

**DELESI 30 pb GEN LATEN MEMBRAN PROTEIN-1 (LMP1)
VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV) PADA PENDERITA
KARSINOMA NASOFARING (KNF) DI INDONESIA**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
Magister Ilmu Biomedik (M.Biomed)**

**SRI MURNI ASIH
NPM : 6105012089**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
NOVEMBER 2008**

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Sri Murni Asih
NPM : 6105012089
Program studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Delesi 30 pb gen laten membran protein-1 (LMP1) virus Epstein-Barr (EBV) pada penderita karsinoma nasofaring (KNF) di Indonesia

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Dwi Anita Suryandari, M.Biomed. (.....)

Pembimbing II : Prof. Drs. Purnomo Soeharso, Ph.D (.....)

Penguji : Drs. Yurnadi, M.biomed (.....)

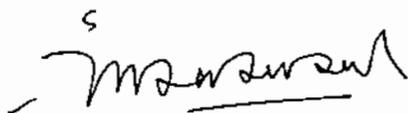
Penguji : dr. Budiman Bela, SpMK. (.....)

Penguji : Dr. dr. Susyana Tamin, SpTHT-KL (.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 13 November 2008

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI



Dr.rer.physiol.dr.Septelia Inawati Wanandi

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin. Puji syukur penulis persembahkan kepada Allah SWT atas segala karunia dan nikmat yang tak terhingga, serta hikmah yang berharga dalam satu proses pembelajaran ini.

Perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Dwi Anita Suryandari, M.Biomed. selaku pembimbing I dan Prof. Drs. Purnomo Soeharso, PhD. selaku pembimbing II, atas pengetahuan, bimbingan serta motivasi yang telah diberikan hingga tersusunnya tesis ini. Terima kasih pula kepada seluruh staf pengajar Program Pasca Sarjana Ilmu Biomedik FK-UI atas wawasan dan bekal ilmu pengetahuannya. Terima kasih penulis ucapkan untuk seluruh staf dan karyawan Departemen Biologi FK-UI yang tidak mungkin penulis sebutkan satu-persatu, atas bantuan yang telah diberikan selama penulis menuntut ilmu.

Terima kasih pula kepada Hibah Tim Penelitian Pascasarjana-HTPP (Hibah Pasca) Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia sebagai penyandang dana, dimana penelitian ini merupakan proyek dari dosen pembimbing penulis, Prof. Drs. Purnomo Soeharso, PhD yang diajukan ke Hibah Pasca.

Terima kasih untuk pak Heru, mbak Asti dan pak Yurnadi, yang telah bersedia berbagi ilmu dengan mengajarkan teknik-teknik di laboratorium, mulai dari isolasi DNA hingga proses elektroforesis.

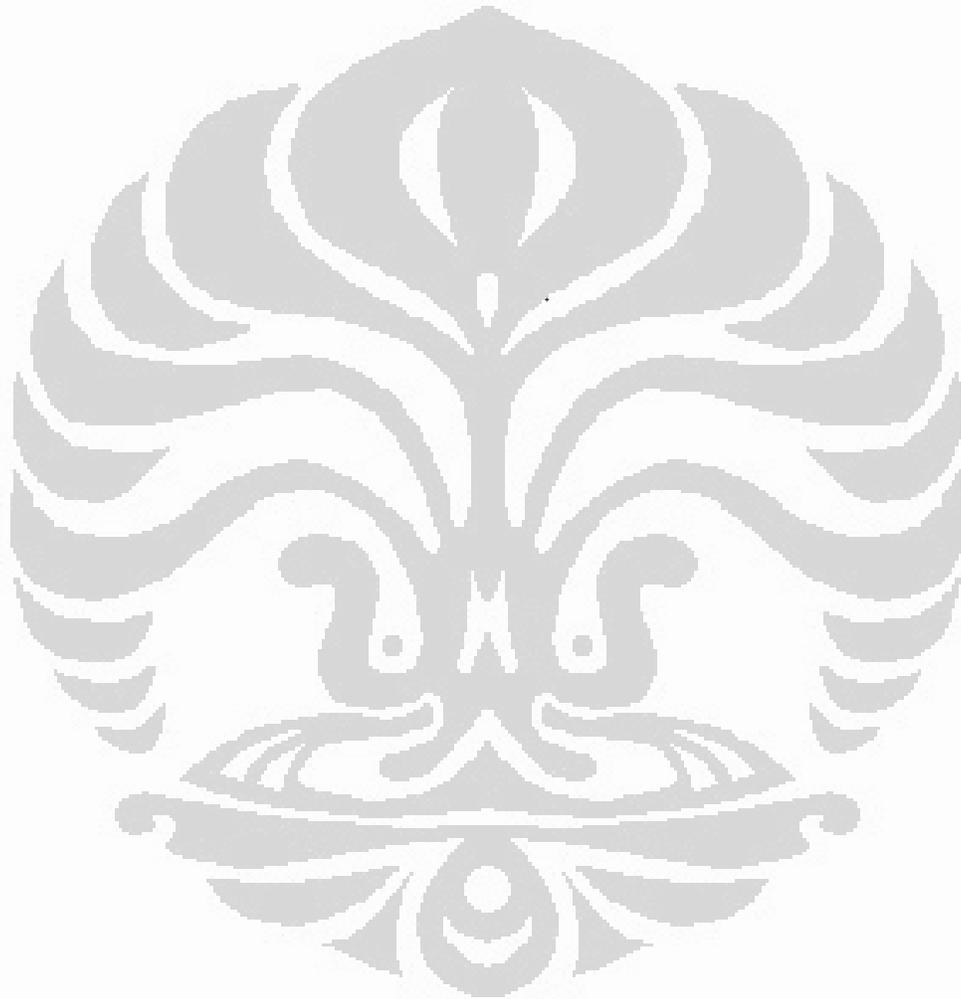
Terima kasih pula untuk teman-teman semua, Yoel, Dita, mbak Silvi, mas Adi, kak Lisbeth, mbak Nina, serta Rita, terima kasih atas persahabatan dan kebersamaan yang telah terjalin selama ini. Untuk pak Daniel dan pak Syaf, terima kasih atas nasehat dan motivasi yang selalu diberikan kepada penulis.

Teristimewa ucapan terima kasih yang tak terhingga penulis sampaikan kepada Bapak dan Ibu tercinta, yang telah membesarkan dengan penuh kasih sayang, mendidik, serta selalu memberikan motivasi dan dorongan untuk menyelesaikan tesis ini. Juga untuk adik-adik ku, Bambang, Iin, dan Ina yang telah membantu setiap saat dengan memberi dukungan semangat. Untuk suami ku, mas Joko, terima kasih atas dukungannya dalam usaha *finishing* tesis ini.

Untuk semua yang telah membantu, penulis hanya dapat mendoakan, semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat-Nya. Akhirnya, penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, tetapi semoga dapat memberi manfaat bagi yang membaca.

Jakarta, November 2008

Penulis



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

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

Nama : Sri Murni Asih
NPM : 6105012089
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Biologi Kedokteran
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 :

**DELESI 30 pb GEN LATEN MEMBRAN PROTEIN-1 (LMP1) VIRUS
EPSTEIN-BARR (EBV) PADA PENDERITA KARSINOMA
NASOFARING (KNF) DI JAKARTA**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan memublikasikan 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 : 13 November 2008
Yang menyatakan



(Sri Murni Asih)

ABSTRAK

Nama : Sri Murni Asih
Program studi : Ilmu Biomedik
Judul : Delesi 30 pb gen laten membran protein-1 (LMP1) virus Epstein-Barr (EBV) pada penderita karsinoma nasofaring (KNF) di Indonesia

Latar Belakang: Virus Epstein-Barr (EBV) merupakan virus dsDNA dan termasuk dalam famili Herpesviridae. Infeksi EBV dapat berasosiasi dengan beberapa penyakit seperti karsinoma nasofaring (KNF). Pada penderita KNF, gen EBV yang diekspresikan adalah gen laten, yaitu EBERs, EBNA1, LMP1, LMP2A, dan LMP2B. Dari kesemua gen tersebut, LMP1 dianggap yang berperan penting dalam proses onkogenesis dan transformasi limfosit B oleh EBV. Dari beberapa studi epidemiologi, ditemukan adanya varian khusus pada gen LMP1 berupa delesi 30 pb pada bagian C-terminal. Di Indonesia, hingga saat ini belum diketahui apakah ditemukan delesi 30 pb gen LMP1 pada penderita KNF dan bila ditemukan, apakah delesi tersebut berhubungan dengan patogenesis KNF.

Tujuan: Mengetahui apakah ditemukan delesi 30 pb gen LMP1 EBV pada penderita KNF di Indonesia, dan bila ditemukan berapa frekuensi delesi 30 pb gen LMP1 EBV pada penderita KNF di Indonesia, serta mengetahui hubungan antara delesi tersebut dengan status patologi KNF.

Metode: Identifikasi delesi 30 pb gen LMP1 virus Epstein-Barr dilakukan dengan metode *nested* PCR dan hasil PCR divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 2%. Hasil amplifikasi berupa pita DNA berukuran 162 pb untuk gen LMP1 yang tidak mengalami delesi 30 pb, sedangkan pita DNA berukuran 132 pb untuk gen LMP1 yang mengalami delesi 30 pb.

Hasil: Dari 100 sampel penderita KNF yang diidentifikasi, 29 sampel mengalami delesi 30 pb, 71 sampel tidak mengalami delesi 30 pb, dan 21 sampel mengalami *coexistence* varian.

Kesimpulan: Di Jakarta, varian EBV berupa delesi 30 pb gen LMP1 ditemukan dalam frekuensi yang rendah (24%; 29/121) bila dibandingkan varian yang tidak mengalami delesi 30 pb (76%; 92/121). Pada penelitian ini juga ditemukan adanya *coexistence* varian gen LMP1. Berdasarkan uji Fisher's Exact, didapat bahwa nilai $p > 0,05$, berarti tidak ada hubungan bermakna antara delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF.

Kata kunci: Delesi 30 pb, EBV, LMP1, Karsinoma nasofaring.

ABSTRACT

Name : Sri Murni Asih
Study program : Biomedical Science
Title : The 30-bp Deletion of Epstein-Barr Virus (EBV) Latent Membrane Protein-1 (LMP1) Gene in Indonesia Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) patients

Background: Epstein-Barr virus (EBV) is a dsDNA virus, member of Herpes (Herpesviridae) family. EBV infection may be associated with several diseases, one of them is nasopharyngeal carcinoma (NPC). NPC patients expressed EBV latent gene, they are EBERs, EBNA1, LMP1, LMP2A, and LMP2B. LMP1, in particular play important roles in epithelial oncogenesis and B lymphocyte transformation. Several epidemiological studies found specific variant of LMP1 gene detectable as 30-bp deletion of C-terminal region of LMP1 gene. There is not any report of 30-bp LMP1 gene on NPC patients so far and it is still unclear whether the deletion is associated with NPC pathogenesis.

Purpose: (1) To understand the existence of the deletion of 30-bp LMP1 gene in Indonesia NPC patients. (2) To determine the frequency of 30-bp deletion of LMP1 gene and its association with pathological status.

Method: Identification of 30-bp deletion in LMP1 gene was done by nested PCR method. The PCR result was investigated by means of electrophoresis in 2% agarose gel. The results were determined as 162 bp of DNA band of LMP1 gene (without 30-bp deletion) and 132 bp of DNA band of LMP1 gene (with 30-bp deletion).

Results: Among 100 identified samples, 29 samples found to have 30-bp deletion, 71 samples doesn't have 30-bp deletion and 21 samples carry coexistence variants.

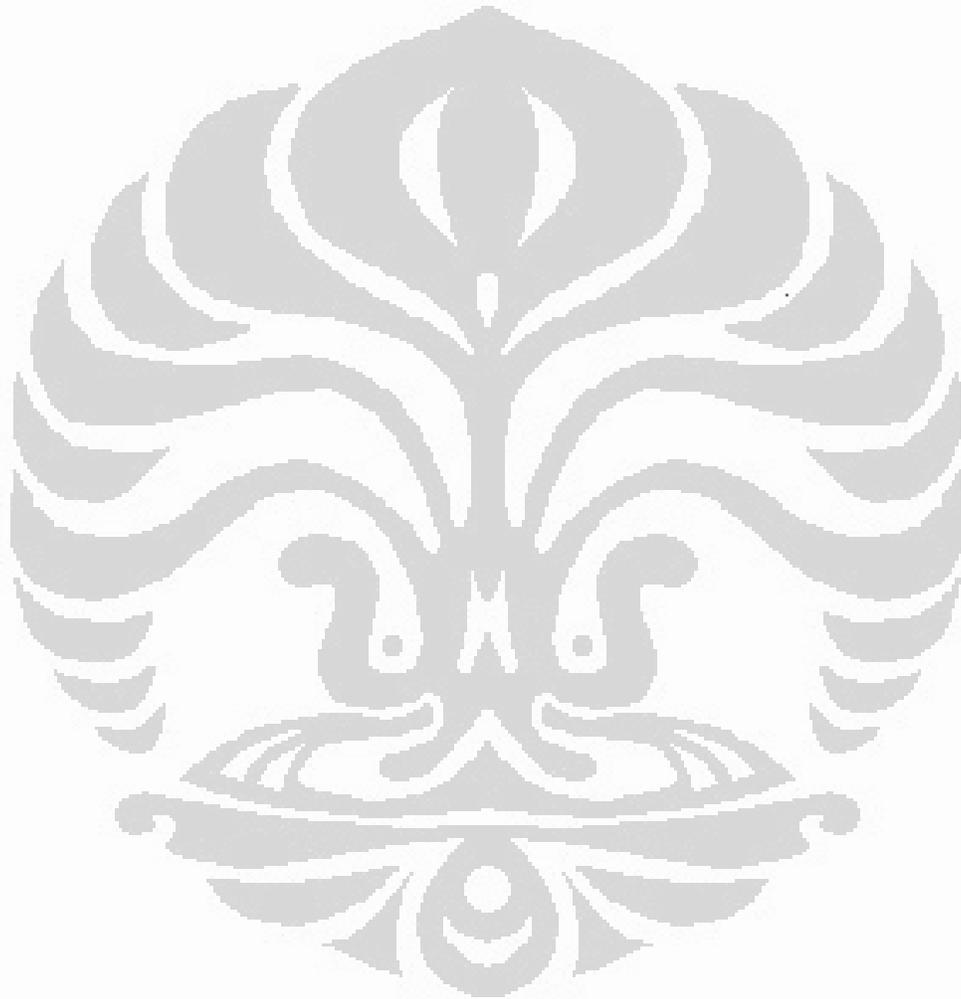
Conclusion: In Indonesia, especially in Jakarta, EBV variant of 30-bp deletion of LMP1 gene was found in low frequency (24%; 29/121) in comparison with variant without deletion (76%; 92/121). There are variant of LMP1 gene mixtures (coexistence with and without deletion). Analysis of data using Fisher's Exact test ($p > 0,05$) showed that there is not significant relationship between 30-bp deletion of LMP1 gene and NPC pathological status.

Keyword: 30-bp Deletion, EBV, LMP1, Nasopharyngeal Carcinoma (NPC).

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan masalah	3
1.3. Tujuan penelitian	3
1.4. Hipotesis penelitian	3
1.5. Manfaat penelitian	4
1.6. Kerangka konsep	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Karsinoma Nasofaring (KNF)	5
2.1.1. Epidemiologi	8
2.1.2. Etiologi	9
2.1.2.1. Infeksi Virus Epstein-Barr (EBV)	9
2.1.2.2. Lingkungan	9
2.1.2.3. Kerentanan Genetik	10
2.2. Virus Epstein-Barr (EBV)	11
2.3. Laten Membran Protein 1 (LMP1)	19
2.4. Delesi 30 pb gen LMP1	21
3. METODE PENELITIAN	23
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	23
3.2. Desain Penelitian	23
3.3. Sampel dan Jumlah Sampel	23
3.4. Alur Penelitian	24
3.5. Cara Kerja	25
3.5.1. Pengambilan sampel darah pasien KNF	25
3.5.2. Isolasi DNA virus dari plasma darah	26
3.5.3. Desain primer spesifik gen LMP1	27
3.5.4. Amplifikasi gen LMP1	28
3.5.5. Deteksi hasil amplifikasi gen LMP1	30
3.5.6. Sekuensing gen LMP1	30
3.5.7. Analisis gen LMP1	31
4. HASIL PENELITIAN	32
5. PEMBAHASAN	38

6. KESIMPULAN DAN SARAN	43
6.1. Kesimpulan	43
6.2. Saran.....	43
DAFTAR REFERENSI	44
LAMPIRAN	49
DRAF ARTIKEL	60
RIWAYAT HIDUP	69

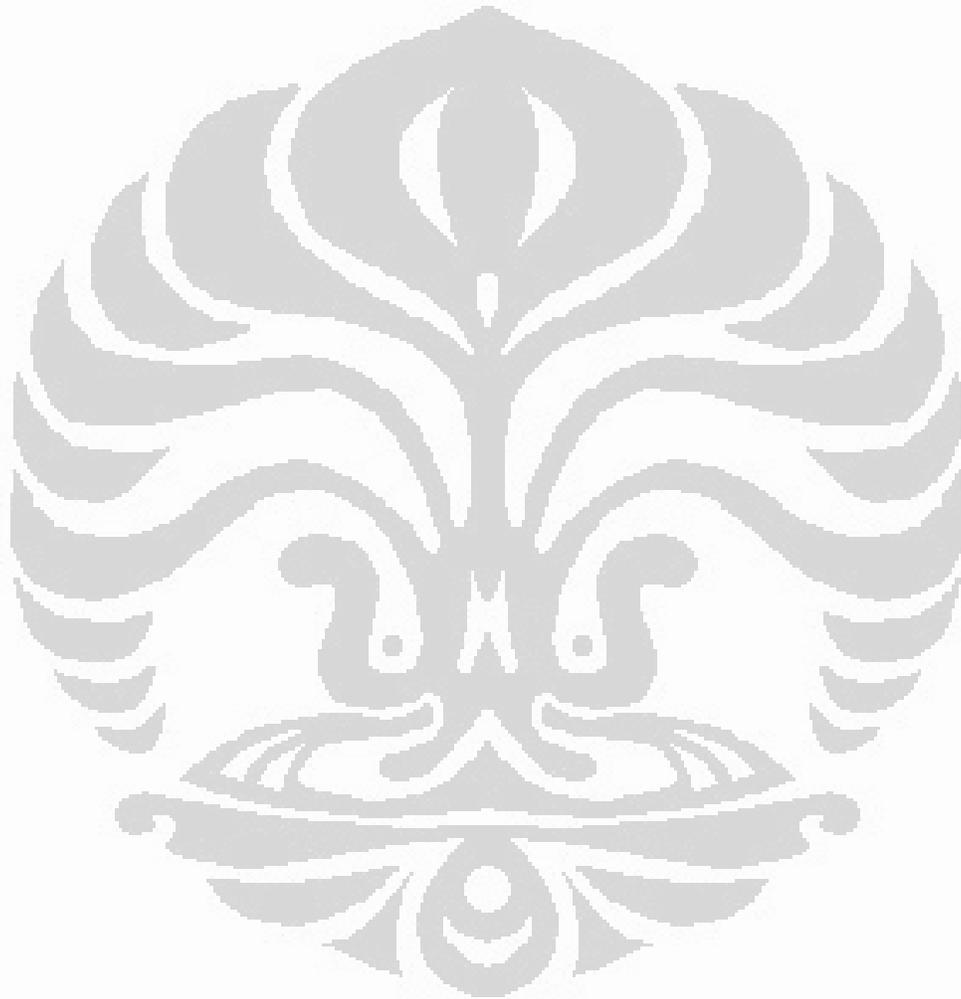


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Daerah nasofaring	5
Gambar 2.2.	Virus famili Herperviridae	11
Gambar 2.3.	Transformasi limfosit B oleh EBV	13
Gambar 2.4.	Struktur gen-gen laten EBV	16
Gambar 2.5.	Genom EBV	18
Gambar 2.6.	Struktur LMP1	20
Gambar 2.7.	Letak delesi 30 pb gen LMP1 pada C-terminal	21
Gambar 3.1.	Bagan alur penelitian	25
Gambar 3.2.	Sekuen gen LMP1 virus Epstein-Barr	27
Gambar 3.3.	Posisi primer yang digunakan untuk <i>nested</i> PCR.....	28
Gambar 4.1.	Gambaran elektroforesis hasil PCR pertama dengan menggunakan primer <i>outer</i>	33
Gambar 4.2.	Hasil sekuensing DNA	34
Gambar 4.3.	Gambaran elektroforesis hasil PCR kedua dengan menggunakan primer <i>inner</i>	35
Gambar 4.4.	Gambaran elektroforesis hasil <i>nested</i> PCR dengan 2 pita spesifik Hasil sekuensing DNA	36

