

**ANALISIS NILAI DNA EBV DALAM SERUM  
PENDERITA KANKER NASOFARING  
STADIUM AWAL I/II DAN STADIUM LANJUT III/IV**

**TESIS**

**RETNO PURWANTI  
NPM 0706170942**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN ONKOLOGI  
JAKARTA  
JULI 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Retno Purwanti

NPM : 0706170942

Tanda Tangan :   6000 DJP

Tanggal : 12 Juli 2010

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Retno Purwanti  
NPM : 0706170942  
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Onkologi  
Judul Tesis : Analisis Nilai DNA EBV pada Serum  
Penderita Kanker Nasofaring  
Stadium Awal I/II dan Stadium Lanjut III/IV

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Onkologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof.dr.Siti Boedina Kresno,SpPK (K).

Pembimbing II : dr.Demak L.Tobing,SpPK.

Penguji I : Dr.rer.physiol.dr.Septelia Inawati Wanandi

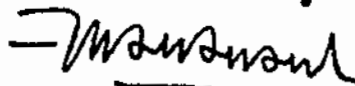
Penguji II : Dr.Dra.Dwi Anita Suryandari, M.Biomed.

Penguji III : Prof.dr.Agus Sjahrurachman,SpMK.,PhD.

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : Juli 2010

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



Dr.rer.physiol.dr.Septelia Inawati Wanandi

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kehadiran Tuhan YME, karena hanya dengan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan ini. Tesis ini dilaksanakan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di Program Magister Ilmu Biomedik dengan judul :

**“Analisis Nilai DNA EBV dalam Serum Penderita Kanker Nasofaring Stadium Awal I/II dan Stadium Lanjut III/IV “**

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang setulusnya atas segala bentuk bantuan, baik berupa gagasan, bimbingan maupun koreksi karena berkat bantuan beliau baik berupa materi maupun dukungannya, saya bisa menyelesaikan tesis ini terutama kepada :

1. Dr. dr. Ratna Sitompul, Sp.M (K) sebagai dekan FKUI dan Prof dr Menaldi Rasmin Sp.P (K), FCCP sebagai Dekan periode 2004-2008 yang menerima penulis sebagai mahasiswa biomedik .
2. Dr.Sonar Soni Panigoro, Sp.B. Onk. M.Epid, selaku Direktur Utama RS. Kanker “Dharmais” beserta seluruh jajaran direksi yang telah banyak membantu baik dukungan moril dan materil selama penulis menjalani pendidikan.
3. Dr.dr. Soetoto, MKes, yang telah banyak membantu baik dukungan moril dan materil demi terselenggaranya pendidikan Magister Biomedik Kekhususan Onkologi di RS.Kanker “Dharmais” atas kesempatan, dukungan serta pengarahannya dalam masa pendidikan.
4. Dr. rer. physiol.dr. Septelia Inawati W sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan pengarahan selama penulis menjalankan pendidikan.
5. Prof. dr. Siti Boedina Kresno,SpPK,(K) sebagai Ketua Kekhususan Onkologi FKUI dan dosen pembimbing tesis ini, terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya atas semua saran, bimbingan, dukungan dan waktu yang diberikan selama penulis mengerjakan penelitian
6. Dr.Demak L.Tobing,SpPK sebagai dosen pembimbing dalam tesis ini. terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya atas semua

- saran, bimbingan, dukungan dan waktu yang diberikan selama penulis melakukan penelitian.
7. Dr.dr.Aida Sofiati Dahlan,Sp.KK(K), yang telah banyak membantu penulis selama mengikuti pendidikan, menjalani dan melalui masa-masa sulit, terima kasih banyak atas waktu dan kesabarannya semoga Allah membalas segala kebaikan dan jerih payah selama penulis menjalani pendidikan.
  8. Kemala Rita W.,SKp,MARS, Nani Sutarni,SKp,MKep, Dahlan,MM,SSos, Retno S.Ns,SKep, Ibu Sukristina SKM dan staf Bidang Keperawatan RS.Kanker "Dharmais" yang telah banyak memberi dukungan moril, membantu dalam menyelesaikan tugas di bidang Keperawatan RSKD selama penulis menjalani pendidikan, terimakasih atas pengertian yang diberikan kepada penulis.
  9. Dr.dr.Noorwaty S.,SpPD.KHOM, selaku Kepala Bidang Diklat dan Pengembangan RS.Kanker "Dharmais", atas kesempatan dan bantuannya kepada penulis selama menjalani penelitian ini.
  10. Dr.Agus Kosasih,SpPK.MARS, selaku kepala Instalasi Patologi Klinik RS.Kanker "Dharmais" yang telah mengizinkan penulis untuk bekerja dan melakukan penelitian.
  11. Dr.Dewi Soeis, SpRadther, atas bantuannya dalam konsultasi, pengiriman pasien dan pemenuhan jumlah sampel.
  12. Dra.Theresia Kushandini dan teman-teman di Bag. Patologi Klinik RS.Kanker "Dharmais" yang sangat bersahaja begitu juga terimakasih kepada Mbak Shelly dan Mas Didik dari Roche atas bantuan, kesabaran, waktu dan kerjasamanya selama penulis melakukan penelitian.
  13. DR.Dr.Moerdani,SpPD KGEH, dr.Kuncoro SpPD dan Utami S,SKM dan seluruh staf Tim Epidemiologi atas bantuan, waktu dan kesabarannya selama penulisan tesis.
  14. Seluruh staf sekretariat Program Study Magister Biomedik: Bpk. Dani, Bpk Zacky, Mbak Ella serta Mb. Tika di sekretariat kekhususan Onkologi atas semua bantuannya selama pendidikan baik dalam

masalah administrasi, pengaturan jadwal dan ruang kuliah dan penulisan tesis sehingga semua dapat berjalan dengan lancar.

15. Ayahanda N.Sukarno (alm) dan ibunda Sri Mulyati serta ibunda mertuaku Hj.Susyati S.Maryono yang kusayangi sebagai orang tua yang begitu besar perannya dalam mendidik dan membimbing semenjak kecil, terimakasih atas dukungan moril dan doanya selama penulis menjalani pendidikan.

16. Suamiku tercinta R.Heru Ardianto,S.Kom dan anakku terkasih Raihan Purwandaru yang telah memberikan dukungan moril dan materil selama menjalani pendidikan. Terimakasih atas pengertian, dukungan dan bantuan waktu yang hilang, selama mama menjalani pendidikan

17. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan namanya satu persatu, pengasuh anakku dan semua guru yang telah mendidik semenjak kecil hingga sekarang. Serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, penulis menghaturkan banyak terimakasih, semoga semua kebaikan dan bantuannya kepada penulis akan mendapat balasan dari Tuhan YME. Dengan rendah hati penulis menyadari bahwa tidak ada karya yang sempurna selain Maha Karya-Nya. Kepada segenap pembaca karya kecil ini, penulis menghaturkan penghargaan dan ucapan terima kasih serta tidak menutup mata untuk koreksi dan perbaikan.

Jakarta, Juli 2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Retno Purwanti  
NPM : 0706170942  
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik  
Kekhususan : Onkologi  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis Karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia, Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**“Analisis Nilai DNA EBV dalam Serum Penderita Kanker Nasofaring Stadium Awal I/II dan Stadium Lanjut III/IV”**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di Jakarta  
Pada tanggal 12 Juli 2010

Yang Menyatakan

  
( Retno Purwanti )

## ABSTRAK

Nama : Retno Purwanti  
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Onkologi  
Judul : Analisis Nilai DNA EBV dalam Serum Penderita Kanker Nasofaring Stadium Awal I/II dan Stadium Lanjut III/IV

### Tujuan Pemeriksaan:

Melakukan analisis nilai DNA EBV dalam serum penderita KNF Stadium Awal (I/II) dan Stadium Lanjut (III/IV).

### Material dan Metode:

Sebanyak 83 serum darah penderita kanker nasofaring (KNF) berjenis *undifferentiated*, diambil sebelum pemberian terapi. Sampel dibagi menjadi 2 group berdasarkan sistem TNM (UICC) dan didapatkan: 25 sampel berasal dari serum penderita KNF stadium awal (I/II) dan 58 dari penderita stadium lanjut (III/IV). Menggunakan *real time polymerase chain reaction (PCR)* dilakukan pengukuran kadar DNA EBV dengan LMP2 sebagai gen target. Perbedaan kadar DNA EBV ditentukan menggunakan analisa deskriptif menggunakan test non parametrik antara penderita KNF stadium awal dan stadium lanjut dan terhadap status T,N dan M.

### Hasil:

Pengukuran kadar serum DNA EBV pada penderita KNF stadium awal (I/II) sebelum memulai pengobatan, menunjukkan sebanyak 17 dari 25 sampel (66.7%) tidak terdeteksi adanya copy DNA EBV dan 8 sampel (33.3%) terdeteksi. Pada penderita KNF stadium lanjut (III/IV), 37 dari 58 sampel (63.15%) terdeteksi adanya copy DNA EBV dan 21 sampel (36.84%) tidak terdeteksi. Kadar DNA EBV pada penderita KNF stadium lanjut menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penderita KNF stadium awal (median 24.8 copy/ml vs 0 copy/ml), dengan nilai cut off pada 7.15 copy/ml (sensitifitas 60.3% dan spesifisitas 72.0%). Kadar DNA EBV yang lebih tinggi terdapat pula pada hasil pengukuran serum DNA EBV antara penderita KNF dengan status T3-T4, N2-N3 dan M1 dibandingkan dengan penderita KNF dengan status T1-T2, N0-N1 dan M0.

### Kesimpulan:

Pengukuran kadar serum DNA EBV merupakan cara yang potensial untuk membedakan antara penderita KNF stadium awal (I/II) dan stadium lanjut (III/IV) dengan perkiraan nilai cut off pada 7.15 copy/ml. Termasuk pula untuk membedakan antara status T,N dan M. Pengukuran kadar DNA EBV dapat menyempurnakan penggunaan sistem TNM pada tingkat molekuler.

Kata Kunci: *KNF, EBV dan Real Time PCR*



## ABSTRACT

Name : Retno Purwanti  
Study Programe : Biomedic Science (Major Oncology)  
Title : **Analysis between Serum EBV DNA Concentration in Patient with Early Stage (I/II) and Advanced Stage (III/IV) Nasopharyngeal Carcinoma**

**Purposed:**

To analyse the difference of pretreatment serum EBV DNA concentration between early stage (I/II) and advance stage (III/IV) nasopharyngeal carcinoma (NPC) patient.

**Method:**

Eighty-three (83) pretreatment serum of undifferentiated with all stages of NPC were studied and divided into two groups: 25 samples came from early stage (I/II) NPC and 58 samples from advance stage (III/IV) NPC as by UICC TNM staging system. LMP2 was used as target gene and the concentration were quantified by *real-time polymerase chain reaction assay*. EBV DNA concentration of the two groups were measured and the difference were assessed, including the T,N,M status with non parametric test.

**Result:**

Pretreatment EBV DNA serum concentration from early stage (I/II) NPC patients showed: 17 of 25 samples (66.7%) were undetectable for copy of EBV DNA, and 8 samples (33.3%) were detectable. Pretreatment EBV DNA from advance stage NPC showed: 37 of 58 patients (63.15%) were detectable for copy of EBV DNA and 21 patients were not. Pretreatment EBV DNA serum concentration from advance stage NPC showed higher serum concentration than early stage (median 24.8 copy/ml vs 0 copy/ml), on *cut off point* prediction at 7.15 copy/ml. Higher concentration as well, were found among those patients whose had T3-T4, N2-N3 and M1 stages compared with T1-T2, N0-N1 and M0 stages NPC.

**Conclusion:**

EBV DNA serum concentration was found potential to differentiate between early and advance stage NPC, on *cut off point* prediction at 7.15 copy/ml, as well as to differentiate T,N and M stages. EBV DNA measurement was good to improve UICC TNM staging system in clinical practice based, on molecular level.

**Keywords:** NPC, EBV and Real-time PCR

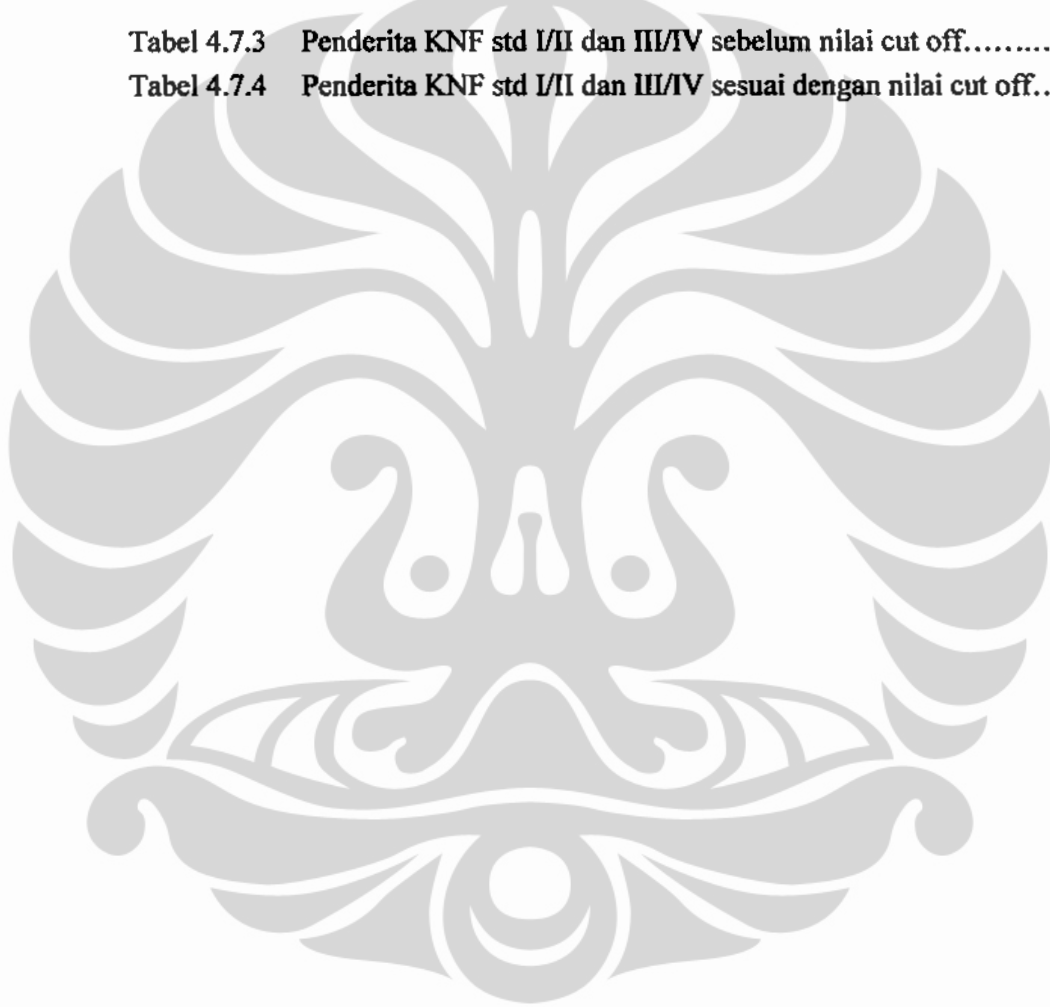
## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
<b>1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Hipotesis .....	3
1.4 Tujuan .....	3
1.5 Manfaat Riset .....	3
<b>2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Kanker Nasofaring (KNF).....	4
2.1.1 Insiden .....	4
2.1.2 Proses Karsinogenesis pada KNF .....	4
2.2 Epstein Barr Virus (EBV) .....	6
2.2.1 Insiden .....	6
2.2.2 Struktur Genom EBV .....	6
2.2.3 Infeksi dan Gen Laten EBV .....	8
2.2.4 Proses Repilkasi Virus .....	11
2.3 Pemeriksaan DNA EBV .....	12
2.4 Real Time Polymerase Reaction .....	14
2.5 Pemeriksaan DNA EBV menggunakan LMP2 .....	16
2.6 Cut off Point.....	17
<b>3 METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konsep .....	21
3.2 Desain Penelitian.....	22
3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	23
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian .....	23
3.5 Besar Sampel .....	24
3.6 Cara Kerja .....	25
3.6.1 Rekrutmen Subjek Penelitian .....	25
3.6.2 Bahan .....	25
3.6.3 Pengambilan sampel Darah .....	25

3.6.4	Metode Pemeriksaan .....	25
3.6.4.1	Isolasi DNA. ....	25
3.6.4.2	Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	26
3.6.4.3	Cara Melakukan Kuantifikasi .....	27
3.7	Alur Penelitian .....	27
3.8	Manajemen dan Analisis Data .....	28
3.9	Definisi Operasional .....	28
3.10	Etika Penelitian .....	28
<b>4</b>	<b>HASIL &amp; PEMBAHASAN PENELITIAN</b>	
4.1	Karakteristik Subjek Penelitian .....	26
4.2	Pengukuran Kadar DNA EBV .....	27
4.3	Hasil Pemeriksaan Serum DNA EBV Stadium Awal dengan Stadium Lanjut .....	32
4.4	Perbedaan Kadar Serum DNA EBV dengan Status T .....	35
4.5	Perbedaan Kadar Serum DNA EBV dengan Status N .....	36
4.6	Perbedaan Kadar Serum DNA EBV dengan Status M .....	37
4.7	Penentuan Nilai Cut Off Kadar DNA EBV .....	38
4.8	Rangkuman Hasil .....	42
<b>5</b>	<b>KESIMPULAN dan SARAN</b>	
5.1	Kesimpulan .....	43
5.2	Saran .....	43
	<b>DAFTAR KEPUSTAKAAN</b> .....	44
	<b>RIWAYAT HIDUP</b> .....	50
	<b>DRAFT ARTIKEL</b> .....	51
	<b>LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	STADIUM KNF UICC 2002 .....	5
Tabel 2.2	Gen laten EBV dan Fungsinya .....	9
Tabel 2.3	Tipe Latensi EBV, Produk Gen serta Keganasannya .....	10
Tabel 2.5	Primer sekuen DNA EBV .....	16
Tabel 2.6.1	Sensitifitas dan Spesifisitas.....	18
Tabel 2.6.3	Contoh nilai Sensitivitas dan Spesifisitas .....	19
Tabel 4.1.1	Karakteristik Subjek Penelitian .....	29
Tabel 4.7.2	Tabel Nilai ROC .....	39
Tabel 4.7.3	Penderita KNF std I/II dan III/IV sebelum nilai cut off.....	41
Tabel 4.7.4	Penderita KNF std I/II dan III/IV sesuai dengan nilai cut off....	41



## DAFTAR GAMBAR

Gbr. 2.1	Bentuk Toroid EBV .....	7
Gbr. 2.2	EBV Genome .....	8
Gbr. 2.3	Infeksi EBV, gen laten dan keganasannya .....	9
Gbr. 2.6	Kurva ROC .....	16
Gbr. 2.2.4	Proses Replikasi Virus .....	11
Gbr. 2.3	Model Infeksi EBV pada Manusia .....	12
Gbr. 2.6.2	Contoh Hasil Uji Diagnostik .....	18
Gbr. 2.6.4	Kurva ROC .....	19
Gbr. 3.1	Kerangka Konsep .....	22
Gbr. 3.2	Alur Penelitian .....	27
Gbr. 4.1.2	Karakteristik Penderita menurut status T,N,M.....	30
Gbr. 4.2.1	Amplifikasi DNA EBV standar dan Kurva Standar.....	31
Gbr. 4.2.2	Kadar DNA EBV pada 83 penderita KNF.....	32
Gbr. 4.3.1	Hasil Pengukuran DNA EBV std awal dan Lanjut .....	32
Gbr. 4.4	Penderita KNF dengan status T .....	35
Gbr. 4.5	Penderita KNF dengan status N .....	36
Gbr. 4.6	Penderita KNF dengan status M .....	37
Gbr. 4.7.1	Kurva ROC .....	38

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Data Sampel & Hasil DNA EBV
Lampiran 2	Hasil Perhitungan Statistik



## DAFTAR SINGKATAN

1. EBV : Epstein-Barr Virus
2. LMP2 : Laten Membran Protein 2
3. KNF : Kanker Nasofharing
4. IARC : International Agency for Research on Cancer
5. PCR : Polymerase Chain Reaction
6. EBNA : EBV nuclear antigen
7. UICC : Union International Contre Le Cancre
8. EBERs : The EBV-encoded RNAs
9. BARTs : Rightward transcripts of BAMHI-A region
10. BARFI : Rightward transcripts of the BAHMI region
11. CD21 : Cluster Differentiated
12. LCL : Lymphoblastoid Cell Lines
13. PTLD : Post Transplant Lymphoproliferative Disease
14. IM : Immunoproliferative Disease
15. ARL : AIDS Related Lymphoma
16. AIDS : Aquired Immuno Defisiensi Syndrome
17. RSKD : RS.Kanker "Dharmais"
18. ROC : Receiver Operating Characteristics

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang

Kanker Nasofaring (KNF) merupakan keganasan yang sering ditemukan di Cina sebelah selatan dan Taiwan yaitu 20% dari seluruh kejadian kanker dinegara tersebut.<sup>1</sup> Penyebab KNF diduga akibat adanya interaksi yang kompleks antara faktor genetik, pola diet yang mengandung karsinogen tertentu dan infeksi Virus Epstein Barr.<sup>2</sup> Sedangkan perubahan molekuler yang terjadi pada KNF masih banyak yang belum dapat dijelaskan.<sup>3</sup> Keganasan ini mencapai 18% dari semua keganasan di Hong Kong, tetapi hanya 2% di Amerika Serikat. Indonesia belum dapat menentukan jumlah kasus KNF namun berdasarkan data R.S. Kanker Dharmais tahun 2000 sampai 2005 didapatkan 235 kasus KNF yang terdiri dari 169 laki-laki dan 66 perempuan\*. (Dewi Soeis, RSKD, data belum dipresentasikan).

Kanker Nasofaring paling banyak disebabkan oleh Virus Epstein-Barr (EBV),<sup>4</sup> yang merupakan keluarga Virus Herpes. Hampir setiap orang mempunyai antibodi terhadap EBV saat dewasa. Virus ini berada pada tahap laten/dorman pada limposit B, dan tahap litik pada sel epitel yang berhubungan dengan proses diferensiasi epitel.<sup>5</sup> Saat teraktifasi virus ditemukan pada air liur penderita dan dapat menularkan pada orang lain.<sup>6</sup> Saat virus masuk dalam sel pejamu, maka suatu saat dapat menyebabkan proliferasi sel yang dihinggapi.<sup>7</sup> KNF termasuk penyakit yang sangat invasif dan mudah bernetastasis dibandingkan dengan keganasan kepala dan leher yang lain.<sup>8,9,10</sup> Salah satu masalah yang sering terjadi pada penderita KNF adalah sebagian besar penderita sudah berada pada stadium III atau IV dengan pembesaran kelenjar getah bening atau terjadi metastasis<sup>11,12</sup> (Harowi, 2005 dan Wee, 2003), pada saat pertama kali terdiagnosis. Hal ini disebabkan sulitnya diagnosis pada stadium awal karena tanda-tanda yang tidak spesifik. Selain itu kekambuhan dan metastasis setelah selesai pengobatan sering pula dilaporkan.



