

**DISERTASI**

**PERBEDAAN DAN MEKANISME RESPONS BAIK DAN BURUK  
TERHADAP KEMORADIASI PADA KARSINOMA NASOFARING  
MELALUI ANALISIS HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, DAN APOPTOSIS  
PADA JARINGAN BIOPSI**



**ETTY HARY KUSUMASTUTI**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2022**

**DISERTASI**

**PERBEDAAN DAN MEKANISME RESPONS BAIK DAN BURUK  
TERHADAP KEMORADIASI PADA KARSINOMA NASOFARING  
MELALUI ANALISIS HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, DAN APOPTOSIS  
PADA JARINGAN BIOPSI**

**ETTY HARY KUSUMASTUTI**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2022**

**PERBEDAAN DAN MEKANISME RESPONS BAIK DAN BURUK  
TERHADAP KEMORADIASI PADA KARSINOMA NASOFARING  
MELALUI ANALISIS HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, DAN APOPTOSIS  
PADA JARINGAN BIOPSI**

**DISERTASI**

Untuk memperoleh Gelar Doktor  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
dan dipertahankan di hadapan Panitia  
Ujian Akhir Tahap 2 (Terbuka)

**Oleh:**

**ETTY HARY KUSUMASTUTI**

**011617017337**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2022**

## LEMBAR PENGESAHAN

**PERBEDAAN DAN MEKANISME RESPONS BAIK DAN BURUK  
TERHADAP KEMORADIASI PADA KARSINOMA NASOFARING  
MELALUI ANALISIS HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, DAN APOPTOSIS  
PADA JARINGAN BIOPSI**

**TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL 1 MARET 2022**

Oleh:

Promotor



Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M. Si

NIP. 19550705 198003 1 005

Kopromotor



Dr. Muhtarum Yusuf, dr., Sp. THT KL (K), FICS

NIP. 19620831 198903 1 010

**Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai  
oleh panitia penguji pada Ujian Akhir Tahap 1 (Tertutup)  
pada tanggal 16 Februari 2022**

**PANITIA PENGUJI :**

- Ketua** : 1. Dr. Gondo Mastutik, drh., M. Kes
- Anggota** : 2. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M. Si  
3. Dr. Muhtarum Yusuf, dr., Sp. THT KL (K), FICS  
4. Prof. Dr. Bambang Suprijanto, dr., Sp. Rad (K)  
5. Dr. Karyono Mintarum, dr., Sp. PA  
6. Dr. Imam Susilo, dr., Sp. PA (K), FISCAM  
7. Dr. Desak Gede A. Suprabawati, dr., Sp. B (K) Onk  
8. Dr. H. Budi Utomo, dr., M. Kes

Ditetapkan dengan Surat Keputusan  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
Tentang Panitia Penguji Disertasi  
Nomor : 88/ UN3.1.1/HK/2021  
Tanggal : 16 Pebruari 2022

## **SURAT PERNYATAAN PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Etty Hary Kusumastuti  
NIM : 011617017337  
Program Studi : Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
Alamat / No. Telp : Bhakti Husada III No.3 Surabaya / 08155000336

dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli, benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas-namakan saya, serta bukan hasil peniruan atau penjiplakan (*plagiatism*) hasil karya orang lain. Disertasi ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik di Universitas Airlangga, maupun di Perguruan Tinggi lainnya;
2. Dalam Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar kepustakaan;
3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya. Apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis Disertasi ini, serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Surabaya, 1 Maret 2022  
Yang membuat pernyataan



Etty Hary Kusumastuti  
NIM. 011617017337

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah rabbil alamin, segala puji kehadiran Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, atas segala karunia dan ridhaNya yang dilimpahkan kepada saya, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul “Perbedaan dan mekanisme respons baik dan buruk pada karsinoma nasofaring terhadap kemoradiasi melalui analisis HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, dan apoptosis pada jaringan biopsi”. Disertasi ini dapat terselesaikan berkat dukungan dan bimbingan dari promotor dan ko-promotor. Perkenankan pada kesempatan ini saya menghaturkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M. Si, sebagai promotor yang penuh kesabaran, perhatian, memberikan bimbingan serta mendorong semangat yang sangat bermanfaat dalam pelaksanaan dan penyelesaian disertasi ini.
2. Dr. Muhtarum Yusuf, dr., Sp. THT KL (K), FICS, sebagai ko-promotor yang disela-sela kesibukan beliau telah berkenan meluangkan waktu memberikan bimbingan, arahan dalam penyusunan disertasi ini.
3. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA., selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama pendidikan.
4. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG (K) FER selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp. U (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran periode di awal studi yang telah memberikan kesempatan, dan fasilitas kepada saya selama menempuh pendidikan di Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
5. Dr. Joni Wahyuhadi, dr., Sp. BS (K), selaku Direktur Utama RSUD Dr. Soetomo yang telah memberi kesempatan serta berbagai fasilitas kepada saya dalam menyelesaikan disertasi ini.
6. Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., Sp, OG (K) FER selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Prof. Dr. Joewono Soeroso, dr., M. Sc., Sp. PD-KR selaku Ketua Program Studi periode sebelumnya yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh pendidikan.
7. Dr. H. Budi Utomo, dr., M. Kes selaku penguji dan telah berkenan meluangkan waktu memberikan bantuan konsultasi analisis statistik, serta saran dan koreksi untuk kesempurnaan disertasi ini.
8. Prof. Dr. Bambang Suprijanto, dr., Sp. Rad (K) selaku penguji yang telah memberikan arahan dan saran-saran untuk kesempurnaan disertasi ini.
9. Dr. Karyono Mintaroem, dr., Sp. PA selaku penguji yang dengan tulus hati berkenan meluangkan waktu serta memberikan masukan dan arahan untuk kesempurnaan disertasi ini.
10. Dr. Imam Susilo, dr., Sp. PA (K), FISCAM, selaku penguji yang telah memberikan arahan dan saran-saran untuk kesempurnaan disertasi ini.
11. Dr. Gondo Mastutik, drh., M. Kes selaku penguji yang telah memberikan masukan, dorongan semangat serta bantuan dalam pelaksanaan penelitian disertasi ini.