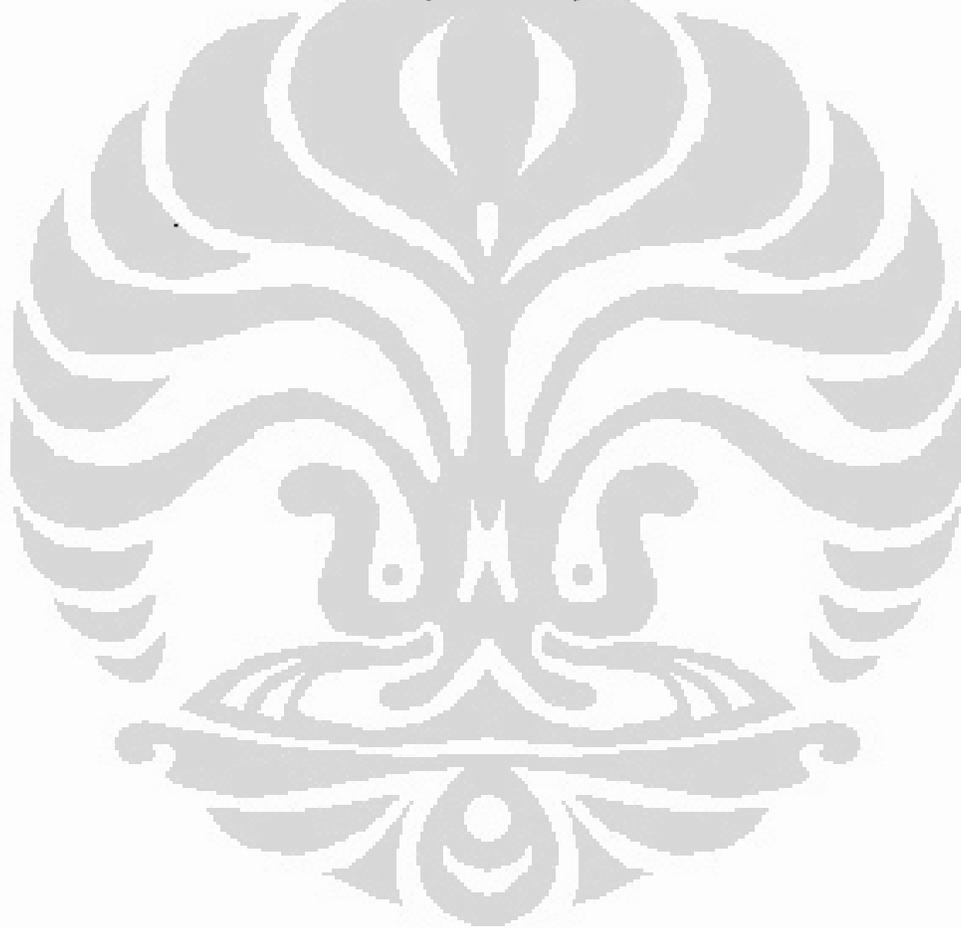
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Fase laten dan asosiasinya terhadap malignansi	17
Tabel 3.1. Kondisi optimal untuk <i>nested</i> PCR gen LMP1 virus Epstein-Barr	29
Tabel 4.1. Hasil <i>nested</i> PCR pada penderita KNF.....	35
Tabel 4.2. Hasil <i>nested</i> PCR terkait dengan tingkat stadium pasien KNF.....	36



DAFTAR LAMPIRAN

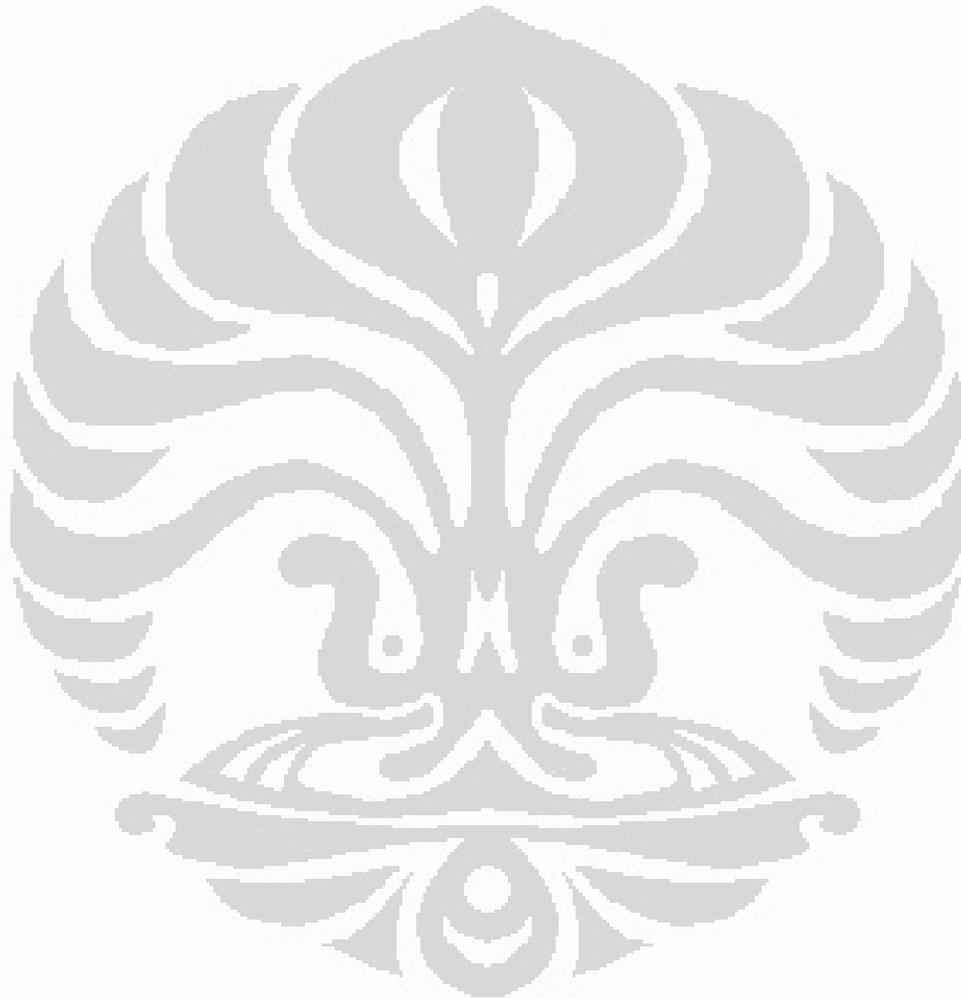
Lampiran 1. Surat keterangan Lolos Kajian Etik	49
Lampiran 2. Contoh surat <i>Informed Consent</i> Dept. Radioterapi RSCM, Jakarta ..	50
Lampiran 3. Contoh surat <i>Informed Consent</i> Dept. THT, RSCM, Jakarta	52
Lampiran 4. Data Pasien KNF	54
Lampiran 5. Analisis Statistik	57
Lampiran 6. Hasil sekuensing DNA sampel nomor 25	58
Lampiran 7. Hasil sekuensing DNA sampel nomor 34	59



DAFTAR SINGKATAN

Bcl-2	: <i>B-cell lymphoma-2</i>
BLAST	: <i>Basic Local Alignment and Search Tool</i>
CD21	: <i>cluster of differentiation 21</i>
C-IAA	: <i>Cloroform-Iso Amyl Alcohol</i>
CR2	: <i>complement receptor 2</i>
cp	: <i>promoter BamHI-C</i>
CYP2E1	: <i>cytochrome P450 2E1</i>
CTAR	: <i>C Terminal Activation Region</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	: <i>deoxynucleotide triphosphate</i>
<i>DraI</i>	: <i>Draccophyllus globigii I</i>
dsDNA	: <i>doublestrain Deoxyribonucleic acid</i>
EA	: <i>Early Antigen</i>
EBERs	: <i>Epstein-Barr encoded RNAs</i>
EBNA	: <i>Epstein-Barr nuclear antigen</i>
EBNA1	: <i>Epstein-Barr nuclear antigen-1</i>
EBNA2	: <i>Epstein-Barr nuclear antigen-2</i>
EBNA3	: <i>Epstein-Barr nuclear antigen-3</i>
EBNA-LP	: <i>Epstein-Barr nuclear antigen-leader protein</i>
EBV	: <i>Epstein-Barr virus</i>
EDTA	: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
gp350/220	: <i>glikoprotein 350/220</i>
HLA	: <i>Human Leucocyte Antigen</i>
IgA	: <i>Imunoglobulin A</i>
IgG	: <i>Imunoglobulin G</i>
IL-10	: <i>interleukin-10</i>
kDa	: <i>kilodaltons</i>
KNF	: <i>Karsinoma nasofaring</i>
LMP1	: <i>Latent membrane protein-1</i>
LMP2A	: <i>Latent membrane protein-2A</i>
LMP2B	: <i>Latent membrane protein-2B</i>
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFκB	: <i>Nuclear factor-kappa B</i>
PIGR	: <i>Polimeric Immunoglobulin Receptor</i>
pb	: <i>pasang basa</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
p53	: <i>protein dengan berat molekul 53kDa</i>
rpm	: <i>rotation per minute</i>
TCR	: <i>T cell Receptor</i>
TAE	: <i>Tris Acetate EDTA</i>
TE	: <i>Tris EDTA</i>
TES	: <i>Transformation Effector Site</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNM	: <i>Tumor Nodul Metastase</i>

TRADD	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor-associated death domain protein</i>
TRAFs	: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factors</i>
VCA	: <i>Virus Capsid antigen</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
wp	: promoter <i>BamHI-W</i>
<i>XhoI</i>	: <i>Xanthomonas I</i>
μg	: <i>microgram</i>
μl	: <i>microliter</i>



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Virus Epstein-Barr (EBV) merupakan virus dsDNA, memiliki kapsid icosohedral, dan termasuk dalam famili Herpesviridae. Penamaan EBV disesuaikan dengan penemunya, yaitu Michael Epstein dan Yvonne Barr. Kedua ahli tersebut menemukan EBV pada penderita limfoma Burkitt di Afrika pada tahun 1964. Virus ini menggunakan manusia sebagai inangnya dan menyebar melalui saliva. EBV menginfeksi sel-sel spesifik, terutama sel epitel squamosa pada mukosa nasofaring dan limfosit B. Infeksi EBV mempunyai insiden tinggi dimana lebih dari 90% populasi manusia di dunia pernah terinfeksi EBV, tetapi tidak semua infeksi bersifat patologis.¹

Infeksi EBV dapat berasosiasi dengan beberapa penyakit seperti limfoma Burkitt, limfoma sel T, mononukleosis infeksius, dan karsinoma nasofaring (KNF). KNF merupakan tumor ganas yang terjadi pada sel epitel di daerah nasofaring, yaitu pada daerah cekungan Rosenmuelleri dan tempat bermuara saluran Eustachii. Banyak faktor yang diduga berhubungan dengan KNF, yaitu (1) adanya infeksi EBV, (2) faktor lingkungan termasuk kebiasaan hidup, dan (3) kerentanan genetik (ras Mongoloid).¹ Dari beberapa penelitian ditemukan bahwa KNF konsisten dengan infeksi EBV. Penelitian Shotelersuk *et al*² menunjukkan bahwa DNA EBV dalam plasma dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis KNF.

Virus Epstein-Barr bereplikasi dalam sel-sel epitel, dan menjadi laten dalam limfosit B. EBV memulai infeksi pada limfosit B dengan cara berikatan dengan reseptor virus, yaitu komponen komplemen C3d (CD21 atau CR2). Glikoprotein (gp350/220) pada kapsul EBV berikatan dengan protein CD21 dipermukaan limfosit B.³ Aktivitas ini adalah rangkaian yang berangsur, EBV masuk ke dalam DNA limfosit B dan menyebabkan limfosit B menjadi immortal. Sementara itu, sampai saat ini mekanisme masuknya EBV ke dalam sel epitel nasofaring belum dapat dijelaskan dengan pasti. Namun demikian, ada 2 reseptor yang diduga berperan dalam masuknya EBV ke dalam sel epitel nasofaring, yaitu CR2 dan PIGR (*Polimeric Immunoglobulin Receptor*).⁴

Pada penderita KNF, gen EBV yang diekspresikan adalah gen laten, yaitu EBERs, EBNA1, LMP1, LMP2A, dan LMP2B. Protein EBNA1 berperan dalam mempertahankan DNA virus pada infeksi laten. Protein transmembran LMP2A dan LMP2B menghambat sinyal tyrosine kinase, yang dipercaya dapat menghambat siklus litik virus. Dari ke semua gen tersebut, maka gen yang berperan penting dalam transformasi sel adalah gen LMP1.³

Struktur protein LMP1 terdiri atas 386 asam amino, yang terbagi menjadi 20 asam amino pada ujung N, 6 segmen protein transmembran (166 asam amino) dan 200 asam amino pada ujung karboksi (C).⁵ Protein transmembran LMP1 menjadi perantara untuk sinyal TNF (*tumor necrosis factor*) dan meningkatkan regulasi sitokin IL-10 yang memproliferasi sel B dan menghambat respon imun lokal.³

Beberapa studi epidemiologi telah melaporkan tingginya prevalensi KNF yang disebabkan infeksi EBV di Asia. Di Cina bagian selatan tepatnya di propinsi Guang-dong, kasus KNF menduduki tempat tertinggi, yaitu 2.500 kasus baru per tahun atau dengan prevalensi 39, 84/100.000 penduduk, sedangkan prevalensi di Asia tenggara dilaporkan 3/100.000 pada populasi Thailand asli dan 10/100.000 pada populasi Thailand yang telah berasimilasi dengan etnis Cina. Di Malaysia, insiden KNF menempati urutan kedua terbanyak. Frekuensi yang tinggi dijumpai pada penduduk Malaysia keturunan etnis Cina. Angka kejadiannya 18, 1/100.000 penduduk pada pria dan 7, 4/100.000 penduduk pada wanita.⁶ Angka tersebut jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan yang terjadi di negara Eropa atau Amerika Utara dengan prevalensi 1 per 100.000 penduduk per tahun.^{1,4,7}

Berdasarkan studi epidemiologi KNF dan hubungannya dengan infeksi EBV, ditemukan adanya varian khusus pada gen LMP1, yaitu berupa adanya delesi 30 pb pada bagian C terminal gen LMP1. Secara umum, delesi 30 pb gen LMP1 dapat dijumpai pada penyakit yang berasosiasi dengan infeksi EBV. Delesi 30 pb gen LMP1 ditemukan pada populasi Cina penderita KNF, seperti yang telah dilaporkan oleh Hu *et al*⁸, Khanim *et al*⁹, dan Lin *et al*.¹⁰ Delesi 30 pb gen LMP1 juga ditemukan pada populasi Eropa penderita KNF,⁹ tetapi tidak ditemukan pada populasi Rusia penderita KNF.¹¹ Hingga saat ini belum diketahui apakah delesi 30 pb gen LMP1 berpengaruh pada patogenitas EBV pada KNF.

Karsinoma nasofaring di Indonesia merupakan kasus keganasan terbanyak di bidang THT (Telinga Hidung Tenggorokan). Penyakit ini menempati urutan keempat setelah karsinoma serviks, mammae, dan kulit. Angka kejadiannya sekitar 4.7 kasus baru per 100.000 penduduk per tahun dan lebih banyak dijumpai pada pria dibandingkan wanita dengan perbandingan 2-3 pria dibandingkan 1 wanita.⁶ Hingga saat ini belum ada publikasi penelitian yang lengkap mengenai varian genetik EBV, khususnya delesi 30 pb gen LMP1 yang mungkin berasosiasi dengan patogenesis dan keganasan KNF di Indonesia.

1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan studi epidemiologi KNF di beberapa populasi, terdapat varian EBV, tepatnya yang mengalami delesi 30 pb pada gen LMP1. Di Indonesia, hingga saat ini belum diketahui apakah ada delesi 30 pb gen LMP1 pada penderita KNF dan apabila ditemukan, apakah delesi tersebut berhubungan dengan status patologi KNF.

1.3. Tujuan penelitian

Dari rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah:

- 1.3.1. Mengetahui apakah terdapat delesi 30 pb gen LMP1 EBV pada penderita KNF di Indonesia.
- 1.3.2. Mengetahui frekuensi delesi 30 pb gen LMP1 EBV pada penderita KNF di Indonesia.
- 1.3.3. Mengetahui hubungan delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF Indonesia.

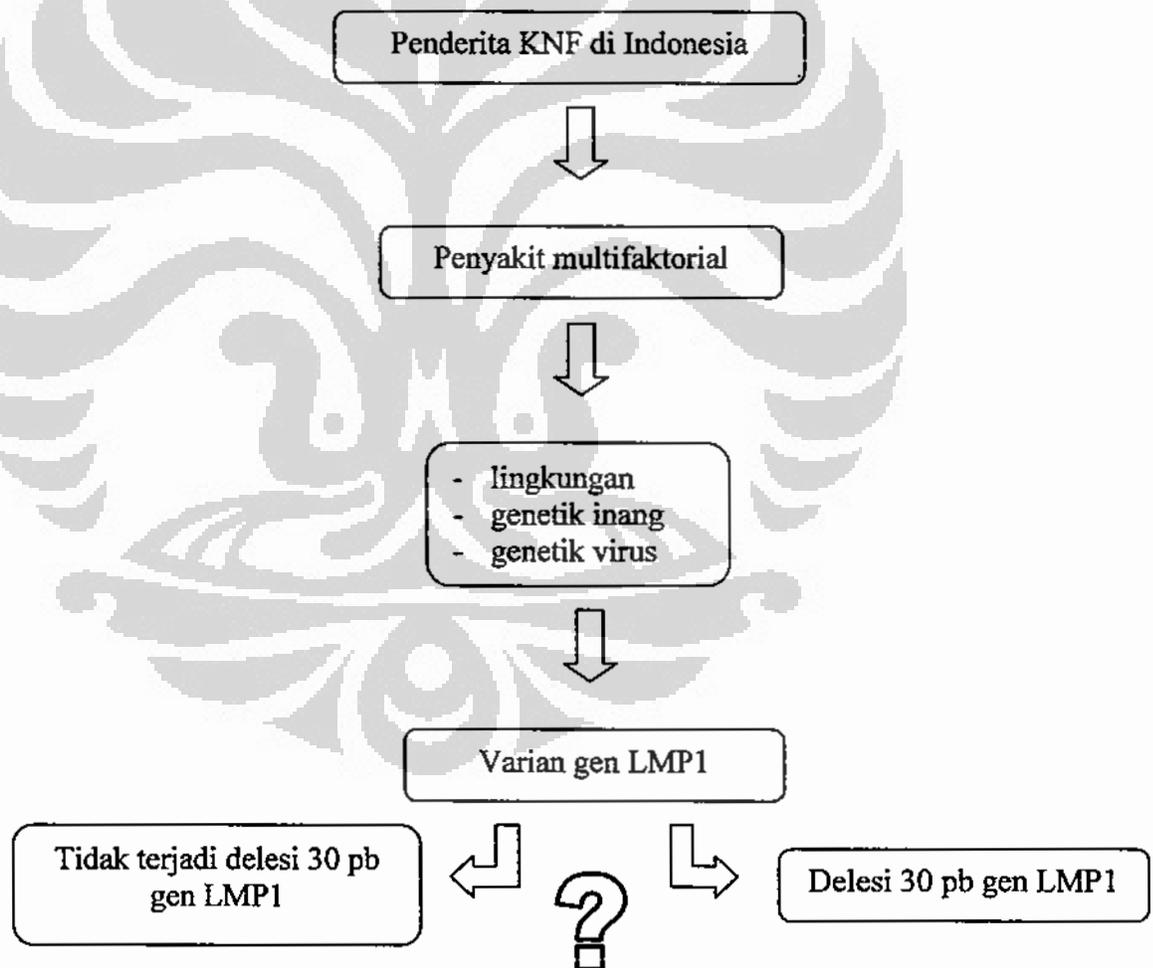
1.4. Hipotesis penelitian

Hipotesis yang diajukan adalah: terdapat hubungan yang bermakna antara delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi pasien KNF di Indonesia.

1.5. Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan pengetahuan mengenai virus Epstein-Barr, khususnya gen LMP1 yang mengalami delesi 30 pb pada penderita KNF. Selain itu, data hasil penelitian dapat dipakai sebagai *database* gen LMP1 pada penderita KNF di Indonesia. Hal ini berguna untuk menunjang penelitian selanjutnya. Dalam jangka waktu panjang, hasil penelitian juga diharapkan dapat membantu pihak klinisi dalam memberi informasi mengenai prognosis KNF.

1.6. Kerangka konsep

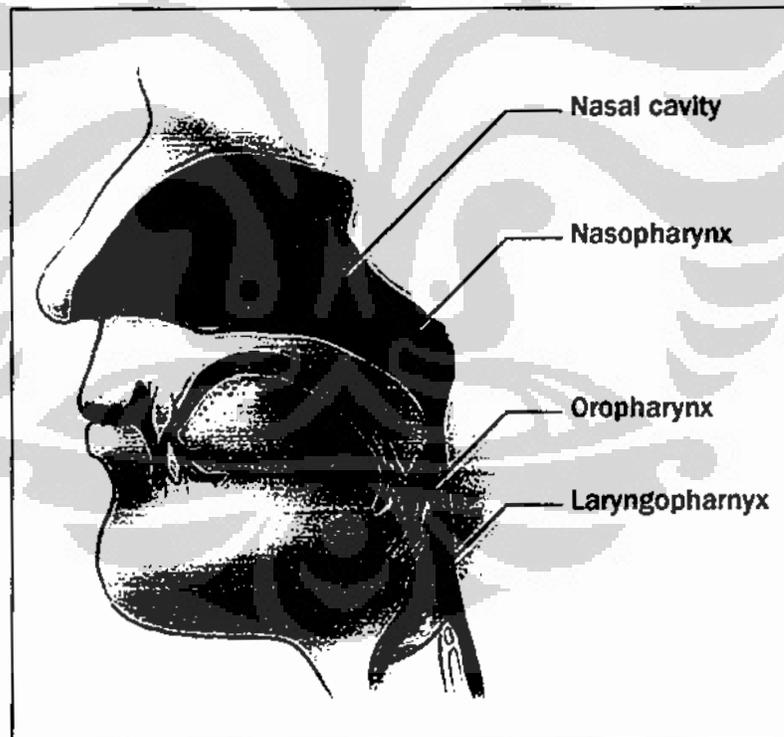


BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karsinoma nasofaring (KNF)

KNF merupakan tumor ganas yang terjadi pada sel epitel di daerah nasofaring, yaitu pada daerah cekungan Rosenmuelleri dan tempat bermuara saluran Eustachii (Gambar 2.1). KNF banyak yang terlambat didiagnosis karena tidak memiliki gejala spesifik, serta letak nasofaring yang tidak mudah diperiksa oleh mereka yang bukan ahlinya. Gangguan pilek biasa tetapi disertai rasa tidak nyaman di telinga dapat menjadi gejala awal KNF. Usia penderita pun cukup beragam, dapat mengenai semua golongan umur. Di negara berkembang, infeksi EBV banyak terjadi pada usia remaja 16-19 tahun tanpa diikuti gejala KNF.^{1,7}



Gambar 2.1. Daerah nasofaring.¹²

Tidak ada gejala spesifik yang dapat dijumpai pada penderita KNF. Umumnya penderita KNF mengeluh pilek disertai rasa tidak nyaman pada telinga, pendengaran sedikit menurun dan lendir dari hidung disertai perdarahan yang berulang. Pembesaran daerah leher merupakan pertanda penyebaran KNF ke

daerah ini atau rasa sakit kepala yang disebabkan desakan tulang dasar tengkorak oleh tumor. Setelah mengalami gejala tersebut, sebaiknya dilakukan pemeriksaan serologi. Hal ini karena pemeriksaan serologi merupakan salah satu cara untuk deteksi dini KNF. Dengan masuknya virus ke dalam sel manusia, tubuh akan membentuk suatu reaksi imunologi terhadap antigen yang terdapat di dalam virus.⁷

Berdasarkan antigen yang dimiliki EBV, kehadiran antigen VCA (*Virus Capsid Antigen*) dan EA (*Early Antigen*) digunakan untuk uji serologi. Sampai saat ini pemeriksaan titer IgA terhadap VCA dianggap yang paling spesifik dan sensitif untuk diagnosis KNF. Penggunaan antibodi IgA karena IgA berperan penting dalam perlindungan terhadap infeksi oleh virus yang melalui saluran pernafasan. IgA dibentuk oleh sel plasma di dalam sel epitel lamina propria selaput lendir, bukan di sel limfosit B. Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik, biasanya IgA-VCA dikombinasi dengan uji IgG terhadap EA. Namun Fachiroh *et al*¹³ melakukan uji serologi IgA yang dikombinasikan dengan antigen lain yaitu VCA dan EBNA-1. Hasil yang diperoleh dari sampel KNF populasi Indonesia, didapatkan sensitivitas dan spesifisitas adalah 98% dan 99,2%.