R.S. Kanker Dharmais sebagai rumah sakit pusat rujukan kanker nasional telah melakukan pemeriksaan serologi dan DNA sebagai pemeriksaan penunjang pada KNF. Pemeriksaan DNA yang berada dalam sirkulasi mulai diteliti sehubungan manfaat potensialnya sebagai petanda berbagai macam keganasan<sup>13</sup> seperti keganasan ginekologi,<sup>14</sup> kolorektal,<sup>15</sup> payudara<sup>16</sup> dan keganasan kepala dan leher.<sup>17</sup> EBV dalam serum/plasma penderita KNF mulai banyak diteliti. Chan, 2002, menyatakan bahwa pengukuran kadar DNA EBV pada penderita KNF stadium lanjut lebih tinggi daripada penderita KNF stadium awal,<sup>18</sup> dan salah satu metode yang dipergunakan untuk mendapatkan pengukuran kuantitatif terhadap adanya DNA EBV yang akurat pada plasma atau serum penderita KNF, adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode ini merupakan metode yang terbukti mudah, cepat, akurat dan aman bagi pasien KNF. Sedangkan fragmen DNA EBV yang telah digunakan dalam pemeriksaan pada RS.Kanker "Dharmais" adalah EBNA1 dan LMP2.

LMP2 (*latent membran protein 2*) adalah salah satu gen yang terdapat didalam genom EBV, selain EBNA1 dan EBER. LMP2 sebagai gen target pengukuran kadar DNA EBV pada penderita KNF mulai banyak diteliti, namun pemakaiannya sebagai petanda tumor pada kasus KNF belum banyak dilaporkan. Salah satu alasan penggunaan LMP2 sebagai gen target pada pemeriksaan DNA EBV adalah untuk mendapatkan petanda tumor guna meningkatkan kewaspadaan terhadap timbulnya progresifitas.

Untuk melengkapi manfaat pemeriksaan DNA EBV secara kuantitatif tersebut, diperlukan nilai *cut off*, sebagai pembeda antara KNF stadium awal dan KNF stadium lanjut. Penentuan nilai *cut off* terhadap DNA EBV diharapkan dapat membantu menentukan penderita KNF stadium awal dan lanjut, Sehingga program pengobatan diberikan tidak hanya berdasarkan kondisi klinis namun juga berdasarkan karakteristik molekulernya untuk menjamin ketepatan, meningkatkan angka keberhasilan dan survival bagi penderita KNF.

## **1.2. Perumusan Masalah**

1. Apakah terdapat perbedaan kadar DNA EBV dalam serum penderita KNF Stadium Awal (I/II) dan penderita KNF stadium Lanjut (III/IV)?
2. Berapa nilai *cut off* kadar DNA EBV dalam serum untuk membedakan KNF stadium Awal (I/II) dengan stadium Lanjut (III/IV).

## **1.3. Hipotesis**

1. Terdapat perbedaan kadar DNA EBV dalam serum penderita KNF Stadium Awal (I/II) dan stadium Lanjut (III/IV).

## **1.4. Tujuan Penelitian**

### **1.4.1. Tujuan Umum**

Mencari/mendapatkan parameter molekuler untuk membedakan penderita KNF stadium awal (I/II) dan stadium Lanjut (III/IV).

### **1.4.2. Tujuan Khusus**

1. Melakukan analisis kadar DNA EBV dalam serum penderita KNF Stadium Awal (I/II) dan stadium Lanjut (III/IV).
2. Mencari nilai *cut off* sebagai pembeda antara KNF stadium awal I/II dan stadium lanjut III/IV.
3. Menentukan perbedaan antara kadar DNA EBV dalam serum dengan status T,N,M pada penderita KNF.

## **1.5. Manfaat Riset**

1. Meningkatkan kemampuan diagnostik molekuler untuk penderita KNF.
2. Meningkatkan efektifitas penatalaksanaan program pengobatan bagi penderita KNF.
3. Menambah pemahaman tentang kegunaan DNA EBV sebagai petanda tumor pada penderita KNF.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Kanker Nasofaring (KNF)

##### 2.1.1 Insiden

Kanker Nasofaring (KNF) merupakan keganasan yang banyak ditemukan di Cina sebelah selatan dan Taiwan yaitu 20% dari seluruh kejadian kanker dinegara tersebut.<sup>1</sup> Penyebab KNF diduga akibat adanya interaksi yang kompleks antara faktor genetik, pola diet yang mengandung karsinogen misalnya konsumsi alkohol, kebiasaan makan makanan yang diasinkan dan infeksi Virus Epstein Barr yang mempunyai hubungan terkuat diantara penyebab-penyebab lainnya dalam menginduksi terjadinya KNF.<sup>2</sup> Keganasan ini mencapai 18% dari semua keganasan di Hong Kong, tetapi hanya 2% di Amerika Serikat. Indonesia belum dapat menentukan jumlah kasus KNF, namun berdasarkan data Medical Record R.S. Kanker Dharmais tahun 2000 sampai 2005 didapatkan 235 kasus KNF yang terdiri dari 169 laki-laki dan 66 perempuan\*. (\*Dewi Soeis, RSKD, data belum dipresentasikan).

##### 2.1.2 Proses Karsinogenesis pada KNF

KNF termasuk salah satu penyakit yang dapat disembuhkan dimana radioterapi merupakan pilihan utama, dengan ketahanan hidup 5 tahun (*overall 5 years survival*) penderita pada stadium I adalah sebesar 70-80%, tetapi untuk penderita stadium IV hanya 20-30%<sup>41-42</sup>. Namun masalah yang timbul pada penderita KNF adalah seringkali penderita datang pada stadium lanjut atau terapi yang diberikan tidak dapat menghilangkan seluruh tumor (*local persistence*) atau terjadi kekambuhan (*relaps*) baik lokal atau muncul didaerah lain (*distant metastasis*).<sup>37</sup> Menurut *Union International Contre Le Cancre* (UICC), KNF dibagi dalam 4 stadium berdasarkan besar tumor, ada tidaknya serta besarnya kelenjar limfe yang terlibat serta ada atau tidaknya penyebaran atau metastasis sel-sel kanker keorgan lain.

Pada tabel 2.1. dibawah ini diperlihatkan pembagian KNF berdasarkan stadium, besarnya tumor, ada tidaknya kelenjar limfe yang terlibat serta ada tidaknya metastasis.

**Tabel 2.1: STADIUM KNF UICC 2002**

STADIUM	TUMOR	NODUL	METASTASE
I	T1	NO	MO
II A	T2A	NO	MO
II B	T1	N1	MO
	T2A	N1	MO
	T2B	NO-N1	MO
III	T1	N2	MO
	T2A, T2B	N2	MO
	T3	NO, N1, N2	MO
IV A	T4	NO, N1, N2	MO
IV B	T1, 2, 3, 4	N3	MO
IV C	T1, 2, 3, 4	N1, 2, 3	M1

Mekanisme molekular mengenai bagaimana virus EBV mengubah sel epitel normal menjadi ganas pada KNF masih belum dapat dijelaskan dengan baik, begitu pula kapan dan mengapa virus yang biasanya berada pada fase laten dan tidak menimbulkan gejala, mengubah sel epitel menjadi ganas.<sup>3</sup>

Proses karsinogenesis sering kali dikaitkan dengan siklus hidup dari Epstein Barr Virus (EBV) yang menurut *International Agency for Research on Cancer* (IARC), EBV diketahui sebagai karsinogen yang mempunyai hubungan kuat sebagai penyebab terjadinya KNF<sup>4</sup>. Hal ini membuat pemahaman akan perangan EBV menjadi hal yang penting.

## 2.2 Epstein Barr Virus (EBV)

### 2.2.1 Insiden

Epstein-Barr Virus adalah keluarga *gamma herpes virus* suatu virus DNA, yang ditemukan oleh Epstein and Barr pada tahun 1964. Virus ini menginfeksi hampir 90% populasi orang dewasa diseluruh dunia.<sup>2-5</sup> Biasanya infeksi primer terjadi pada masa kanak-kanak yang selanjutnya berada pada fase laten di limfosit B, menetap didalam air liur /saliva untuk dikemudian hari menularkan infeksinya kepada orang lain.<sup>6-7</sup> Selama fase akut EBV menginfeksi dan bereplikasi pada epitel skuamosa orofaring,<sup>19</sup> dilanjutkan dengan infeksi laten pada limfosit B dimana virus berada pada sel B memori yang bersirkulasi.<sup>20,21</sup>

EBV merupakan virus pertama yang dikaitkan dengan terjadinya proses karsinogenesis pada manusia. Kebanyakan orang hidup bersama virus ini tanpa mengalami keluhan serius tapi sebagian kecil akan berkembang menjadi tumor atau kanker. Penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan infeksi EBV adalah limfoma Burkitt's, limfoma Hodgkin's, non-Hodgkin's disease, kanker nasofaring (KNF), tumor payudara dan lambung bahkan juga leiomiosarkoma.<sup>22-25</sup> Pada KNF yang tidak berdiferensiasi, 100% tumor terkait dengan infeksi EBV dengan ekspresi protein membrane laten EBNA1, LMP1 dan LMP2.<sup>23</sup>

Keterlibatan EBV pada KNF telah ditetapkan sejak tahun 1973,<sup>26</sup> walaupun demikian sampai saat ini, banyak peran EBV terhadap patogenesis kanker termasuk KNF belum diketahui atau masih membutuhkan pembuktian lebih lanjut.

### 2.2.2 Struktur Genom EBV

Kief and Rickinson<sup>2</sup> menjelaskan bahwa EBV mempunyai *protein core* yang berbentuk *toroid* terbungkus DNA, *nukleokapsid* nya terdiri dari 162 *capsomer*, dengan *protein tegument* diantara *nukleokapsid* dan *envelopenya* dan bagian terluar *envelope* mempunyai berbagai susunan *glikoprotein (Gp)*, dimana Gp350/220 merupakan *glikoprotein* terbanyak yang terdapat pada membran luar EBV.<sup>7</sup>

Gen-gen EBV tersebut saling berinteraksi dengan sitokin, molekul lain yang bersifat antiapoptosis dan transduksi sinyal yang akan membuat sel yang terinfeksi EBV menjadi *immortal* dan bertransformasi menjadi ganas<sup>(28)</sup>.

Epstein-Barr virus bisa tetap tinggal didalam inangnya melalui kemampuannya untuk mempertahankan infeksi laten dengan melakukan *self replicating* secara periodik. Tipe infeksi laten EBV, dibedakan menurut hasil transkripsinya menjadi Latensi I,II,dan III. (Rowe *et al.*, 1992; Brooks *et al.*, 1993)<sup>30-31</sup>. Protein laten EBV terdiri dari: 6 spesifik *EBV nuclear antige* ( *EBNAs 1,2,3A, 3B,3C dan Leader Protein, EBNA-LP* ), dan 3 protein laten membran (*LMPs 1,2A dan 2B*) ditemukan pada latensi III. Semua EBNA dikode oleh mRNA hasil transkrip yang berasal dari daerah *BamHI C promoter* atau *BamHI W promoter*. LMP diekspresikan dari *promoter* di daerah *BamHI N*, dengan arah berlawanan *rightward* untuk LMP2B dan *leftward* untuk LMP1. LMP2A berukuran lebih panjang dibandingkan dengan LMP2, dikode oleh transkrip yang berasal dari *promoter* yang berbeda berisi ekson pertama yang unik dan tidak terdapat pada LMP2B mRNA. Setiap tipe latensi akan menghasilkan produk gen yang berbeda dan akan dimanifestasikan dengan keganasan yang berbeda, seperti terlihat pada tabel 2.2.3.3. dibawah ini.

**Tabel 2.2.3.3 Tipe Latensi EBV, Produk Gen serta Keganasannya<sup>29</sup>**

<b>Tipe Latensi</b>	<b>Produk Gen</b>	<b>Keganasan</b>
<b>I</b>	EBERs, EBNA1, BARTs	Burkitt's Lymphoma
<b>II</b>	EBERs, EBNA1, BARTs, LMP1,2A-B, BARF	Karsinoma Nasofaring (KNF)
<b>III</b>	EBERs,EBNA1-3,LMP1-2, BARTs	Lymphoblastoid Cell Lines (LCL), PTLN, IM, AIDS Related Lymphoma (ARL),
<b>Lainnya</b>	- EBERs, EBNA1, LMP2, BARTs - EBERs, EBNA1, LMP2, BARTs, BARF1 - EBNA1, BARF1	- Pheripheral blood B sel - Karsinoma Gaster - Karsinoma Hepatoselular

DNA tumor dalam plasma/serum dapat merefleksikan keadaan klinis tertentu dan dapat digunakan sebagai *marker* diagnostik yang potensial. Serum/plasma darah merupakan jenis sampel yang tepat untuk melihat jumlah DNA virus, karena biasanya jumlah DNA virus pada individu sehat sangat rendah atau tidak terdeteksi namun jumlah DNA virus akan terdeteksi dan jumlahnya meningkat pada saat infeksi menjadi aktif. Hal ini terjadi pada berbagai penyakit keganasan terkait infeksi virus,<sup>61,62</sup> termasuk infeksi terhadap EBV.

EBV banyak terkait dengan berbagai keganasan, hal yang membuat DNA EBV dapat dijadikan sebagai *marker* genetik yang spesifik dan sensitif bagi berbagai keganasan<sup>36,37,38</sup>. Penelitian menunjukkan kadar/konsentrasi DNA dalam plasma/serum yang berasal dari sel yang terinfeksi oleh virus EBV yang berada dalam sirkulasi darah, dapat dipergunakan sebagai *marker* molekuler bagi penyakit-penyakit terkait infeksi virus ini, dimana KNF adalah salah satunya.<sup>37-38</sup> Kadar DNA EBV dalam serum/plasma pada pasien KNF diketahui mengalami peningkatan yang signifikan dibanding dengan kontrol yang sehat, peningkatannya terjadi seiring dengan peningkatan stadium dan menurun setelah pemberian terapi yang baik melalui radiasi dan/atau kemoterapi. Namun saat pengukuran harus diperhatikan agar didapat kadar DNA EBV yang sebenarnya dan bukan kadar DNA EBV yang terjadi akibat proses apoptosis atau sel lisis akibat terapi yang diberikan, sehingga jumlah DNA EBV didalam sirkulasi meningkat secara drastis. Pada pemberian radiasi, pengambilan serum sebaiknya dilakukan 4 -8 minggu setelah program radiasi berjalan. Lo Dennis YM, et al,2000, menyatakan bahwa penurunan kadar DNA EBV pada pasien KNF yang menjalani radiasi terjadi antara minggu ke 4-8 masa radiasi dengan waktu paruh 4 hari. Setelah waktu 8 minggu, didapatkan bahwa kadar DNA EBV telah menurun sampai dengan tidak terdeteksi pada semua penderita yang diteliti.<sup>66</sup> Kadar DNA EBV akan meningkat kembali saat terjadi kekambuhan<sup>39</sup>. Sejalan dengan penemuan tersebut maka pemeriksaan terhadap DNA EBV mulai banyak dilakukan untuk dipergunakan sebagai alat deteksi pada pasien KNF baik sebelum menjalani terapi, evaluasi paska terapi dan pada saat terjadi kekambuhan<sup>39-40</sup>.

Banyak gen target yang digunakan dalam pemeriksaan DNA EBV pada KNF diantaranya EBNA1 dan fragmen DNA yang berasal dari region BamH1W

pada genom EBV dan LMP2. Sedangkan metode yang digunakan pada pemeriksaan, salah satunya adalah dengan menggunakan *real time polymerase chain reaction (PCR)*.

#### 2.4. Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR adalah tehnik dalam biologi molekuler untuk mengamplifikasi beberapa copy DNA menjadi berpuluh atau beratus-ratus copy DNA target. Metode ini berdasarkan *siklus termal*, yang terdiri dari proses pemanasan dan pendinginan berulang yang diperlukan pada proses peleburan DNA (*DNA melting*) dan proses enzimatik saat *replikasi DNA*. Sedangkan Real time PCR adalah tehnik pemeriksaan laboratorium berdasarkan prinsip PCR dimana pada proses ini amplifikasi dan kuantifikasi DNA berjalan bersamaan dengan hasil kuantifikasi yang absolut, berupa jumlah copy DNA yang teramplifikasi dan terdeteksi pada setiap reaksinya.<sup>49</sup> Terdapat 2 metode yang biasa digunakan sebagai alat deteksi pada proses real time PCR: *non spesifik fluorescent dyes* yang *menginterkalasi double stranded DNA* dan *spesifik DNA probe* berisi sekuen spesifik untuk DNA tertentu, berisi oligonukleotida yang telah dilabel dengan *flouresent reporter* yang akan memberikan sinyal setelah terjadi hibridisasi antara *probe* dengan DNA target pasangannya.<sup>49</sup>

Dalam pelaksanaan PCR, dibutuhkan beberapa komponen diantaranya: *Template DNA* yang berisi daerah/region/target DNA yang akan diamplifikasi, 2 buah *primers* yang saling berpasangan (*reverse dan forward*), *Tag DNA Polymerase* dengan temperatur optimum sekitar 70°C, *Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) building bloks* dimana *DNA polymerase* melakukan sintesis DNA yang baru, *buffer solution* dan elektrolit untuk memberikan lingkungan kimiawi yang tepat bagi kerja *DNA polymerase* dalam reaksi PCR. Program PCR terdiri dari 3 tahapan yaitu: Tahapan *pre-inkubasi* untuk mengaktivasi enzim *Tag DNA Polymerase* dimana suhu dinaikkan menjadi 95°C selama 5-10 menit untuk menghilangkan *unspesifik binding*. Tahapan ke dua adalah, Tahapan *amplifikasi* dimana tahapan ini terbagi menjadi 3 proses: *Denaturasi* dimana terjadi pemisahan rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal pada suhu 95°C selama 5-10 detik, *Annealing* dimana terjadi penempelan untai



DNA dengan primer pada suhu 55°C (suhu tergantung dari *primers* yang dipakai) selama 15 detik, dan *Ekstension* dimana terjadi perpanjangan untai DNA spesifik, pada suhu 72°C selama 15 detik. Tahap amplifikasi dilakukan sebanyak 45 siklus, pada tahap inilah terjadi proses kuantifikasi DNA.<sup>49</sup>

Analisa kuantifikasi dilakukan terhadap kurva standar. Kurva standar digunakan untuk menentukan nilai konsentrasi DNA target/sampel yang belum diketahui. Kemiringan kurva standar disebut nilai efisiensi kurva dimana reaksi amplifikasi yang sempurna akan menghasilkan nilai efisiensi 2, karena jumlah DNA yang diamplifikasi setiap siklusnya adalah kelipatan 2 (*double*). Pada kurva standar konsentrasi DNA standar diplot berdasarkan nilai *crossing point*. *Crossing Point* adalah waktu dimana sinyal fluoresensi meningkat, melebihi sinyal *background*. Nilai ini muncul sebagai kurva yang naik secara tajam pada grafik pemeriksaan sampel dimana produk yang teramplifikasi mulai dihitung oleh mesin. Nilai *crossing point* tergantung pada konsentrasi DNA awal pada sampel. Sampel dengan konsentrasi DNA yang rendah akan membutuhkan siklus amplifikasi yang lebih banyak untuk mencapai nilai/titik *crossing point*. Tahapan selanjutnya setelah amplifikasi adalah *Melting Curve*. Pada tahap ini, temperatur dimana rantai DNA terpisah dari tiap sampel diperiksa, untuk menilai spesifikasi produk DNA yang teramplifikasi. *Melting Curve* adalah temperatur yang dibutuhkan bagi rantai ganda DNA untuk terpisah. Setiap produk DNA mempunyai temperatur melting yang berbeda tergantung pada urutan nukleotida penyusunnya. Panjang rantai dan kandungan basa *Guanin* dan *Cytosin* akan mempengaruhi temperatur melting. Sehingga temperatur melting dapat digunakan untuk menilai spesifisitas produk DNA yang telah diamplifikasi, dimana adanya kontaminan pada produk DNA yang teramplifikasi dapat diketahui berdasarkan adanya perbedaan puncak dari temperatur meltingnya.<sup>49</sup> Dari proses realtime diatas didapatkan keuntungan dalam menggunakan metode ini dalam penelitian berupa: kemungkinan terjadinya kontaminan kecil, menghasilkan produk yang spesifik, sensitif dan akurat dengan hasil kuantitatif selain itu proses lebih cepat dibandingkan dengan pemeriksaan *gel based PCR*.<sup>48</sup>

## 2.5. Pemeriksaan DNA LMP2 EBV

*Real-time* PCR adalah metode yang banyak digunakan karena terbukti sensitif dan spesifik dalam mendeteksi adanya DNA EBV baik dalam darah (plasma/serum) maupun dalam jaringan (*paraffin embedded*),<sup>43-44</sup> termasuk pemeriksaan terhadap DNA LMP2 EBV. Penggunaan metode ini mempunyai beberapa keuntungan diantara metode yang lain karena terbukti sensitif, spesifik, proses mudah dan cepat dengan hasil berupa data yang bersifat kuantitatif.<sup>49</sup> Pemeriksaan terhadap DNA LMP2 EBV banyak dilakukan dalam penelitian penyakit-penyakit terkait infeksi virus ini, begitu pula kemampuannya yang potensial dalam mendeteksi adanya DNA EBV telah banyak dilaporkan walaupun penggunaannya secara klinis belum banyak dilakukan.<sup>43,48,49,50</sup> Adapun sekuen DNA LMP2 EBV yang sering dipergunakan dalam penelitian terkait DNA EBV adalah seperti terlihat pada tabel 2.5.

**Tabel 2.5. Primer Sekuen DNA EBV (*Prototypic EBV B95,8*)<sup>63</sup>**

Transcript	Primer	Sequence (5'→3')	B95.8 genomic coordinates (bp)
EBNA1	5' (Y3)	TGGCGTGTGACGTGOTATA	48397-48416
	5' (Q)	GTGCGCTACCCGATCGCG	63481-63457
	3' (R)	CATTTCAGGTCCTGACCT	107986-107967
LMP1	5' (2B)	ACACACTGCCCTGAGATCG	169490-169471
	5' (2B*)	TGTACATGTTTATGATGAC	169356-169337
	5' (3.7)	GCGTACTGTGACGTGACCG	169569-169550
	3'	ATACCTAAGA/CAGTAAGCA	168956-168965/169002-169051
	5' (nested)	GTTCAAGAGACCTTCTCT	169262-169243
	3' (nested)	ACAATGCTGTGCTGCAAA	169061-169100
LMP2	5' (2A)	ATGACTCATGTCAACACATA	166874-166893
	5' (2B)	CAGTGTAACTGACACAAGA	169819-169838
	3'	CATGTTAGGCAATTGAAA	380-361

Penggunaan LMP2 dalam banyak penelitian terkait KNF, disebabkan karena transkripsi LMP2 selalu ditemukan pada penderita KNF (Latensi II), bersama dengan EBNA1 dan LMP1.<sup>30</sup> Pegtel et al,<sup>67</sup> menunjukkan hampir 95% dari KNF tipe yang tidak berdiferensiasi menunjukkan transkripsi LMP2 dan 50% mengekspresikan LMP2 pada tingkat protein, dimana LMP2 berperan dalam menginduksi progresifitas dan metastasis. Dengan melakukan pemeriksaan

terhadap DNA LMP2 EBV, penulis berasumsi bila terjadi peningkatan DNA LMP2 EBV, maka kewaspadaan terhadap terjadinya proses progresifitas dan metastasis perlu dipertimbangkan, tentu saja hal tersebut masih harus dibuktikan dengan pemeriksaan pada tingkat RNA atau protein.

Pemeriksaan DNA LMP2 EBV dengan menggunakan real time PCR akan menghasilkan jumlah DNA yang bersifat kuantitatif sehingga untuk pemanfaatan sebagai *marker molekuler* dalam tatalaksana klinis membutuhkan nilai batas atau *cut off point*.