12. Dr. Desak Gede A. Suprabawati, dr., Sp. B (K) Onk selaku penguji, yang telah berkenan memberikan arahan, wawasan dan masukan untuk kesempurnaan disertasi ini.
13. Dr. Dyah Fauziah, Sp. PA (K) selaku Ketua Departemen Patologi Anatomi dan dr. Sjahjenny Mustokoweni, Sp. PA (K), MIAC selaku Ketua Departemen Patologi Anatomi periode sebelumnya yang telah memberikan kesempatan dan motivasi untuk dapat menyelesaikan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
14. Dyah Erawati, dr., Sp. Rad (K) Onk, Anita Widyoningroem, dr., Sp. Rad (K), Triwulan Handarini, dr. Sp. Rad (K) dan Dr. Rosy Setiawati, dr, Sp, Rad (K) yang telah memberikan bantuan kemudahan pengumpulan data sampel penelitian dan memberikan wawasan, arahan dalam penelitian ini.
15. Dr. Anny Setijo Rahaju, dr., Sp. PA (K) dan Priangga Adi Wiratama, dr., Sp. PA, M. H, yang telah memberikan bantuan dan dukungan untuk penyelesaian disertasi ini.
16. Kepada guru-guru saya sejak pendidikan Taman Kanak-Kanak, Sekolah Dasar, Sekolah Menengah Pertama, Sekolah Menengah Atas, para dosen di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, khususnya para dosen di Program Studi Spesialis Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS., almarhum Prof. Soegeng Soekanto Martoprawiro, dr., MS., Sp. PA (K)., PhD, almarhumah Prof. Dr. Roemwerdiniadi, dr., Sp. PA (K)., Prof. Dr. Juliati H. A., dr., M. S., Sp. PA (K), FIAC., Prof. J. H. Lunardi., dr., Sp. PA (K), FIAC., Prof. Dr. Endang Joewarini, dr., Sp. PA (K)., almarhum Soedoko Sidohoetomo, dr., Sp. PA (K)., Koesoemowardojo, dr., Msc, Sp. PA (K)., almarhum Suparman, dr., Sp. PA (K)., Faroek Hoesin., dr., Sp. PA (K)., Troef Soemarno., dr., MS., Sp., PA (K)., almarhum Dr. Watadianta, dr., Sp. PA (K)., MS., Tulus Panuwun., dr. MS, Sp. PA (K), almarhumah Eka Kusumowardhani., dr., Sp. PA (K), saya ucapkan terima kasih yang sebanyak-banyaknya atas bimbingan dan pengajaran yang diberikan selama masa pendidikan saya. Semoga Allah SWT membalas dengan pahala yang berlipat ganda.
17. Kepada seluruh staf pengajar di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Dr. Willy Sandhika, dr., M. Si., Sp. PA (K), Nila Kurniasari., dr., Sp. PA (K), Alphania Rahnayu., dr., Sp. PA (K)., Heriyawati., dr., Sp. PA (K)., Grace Ariani, dr., Sp. PA (K)., Ridholia, dr., Sp. PA (K) terima kasih atas dukungan, doa, bantuan dan kerjasama selama ini.
18. Staf pengajar Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan wawasan ilmu yang sangat berharga selama menempuh pendidikan Doktor, semoga Allah SWT melimpahkan pahala berlipat ganda.
19. Seluruh rekan seangkatan mahasiswa Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga angkatan 2016 atas dorongan semangat dan kerjasamanya yang luar biasa untuk menyelesaikan studi.
20. Ika Agustina Kiswari, Amd., SKM., Tamyah Dhita H R, S. Tr. Ak., ibu Lavatini Amd., SKM., dan seluruh teknisi laboratorium beserta karyawan

yang telah membantu pelaksanaan proses laboratorium dalam penelitian ini. Semoga Allah SWT melimpahkan pahala berlipat ganda.

21. Kepada saudara-saudaraku tercinta Didik Hary Purwanto, almarhum Hary Prasetyo, Titien Hary Agustantina, drg., M. Kes, Dr. Kurniawan Hary Putranto., ST., MM., yang selalu memberikan doa dan dukungannya kepada saya.
22. Kedua orang tua saya tercinta almarhum ayahanda Drs. A. Haryanto, MM., dan almarhumah ibunda Wulyaningsih yang telah mengasuh dan mendidik dengan penuh kasih sayang. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan pahala berlipat ganda dan memberikan tempat di surga kelak.
23. Kedua mertua tercinta almarhum ayahanda Soedoko Sidohoetomo, dr., Sp. PA (K) dan almarhumah ibunda Prof. Dr. Roemwerdiniadi, dr., Sp. PA (K) yang senantiasa memberikan restu, dukungan dan kasih sayang. Semoga Allah SWT melimpahkan pahala yang berlipat ganda dan memberikan tempat di surga kelak.
24. Suami saya, Ananto Sidohutomo, dr. MARS atas restu, pengertian, kesabaran dan selalu memberikan dorongan semangat, dukungan dan kasih sayang.
25. Serta kepada anak-anak saya terkasih Deanandya, ST. M. Sc, Muhammad Alim Ananto, S. Ked beserta anak menantu Sylvani Kumala Ulinnuha, S. Pd, M. Pd., Muhammad Arif Ananto dan Muhammad Ariq Ananto atas kasih sayang, dukungan dan dorongan semangat yang sangat berarti selama proses pendidikan doktor ini.

Surabaya, 1 Maret 2022

Penulis

## RINGKASAN

### PERBEDAAN DAN MEKANISME RESPONS BAIK DAN BURUK TERHADAP KEMORADIASI PADA KARSINOMA NASOFARING MELALUI ANALISIS HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, DAN APOPTOSIS PADA JARINGAN BIOPSI

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan tumor ganas yang sering dijumpai di wilayah Asia Tenggara, termasuk di Indonesia. Jenis KNF yang tersering adalah *non keratinizing squamous cell carcinoma, undifferentiated sub-type*. Sebagian besar KNF sensitif terhadap kemoradiasi, yang ditandai dengan tidak ada sel tumor pada biopsi sesudah kemoradiasi, tetapi terdapat penderita KNF dengan respons buruk dimana masih didapatkan sel tumor yang *viable* sesudah kemoradiasi. Jalur molekuler yang berperan menimbulkan perbedaan respons kemoradiasi pada KNF hingga saat ini belum diketahui dengan jelas.

Tumor ganas padat sering berada dalam kondisi kekurangan oksigen. Pada kondisi hipoksia, *hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ), suatu faktor transkripsi pengikat DNA, tidak didegradasi dan berperan mengaktifkan serangkaian gen termasuk promotor *cluster differentiation 133* (CD133), yaitu suatu penanda sel punca kanker, yang mengarah pada penghambatan apoptosis. *Superoxide dismutase* (SOD), suatu *metalloenzyme* yang berperan menurunkan *reactive oxygen species*, dan *heat shock protein 70* (HSP70) suatu pendamping molekuler yang berperan dalam pelipatan protein, keduanya bertindak sebagai pelindung sel terhadap berbagai jejas antara lain terhadap agen radiasi dan kemoterapi. Seluruh biomarker tersebut diduga dapat menghambat apoptosis sel tumor, sehingga sel tumor tetap *survive* dan mempengaruhi respons kemoradiasi.

Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan perbedaan dan mekanisme antara respons baik dan buruk terhadap kemoradiasi pada KNF dengan cara mempelajari perbedaan ekspresi biomarker HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70 dan sel *survive* sebelum dan sesudah kemoradiasi.