Diagnosis juga dapat dilakukan dengan pengambilan biopsi nasofaring, yang dapat dilakukan melalui hidung atau mulut. Bila cara ini masih dianggap kurang memuaskan maka dapat dilakukan pengerokan dengan kuret daerah lateral nasofaring. Diagnosis dengan menggunakan DNA dari virus EBV juga dapat dilakukan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Chang *et al*,¹⁴ dengan menggunakan metode PCR pada sel epitel nasofaring penderita KNF ditemukan adanya DNA virus EBV.

Berdasarkan histopatologi yang direkomendasikan oleh WHO (*World Health Organization*), KNF diklasifikasi dalam 3 tipe, yaitu:

- i. karsinoma sel squamosa (*squamous cell carcinoma*)
- ii. karsinoma non-keratinisasi (*non-keratinizing carcinoma*)
- iii. karsinoma tidak berdiferensiasi (*undifferentiated carcinoma*)

Dari ketiga tipe tersebut di atas, karsinoma tipe 2 dan 3 sudah dapat dipastikan berhubungan dengan adanya titer virus Epstein-Barr, sedangkan EBV tidak ditemukan pada karsinoma tipe 1. Umumnya kasus karsinoma tipe 3 diderita oleh

remaja dan orang dewasa, sedangkan kasus pada karsinoma tipe 2 sangat sedikit.^{1,15}

Penentuan stadium dilakukan berdasarkan atas kesepakatan antara UICC (*Union Internationale Contrele Cancer*) pada tahun 1992 adalah sebagai berikut :

T = Tumor, menggambarkan keadaan tumor primer, besar dan perluasannya.

T0 : Tidak tampak tumor

T1 : Tumor terbatas pada 1 lokasi di nasofaring

T2 : Tumor meluas lebih dari 1 lokasi, tetapi masih di dalam rongga
Nasofaring

T3 : Tumor meluas ke tengkorak dan/sudah mengenai saraf otak

N = Nodul, menggambarkan keadaan kelenjar limfe regional

N0 : Tidak ada pembesaran kelenjar

N1 : Terdapat pembesaran kelenjar homolateral yang masih dapat digerakkan

N2 : Terdapat pembesaran kelenjar kontralateral/bilateral yang masih dapat
Digerakkan

N3 : Terdapat pembesaran kelenjar baik homolateral, kontralateral atau
bilateral, yang sudah melekat pada jaringan sekitar

M = Metastasis, menggambarkan metastasis jauh

M0 : Tidak ada metastasis jauh

M1 : Terdapat metastasis jauh.

Berdasarkan TNM tersebut di atas, maka stadium penyakit dapat ditentukan :

Stadium I	:	T1	N0	M0
Stadium II	:	T2	N0	M0
Stadium III	:	T3	N0	M0
		T1,T2,T3	N1	M0
Stadium IV	:	T4	N0,N1	M0
		Tiap T	N2,N3	M0
		Tiap T	Tiap N	M1. ¹⁵

KNF merupakan kanker yang sangat radioresponsif sehingga radioterapi merupakan terapi standar dalam penanganan penderita KNF. Lebih kurang 80 % penderita KNF pada stadium awal (stadium I dan II) dapat mencapai remisi sempurna setelah mendapat radioterapi, namun pada penderita stadium lanjut

(stadium III dan IV) angka kekambuhan masih cukup tinggi (30-40 %) bahkan disertai metastasis. Dengan demikian radioterapi saja tidak cukup untuk mengeliminasi sel tumor, sehingga perlu pemberian kemoterapi virus bersama radioterapi yang telah terbukti dapat meningkatkan efektivitas pengobatan.¹⁶

2.1.1. Epidemiologi

Bila dilihat dari pola distribusi KNF di dunia, penyakit ini paling banyak dijumpai pada ras Mongoloid, Mediteranian, dan beberapa ras di Afrika bagian utara. Di Cina bagian selatan tepatnya di propinsi Guang-dong, kasus KNF menduduki tempat tertinggi, yaitu 2.500 kasus baru per tahun atau prevalensi 39,84 per 100.000 penduduk.⁷ Di Malaysia, insiden KNF juga banyak dijumpai pada keturunan ras Mongoloid.⁶ Menurut hasil penelitian Devi *et al*, di Sarawak-Malaysia, kasus KNF juga memiliki prevalensi yang cukup tinggi, yaitu 13,5 per 100.000 penduduk.¹⁷ Namun demikian, sekalipun bangsa Korea, Jepang dan Tiongkok bagian utara termasuk dalam ras Mongoloid tetapi tidak banyak yang dijumpai menderita KNF.⁷

Insiden KNF yang terjadi di negara-negara Asia jauh lebih tinggi dibandingkan yang terjadi di beberapa negara Eropa atau Amerika. Di Inggris, kasus KNF yang terjadi pada usia 0-14 tahun adalah 0,25 per 1.000.000 penduduk, sedangkan pada usia 10-14 tahun adalah 0,8 per 1.000.000 penduduk. Kisaran usia dari data *England and Wales Cancer* menunjukkan bahwa 80% penderita KNF berusia 15-19 tahun, dengan angka kejadian 1-2 per 1.000.000 penduduk.¹

Di Indonesia, KNF menjadi tumor ganas terbanyak di bidang THT dan merupakan urutan ke-4 terbanyak setelah kanker leher rahim, kanker payudara, dan kanker kulit. Angka kejadian KNF di Indonesia sekitar 4,7 kasus baru per 100.000 penduduk per tahun. Penderita KNF lebih banyak dijumpai pada pria dibandingkan wanita dengan perbandingan 2-3 pria dibandingkan 1 wanita.⁷

2.1.2. Etiologi

Terjadinya kasus KNF sering dikaitkan dengan beberapa faktor. Faktor tersebut adalah infeksi virus Epstein-Barr, lingkungan termasuk kebiasaan hidup seperti mengkonsumsi ikan yang diasinkan, dan kerentanan genetik (ras Mongoloid).¹

Etiologi KNF telah dilaporkan konsisten dengan infeksi EBV. Kaitan antara EBV dan konsumsi ikan asin dikatakan sebagai penyebab utama timbulnya KNF. EBV dapat masuk ke dalam tubuh tanpa menyebabkan suatu kelainan dalam jangka waktu lama. Untuk mengaktifkan virus ini diperlukan suatu mediator. Kebiasaan mengkonsumsi ikan asin secara terus menerus sedari masa kanak-kanak merupakan mediator utama yang dapat mengaktifkan EBV sehingga menimbulkan KNF.¹⁵

2.1.2.1. Infeksi virus Epstein-Barr (EBV)

Virus Epstein-Barr menggunakan manusia sebagai inangnya dan menyebar melalui saliva. Virus ini pertama kali ditemukan pada biopsi penderita KNF oleh Zur Hausen pada tahun 1970.³ Penemuan ini kemudian digunakan sebagai salah satu metode dalam diagnosis KNF, dimana pada serum atau plasma penderita KNF selalu ditemukan DNA EBV.^{2,18} Pada penderita KNF, sejumlah gen laten diekspresikan oleh EBV, yaitu EBERs, EBNA1, LMP1, LMP2A, dan LMP2B.³

Infeksi primer EBV dapat dianggap sebagai inisiasi (*starting point*) patogenesis KNF. Infeksi primer pada orang dewasa dapat menyebabkan persistensi virus, dimana virus masuk ke periode laten pada karier sehat dan virus dapat terdeteksi pada sel B memori. Periode laten mengalami reaktivasi spontan apabila limfosit B yang membawa virus laten mencapai epitel nasofaring dan/atau mukosa jaringan limfoid.¹⁹

2.1.2.2. Lingkungan

Ada beberapa faktor lingkungan yang berpengaruh antara lain iritasi bahan kimia (seperti formaldehid), asap sejenis kayu tertentu yang digunakan untuk memasak, kebiasaan memasak dengan bahan atau bumbu masak tertentu dan

kebiasaan makan makanan terlalu panas. Penelitian yang dilakukan oleh Vaughan *et al*²⁰ menunjukkan bahwa pada orang yang terpapar formaldehid akan meningkatkan risiko KNF, sedangkan orang yang terpapar formaldehid dan asap kayu akan mengakibatkan KNF dan kanker respirasi lainnya.

Kenaikan kasus KNF juga terjadi pada komunitas perahu yang sebagian besar orang Vietnam. Hal ini diduga karena kebiasaan menggunakan kayu sebagai bahan bakar untuk memasak. Kebiasaan hidup penduduk Guang-dong yang hampir setiap hari mengkonsumsi ikan yang diawetkan (diasinkan atau diasapi) juga memicu timbulnya KNF. Pada ikan yang telah diawetkan dijumpai zat yang bersifat karsinogen yaitu nitrosamin.⁷

2.1.2.3. Kerentanan genetik

Adanya alel yang unik (khas) dari HLA (*Human Leukocyte Antigen*)³ dan Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1)²⁰ dapat menjadi faktor genetik yang berpredisposisi pada inang KNF. Pada umumnya, KNF banyak dijumpai pada ras Mongoloid. Pada populasi Cina yang memiliki HLA-A2 akan mengalami peningkatan faktor risiko terkena KNF. Menurut hasil penelitian Hildesheim *et al*²¹ terdapat hubungan antara uniknya alel CYP2E1 dengan tingginya faktor risiko penderita KNF di Taiwan (keturunan China).

HLA berperan penting dalam respon imun oleh virus, sedangkan CYP2E1 merupakan enzim yang terlibat dalam metabolisme aktivasi prokarsinogen menjadi karsinogen. Nitrosamin merupakan substrat untuk CYP2E1 dalam metabolisme aktivasi karsinogen menjadi beberapa jenis kanker. Hasil penelitian Poirier *et al.* memperlihatkan CYP2E1 diekspresikan di epitel nasal manusia. Hal ini dipercaya dapat menyebabkan kerentanan pada sel epitel nasofaring sehingga mengakibatkan KNF.²²

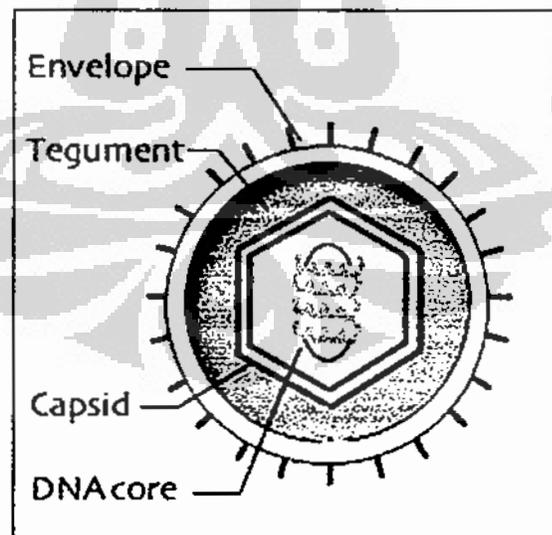
Penelitian yang terkait dengan gen CYP2E1 pada penderita KNF di Indonesia telah dilakukan oleh Suryohastari. Polimorfisme gen CYP2E1 dengan menggunakan enzim restriksi *DraI* memperlihatkan hasil bahwa tidak ada hubungan antara genotip dan alotip gen CYP2E1 dengan suseptibilitas individu terhadap KNF.²³

Polimorfisme gen TCR β juga turut berperan dalam kerentanan genetik pada penderita KNF. TCR adalah protein struktural dipermukaan limfosit T yang berfungsi untuk mengenal dan mengikat antigen. Menurut penelitian Setiawan, pada penderita KNF di Indonesia, alel A TCR β merupakan faktor predisposisi patologi KNF.²⁴

2.2. Epstein-Barr Virus (EBV)

EBV pertama kali diidentifikasi pada tahun 1964 oleh Michael Epstein, Yvonne Barr dan Bert Achong pada penderita limfoma Burkitt. Partikel EBV dapat dilihat pada biopsi kelenjar limfe penderita limfoma Burkitt dengan bantuan mikroskop elektron. Selain itu, pada serum penderita limfoma juga terdapat titer antibodi anti EBV yang tinggi bila dibandingkan dengan yang ada pada orang sehat (kontrol tanpa limfoma).²⁵

EBV termasuk dalam famili Herpesviridae, sub famili Gammaherpesvirus. Virus ini merupakan virus dsDNA, memiliki kapsid icosohedral dengan 162 kapsomer, protein tegumen diantara nukleokapsid dan *envelope*, serta memiliki glikoprotein (Gambar 2.2).^{5,25,26}



Gambar 2.2. Virus famili Herpesviridae.²⁶

EBV adalah virus homotropik dengan manusia sebagai inang spesifiknya dan menyebar melalui saliva. Infeksi EBV dapat berasosiasi dengan beberapa penyakit seperti limfoma Burkitt, limfoma sel T, mononukleosis infeksius,

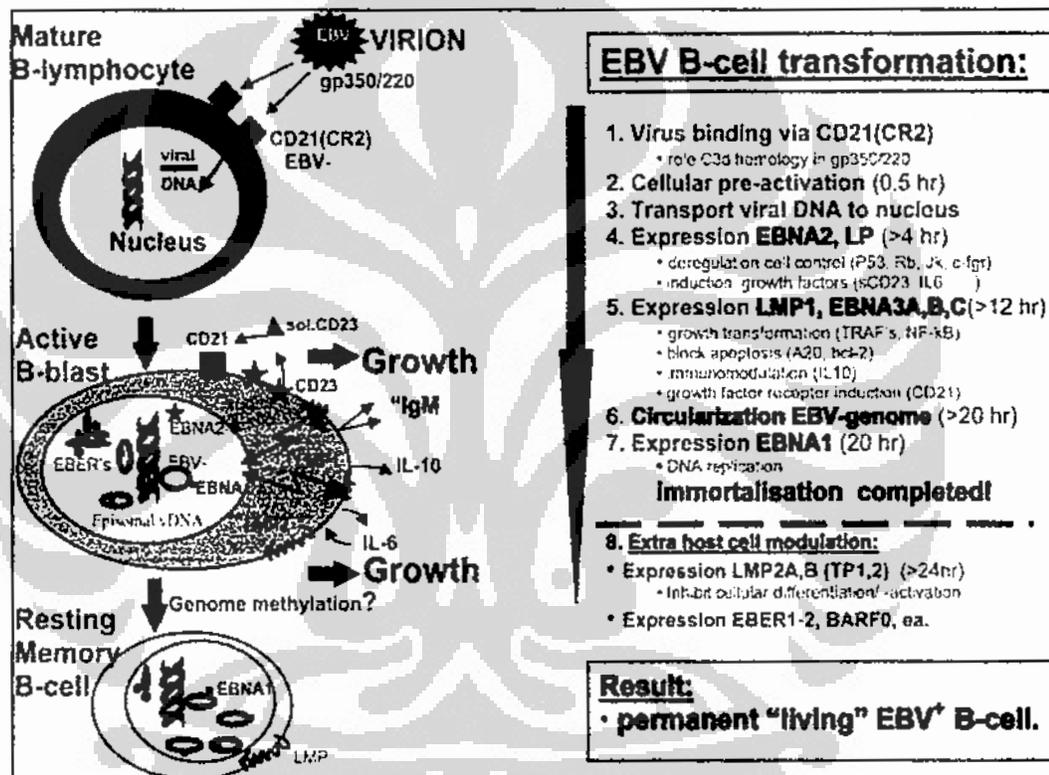
limfoma Hodgkin dan KNF. Ada 2 subtipe EBV yang diketahui dapat menginfeksi manusia, yaitu EBV-1 dan EBV-2. Kedua tipe tersebut berbeda dalam mengkode gen *Epstein-Barr nuclear antigen* (EBNA2 dan EBNA3). Secara *in vitro*, EBV-1 lebih efisien dalam bertransformasi ke sel B.^{25,27}

Bila dilihat dari distribusi geografis, terdapat perbedaan antara distribusi EBV-1 dan EBV-2. EBV-1 dijumpai secara umum pada setiap populasi, sedangkan EBV-2 lebih sedikit prevalensinya. EBV-2 banyak dijumpai pada kasus penderita limfoma Burkitt di Afrika. Hal ini sangat berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Shu *et al* di Taiwan, dimana 85% penderita karsinoma nasofaring mengandung EBV-1.²⁸ Secara umum, EBV-1 juga dapat dijumpai pada penderita limfoma Hodgkin di Eropa.⁹

Pada manusia, tepatnya di permukaan limfosit B terdapat CD21 yang berperan sebagai reseptor virus Epstein-Barr.³ Virus Epstein-Barr memulai infeksi pada limfosit B dengan cara berikatan dengan reseptor untuk EBV, yang juga merupakan reseptor komponen C3d komplemen (CD21 atau CR2). Glikoprotein (gp350/220) pada EBV berikatan dengan reseptor CD21 pada limfosit B. Protein laten yang pertama terbentuk adalah EBNA2 dan EBNA-LP, dengan Wp atau Cp sebagai promoter, kemudian diikuti dengan ekspresi gen LMP-1 dan diakhiri dengan mengekspresikan gen EBNA-1, sehingga episom virus dapat bereplikasi bersamaan dengan pembelahan sel dan melengkapi proses transformasinya (Gambar 2.3).³

Insiden infeksi EBV mencapai hampir 90% populasi manusia di dunia, tetapi tidak semuanya bersifat patogen. Virus Epstein-Barr yang menginfeksi orang sehat tetapi tidak bermanifestasi menjadi penyakit, diduga terjadi karena infeksi laten dan masih dalam bentuk virus EBV laten. Hal ini karena DNA EBV yang telah masuk ke dalam limfosit B tidak menginfeksi sel epitel, sehingga tidak akan menimbulkan keganasan. Virus Epstein-Barr yang berada dalam kondisi bebas (tidak menginfeksi limfosit B) tidak dapat secara langsung menginfeksi sel epitel. Berdasarkan data yang diperoleh, diyakini reseptor pada sel epitel tidak dapat menangkap EBV bebas (gp350/220) sebelum berikatan dengan limfosit B.²⁹ Jadi untuk dapat menimbulkan keganasan, EBV harus terlebih dahulu menginfeksi limfosit B dan selanjutnya limfosit B menginfeksi sel epitel.

Virus Epstein-Barr bereplikasi dalam sel-sel epitel, dan menjadi bentuk laten dalam limfosit B. Infeksi laten adalah persistensi virus dalam keadaan tersembunyi atau bentuk tersembunyi pada sebagian besar periode infeksiya.⁵ Sementara itu, sampai saat ini mekanisme masuknya EBV ke dalam sel epitel nasofaring belum dapat dijelaskan dengan pasti. Namun demikian, selain reseptor CR2 diduga ada reseptor lain yang turut berperan dalam masuknya EBV ke dalam sel epitel nasofaring, yaitu PIGR (*Polimeric Immunoglobulin Receptor*).⁴



Gambar 2.3. Transformasi limfosit B oleh EBV.³

Reaktivasi EBV pada epitel nasofaring berimplikasi pada 2 reaksi seluler, yaitu :

1. Infeksi litik

Infeksi EBV dimanifestasikan dengan terjadinya replikasi DNA virus, transkripsi, translasi genom virus, dilanjutkan dengan pembentukan (*assembly*) virion baru dalam jumlah besar yang menyebabkan sel inang menjadi lisis dan dilepas ke sirkulasi.

2. Infeksi laten (non litik)

Infeksi EBV berlanjut dengan inkorporasi DNA virus ke genom inang dan dapat menginduksi sel normal menjadi maligna.³

Selama fase laten, EBV akan mengekspresikan gen viral yang terkait dengan stimulasi proliferasi sel, menghambat apoptosis dan menghalangi replikasi viral litik.³ Virus Epstein-Barr yang telah menginfeksi limfosit B akan mengekspresikan beberapa gen laten. Gen-gen laten tersebut adalah:

1. EBNA1

EBNA1 dikode oleh BKRF1 *open reading frame*. Protein EBNA1 diekspresikan pada semua fase laten. Pada prototipe EBV galur B95.8, EBNA1 terdiri atas 641 asam amino. Protein ini berperan dalam replikasi dan pemelihara DNA virus pada waktu segregasi episom saat mitosis.