## 2.6. *Cut Off Point*

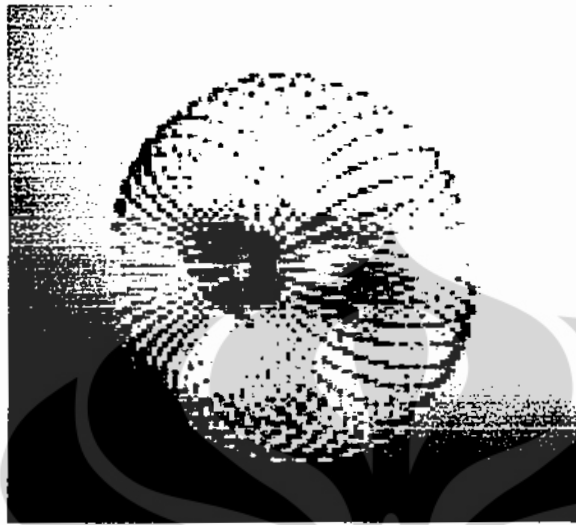
Nilai *cut off* adalah nilai yang didapat dari hasil uji diagnostik dan dipergunakan sebagai batas penentuan nilai positif dan negatif suatu pemeriksaan<sup>45</sup>. Bila pengukuran hasil uji dilakukan dalam skala dikotomi yaitu positif atau negatif maka tidak diperlukan titik potong, atau hasil uji menghasilkan skala ordinal, misalnya: +, ++, +++, maka dapat ditentukan titik potongnya misalnya sampai dengan ++ dianggap normal, tetapi bila +++ maka dianggap tidak normal. Namun bila hasil uji diagnostik menghasilkan hasil numerik maka harus ditetapkan dahulu titik potongnya untuk menentukan nilai positif atau negatifnya.<sup>64</sup> Pada penentuan titik potong pada uji diagnostik dengan hasil numerik maka harus dilakukan tawar-menawar, karena peningkatan sensitivitas akan menyebabkan penurunan spesifisitas dan begitu pula sebaliknya. Dalam tawar menawar ini, harus diperhatikan kepentingan uji diagnostik. Apakah untuk menegakkan diagnostik atau untuk menyingkirkan penyakit.<sup>64</sup> Bila diperlukan untuk mendapatkan pengobatan yang berbahaya maka nilai spesifitasnya harus tinggi meskipun sensitifitasnya berkurang. Begitu pula sebaliknya untuk mendiagnosis penyakit maka titik potong direndahkan agar sensitifitas uji menjadi tinggi. Salah satu cara untuk menentukan titik potong dalam uji diagnostik adalah dengan penggunaan kurva ROC (*Receiver Operating Characteristics*).<sup>64,65</sup>

Kurva ROC merupakan kurva yang menggambarkan tawar menawar antara nilai sensitifitas dan spesifisitas. Makin tinggi nilai sensitivitas, makin rendah nilai spesifisitasnya begitu pula sebaliknya.<sup>64</sup>

Pada gambar diatas, bila titik potong ditentukan pada titik hijau, akan diperoleh nilai spesifisitas yang tinggi yaitu  $1 - 0 = 1$  tetapi dengan sensitifitas yang rendah yaitu 0.35, sedangkan bila kita memilih titik potong pada titik hitam, maka akan diperoleh sensitifitas yang tinggi yaitu  $1 = 100\%$  tetapi dengan spesifisitas yang rendah  $1 - 0.6 = 0.4$ . Titik merah adalah titik yang moderat. Seperti telah disebutkan diatas pemilihan titik potong ini bergantung pada tujuan uji diagnostik yang dilakukan. Bila dibutuhkan nilai sensitifitas yang tinggi, pilihlah titik potong kearah titik hitam sedangkan bila diperlukan nilai spesifisitas yang tinggi geserlah titik potong kearah titik hijau.

Nilai *cut off* pada penelitian ini diperlukan untuk menentukan batas antara kadar DNA EBV dalam serum/plasma penderita KNF stadium awal dan stadium lanjut. Dengan nilai *cut off* ini diharapkan pemberian terapi dapat diberikan secara tepat berdasarkan penilaian klinis dan penentuan secara molekuler, sehingga angka keberhasilan dalam pemberian terapi dapat meningkat dan kejadian terjadinya kekambuhan dan atau metastasis dapat ditekan/diatasi dengan segera.

Gambar 2.2.2.1. dibawah ini menunjukkan bentuk toroid dari EBV.

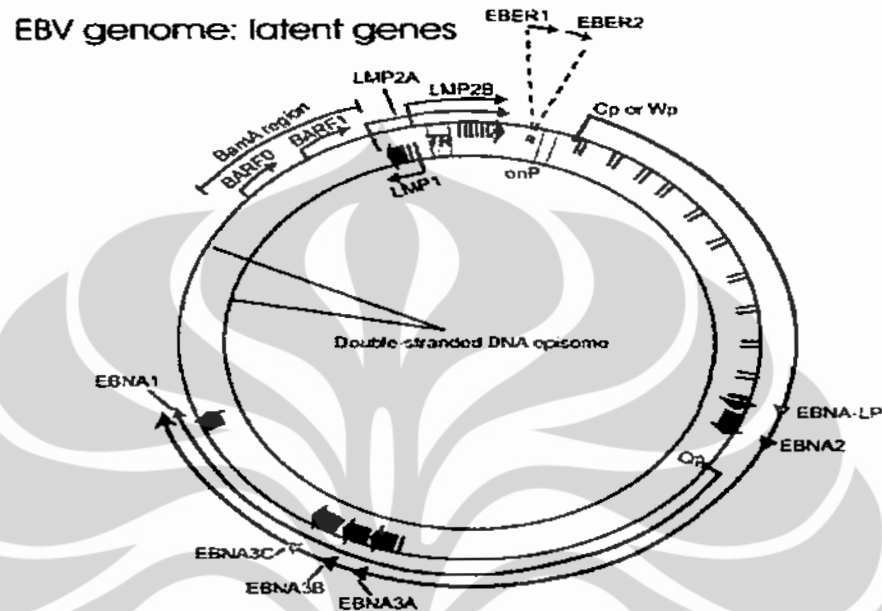


Gbr 2.2.2.1. Bentuk Toroid dari EBV. Sanna M Aalto 2007.

Genom EBV berbentuk *single, linear, double stranded 184-kb DNA*<sup>1</sup>. Setiap posisi dalam genom EBV *strain B95.8* telah berhasil dipetakan posisinya dengan menggunakan *BamHI restriksi endonuklease*. Setiap fragmen ditandai dengan huruf untuk membedakan fragmen yang satu dengan fragmen yang lain didalam genom EBV<sup>27</sup>. Setiap gen yang terdapat pada *strain B95.8* dipetakan berdasarkan letaknya terhadap daerah asal transkripsi RNA. *BamHI-A* adalah daerah didalam genom EBV dengan fragment terpanjang disusul dengan *BamHI-B*.<sup>69</sup> Terdapat dua tipe EBV yaitu EBV tipe A dan Ebv tipe B yang merupakan bentuk polimorfisme dengan perbedaan yang jelas pada sekuen gen EBNA-2, EBNA 3 A-C, polimorfisme minor pada EBNA 1, LMP1, Zebra dan beberapa gen lain pada genom EBV.<sup>29,31,69</sup>

Saat virus menginfeksi sebuah sel, genomnya menjadi *episome* yang terdiri dari beberapa *tandem repeat*, dengan jumlah tergantung dari *tandem repeat* yang ada pada genom parentalnya, dengan variasi beberapa *tandem repeat* yang terjadi selama proses replikasi. Pada saat infeksi laten setiap *episome* yang terdapat pada sel yang terinfeksi akan mempunyai jumlah *tandem repeat* yang sama dengan parentalnya, hal ini berguna untuk menentukan apakah sel-sel yang terinfeksi dan berada pada fase laten berasal dari sel progenitor yang sama atau

berasal dari berbagai sel progenitor yang berbeda.<sup>60</sup> Gambar 2.2.2.2 dibawah ini memperlihatkan genom EBV dan posisi gen-gen latennya.



**Gbr.2.2.2.2 Genom EBV (Murray & Young 2001).** Gambar menunjukkan lokasi dan transkripsi dari gen laten EBV pada *double stranded DNA episome*. Warna orange menunjukkan daerah asal replikasi plasmid (*oriP*). Kotak warna ungu menunjukkan *coding exon* dari setiap protein laten dan tanda panah menunjukkan arah gen tersebut ditranskripsikan: protein laten tersebut meliputi: 6 *nuclear antigens (EBNAs 1,2,3A,3B,3C dan EBNA LP)*, 3 *Laten Membran Protein (LMPs 1,2A dan 2B)*. *EBNA LP* ditranskripsi dari beberapa *exon repetitive*. *LMP2A* dan *B* terdiri dari beberapa *exon* yang berasal dari sisi lokasi *terminal repeat (TR)* yang terbentuk selama sirkularisasi linear DNA saat pembentukan *episome virus*. Panah orange yang terletak diatas menunjukkan daerah transkripsi dari *non polyadenylated RNAs EBER 1 dan EBER2*. Panah panjang luar warna merah menunjukkan arah transkripsi EBV pada latensi III, dimana semua *Protein EBNA* ditranskripsi dari *promoter Cp dan Wp*. Panah pendek biru menunjukkan transkripsi dari *EBNA 1* yang berasal dari *promoter Qp* selama latensi I dan II. Transkrip dari *Bam A region* dapat dideteksi selama masa infeksi laten tetapi tidak ada protein yang terbentuk dari regio ini. Terlihat pula lokasi dari *BARF0* dan *BARF1 coding region*.

### 2.2.3 Infeksi dan Gen Laten EBV

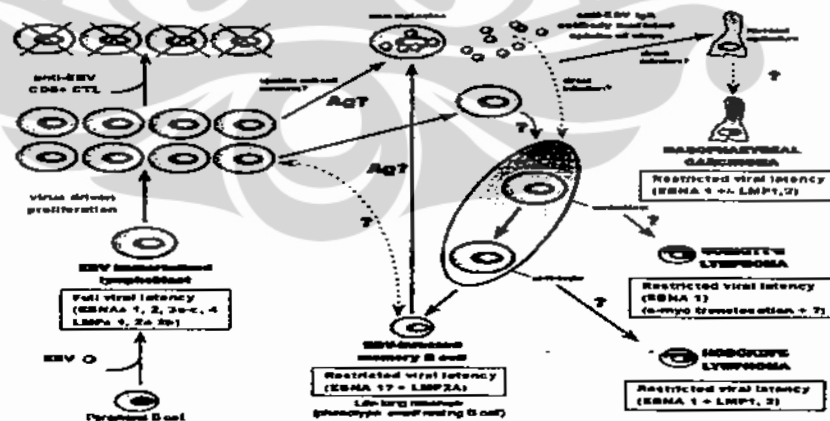
EBV mempengaruhi pertumbuhan limfosit B, sehingga terjadi perubahan atau transformasi pertumbuhan yang permanen melalui ekspresi gen-gen yang dikeluarkan oleh virus.<sup>(28)</sup> Ada sekitar 80-100 gen yang dikeluarkan oleh virus tetapi gen-gen yang paling sering dibicarakan terkait dengan patogenesis beberapa

kanker adalah sebagai seperti yang terlihat pada tabel 2.2.3.1 dibawah ini, berikut fungsinya.

**Tabel 2.2.3.1. Gen laten EBV dan Fungsinya**<sup>29</sup>

Gen	Fungsi
EBNA 1	Menjaga agar genom virus dapat terus ikut bereplikasi dalam sel host
EBNA 2	Penting dalam proses transformasi sel B Berperan pada proses transkripsi dari LMP2 dan gen lainnya, Menyerupai jalur signaling NOTCH
EBNA3 dan LP	Mengatur kerja dari EBNA2, mengatur faktor-faktor yang dibutuhkan bagi pertumbuhan sel B, berinteraksi dengan p53 dan Rb
LMP1	Mengatur transformasi protein-protein Menyerupai kerja dari reseptor CD40 yang teraktifasi, meningkatkan kerja dari NFkB
LMP2A dan 2B	Menyerupai reseptor B-cell receptor (BCR) dan akan membantu sel yang tidak mempunyai BCR untuk berproliferasi dan menghindar dari apoptosis

Gen laten EBV berbeda-beda pada tiap keganasan, hal tersebut berhubungan dengan interaksi antara virus dan inangnya yang juga berbeda. Pola tersebut dapat terlihat pada gambar 2.2.3.2

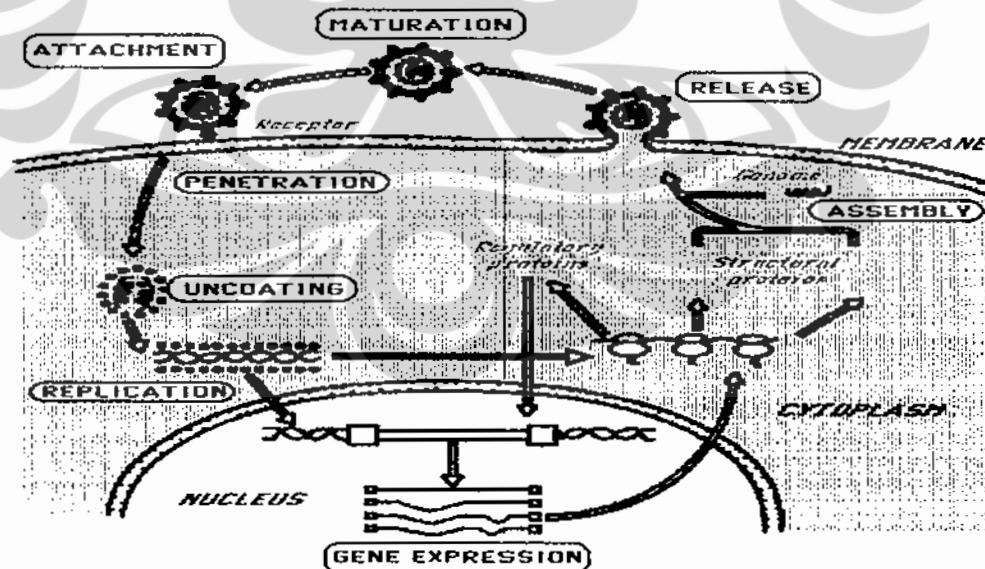


**Gbr 2.2.3.2. Infeksi EBV, gen laten dan keganasannya.**Tanda panah menunjukkan masih banyak mekanisme virus yang belum diketahui pada berbagai penyakit. (Courtesy Skip Virgin, WUMS 2-24-04)

Pada latensi I, EBNA 1 selalu terdeteksi pada *Burkitt's Lymphoma cell line*. Ditranskripsi oleh *promoter* pada daerah *BamH1F*. Pada Latensi II ditandai dengan ekspresi semua LMP dan EBNA 1 pada keganasan yang tidak terkait sel B, salah satunya adalah KNF<sup>30</sup>. Dari semua gen laten tersebut hanya EBNA1, LMP1 dan LMP2 yang selalu terdeteksi pada setiap latensi, hal ini menunjukkan bahwa gen tersebut memainkan peranan yang penting untuk mempertahankan infeksi laten dari EBV. Selain itu produk gen yang selalu ada pula pada setiap latensi adalah EBER (*The EBV encoded RNAs*)

#### 2.2.4. Proses Replikasi Virus

Proses replikasi virus, diharapkan akan memperjelas pemahaman akan cara kerja EBV saat masuk dan menginfeksi sel/inang. Agar virus dapat masuk dan memperbanyak diri maka virus harus masuk dan menginfeksi sel hidup yang spesifik untuk setiap virus. Proses yang harus dipastikan oleh virus untuk menginfeksi sel adalah memastikan agar proses replikasi genomnya dapat terjadi, mengemas genomnya kedalam partikel virus dan mengubah metabolisme sel yang terinfeksi sehingga sel tersebut dapat memproduksi virus, melalui beberapa proses seperti terlihat pada gambar 2.2.4. dibawah ini.



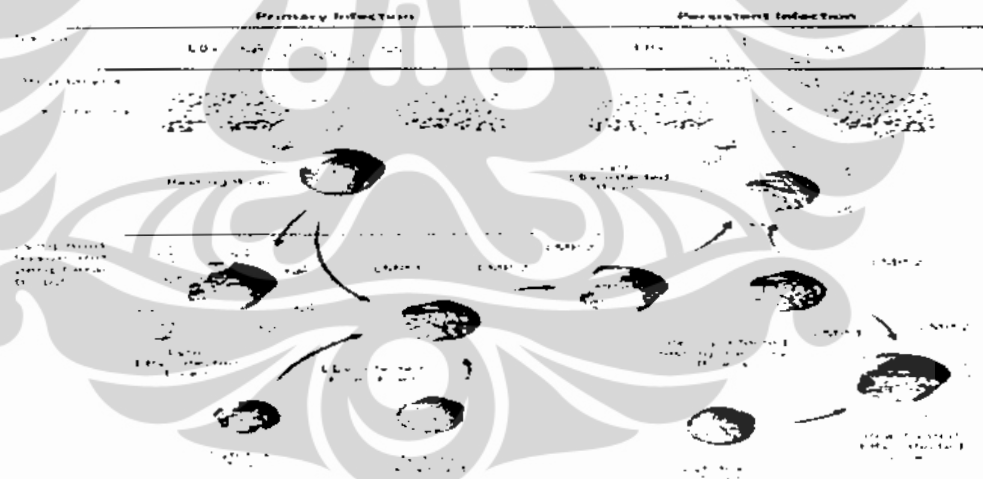
Gbr. 2.2.4. Proses Replikasi Virus. (University of Wageningen, Netherlands, 2010).



Proses tersebut terjadi melalui 3 fase yaitu fase Inisiasi dimana virus menempel pada membran sel (*attachment*), masuknya virus kedalam sel (*penetration*) dan terlepasnya selubung virus (*uncoating*). Selanjutnya terjadi fase Replikasi dimana terjadi sintesis DNA, RNA dan Protein virus. Pada fase ini, protein virus melakukan replikasi genomnya menggunakan protein sel inangnya. Proses terakhir adalah fase Pelepasan/*Release* dimana terjadi perakitan virus (*assembly*), pematangan virus (*maturation*) dan keluarnya virus dari sel (*exit from cell*). Proses replikasi ini hampir selalu sama pada setiap virus walaupun ukuran genom, komposisi dan susunan virus bervariasi sesuai klasifikasinya.

### 2.3. Pemeriksaan DNA EBV

Banyak penelitian membuktikan bahwa DNA tumor dapat terdeteksi didalam serum/plasma darah berbagai penyakit keganasan diantaranya keganasan paru, kepala dan leher, kolorektal dan leukemia<sup>32-35</sup> yang berasal dari sel tumor yang mati akibat nekrosis atau apoptosis. Model infeksi virus pada gambar 2.3. ini memperlihatkan bagaimana DNA virus berada dalam aliran darah.



**Gbr 2.3. Model Infeksi EBV pada manusia.** Pada orofaring, EBV menginfeksi sel epitel dan selanjutnya masuk untuk menginfeksi sel B. Selama infeksi primer sel B yang terinfeksi mengalami siklus litik dengan produksi virus atau mengekspresikan seluruh protein laten virus. Infeksi akan diatasi oleh sel NK atau sel T sitotoksik. Selama masa konvalensi, EBV terdapat didalam darah yang bersirkulasi dalam bentuk infeksi laten pada sel B memori dengan ekspresi protein laten membran (LMP2) dan antigen inti EBV (EBNA 1). Sel B memori yang terinfeksi EBV dapat mengalami reaktivasi. Beberapa sel yang berada pada infeksi laten dapat menjalani replikasi litik pada orofaring yang menyebabkan keluarnya virus dalam saliva atau sel epitel. EBV:Epstein-Barr Virus, NK: Natural Killer, LMP2:Protein Laaten Membran 2, EBNA1: Antigen inti EBV.

Nilai sensitivitas dan spesifisitas biasanya dinyatakan dalam persen. Sensitivitas digambarkan pada sumbu Y yang mewakili nilai Positif Benar (*True Positive*) dan 1- spesifisitas atau nilai yang mewakili Positif Palsu (*False Positive*) digambarkan pada sumbu X. Nilai positif benar dan positif palsu adalah nilai yang didapat dengan menggunakan tabel 2.6.1. dibawah ini:

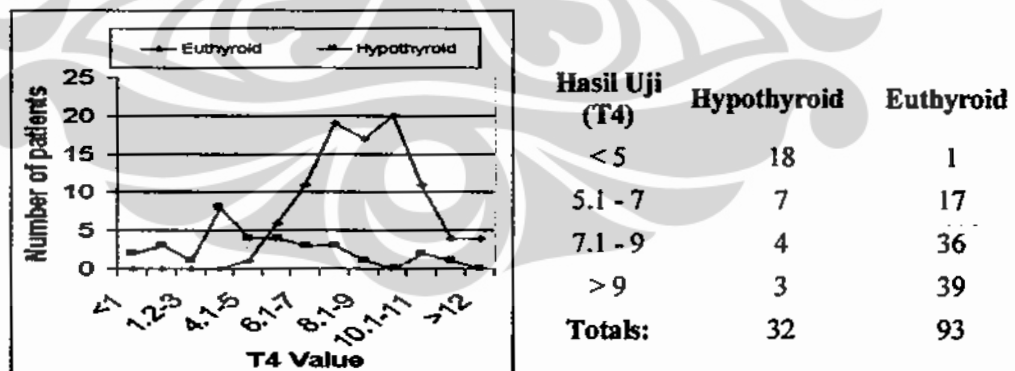
**Tabel 2.6.1. Tabel Sensitivitas dan Spesifisitas<sup>64</sup>**

	Baku Emas + ve	Baku Emas - ve	Jumlah
Uji + ve (nilai uji)	a	b	a + b
Uji - ve (nilai uji)	c	d	c + d
Jumlah	a + c	b + d	a + b + c + d

Sensitivitas (True Positif) :  $a / (a+c)$

Spesifisitas (False Positif) :  $d / (b+d)$

Nilai uji adalah nilai yang didapat dari hasil uji diagnostik yang dilakukan dan nilainya akan diuji dengan menggunakan tabel diatas sehingga nilai sensitifitas dan sensitifitasnya dapat ditentukan. Pada gambar 2.6.2. diperlihatkan contoh bagaimana menentukan nilai sensitifitas dan spesifisitas dari uji yang dilakukan. Hasil pengukuran atau hasil uji dibuat dalam beberapa katagori untuk selanjutnya ditentukan penggunaan nilai-nilai dibawah ini:



**Gbr 2.6.2. Contoh hasil uji diagnostik (T4) pada keadaan *Hypothyroid* dan *euthyroid*. Warna merah: menunjukkan pasien yang mengalami hipotiroid dan warna biru eutiroid. Nilai pada tabel merupakan konversi nilai pada gambar disampingnya.<sup>68</sup>**

Selanjutnya dari berbagai nilai T4 yang diperoleh, dipilihlah nilai T4 yang mempunyai nilai sensitivitas dan spesifisitas yang diinginkan dan sesuai dengan tujuan penentuan uji diagnostik yang kita lakukan. Contoh bagaimana mencari nilai sensitifitas dan spesifisitas dapat dilihat pada tabel 2.6.3. dibawah ini

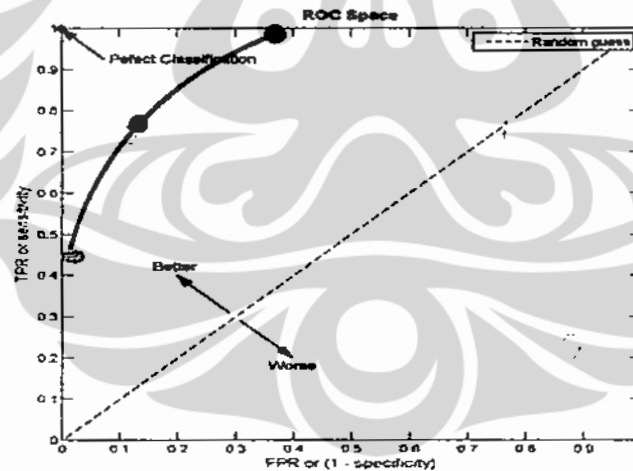
**Tabel 2.6.3. Contoh nilai sensitivitas dan spesifisitas pada nilai T4 < 5 dan > 5<sup>68</sup>**

Hasil Uji (T4)	Hypothyroid	Euthyroid
< 5	18	1
> 5	14	92
<b>Totals:</b>	<b>32</b>	<b>93</b>

Nilai sensitivitas adalah:  $18 / 18 + 14 = 0.56$  ( $0.56 \times 100\%$ ) = 56%

Nilai spesifisitas adalah:  $92 / 1 + 92 = 0.99$  ( $0.99 \times 100\%$ ) = 99%

Selanjutnya nilai-nilai tersebut dimasukkan pada kurva ROC dan ditentukan nilai cut off dari pemeriksaan yang telah dilakukan. Pada gambar 2.6.4. digambarkan kurva ROC serta posisi nilai-nilai yang ditentukan berdasarkan sensitifitas dan spesifisitasnya.