Penelitian ini merupakan studi observasional analitik yang dilakukan pada sampel blok parafin jaringan biopsi penderita KNF dengan diagnosis awal *non-keratinizing squamous cell carcinoma undifferentiated sub type* di Unit Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo periode Januari 2014 – Desember 2019. Jumlah sampel penelitian adalah 34 pasang, sebelum dan sesudah terapi, terdiri dari 18 pasang respons baik dan 16 pasang respons buruk. Sampel jaringan diperoleh dari penderita KNF stadium lanjut yang mendapat terapi radiasi eksternal 70 Gy serta mendapat regimen kemoterapi berupa *platinum based* dan regimen lain. Ekspresi HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD dan HSP70 dievaluasi melalui pewarnaan imunohistokimia, sedangkan sel *survive* dievaluasi berdasarkan sel yang tidak terwarnai dengan metode *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling assay*. Data yang diperoleh dilakukan analisis *bivariate* komparasi untuk menentukan perbedaan antara respons baik dan respons buruk, sebelum dan sesudah kemoradiasi. Analisis menggunakan Uji T 2 sampel bebas bila distribusi data normal dan homogen, apabila data tidak normal menggunakan Uji Mann Whitney.

Hasil data perubahan sebelum dan sesudah kemoradiasi dilakukan analisis jalur menggunakan Smart PLS3.

Hasil uji Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan signifikan ekspresi HIF-1 $\alpha$  sebelum kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,002$ , dan terdapat perbedaan signifikan ekspresi HIF-1 $\alpha$  sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,001$ . Hasil uji T2 sampel bebas menunjukkan perbedaan yang signifikan perubahan ekspresi HIF-1 $\alpha$  sebelum dan sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,001$ . Mayoritas tumor padat dalam kondisi hipoksia. Sel tumor dalam melawan kondisi hipoksia tersebut dengan cara mendelegasikan kepada HIF1 $\alpha$  untuk mengatur berbagai fungsi dengan tujuan melakukan adaptasi terhadap kondisi hipoksia. Cyclin D1, p21 dan p27 merupakan gen target dari HIF-1 $\alpha$  yang dapat memodifikasi siklus perkembangan sel tumor. *Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  mampu menimbulkan radioresisten sel kanker melalui berbagai cara yaitu melalui jalur metabolisme glukosa, melalui jalur *epithelial-mesenchymal transitional* (EMT), serta pengendalian siklus sel dan autofagi. *Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  mampu mengatur peningkatan protein anti apoptosis yaitu Bcl-XL dan Bcl-2, dan menurunkan protein yang berperan dalam apoptosis yaitu Bak dan Bax, sehingga efek sitotoksik kemoterapi melemah. Akumulasi HIF-1 $\alpha$  mampu meningkatkan gen *proangiogenic* termasuk VEGF, sehingga menghasilkan pembuluh darah yang tidak sempurna. Hal tersebut menyebabkan gangguan aliran obat sehingga menurunkan efek kemoterapi.

Hasil uji Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan signifikan ekspresi CD133 sebelum kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,046$ , terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi CD133 sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,001$  dan terdapat perbedaan yang signifikan perubahan ekspresi CD133 sebelum dan sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,001$ . Literatur menyebutkan bahwa CD133 berkorelasi dengan tingkat diferensiasi, stadium, metastasis jauh, *disease free interval* serta *overall survival* yang buruk pada keganasan berbagai organ. Hal tersebut antara lain karena CD133 dapat mengaktivasi Wnt/  $\beta$  catenin yang selanjutnya berinteraksi dengan faktor transkripsi sehingga mempercepat pertumbuhan sel kanker. CD133 juga mampu mempromosi jalur sinyal PI3K-Akt, sehingga mendorong pertumbuhan sel tumor dan menghambat apoptosis. Paparan radiasi juga dapat meningkatkan *stemness* sel tumor, antara lain akibat radiasi menimbulkan instabilitas gen dan juga mempromosikan jalur EMT.

Hasil uji T2 sampel bebas menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi SOD sebelum kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,002$ . Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa SOD sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik lebih tinggi dibandingkan KNF respons buruk. Hal tersebut karena tumor mengalami hipoksia sehingga mengaktifkan HIF-1 $\alpha$  yang mampu menurunkan tingkat c-Myc, sehingga menekan biogenesis mitokondria dan respirasi. Hal tersebut menghalangi produksi ROS, sehingga dihasilkan SOD yang rendah pula. Hasil uji Mann Withney menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi SOD sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p=0,001$ . Hasil uji T2 sampel bebas menunjukkan terdapat

perbedaan yang signifikan perubahan ekspresi SOD sebelum dan sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p = 0,001$ . Hal tersebut menunjukkan bahwa kemoradiasi berperan menimbulkan kematian sel tumor. Namun pada tumor dengan ekspresi SOD tinggi mampu mengkatalisis dismutase dari superoksida radikal bebas anion menjadi oksigen dan hydrogen peroksida sehingga mencegah kematian sel tumor.

Hasil uji T2 sampel bebas menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi HSP70 sebelum kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p = 0,046$ . Hasil uji Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi HSP70 sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p = 0,001$ , dan terdapat perbedaan yang signifikan perubahan ekspresi HSP70 sebelum dan sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p = 0,001$ . HSP70 merupakan molekul pendamping yang berperan dalam pengaturan pelipatan protein, mampu mencegah degradasi protein dan memastikan tercapainya stabilisasi fungsional berbagai protein di dalam sel yang berada dalam kondisi tertekan, misalnya pada pertumbuhan kanker sehingga dalam penelitian ini ekspresi HSP70 lebih tinggi ditemukan pada KNF respons buruk. HSP70 berperan sebagai protein anti-apoptosis baik pada jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik.

Hasil uji Mann Whitney dalam penelitian ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan persentase sel tumor yang *survive* sebelum kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p = 0,088$ . Hal itu karena kedua kelompok tersebut belum mendapat induksi radiasi maupun kemoterapi. Hasil uji Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan persentase sel tumor yang *survive* sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p = 0,001$ , serta terdapat perbedaan yang signifikan perubahan persentase sel tumor yang *survive* sebelum dan sesudah kemoradiasi pada respons baik dan buruk dengan nilai  $p = 0,001$ . Hal tersebut menunjukkan bahwa pada KNF respons baik, pemberian kemoradiasi bermanfaat menimbulkan kematian sel tumor. Sedangkan pada KNF respons buruk yang bersifat progresif, sering mengandung sel tumor dengan mutasi p53, sehingga kehilangan fungsi sebagai gen penekan tumor. Hal tersebut mengarah pada kelangsungan hidup sel tumor, hambatan apoptosis dan menimbulkan respons kemoradiasi yang buruk.