2. EBNA2

Protein EBNA2 merupakan protein EBV pertama yang diekspresikan. Antara EBV-1 dan EBV-2 terdapat sekuen yang signifikan pada protein EBNA2. Secara *in vitro*, perbedaan sekuen tersebut berhubungan dengan fungsi pada aktivitas transformasi. Meskipun EBNA2 penting untuk inisiasi transformasi EBV secara *in vitro*, namun ekspresinya kurang relevan untuk proses malignansi secara *in vivo*. Hal ini karena EBNA2 tidak diekspresikan pada semua EBV yang berasosiasi dengan tumor, kecuali pada individu yang mengalami imunokompromais.

3. EBNA3A (EBNA3), EBNA3B (EBNA4), EBNA3C (EBNA6)

Protein EBNA3A, B, dan C memiliki berat molekul 140, 165, dan 155 kDa. Pada EBV-1 dan EBV-2 terdapat variasi pada bagian *repeat* C-terminal, dimana untuk sekuen yang identik hanya 84, 80 dan 72%. Secara *in vitro*, EBNA3A dan EBNA3C berperan penting dalam transformasi sel B, namun tidak pada EBNA3B. EBNA3C dapat meningkatkan regulasi ekspresi CD21 dan mengganggu siklus *checkpoint* pada fase G1 siklus sel.

4. EBNA-LP (EBNA5)

EBNA-LP juga merupakan salah satu protein yang pertama kali diekspresikan oleh EBV selain EBNA2. Secara *in vitro*, EBNA-LP turut berperan penting untuk transformasi. EBNA-LP berinteraksi dengan EBNA2

mengatur sel limfosit B tetap pada fase G1 di siklus sel dengan mengikat p53 dan pRb (*retinoblastoma*).

5. LMP1

LMP1 dikode oleh BNFL-1 *open reading frame*. LMP1 juga turut terlibat dalam proses transformasi limfosit B. Protein LMP1 ini secara langsung berperan dalam proses onkogenesis, melindungi sel yang terinfeksi dari apoptosis dan meningkatkan proliferasi sel.

6. LMP2A, LMP2B

LMP2 mengkode 2 protein, yaitu LMP2A dan LMP2B. Keduanya memiliki perbedaan pada region N-terminal. Pada LMP2A terdapat 119 asam amino di N-terminal, sedangkan pada LMP2B tidak terdapat. LMP2A dan LMP2B dapat menghambat sinyal tirosine kinase, yang dapat menghambat siklus litik virus.

7. EBERs

EBERs terdiri dari EBER1 [167 nukleotida] dan EBER2 [172 nukleotida]. Protein ini terekspresi pada hampir semua sel yang terinfeksi EBV. EBER terlibat dalam induksi faktor autokrin dan memelihara fenotip malignansi pada sel limfoma Burkitt. Namun belum jelas apakah EBER ini turut berperan dalam transformasi sel B.^{3,4,25}

Virus Epstein-Barr juga mengkode beberapa protein yang terekspresi pada infeksi litik. Ada kesamaan sekuen dan fungsi antara protein yang diekspresikan pada infeksi litik dengan protein yang dimiliki oleh manusia sebagai inangnya. Protein-protein ini dapat mengadakan interaksi atau mempunyai homologi dengan berbagai protein tubuh seperti protein antiapoptosis, sitokin, dan transduksi sinyal. Protein yang diekspresikan adalah BCRF1, BDLF1, BHRF1 dan BARF 1.

a. BCRF1 dan IL-10

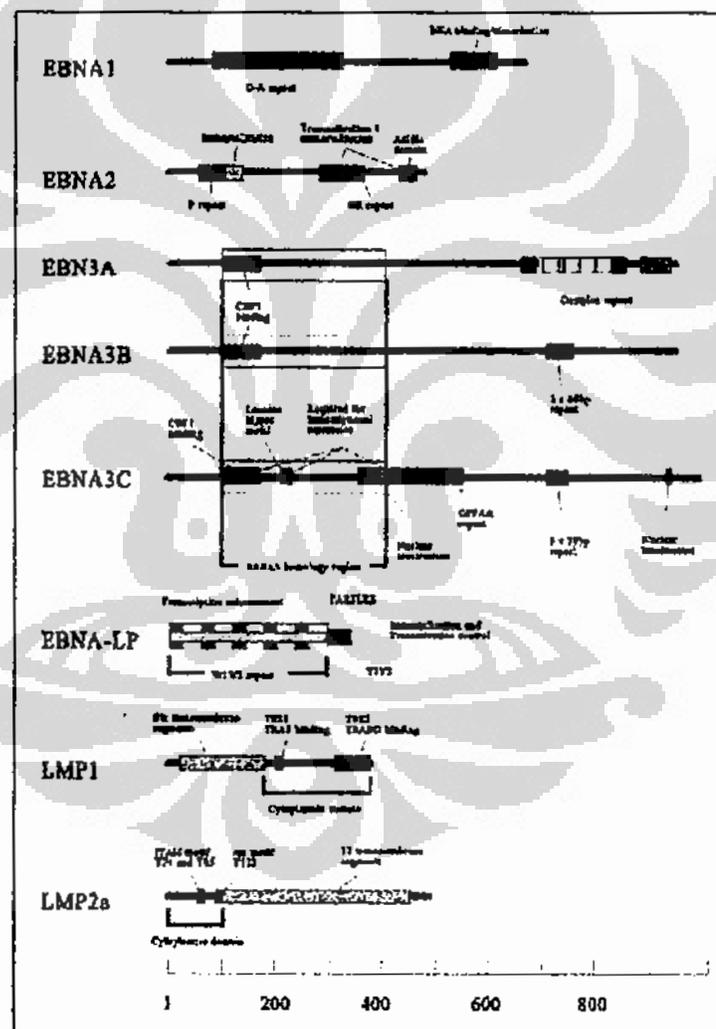
Protein BCRF1 memiliki 84% sekuen yang homolog dengan IL-10. IL-10 dapat menghambat aktivitas dan berfungsi sebagai efektor dari sel T, monosit dan makrofag. IL-10 juga diketahui sebagai faktor pertumbuhan dan aktivasi pada sel B. EBV menggunakan IL-10 untuk mempertahankan infeksi laten dengan menekan sistem respon imun pada inang.

b. BDLF2 dan Cyclin B1

Protein BDLF2 mempunyai kesamaan sekuen dengan cyclin B1. Cyclin B1 meregulasi G2-M pada siklus pembelahan sel. Memang masih banyak yang belum diketahui tentang protein ini, namun diyakini bahwa BDLF2 turut berperan dalam siklus litik.

c. BHRF1 dan Bcl2

Hampir 25% sekuen BHRF1 homolog dengan Bcl2, dimana Bcl2 berperan sebagai proto-onkogen dan melindungi sel limfosit B dari apoptosis.²⁵



Gambar 2.4. Struktur gen-gen laten EBV.⁵

Berdasarkan ekspresi gen laten EBV pada inangnya, dapat dibedakan dalam beberapa fase laten, yaitu:

- a. Fase laten I : mengekspresikan EBNA1, EBERs.
- b. Fase laten II : mengekspresikan EBERs, EBNA1, LMP1, LMP2A, LMP2B.
- c. Fase laten III : mengekspresikan EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3C, LMP1, LMP2.³

Perbedaan ekspresi gen fase laten tersebut dapat mengakibatkan perbedaan malignansi yang ditimbulkan EBV.^{3,25} Asosiasi EBV dengan beberapa malignansi ditunjukkan pada Tabel 2.1.

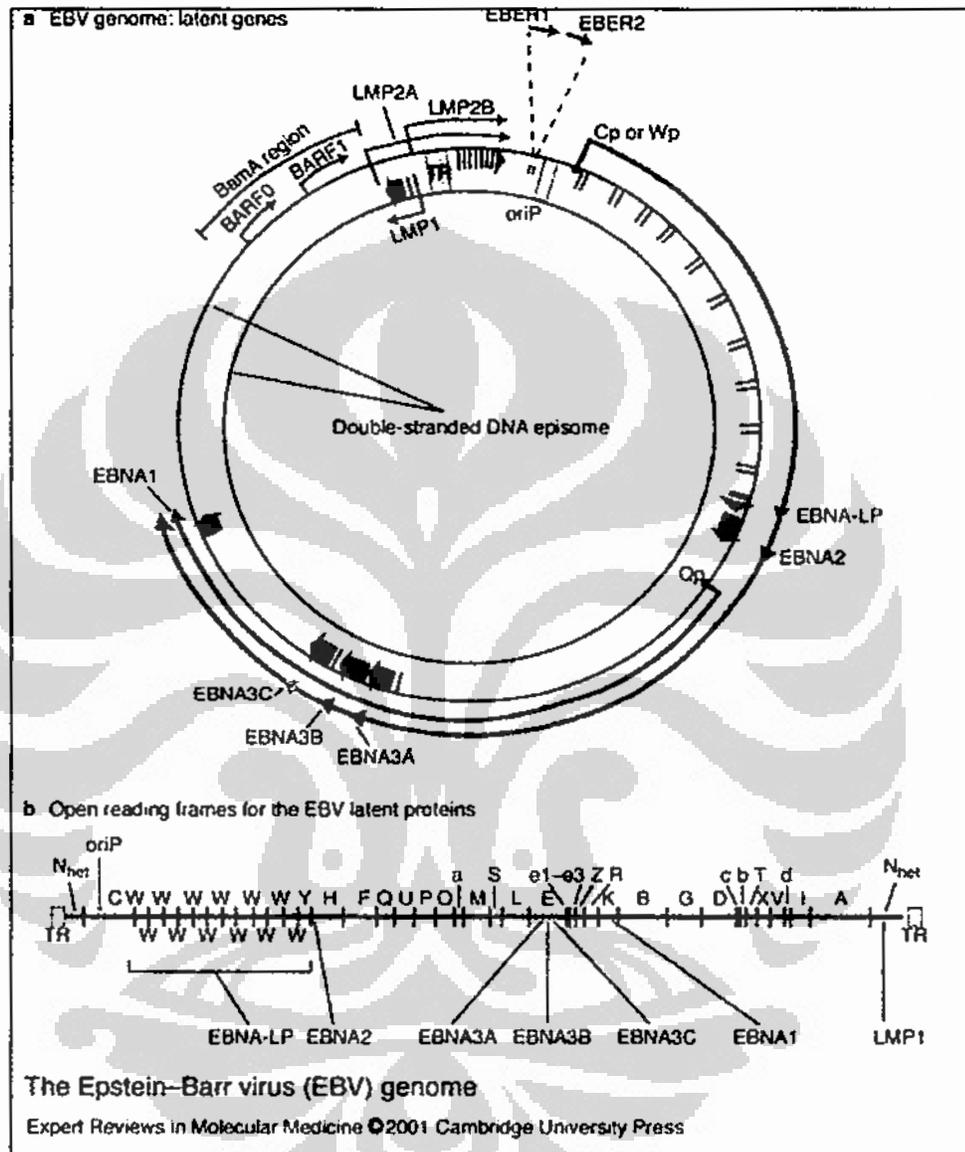
Tabel 2.1. Fase laten dan asosiasinya terhadap malignansi.^{3,25}

Fase laten	Ekspresi gen EBV	Asosiasi dengan Malignansi
Laten I	EBNA1 EBERs	Limfoma Burkitt
Laten II	EBNA1 EBERs LMP1 LMP2A LMP2B	Hodgkin's Karsinoma nasofaring Peripheral T/NK lymphoma
Laten III	Semua EBNA LMP1 LMP2	AIDS-associated lymphoma Posttransplant lymphomaproliferative

EBV mempunyai potensi onkogenik dengan mengubah sel yang terinfeksi menjadi sel ganas melalui beberapa mekanisme. Pertama, genom EBV dipertahankan dalam sel inang dengan berintegrasi pada genom sel inang. Selain itu EBV juga dapat mengekspresikan protein yang mempunyai homologi dengan protein antiapoptosis dan akhirnya proliferasi sel terinfeksi menjadi tidak terkendali akibat EBV mengaktifkan sinyal intraseluler yang berperan pada pengendalian pertumbuhan sel.²⁵

Berdasarkan data yang diperoleh dari GeneBank NCBI, ukuran genom EBV setelah disekuensi adalah 171,823 pb, terdiri atas kurang lebih 85 gen. Genom

EBV yang linear akan membentuk lingkaran sebagai episom (Gambar 2.5).³⁰
 Genom EBV ini terdiri atas lebih 100 *open reading frame* (ORFs).³



Gambar 2.5. Genom EBV.³⁰

2.3. Laten Membran Protein 1 (LMP1)

LMP1 merupakan protein membran integral dengan berat molekul 62 kDa. LMP1 dikode oleh EBV BNFL-1 *open reading frame*. Peran LMP1 sangat penting, karena terlibat dalam proses transformasi limfosit B. Protein LMP1 juga secara langsung berperan dalam proses onkogenesis. Protein ini dapat melindungi sel yang terinfeksi dari apoptosis dan meningkatkan proliferasi sel.^{5,25,31}

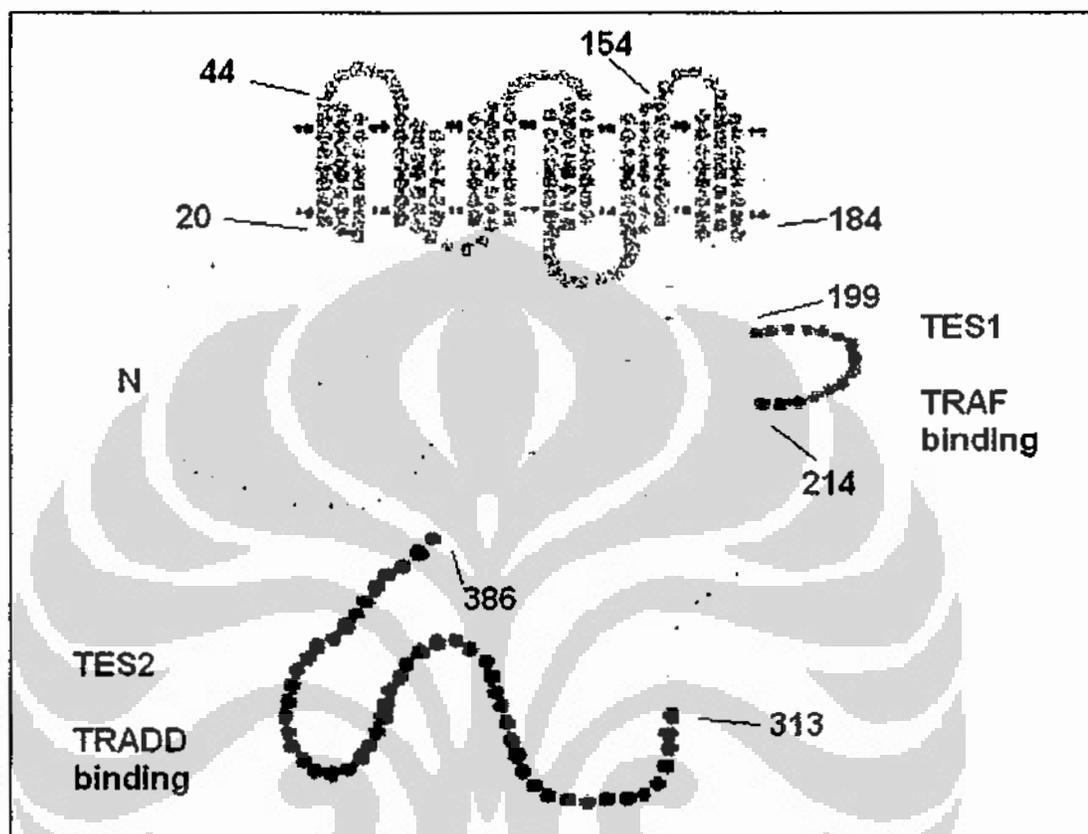
Beberapa penelitian memperlihatkan sel T, sel B, dan sel epitel yang terinfeksi EBV terlindungi dari proses apoptosis.⁵ Menurut penelitian yang dilakukan oleh Fries *et al*, LMP1 dapat menghambat terjadinya apoptosis oleh p53 dengan meningkatkan regulasi Bcl-2 dan A20 sebagai anti apoptosis.³² Sementara itu, LMP1 juga dapat meningkatkan regulasi sitokin IL-10 yang menstimulasi proliferasi limfosit B dan menghambat respon imun lokal. Secara *in vivo*, ekspresi LMP1 yang tinggi dapat dihubungkan dengan prognosis penyakit yang semakin buruk.³

Ekspresi LMP1 dapat mempertahankan fase laten dan menghambat fase litik EBV. Berdasarkan hasil penelitian Hatzivassiliou *et al*, LMP1 dapat menekan aktivitas protein kinase.³³ Protein kinase merupakan protein yang diproduksi selama fase litik EBV.³ Struktur LMP1 mirip dengan CD40 pada limfosit B, dimana pada kondisi normal CD40 akan berikatan dengan ligan CD40 yang berperan dalam proses transduksi sinyal untuk pertumbuhan sel.²⁵

Pada limfosit B yang telah terinfeksi EBV, LMP1 berlokasi pada membran plasma limfosit B. Protein LMP1 terdiri atas 386 asam amino yang terbagi dalam 20 asam amino pada N-terminal, 6 protein transmembran (166 asam amino), dan 200 asam amino pada C-terminal.⁵

Bagian C-terminal LMP1 berinteraksi dengan TRAFs (*Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factors*) dan TRADD (*Tumor Necrosis Factor Receptor-associated death domain protein*). Interaksi antara TRAFs dan TRADD dibagi menjadi 2 situs, yaitu *Transformation Effector Site* (TES) atau *C Terminal Activation Region* (CTAR). TES1/CTAR1 (asam amino 199-214) berikatan dengan TRAFs dan TES2/CTAR2 (asam amino 313-386) berikatan dengan TRADD. LMP1 yang berikatan dengan TRAFs dan TRADD dapat mengaktivasi NFκB dan meregulasi ekspresi gen NFκB yang berperan sebagai faktor transkripsi

dalam regulasi pertumbuhan sel dan apoptosis.^{5,25} Struktur LMP1 dengan TES1 dan TES2 dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Struktur LMP1.⁵ C-terminal LMP1 yang terbagi menjadi TES1 dan TES2.

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan, terdapat varian atau karakter khusus pada gen LMP1. Varian tersebut antara lain:

a. Delesi 30 pb gen LMP1

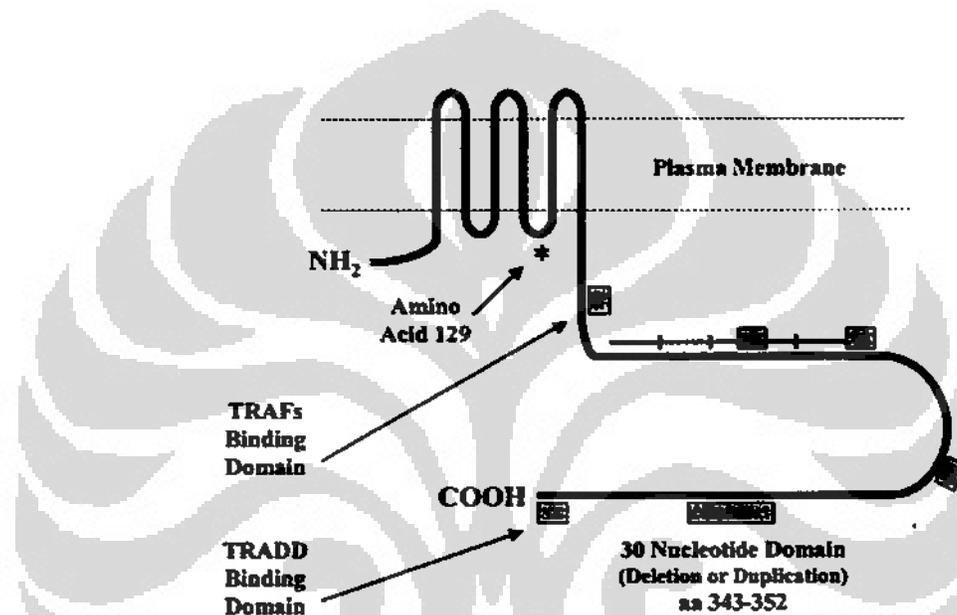
Delesi 30 pb gen LMP1 ini terjadi pada bagian C-terminal.^{9,28} Menurut penelitian yang dilakukan oleh Milller *et al*, delesi 30 pb terjadi diantara kode asam amino 343 dan 352.³⁴

b. *XhoI*-loss

Pada gen LMP1 terdapat bagian yang kehilangan situs *XhoI*, tepatnya pada bagian N-terminal.^{8,10} Perbedaan pada situs restriksi *XhoI* dapat dideteksi dengan metode RFLP. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Zhou *et al*, terjadinya *XhoI*-loss karena adanya mutasi dari G ke T.³⁵

2.4. Delesi 30 pb pada gen LMP1

Gen LMP1 mempunyai peran yang penting bagi EBV, terutama untuk proses transformasi limfosit B dan proses onkogenesis. Adanya varian gen ini diduga akan berpengaruh pada peran tersebut. Salah satu varian dari gen LMP1 adalah delesi 30 pb pada bagian C-terminal. Region C-terminal ini dianggap penting dalam proses onkogenesis.⁶ Delesi 30 pb terjadi diantara asam amino 343 dan 352.³⁴ Daerah yang mengalami delesi dapat dilihat pada gambar 2.7.