**Gbr 2.6.4. Kurva ROC.** Grafik ROC berisi nilai-nilai yang dipilih sesuai dengan kebutuhan pemeriksaan berdasarkan sensitifitas dan spesifisitasnya. Garis merah membagi kurva menjadi 2 bagian, dimana arah atas yang semakin menjauhi garis merah menunjukkan nilai-nilai yang baik dengan kemungkinan positif benar besar (contoh titik warna merah) atau mendekati sisi pojok kiri atas dari kurva seperti terlihat pada tanda panah diatas, sedang arah semakin ke bawah garis merah menunjukkan nilai-nilai buruk dengan positif palsu yang makin besar (contoh titik warna kuning). ROC:Receiver Operating Characteristics, FPR:False Positive Rate= Positif palsu, TFR:true positive rate= positif benar.

## BAB III

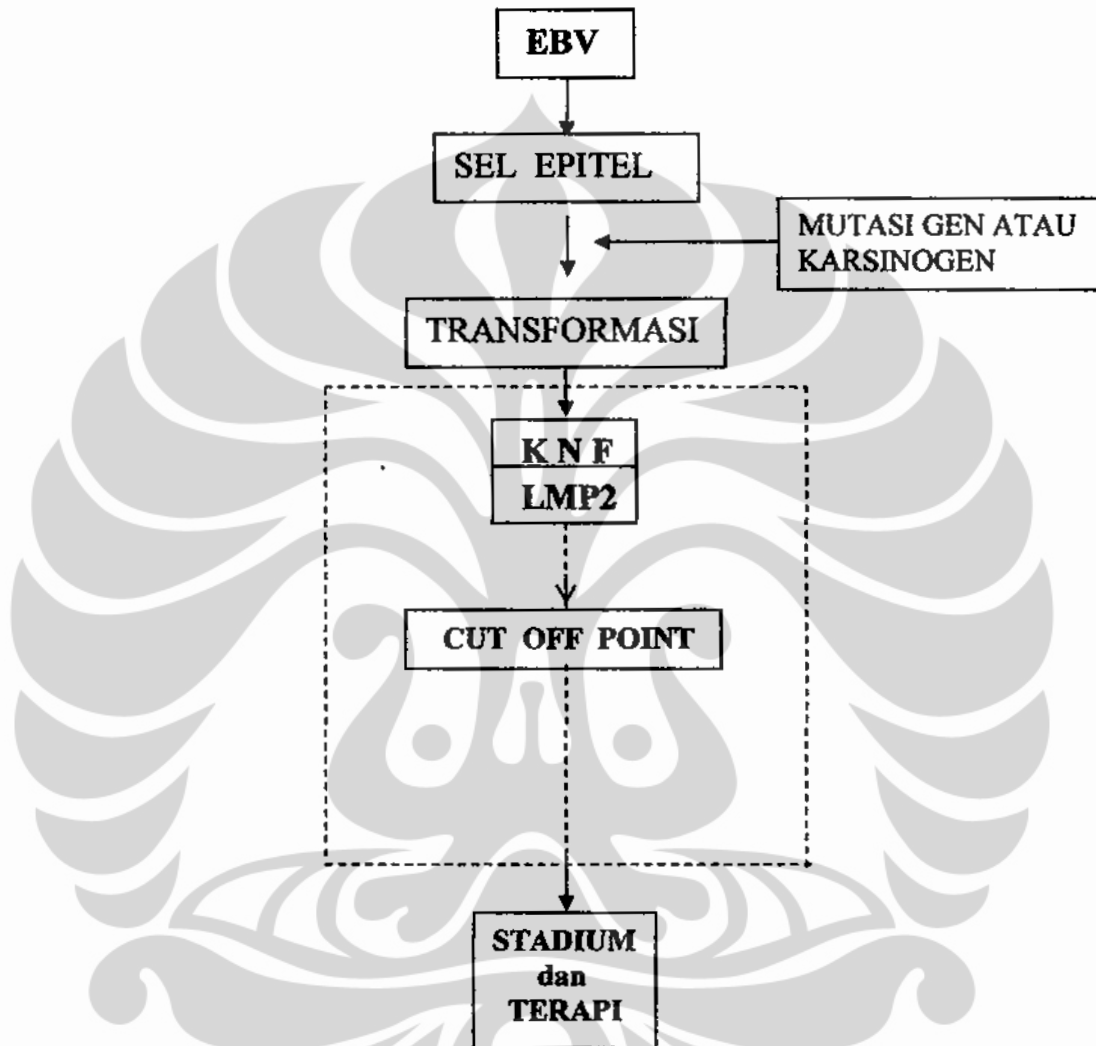
### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Kerangka Konsep

KNF diketahui terkait erat antara faktor genetik, pola diet yang mengandung karsinogen tertentu dan infeksi Virus Epstein Barr.<sup>2</sup> Dengan modalitas terapi utama yang dipergunakan adalah radiasi dan atau kemoterapi sesuai dengan stadium penyakit. Penentuan stadium merupakan hal yang penting sebelum pemberian terapi, karena penentuan stadium penyakit akan menentukan jenis dan program pengobatan yang akan diberikan. Pada KNF stadium awal I/II, pengobatan utama adalah radioterapi sedangkan pada stadium lanjut III/IV adalah radioterapi didahului kemoterapi (*neoadjuvant kemoterapi*) atau radioterapi dilakukan bersama dengan kemoterapi (*concurrent/concomitant kemoterapi*) atau radioterapi diakhiri dengan kemoterapi (*adjuvant kemoterapi*)<sup>47</sup>. Untuk keperluan tersebut, diperlukan *marker* yang dapat dipergunakan dalam membedakan antara penderita KNF stadium awal dan lanjut bukan hanya ditingkat sel atau jaringan tetapi juga ditingkat molekuler. DNA LMP2 EBV adalah salah satu gen laten yang transkripsinya selalu terdapat pada penderita KNF. Penggunaannya sebagai salah satu *marker* pada penatalaksanaan pengobatan KNF mulai banyak diteliti walaupun dalam tatalaksana klinis belum banyak digunakan.

Pada penelitian ini, akan dilihat apakah terdapat perbedaan antara nilai/kadar DNA LMP2 EBV pada serum/plasma penderita KNF berjenis histopatologi *undifferentiated* stadium awal (I/II) dengan KNF stadium lanjut (III/IV), dimana bila terdapat perbedaan nilai antara kedua kelompok tersebut, maka pemeriksaan DNA LMP2 EBV dapat dipergunakan sebagai *marker molekuler* yang potensial dalam membedakan kedua kelompok tersebut. Selanjutnya penentuan *nilai cutt off* akan melengkapi manfaat dari pemeriksaan DNA LMP2 EBV ini, dalam penentuan stadium dan program pengobatan, disamping pemeriksaan diagnostik lainnya. Sehingga dimasa yang akan datang penentuan stadium dan pengobatan bagi penderita KNF akan ditentukan tidak hanya berdasarkan kondisi klinis yaitu dengan menggunakan hasil *patologi*

*anatomis Thorax PA, USG Abdomen* serta *Bone Scaning* sebagai pemeriksaan diagnostik penunjang tetapi juga secara molekuler dengan menggunakan nilai DNA LMP2 EBV, melalui pemanfaatan nilai *cut off*.



**Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian**

Keterangan

----- : Ruang lingkup penelitian

### 3.2. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi *analytical cross-sectional* untuk melihat jumlah/kadar DNA LMP2 EBV dalam serum/plasma penderita KNF berjenis

*undifferentiated* setelah dilakukan proses staging berada pada stadium I/II dan stadium III/IV dan belum pernah mendapatkan terapi baik kemoterapi dan atau radiasi. Selanjutnya serum/plasma penderita KNF tersebut diperiksa dan ditentukan kadarnya dengan metoda PCR menggunakan *Light Cycler EBV Quantification Kit* dari Roche terhadap DNA LMP2 EBV. Hasil pemeriksaan akan dianalisa untuk mengetahui adanya perbedaan antara kadar DNA LMP2 EBV pada serum/plasma penderita KNF stadium awal (I/II) dan stadium lanjut (III/IV).

### **3.3. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian di lakukan pada pasien KNF di Rumah Sakit Kanker “Dharmais” (RSKD). Pengambilan sampel darah dilakukan pada laboratorim RSKD dan dilakukan oleh staf Instalasi Patologi Klinik RSKD. Pemeriksaan laboratorium dilakukan di laboratorium Patologi Klinik RSKD sejak November 2008 sampai dengan April 2010.

### **3.4. Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **3.4.1. Populasi Penelitian adalah :**

Pasien Kanker Nasofaring (KNF) berjenis *undifferentiated* yang berada pada stadium awal (I/II) dan stadium lanjut ( III/IV)

#### **3.4.2. Sampel Penelitian adalah :**

Sampel darah (serum/plasma) yang diambil dari penderita Kanker Nasofaring (KNF) yang berjenis *undifferentiated* berada pada stadium awal (I/II) dan stadium lanjut (III/IV) yang berobat di (RSKD) dan telah menandatangani *informed consent*.

#### **3.4.3 Kontrol negatif berasal dari serum/plasma darah orang yang sehat**

#### **3.4.4. Kontrol positif berasal dari serum/plasma penderita KNF yang mempunyai kadar DNA LMP2 EBV yang tinggi**

### 3.5. Besar Sampel

Perhitungan besar sampel minimal dihitung dengan menggunakan rumus uji 2 hipotesis:

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2}{(X1 - X2)^2}$$

Dimana S (Standar Deviasi) diambil dari rumus Standar Deviasi Gabungan yaitu :

$$Sp^2 = \frac{(n1 - 1) S1^2 + (n2 - 1) S2^2}{(n1 - 1) + (n2 - 1)}$$

Keterangan

n1 = jumlah sampel kelompok 1 (penelitian sebelumnya) = 10

n2 = jumlah sampel kelompok 2 (penelitian sebelumnya) = 10

S1 = standar deviasi kelompok 1 (penelitian sebelumnya) = 8268.50

S2 = standar deviasi kelompok 2 (penelitian sebelumnya) = 2681.59

$$Sp^2 = \frac{(10 - 1) \cdot 8268.50^2 + (10 - 1) \cdot 2681.59^2}{(10 - 1) + (10 - 1)}$$

$$Sp^2 = 5475.04$$

Selanjutnya jumlah sampel dicari dengan rumus

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2}{(X1 - X2)^2}$$

$\alpha = 1 - 5\%$ , 5% (2-sided)

$\alpha = 5\%$ ,  $= Z_{0.975} = 1.96$

$\beta = 10\%$   $= Z = 1.28$

X1 = mean kelompok 1 = 4893.66 (Peneliti)

X2 = mean kelompok 2 = 1641.84 (Peneliti)

S = Standar Deviasi = 5475.04 (Peneliti)

$$n = \frac{2(1.96 + 1.28)^2 \cdot 5475.04}{(4893.66 + 1641.84)^2}$$

$$n = 59, 51$$

$$n1 = n2 = 60 \text{ sampel}$$

### **3.6. Cara Kerja**

#### **3.6.1. Rekrutmen Subyek Penelitian**

Sampel serum/plasma darah penderita KNF pada stadium awal (I/II) dan stadium lanjut (III/IV) sebelum pemberian terapi, didapat melalui pengambilan darah yang dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi RS.Kanker Dharmais. Pasien yang memenuhi persyaratan dihubungi / ditemui, untuk diminta kesediaannya menandatangani *informed consent*.

#### **3.6.2. Bahan**

Bahan penelitian adalah darah: serum/plasma penderita KNF yang setelah menjalani proses *staging* (penentuan stadium), berada pada stadium awal (I/II) dan Stadium lanjut (III/IV), yang berobat di RS.Kanker Dharmais.

#### **3.6.3. Pengambilan Sampel Darah**

Darah perifer diambil dari penderita selanjutnya disentrifus dan serum/plasma diambil dan dimasukkan dalam tabung. Selanjutnya disimpan dalam suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk pemeriksaan selanjutnya.

#### **3.6.4. Metode Pemeriksaan**

Pemeriksaan kadar LMP2 dalam serum/plasma penderita KNF dilakukan dengan menggunakan metode *Real Time PCR* adapun langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

##### **3.6.4.1. Isolasi DNA dalam Serum Penderita**

Langkah- langkah Isolasi DNA dari sampel serum adalah:

1. Kit : *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* dari Roche
2. Sampel darah berupa serum/plasma penderita KNF disiapkan
3. Persiapan *Working Solution: Poly A, Binding Buffer*.
4. Serum/plasma sampel 200 $\mu\text{l}$ , *Proteinase K* 50 $\mu\text{l}$  dan 200 $\mu\text{l}$  *working solution* dimasukkan dalam tabung dan diinkubasi pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit.



5. Sebanyak 5µl *Internal kontrol* dan 100µl *binding buffer* ditambahkan dalam tabung
6. *Filter tube* dan *colection tube* disatukan lalu sampel dipindahkan kedalam *filter tube* dan disentrifuge pada 8000g selama 1 menit.
7. Hasil cairan dibuang dan diberi 500 µl *inhibitor removal buffer*, lalu disentrifuge pada 8000g selama 1 menit.
8. Cairan yang terkumpul dibuang, beri 450µl *wash buffer*, dan disentrifuge pada 8000g 1menit dan dilakukan sebanyak 2 kali.
9. Cairan yang terkumpul dibuang, 450µl *wash buffer* ditambahkan, dan disentrifuge pada 8000g selama 3 menit
10. Cairan yang terkumpul dibuang dan disentrifuge kembali pada 13.000g selama 10 detik.
11. Tabung diganti, dipasang tabung baru dan ditambahkan 100µl *elution buffer* lalu disentrifuge pada 8000g selama 1menit.
12. Didapatkan DNA yang sudah dipurifikasi.
13. DNA disimpan dalam suhu -20°C sampai saat digunakan

#### 3.6.4.2 *Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction)*

Langkah-langkah Analisa Real Time PCR:

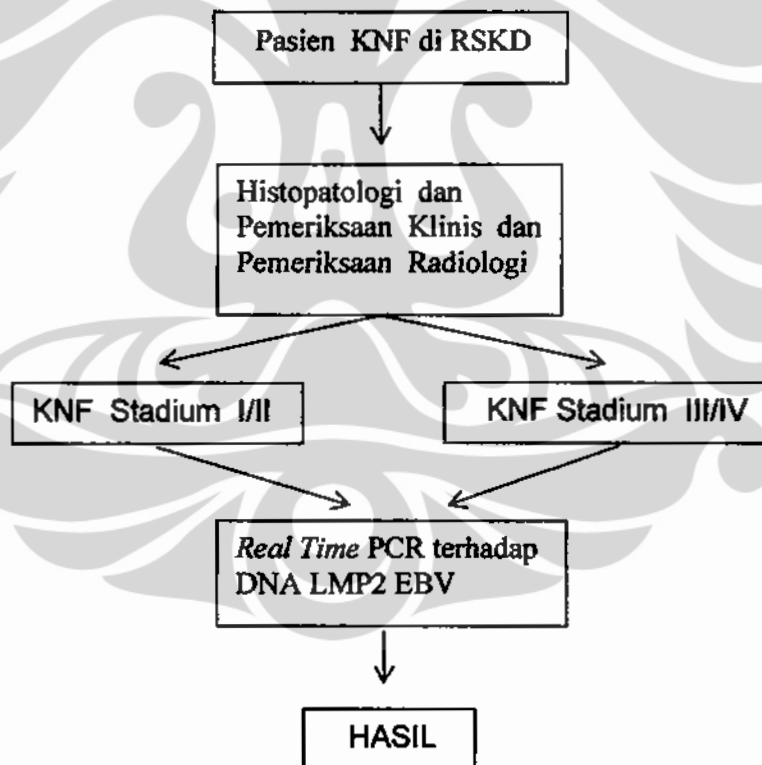
1. Kit: *EBV Quantification Kit* dari Roche
2. Tabung kapiler diisi dengan 15µl campuran dari *deoxynucleoside triphosphate*, primers yang berisi 96 bp region dari genom EBV (tidak dapat dipublikasi karena kerahasiaan produk), *probe ( FRET hybridization probe)*, *MgCl<sub>2</sub>*, *Tag DNA Polymerase* dan *H<sub>2</sub>O*, dan DNA Sampel/ Internal Kontrol/ Standart sebanyak 5µl.
3. Selanjutnya PCR dijalankan bersama dengan standar yang terdapat didalam kit, H<sub>2</sub>O dari Kit, H<sub>2</sub>O hasil isolasi DNA, kontrol positif dan kontrol negatif.
4. PCR dilaksanakan sebanyak 45 siklus.

### 3.6.4.3. Cara Melakukan Kuantifikasi

Langkah-langkah Kuantifikasi DNA EBV LMP2:

1. Jumlah amplifikasi dihitung berdasarkan warna yang muncul (channel 640) dan dari internal kontrol (channel 705).
2. Melalui *melting curve* dilakukan analisis spesifisitas. Temperatur *melting* saat DNA terpisah, berbeda, tergantung dari susunan nukleotida penyusunnya. Perbedaan satu basa dalam DNA akan menghasilkan perbedaan *temperatur melting*. Maka *temperatur melting* dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesifisitas DNA.
3. Hasil amplifikasi dihitung dengan menggunakan *detektor sequencer* dan jumlah copy DNA LMP2 EBV dihitung.
4. Jumlah copy DNA terkecil yang dapat dideteksi adalah 10 copy.

### 3.7. Alur Penelitian



Gambar 3.7. Alur Penelitian

### **3.8. Manajemen dan Analisis Data**

Hasil penelitian akan dikelola sebagai berikut:

1. Data deskriptif akan ditampilkan untuk melihat karakteristik penderita dan semua variabel yang diteliti akan disajikan dalam bentuk tabular.
2. Dibuat perbandingan jumlah kadar DNA LMP2 EBV dalam darah pada pasien KNF stadium I/II dan Pasien KNF stadium III/IV menggunakan uji T Test/ Mann-Whitney Test. Uji statistik dikatakan bermakna bila  $p < 0,05$ .
3. Dibuat kurva ROC antara kadar DNA LMP2 EBV dalam darah pasien KNF stadium I/II dan pasien KNF stadium III/IV, untuk menentukan nilai *Cut Off* nya.
4. Analisa data dilakukan dengan menggunakan program SPSS versi 17

### **3.9. Definisi Operasional**

1. **KNF Stadium Awal I/II** adalah KNF yang berdasarkan pemeriksaan CT Scan, biopsi nasofaring, hasil USG Abdomen, Thorax PA dan Bone Scan ditentukan berada pada stadium I/II.
2. **KNF Stadium Lanjut III/IV** adalah KNF yang berdasarkan pemeriksaan CT Scan, biopsi nasofaring, hasil USG Abdomen, Thorax PA dan Bone Scan ditentukan berada pada stadium III/IV.

### **3.10. Etika Penelitian**

Penelitian ini tidak mengandung unsur intervensi kepada penderita, namun pada setiap analisis genetik perlu dilengkapi dengan persetujuan tertulis atau *informed consent* pada penderita atau keluarganya. Sebelumnya kepada pasien/keluarga diberikan penjelasan tentang tujuan penelitian serta manfaat yang bisa didapat dari penelitian ini. Setelah memahami tujuan dan manfaat maka penderita yang setuju untuk ikut dalam penelitian ini diminta untuk menandatangani surat persetujuan yang sudah disiapkan oleh peneliti. Kaji etik dan keterangan lolos kaji etik telah diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Rumah Sakit Kanker Dharmais dengan surat keputusan No.18/PEP/05/2009.

## BAB IV

### HASIL & PEMBAHASAN PENELITIAN

#### 4.1. Karakteristik Subyek Penelitian

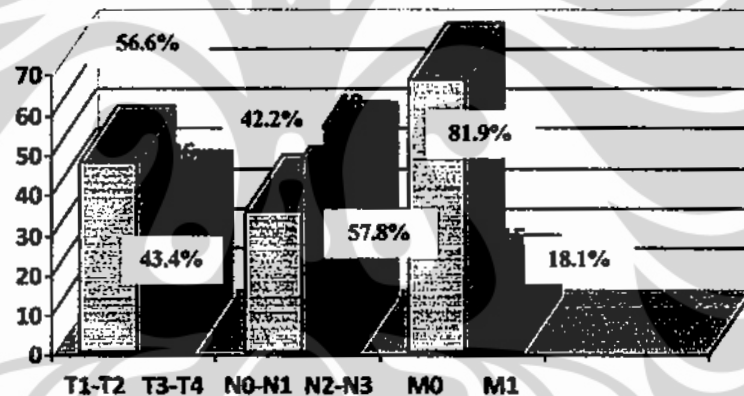
Selama penelitian, dari pasien yang berkunjung ke poli THT sejak November tahun 2008 sampai dengan April tahun 2010 terkumpul sampel serum/plasma darah penderita KNF sebanyak 220 sampel. Pengumpulan subyek penelitian dimulai melalui penelusuran data penderita Kanker Nasofaring di Bagian Litbang/ Registrasi Kanker RS. Kanker "Dharmais" dilanjutkan dengan membuka rekam medis semua penderita KNF untuk melihat hasil pemeriksaan *Patologi Anatomi (PA)*, hasil penentuan stadium, hasil laboratorium dan hasil pemeriksaan radiologi: *Thorax PA, USG Abdomen dan Bone Scanning*.

Subyek penelitian adalah pasien yang datang ke Rumah Sakit Kanker "Dharmais", dan sesuai dengan kriteria inklusi yang sudah ditetapkan dalam penelitian ini. Dari 220 sampel, ternyata hanya sebanyak 83 sampel serum/plasma sesuai dan memenuhi kriteria inklusi yang sudah ditetapkan, dimana jumlah tersebut tidak dapat memenuhi jumlah sampel minimal yaitu 60 sampel untuk masing-masing kelompok penderita KNF stadium awal (I/II) dan kelompok penderita KNF stadium lanjut (III/IV). Karakteristik ke 83 penderita KNF tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.1.1.

**Tabel 4.1.1. Karakteristik Subyek Penelitian**

Karakteristik	n (%)
n	83 (100,0)
<b>Jenis kelamin</b>	
Laki-laki	53 (63,90)
Perempuan	30 (36,10)
<b>Usia (Tahun)</b>	
<40 tahun	26 (31,34)
40 – 60 tahun	48 (57,83)
>60 tahun	9 (10,84)
<b>Stadium</b>	
Std awal (I/II)	25 (30,10)
Std lanjut (III/IV)	58 (69,90)

Dari tabel 4.1.1. sebagian besar penderita KNF berasal dari penderita berstadium lanjut (III/IV) sebanyak 58 sampel atau 69.9%, dan sisanya sebanyak 25 sampel atau 30.1% berasal dari penderita KNF stadium I/II. Seluruh penderita berada pada rentang usia 11 tahun sampai dengan 72 tahun dengan umur rata-rata  $44,93 \pm 12,24$  tahun. Sampel terbanyak berasal dari penderita berjenis kelamin laki-laki yaitu sebanyak 53 sampel atau 63.9% dan sisanya 30 sampel atau 36.1% berasal dari penderita KNF perempuan. Hal ini sesuai dengan banyak peneliti yang mengatakan bahwa sebagian besar penderita KNF datang pada stadium lanjut dan jumlah penderita laki-laki lebih banyak dibandingkan penderita perempuan, dengan umur terbanyak penderita antara 40 sampai dengan 50 tahun <sup>47</sup>. Selanjutnya penderita KNF dibagi sesuai dengan status T (tumor), N (Nodul) dan M (metastasis) -nya menurut UICC, seperti terlihat pada gambar 4.1.2.