Hasil analisis jalur menunjukkan bahwa terdapat pengaruh signifikan HIF-1 $\alpha$  terhadap CD133 dengan  $p = 0,001$ , namun tidak terdapat pengaruh signifikan CD133 terhadap sel *survive* dengan  $p = 0,972$ . Hal tersebut karena modulasi CD133 dipengaruhi oleh kondisi hipoksia dan disfungsi mitokondria. Hipoksia menyebabkan aktivasi promotor CD133 oleh HIF-1 $\alpha$ . Aktivitas CD133 tergantung pada aktivasi dari promotor-promotornya, antara lain oleh OCT4, SOX2 dan Notch1, selain oleh HIF-1 $\alpha$ . Aktivasi CD133 juga dipengaruhi oleh fosforilasi tyrosine 828 pada *c terminal domain*. Terdapat pengaruh signifikan SOD dan HSP70 terhadap sel *survive* dengan  $p = 0,047$  dan  $p = 0,001$ , serta terdapat pengaruh signifikan sel *survive* terhadap respons kemoradiasi dengan  $p = 0,001$ .

Penelitian ini menjelaskan terdapat perbedaan yang signifikan perubahan ekspresi HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70 dan sel *survive* sebelum dan sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk. Mekanisme respons

kemoradiasi pada KNF ditentukan oleh jalur SOD, HSP70 dan sel *survive*, dimana pada respons buruk terjadi peningkatan HSP70, SOD dan sel *survive*.

## *SUMMARY*

### **THE DIFFERENCES AND MECHANISMS OF GOOD AND POOR CHEMORADIATION RESPONSES OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA THROUGH ANALYSIS OF HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, AND APOPTOSIS IN TISSUE BIOPSIES**

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a common malignant tumor found in Southeast Asia, including Indonesia. Non keratinizing squamous cell carcinoma undifferentiated sub-type, however, is more commonly encountered in Dr. Soetomo Hospital. Although the majority of NPC are sensitive to chemoradiation, characterized by the absence of tumor cells on follow-up biopsies, there is a significant poor response that is still present in viable tumor cells after chemoradiation. Unfortunately, the molecular pathway that causes differences in the chemoradiation response in NPC is not yet clearly understood.

Oxygen deprivation is common in malignant solid tumors. Under hypoxia, hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), DNA binding transcription factors are undegraded and act as an activator to a series of genes including promoter of cluster differentiation 133 (CD133), a cancer stem cells marker which leads to inhibition of apoptosis. Superoxide dismutase (SOD), a metalloenzyme that plays a role in reducing reactive oxygen species, and heat shock protein 70 (HSP70), a molecular chaperone that plays a role in protein folding, both of which act as cytoprotector against various types of injury, including radiation and chemotherapy agents. All of these biomarkers are thought to be able to inhibit apoptosis, leading cells to survive and they also affect the chemoradiation response.

The study aims is to elucidate the differences and mechanism of good and poor chemoradiation responses of NPC by studying the differences in the expressions of HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, and cell survival before and after chemoradiation.

This research is an analytic observational study conducted on formalin-fixed paraffin embedded archives of tissue biopsy of NPC patients with an initial diagnosis of non-keratinizing squamous cell carcinoma undifferentiated sub-type in the Anatomical Pathology Unit of Dr. Soetomo General Hospital period January 2014 – December 2019. Samples are 34 pairs of pre and post-chemoradiation, composed of 18 pairs of good responses and 16 pairs of poor responses. Tissue samples were obtained from patients who received 70 Gy external radiation and combined platinum-based chemotherapy. Immunohistochemistry stain was performed to evaluate expressions of HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, and HSP70, while cell survivals were evaluated by TUNEL assay. The data were tested by comparative bivariate analysis to determine the difference between good and poor responses, before and after chemoradiation. Analysis using t-test 2-sample was chosen if the data distribution was normal and homogeneous. If the data had non-normal distribution, analysis using the Mann

Whitney Test was chosen. The results of delta before and after chemoradiation data were carried out by path analysis using Smart PLS3.

Mann Whitney result showed that there were significant differences in expressions of HIF-1 $\alpha$  before chemoradiation in good and poor response  $p=0,002$ , after chemoradiation in good and poor response ( $p=0,001$ ), delta before and after chemoradiation in good and poor response ( $p=0,001$ ). The majority of solid tumors are hypoxic. Tumor cells fight hypoxic conditions by delegating to HIF1 $\alpha$  to regulate various functions to adapt to hypoxic conditions. HIF 1 is a transcription factor that induces a series of genes. Cyclin D1, p21, and p27 are the target genes of HIF-1 $\alpha$  that can modify the cell cycle of tumor growth. HIF-1 $\alpha$  is able to cause radioresistance through various ways including through glucose metabolism pathways, the epithelial-mesenchymal transitional pathway, as well as cell cycle control and autophagy. HIF-1 $\alpha$  is able to regulate the increase in anti-apoptotic proteins such as Bcl-XL and Bcl-2, and decrease proteins that play a role in apoptosis such as Bak and Bax, thereby weakening the cytotoxic effect of chemotherapy. HIF-1 $\alpha$  was able to upregulate the increase in anti-apoptotic proteins such as Bcl-XL and Bcl-2, and block proteins that play a role in apoptosis such as Bak and Bax, leading to a weakened cytotoxic effect of chemotherapy. HIF-1 $\alpha$  accumulation is able to increase proangiogenic genes including VEGF, resulting in imperfect blood vessels. This causes disruption of drug flow thereby reducing the effect of chemotherapy.

The result of Mann Withney tests showed there were significant differences in expression of CD133 before chemoradiation in good and poor response ( $p=0,046$ ), after chemoradiation in good and poor response ( $p=0,001$ ), delta before and after chemoradiation in good and poor response ( $p=0,001$ ). The literature states that CD133 is correlated with the level of differentiation, stage, distant metastases, disease free interval, and poor overall survival in malignancies of various organs. This is because CD133 can activate Wnt/ $\beta$  catenin which then interacts with transcription factors thereby accelerating the growth of cancer cells. CD133 is capable of promoting the PI3K-Akt signaling pathway, leading to promote tumor cell growth and inhibit apoptosis. Radiation exposure can also increase tumor cell stemness, through radiation causing gene instability and promoting the EMT pathway

The result of t-test 2 sample showed that there were significant differences in expression of SOD before chemoradiation in good and poor response ( $p=0,002$ ). The results of this study showed that the SOD before chemoradiation in NPC good response was higher than in NPC poor response. This is because the tumor is hypoxic, so it activates HIF-1 $\alpha$  which can reduce c-Myc levels, thereby suppressing mitochondrial biogenesis and respiration. This prevents the production of ROS, resulting in low SOD as well. The result of Mann Whitney tests showed that there were significant differences in expression of SOD after chemoradiation in good and poor response ( $p=0,001$ ) and delta before and after chemoradiation in good and poor response ( $p=0,001$ ). This indicates that chemoradiation plays a role in causing tumor cell death. However, tumors with high SOD expression were able to catalyze the dismutase of superoxide anion free radicals into oxygen and hydrogen peroxidase, thereby preventing tumor cell death.