Gambar 2.7. Letak delesi 30 pb gen LMP1 pada C-terminal.³⁶

Pada strain B95.8 yang merupakan strain prototype EBV, delesi terjadi pada urutan basa 5'-acc gcc gcc atg gcc gga atc atg act atg-3'.³³ Delesi ini terletak pada daerah TES2/CTAR2 yang akan berikatan dengan TRADD. Region TES2 pada LMP1 dapat mengaktivasi NFκB dan meregulasi ekspresi gen NFκB yang berperan sebagai faktor transkripsi dalam regulasi pertumbuhan sel dan apoptosis.^{5,25} Melihat peran bagian gen LMP1 yang mengalami delesi, maka memperkuat dugaan bahwa delesi 30 pb gen LMP1 akan berpengaruh pada proses perkembangan tumor.

Dari beberapa studi epidemiologi, delesi 30 pb gen LMP1 dapat ditemukan pada beberapa populasi yang terinfeksi EBV. Penelitian yang dilakukan oleh Khanim *et al* (1996), memperlihatkan adanya delesi 30 pb gen LMP1 pada penderita karsinoma nasofaring. Dengan metode PCR dan menggunakan primer

spesifik, delesi terdeteksi pada pita DNA yang berukuran 230 pb, sedangkan bila tidak terjadi delesi maka pita DNA akan berukuran 260 pb. Penelitian Khanim *et al.* ini dilakukan pada beberapa populasi yang berbeda. Secara umum, delesi 30 pb gen LMP1 dijumpai pada populasi Cina. Namun demikian, delesi juga dapat dijumpai pada populasi Eropa penderita karsinoma nasofaring, meskipun frekuensinya lebih rendah dibandingkan populasi Cina.⁹

Delesi 30 pb gen LMP1 tidak hanya terjadi pada EBV yang berasosiasi dengan KNF. Hasil penelitian Barozzi *et al.*, menemukan 10 dari 39 (25,6%) penderita limfoma dan 4 dari 13 (30%) penderita *benign lymphadenopathies (follicular hyperplasia)* terdeteksi mengalami delesi 30 pb pada gen LMP1.³⁷ Sementara itu, penelitian yang dilakukan oleh Zhou *et al.*, menunjukkan bahwa sekitar 83% penderita Hodgkin pada populasi Cina juga mengalami delesi 30 pb pada gen LMP1.³⁵

Tidak semua varian delesi 30 pb gen LMP1 dapat dijumpai pada populasi yang terinfeksi EBV. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Hahn *et al.* pada populasi Rusia penderita KNF, tidak ditemukan delesi 30 pb gen LMP1.¹¹ Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, maka sampai saat ini tidak ada batas distribusi yang jelas mengenai pola sebaran varian delesi 30 pb gen LMP1.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel penderita KNF dilakukan di Departemen THT dan Radioterapi RSCM Jakarta, sedangkan identifikasi gen dilakukan di Laboratorium Departemen Biologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penelitian dilakukan selama 1 (satu) tahun.

3.2. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif analitik, yang bertujuan untuk mengidentifikasi dan menghitung frekuensi delesi 30 pb gen LMP1 virus Epstein-Barr pada penderita KNF di Indonesia, serta mengetahui hubungan antara delesi 30 pb dengan status patologi KNF.

3.3. Sampel dan Jumlah sampel

Sampel penelitian adalah plasma darah penderita KNF. Subyek penelitian tidak ditentukan oleh batasan usia dan jenis kelamin. Seluruh subyek penelitian terlebih dahulu telah memberikan *informed consent* sebelum diikutsertakan dalam penelitian ini. Contoh surat *informed consent* dapat dilihat pada lembar lampiran 2 dan lampiran 3. Diagnosis KNF ditegakkan oleh para dokter di Departemen Telinga Hidung dan Tenggorokan (THT) RSCM/FKUI Jakarta berdasarkan pemeriksaan histopatologi.

Penelitian ini menggunakan sampel tunggal dan belum pernah ada publikasi sebelumnya di Indonesia, sehingga untuk jumlah sampel dihitung berdasarkan perhitungan jumlah sampel studi prevalensi atau *single proportion* dengan rumus sebagai berikut:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 pq}{d^2} = \frac{4pq}{d^2}$$

dengan: $\alpha = 5\%$ (*level of significance 95%*)

$p = 0,5$ (perkiraan proporsi kejadian delesi 30 pb gen LMP1)

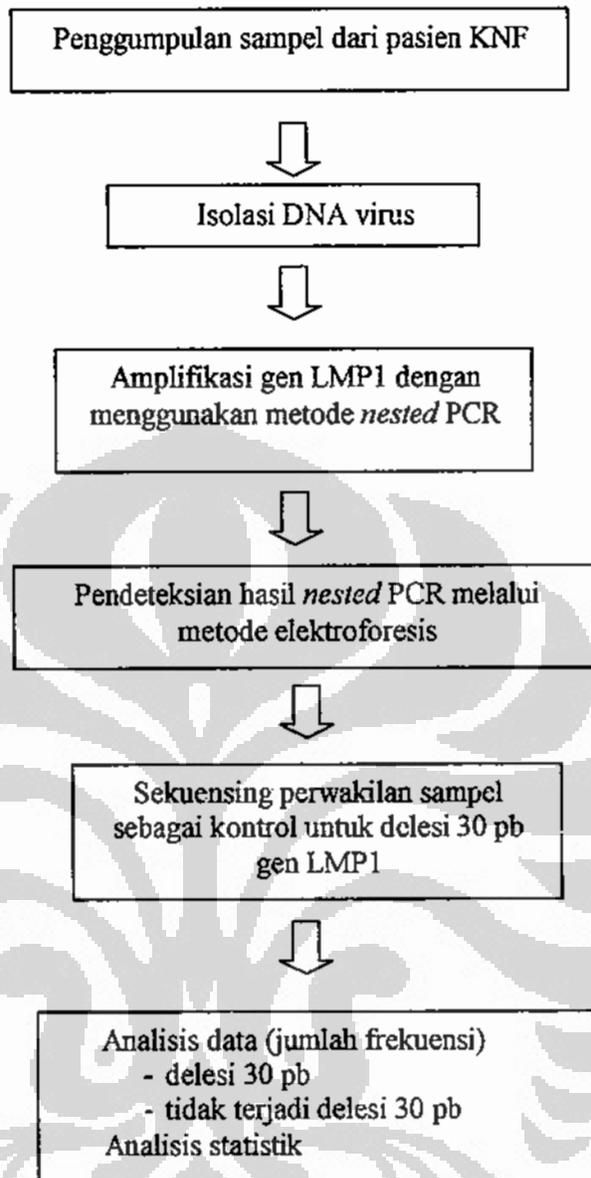
$q = 1 - p$

$$d = + 15\% = 0,15 \text{ (ketelitian dari nilai } p)$$

Hasil perhitungan yang didapat adalah 42,68.

3.4. Alur penelitian

Pada penelitian ini, adapun dalam proses pelaksanaannya dibagi dalam beberapa tahap (Gambar 3.1). Tahap pertama adalah pengumpulan sampel dari penderita KNF. Tahap kedua adalah isolasi DNA virus dari plasma darah sampel tersebut. Tahap ketiga adalah amplifikasi DNA gen LMP1. Proses amplifikasi dilakukan dengan metode *nested* PCR, dengan menggunakan 2 primer yang spesifik. Tahap keempat adalah deteksi hasil *nested* PCR melalui metode elektroforesis yang kemudian divisualisasi dan difotografi. Tahap kelima adalah sekuensing DNA hasil *nested* PCR. Sekuensing dilakukan pada perwakilan sampel yang mengalami delesi 30 pb dan yang tidak mengalami delesi 30 pb. Sampel yang telah disekuensing akan menjadi marka untuk setiap proses elektroforesis selanjutnya. Tahap keenam adalah menghitung frekuensi terjadinya delesi 30 pb gen LMP1 pada penderita KNF.



Gambar 3.1. Bagan alur penelitian

3.5. Cara Kerja

3.5.1. Pengambilan sampel darah pasien KNF

Plasma darah diperoleh dari darah perifer penderita KNF. Darah perifer pasien KNF diambil dari vena kubiti sebanyak 3 ml yang ditampung dengan vaktainer yang telah diberi antikoagulan. Darah perifer disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 10 menit, kemudian supernatan dipisahkan dan

dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang telah dilabel dan disimpan pada suhu -20°C sampai prosedur selanjutnya.

3.5.2. Isolasi DNA virus dari plasma darah

Sebanyak 100 μl plasma dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml dan ditambahkan 350 μl TE, 30 μl SDS 10%, dan 1 μl Proteinase K, kemudian divortex selama 1 menit dan dilanjutkan dengan inkubasi di dalam *waterbath* dengan suhu 65°C selama kurang lebih 1 jam. Setelah diinkubasi, kemudian ditambahkan 200 μl Phenol dan 200 μl C-IAA (*Cloroform-Iso Amyl Alcohol*), lalu divortex kembali selama 3 menit dan disentrifugasi pada suhu 20°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Dalam tabung eppendorf yang telah disentrifugasi akan terbentuk *aquous layer* (bagian atas) yang berwarna jernih. *Aquous layer* kemudian diambil dengan pipet dan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru, ke dalam tabung tersebut ditambahkan 100 μl Phenol dan 300 μl C-IAA, lalu divortex kembali selama 3 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada suhu 20°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Langkah ini diulang sebanyak 2-3 kali. Setelah pengulangan ke-3, sebanyak 200-300 μl *aquous layer* dipindahkan ke dalam eppendorf baru, kemudian ditambahkan 30 (1/10) μl Na-asetat pH 4,2 dan 1 ml etanol absolut (100%) dingin, lalu diinkubasi pada suhu -20°C selama semalam.

Setelah diinkubasi, tabung eppendorf yang berisi sampel dilanjutkan dengan sentrifugasi pada suhu 20°C dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Sentrifugasi dilakukan sebanyak 2 kali, tetapi diberi waktu sela antara sentrifugasi pertama dan kedua. Setelah disentrifugasi, pada tabung eppendorf akan terlihat pellet berwarna putih, kemudian supernatan dibuang dengan sangat hati-hati (pellet jangan sampai terbang), lalu dilanjutkan dengan menambahkan 500 μl Etanol 70% dingin dan disentrifugasi kembali pada suhu 20°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan perlahan, kemudian dikering anginkan selama 30 menit. Selama dikering anginkan, tabung eppendorf diiciungkupkan dengan posisi kurang lebih 45° . Setelah kering, ke dalam tabung eppendorf ditambahkan 20 μl larutan TE, lalu disimpan pada suhu 4°C untuk dilanjutkan ke tahap berikutnya.

3.5.3. Desain primer spesifik gen LMP1

Amplifikasi gen LMP1 dilakukan dengan menggunakan metode *nested* PCR. Dengan *nested* PCR proses amplifikasi dilakukan sebanyak dua kali menggunakan dua primer spesifik yang berbeda. Sebelum dilakukan amplifikasi gen, maka terlebih dahulu didesain primer yang akan digunakan untuk *nested* PCR. Primer didesain dengan mengacu pada sekuen LMP1 yang diakses pada GeneBank di NCBI (Gambar 3.2).³⁸

```

gene      complement(join(167702..168507,168584..168670,
               168749..169016))
          /gene="LMP1"
CDS       complement(join(167702..168507,168584..168670,
               168749..169016))
          /gene="LMP1"
          /function="latent membrane protein"
          /codon_start=1
          /protein_id="CAD53472.1"
          /db_xref="GI:23893668"
          /db_xref="GOA:Q777A4"
          /db_xref="InterPro:IPR007961"
          /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:Q777A4"

167581 agacagtgtg gctaagggag tgtgtgccag ttaaggtgat tagctaaggc attcccagta
167641 aatggagggga gagtcagtca ggcaagccta tgacatggta atgcctagaa gtaaagaaa
167701 gttagtcata gtagcttagc tgaactgggc cgtgggggtc gtcacatcat ccaccggaac
167761 cagaagaacc caaaagcagc gtaggaaggt gtggatcacc gccgccatgg ccggaatcat
167821 gactatgacc gccgcctccg tctgtcatca aaggcgggcc ctggtcacct cctttgtttt
167881 caacctcttc cgtcaattgt ggagggcctc catcatttcc agcagagtgc ctagggctat
167941 gaggcagcgg gtcagtgtgg ccattgtcat cagtgttgtc agggctcctgt gggccattgt
168001 catcagtgtt gtcagggtcc tgaggcagcg ggtcatgtgc gccattgtca tcagtgttgt
168061 cagggctcctg tgggccattg tcatcagtgt tgtcagggtc ctgtgggcca ttgtcaggac
168121 cacctccagg tgcgcctagg ttttgagagc agagtggggg tccgtcgcgg gctccactca
168181 cgagcaggtg gtgtctgccc tcgttggagt tagagtcaga ttcattggca gaatcatcgg
168241 tagcttgttg aggtgcccgg agggagtcat cgtggtggtg ttcacactg tgctgttgtc
168301 catggtaata catccagatt aaaatcgcca gaaacaggag gagccaaagg agatcaacca
168361 atagagtcca ccagttttgt ttagataga gagcaataat gagcaggatg aggtctagga
168421 agaaggctag gaagaaggcc aaaagctgcc agatggtggc accaagtcgc cagagcatct
168481 ccaataagta gatccagata cctaagactg cgttgaaaaa agagtgttag ggttgaaaa
168541 gtgggggtgt ggtaaataat tcctagggaa tgttagatct taccaagtaa gcaccggaag
168601 atgaacagca caattccaag gaacaatgcc tgtccgtgca aattccagag agcgatgagc
168661 aggaggtgta ctggggaaaag aggagaaagt gcgttagaga aggaagagta agggaaaagg
168721 ggtgtggggc aaaggggtgta atacttactc atcagttaga gtatacaaaag ggctccaagt
168781 ggacagagaa ggtctcttct gaagataaaag atgatcaaaa ttataattat aagcatgaga
168841 gcaaaggaat agaggacaag gagggtcctc ccagtccagt cactcataac gatgtacagc
168901 caaaacagta gcgccaagag gaggagaagg agagcaaggc ctagggaaga ggagaggggg
168961 ggtcctcgag ggggccgtcg cgggcccggt gggcccctct caaggctcgt ttccatcctc
169021 agggcagtgt gtcaggagca aggcagtga gaaagaagg gggcagagca gtgtgagagg
169081 cttatgtagg gcggctacgt cagaagtaac cgtgtttctt gggatgtagg cccggggggg

```

Gambar 3.2. Sekuen gen LMP1 virus Epstein-Barr (dari GenBank dengan ID akses [AJ507799](#))

Tabel 3.1. Kondisi optimal untuk *nested* PCR gen LMP1 virus Epstein-Barr.

Nested PCR	Kondisi PCR			Produk (pb)
	Denaturasi	Annealing	Ekstensi	
PCR pertama (primer <i>outer</i>) 5'- gac atg gta atg cct aga ag -3' 5'- gcg act ctg ctg gaa atg at -3'	94 ^o C, 30''	55 ^o C, 90''	70 ^o C, 120''	260
PCR kedua (primer <i>inner</i>) 5'- gtc atc atc tcc acc gga ac -3' 5'- cca caa ttg acg gaa gag gtt -3'	94 ^o C, 30''	59 ^o C, 90''	70 ^o C, 120''	162

Volume setiap pereaksi PCR adalah 25 μ l, yang terdiri atas 10 μ l DNA virus Epstein-Barr, 2,5 μ l buffer 10x MgCl₂-free, 2,5 μ l MgCl₂ (25 mM), 0,5 μ l dNTP (10 mM), 0,5 μ l *forward* primer, 0,5 μ l *reverse* primer, 0,125 μ l *Tag DNA polimerase*, dan 8,375 μ l ddH₂O. Pencampuran larutan pereaksi PCR dilakukan pada suhu rendah, selanjutnya eppendorf disentrifugasi selama beberapa detik untuk menghomogenkan dan menurunkan pereaksi yang menempel di dinding eppendorf, kemudian ditambahkan 1 tetes mineral oil pada setiap larutan pereaksi PCR. Pemberian *mineral oil* berguna untuk menghindari penguapan yang mungkin terjadi ketika berada di dalam mesin PCR. Larutan pereaksi PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR, kemudian mesin PCR diprogram sesuai dengan kondisi PCR yang optimal untuk PCR pertama. Tahap denaturasi dilakukan pada suhu 94^oC selama 30 detik. Tahap *annealing* primer dilakukan pada suhu 55^oC selama 90 detik. Tahap ekstensi dilakukan pada suhu 70^oC selama 120 detik. Ketiga tahap ini diulangi sampai 30 siklus.

Produk PCR pertama digunakan sebagai DNA cetakan untuk PCR kedua. Volume setiap pereaksi PCR sama dengan PCR pertama, hanya berbeda pada primer yang digunakan. Mesin PCR diprogram sesuai kondisi PCR yang optimal untuk PCR kedua. Tahap denaturasi dilakukan pada suhu 94^oC selama 30 detik, tahap *annealing* primer dilakukan pada suhu 59^oC selama 90 detik, sedangkan tahap ekstensi dilakukan pada suhu 70^oC selama 120 detik. Ketiga tahap ini diulangi sampai 30 siklus.

3.5.5. Deteksi hasil amplifikasi gen LMP1

Deteksi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis produk PCR. Sebelum proses elektroforesis, maka dilakukan persiapan dengan membuat gel agarosa 2%. Sebanyak 1 gram agarosa dilarutkan ke dalam 50 ml larutan buffer TAE 1x, lalu dipanaskan sampai mendidih, kemudian ditambahkan 0,2 µl etidium bromida dan diaduk sampai merata. Gel agarosa 2% dibuat dalam suatu wadah pencetak dan dituangkan ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir cetakan. Gel agarosa kemudian didinginkan sampai mengeras, selama kurang lebih 1 jam. Setelah mengeras, sisir pencetak diangkat sehingga membentuk sumur-sumur tempat memasukkan sampel. Gel agarosa yang telah mengeras kemudian dimasukkan ke dalam bak elektroforesis yang telah diisi larutan dapar TAE 1x sebagai larutan elektrolit.

Produk PCR yang akan dideteksi kemudian disiapkan, sebanyak 2 µl *tracking dye* dan 10 µl produk PCR dicampur sampai rata, kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing sumur cetakan. Marker *DNA ladder* tiap 100 pb digunakan sebagai marka. Sebanyak 2 µl DNA marker 100 pb dicampur dengan 2 µl *tracking dye* dan 3 µl ddH₂O. Mesin elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* dan diset pada tegangan 90 volt selama 55 menit, dengan arah pergerakan dari kutub negatif ke kutub positif. Setelah elektroforesis selesai dijalankan, gel diangkat dan diamati pada UV *transiluminator*, maka akan terlihat pita DNA hasil PCR gen LMP1. Gen LMP1 yang tidak mengalami delesi diperlihatkan oleh pita berukuran 162 pb, sedangkan gen LMP1 yang mengalami delesi diperlihatkan oleh pita berukuran 132 pb. Hasil elektroforesis kemudian difoto dengan Film Polaroid 667 ISO 3000 8,5 x 10,8 cm *Black and White Instant Pack Film* menggunakan kamera Polaroid.

3.5.6. Sekuensing gen LMP1

Setelah dielektroforesis dan muncul pita dengan ukuran yang sesuai dengan primer, kemudian dilakukan sekuensing DNA. Sampel yang disekuensing hanya perwakilan dari masing-masing pita DNA yang memiliki ukuran 162 pb dan 132 pb pada saat dideteksi dengan elektroforesis. Sampel tersebut kemudian akan menjadi marka untuk setiap proses elektroforesis yang dilakukan. Proses sekuensing DNA ini dilakukan oleh Lembaga Biologi Molekuler Eijkman.

Sebelum dilakukan sekuensing, produk PCR dipurifikasi terlebih dulu. Selanjutnya dilakukan sekuensing DNA dengan menggunakan mesin ABI 3130 XI Genetic Analyzer. Tujuan dari sekuensing ini adalah untuk konfirmasi ketepatan urutan nukleotida hasil amplifikasi gen pada gen LMP1 yang mengalami delesi dengan yang tidak mengalami delesi.

Hasil sekuensing kemudian dibaca ulang (*manual sequence editing*) dengan menggunakan program FinchTV v.1.4.0, sehingga dapat terbaca lebih baik. Hasil sekuensing kemudian dicocokkan dengan urutan nukleotida pada data GeneBank di NCBI.

3.5.7. Analisis gen LMP1

Analisis gen LMP1 dilakukan dengan menghitung frekuensi terjadinya delesi 30 pb gen LMP1. Delesi dapat dilihat dari hasil elektroforesis berupa pita DNA spesifik dengan ukuran 132 pb pada gel agarosa yang telah divisualisasikan dengan etidium bromida di bawah UV *transiluminator*.

Untuk menganalisis hubungan antara delesi 30 pb dengan status patologi KNF, maka digunakan uji statistik Chi-square (Tabel 2 x 2). Bila data yang diperoleh tidak memenuhi syarat untuk uji Chi-square, maka dilanjutkan dengan uji Fisher's Exact. Hasil dinyatakan bermakna bila $p < 0,05$, yang berarti hipotesis diterima.³⁹

BAB 4

HASIL PENELITIAN

Identifikasi delesi 30 pb gen LMP1 virus Epstein-Barr pada penderita karsinoma nasofaring dilakukan dengan menggunakan metode *nested* PCR. Hasil *nested* PCR dapat dilihat dengan metode elektroforesis, dimana akan menghasilkan pita yang spesifik dengan ukuran 162 pb untuk gen LMP1 yang tidak mengalami delesi dan 132 pb untuk gen LMP1 yang mengalami delesi 30 pb.

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah sampel, maka 43 sampel dinyatakan sudah cukup. Namun selama penelitian berlangsung, telah dikumpulkan 100 pasien penderita KNF dari Departemen THT dan Radioterapi RSCM Jakarta. Pasien terdiri dari 64 lelaki dan 36 perempuan. Data lengkap seluruh pasien KNF dapat dilihat pada Lampiran 4. Setelah plasma darah diperoleh, maka dilakukan isolasi DNA virus. Hasil isolasi DNA virus tidak dapat dideteksi dengan elektroforesis, karena konsentrasinya sangat rendah.