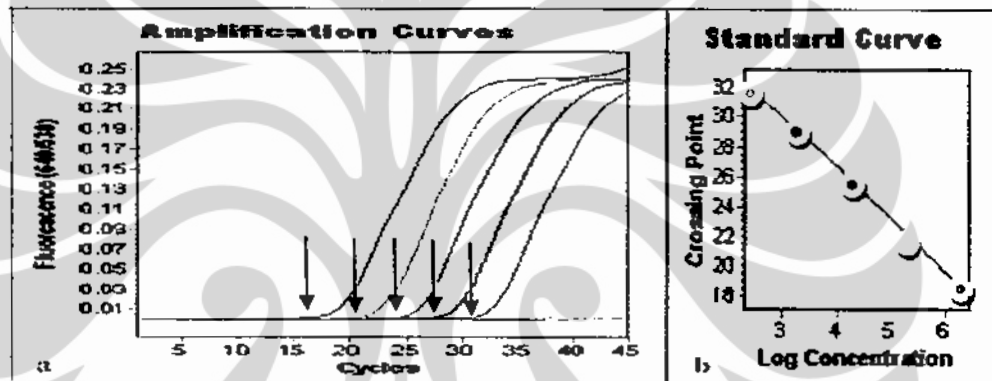


Gbr.4.1.2 Karakteristik Penderita KNF menurut status T: T1-T2 dan T3-T4, Status N: N0-N1 dan N2-N3 dan status M: M0 dan M1

#### 4.2. Pengukuran Kadar DNA LMP2 EBV

Pengukuran kadar DNA EBV LMP2 pada serum/plasma dilakukan pada ke-2 kelompok penderita KNF stadium awal ( I/II) dan kelompok stadium lanjut (III/IV), menggunakan metode *Real Time* PCR. Penggunaan metode ini mempunyai beberapa keuntungan diantaranya metode ini terbukti sensitif, spesifik, proses mudah dan cepat dengan hasil berupa data yang bersifat kuantitatif. Untuk *reagen*, penulis menggunakan *LightCycler EBV*

*Quantification Kit*, salah satu *reagen* spesifik dari ROCHE dengan LMP2 sebagai target gen yang digunakan. Reaksi dilakukan bersamaan dengan 5 standar DNA EBV yang berisi  $10^6$  sampai dengan  $10^2$  copy DNA per reaksi, kontrol negatif yang berasal dari darah orang sehat dan kontrol positif yang berasal dari penderita KNF yang mempunyai nilai DNA LMP2 EBV yang tinggi/positif, sampel H<sub>2</sub>O sebagai kontrol negatif pada setiap melakukan isolasi DNA dan sampel H<sub>2</sub>O sebagai kontrol negatif dari Kit PCR yang digunakan. Gambar 4.2.1 menunjukkan kurva amplifikasi yang dihitung berdasarkan 5 nilai konsentrasi standar DNA LMP2 EBV dan standar kurva yang menunjukkan konsentrasi standar DNA LMP2 EBV berdasarkan nilai *crossing point*.

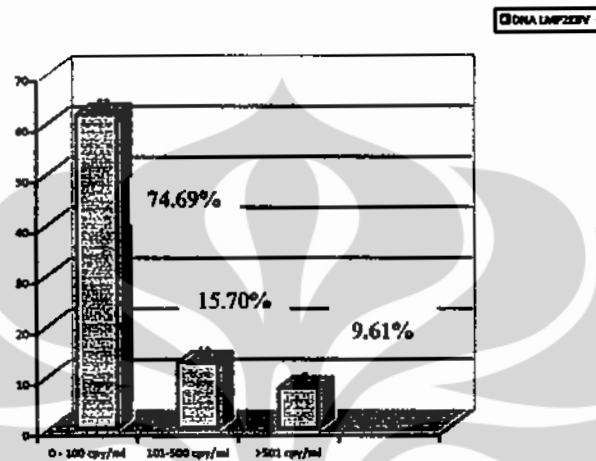


Gbr 4.2.1 Amplifikasi DNA LMP2 EBV standar menggunakan real time PCR. (a). Pengukuran dihitung terhadap *signal fluorescence* yang meningkat diatas *baseline* yaitu pada *crossing point* digambarkan dengan gambar panah (b). Standar Kurva menggambarkan nilai DNA standar yang teramplifikasi, setiap warna mewakili konsentrasi DNA yang teramplifikasi.

Kurva standar menggambarkan tingkat *error* dan *efisiensi* yang terjadi pada reaksi PCR yang dilakukan. Pengukuran kadar DNA LMP2 EBV dalam serum/plasma dilakukan terhadap kedua kelompok pasien tersebut (penderita KNF stadium awal dan lanjut). Pemeriksaan dilakukan *secara in duplo* untuk memastikan ketepatan hasil dalam proses tersebut. Pada sampel dengan hasil *duplo* yang berbeda akan dilakukan pengulangan. Data seluruh hasil pemeriksaan PCR kedua kelompok tersebut dapat dilihat pada lampiran 1.

Penggunaan *Light Cycler EBV Quantification Kit* sebagai *reagen* yang dipakai dalam penelitian berdasarkan bukti dan kemampuan yang baik dalam mendeteksi dan kuantifikasi DNA EBV khususnya LMP2 dan mempunyai

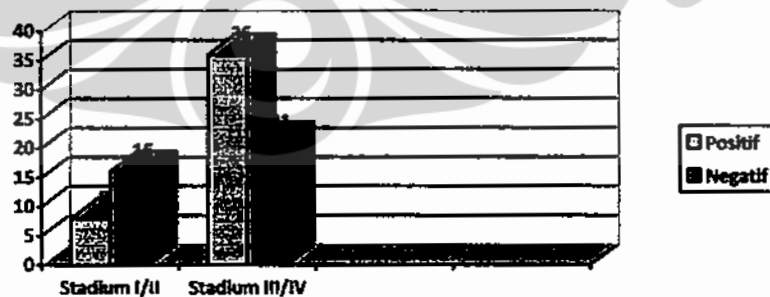
tingkat spesifitas dan sensitifitas yang tinggi dalam penggunaannya diberbagai riset terkait DNA EBV.<sup>43,48,49,50</sup> Selanjutnya semua sampel diperiksa terhadap DNA LMP2 EBV dan hasil dibagi dalam kelompok interval seperti terlihat pada diagram batang pada gambar 4.2.2.dibawah ini.



Gbr.4.2.2 Kadar DNA LMP2 EBV pada 83 penderita KNF

#### 4.3. Hasil Pemeriksaan DNA EBV pada Stadium Awal (I/II) dengan Stadium Lanjut (III/IV)

Dilakukan analisa deskriptif pada hasil pengukuran DNA LMP2 EBV kedua kelompok namun hasil tersebut tidak dapat dilakukan analisa bivariat karena tidak memenuhi jumlah sampel minimal. Hasil analisa deskriptif pemeriksaan kedua kelompok penderita KNF tersebut, ditampilkan pada gambar 4.3.1. dibawah ini.



Gbr 4.3.1 Hasil pengukuran DNA EBV pada stadium I/II dan stadium III/IV. Stadium I/II Positif 33.30% dan negatif 66.70%. Stadium III/IV Positif 63.15% dan negatif 36.84%

Berdasarkan hasil analisa data menggunakan analisa deskriptif, diperoleh hasil sebagai berikut: dari 25 penderita KNF stadium awal (I/II), terdapat sebanyak 17 sampel (66.7%) yang tidak menunjukkan adanya copy DNA (*negatif copy*) dan terdapat 8 (33.3%) sampel menunjukkan adanya copy DNA EBV (*positif copy*). Hal tersebut mengandung arti bahwa pada penderita KNF stadium awal (I/II) sebagian besar penderita menunjukkan hasil pengukuran DNA EBV negatif (*negatif copy*) namun terdapat pula sebagian kecil penderita (33.3%) dengan hasil positif dengan nilai median 0 copy DNA/ml (0-94.7copy/ml).

Penelitian kohort Leung Sing-fai *et al*, 2003,<sup>40</sup> dengan waktu *follow up* selama 5.8 tahun, mendapatkan hasil bahwa terdapat sebagian kecil penderita KNF stadium awal (I/II) dengan kadar DNA EBV yang lebih tinggi dari nilai *cut off*, yang ditentukan dalam penelitian tersebut, menunjukkan nilai *survival probability* lebih rendah atau sama dengan nilai *survival probability* pada stadium lanjut (III/IV). Selain itu terdapat juga perbedaan nilai *5 year survival* yang cukup bermakna pada penderita stadium awal (I/II) dengan kadar DNA EBV rendah sebesar 90% dan kadar DNA EBV tinggi sebesar 63%.<sup>40</sup> Berdasarkan penelitian tersebut, penulis menduga bahwa pada sebagian kecil penderita KNF stadium awal (I/II) terdapat penderita yang mempunyai nilai DNA EBV yang lebih tinggi dari nilai DNA EBV dalam kelompoknya, seperti yang terjadi pada ke 8 (33.3%) penderita KNF stadium awal pada penelitian penulis. Penulis menduga pada ke 8 penderita tersebut, kemungkinan akan mempunyai nilai *survival probability* dan *5 year survival* penderita, seperti pada penelitian Leung diatas. Hal tersebut harus diteliti lebih lanjut dengan penelitian yang bersifat kohort, dan untuk itu perlu ditentukan pula nilai *cut off* untuk menentukan batas antara hasil pemeriksaan DNA EBV pada stadium awal dan lanjut.

Pada sejumlah 58 penderita KNF dengan stadium lanjut III/IV, didapat sebanyak 37 (63.15%) sampel mempunyai copy DNA EBV (*positif copy*) dan sebanyak 21 (36.84%) sampel tidak menunjukkan adanya copy DNA EBV (*negatif copy*). Hal tersebut menunjukkan, pada penderita KNF stadium lanjut (III/IV) sebagian besar penderita 37 (63.15%) menunjukkan hasil pengukuran DNA EBV yang positif (*positif copy*) dengan nilai median 24.8 copy DNA/ml (0-11040 copy/ml), Penelitian Leung Sing-fai, *et al*, 2003,<sup>40</sup> menyatakan bahwa



hasil pengukuran DNA EBV penderita KNF stadium lanjut umumnya, lebih tinggi dibandingkan dengan hasil pengukuran DNA EBV pada penderita KNF stadium awal, namun terdapat pula sebagian kecil penderita KNF stadium lanjut (III/IV) dengan kadar DNA EBV lebih rendah dari nilai *cut off* yang ditentukan. Namun tinggi dan rendahnya kadar DNA EBV tersebut tetap menunjukkan *5 year survival* yang rendah.

Dari hasil pengukuran DNA EBV pada penelitian penulis, didapatkan bahwa pada sebagian besar penderita KNF stadium lanjut (III/IV) mempunyai hasil pemeriksaan DNA EBV yang lebih tinggi, dibandingkan dengan penderita KNF stadium awal (I/II): median 24.8 copy/ml vs 0 copy/ml. Hal ini sejalan pula dengan penelitian Leung Sing Fai diatas dan Shao JY, 2004. Shao mengatakan bahwa terdapat perbedaan antara jumlah *copy* DNA EBV pada penderita KNF stadium awal dibandingkan dengan penderita KNF stadium lanjut,<sup>53</sup> dimana kadar DNA EBV pada penderita KNF stadium lanjut lebih tinggi dari pada hasil DNA EBV pada penderita KNF stadium awal (I/II).

Sistem staging (UICC) diketahui mempunyai nilai prognostik dalam menentukan *5 year disease survival* penderita KNF stadium I,II,III dan IV sebesar 95%, 78%, 49% dan 23%.<sup>41,52</sup> Selain itu pemberian program pengobatanpun diberikan berdasarkan pada penentuan staging, dimana pengobatan utama pada KNF stadium awal I/II adalah radioterapi dengan keberhasilan 80%-90% terjadi remisi sempurna secara klinis (Lee,2000). Namun angka kekambuhan dan metastasis pada KNF masih cukup tinggi dan salah satu penyebabnya adalah masih terdapatnya sisa tumor yang tidak dapat dideteksi secara klinis<sup>47</sup> atau kemungkinan disebabkan karena penentuan pemberian terapi hanya didasarkan pada kondisi klinis saja. Dengan pemeriksaan kadar DNA LMP2 EBV sebelum pemberian terapi ini, penentuan stadium dan penentuan pengobatan akan ditentukan tidak hanya berdasarkan kondisi klinis tetapi juga berdasarkan pada aktivitas molekuler sel-sel kanker sehingga diharapkan pemeriksaan ini akan meningkatkan angka keberhasilan pengobatan.

#### 4.4. Perbedaan Kadar Serum DNA EBV dengan Status T (Tumor)

Analisa hasil DNA EBV terhadap status TNM, diharapkan akan melengkapi pemahaman terhadap penyakit ini terkait dengan penggunaan DNA EBV dalam aplikasi klinis. Dilakukan analisa deskriptif antara hasil DNA EBV dalam darah dengan status T,N dan M penderita yang akan dibahas terpisah. Hasil analisa kadar DNA EBV dengan status T1-T2 dan T3-T4 dapat dilihat pada gambar 4.4.

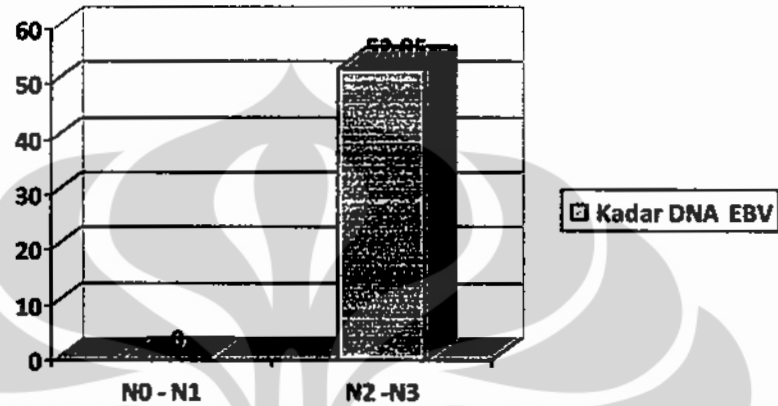


Gbr. 4.4. Penderita KNF dengan T1-T2 (56.60%) dan T3-T4( 43.40%)

Sebanyak 47 (56.6%) penderita KNF dengan status T berada pada T1-T2 mempunyai hasil pengukuran DNA EBV dengan median 6,3 copy/ml (0-2589 copy/ml) dan 36 (43.4%) penderita KNF dengan status T berada pada T3-T4 mempunyai hasil pengukuran DNA LMP2 EBV dengan median 10,55 copy/ml (0-11040 copy/ml). Hasil analisa bivariat hasil DNA LMP2 EBV pada penderita KNF dengan T1-T2 dan T3-T4 didapatkan hasil bahwa makin besar status T atau makin besar ukuran tumor akan menghasilkan kadar DNA EBV yang lebih tinggi. Hal ini sejalan dengan Shao et al, 2004 berdasarkan penelitiannya menyatakan terdapat korelasi antara meningkatnya jumlah DNA EBV pada penderita KNF dengan besarnya tumor.

#### 4.5. Perbedaan Kadar Serum DNA EBV dengan Status N (Nodul)

Pada analisa deskriptif antara kadar DNA EBV dengan status N (Nodul= ada tidaknya penyebaran sel tumor pada kelenjar getah bening), terlihat pada gambar 4.5. dibawah ini.



Gbr. 4.5. Penderita KNF dengan N0-N1 (42.20%) dan N2-N3( 57.80%)

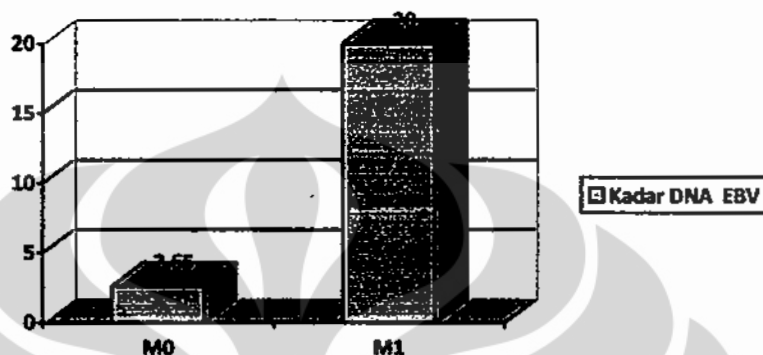
Penulis mendapatkan bahwa dari 83 penderita KNF sebanyak 35 (42.2%) penderita KNF dengan status N berada pada N0-N1 mempunyai hasil pengukuran DNA EBV dengan median 0 copy/ml (0-309 copy/ml) dan 48 (57.8%) penderita KNF dengan status N berada pada N2-N4 mempunyai hasil pengukuran DNA EBV dengan median 52,85 copy/ml (0-11040 copy/ml).

Hasil analisa deskriptif menunjukkan bahwa hasil pengukuran DNA EBV pada penderita KNF dengan N2-N3 lebih tinggi dibandingkan dengan penderita KNF dengan status N berada pada N0-N1. Namun penulis tidak dapat melakukan analisa bivariat karena jumlah sampel yang kurang.

Shao, *et al*, 2004, yang menyatakan bahwa tidak ada korelasi antara kadar DNA EBV dengan status N begitu pula dengan Chindavijak 2008, yang menyatakan bahwa tidak ada perbedaan yang berarti antara kadar DNA EBV dengan status T,N dan M secara sendiri-sendiri. Namun kadar DNA EBV menunjukkan kenaikan yang berarti bila dihubungkan dengan terjadinya peningkatan stadium bahwa makin tinggi stadium umumnya akan menunjukkan nilai DNA EBV yang lebih tinggi pula.

#### 4.6. Perbedaan Kadar Serum DNA EBV dengan Status M (Metastasis)

Pada analisa bivariat antara kadar DNA EBV dengan status M (Metastasis = ada tidaknya penyebaran sel tumor ke organ lain), Hasil pengukuran dapat dilihat pada gambar 4.6.



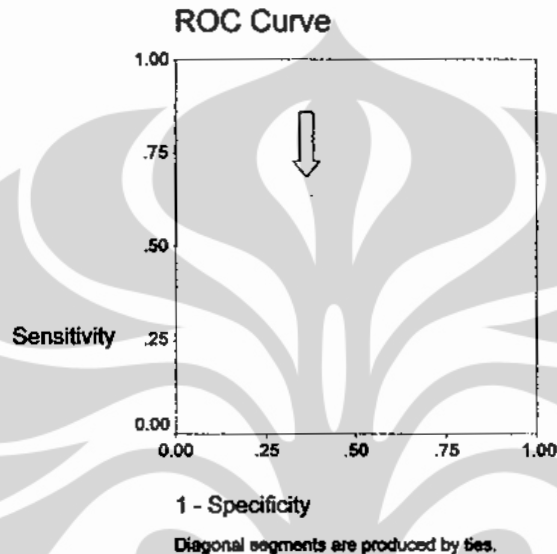
Gbr. 4.6. Penderita KNF dengan M0 (81.90%) dan M1( 18.10%)

Pada analisa deskriptif antara kadar DNA EBV dengan status M (M= ada tidaknya metastasis ke organ lain), penulis mendapatkan bahwa dari 83 penderita KNF sebanyak 68 (81.9%) penderita KNF dengan status M, berada pada M0 mempunyai hasil pengukuran DNA EBV dengan median 2,65 copy/ml (0-11040copy/ml) dan 15 (18.1%) penderita KNF dengan status M, berada pada M1 mempunyai hasil pengukuran DNA EBV dengan median 20 copy/ml (0-11570 copy/ml). Hasil analisa deskriptif pada kadar DNA LMP2 EBV dengan status M, menunjukkan bahwa kadar DNA EBV pada M1 lebih tinggi daripada penderita KNF dengan status M0. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Lin *et al*, 2004, yang menyatakan bahwa hasil DNA EBV pada penderita KNF yang mengalami metastasis lebih tinggi dibandingkan dengan penderita yang tidak mengalami metastasis.

#### 4.7. Penentuan Nilai *Cut Off* Kadar DNA EBV

Berdasarkan analisa hasil pengukuran kadar DNA EBV darah penderita KNF diatas dibuatlah kurva dan tabel ROC (*Receiver Operator Curve*).

Kurva ROC analisa 2 kelompok dapat dilihat pada gambar 4.7.1



**Gambar 4.7.1. Kurva ROC.** Sumbu Y menunjukkan nilai sensitifitas dan sumbu X menunjukkan nilai spesifisitas ( pengurangan 1 -- nilai spesifisitas). Garis merah menggambarkan hasil DNA LMP2 EBV yang diperiksa, sedangkan garis hijau adalah garis spesifisitas. Garis panah menunjukkan titik potong antara sensitifitas dan spesifisitas yang terbaik dari hasil pemeriksaan DNA LMP2 EBV yang telah diperiksa, yaitu pada sensitifitas 0.62=60.2% dan spesifisitas 1- 0,28= 0.72 (72%)

Dari tabel dan kurva tersebut ditentukan nilai *cut off* antara kadar DNA LMP2 EBV darah penderita KNF kedua kelompok. Nilai *cut off* dipilih dengan memperhatikan spesifisitas dan sensitivitas sesuai dengan tujuan/kebutuhan pemeriksaan. Untuk keperluan diagnostik biasanya dipilih nilai sensitivitas yang tinggi untuk dapat menjangring sebanyak mungkin populasi yang berisiko terkena penyakit. Nilai spesifisitas tinggi dipilih dalam penentuan pengobatan agar pengobatan yang diberikan lebih spesifik untuk memberikan hasil yang baik. Nilai spesifisitas didapat dengan cara mengurang angka 1 dengan nilai sensitifitas didalam tabel ROC lalu dikalikan dengan seratus persen agar didapat hasil dalam persen.

Nilai-nilai *cut off* yang termasuk dalam gambar diatas dapat dilihat pada tabel ROC ( Tabel 4.7.2. ) dibawah ini.

**Tabel 4.7.2 Tabel Nilai ROC( Receiver Operating Characteristics)**  
Lingkaran merah menunjukkan titik potong antara sensitifitas dan spesifisitas yang dipilih

Titik Potong Hasil DNA LMP2 EBV pada:	Sensitiviti ( <i>True Positive</i> )	1-Spesificiti ( <i>False Positive</i> )
- 1.0000	1.000	1.000
1.0500	.638	.360
2.6500	.638	.320
3.4500	.621	.320
5.0000	.603	.320
7.1500	.603	.280
9.0000	.586	.200
10.5500	.569	.160
12.8000	.552	.160
14.7500	.534	.160
15.1000	.534	.120
.....	.....	.....
.....	.....	.....

Nilai-nilai yang akan ditetapkan sebagai nilai *cut off* pada kolom kiri pada tabel diatas didapat berdasarkan hasil pengukuran DNA EBV pada ke 83 penderita KNF, masing-masing dengan nilai spesifisitas dan sensitivitas pada berbagai nilai *cut off*. Nilai *cut off* dipilih, dengan memperhatikan nilai sensitifitas dan spesifisitas dari nilai-nilai yang berada didalam tabel ROC.