The result of t-tests 2-sample showed that there were significant differences in expression of HSP70 before chemoradiation in good and poor response ( $p=0,044$ ), after chemoradiation in good and poor response ( $p=0,001$ ), delta before and after chemoradiation in good and poor response ( $p=0,001$ ). HSP70, a chaperone molecule that plays a role in regulating protein folding, is able to prevent protein degradation and ensure the achievement of functional stabilization of various proteins in cells under stress conditions, for example in cancer growth. HSP70 acts as an anti-apoptotic protein in both the intrinsic and extrinsic pathways.

The result of Mann Whitney tests showed that there was no significant difference of apoptosis which was evaluated from cell tumor survival before chemoradiation in good and poor response ( $p=0,088$ ). This was because the two groups had not received radiation induction or chemotherapy. But there were significant differences after chemoradiation in good and poor response ( $p=0,001$ ), and delta before and after chemoradiation in good and poor response ( $p=0,001$ ). This shows that chemoradiation is beneficial in causing tumor cell death, resulting in a good NPC response. Whereas in NPC poor response, a progressive tumor, is often containing tumor cells with p53 mutations, thus they lose their function as tumor suppressor genes. This leads to tumor cell survival, inhibits apoptosis, and causes a poor response.

The result of path analysis showed that there was a significant effect of HIF-1 $\alpha$  on CD133 ( $p=0,001$ ), but there was no significant effect of CD133 on apoptosis ( $p=0,972$ ). This is because CD133 modulation is influenced by hypoxia and mitochondrial dysfunction. Hypoxia leads to activation of the CD133 promoter by HIF-1 $\alpha$ . CD133 activity depends on the activation of its promoters, namely OCT4, SOX2 Notch1, in addition to HIF- $\alpha$ -1. CD133 activation is also affected by phosphorylation of tyrosine 828 in the c-terminal domain. There were significant effects of SOD and HSP70 on cell survival ( $p=0,047$  and  $p=0,001$ ), and there was a significant effect of cell survival on chemoradiation responses ( $p=0,001$ ).

In this study, it was proven that there were significant differences in expressions among HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, and cell survival delta before and after chemoradiation in good and poor responses of NPC. The mechanisms of chemoradiation responses in NPC are determined by SOD, HSP70, and cell survival, which in poor responses showed increases in expressions of SOD, HSP70, and cell survival.

## ***ABSTRACT***

### **THE DIFFERENCES AND MECHANISMS OF GOOD AND POOR CHEMORADIATION RESPONSES OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA THROUGH ANALYSIS OF HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, AND APOPTOSIS IN TISSUE BIOPSIES**

**Background:** Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is commonly sensitive to chemoradiation, but it has a significant poor response. In addition, the molecular pathway in the chemoradiation responses in NPC is not yet clearly understood.

**Objective:** To elucidate the differences and mechanism of good and poor chemoradiation responses of NPC by studying the expression of HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, and cell survival.

**Methods:** This study was conducted on FFPE tissue biopsy of non-keratinizing squamous cell carcinoma undifferentiated sub-type of NPC patients in Dr. Soetomo Hospital period 2014 – 2019. Samples are 34 pairs of pre and post-chemoradiation, composed of 18 pairs of good and 16 pairs of poor responses. All patients received 70 Gy external radiation and combined platinum-based chemotherapy. Immunohistochemistry was performed to evaluate HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD and HSP70, while cell survivals were evaluated by TUNEL assay. The data were tested by comparative bivariate and path analysis.

**Result:** There were significant differences in the delta expression of HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, and cell survival before and after chemotherapy in good and poor responses, each of which has a p-value of 0,001. There was a significant effect of HIF-1 $\alpha$  on CD133 (p-value 0,001), but no of CD133 on cell survival (p-value 0,972). There were significant effects of SOD and HSP70 on cell survival (p-value of 0,047 and 0,001), and of cell survival on chemoradiation response (p-value of 0,001).

**Conclusion:** There were significant differences in the delta expressions among HIF-1 $\alpha$ , CD133, SOD, HSP70, and cell survival in good and poor chemoradiation responses of NPC. The mechanisms of chemoradiation responses in NPC are determined by SOD, HSP70, and cell survival, in which poor response showed increased expressions of SOD, HSP70, and cell survival.

**Keyword:** Nasopharyngeal carcinoma, chemoradiation, and chemoradiation response.

## DAFTAR ISI

### Halaman

|                                                             |       |
|-------------------------------------------------------------|-------|
| Sampul Depan                                                |       |
| Sampul Dalam .....                                          | i     |
| Halaman awal disertasi .....                                | ii    |
| Persyaratan Gelar .....                                     | iii   |
| Lembar Pengesahan .....                                     | iv    |
| Penetapan Panitia Penguji .....                             | v     |
| Pernyataan Orisinalitas Disertasi .....                     | vi    |
| Ucapan Terima Kasih .....                                   | vii   |
| Ringkasan. ....                                             | x     |
| <i>Summary</i> .. ....                                      | xiv   |
| <i>Abstract</i> .. ....                                     | xvii  |
| DAFTAR ISI .....                                            | xvii  |
| DAFTAR TABEL .....                                          | xxii  |
| DAFTAR GAMBAR .....                                         | xxiv  |
| DAFTAR LAMPIRAN .....                                       | xxvi  |
| DAFTAR SINGKATAN .....                                      | xxvii |
| <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>                                    |       |
| 1.1 Latar Belakang .....                                    | 1     |
| 1.2 Rumusan Masalah .....                                   | 6     |
| 1.3 Tujuan Penelitian .....                                 | 8     |
| 1.3.1 Tujuan umum .....                                     | 8     |
| 1.3.2 Tujuan khusus .....                                   | 8     |
| 1.4 Manfaat Penelitian .....                                | 9     |
| 1.4.1 Manfaat teoritis .....                                | 9     |
| 1.4.2 Manfaat praktis .....                                 | 9     |
| <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>                               |       |
| 2.1 Karsinoma Nasofaring .....                              | 10    |
| 2.1.1 Epidemiologi karsinoma nasofaring .....               | 10    |
| 2.1.2 Etiologi dan faktor risiko karsinoma nasofaring ..... | 11    |
| 2.1.3 Gambaran klinis karsinoma nasofaring .....            | 13    |