Hasil isolasi DNA virus kemudian diamplifikasi dengan *nested* PCR menggunakan 2 primer yang spesifik, yaitu primer *outer* dan primer *inner*. Dengan primer *outer*, akan diperoleh pita DNA yang spesifik yaitu 260 pb untuk gen LMP1 yang tidak mengalami delesi dan 230 pb untuk gen LMP1 yang mengalami delesi 30 pb. Berdasarkan hasil PCR pertama dengan menggunakan primer *outer*, ternyata tidak semua sampel menunjukkan hasil berupa pita yang spesifik. Bahkan ada sampel yang tidak menunjukkan adanya pita DNA. Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis pada 43 sampel, hanya 4 sampel yang menunjukkan pita spesifik pada PCR pertama ini. Gambaran pita spesifik sebagai hasil elektroforesis DNA EBV dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Pada gambar 4.1, terlihat bahwa hanya pada sampel nomor 17 saja yang menunjukkan adanya pita spesifik 260 pb, sedangkan pada sampel nomor 1 dan 2 sama sekali tidak terlihat adanya pita DNA. Kontrol negatif adalah kontrol terhadap pelaksanaan reaksi PCR, yang digunakan sebagai kontrol negatif adalah ddH₂O.

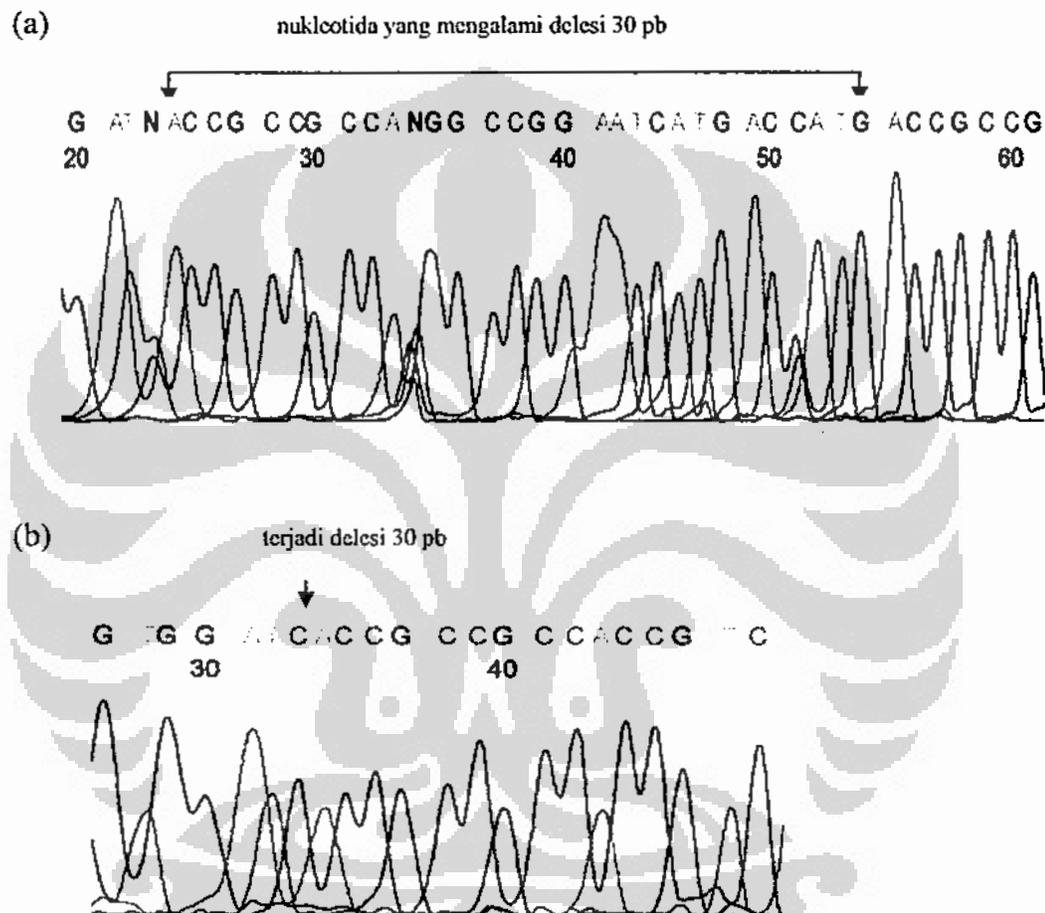
Produk PCR pertama kemudian digunakan sebagai DNA *template* untuk PCR kedua. Dikarenakan hasil PCR pertama yang secara umum tidak memperlihatkan pita DNA yang spesifik, maka semua sampel digunakan tanpa melihat apakah pada hasil PCR pertama terlihat pita DNA yang spesifik. Pada PCR kedua dengan menggunakan primer *inner*, semua sampel dapat memperlihatkan adanya pita DNA spesifik sebagai hasil amplifikasi. Pita spesifik dengan ukuran 162 pb untuk yang tidak mengalami delesi dan 132 pb untuk yang mengalami delesi 30 pb gen LMP1.



Gambar 4.1. Gambaran elektroforesis hasil PCR pertama dengan menggunakan primer *outer*. Keterangan: kolom 1: DNA *ladder* tiap 100 pb; kolom 2: kontrol negatif; kolom 3-5: sampel dengan no.1, 2, dan 17.

Sebagai kontrol pada setiap proses elektroforesis, maka dilakukan sekuensing pada sampel nomor 25 dan 34. Hal ini bertujuan untuk memastikan ukuran sampel dan mengidentifikasi daerah yang mengalami delesi. Namun demikian, sekuensing DNA yang dilakukan oleh Lembaga Biologi Molekuler Eijkman menunjukkan hasil bahwa kedua sampel tersebut tidak dapat disekuensing dengan baik. Hasil sekuensing kedua sampel dapat dilihat pada lembar Lampiran 6 dan 7. Hasil sekuensing kemudian dibaca ulang dengan menggunakan program

FinchTV v.1.4.0, sehingga dapat terbaca lebih baik (Gambar 4.2). Berdasarkan hasil sekuensing pada sampel nomor 25, daerah yang akan mengalami delesi terdapat pada urutan nukleotida mulai dari nukleotida ke-24 sampai ke-54. Sedangkan pada sampel nomor 34, urutan nukleotida yang mengalami delesi tidak terbaca.

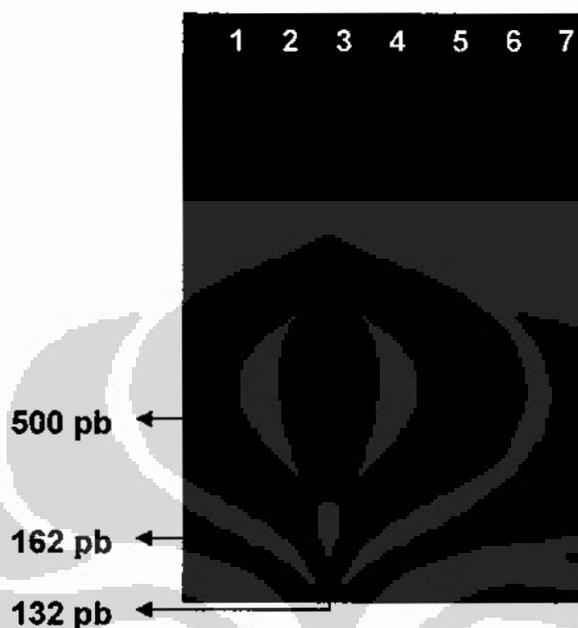


Gambar 4.2. Hasil sekuensing DNA. (a). Hasil sekuensing DNA sampel no. 25 dengan daerah gen LMP1 yang tidak mengalami delesi 30 pb. Delesi terjadi pada nukleotida ke-24 sampai nukleotida ke-54. (b). Hasil sekuensing DNA sampel no. 34 dengan daerah gen LMP1 yang mengalami delesi 30 pb (antara nukleotida ke-33 dan ke-34).

Lebih lanjut, maka setiap kali elektroforesis maka sampel nomor 25 dan 34 diikutsertakan sebagai kontrol. Hasil *nested* PCR dapat dilihat pada gambar 4.3.

Pada gambar 4.3, terlihat bahwa hanya sampel nomor 24 yang mengalami delesi 30 pb, sedangkan sampel nomor 23 dan 29 tidak mengalami delesi 30 pb pada gen LMP1. Pada kolom 4 dimana terdapat kontrol negatif terlihat ada pita

DNA, pita ini kemungkinan merupakan primer yang digunakan pada kontrol negatif tersebut.



Gambar 4.3. Gambaran elektroforesis hasil PCR kedua dengan menggunakan primer *inner*. Keterangan : kolom 1: DNA ladder tiap 100 pb; kolom 2: sampel no.25 sebagai kontrol untuk 162 pb; kolom 3: sampel no.34 sebagai kontrol untuk 132 pb; kolom 4: kontrol negatif; kolom 5-7: sampel no. 23, 24, dan 29.

Dengan menggunakan *nested* PCR, maka semua sampel penderita KNF yang terkumpul dapat diidentifikasi. Hasil penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil *nested* PCR pada penderita KNF

Identifikasi gen LMP1	Jumlah
132 pb	8
162 pb	71
132 pb & 162 pb	21
Total	100

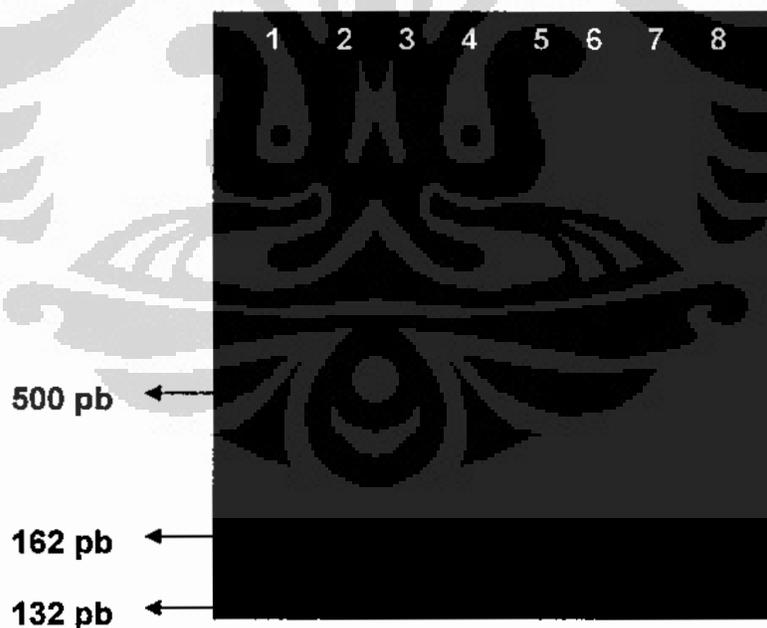
Berdasarkan hasil *nested* PCR yang diperoleh dari 100 sampel penderita KNF, maka ada 29 sampel yang menunjukkan pita spesifik yang berada pada ukuran 132 pb. Dengan demikian, berarti hanya 24% yang mengalami delesi 30 pb gen LMP1. Sementara itu, pita spesifik 162 pb diperoleh pada 92 sampel

plasma darah penderita KNF, yaitu 76%. Sementara itu, bila hasil *nested* PCR tersebut dihubungkan dengan tingkat stadium pasien KNF, maka secara lengkap hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Hasil *nested* PCR terkait dengan tingkat stadium pasien KNF

Identifikasi gen LMP1	Jumlah Pasien	
	Stadium awal	Stadium lanjut
132 pb	1	5
162 pb	9	55
132 pb & 162 pb	3	15

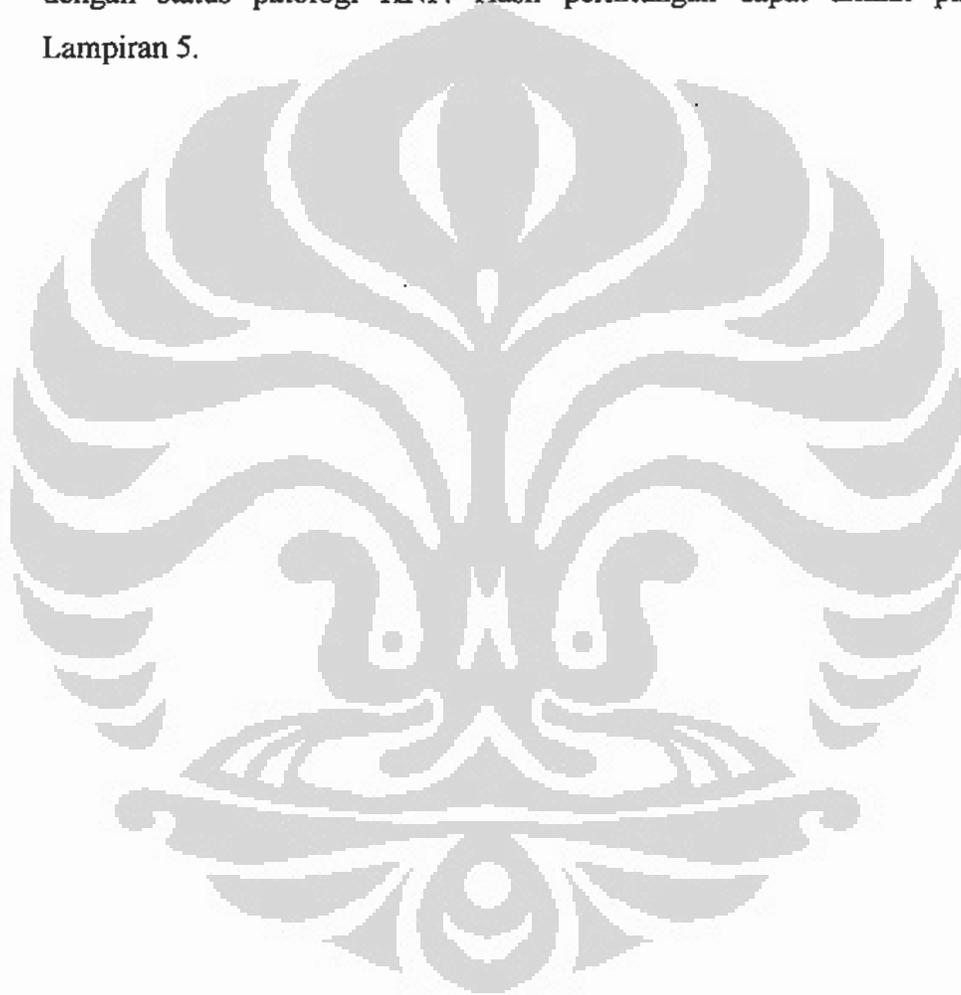
Ada yang menarik pada hasil penelitian ini. Pada penelitian ini diperoleh hasil dimana ada dua pita DNA spesifik yang terdapat pada satu sampel. Dari seluruh sampel plasma darah penderita KNF yang diidentifikasi, ada 21 sampel yang menunjukkan 2 pita spesifik. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Gambaran elektroforesis hasil *nested* PCR dengan 2 pita spesifik.
Keterangan : kolom 1: DNA ladder tiap 100 pb; kolom 2: sampel no.34 sebagai kontrol untuk 132 pb; kolom 3: sampel no.25 sebagai kontrol untuk 162 pb; kolom 4: kontrol negatif; kolom 5-8: sampel no. 57, 58, 59, dan 60.

Berdasarkan data seluruh sampel, ada 12 sampel yang tidak lengkap data status patologinya, maka hanya 88 sampel yang dapat diuji statistik terkait dengan status patologi. Uji Chi-square (Tabel 2 x 2) yang dilakukan ternyata tidak terpenuhi. Sesuai prosedur maka dilanjut dengan uji

Dengan uji Fisher's Exact nilai p yang diperoleh adalah 0,745. Hasil ini menunjukkan bahwa hipotesis tidak bermakna (tidak diterima), karena nilai $p > 0,05$, berarti tidak ada hubungan bermakna antara delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lembar Lampiran 5.



BAB 5 PEMBAHASAN

Karsinoma nasofaring merupakan penyakit multifaktorial. Salah satu faktor penyebab KNF adalah infeksi virus Epstein-Barr.¹ Hal ini dapat dipastikan karena pada serum atau plasma penderita KNF selalu dapat ditemukan DNA EBV.^{2,18} EBV akan mengekspresikan beberapa gen laten, seperti EBERs, EBNA1, LMP1, LMP2A, dan LMP2B.³ Diantara gen-gen laten tersebut, gen LMP1 berperan penting dalam proses transformasi limfosit B oleh EBV. Selain itu, LMP1 juga diyakini turut berperan dalam proses onkogenesis. Protein LMP1 dapat melindungi sel yang terinfeksi dari apoptosis dan meningkatkan proliferasi sel.^{4,25,31}

Berdasarkan studi epidemiologi KNF, terutama mengenai gen LMP1, ternyata ada salah satu varian yang khas dari gen LMP1, yaitu delesi 30 pb di bagian C-terminal. Region C-terminal dianggap berpengaruh terhadap proses onkogenesis.⁵ Delesi 30 pb gen LMP1 secara umum dapat dijumpai pada penyakit yang berasosiasi dengan infeksi EBV, seperti limfoma Hodgkin, limfoma Burkitt, dan mononukleosis infeksius.⁹

Pada penelitian ini, delesi 30 pb gen LMP1 dapat dideteksi menggunakan metode *nested* PCR. PCR pertama dengan menggunakan primer *outer*, ternyata tidak semua reaksi menunjukkan pita spesifik, hanya 4 dari 43 sampel yang menghasilkan pita spesifik 260 pb. Hal ini mungkin dapat terjadi karena konsentrasi DNA virus yang rendah, sehingga tidak tampak pada saat divisualisasikan dengan elektroforesis. Namun pada PCR kedua dengan menggunakan primer *inner*, semua sampel memperlihatkan pita DNA yang spesifik.

Hasil penelitian ini menunjukkan 24% penderita KNF mengalami delesi 30 pb gen LMP1. Hasil ini tentu jauh lebih rendah dibandingkan negara-negara Asia lainnya dimana insiden KNF termasuk dalam urutan tertinggi. Rendahnya angka terjadinya delesi 30 pb pada penelitian ini belum dapat dijelaskan dengan pasti.

Namun hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh See *et al* di Malaysia, sebanyak 24,1% (7 dari 29 sampel) plasma darah penderita KNF mengalami delesi 30 pb.⁶ Bila dilihat dari tingkat insiden terjadinya KNF, maka Malaysia termasuk negara yang memiliki prevalensi yang cukup tinggi. Menurut hasil penelitian Devi *et al*, kasus KNF di Sarawak-Malaysia memiliki prevalensi 13,5 per 100.000 penduduk.¹⁷

Menurut beberapa penelitian, terjadinya delesi 30 pb gen LMP1 identik dengan kasus KNF di Asia.⁴⁰ Pada daerah endemik KNF, yaitu Cina Selatan dan Taiwan, angka terjadinya delesi 30 pb dapat mencapai 70% atau bahkan sampai lebih dari 90%.⁶

Delesi 30 pb gen LMP1 terjadi pada bagian C-terminal dan terletak diantara asam amino 343 dan 352.³⁴ Bila dilihat struktur protein LMP1, maka delesi terletak pada bagian TES2/CTAR2. CTAR2 akan berikatan dengan TRADD/TRAF2 dan memperantarai 66% aktivitas NFκB. Aktivitas NFκB yang melalui LMP1 akan mengatur ekspresi beberapa gen lain yang terkait dengan proses biologi dan peran LMP1 sebagai tumorigenesis dalam kasus KNF.⁴¹

Pada penderita KNF, LMP1 memulai sinyal *cascade* melalui kompleks ikatan antara TRADD/TRAF2 dengan CTAR2. LMP1 dapat mengatur ekspresi cyclin D1. LMP1 meningkatkan regulasi transkripsi cyclin D1 melalui jalur sinyal NFκB, hal ini dapat menyebabkan perpindahan siklus sel dari fase G1 ke S berlangsung lebih awal. Peningkatan regulasi transkripsi cyclin D1 dapat menyebabkan penurunan regulasi G1/S *checkpoint*. Hal ini akan mengakibatkan proliferasi sel yang abnormal.⁴¹

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Fries *et al*, ekspresi gen LMP1 pada sel T, sel B, dan sel epitel dapat melindungi sel dari apoptosis jalur p53 dengan cara meningkatkan regulasi Bcl2 dan A20 sebagai gen anti-apoptosis. Pada sel epitel yang terinfeksi EBV, LMP1 akan menginduksi A20 sehingga dapat melindungi sel epitel dari apoptosis jalur p53.³²

Selain karena peningkatan Bcl2 dan A20, apoptosis pada penderita KNF juga dihambat dengan diekspresikannya survivin. Survivin adalah protein inhibitor apoptosis. LMP1 dapat menstimulasi ekspresi survivin melalui NFκB. Pada siklus sel, secara umum survivin diekspresikan selama fase G2/M. Pada sel

epitel penderita KNF, survivin tidak hanya dijumpai pada fase G2/M saja, tetapi juga dapat dilihat pada fase G1 dan S. Ekspresi survivin pada fase G1/S dimodulasi oleh LMP1. Berdasarkan hal tersebut, maka LMP1 turut berperan dalam menghambat apoptosis sel penderita KNF.⁴¹

Menurut beberapa penelitian, adanya delesi 30 pb gen LMP1 akan berperan dalam meningkatkan proses perkembangan tumor. Dua galur LMP1 yang mengalami delesi 30 pb yaitu, CAO dan C1510 dapat meningkatkan tumorigenesis bila dibandingkan galur B95.8. yang merupakan galur *wildtype* EBV.⁴²

Penelitian yang dilakukan oleh Knecht *et al* memperlihatkan bahwa delesi 30 pb berasosiasi dengan tingkat keganasan penyakit.⁴³ Asosiasi ini juga diperlihatkan dari beberapa penelitian yaitu, pada 30% penderita limfoma Hodgkin dan 65% penderita *peripheral T-cell lymphomas* (PTL) di Eropa, serta pada 100% penderita PTL di Malaysia.⁴⁴ Penelitian yang dilakukan oleh Santón *et al* di Spanyol juga menunjukkan hal yang sama. Secara histologi dan klinik, terjadi peningkatan agresivitas tumor pada penderita limfoma Hodgkin yang mengalami delesi 30 pb gen LMP1.⁴⁵

Berdasarkan hasil uji Fisher's Exact, maka diperoleh nilai p adalah 0,745. Hal ini berarti bahwa hipotesis tidak diterima, karena nilai $p > 0,05$. Hasil berupa hipotesis tidak diterima menunjukkan bahwa pada penelitian ini tidak ada hubungan bermakna antara delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF.