Berdasarkan daftar nilai pada tabel ROC, ditentukan nilai *cut off* pada nilai 7.15 copy/ml. Nilai tersebut dipilih, karena pada nilai 7.15 copy/ml didapat perbandingan nilai sensitifitas dan spesifisitas yang cukup bagus dibandingkan dengan nilai *cut off* yang lain. Pada nilai 7.15 didapat nilai sensitifitas  $0,603 \times 100\% = 60.3\%$  dan nilai spesifisitas  $72.0\% (1 - 0,280 \times 100\%)$ . Nilai *cut off* yang dipilih, ditunjukkan dengan garis /lingkaran berwarna merah pada tabel 4.7.2 diatas dengan nilai sensitifitas dan spesifisitasnya.

Hasil *cut off* diatas berbeda dengan hasil *cut off* penelitian yang dilakukan oleh Chan AT, *et al*, 2002 yang menetapkan nilai *cut off* sejumlah 4000 copy/ml bagi penderita KNF dengan menggunakan target, sekuen *BamHIW* pada genom EBV<sup>46</sup> atau Steven SJC *et al*,2001, yang menetapkan nilai *cut off* sebesar 2000 copy/ ml<sup>54,55</sup> atau Chindavijak, 2008,yang menggunakan gen target LMP2 namun dengan nilai *cut off* sebesar 50 copy/ml<sup>43</sup>.

Perbedaan nilai *cut off* antara penelitian Chan, *et al*, 2002 diatas, terjadi karena target amplifikasi yang digunakan dalam pemeriksaan PCR berbeda walaupun daerah amplifikasi tersebut berada dalam satu genom EBV. Daerah *BamHIW* dalam genom EBV, sering digunakan sebagai target amplifikasi dalam pemeriksaan DNA EBV terhadap pasien KNF. Pemeriksaan terhadap daerah genom EBV ini umumnya akan menghasilkan nilai *cut off* yang lebih besar dibandingkan dengan pemeriksaan yang menggunakan target amplifikasi LMP2.<sup>43</sup> Hal tersebut disebabkan daerah *BamHIW* dalam genom EBV mempunyai *multiple repeat* yang lebih banyak, dibandingkan dengan gen LMP2 yang merupakan *single copy gene*,<sup>39,46,51,56,57,58</sup> sehingga nilai DNA EBV yang teramplifikasi lebih besar pada setiap reaksi PCRnya dibandingkan bila menggunakan gen target LMP2. Sebagai tambahan, beberapa *sel line* EBV, mempunyai beberapa genom virus yang berbeda dalam jumlah *repeat* dan jumlah *repeat* tersebut dapat berubah saat terjadi replikasi pada fase litik<sup>51</sup>. Akibatnya nilai *cut off* yang dihasilkanpun menjadi lebih besar dibandingkan nilai *cut off* yang didapat menggunakan gen target LMP2.

Perbedaan nilai *cut off* pada penelitian Chindavijak, 2008, mungkin disebabkan penelitian tersebut memasukkan semua sampel yang berasal pasien KNF dari berbagai jenis histopatologi dan sampel kontrol non KNF yang mempunyai nilai positif terhadap LMP2<sup>43</sup> atau Steven SJC *et al*,2001, yang menggunakan sampel yang berasal dari pasien *PTLD (Post Transplant Lymphoproliferative Disease)*<sup>55</sup>.

Dari nilai *cut off* yang didapat, dari keseluruhan hasil pemeriksaan DNA LMP2 EBV, maka didapatkan hasil yang sedikit berbeda antara jumlah penderita KNF stadium awal I/II dan penderita KNF stadium III/IV sebelum menggunakan

nilai *cut off* dan setelah menggunakan nilai *cut off*. Perbedaan tersebut dapat dilihat pada tabel 4.7.3. dan 4.7.4.

**Tabel 4.7.3. Penderita KNF stadium I/II dan stadium III/IV sebelum menggunakan *cut off point***

	Stadium III/IV	Stadium I/II	Total
<b>DNA LMP2 EBV positif</b>	37	8	45
<b>DNA LMP2 EBV negatif</b>	21	17	38
<b>Total</b>	58	25	83

**Tabel 4.7.4. Penderita KNF stadium I/II dan stadium III/IV sesuai dengan nilai *cut off* pada 7.15 copy/ml**

	Stadium III/IV	Stadium I/II	Total
<b>DNA LMP2 EBV &gt;7.15 copy/ml</b>	35	7	42
<b>DNA LMP2 EBV ≤ 7.15 copy/ml</b>	23	18	41
<b>Total</b>	58	25	83

Berdasarkan tabel 4.7.3. diatas, didapatkan bahwa dari 8 orang pada stadium I/II yang mempunyai nilai DNA EBV positif ternyata, hanya terdapat 7 penderita yang mempunyai nilai DNA EBV diatas *cut off*. Begitu pula pada penderita KNF stadium lanjut, dari 37 penderita yang positif, ternyata hanya 35 orang saja yang mempunyai hasil DNA EBV yang berada diatas nilai *cut off*, sehingga terhadap penderita ini penulis mengharapkan sebaiknya dilakukan penelitian secara kohort untuk melihat progresifitas penyakit dan respon penderita terhadap pengobatan, dibandingkan dengan penderita pada stadium yang sama dengan nilai DNA EBV dibawah nilai *cut off*.

Pengukuran terhadap DNA EBV ini menunjukkan bahwa tetap dibutuhkan pemeriksaan molekuler pada penderita KNF terutama pada penderita KNF stadium awal, untuk mengetahui aktivitas molekuler yang terjadi pada sel



kanker yang tidak bisa diketahui hanya dengan menggunakan *TNM system* yang ditetapkan oleh UICC atau pemeriksaan klinis saja.

### **Rangkuman Hasil**

EBV diketahui terkait erat dengan berbagai keganasan diantaranya dengan KNF. DNA EBV yang terdapat dalam serum/plasma penderita KNF diketahui mempunyai nilai potensial sebagai alat yang dapat dipakai sebagai molekular marker yang potensial dalam berbagai keganasan terkait EBV termasuk diantaranya KNF. Diantara DNA EBV yang sering digunakan dalam penelitian terkait KNF adalah DNA LMP2 EBV .

Penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nilai pengukuran DNA EBV antara penderita KNF stadium awal (I/II) dengan penderita KNF stadium lanjut (III/IV), dimana pada penderita KNF stadium lanjut (III/IV) mempunyai kecenderungan hasil pengukuran yang lebih tinggi dibandingkan dengan hasil pengukuran DNA EBV pada penderita KNF stadium awal (I/II). Begitu pula dari hasil pengukuran DNA EBV yang dilakukan penulis, didapat kecenderungan pula bahwa pada penderita KNF dengan status T, N dan M yang lebih tinggi (T3-T4, N2-N3 dan M1) menghasilkan nilai DNA EBV yang lebih tinggi dibandingkan penderita KNF dengan status T,N dan M yang lebih rendah (T1-T2, N0-N1 dan M0).

Dengan demikian DNA EBV merupakan salah satu petanda yang dapat digunakan sebagai *marker molekular* dalam membedakan penderita KNF stadium awal (I/II) dengan penderita KNF stadium lanjut (III/IV) termasuk dalam penentuan terhadap status T,N dan M, disamping penggunaan sistem TMN (UICC).

Untuk melengkapi kegunaan dari pemeriksaan DNA EBV ini dibutuhkan nilai *cut off* yang dapat membantu menentukan batas antara penderita KNF stadium awal (I/II) dengan penderita KNF stadium lanjut (III/IV). Nilai *cut off* yang didapat dari pemeriksaan DNA LMP2 EBV ini, adalah sebesar 7.15 copy/ml dengan nilai Sensitivitas dan Spesifisitas berturut-turut dalam persen adalah: 60.3% dan 72.0%.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

1. Kadar serum DNA EBV penderita KNF stadium lanjut (III/IV) cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan kadar serum DNA EBV pada penderita KNF stadium awal (I/II).
2. Kadar serum DNA EBV penderita KNF dengan status T,N dan M yang lebih tinggi (T3-T4, N2-N3 dan M1) menunjukkan hasil yang cenderung lebih tinggi pula dibandingkan dengan penderita KNF dengan status T,N dan M yang rendah (T1-T2, N0-N1 dan M0).
3. Nilai *cut off* sebesar 7.15 copy/ml, merupakan batas antara penderita KNF stadium awal I/II dan stadium lanjut III/IV dalam penelitian ini.

#### 5.2. Saran

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang mencukupi dan dilakukan penelitian kohort pada penderita KNF stadium awal dengan kadar DNA EBV yang tinggi dari nilai *cut off* dan pada penderita KNF stadium lanjut dengan kadar DNA EBV dibawah nilai *cut off* untuk melihat adanya hubungan antara tingginya nilai DNA EBV sebelum pemberian terapi, terhadap keberhasilan terapi dan risiko terjadinya kekambuhan atau metastasis.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menilai *cut off value* ini sebagai parameter dalam penelitian terkait DNA EBV pada penderita KNF.
3. Pengukuran kadar plasma/serum DNA EBV sebelum pemberian terapi, merupakan cara yang baik untuk membedakan antara penderita KNF stadium awal dan stadium lanjut.
4. Pemeriksaan plasma/serum DNA EBV akan menyempurnakan penggunaan sistem TNM pada tingkat molekuler

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Khanna R, Burrows SR, Moss DJ, Immune regulation in Epstein-Barr Virus associated diseases, *Microbiol.rev*, 1995:p387-405
2. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Field's Virology*. 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia, PA: Lippincott/Williams & Wilkins, 2001;2575-627
3. Kilger E, Kieser A, Baumann M, et al. Epstein-Barr virus mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which stimulates an activated CD40 receptor
4. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;15:702-3
5. BBC News, Epstein-Barr Virus, Updated March; 2003
6. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, et al. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 1998;9:395-404
7. Thorley-Lawson DA, Miyashita EM, Khan G. Epstein-Barr virus and the B cell: that's all it takes. *Trends Microbiol* 1996;4:204-208
8. Horikawa T, Yoshuzaki T, Sheen T, Lee S, Furukawa M. Association of Latent Membran Protein 1 dan Matrix Metalloproteinase 9 with metastasis in NPC. *Cancer*, 2000;89:715-23
9. Liu MT, Hsieh CY, Chang TH, Lin JP, Huang CC, Wang AJ. Prognostic factor affecting the outcome of NPC. *Jpn Journal Cancer Clin. Oncol.* 2003;3:501-508
10. Jian-guo T, Xuan I, Ping C. Expression of MMP9 in NPC and association with EBV infection. *Journal of Zhejiang University Science.* 2004;5(10):1304-12
11. Harowi K, Hariwiyanto B, Erlangga EG and Erick S. The management of NPC at Sardjito Hospital of Jogyakarta. Free Paper. The 11<sup>th</sup> Asean ORC HNS Congress, Bali 2005
12. Wee J. Treatment of NPC. In Bishop, Huang Peng, Johnson PJ, Sham JST and Soo KC Ed. *Cancer Review*, 2003:93-102
13. Chan KCA, Lo YMD. Circulating tumor derived nucleic acids in cancer patient: potential application as tumor marker. *Br.J.Cancer.* 2007;96:681-5
14. Wang BG, Huang HY, Chen YC, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 2003;63:3966-8

15. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, *et al.* Increasing integrity of free circulating DNA in serra of patient with collorectal of periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem.* 2006;52:1062-9
16. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu S, *et al.* Pediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum . *J.Clin.Oncol .* 2006;24:4270-6
17. Jiang WW, Zahurak M, Goldenberg D, *et al.* Increased plasma DNA integrity index in head&neck cancerpatient. *Int.J.Cancer.*2006;119:2673-6
18. Chan ATC, Teo PML and Jonhson PJ. Nasopharyngeal carcinoma review. *Annual of Otolaryngology.*2002;13:1007-15
19. Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA. A reexamination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* 1985;35:35-42
20. Murray PG, Young LS. The role of the Epstein-Barr virus in human disease. *Front Biosci* 2002; 7:519-40
21. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, *et al.* Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl JMed* 1984;310:1225-30
22. Farrell PJ. Epstein-Barr Virus immortalizing genes. *Trends Microbiol* 1995;3:105-9
23. Baumforth KRN, Young LS, Flavell KJ, *et al.* The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol*1999;52:307-22
24. Lyons S, Liebowitz D. The roles of human viruses in the pathogenesis of lymphoma. *Semin Oncol* 1998;25:461-75
25. Teper C, Seldin M. Modulation of caspase-8 and FLICEinhibitor protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood* 1999;94:1727-37
26. Wolf H, Zur Hausen H, Becker V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature*1973;244:245-7
27. Sample, J., Lancz, G. & Nonoyama, M. Use of cloned Epstein-Barr Virus DNA to identify genes that determine the fate of viral infection. In *viral messenger RNA:Transcription, Processing, Splicing and Molecular Structure.* Ed. Y. Becker.1984 :127-146
28. Epstein Barr Virus (EBV) gene product in EBV associated proliferative disorders, *Critical Review in Oncology/Hematology*, 45(2003):1-36

29. Sanna M Aalto. Modern diagnosis of EBV infections and post transplant lymphoproliferative disease. Haartman Institute, Dep. of Virology, university of Helsinki, Finland, 2007
30. Brooks LA, *et al.* Transcripts from the EBV virus BamH1 A fragment are detectable in all three of virus latency. *J. Virol.* 1993;67:3182-90
31. Rowe M, Young LS, Cadwallader K, Petti L, Rickinson AB. Distinction between EBV type A (EBNA-2A) dan Type B (EBNA-2B) isolates extends to the EBNA-3 family of nuclear protein. *J. Virol.* 1989;63:1031-39
32. Chen XQ, Stroun M, Magnenet JL, Nicod LP, *et al.* Microsatellite alteration in plasma DNA of small cell lung cancer patient. 1996; 2:1033-4
33. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alteration in serum of head and neck patient. *Nat. Med.* 1996;2: 1035-36
34. Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, *et al.* K-Ras mutation are found in DNA extracted from plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1997;112:1114-20
35. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun. Point mutation of N-Ras gene in the blood plasma DNA of patient with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia. *Br. J. Hematol.* 1994;86:774-9
36. Vasef MA, Ferlo A, Weiss LM. Clinicopathological consultation NPC with emphasis on its relationship to EBV. *Ann. Otol. Rhinol.* 1997;106: 348-356
37. Philip JJ and YM Dennis Lo. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Cancer Diagnostic: Review, Clinical Chemistry.* 2002;48; 8: p1186-93
38. Shotelersuk K, Khorprasert C, Sakdidul S, Pomthanakasem W, Voravud N, Multirangura A. Epstein-Barr virus DNA in serum/Plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1046-51
39. Lin JC, Wang WY, Chen KY, *et al.* Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 2004;350:2461-70
40. Sing fai Leung, *et al.* Pretherapy quantitative measurement of circulating EBV DNA is predicting of posttherapy distant failure in patient with early stage nasopharyngeal carcinoma of undifferentiated type. *American Cancer Society.* 2003:288-291
41. Hong MH, Min HQ, Ma J, Zhang EP, Cui NJ. A comparative study between '92 & UICC (draft 1996) staging system of NPC. *Chin J Cancer.* 1997;16:116-8

42. Sham JS, Choy D. Prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma: a review of 759 patients. *Br J Radiol*,1990;63:51-8
43. Somjin Chindavijak, Danai T,Ekapob S. Quantitative detection of plasma cell-free Epstein Barr Virus DNA in NPC patient by realtime PCR. *Thai Cancer Journal*. 2008;28:13-23
44. Julie LR, Hongxin Fan, Sally LG, Steven AS, Nancy Raab-Traub, Margaret L.Gulley. Epstein-Barr Virus quantification by Real Time PCR targeting multiple gene segments: A novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma.*Journal of Molecular Diagnostics*; 2004;Vol 6: No 4
45. Iwan Ariawan. Kurva receiver operating characteristic. Materi Kuliah Biostatistik S2, FKM UI. 2008
46. Chan AT, Lo YM, Zee B, *et al*. Plasma Epstein-Barr virus DNA and residual disease after radiotherapy for undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002.;94:1614–1619
47. Hariwiyanto, Bambang. Peran protein EBNA1,EBNA2,LMP1 dan LMP2 virus EBV sebagai faktor prognosis pada pengobatan karsinoma nasofaring. Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2009
48. Margaret G, Hongxin Fan, Sandra H Elmore. Validation of Roche LightCycler Epstein-Barr Virus quantification reagents in a clinical laboratory setting. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2006;vol8:5
49. Monica Aeur, *et al* .Development of a quantitative lightcycler assay for the detection of EBVDNA in research samples.*Biochemica*,2002;3:6-8
50. Kozic Sanja, *et al*. Evaluation of a commercial real-time PCR assay for quantification of EBV DNA in different group of patients. *Jvirumed*, 2006;135:263-68
51. Quynh Tu Le,Carol D Jones,Tsz Kok Yau, *et al*. A comparison study of different PCR assay in measuring plasma DNA EBV levels in patient with nasopharyeal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5700-7
52. Min HQ, Hong MH, Ma J, *et al*. A new staging system for NPC in China.*Int J Radiat Oncol Biol Phys*.1994;30:1037-104
53. Shao JY, Zhang Y, *et al*. Comparison of EBV DNA level in plasma, peripheral blood cell and tumor tissue in nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res*,2004;24:4059-66
54. Steven SJC, Verkuijlen SAWM, van der Brule AJC, Middeldorp JM. Comparison of quantitative competitive PCR with LightCycler-based PCR

for monitoring of EBV DNA load in clinical specimens. *J Clin Microbiol.*2002;40:3986-92

55. Steven SJC, *et al.* Frequent monitoring of EBV DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of PLTD in high risk patient. *Blood* 2001;97:1165-71
56. Lo YMD, Chan LYS, Chan ATC, Leung SF, Lo KW, Zhang J. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free EBV DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 1999;59:5452-5
57. Jones MD, Griffin BE. Clustered repeat sequences in the genome of EBV. *Nucleic Acid Res*, 1983;11:3919-37
58. Allan GJ, Rowe DT. Size and stability of the EBV major internal repeats (IR-1) in Burkitt's lymphoma and lymphoblastoid cell lines. *Virology*, 1989;173:489-98
59. Lo YMD, Chan LYS, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan ATC, *et al.* Quantitative analysis of cell free EBV DNA in plasma of patients with NPC. *Cancer Res*. 1999;59:1189-91
60. Raab-Traub N, Flynn K. The structure of the termini of the EBV as a marker of clonal proliferation. *Cell*. 1986;47:883-89
61. Fan H, Gulley ML. Epstein-Barr viral load measurement as a marker of EBV related disease. *Mol Diagn*, 2001;6:279-89
62. Bauer CC, Aberle SW, Popow-Kraupp T, Kapitan M, Hofmann H, Puchhammer-Stockl E. Serum EBV DNA load in primary EBV infection. *J Med Virol*. 2005;75:54-8
63. Brooks L, Yao QY, Rickinson, Young LS. Epstein Barr Virus Latent gene transcription in NPC cells: coexpression of EBNA1, LMP1, LMP2 transcripts. *J Med Virol*. 2005;75:54-58
64. Puspongoro HD, Nila Wirya IGN, Pudjiadi A, Bisanto J, Zulkarnaen SZ. Dasar-dasar metodologi klinis: Uji Diagnostik
65. Singh Girish. Determination of cut off score for a diagnostic test. *The internet Journal of Laboratory Medicine*. 2007;2:1 (ISSN:1937-8181)
66. Lo YMD, Sing fai Leung, Lisa YS Chan, Anthony TC Chan, Kwok-Wai Lo, Philip JJ, Dolly P Huang. Kinetics of Plasma EBV DNA during Radiation Therapy for NPC. *Cancer Research*. 2000;60:2351-55
67. Pegtel DM *et al.*, Epstein Barr Virus-encoded LMP2A induced primary epithelial cell migration and invasion: possible role in NPC. *Journal of Virology*, Dec;2005:p15430-42

68. Tape Thomas G. Interpreting Diagnostic Test. Univ.of Nebraska Medical Centre. <http://gim.unmc.edu/dxtests/Default.htm>, cited: Juli,16,2010.
69. Middeldorp Jaap M, Brink Antoinette ATP, Van den Brule AJC, Meijer Chris LJM. Pathogenic roles for EBV gene product in EBV- associated proliferation disorders. Clinical Review in Oncology/Hematology . 2003;45:1-36.





## CURRICULUM VITAE



- Nama** : Retno Purwanti  
**Tempat/tanggal lahir** : Tangerang, 6 Juni 1969  
**Agama** : Islam  
**Alamat** : Kompleks Paspampres Blok K No.5  
Kramat Jati Jakarta Timur 13540  
**Status** : Menikah  
**Pendidikan** :
1. Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta (sedang berlangsung)
  2. Profesi Ners, Fakultas Ilmu Keperawatan Universitas Indonesia, lulus tahun 2003
  3. Sarjana Keperawatan, Fakultas Ilmu Keperawatan Universitas Indonesia, lulus tahun 2002
  4. Akademi Perawat Sint.Carolus, lulus tahun 1990
- Pelatihan :**
1. Kursus Basic Oncology, Jakarta 2007
  2. Pelatihan ACLS (Advanced Cardiac Life Support), Jakarta 2005
  3. Pelatihan PBSCT (Peripheral Blood Stem Cell Transplantation) Jakarta 2000
  4. Kursus Manajemen Bangsal, Jakarta, 2000
  5. Pelatihan Perawatan Pasien Kemothorapy, Jakarta 1997
  6. Pelatihan Penatalaksanaan Pasien Kanker, Melbourne Australia 1997
- Pengalaman Kerja :**
1. Staf Keperawatan, RS Kanker "Dharmais", 1993 – saat ini
  2. RS. Sint. Carolus, 1992
  3. Staf Pengajar SPK RS. Fatima Pare-Pare, Sulawesi Selatan 1990-1992
- Sumber dana penelitian : RS. Kanker "Dharmais"**

"Analisis Nilai DNA EBV dalam Serum Penderita  
Kanker Nasofaring Stadium Awal I/II dan Stadium Lanjut III/IV"

Retno Purwanti  
Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Onkologi  
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

**Tujuan Pemeriksaan:**

Melakukan analisis nilai DNA EBV dalam serum penderita KNF Stadium Awal (I/II) dan Stadium Lanjut (III/IV).

**Material dan Metode:**

Sebanyak 83 serum darah penderita kanker nasofaring (KNF) berjenis *undifferentiated*, diambil sebelum pemberian terapi. Sampel dibagi menjadi 2 group berdasarkan sistem TNM (UICC) dan didapatkan: 25 sampel berasal dari serum penderita KNF stadium awal (I/II) dan 58 dari penderita stadium lanjut (III/IV). Menggunakan *real time polymerase chain reaction (PCR)* dilakukan pengukuran kadar DNA EBV dengan LMP2 sebagai gen target. Perbedaan kadar DNA EBV ditentukan menggunakan analisis deskriptif menggunakan test non parametrik antara penderita KNF stadium awal dan stadium lanjut dan terhadap status T,N dan M.

**Hasil:**

Pengukuran kadar serum DNA EBV pada penderita KNF stadium awal (I/II) sebelum memulai pengobatan, menunjukkan sebanyak 17 dari 25 sampel (66.7%) tidak terdeteksi adanya copy DNA EBV dan 8 sampel (33.3%) terdeteksi. Pada penderita KNF stadium lanjut (III/IV), 37 dari 58 sampel (63.15%) terdeteksi adanya copy DNA EBV dan 21 sampel (36.84%) tidak terdeteksi. Kadar DNA EBV pada penderita KNF stadium lanjut menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penderita KNF stadium awal (median 24.8 copy/ml vs 0 copy/ml), dengan nilai cut off pada 7.15 copy/ml (sensitifitas 60.3% dan spesifisitas 72.0%). Kadar DNA EBV yang lebih tinggi terdapat pula pada hasil pengukuran serum DNA EBV antara penderita KNF dengan status T3-T4, N2-N3 dan M1 dibandingkan dengan penderita KNF dengan status T1-T2, N0-N1 dan M0.