|                                                           |                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.4                                                     | Stadium karsinoma nasofaring.....                                                     | 14 |
| 2.1.5                                                     | Histopatologi karsinoma nasofaring .....                                              | 15 |
| 2.1.6                                                     | Penatalaksanaan karsinoma nasofaring.....                                             | 18 |
| 2.1.7                                                     | Faktor prognosis karsinoma nasofaring .....                                           | 22 |
| 2.2                                                       | <i>Hypoxia Inducible Factor-1<math>\alpha</math> (HIF-1<math>\alpha</math>)</i> ..... | 23 |
| 2.3                                                       | <i>Cluster Differentiation 133 (CD133)</i> .....                                      | 30 |
| 2.4                                                       | <i>Superoxide Dismutase (SOD)</i> .....                                               | 36 |
| 2.5                                                       | <i>Heat Shock Protein 70 (HSP70)</i> .....                                            | 38 |
| 2.6                                                       | Jejas pada Sel dan Apoptosis .....                                                    | 45 |
| 2.6.1                                                     | Jejas pada sel.....                                                                   | 45 |
| 2.6.2                                                     | Apoptosis .....                                                                       | 48 |
| 2.6.2.1                                                   | Jalur intrinsik apoptosis .....                                                       | 49 |
| 2.6.2.2                                                   | Jalur ekstrinsik apoptosis .....                                                      | 50 |
| 2.7                                                       | Radioterapi dan Kemoterapi .....                                                      | 52 |
| 2.7.1                                                     | Radioterapi.....                                                                      | 52 |
| 2.7.2                                                     | Kemoterapi.....                                                                       | 58 |
| <b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> |                                                                                       |    |
| 3.1                                                       | Kerangka Konseptual Penelitian.....                                                   | 64 |
| 3.2                                                       | Hipotesis Penelitian .....                                                            | 67 |
| <b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>                            |                                                                                       |    |
| 4.1                                                       | Rancangan Penelitian.....                                                             | 69 |
| 4.2                                                       | Populasi dan Sampel Penelitian .....                                                  | 70 |
| 4.2.1                                                     | Populasi.....                                                                         | 70 |
| 4.2.2                                                     | Sampel penelitian.....                                                                | 70 |
| 4.3                                                       | Variabel Penelitian.....                                                              | 71 |
| 4.4                                                       | Definisi Operasional .....                                                            | 72 |
| 4.5                                                       | Alat dan Bahan Penelitian.....                                                        | 74 |
| 4.5.1                                                     | Alat penelitian .....                                                                 | 74 |
| 4.5.2                                                     | Bahan penelitian.....                                                                 | 74 |
| 4.6                                                       | Cara Kerja .....                                                                      | 75 |
| 4.7                                                       | Kerangka Operasional Penelitian.....                                                  | 76 |
| 4.8                                                       | Tempat dan Waktu Penelitian .....                                                     | 76 |
| 4.9                                                       | Analisis Data.....                                                                    | 77 |
| 4.10                                                      | Analisis Jalur.....                                                                   | 77 |

|              |                                                                                                                           |           |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>BAB 5</b> | <b>HASIL PENELITIAN .....</b>                                                                                             | <b>79</b> |
| 5.1          | Karakteristik Sampel Penelitian.....                                                                                      | 81        |
| 5.2          | Ekspresi HIF-1 $\alpha$ .....                                                                                             | 83        |
| 5.2.1        | Perbedaan ekspresi HIF-1 $\alpha$ sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....                       | 83        |
| 5.2.2        | Perbedaan ekspresi HIF-1 $\alpha$ sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....                       | 85        |
| 5.2.3        | Perbedaan perubahan ekspresi HIF-1 $\alpha$ sebelum dan sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk ..... | 85        |
| 5.3          | Ekspresi CD133 .....                                                                                                      | 86        |
| 5.3.1        | Perbedaan ekspresi CD133 sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....                                | 87        |
| 5.3.2        | Perbedaan ekspresi CD133 sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....                                | 88        |
| 5.3.3        | Perbedaan perubahan ekspresi CD133 sebelum dan sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....          | 89        |
| 5.4          | Ekspresi SOD .....                                                                                                        | 90        |
| 5.4.1        | Perbedaan ekspresi SOD sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....                                  | 91        |
| 5.4.2        | Perbedaan ekspresi SOD sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....                                  | 91        |
| 5.4.3        | Perbedaan perubahan ekspresi SOD sebelum dan sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....            | 92        |
| 5.5          | Ekspresi HSP70 .....                                                                                                      | 93        |
| 5.5.1        | Perbedaan ekspresi HSP70 sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....                                | 94        |
| 5.5.2        | Perbedaan ekspresi HSP70 sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....                                | 95        |
| 5.5.3        | Perbedaan perubahan ekspresi HSP70 sebelum dan sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....          | 96        |
| 5.6          | Apoptosis .....                                                                                                           | 96        |
| 5.6.1        | Perbedaan sel tumor yang <i>survive</i> sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk .....                 | 97        |

|       |                                                                                                                                    |     |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.6.2 | Perbedaan sel tumor yang <i>survive</i> sesudah kemoradiasi pada KNF<br>respons baik dan respons buruk .....                       | 98  |
| 5.6.3 | Perbedaan perubahan sel tumor yang <i>survive</i> sebelum dan sesudah<br>kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk ..... | 99  |
| 5.7   | Mekanisme respons kemoradiasi pada KNF.....                                                                                        | 100 |

## **BAB 6 PEMBAHASAN**

|     |                                             |     |
|-----|---------------------------------------------|-----|
| 6.1 | Karakteristik Sampel Penelitian.....        | 103 |
| 6.2 | Ekspresi HIF-1 $\alpha$ .....               | 103 |
| 6.3 | Ekspresi CD133 .....                        | 109 |
| 6.4 | Ekspresi SOD.....                           | 113 |
| 6.5 | Ekspresi HSP70 .....                        | 115 |
| 6.6 | Apoptosis .....                             | 119 |
| 6.7 | Mekanisme respons kemoradiasi pada KNF..... | 121 |
| 6.8 | Temuan Baru yang Dihasilkan.....            | 129 |
| 6.9 | Keterbatasan.....                           | 129 |

## **BAB 7 PENUTUP**

|     |                  |     |
|-----|------------------|-----|
| 7.1 | Kesimpulan ..... | 130 |
| 7.2 | Saran .....      | 132 |

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b> | <b>133</b> |
|-----------------------------|------------|

|                      |            |
|----------------------|------------|
| <b>LAMPIRAN.....</b> | <b>144</b> |
|----------------------|------------|