Hasil penelitian ini memang berbeda dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa delesi 30 pb gen LMP1 terkait dengan tingkat keganasan tumor. Pada penelitian ini, tidak menunjukkan adanya hubungan antara delesi 30 pb dengan tingkat keganasan KNF yang dilihat dari status patologi pasien. Penelitian yang dilakukan oleh Dolcetti *et al* memperlihatkan hal yang sama, bahwa delesi 30 pb tidak berhubungan dengan faktor risiko perkembangan EBV yang berasosiasi dengan penyakit Hodgkin.⁴⁰ Menurut Hahn *et al*, tidak ada hubungan antara delesi 30 pb dengan tingkat induksi NFκB, sehingga delesi 30 pb tidak menjadi faktor predisposisi untuk kasus KNF di Rusia.¹¹

Di Taiwan, delesi 30 pb merupakan varian virus yang dominan pada penderita KNF, karena pada 446 (82,3%) penderita KNF mengalami delesi 30 pb. Namun demikian, berdasarkan studi kohort retrospektif, secara statistik delesi 30 pb tidak terkait dengan prognosis KNF. Adanya delesi 30 pb gen LMP1 hanya sebuah fenomena polimorfisme pada daerah endemik KNF.⁴⁶ Ada kecenderungan bahwa hasil penelitian ini sama dengan yang terjadi di Taiwan. Delesi 30 pb yang terjadi di Indonesia merupakan fenomena polimorfisme pada gen LMP1.

Bila dilihat dari beberapa studi epidemiologi KNF, maka insiden delesi 30 pb gen LMP1 berbeda pada setiap populasi berdasarkan letak geografisnya. Secara umum, kawasan Asia sebagai wilayah endemik KNF memiliki angka delesi yang tinggi dibandingkan wilayah lainnya. Meskipun menurut data yang diperoleh, di Indonesia, KNF merupakan tumor ganas terbanyak di bidang THT dan merupakan urutan ke-4 terbanyak setelah kanker leher rahim, kanker payudara, dan kanker kulit.⁷ Namun demikian, hasil penelitian ini tidak menunjang pernyataan tersebut. Di Indonesia, khususnya Jakarta, delesi 30 pb pada penderita KNF sangat rendah hanya 24%. Angka delesi 30 pb yang rendah umumnya diperoleh dari wilayah bukan endemik KNF.

Hal yang menarik diperoleh pada hasil penelitian ini, yaitu ditemukannya 2 varian gen LMP1 (132 pb & 162 pb), yang berarti terdapat gen LMP1 yang mengalami delesi dan tidak mengalami delesi 30 pb pada satu individu. Dari 100 sampel, diperoleh 20 sampel penderita KNF yang teridentifikasi dengan dua pita spesifik tersebut. Hal ini dimungkinkan karena telah terjadi lebih dari satu kali infeksi, dimana infeksi dilakukan oleh EBV dengan varian gen LMP1 yang berbeda.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Tan *et al*, menemukan 2 varian gen LMP1 (132 pb & 162 pb) pada sampel biopsi penderita KNF.⁴⁷ Penelitian lain oleh See *et al* juga menemukan *coexistence* 2 varian gen LMP1. See *et al* menggunakan sampel dari biopsi dan plasma darah penderita KNF. Dengan menggunakan sampel plasma darah, diperoleh 5/29 (17,2%) penderita KNF mempunyai *coexistence* 2 varian gen LMP1, sedangkan pada sampel biopsi tidak ditemukan adanya *coexistence* 2 varian gen LMP1. Menurut See *et al*, hasil penelitiannya merupakan kasus pertama dimana *coexistence* 2 varian gen LMP1

diperoleh dari plasma darah, tetapi tidak pada biopsi, karena secara umum varian EBV di plasma darah merupakan gambaran varian EBV dari biopsi tumor KNF.⁶

Untuk menunjang data yang diperoleh, maka dilakukan sekuensing pada perwakilan masing-masing sampel. Sekuensing dilakukan pada sampel nomor 25 dan nomor 34 oleh Lembaga Biologi Molekuler Eijkman. Namun, sampel tersebut ternyata tidak dapat dibaca secara keseluruhan. Hal ini terjadi karena ukuran basa yang disekuensing kurang dari 200 pb. Mesin ABI 3130 XI Genetic Analyzer dapat mensekuensing DNA dengan baik pada ukuran basa lebih dari 300 pb.⁴⁸ Untuk mendapatkan hasil yang maksimal, maka dilakukan pembacaan ulang hasil sekuensing DNA dengan menggunakan program FinchTV.

Pada hasil sekuensing sampel nomor 25, dengan pembacaan ulang dapat dilihat bahwa delesi 30 pb terjadi dengan urutan sebagai berikut: 5'- acc gcc gcc aNg cgg gga atc atg acc atg -3'. Hasil ini sesuai dengan urutan nukleotida LMP1 pada data GeneBank dan data sekuensing DNA delesi 30 pb yang dilakukan oleh Higa *et al* dengan menggunakan galur B95.8.⁴⁹ Pada hasil sekuensing terdapat satu nukleotida yang tidak dapat terbaca yaitu pada nukleotida ke-11. Berdasarkan data GeneBank dan Higa *et al*, maka nukleotida yang tidak terbaca pada urutan ke-11 tersebut adalah t. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Miller, delesi tidak mempengaruhi proses pembacaan asam amino, yaitu pada urutan asam amino 342-352 : Gly-Gly-Gly-His-Ser-His-Asp-Ser-Gly-His.⁵⁰

Sebagai koreksi pada setiap penelitian, maka umumnya disertakan kontrol negatif pada setiap proses yang dilakukan. Kontrol negatif pada penelitian ini dilakukan untuk menilai adanya kontaminasi pada proses penambahan sampel, baik pada saat penambahan sampel pada reaksi PCR pertama maupun reaksi PCR kedua (*nested* PCR). Adapun kelemahan pada penelitian ini dalam hal prosedur amplifikasi, ialah tidak diikutsertakan kontrol negatif pada saat melakukan prosedur ekstraksi DNA virus, sehingga kemungkinan terjadinya kontaminasi pada saat proses ekstraksi belum dapat disingkirkan.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Di Indonesia, khususnya Jakarta, pada penderita KNF ditemukan adanya delesi 30 pb gen LMP1.
2. Dari 100 sampel penderita KNF, diperoleh hasil sebagai berikut: 24% sampel mengalami delesi 30 pb, sedangkan 76% sampel tidak mengalami delesi 30 pb. Pada penelitian ini juga ditemukan adanya *coexistence* varian gen LMP1.
3. Tidak ada hubungan bermakna antara delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF.

6.2. Saran

Saran yang diberikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah:

1. perlunya dilakukan identifikasi varian lain dari gen LMP1, sehingga dapat melihat keterkaitan antara varian gen LMP1 dengan status patologi KNF.
2. meneliti *coexistence* gen LMP1 EBV pada suku Jawa/ Sunda serta hubungannya dengan *staging* KNF.

DAFTAR REFERENSI

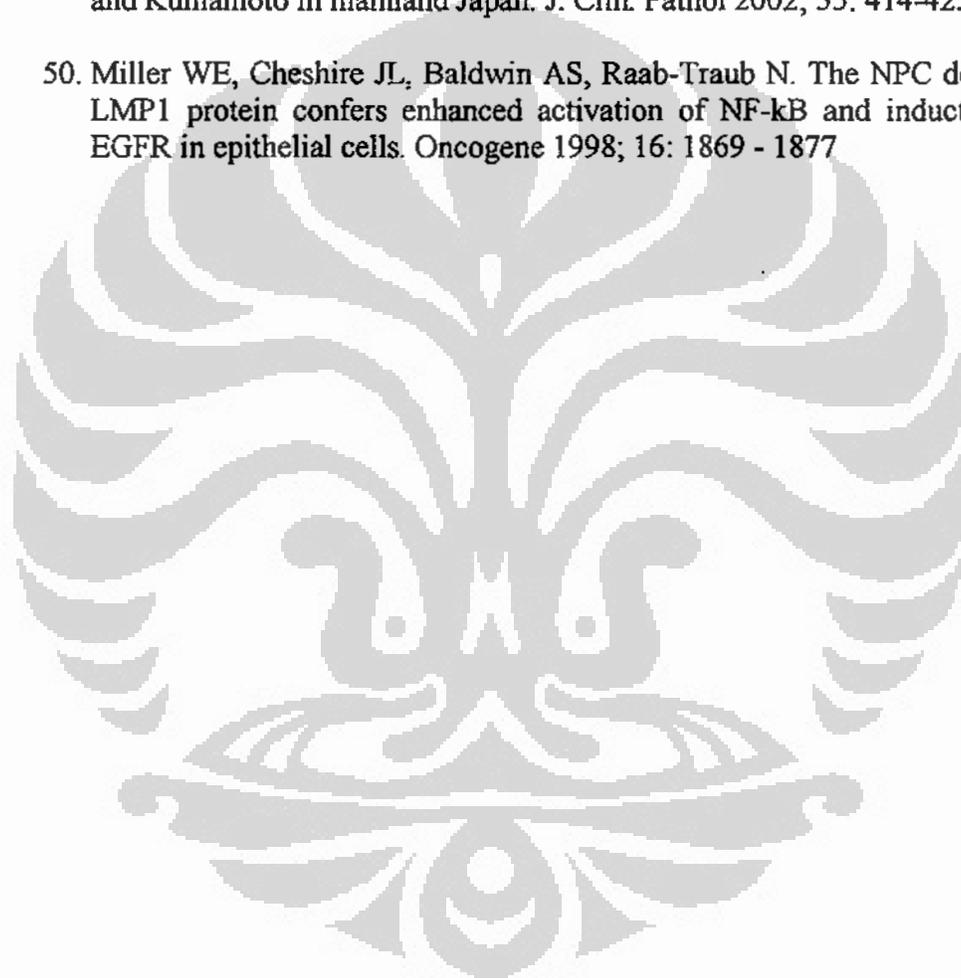
1. Brennan B. Carcinoma Nasopharyngeal. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2006; 1 (23): 1-5.
2. Shotelersuk K, Khorprasert C, Sakdikul S, Pornthanakasem W, Voravud N, *et al.* Epstein-Barr virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 1046-51.
3. Middledrop JM *et al.* Human Hervesvirus 4 (HHV-4)/Epstein-barr virus (EBV). *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 45(1): 1-36.
4. Hirusantit R, Kongruttanachok N, Shotelersuk K, Suphiyapun P, Voravud N, *et al.* Polymeric immunoglobulin receptor polymorphisms and risk of nasopharyngeal cancer. *BMC Genetic* 2003;4:1-9.
5. Rowe DT. Epstein-Barr virus immortalization and latency. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4: 346-71.
6. See HS, Yap YY, Yip WK, Seow HF. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) 30-bp deletion and Xho I-loss is associated with type III nasopharyngeal carcinoma in Malaysia. *World Journal of Surgical Oncology* 2008; 6:18. Available from: <http://www.wjso.com/content/6/1/18>
7. Susworo, R. Kanker Nasofaring: Epidemiologi dan Pengobatan Mutakhir. *Cermin Dunia Kedokteran* 2004; 144: 16-9.
8. Hu LF, Zabarovsky ER, Chen F, Cao SL, Ernberg I, *et al.* Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP-1) from a chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol*, 1991; 72: 2399-409.
9. Khanim F, Yao Y, Neidobitek G, Sihota S, Rickinson AB, *et al.* Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphism in normal donors and in virus-associated tumors from different geografhic location. *Blood*. 1996; 88: 3491-501.
10. Lin SX, Zong YS, Wu QL, Han AJ, Liang YJ. Loss of an Xho1-site within N-terminal region of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Chinese journal of cancer*, 2003; 22(11): 1147-51.
11. Hahn P, Novikova E, Scherback L, Janik C, Pavlish O, *et al.* The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion.[Abstrak] *Int J Cancer*, 2001; 91(6): 815-21.
12. Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER). Nasopharyngeal carcinoma. [serial online] 2006 [cited 2007 Sept 1] Available from: health.yahoo.com/topic/cancer/overview/articl...

13. Fachiroh K, Paramita DK, Hariwiyanto B, Harijadi A, Dahlia L, *et al.* Single-assay combination of Epstein-barr virus (EBV) EBNA-1 and viral capsid antigen-p18-derived synthetic levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patient: options for field screening. *Journal of Clinical microbiology* 2006; 44(4): 1459-67.
14. Chang Yu S, Tyan Yue S, Liu Shih T, Tsai Min S, Pao Chia C. Detection of Epstein-barr virus DNA sequences in nasopharyngeal carcinoma cells by enzymatic DNA amplification. *Journal of Clinical microbiology* 1990; 28(11): 2398-402.
15. Asroel, HA. Penatalaksanaan Radioterapi pada Karsinoma Nasofaring. USU Digital Library. 2002.
16. Chan ATC, Lo YMD, Zee B, Chan LYS, Ma BBY *et al.* Plasma Epstein-Barr Virus DNA and residual disease after radiotherapy for undifferentiated nasopharyngeal carcinoma, *J Natl Cancer Inst* 2000a; 94:1614-1619.
17. Devi, BCR, Pisani P, Tang TS, Parkin DM, High Incidence of Nasopharyngeal Carcinoma in Native People of Sarawak, Borneo Island. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(3): 482-6.
18. Krishna SM, James S, Kattoor J, Balarama P. Serum EBV DNA as a biomarker in Primary nasopharyngeal Carcinoma of Indian Origin. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34(6): 307-11.
19. Feng, Ren EC, Liu D, Chan SH, Hu H. Expression of Epstein-Barr Virus lytic gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma : potential use in diagnosis. *J Gen Virol* 2000; 81:2417-2423.
20. Vaughan TL, Stewart PA, Teschke K, Lynch CF, Swanson GM, *et al.* Occupational exposure to formaldehyde and wood dust and nasopharyngeal carcinoma. *Occup. Environ. Med.* 2000;57;376-84.
21. Hildesheim A, Chen CJ, Caporaso NE, Cheng YJ, Hoover RN, *et al.* Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma: results from a case-control study conducted in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995, 4(6):607-10.
22. Poirier S, Bouvier G, Malaveille C, Ohshima H, Shao YM, *et al.* Volatile nitrosamine levels and genotoxicity of food samples from high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma before and after nitrosation. *Int J Cancer* 1989; 5;44(6):1088-94.
23. Suryohastari RB. Polimorfisme Gen CYP2E1: Hubungannya Dengan Suseptibilitas Individu Terhadap Karsinoma Nasofaring (KNF) Pada Populasi Indonesia. Tesis Program Pasca Sarjana Ilmu Biomedik FK-UI; 2008.

24. Setiawan H. Polimorfisme gen TCR β : Hubungannya dengan suseptibilitas individu terhadap karsinoma nasofaring (KNF) pada beberapa suku/etnis di Indonesia. Tesis Program Pasca Sarjana Ilmu Biomedik FK-UI; 2008.
25. Thomson MP & Kurzrock R. Epstein_barr virus and Cancer. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 803-21.
26. Roizman B & Thayer N. Herpesvirus family: Herpesviridae. [serial online] 2001 [cited 2008 Maret 24] Available from: <http://stdgen.northwestern.edu/stdgen/bacteria/hbv2/herpes>.
27. Sample J, Young L, Martin B, *et al.* Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in the EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol* 1990;64:4084-92.
28. Shu CH, Chang YS, Liang CL, Liu ST, Lin CZ *et al.* Distribution of type A and type B EBV in normal individuals and patients with head and neck carcinoma in Taiwan. *J Virol Method* 1992; 38: 123-30.
29. Bornkamm GW, Behrends U, Mautner J. The infectious kiss: newly infected B cells deliver Epstein-barr virus to epithelial cells. *PNAS* [serial online] 2006 May [Cited 2006 Okt 14] Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0602077103
30. Murray PG, Young LS. The Epstein-barr virus (EBV) genome. *Reviews in Molecular Medicine* [serial online] 2001 Nov [Cited 2006 Okt 10] Available from: <http://www.expertreviews.org/>
31. Kaye KM, Izumi KM, & Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Medical Sciences* 1993;90:9150-4.
32. Fries, K., W. Miller, & N. Raab-Traub: Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* 1996; 70: 8653-9.
33. Hatzivassiliou E, Miller WE, Raab-Traub N, Kieff E, & Mosialos G. A Fusion of the EBV Latent Membrane Protein-1 (LMP1) Transmembrane Domains to the CD40 Cytoplasmic Domain Is Similar to LMP1 in Constitutive Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression, Nuclear Factor-kB, and Stress-Activated Protein Kinase1. *The Journal of Immunology* 1998;1116-21.
34. Miller WE, Edwards RE, Walling DM, Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol* 1994; 75:2729.
35. Zhou, X-Q, Sandvej K, Li P-J, Ji X-L, Yan Q-H, *et al.* Epstein-Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin's disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *Journal of General Virology* 2001; 82: 1157-67.

36. Pandya J, Walling M. Epstein-barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) half-life in epithelial cells is down-regulated by lytic LMP-1. *Journal of Virology* 2004; 8404-10.
37. Barozzi P, Luppi M, Cagossi K, Maiorana A, Marasca R, *et al.* The oncogenic 30 and 69 bp deletion variants of the EBV LMP-1 gene are common in HIV-negative lymphoproliferations, both malignant and benign *Annals of Oncology* 1999;10: 467-9.
38. NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
39. Dahlan, S. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan*. Jakarta: PT ARKANS; 2004.
40. Dolcetti R, Zancai P, Re VD, Gloghini A, Bigoni B, *et al.* Epstein-Barr Virus Galurs With Latent Membrane Protein-1 Deletions: Prevalence in the Italian Population and High Association With Human Immunodeficiency Virus – Related Hodgkin’s Disease. *Blood* 1997; 89(5):1723-31.
41. Zheng H, Li L, Hu D, Deng X, Cao Y. Role of Epstein-Barr Virus Encoded Latent Membrane Protein 1 in the Carcinogenesis of Nasopharyngeal Carcinoma. *The Chinese Society of Immunology* 2007; 4(3): 185-96.
42. Sandvej K, Andresen BS, Zhou X-G, Gregersen N, Hamilton-Dutoit S. Analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP-1) gene and promoter in Hodgkin’s disease isolates: selection against EBV variants with mutations in the LMP-1 promoter ATF-1/CREB-1 binding site. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000; 53:280–8.
43. Knecht H, Bachmann E, Brousset P, Sandvej K, Nadal D, *et al.* Deletion within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin’s disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* 1993; 82(10): 2937-42.
44. Sanvej K, Gratama JW, Munch M, Zhou X-G, Bolhous RLH, *et al.* Sequence analysis of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates. *Blood* 1997; 90(1): 323-30.
45. Santón A, Manzanal AI, Campo E, Bellas C. Deletions in the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene in Hodgkin's disease. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1995; 48: 184-7.
46. Chang KP, Hao SP, Lin SY, Ueng SH, Pai PC, *et al.* The 30-bp deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 gene has no effect in nasopharyngeal carcinoma. [Abstrak] *Laryngoscope*. 2006;116(4): 541-6.

47. Tan EL, Peh SC, Sam CK. Analyses of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in Malaysian nasopharyngeal carcinoma: high prevalence of 30-bp deletion, Xho1 polymorphism and evidence of dual infections. [Abstrak] J Med Virol. 2003; 69(2): 251-7.
48. AB Applied Biosystems. Applied Biosystems 3130 / 3130XI Genetic Analyzer. 2004.
49. Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Iwamasa T, Hamada T, *et al.* Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. J. Clin. Pathol 2002; 55: 414-423.
50. Miller WE, Cheshire JL, Baldwin AS, Raab-Traub N. The NPC derived C15 LMP1 protein confers enhanced activation of NF- κ B and induction of the EGFR in epithelial cells. Oncogene 1998; 16: 1869 - 1877



Lampiran 1. Surat keterangan lolos kajian etik



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN**

Jalan Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat
Pos Box 1358 Jakarta 10430
Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, Fax. : 31930372, e-mail : office@fk.ui.ac.id

No : 88 /PT02.FK/ETIK/2006

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL CLEARANCE**

Penitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Committee of The Medical Research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

"PERUBAHAN EKSISTENSI DNA VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV) DAN EKSPRESINYA UNTUK MEMANTAU EFEKTIVITAS RADIOTERAPI DAN KEMOTERAPI PADA PENDERITA KARSINOMA NASOFARING (KNF) DENGAN MEMPERHATIKAN VARIASI GENETIK YANG MENENTUKAN PROGNOSIS PENYAKIT DAN HASIL TERAPI".

Nama peneliti utama : Drs.PURNOMO SOBHARSO, PhD
Name of the principal investigator

Nama institusi : BIOLOGI FKUI
Name of institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approved the above mentioned proposal.