**Kesimpulan:**

Pengukuran kadar serum DNA EBV merupakan cara yang potensial untuk membedakan antara penderita KNF stadium awal (I/II) dan stadium lanjut (III/IV) dengan perkiraan nilai cut off pada 7.15 copy/ml. Termasuk pula untuk membedakan antara status T,N dan M. Pengukuran kadar DNA EBV dapat menyempurnakan penggunaan sistem TNM pada tingkat molekuler.

**Kata Kunci:** *KNF, EBV, LMP2, ITGa6 dan Real Time PCR*

## I. Pendahuluan

Kanker Nasofaring (KNF) merupakan keganasan yang sering ditemukan di Cina sebelah selatan dan Taiwan yaitu 20% dari seluruh kejadian kanker dinegara tersebut.<sup>1</sup> Penyebab KNF diduga akibat adanya interaksi yang kompleks antara faktor genetik, pola diet yang mengandung karsinogen tertentu dan infeksi Virus Epstein Barr.<sup>2</sup> Sedangkan perubahan molekuler yang terjadi pada KNF masih belum banyak dijelaskan.<sup>3</sup> Keganasan ini mencapai 18% dari semua keganasan di Hong Kong, tetapi hanya 2% di Amerika Serikat.

Kanker Nasofaring disebabkan oleh Virus Epstein-Barr (EBV),<sup>4</sup> yang merupakan keluarga Virus Herpes. KNF termasuk penyakit yang sangat invasif dan mudah bermetastasis dibandingkan dengan keganasan kepala dan leher yang lain.<sup>5,9,10</sup> Salah satu masalah yang sering terjadi pada penderita KNF adalah sebagian besar penderita sudah berada pada stadium III atau IV dengan pembesaran kelenjar getah bening atau terjadi metastasis<sup>11,12</sup> (Harowi, 2005 dan Wee 2003), pada saat pertama kali terdiagnosis. Hal ini disebabkan sulitnya diagnosis pada stadium awal karena tanda-tanda yang tidak spesifik. Selain itu kekambuhan dan metastasis setelah selesai pengobatan sering pula dilaporkan.

Pemeriksaan DNA yang berada dalam sirkulasi mulai diteliti sehubungan manfaat potensialnya sebagai petanda berbagai macam keganasan<sup>13</sup> seperti keganasan ginekologi,<sup>14</sup> kolorektal,<sup>15</sup> payudara<sup>16</sup> dan keganasan kepala dan leher.<sup>17</sup> EBV dalam serum/plasma penderita KNF mulai banyak diteliti. Chan 2002, menyatakan bahwa pengukuran kadar DNA EBV pada penderita KNF stadium lanjut lebih tinggi daripada penderita KNF stadium awal.<sup>18</sup> Salah satu metode yang dipergunakan untuk mendapatkan pengukuran kuantitatif terhadap adanya DNA EBV yang akurat pada plasma atau serum penderita KNF, adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode ini merupakan metode yang terbukti mudah, cepat, akurat dan aman bagi pasien KNF. Sedangkan fragmen DNA EBV yang telah digunakan dalam pemeriksaan pada RS.Kanker "Dharmais" adalah EBNA1 dan LMP2.

LMP2 (*latent membran protein 2*) adalah salah satu gen yang terdapat didalam genom EBV, selain EBNA dan EBER. Penggunaan gen LMP2 dalam pengukuran kadar DNA EBV pada penderita KNF mulai banyak digunakan, namun penggunaannya sebagai petanda tumor pada kasus KNF belum banyak dilaporkan. Untuk melengkapi manfaat pemeriksaan DNA EBV secara kuantitatif tersebut, diperlukan nilai *cut off*, yang dapat dipergunakan sebagai pembeda antara KNF stadium awal dan KNF stadium lanjut. Dalam hal ini penentuan nilai *cut off* terhadap DNA LMP2 EBV diharapkan dapat membantu menentukan antara penderita KNF

stadium awal dan lanjut. Sehingga program pengobatan dapat diberikan dengan tepat tidak hanya berdasarkan kondisi klinis namun juga berdasarkan karakteristik molekulernya untuk meningkatkan angka keberhasilan dan survival bagi penderita KNF.

## II. Material & Metode Pengumpulan Sampel

Serum/plasma darah dari 83 penderita KNF dikumpulkan dibagian Patologi Anatomi RS.Kanker "Dharmais" dengan hasil PA: Undifferentiated Carcinoma dikumpulkan dan informed consent diisi. Menurut UICC Staging System didapat sebanyak 25 sampel berada pada Stadium awal (I/II) dan 58 sampel berada pada stadium lanjut (III/IV). Darah perifer diambil dari penderita, disentrifus, serum/plasma diambil, dimasukkan dalam tabung. Selanjutnya disimpan dalam suhu -20°C untuk pemeriksaan selanjutnya.

### Ekstraksi DNA

DNA dari serum/sampel penderita KNF diekstraksi dengan menggunakan Kit High Pure Viral Nucleid Acid (Roche) sesuai dengan manual yang sudah ditetapkan. Sebanyak 200µl sampel, 200µl working solution (*Poly A, Binding Buffer*) dan 50µl *Proteinase K* dimasukkan dalam tabung dan divortex. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 72°C selama 10 menit. Sebanyak 5µl *Internal kontrol* dan 100µl *binding buffer* ditambahkan dalam tabung. Satukan *filter tube* dan *collection tube* lalu pindahkan sediaan kedalam *filter tube* lalu sentrifuge pada 8000g selama 1 menit. Buang cairan dan beri 500 µl *inhibitor removal buffer*, sentrifuge 8000g selama 1 menit. Buang cairan, cuci dua kali dengan 450µl *wash buffer*, sentrifuge 8000g 1menit dan 3 menit. Buang cairan dan sentrifuge 13.000g selama 10 detik. Pasangi tabung baru dan tambahkan 100µl *elution buffer* sentrifuge 8000g selama 1menit. DNA ekstraksi disimpan dalam suhu -20°C sampai saat digunakan.

### Kuantifikasi DNA LMP2 EBV

*Kit LightCycler EBV* (Roche) digunakan untuk mendeteksi fragmen DNA EBV LMP2. *Master Mix reagen* terdiri dari 2µl *reaction mix* (*DNA polymerase, reaction buffer* dan *deoxynucleoside triphosphate*), 2µl *detection mix* (*probe hibridisasi*) dan 11µl *PCR grade water*. Sebanyak 5µl DNA sampel ditambahkan 15µl *master mix reagen*. Standart DNA EBV dijalankan pada setiap reaksi PCR. Reaksi dijalankan sesuai dengan protokol yang sudah ditentukan. Tahap PCR dilakukan: *preinkubasi* selama 10 menit pada suhu 95°C untuk proses *denaturasi DNA*, diikuti dengan tahap 45 siklus proses amplifikasi DNA (95°C selama 10 detik untuk *denaturasi DNA template*, 55°C selama 15 detik untuk *primer annealing* dan 72°C selama 15 detik untuk proses *ekstensi DNA*). Jumlah amplifikasi dihitung berdasarkan warna yang

muncul (channel 640) dan dari internal kontrol (channel 705). Melalui *melting curve* dilakukan analisis spesifisitas. Hasil amplifikasi dihitung dengan menggunakan detektor sequencer. Jumlah copy DNA terkecil yang dapat dideteksi adalah 10 copy.

#### Analisa Statistik

Data deskriptif akan ditampilkan untuk melihat karakteristik penderita dan semua variabel yang diteliti akan disajikan dalam bentuk tabular. Dibuat perbandingan jumlah kadar DNA LMP2 EBV dalam darah pada pasien KNF stadium I/II dan Pasien KNF stadium III/IV menggunakan Mann-Whitney Test. Uji statistik dikatakan bermakna bila  $p < 0,05$ . Dibuat kurva ROC antara kadar DNA LMP2 EBV dalam darah pasien KNF stadium I/II dan pasien KNF stadium III/IV, untuk menentukan nilai *Cut Off* nya. Analisa data dilakukan dengan menggunakan program SPSS versi 17

### III. Hasil Penelitian & Pembahasan

Didapat 83 sampel serum/plasma sesuai dan memenuhi kriteria inklusi yang sudah ditetapkan, namun jumlah ini tidak bisa memenuhi jumlah sampel minimal sehingga analisa bivariat tidak dapat dilakukan dan hanya dilakukan analisa deskriptif saja. Karakteristik subjek penelitian dapat dilihat pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Karakteristik Subyek Penelitian

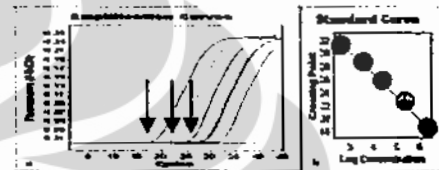
Karakteristik	n (%)
<b>n</b>	83 (100,0)
<b>Jenis kelamin</b>	
Laki-laki	53 (63,90)
Perempuan	30 (36,10)
<b>Usia (Tahun)</b>	
<40 tahun	26 (31,34)
40 – 60 tahun	48 (57,83)
>60 tahun	9 (10,84)
<b>Stadium</b>	
Std awal (I/II)	25 (30,10)
Std lanjut (III/IV)	58 (69,90)

Sampel penderita KNF terbanyak berasal dari penderita berjenis kelamin laki-laki yaitu sebanyak 53 sampel atau 63,9% dengan rentang usia 11 tahun sampai dengan 72 tahun dengan umur rata-rata  $44,93 \pm 12,24$  tahun, dan terbanyak datang pada stadium lanjut 58 (69,90%).

#### Pengukuran Kadar LMP2

Pengukuran kadar DNA LMP2 EBV pada serum/plasma dilakukan pada 2 kelompok penderita KNF stadium awal (I/II) dan kelompok stadium lanjut (III/IV), menggunakan metode PCR dengan *LightCycler EBV Quantification Kit*, sebagai salah satu *reagen* spesifik dari ROCHE

dengan target gen DNA LMP2 EBV. Reaksi dilakukan bersamaan dengan 5 standar EBV DNA yang berisi  $10^6$  sampai dengan  $10^2$  copy DNA per reaksi, kontrol negatif dan kontrol positif, ddH<sub>2</sub>O dari setiap isolasi DNA pasien yang diperiksa dan H<sub>2</sub>O PCR Kit dari reagen yang digunakan. Penggunaan *Light Cycler EBV Quantification Kit* sebagai reagen yang dipakai dalam penelitian berdasarkan bukti dan kemampuan yang baik dalam mendeteksi dan kuantifikasi DNA EBV khususnya LMP2 dan mempunyai tingkat spesifitas dan sensitifitas yang tinggi dalam penggunaannya diberbagai riset terkait EBV DNA.<sup>43,48,49,50</sup> Pemeriksaan dilakukan secara *in duplo* untuk memastikan ketepatan hasil dalam proses tersebut.



Gbr 3.2. Amplifikasi DNA LMP2 EBV standar menggunakan real time PCR. (a). Pengukuran dihitung terhadap *signal fluorescence* yang meningkat diatas *baseline* yaitu pada *crossing point* digambarkan dengan gambar panah (b). Standar Kurva menggambarkan nilai DNA standar yang teramplifikasi, setiap warna mewakili konsentrasi DNA yang teramplifikasi.

#### Hasil Pemeriksaan DNA EBV pada Stadium Awal (I/II) dengan Stadium Lanjut (III/IV)

Dilakukan analisa deskriptif pada hasil pengukuran DNA LMP2 EBV kedua kelompok namun hasil tersebut tidak dapat dilakukan analisa bivariat karena tidak memenuhi jumlah sampel minimal. Berdasarkan hasil analisa data menggunakan analisa deskriptif, diperoleh hasil sebagai berikut: dari 25 penderita KNF stadium awal (I/II) sebagian besar penderita menunjukkan hasil pengukuran DNA EBV negatif (*negatif copy*) dengan nilai median 0 copy DNA/ml (0-94,7 copy/ml) dan pada sejumlah 58 penderita KNF dengan stadium lanjut III/IV, sebagian besar penderita 37 (63,15%) menunjukkan hasil pengukuran DNA EBV yang positif (*positif copy*) dengan nilai median 24,8 copy DNA/ml (0-11040 copy/ml). Hal ini sejalan pula dengan penelitian Leung Sing Fai, 2003, dan Shao JY, 2004 yang mengatakan bahwa terdapat perbedaan antara jumlah *copy* DNA EBV pada penderita KNF stadium awal dibandingkan dengan penderita KNF stadium lanjut,<sup>53</sup> dimana kadar DNA EBV pada penderita KNF stadium lanjut lebih tinggi dari pada hasil DNA EBV pada penderita KNF stadium awal (I/II). Menggunakan pemeriksaan kadar DNA LMP2 EBV sebelum pemberian terapi ini, penentuan stadium dan penentuan pengobatan akan ditentukan tidak

hanya berdasarkan kondisi klinis tetapi juga berdasarkan pada aktivitas molekuler sel-sel kanker sehingga diharapkan pemeriksaan ini akan meningkatkan angka keberhasilan pengobatan.

**Perbedaan Kadar Serum DNA EBV dengan Status T (Tumor), N (Nodul) dan M (Metastasis)**

Hasil pengukuran DNA EBV yang dilakukan penulis, didapat kecenderungan pula bahwa pada penderita KNF dengan status T, N dan M yang lebih tinggi (T3-T4, N2-N3 dan M1) menghasilkan nilai DNA EBV yang lebih tinggi dibandingkan penderita KNF dengan status T,N dan M yang lebih rendah (T1-T2, N0-N1 dan M0). Hal ini sejalan dengan Shao et al, 2004 berdasarkan penelitiannya menyatakan terdapat korelasi antara meningkatnya jumlah DNA EBV pada penderita KNF dengan besarnya tumor. Begitu pula dengan penelitian Lin et al, 2004, yang menyatakan bahwa hasil DNA EBV pada penderita KNF yang mengalami metastasis lebih tinggi dibandingkan dengan penderita yang tidak mengalami metastasis.

Dengan demikian DNA EBV merupakan salah satu petanda yang dapat digunakan sebagai *marker molekular* dalam membedakan penderita KNF stadium awal (I/II) dengan penderita KNF stadium lanjut (III/IV) termasuk dalam penentuan terhadap status T,N dan M, disamping penggunaan sistem TMN (UICC).

**Penentuan Nilai Cut Off Kadar DNA EBV**

Berdasarkan analisa hasil pengukuran kadar DNA EBV darah penderita KNF diatas dibuatlah kurva dan tabel ROC (*Receiver Operator Curve*). Nilai *cut off* yang didapat dari pemeriksaan DNA LMP2 EBV ini, adalah sebesar 7.15 copy/ml dengan nilai Sensitivitas dan Spesifisitas berturut-turut dalam persen adalah: 60.3% dan 72.0%.

Hasil *cut off* diatas berbeda dengan hasil *cut off* penelitian yang dilakukan oleh Chan AT, et al, 2002 yang menetapkan nilai *cut off* sejumlah 4000 copy/ml bagi penderita KNF dengan menggunakan target, sekuen *BamHIW* pada genom EBV<sup>46</sup> atau Steven SJC et al,2001, yang menetapkan nilai *cut off* sebesar 2000 copy/ ml<sup>54,55</sup> atau Chindavijak, 2008,yang menggunakan gen target LMP2 namun dengan nilai *cut off* sebesar 50 copy/ml<sup>43</sup>.Perbedaan nilai *cut off* antara penelitian Chan, et al, 2002 diatas, terjadi karena target amplifikasi yang digunakan dalam pemeriksaan PCR berbeda walaupun daerah amplifikasi tersebut berada dalam satu genom EBV. Daerah *BamHIW* dalam genom EBV, sering digunakan sebagai target amplifikasi dalam pemeriksaan DNA EBV terhadap pasien KNF. Pemeriksaan terhadap daerah genom EBV ini umumnya akan menghasilkan nilai *cut off* yang lebih besar dibandingkan dengan pemeriksaan yang menggunakan target

amplifikasi LMP2.<sup>43</sup> Hal tersebut disebabkan daerah *BamHIW* dalam genom EBV mempunyai *multiple repeat* yang lebih banyak, dibandingkan dengan gen LMP2 yang merupakan *single copy gene*<sup>39,46,51,56,57,58</sup> sehingga nilai DNA EBV yang teramplifikasi lebih besar pada setiap reaksi PCRnya dibandingkan bila menggunakan gen target LMP2. Sebagai tambahan, beberapa *sel line* EBV, mempunyai beberapa genom virus yang berbeda dalam jumlah *repeat* dan jumlah *repeat* tersebut dapat berubah saat terjadi replikasi pada fase litik<sup>51</sup>. Akibatnya nilai *cut off* yang dihasilkanpun menjadi lebih besar dibandingkan nilai *cut off* yang didapat menggunakan gen target LMP2.

Perbedaan nilai *cut off* pada penelitian Chindavijak, 2008, mungkin disebabkan penelitian tersebut memasukkan semua sampel yang berasal pasien KNF dari berbagai jenis histopatologi dan sampel kontrol non KNF yang mempunyai nilai positif terhadap LMP2<sup>43</sup> atau Steven SJC et al,2001, yang menggunakan sampel yang berasal dari pasien PTLD (*Post Transplant Lymphoproliferative Disease*)<sup>55</sup>. Dari nilai *cut off* yang didapat, dari keseluruhan hasil pemeriksaan DNA LMP2 EBV, maka didapatkan hasil yang sedikit berbeda antara jumlah penderita KNF stadium awal I/II dan penderita KNF stadium III/IV sebelum menggunakan nilai *cut off* dan setelah menggunakan nilai *cut off*. Perbedaan tersebut dapat dilihat pada tabel 4.7.3. dan 4.7.4.

**Tabel 3.3 Penderita KNF stadium I/II dan stadium III/IV sebelum menggunakan *cut off point***

	Stadium III/IV	Stadium I/II	Total
DNA EBV positif	37	8	45
DNA EBV negatif	21	17	38
Total	58	25	83

**Tabel 4.7.4. Penderita KNF stadium I/II dan stadium III/IV sesuai dengan nilai *cut off* pada 7.15 copy/ml**

	Stadium III/IV	Stadium I/II	Total
DNA EBV >7.15copy/ml	35	7	42
DNA EBV <=7.15copy/ml	23	18	41
Total	58	25	83

Berdasarkan tabel 4.7.3. diatas, didapatkan bahwa dari 8 orang pada stadium I/II yang mempunyai nilai DNA EBV positif ternyata, hanya terdapat 7 penderita yang mempunyai nilai DNA EBV diatas *cut off*. Begitu pula pada penderita KNF stadium lanjut, dari 37 penderita yang positif, ternyata hanya 35 orang saja yang mempunyai hasil DNA EBV yang berada diatas nilai *cut off*, sehingga terhadap penderita ini penulis mengharapkan sebaiknya dilakukan penelitian secara kohort untuk melihat progresifitas penyakit dan respon penderita terhadap pengobatan, dibandingkan dengan penderita pada stadium yang sama dengan nilai DNA EBV dibawah nilai *cut off*.

Pengukuran terhadap DNA EBV ini menunjukkan bahwa tetap dibutuhkan pemeriksaan molekuler pada penderita KNF terutama pada penderita KNF stadium awal, untuk mengetahui aktivitas molekuler yang terjadi pada sel kanker yang tidak bisa diketahui hanya dengan menggunakan *TNM system* yang ditetapkan oleh UICC atau pemeriksaan klinis saja.

#### IV. KESIMPULAN dan SARAN

1. Kadar serum DNA EBV penderita KNF stadium lanjut (III/IV) cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan kadar serum DNA EBV pada penderita KNF stadium awal (I/II).
2. Kadar serum DNA EBV penderita KNF dengan status T,N dan M yang lebih tinggi (T3-T4, N2-N3 dan M1) menunjukkan hasil yang cenderung lebih tinggi pula dibandingkan dengan penderita KNF dengan status T,N dan M yang rendah (T1-T2, N0-N1 dan M0).
3. Nilai *cut off* sebesar 7.15 copy/ml, merupakan batas antara penderita KNF stadium awal I/II dan stadium lanjut III/IV dalam penelitian ini.

#### Saran

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang mencukupi dan dilakukan penelitian kohort pada penderita KNF stadium awal dengan kadar DNA EBV yang tinggi dari nilai *cut off* dan pada penderita KNF stadium lanjut dengan kadar DNA EBV dibawah nilai *cut off* untuk melihat adanya hubungan antara tingginya nilai DNA EBV sebelum pemberian terapi, terhadap keberhasilan terapi dan risiko terjadinya kekambuhan atau metastasis.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menilai *cut off value* ini sebagai parameter dalam penelitian terkait DNA EBV pada penderita KNF.
3. Pengukuran kadar plasma/serum DNA EBV sebelum pemberian terapi, merupakan cara yang baik untuk membedakan antara

penderita KNF stadium awal dan stadium lanjut.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Khanna R, Burrows SR, Moss DJ, Immune regulation in Epstein-Barr Virus associated diseases, *Microbiol.rev*,1995;p387-405
2. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Field's Virology*. 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia, PA: Lippincott/Williams&Wilkins,2001;2575-627.
3. Kilger E, Kieser A, Baumann M, *et al*. Epstein-Barr virus mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which stimulates an activated CD40 receptor.
4. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;15:702-3.
5. BBC News, Epstein-Barr Virus, Updated March;2003
6. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, *et al*. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 1998;9:395-404.
7. Thorley-Lawson DA, Miyashita EM, Khan G. Epstein-Barr virus and the B cell: that's all it takes. *Trends Microbiol* 1996;4:204-208.
8. Horikawa T, Yoshizaki T, Sheen T, Lee S, Furukawa M. Association of Latent Membran Protein 1 dan Matrix Metalloproteinase 9 with metastasis in NPC. *Cancer*,2000;89:715-23
9. Liu MT, Hsieh CY, Chang TH, Lin JP, Huang CC, Wang AJ. Prognostic factor affecting the outcome of NPC. *Jpn Journal Cancer Clin.Oncol*.2003;3:501-508
10. Jian-guo T, Xuan I, Ping C. Expression of MMP9 in NPC and association with EBV infection. *Journal of Zhejiang University Science*.2004;5(10):1304-12
11. Harowi K, Hariwiyanto B, Erlangga EG and Erick S. The management of NPC at Sardjito Hospital of Yogyakarta. Free Paper. The 11<sup>th</sup> Asean ORC HNS Congress, Bali.2005
12. Wee J. Treatment of NPC. In Bishop, Huang Peng, Johnson PJ, Sham JST and Soo KC Ed. *Cancer Review*,2003:93-102.
13. Chan KCA, Lo YMD. Circulating tumor derived nucleid acids in cancer patient: potential application as tumor marker. *Br.J.Cancer*.2007;96:681-5.
14. Wang BG, Huang HY, Chen YC, *et al*. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res*.2003;63:3966-8
15. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, *et al*. Increasing integrity of free circulating DNA in serra of patient with collorectal of periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem*. 2006;52:1062-9

16. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu S et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J.Clin.Oncol.* 2006;24:4270-6
17. Jiang WW, Zahurak M, Goldenberg D, et al. Increased plasma DNA integrity index in head&neck cancerpatient. *Int.J.Cancer.*2006;119:2673-6
18. Chan ATC, Teo PML and Jonhson PJ. Nasopharyngeal carcinoma review. *Annual of Otolaryngology.* 2002;13:1007-15.
19. Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA. A reexamination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* 1985;35:35-42.
20. Murray PG, Young LS. The role of the Epstein-Barr virus in human disease. *Front Biosci* 2002; 7:519-40.
21. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, et al. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl JMed* 1984;310:1225-30.
22. Farrell PJ. Epstein-Barr Virus immortalizing genes. *Trends Microbiol* 1995;3:105-9.
23. Baumforth KRN, Young LS, Flavell KJ, et al. The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol*1999;52:307-22.
24. Lyons S, Liebowitz D. The roles of human viruses in the pathogenesis of lymphoma. *Semin Oncol* 1998;25:461-75
25. Teper C, Seldin M. Modulation of caspase-8 and FLICEinhibitor protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood* 1999;94:1727-37.
26. Wolf H, Zur Hausen H, Becker V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature*1973;244:245-7.
27. Sample, J., Lencz, G. & Nonoyama, M. Use of cloned Epstein-Barr Virus DNA to identify genes that determine the fate of viral infection. In *viral messenger RNA:Transcription, Processing, Splicing and Molecular Structure.* Ed. Y. Becker.1984 :127-146.
28. Epstein Barr Virus (EBV) gene product in EBV associated proliferative disorders, *Critical Review in Oncology/Hematology,* 45(2003);1-36
29. Sanna M Aalto. Modern diagnosis of EBV infections and post transplant lymphoproliferative disease. *Haartman Insitute,Dep.of Virology, university of Helsinki,Findland, 2007.*
30. Brooks LA, etal. Transcripts from the EBV virus BamHI A fragment are detectable in all three of virus latency. *J.Virol.* 1993;67:3182-90
31. Rowe M, Young LS, Cadwallader K, Petti L, Rickinson AB. Distinction between EBV type A (EBNA-2A) dan Type B (EBNA-2B) isolates extends to the EBNA-3 family of nuclear protein. *J.Virol.*1989;63:1031-39
32. Chen XQ, Stroun M, Magnenet JL, Nicod LP, etal. Microsatellite alteration in plasma DNA of small cell lung cancer patient. 1996; 2:1033-4
33. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alteration in serum of head and neck patient. *Nat.Med.* 1996;2: 1035-36
34. Anker P, Lefort F, Vasioukhin V. et al. K-Ras mutation are found in DNA extracted from plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1997;112:1114-20
35. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun. Point mutation of N-Ras gene in the blood plasma DNA of patient with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia. *Br.J.Hematol.*1994;86:774-9
36. Vasef MA, Ferlo A, Weiss LM. Cilnicopathological consultation NPC with emphasis on its relationship to EBV. *Ann.Otol.Rhinol.*1997;106: 348-356
37. Philip JJ and YM Dennis Lo. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Cancer Diagnostic:Review,Clinical Chemistry.* 2002;48; 8: p1186-93
38. Shotelersuk K, Khorprasert C, Sakdidul S, Pornthanakasem W, Voravud N, Multirangura A. Epstein-Barr virus DNA in serum/Plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1046-51.
39. Lin JC, Wang WY, Chen KY, et al. Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 2004;350:2461-70.
40. Sing fai Leung, et al. Pretherapy quantitative measurement of circulating EBV DNA is predicting of posttherapy distant failure in patient with early stage nasopharyngeal carcinoma of undifferentiated type. *American Cancer Society.*2003:288-291.
41. Hong MH, Min HQ, Ma J, Zhang EP, Cui NJ. A comparative study between '92&UICC (draft 1996) staging system of NPC. *Chin J Cancer.*1997;16:116-8
42. Sham JS, Choy D. Prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma: a review of 759 patients. *Br J Radiol.*1990;63:51-8.
43. Somjin Chindavijak, Danai T, Ekapob S. Quantitative detection of plasma cell-free Epstein Barr Virus DNA in NPC patient by realtime PCR. *Thai Cancer Journal.* 2008;28:13-23.
44. Julie LR, Hongxin Fan, Sally LG, Steven AS, Nancy Raab-Traub, Margaret L. Gulley. Epstein-Barr Virus quantification by Real Time PCR targeting multiple gene segments:



- A novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *Journal of Molecular Diagnostics*; 2004; Vol 6: No 4.
45. Iwan Ariawan. Kurva receiver operating characteristic. Materi Kuliah Biostatistik S2, FK M UI. 2008.
  46. Chan AT, Lo YM, Zee B, *et al.* Plasma Epstein-Barr virus DNA and residual disease after radiotherapy for undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002.;94:1614-1619.
  47. Hariwiyanto, Bambang. Peran protein EBNA1, EBNA2, LMP1 dan LMP2 virus EBV sebagai faktor prognosis pada pengobatan karsinoma nasofaring. Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2009.
  48. Margaret G, Hongxin Fan, Sandra H Elmore. Validation of Roche LightCycler Epstein-Barr Virus quantification reagents in a clinical laboratory setting. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2006; vol8:5.
  49. Monica Aeur, *et al.* Development of a quantitative lightcycler assay for the detection of EBV DNA in research samples. *Biochemica*, 2002; 3:6-8.
  50. Kozic Sanja, *et al.* Evaluation of a commercial real-time PCR assay for quantification of EBV DNA in different group of patients. *Jvirumed*, 2006; 135:263-68
  51. Quynh Tu Le, Carol D Jones, Tsz Kok Yau *et al.* A comparison study of different PCR assay in measuring plasma DNA EBV levels in patient with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:5700-7.
  52. Min HQ, Hong MH, Ma J, *et al.* A new staging system for NPC in China. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994; 30:1037-104
  53. Shao JY, Zhang Y, *et al.* Comparison of EBV DNA level in plasma, peripheral blood cell and tumor tissue in nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res.* 2004; 24:4059-66.
  54. Steven SJC, Verkuijlen SAWM, van der Brule AJC, Middeldorp JM. Comparison of quantitative competitive PCR with LightCycler-based PCR for monitoring of EBV DNA load in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:3986-92.
  55. Steven SJC, *et al.* Frequent monitoring of EBV DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of PLTD in high risk patient. *Blood* 2001; 97:1165-71.
  56. Lo YMD, Chan LYS, Chan ATC, Leung SF, Lo KW, Zhang J. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free EBV DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 1999; 59:5452-5.
  57. Jones MD, Griffin BE. Clustered repeat sequences in the genome of EBV. *Nucleic Acid Res.* 1983; 11:3919-37.
  58. Allan GJ, Rowe DT. Size and stability of the EBV major internal repeats (IR-1) in Burkitt's lymphoma and lymphoblastoid cell lines. *Virology*, 1989; 173:489-98.
  59. Lo YMD, Chan LYS, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan ATC, *et al.* Quantitative analysis of cell free EBV DNA in plasma of patients with NPC. *Cancer Res.* 1999; 59:1189-91



LAMPIRAN 1. DATA SAMPEL & HASIL DNA LMP2

No	Kode	Sex	Umur	Std	TNM	T	N	M	LMP2 (copy/ml)
1	RPM 2	L	38	III A	T2N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	0
2	RPM 6	L	60	IV A	T4N0M0	T3-T4	N0-N1	M0	0
3	RPM 8	P	63	III B	T3N1M0	T3-T4	N0-N1	M0	3.7
4	RPM 9	L	43	III A	T2N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	2589
5	RPM 12	L	49	III B	T3N2M0	T3-T4	N2-N3	M0	0
6	RPM 13	L	42	IV B	T3N2M0	T3-T4	N2-N3	M0	0
7	RPM 21	L	45	III A	T2N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	84
8	RPM 24	L	55	IV C	T2N2M1	T1-T2	N2-N3	M1	72
9	RPM 27	L	41	IV A	T4N1M0	T3-T4	N0-N1	M0	29.6
10	RPM 29	L	44	IV B	T3N3M0	T3-T4	N2-N3	M0	11040
11	RPM 31	L	67	IV C	T2N3M1	T1-T2	N2-N3	M1	244.5
12	RPM 32	L	41	IV B	T3N3M0	T3-T4	N2-N3	M0	7336
13	RPM 34	L	63	III A	T3N0M0	T3-T4	N0-N1	M0	0
14	RPM 35	P	67	III B	T3N0M0	T3-T4	N0-N1	M0	0
15	RPM 39	P	50	IV A	T4N0M0	T3-T4	N0-N1	M0	15.2
16	RPM 61	L	67	IV C	T4N3M1	T3-T4	N2-N3	M1	0
17	RPM 62	P	49	III A	T2N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	1170
18	RPM 64	P	36	IV C	T3N3M1	T3-T4	N2-N3	M1	811.5
19	RPM 65	L	42	III A	T2N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	129
20	RPM 71	P	39	IV A	T4N2M0	T3-T4	N2-N3	M0	0
21	RPM 74	P	29	IV C	TXNXM1	T3-T4	N2-N3	M1	14.5
22	RPM 79	L	30	IV C	T2N3M1	T1-T2	N2-N3	M1	1570
23	RPM 82	L	13	IV B	T3N3M0	T3-T4	N2-N3	M0	3.2
24	RPM 93	L	58	III B	T3N2M0	T3-T4	N2-N3	M0	0
25	RPM 96	L	42	IV B	T3N3M0	T3-T4	N2-N3	M0	98.3
26	RPM 98	L	47	IV C	T2N2M1	T1-T2	N2-N3	M1	45.9
27	RPM 99	L	49	IV B	T1N3M0	T1-T2	N2-N3	M0	0
28	RPM 112	L	45	IV C	T3N3M1	T3-T4	N2-N3	M1	0
29	RPM 117	L	53	IV A	T4N1M0	T3-T4	N0-N1	M0	0
30	RPM 118	P	27	III A	T2N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	0
31	RPM 125	L	20	IV B	T3N3M0	T3-T4	N2-N3	M0	218
32	RPM 126	L	47	IV A	T4N1M0	T3-T4	N0-N1	M0	309
33	RPM 136	L	65	IV C	T3N1M1	T3-T4	N0-N1	M1	11.1
34	RPM 141	L	44	III B	T3N2M0	T3-T4	N2-N3	M0	10
35	RPM 147	L	34	IV C	T1N2M1	T1-T2	N2-N3	M1	8
36	RPM 153	L	42	IV C	T3N3M1	T3-T4	N2-N3	M1	100.8
37	RPM 157	P	48	IV C	T3N1M1	T3-T4	N0-N1	M1	0
38	RPM 163	L	62	IV A	T4N0M0	T3-T4	N0-N1	M0	53
39	RPM 164	L	41	III B	T3N0M0	T3-T4	N0-N1	M0	0
40	RPM 166	P	20	IV B	T4N3M0	T3-T4	N2-N3	M0	0

41	RPM 168	L	20	III	T2N3M0	T1-T2	N2-N3	M0	123.5
42	RPM 169	L	52	IV B	T4N3M0	T3-T4	N2-N3	M0	107
43	RPM 172	P	50	III A	T2N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	379.5
44	RPM 173	L	57	IV B	T4N3M0	T3-T4	N2-N3	M0	103.1
45	RPM 174	L	38	IV B	T3N3M0	T3-T4	N2-N3	M0	0
46	RPM 178	L	45	IV C	T2N3M1	T1-T2	N2-N3	M1	481.5
47	RPM 179	L	38	IV A	T4N1M0	T3-T4	N0-N1	M0	0
48	RPM 180	P	45	III B	T3N2M0	T3-T4	N2-N3	M0	53
49	RPM 187	P	31	IV B	T2N3M0	T1-T2	N2-N3	M0	212.5
50	RPM 192	L	40	III A	T2N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	519.5
51	RPM 201	L	48	IV	T4N3MX	T3-T4	N2-N3	M0	1043
52	RPM 202	P	38	III A	T2N2MX	T1-T2	N2-N3	M0	0
53	RPM 218	L	50	IV	T2N3MX	T1-T2	N2-N3	M0	36.5
54	RPM 124	P	40	IV B	T4N3M0	T3-T4	N2-N3	M0	336
55	RPM 159	L	53	IV C	T2N3M1	T1-T2	N2-N3	M1	0
56	RPM 135	L	54	III	T2N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	313
57	RPM 155	L	60	IV C	T4N2M1	T3-T4	N2-N3	M1	20
58	RPM 149	P	28	III	T2N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	0
59	RPNM 2	P	49	II A	T2N0M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
60	RPM 1	P	46	II A	T2N0M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
61	RPM 4	L	52	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
62	RPM 5	P	43	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
63	RPM 7	P	58	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	2.1
64	RPM 11	P	46	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
65	RPM 17	P	42	II B	T1N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
66	RPM 18	L	51	II B	T1N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
67	RPM 26	P	52	II A	T2N0M0	T1-T2	N0-N1	M0	8
68	RPM 28	L	39	II B	T1N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	8
69	RPM 47	L	39	II B	T1N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	6.3
70	RPM 55	P	37	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
71	RPM 77	L	11	II B	T1N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
72	RPM 88	P	40	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	94.7
73	RPM 106	P	45	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
74	RPM 108	P	43	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
75	RPM 116	P	43	II A	T2N0M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
76	RPM 133	L	38	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	10
77	RPM 158	P	72	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
78	RPM 162	L	66	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	94.35
79	RPM 165	L	53	II A	T1N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	52.7
80	RPM 183	P	47	II B	T1N2M0	T1-T2	N2-N3	M0	0
81	RPM 188	L	32	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	15
82	RPM 198	L	53	II B	T2N1M0	T1-T2	N0-N1	M0	0
83	RPM 209	L	28	II A	T2N0M0	T1-T2	N0-N1	M0	0

LAMPIRAN 2. STATISTIK

**Explore**

**Case Processing Summary**

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
LMP2	83	100.0%	0	.0%	83	100.0%

**Descriptives**

		Statistic	Std. Error
LMP2	Mean	361.2590	161.8853
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 39.2176 Upper Bound 683.3005	
	5% Trimmed Mean	97.3829	
	Median	8.0000	
	Variance	2175169	
	Std. Deviation	1474.8454	
	Minimum	.00	
	Maximum	11040.00	
	Range	11040.00	
	Interquartile Range	100.8000	
	Skewness	6.108	.264
	Kurtosis	39.590	.523

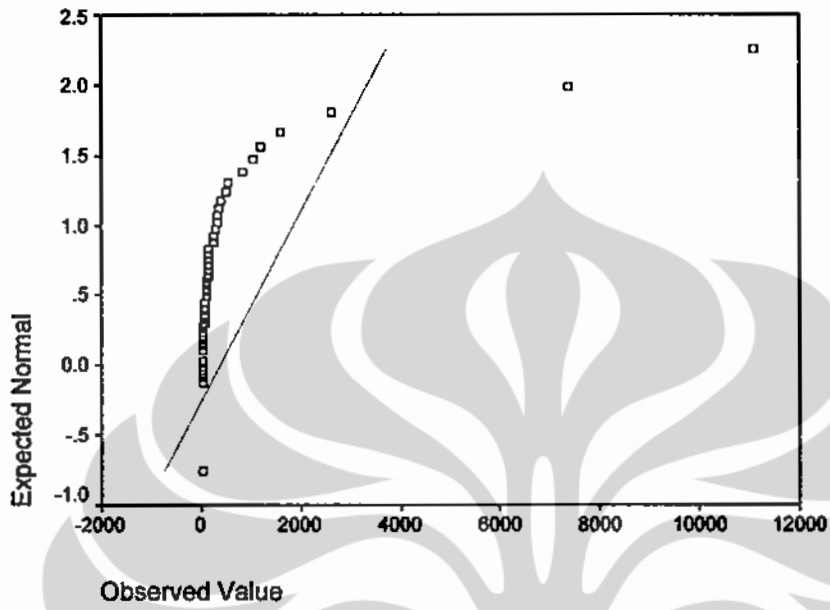
**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Statistic	df	Sig.
LMP2	.403	83	.000

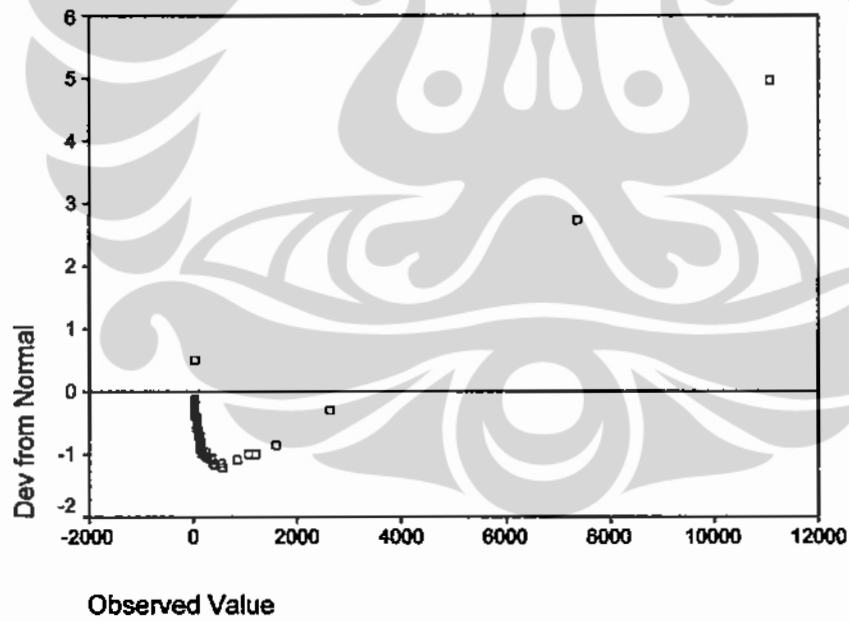
a. Lilliefors Significance Correction

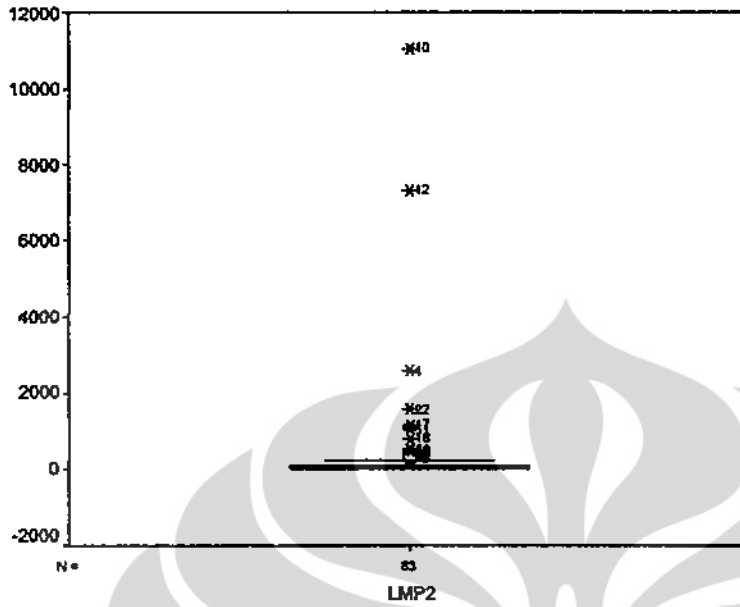
# LMP2

## Normal Q-Q Plot of LMP2



## Detrended Normal Q-Q Plot of LMP2





### NonPar Tests LMP2: Std III/IV vs Std I/II

#### Mann-Whitney Test

##### Ranks

	Stadium	N	Mean Rank	Sum of Ranks
LMP2	Stadium 3/4	58	47.35	2746.50
	Stadium 1/2	25	29.58	739.50
	Total	83		

##### Test Statistics<sup>a</sup>

	LMP2
Mann-Whitney U	414.500
Wilcoxon W	739.500
Z	-3.228
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001

a. Grouping Variable: Stadium

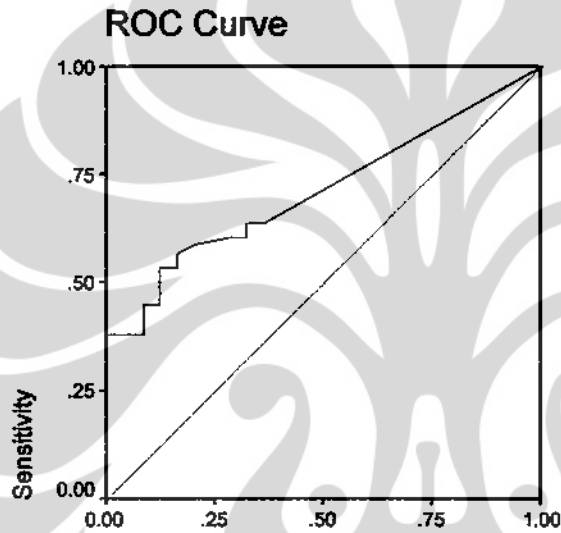
# ROC Curve

## Case Processing Summary

Stadium	Valid N (listwise)
Positive <sup>a</sup>	58
Negative	25

Larger values of the test result variable(s) indicate stronger evidence for a positive actual state.

a. The positive actual state is Stadium 3/4.



1 - Specificity

Diagonal segments are produced by ties.

## Area Under the Curve

Test Result Variable(s): LMP2

Area	Std. Error <sup>a</sup>	Asymptotic Sig. <sup>b</sup>	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.714	.055	.002	.606	.823

The test result variable(s): LMP2 has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): LMP2

Positive if Greater Than or Equal To <sup>a</sup>	Sensitivity	1 - Specificity
-1.0000	1.000	1.000
1.0500	.638	.360
2.6500	.638	.320
3.4500	.621	.320
5.0000	.603	.320
7.1500	.603	.280
9.0000	.586	.200
10.5500	.569	.160
12.8000	.552	.160
14.7500	.534	.160
15.1000	.534	.120
17.6000	.517	.120
24.8000	.500	.120
33.0500	.483	.120
41.2000	.466	.120
49.3000	.448	.120
52.8500	.448	.080
62.5000	.414	.080
78.0000	.397	.080
89.1750	.379	.080
94.5250	.379	.040
96.5000	.379	.000
99.5500	.362	.000
101.9500	.345	.000
105.0500	.328	.000
115.2250	.310	.000
126.2250	.293	.000
170.7500	.276	.000
215.2500	.259	.000
231.2500	.241	.000
276.7500	.224	.000
311.0000	.207	.000
324.5000	.190	.000
357.7500	.172	.000
430.5000	.155	.000
500.5000	.138	.000
665.5000	.121	.000
927.0000	.103	.000
1106.2500	.086	.000
1370.0000	.069	.000
2079.5000	.052	.000
4962.2500	.034	.000
9187.7500	.017	.000
11041.0000	.000	.000

The test result variable(s): LMP2 has at least one tie between the positive actual state group and the negative

## Katagori LMP2 \* Stadium Crosstabulation

Count

	Stadium		Total
	Stadium 3/4	Stadium 1/2	
Katagori LMP2 > 7,15	35	7	42
LMP2 LMP2 <= 7,1	23	18	41
Total	58	25	83

Sensitivitas	= $a : (a+c)$	= 60,3%
Spesifisitas	= $d : (b+d)$	= 72,0%
Nilai prediksi positif	= $a : (a+b)$	= 83,3%
Nilai prediksi negatif	= $d : (c+d)$	= 43,9%
Rasio Kemungkinan Positif	= $a/(a+c) : b/(b+d)$	= 2,15%
Rasio Kemungkinan Negatif	= $c/(a+c) : d/(b+d)$	= 0,55%

## NonPar Tests LMP2: T3-T4 vs T1-T2

### Frequencies T3-T4

#### Statistics

LMP2

N	Valid	38
	Missing	0
Median		10.5500
Minimum		.00
Maximum		11040.00

### Frequencies T1-T2

#### Statistics

LMP2

N	Valid	47
	Missing	0
Median		6.3000
Minimum		.00
Maximum		2589.00



## NonPar Tests LMP2: N2-N3 vs N0-N1

### Frequencies N2-N3

#### Statistics

LMP2

N	Valid	48
	Missing	0
Median		52.8500
Minimum		.00
Maximum		11040.00

### Frequencies N0-N1

#### Statistics

LMP2

N	Valid	35
	Missing	0
Median		.0000
Minimum		.00
Maximum		309.00

## NonPar Tests LMP2: M1 vs M0

### Frequencies M1

#### Statistics

LMP2

N	Valid	15
	Missing	0
Median		20.0000
Minimum		.00
Maximum		1570.00

### Frequencies M0

#### Statistics

LMP2

N	Valid	68
	Missing	0
Median		2.6500
Minimum		.00
Maximum		11040.00