## DAFTAR TABEL

|                                                                                                                              | Halaman |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Tabel 2.1 Klasifikasi TNM KNF AJCC <i>cancer staging manual</i> edisi 8 .....                                                | 14      |
| Tabel 2.2 Pengelompokan stadium KNF .....                                                                                    | 15      |
| Tabel 4.1 Definisi operasional penelitian .....                                                                              | 72      |
| Tabel 5.1 Distribusi kelompok usia penderita KNF.....                                                                        | 81      |
| Tabel 5.2 Distribusi kelompok jenis kelamin penderita KNF.....                                                               | 82      |
| Tabel 5.3 Distribusi stadium KNF .....                                                                                       | 82      |
| Tabel 5.4 Tabel distribusi jenis kemoterapi penderita KNF .....                                                              | 83      |
| Tabel 5.5 Ekspresi HIF-1 $\alpha$ sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik<br>dan respons buruk .....                       | 84      |
| Tabel 5.6 Ekspresi HIF-1 $\alpha$ sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik<br>dan respons buruk .....                       | 85      |
| Tabel 5.7 Perubahan ekspresi HIF-1 $\alpha$ sebelum dan sesudah kemoradiasi pada<br>KNF respons baik dan respons buruk ..... | 86      |
| Tabel 5.8 Ekspresi CD133 sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik<br>dan respons buruk. ....                                | 88      |
| Tabel 5.9 Ekspresi CD133 sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik<br>dan respons buruk .....                                | 89      |
| Tabel 5.10 Perubahan ekspresi CD133 sebelum dan sesudah kemoradiasi pada<br>KNF respons baik dan respons buruk .....         | 90      |
| Tabel 5.11 Ekspresi SOD sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik dan<br>respons buruk .....                                 | 91      |
| Tabel 5.12 Ekspresi SOD sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan<br>respons buruk .....                                 | 92      |
| Tabel 5.13 Perubahan ekspresi SOD sebelum dan sesudah kemoradiasi pada<br>KNF respons baik dan respons buruk .....           | 93      |
| Tabel 5.14 Ekspresi HSP70 sebelum kemoradiasi pada KNF respons baik<br>dan respons buruk .....                               | 95      |
| Tabel 5.15 Ekspresi HSP70 sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik<br>dan respons buruk .....                               | 95      |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabel 5.16 Perubahan ekspresi HSP70 sebelum dan sesudah kemoradiasi pada<br>KNF respons baik dan respons buruk .....                          | 96  |
| Tabel 5.17 Persentase sel tumor yang <i>survive</i> sebelum kemoradiasi pada<br>KNF respons baik dan respons buruk .....                      | 98  |
| Tabel 5.18 Persentase sel tumor yang <i>survive</i> sesudah kemoradiasi pada<br>KNF respons baik dan respons buruk .....                      | 99  |
| Tabel 5.19 Perubahan persentase sel tumor yang <i>survive</i> sebelum dan<br>sesudah kemoradiasi pada KNF respons baik dan respons buruk..... | 100 |
| Tabel 5.20 Data analisis jalur koefisien korelasi antar variabel.....                                                                         | 100 |
| Tabel 5.21 Data analisis jalur <i>r square</i> .....                                                                                          | 102 |

## DAFTAR GAMBAR

|                                                                                                                      | Halaman |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Gambar 2.1 Gambar mikroskopis karsinoma nasofaring sub tipe<br><i>non keratinizing squamous cell carcinoma</i> ..... | 16      |
| Gambar 2.2 Gambar mikroskopis karsinoma nasofaring sub tipe<br><i>keratinizing squamous cell carcinoma</i> .....     | 17      |
| Gambar 2.3 Gambar mikroskopis karsinoma nasofaring sub tipe<br><i>basaloid squamous cell carcinoma</i> .....         | 17      |
| Gambar 2.4 Struktur HIF-1 $\alpha$ .....                                                                             | 27      |
| Gambar 2.5 Imunohistokimia HIF-1 $\alpha$ .....                                                                      | 30      |
| Gambar 2.6 Skema struktur CD133 .....                                                                                | 32      |
| Gambar 2.7 Representasi skematis 5 wilayah promotor gen CD133 .....                                                  | 32      |
| Gambar 2.8 Imunohistokimia CD133 .....                                                                               | 36      |
| Gambar 2.9 Imunohistokimia SOD .....                                                                                 | 38      |
| Gambar 2.10 Struktur HSP70 dengan bagian-bagian aksinya .....                                                        | 41      |
| Gambar 2.11 Imunohistokimia HSP70 .....                                                                              | 44      |
| Gambar 2.12 Apoptosis jalur intrinsik dan ekstrinsik .....                                                           | 51      |
| Gambar 2.13 Gambar mikroskopis TUNEL <i>assay</i> .....                                                              | 52      |
| Gambar 2.14 Radioterapi menimbulkan efek langsung dan tidak langsung .....                                           | 54      |
| Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian .....                                                                      | 64      |
| Gambar 4.1 Rancangan penelitian .....                                                                                | 69      |
| Gambar 4.2 Kerangka operasional penelitian .....                                                                     | 76      |
| Gambar 4.3 Analisis jalur .....                                                                                      | 77      |
| Gambar 5.1 Gambar mikroskopis KNF <i>non keratinizing squamous<br/>cell carcinoma undifferentiated subtype</i> ..... | 80      |
| Gambar 5.2 Gambar mikroskopis ekspresi HIF-1 $\alpha$ pada KNF .....                                                 | 84      |
| Gambar 5.3 Gambar mikroskopis ekspresi CD133 pada KNF .....                                                          | 87      |
| Gambar 5.4 Gambar mikroskopis ekspresi SOD pada KNF .....                                                            | 90      |
| Gambar 5.5 Gambar mikroskopis ekspresi HSP70 pada KNF .....                                                          | 94      |
| Gambar 5.6 Gambar mikroskopis apoptosis pada KNF .....                                                               | 97      |

|            |                                                                                                                      |     |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Gambar 5.7 | Diagram mekanisme respons kemoradiasi antar variabel<br>berdasarkan koefisien korelasi ( $\beta$ ) dan nilai p ..... | 101 |
| Gambar 5.8 | Diagram mekanisme hubungan antar variabel yang<br>menunjukkan pengaruh total ( $r^2$ ) .....                         | 102 |

## DAFTAR LAMPIRAN

|                                                                                | Halaman |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Lampiran 1 Keterangan Kelaikan Etik Penelitian .....                           | 144     |
| Lampiran 2 Prosedur Pewarnaan Imunohistokimia .....                            | 145     |
| Lampiran 3 Prosedur Deteksi Apoptosis dengan Pewarnaan TUNEL <i>assay</i> .... | 148     |
| Lampiran 4 Katalog HIF-1 $\alpha$ (Novus).....                                 | 149     |
| Lampiran 5 Katalog CD 133 (5E3), Invitrogen .....                              | 152     |
| Lampiran 6 Katalog SOD-1 (G-11).....                                           | 153     |
| Lampiran 7 Katalog HSP 70 (3A3).....                                           | 154     |
| Lampiran 8 Katalog Apo BrdU TUNEL <i>assay</i> .....                           | 155     |
| Lampiran 9 Artikel Jurnal .....                                                | 159     |
| Lampiran 9 Hasil Analisis Statistik .....                                      | 173     |

## DAFTAR SINGKATAN

|         |                                                                                                     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABD     | : <i>ATPase Binding Domain</i>                                                                      |
| ADP     | : <i>Adenosine Diphosphate</i>                                                                      |
| AhR     | : <i>Aryl hydrocarbon Receptor</i>                                                                  |
| AIF     | : <i>Apoptosis Inducing Factor</i>                                                                  |
| AJCC    | : <i>American Joint Committee on Cancer</i>                                                         |
| APAF    | : <i>Apoptotic Proteinase Activating Factor</i>                                                     |
| ARNT    | : <i>Aryl hydrocarbon Nuclear Translocator</i>                                                      |
| ATM     | : <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>                                                              |
| ATP     | : <i>Adenosine Triphosphate</i>                                                                     |
| Bag-1   | : <i>Bcl-2 associates anthanogen</i>                                                                |
| Bax     | : <i>Bcl-2 associated X protein</i>                                                                 |
| Bcl     | : <i>B cell lymphoma</i>                                                                            |
| bHLH    | : <i>basic-Helix-Loop-Helix</i>                                                                     |
| bHLH-LZ | : <i>basic helix-loop-helix-leucine zipper</i>                                                      |
| CAD     | : <i>Caspase DNAase</i>                                                                             |
| Caspase | : <i>Cysteine aspartyl protease</i>                                                                 |
| CBP     | : <i>Cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein</i>                            |
| CD133   | : <i>Cluster of Differentiation 133</i>                                                             |
| cFLIP   | : <i>Cellular FLICE (FADD-like IL-1<math>\beta</math> - converting enzyme) – Inhibitory Protein</i> |
| CTAR    | : <i>C terminal active region</i>                                                                   |
| DAMP    | : <i>Danger-Associated Molecular Patterns</i>                                                       |
| DIABLO  | : <i>Direct IAP binding protein with low PI</i>                                                     |
| DISC    | : <i>Death-Inducing Signaling Complex</i>                                                           |
| dkk     | : <i>dan kawan-kawan</i>                                                                            |
| DNA     | : <i>Deoxyrobonucleic acid</i>                                                                      |
| DR      | : <i>Death Receptor</i>                                                                             |
| DSB     | : <i>Double strand breaks</i>                                                                       |
| EBV     | : <i>Epstein-Barr virus</i>                                                                         |
| EC      | : <i>Extracellular</i>                                                                              |
| EMT     | : <i>Epithelial Mesenchymal Transition</i>                                                          |

|                |                                                               |
|----------------|---------------------------------------------------------------|
| EPO            | : <i>Erythropoietin</i>                                       |
| FADD           | : <i>Fas Associated Via Death Domain</i>                      |
| HIF-1 $\alpha$ | : <i>Hypoxia Inducible Factor-1 <math>\alpha</math></i>       |
| HLA            | : <i>Human Leukocyte Antigen</i>                              |
| HMGB1          | : <i>High mobility group box 1</i>                            |
| HPV            | : <i>Human papillomavirus</i>                                 |
| HRE            | : <i>Hypoxia Response Element</i>                             |
| HSc            | : <i>Heat Shock cognate</i>                                   |
| HSF            | : <i>Heat Shock transcription Factors</i>                     |
| HSP            | : <i>Heat Shock Protein</i>                                   |
| IARC           | : <i>International Agency for Research on Cancer</i>          |
| IC             | : <i>Intracellular</i>                                        |
| ICAD           | : <i>Inhibitor Caspase DNAase</i>                             |
| IFN            | : <i>Interferon</i>                                           |
| IL             | : <i>Interleukin</i>                                          |
| IMRT           | : <i>Intensity Modulated Radiation Therapy</i>                |
| KNF            | : <i>Karsinoma nasofaring</i>                                 |
| KSCC           | : <i>Keratinizing Squamous Cell Carcinoma</i>                 |
| LMP-1          | : <i>Latent membrane protein 1</i>                            |
| MAPK           | : <i>Mitogen-activated protein kinases</i>                    |
| Max            | : <i>Myc-associated factor X</i>                              |
| MDM2           | : <i>Mouse Double Minute 2 Homolog</i>                        |
| MHC            | : <i>Major histocompatibility complex</i>                     |
| Mxi1           | : <i>Max interacting protein 1</i>                            |
| NADPH          | : <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen</i> |
| NEF            | : <i>Nucleotide Exchange Factor</i>                           |
| NKSCC          | : <i>Non Keratinizing Squamous Cell Carcinoma</i>             |
| OCT            | : <i>Octamer binding transcription factor</i>                 |
| ODDD           | : <i>Oxygen Dependent Degradation Domain</i>                  |
| PARP1          | : <i>poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>                       |
| PBD            | : <i>Peptide Binding Domain</i>                               |
| PI3K           | : <i>Phosphatidylinositol 3 Kinase</i>                        |
| PIP2           | : <i>Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i>                 |
| PIP3           | : <i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>              |

|              |                                                                                 |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| PKC          | : <i>Protein kinase C</i>                                                       |
| pVHL         | : <i>protein von Hippel Lindau</i>                                              |
| RBP-Jk       | : <i>Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region</i> |
| RECIST       | : <i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumor</i>                            |
| RIP          | : <i>Receptor Interacting Protein</i>                                           |
| ROS          | : <i>Reactive Oxygen Species</i>                                                |
| RSUD         | : <i>Rumah Sakit Umum Daerah</i>                                                |
| SH2          | : <i>src homology 2</i>                                                         |
| SMAC         | : <i>Second Mitochondrial Activator of Caspase</i>                              |
| SOD          | : <i>Superoxide Dismutase</i>                                                   |
| SOX2         | : <i>Sex determining region Y-box containing gene 2</i>                         |
| SPK          | : <i>Sel punca kanker</i>                                                       |
| TAD          | : <i>Transactivation domain</i>                                                 |
| TdT          | : <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>                                  |
| TERT         | : <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>                                       |
| TGF          | : <i>Tumor Growth Factor</i>                                                    |
| TNF $\alpha$ | : <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>                              |
| TNM          | : <i>Tumor Node Metastasis</i>                                                  |
| TRAF         | : <i>Tumor Necrosis Factor Receptor-associated factor</i>                       |
| TRAIL        | : <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>                                  |
| TUNEL        | : <i>Terminal deoxynucleoidyl transferase dUTP nick end labelling</i>           |
| VEGF         | : <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>                                     |
| WHO          | : <i>World Health Organization</i>                                              |
| ZEB          | : <i>Zinc finger e-box binding homeobox</i>                                     |