16 Agustus 2006



Ketua
Chairman

Prof.dr.R.Sjamshidajat

Lampiran 2. Contoh surat *Informed Consent* Dept. Radioterapi RSCM, Jakarta

INFORMED CONSENT

PENJELASAN MENGENAI PENELITIAN PERUBAHAN EKSTENSIF DNA VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV) DAN EKSPRESINYA UNTUK MEMANTAU EFEKTIVITAS RADIOTERAPI DAN KEMOTERAPI PADA PENDERITA KARSINOMA NASOFARING (KNF) DENGAN MEMPERHATIKAN VARIASI GENETIK YANG MENENTUKAN PROGNOSIS PENYAKIT DAN HASIL TERAPI.

Tim peneliti dari Departemen Biologi Kedokteran FKUI Jakarta, sedang melakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui efektivitas radioterapi dan kemoterapi pada penderita karsinoma nasofaring dengan mendeteksi perubahan ekstensi DNA EBV dan ekspresi gen laten maupun gen litik EBV di dalam jaringan (biopsi) tumor, plasma/serum dan sel darah penderita KNF yang belum mendapat adioterapi dan kemoterapi. Deteksi DNA EBV, ekspresi gen laten dan gen litik EBV dilakukan dengan teknik *Nested-PCR* dan *RT-PCR*. Perubahan DNA EBV dan perubahan ekspresi gen tersebut di dalam jaringan tumor, plasma/serum, dan sel darah setelah terapi memberikan peluang penggunaan DNA EBV dan transkripsinya (RNA EBV) sebagai marka/penanda yang sensitif untuk memantau status patologi dan keberhasilan terapi.

EBV mempunyai potensi onkogenik mengubah sel terinfeksi menjadi sel ganas. Pada penderita KNF, DNA EBV selain dapat ditemukan pada jaringan (biopsi) tumor juga dapat dideteksi dalam sirkulasi (plasma/serum) dan sel darah penderita KNF. Radioterapi dan kemoterapi merupakan terapi standar dalam penanganan penderita KNF. Lebih kurang 80% penderita KNF pada stadium awal (stadium I dan II) dapat mencapai remisi sempurna setelah radioterapi. Namun demikian, rekurensi setelah radioterapi dan kemoterapi dihentikan masih merupakan kendala dalam pengobatan KNF.

Penelitian ini bermanfaat sebagai metode yang sensitif untuk memantau status patologi dan terapi KNF dengan memperhatikan dan mempertimbangkan variasi genetik gen PIGR dan TCR-B sebagai faktor predisposisi yang dapat menentukan prognosis penyakit dan hasil terapi KNF pada populasi Indonesia yang sangat heterogen.

Bila anda bersedia ikut dalam penelitian ini, anda diminta untuk menyumbangkan darah sebanyak 3 ml (setengah sendok teh). Darah tersebut akan diperiksa gen/DNA EBV, gen TCR, dan gen PIGR. Pengambilan darah dilakukan oleh perawat atau petugas yang berkompeten di Poliklinik Departemen THT FKUI/RSCM. Anda tidak dibebani biaya dalam pemeriksaan ini dan anda bebas menolak ikut serta dalam penelitian ini tanpa merubah kualitas pelayanan dari tim medis yang akan merawat anda. Semua data akan diperlakukan secara rahasia sehingga tidak mungkin orang lain menghubungkannya dengan anda.

Anda diberi kesempatan untuk menanyakan semua hal yang belum jelas sehubungan dengan penelitian ini. Bila sewaktu-waktu membutuhkan penjelasan, anda dapat menghubungi Drs. Purnomo Soeharso Ph.D di Departemen Biologi Kedokteran FKUI, Jl Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat (021-31930379) atau Prof. Dr. dr. R. Susworo Sp.Rad (K), dr. Irwan Ramli Sp.Rad di Departemen Radioterapi FK-UI/RSCM, Jl. Diponegoro 71 Jakarta Pusat (021-3921155).

(lanjutan)

FORMULIR PERSETUJUAN

Semua penjelasan di atas telah disampaikan kepada saya secara lisan dan tertulis dan semua pertanyaan saya telah dijawab oleh dokter/peneliti. Saya mengerti bahwa, bila masih memerlukan penjelasan, saya akan mendapat jawaban dari Drs. Purnomo Soeharso Ph.D, Prof. Dr. dr. R. Susworo Sp.Rad (K), dr. Irwan Ramli Sp.Rad, atau tim penelitiannya.

Dengan menandatangani formulir ini, saya setuju untuk ikut berpartisipasi dalam penelitian ini.

Jakarta, Tanggal :

Tanda tangan pasien/subjek :

Nama jelas :

Tanda tangan saksi :

Nama jelas :

Lampiran 3. Contoh surat *Informed Consent* Dept. THT, RSCM, Jakarta

INFORMED CONSENT

PENJELASAN MENGENAI PENELITIAN PERUBAHAN EKSISTENSI DNA VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV) DAN EKSPRESINYA UNTUK MEMANTAU EFEKTIVITAS RADIOTERAPI DAN KEMOTERAPI PADA PENDERITA KARSINOMA NASOFARING (KNF) DENGAN MEMPERHATIKAN VARIASI GENETIK YANG MENENTUKAN PROGNOSIS PENYAKIT DAN HASIL TERAPI.

Tim peneliti dari Departemen Biologi Kedokteran FKUI Jakarta, sedang melakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui efektivitas radioterapi dan kemoterapi pada penderita karsinoma nasofaring dengan mendeteksi perubahan eksistensi DNA EBV dan ekspresi gen laten maupun gen litik EBV di dalam jaringan (biopsi) tumor, plasma/serum dan sel darah penderita KNF yang belum mendapat adioterapi dan kemoterapi. Deteksi DNA EBV, ekspresi gen laten dan gen litik EBV dilakukan dengan teknik *Nested-PCR* dan *RT-PCR*. Perubahan DNA EBV dan perubahan ekspresi gen tersebut di dalam jaringan tumor, plasma/serum, dan sel darah setelah terapi memberikan peluang penggunaan DNA EBV dan transkripsinya (RNA EBV) sebagai marka/penanda yang sensitif untuk memantau status patologi dan keberhasilan terapi.

EBV mempunyai potensi onkogenik mengubah sel terinfeksi menjadi sel ganas. Pada penderita KNF, DNA EBV selain dapat ditemukan pada jaringan (biopsi) tumor juga dapat dideteksi dalam sirkulasi (plasma/serum) dan sel darah penderita KNF. Radioterapi dan kemoterapi merupakan terapi standar dalam penanganan penderita KNF. Lebih kurang 80% penderita KNF pada stadium awal (stadium I dan II) dapat mencapai remisi sempurna setelah radioterapi. Namun demikian, rekurensi setelah radioterapi dan kemoterapi dihentikan masih merupakan kendala dalam pengobatan KNF.

Penelitian ini bermanfaat sebagai metode yang sensitif untuk memantau status patologi dan terapi KNF dengan memperhatikan dan mempertimbangkan variasi genetik gen PIGR dan TCR-B sebagai faktor predisposisi yang dapat menentukan prognosis penyakit dan hasil terapi KNF pada populasi Indonesia yang sangat heterogen.

Bila anda bersedia ikut dalam penelitian ini, anda diminta untuk menyumbangkan darah sebanyak 3 ml (setengah sendok teh). Darah tersebut akan diperiksa gen/DNA EBV, gen TCR, dan gen PIGR. Pengambilan darah dilakukan oleh perawat atau petugas yang berkompeten di Poliklinik Departemen THT FKUI/RSCM. Anda tidak dibebani biaya dalam pemeriksaan ini dan anda bebas menolak ikut serta dalam penelitian ini tanpa merubah kualitas pelayanan dari tim medis yang akan merawat anda. Semua data akan diperlakukan secara rahasia sehingga tidak mungkin orang lain menghubungkannya dengan anda.

Anda diberi kesempatan untuk menanyakan semua hal yang belum jelas sehubungan dengan penelitian ini. Bila sewaktu-waktu membutuhkan penjelasan, anda dapat menghubungi Drs. Purnomo Soeharso Ph.D di Departemen Biologi Kedokteran FKUI, Jl Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat (021-31930379) atau dr. Armiyanto Sp.THT-KL (K) di Departemen THT FK-UI/RSCM, Jl. Diponegoro 71 Jakarta Pusat (021-31935088).

(lanjutan)

FORMULIR PERSETUJUAN

Semua penjelasan di atas telah disampaikan kepada saya secara lisan dan tertulis dan semua pertanyaan saya telah dijawab oleh dokter/peneliti. Saya mengerti bahwa, bila masih memerlukan penjelasan, saya akan mendapat jawaban dari Drs. Purnomo Soeharso Ph.D, dr. Armiyanto Sp.THT-KL (K), atau tim peneliti.

Dengan menandatangani formulir ini, saya setuju untuk ikut berpartisipasi dalam penelitian ini.

Jakarta, Tanggal :

Tanda tangan pasien/subjek :

Nama jelas :

Tanda tangan saksi :

Nama jelas :

Lampiran 4. Data pasien KNF

Data pasien KNF dan hasil identifikasi delesi 30 pb gen LMP1

NO. SAMPEL	GENDER	UMUR (THN)	STADIUM	HASIL PCR	
				162 pb	132 pb
001	L	39	2	+	-
002	L	56	2	+	-
003	P	56	2	+	-
004	P	37	2	+	-
005	L	46	-	+	-
006	P	47	2	+	-
007	L	46	2	+	-
008	P	51	2	+	-
009	L	15	1	+	-
010	L	33	2	+	-
011	P	57	2	+	-
012	L	52	2	+	+
013	P	22	2	+	-
014	L	58	2	+	-
015	P	35	2	+	-
016	P	48	2	+	-
017	P	36	2	+	-
018	L	44	2	+	-
019	L	42	2	+	-
020	L	30	2	+	-
021	P	18	1	-	+
022	L	31	2	+	-
023	L	40	2	+	-
024	P	17	2	-	+
025	L	42	2	+	-
026	L	22	2	+	-
027	P	40	2	+	-
028	L	33	2	+	-
029	L	29	2	+	-
030	L	49	2	+	-
031	L	40	2	+	-
032	L	55	2	+	-
033	L	35	2	+	-
034	P	45	2	-	+
035	L	53	2	+	-
036	L	52	1	+	-
037	L	52	2	+	-
038	L	69	1	+	-
039	L	21	-	+	-
040	L	55	1	+	-
041	L	40	2	+	-
042	L	46	2	+	-
043	L	37	1	+	-
044	P	56	2	+	-
045	L	44	1	+	-

(lanjutan)

Data pasien KNF dan hasil identifikasi delesi 30 pb gen LMP1

NO. SAMPEL	GENDER	UMUR (THN)	STADIUM	HASIL PCR	
				162 pb	132 pb
046	P	43	2	+	-
047	P	27	1	+	-
048	L	16	-	+	-
049	L	16	2	+	-
050	L	45	2	+	-
051	L	37	2	+	-
052	P	48	2	+	-
053	P	41	2	+	-
054	P	45	2	+	-
055	P	-	-	+	-
056	L	-	2	+	-
057	L	43	2	+	-
058	L	44	2	+	-
059	L	64	2	+	+
060	L	33	2	+	+
061	L	46	2	+	-
062	L	26	2	+	-
063	P	29	2	+	+
064	L	37	2	+	-
065	P	59	1	+	-
066	L	46	Prostaging	+	+
067	L	38	Residif	+	-
068	P	60	2	+	+
069	L	44	1	+	+
070	P	37	2	+	-
071	L	29	2	+	+
072	P	20	2	-	+
073	L	-	2	+	+
074	L	28	2	-	+
075	P	47	2	+	+
076	P	50	1	+	+
077	L	29	2	+	-
078	L	15	2	+	-
079	P	25	2	+	-
080	L	52	2	+	-
081	L	37	2	+	-
082	L	59	Residif	-	+
083	P	30	1	+	-
084	P	54	2	+	+
085	L	37	Prostaging	+	+
086	P	47	2	+	+
087	L	38	2	+	-
088	L	55	Prostaging	+	-
089	L	59	2	+	+
090	L	45	2	+	+

(lanjutan)

Data pasien KNF dan hasil identifikasi delesi 30 pb gen LMP1

NO. SAMPEL	GENDER	UMUR (THN)	STADIUM	HASIL PCR	
				162 pb	132 pb
091	P	39	2	+	+
092	L	56	2	+	+
093	L	55	2	+	-
094	P	48	1	+	+
095	L	44	2	+	-
096	L	55	2	-	+
097	P	50	Pascakemo	-	+
098	L	46	2	+	+
099	P	50	Residif	+	+
100	P	27	Prostaging	+	-

Keterangan :

Gender :

L : Laki-laki

P : Perempuan

Stadium :

1: stadium awal (stadium I dan II)

2: stadium lanjut (stadium III dan IV)

Hasil PCR :

+ : ada pita pada hasil PCR dengan ukuran yang sesuai

- : tidak ada pita pada hasil PCR pada ukuran yang sesuai

Lampiran 5. Analisis statistik

Analisis statistik hubungan antara delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF.

a. Tabel kesimpulan data pasien KNF

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
PCR * STADIUM	88	88,0%	12	12,0%	100	100,0%

b. Tabel hasil PCR terkait stadium pasien KNF

			STADIUM		Total
			stadium awal	stadium lanjut	
GEN_LMP1	132 pb; 132 pb & 162 pb	Count	4	20	24
		Expected Count	3.5	20.5	24.0
	162 pb	Count	9	55	64
		Expected Count	9.5	54.5	64.0
Total		Count	13	75	88
		Expected Count	13.0	75.0	88.0

- Pada hasil sel, masih terdapat sel yang nilai *expected* kurang dari 5.
- Berdasarkan hasil tersebut, maka syarat uji Chi-square tidak terpenuhi, kemudian dilanjutkan dengan uji Fisher's Exact.

c. Tabel Uji Exact Fisher's

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.094 ^b	1	.759	.745	.497
Continuity Correction ^a	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.092	1	.762		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	.093	1	.760		
N of Valid Cases	88				

- Dengan uji Fisher's Exact, diperoleh nilai p adalah 0,745.
- $P > 0,05$, hipotesis tidak diterima, berarti tidak ada hubungan bermakna antara delesi 30 pb dengan status patologi KNF.

DRAF ARTIKEL

Delesi 30 pb Gen Laten Membran Protein-1 (LMP1) Virus Epstein-Barr (EBV) pada Penderita Karsinoma Nasofaring (KNF) di Indonesia

Dwi Anita Suryandari^{*}, Purnomo Soeharso^{*}, Sri Murni Asih^{**}, Yumadi^{*}

^{*}Departemen Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

^{**}Peserta Progtam Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Abstrak: Virus Epstein-Barr (EBV) merupakan virus dsDNA dan termasuk dalam famili Herpesviridae. Infeksi EBV dapat berasosiasi dengan beberapa penyakit seperti karsinoma nasofaring (KNF). Pada penderita KNF, gen EBV yang diekspresikan adalah gen laten, yaitu EBERs, EBNA1, LMP1, LMP2A, dan LMP2B. Dari kesemua gen tersebut, LMP1 dianggap yang berperan penting dalam proses onkogenesis dan transformasi limfosit B oleh EBV. Dari beberapa studi epidemiologi, ditemukan adanya varian khusus pada gen LMP1 berupa delesi 30 pb pada bagian C-terminal. Di Indonesia, hingga saat ini belum diketahui apakah ditemukan delesi 30 pb gen LMP1 pada penderita KNF dan bila ditemukan, apakah delesi tersebut berhubungan dengan patogenesis KNF. Tujuan: Mengetahui apakah ditemukan delesi 30 pb gen LMP1 EBV pada penderita KNF di Indonesia, dan bila ditemukan berapa frekuensi delesi 30 pb gen LMP1 EBV pada penderita KNF di Indonesia, serta mengetahui hubungan antara delesi tersebut dengan status patologi KNF. Metode: Identifikasi delesi 30 pb gen LMP1 virus Epstein-Barr dilakukan dengan metode *nested* PCR dan hasil PCR divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 2%. Hasil amplifikasi berupa pita DNA berukuran 162 pb untuk gen LMP1 yang tidak mengalami delesi 30 pb, sedangkan pita DNA berukuran 132 pb untuk gen LMP1 yang mengalami delesi 30 pb. Hasil: Dari 100 sampel penderita KNF yang diidentifikasi, 29 sampel mengalami delesi 30 pb, 71 sampel tidak mengalami delesi 30 pb, dan 21 sampel mengalami *coexistence* varian. Kesimpulan: Di Jakarta, varian EBV berupa delesi 30 pb gen LMP1 ditemukan dalam frekuensi yang rendah (24%) bila dibandingkan varian yang tidak mengalami delesi 30 pb (76%). Pada penelitian ini juga ditemukan adanya *coexistence* varian gen LMP1. Berdasarkan uji Fisher's Exact, didapat bahwa nilai $p > 0,05$, berarti tidak ada hubungan bermakna antara delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF.

Kata kunci: Delesi 30 pb, EBV, LMP1, Karsinoma nasofaring.

PENDAHULUAN

Virus Epstein-Barr (EBV) merupakan virus dsDNA, memiliki kapsid icosohedral, dan termasuk dalam famili Herpesviridae. Infeksi EBV dapat berasosiasi dengan beberapa penyakit seperti limfoma Burkitt, limfoma sel T, mononucleosis infeksiosa, dan karsinoma nasofaring (KNF). KNF merupakan tumor ganas yang terjadi pada sel epitel di daerah nasofaring, yaitu pada daerah cekungan Rosenmuelleri dan tempat bermuara saluran eustachii. Banyak faktor yang diduga berhubungan dengan KNF, yaitu (1) adanya infeksi EBV, (2) faktor lingkungan termasuk kebiasaan hidup, dan (3) kerentanan genetik (ras mongoloid).¹ Dari beberapa penelitian ditemukan bahwa KNF konsisten dengan infeksi EBV. Penelitian Shotelersuk *et al* (2000)² menunjukkan bahwa DNA EBV dalam plasma dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis KNF.

Pada penderita KNF, gen EBV yang diekspresikan adalah gen laten, yaitu EBERs, EBNA1, LMP1, LMP2A, dan LMP2B. Protein EBNA1 berperan dalam mempertahankan DNA virus pada infeksi laten. Sementara itu, untuk transformasi EBV

yang berperan adalah protein LMP1. Protein transmembran LMP2A dan LMP2B menghambat sinyal tyrosine kinase, yang dipercaya dapat menghambat siklus litik virus. Dari kesemua gen tersebut, maka gen yang berperan penting dalam transformasi sel adalah gen LMP1.³

Struktur protein LMP1 terdiri dari 386 asam amino, yang terbagi menjadi 20 asam amino pada N terminal, 6 segmen protein transmembran (166 asam amino) dan 200 asam amino pada karboksi (C) terminal.⁴ Protein transmembran LMP1 menjadi perantara untuk sinyal TNF (*tumor necrosis factor*) dan meningkatkan regulasi sitokin IL-10 yang memproliferasi sel B dan menghambat respon imun lokal.³

Beberapa studi epidemiologi telah melaporkan tingginya prevalensi KNF yang disebabkan infeksi EBV di Asia. Di Cina bagian selatan tepatnya di propinsi Guang-dong, kasus KNF menduduki tempat tertinggi, yaitu 2.500 kasus baru per tahun atau dengan prevalensi 39.84/100.000 penduduk, sedangkan prevalensi di Asia tenggara dilaporkan 3/100.000 pada populasi Thailand asli dan 10/100.000 pada populasi Thailand yang telah berasimilasi dengan etnis Cina. Di Malaysia, insiden KNF menempati urutan kedua terbanyak. Frekuensi yang tinggi dijumpai pada penduduk Malaysia keturunan etnis Cina. Angka kejadiannya 18.1/100.000 penduduk pada pria dan 7.4/100.000 penduduk pada wanita.⁵ Angka tersebut jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan yang terjadi di negara Eropa atau Amerika Utara dengan prevalensi 1 per 100.000 penduduk per tahun.^{1,6,7}

Berdasarkan studi epidemiologi KNF dan hubungannya dengan infeksi EBV, ditemukan adanya varian khusus pada gen LMP1, yaitu berupa adanya delesi 30 pb pada bagian C terminal gen LMP1. Secara umum, delesi 30 pb gen LMP1 dapat dijumpai pada penyakit yang berasosiasi dengan infeksi EBV. Delesi 30 pb gen LMP1 ditemukan pada populasi Cina penderita KNF, seperti yang telah dilaporkan oleh Hu *et al* (1991)⁸, Khanim *et al* (1996)⁹, dan Lin *et al* (2003).¹⁰ Delesi 30 pb gen LMP1 juga ditemukan pada populasi Eropa penderita KNF,⁹ tetapi tidak ditemukan pada populasi Rusia penderita KNF.¹¹ Hingga saat ini belum diketahui apakah delesi 30 pb gen LMP1 berpengaruh pada patogenitas EBV pada KNF.

Karsinoma nasofaring di Indonesia merupakan kasus keganasan terbanyak di bidang THT. Penyakit ini menempati urutan keempat setelah karsinoma servix, mammae dan kulit. Angka kejadiannya sekitar 4.7 kasus baru per 100.000 penduduk per tahun dan lebih banyak dijumpai pada pria dibandingkan wanita dengan perbandingan 2-3 pria dibandingkan 1 wanita.⁵ Hingga saat ini belum ada publikasi penelitian yang lengkap mengenai varian genetik EBV, khususnya delesi 30 pb gen LMP1 yang mungkin berasosiasi dengan patogenesis dan keganasan KNF di Indonesia.

Dengan demikian, tujuan penelitian ini adalah: (1) mengetahui apakah delesi 30 pb gen LMP1 EBV pada penderita KNF dapat ditemukan di Indonesia, (2) mengetahui frekuensi delesi 30 pb gen LMP1 EBV pada penderita KNF di Indonesia, dan (3) mengetahui hubungan delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF.

METODE PENELITIAN

1. Sampel

Sampel penelitian adalah plasma darah penderita KNF. Subyek penelitian tidak ditentukan oleh batasan usia dan jenis kelamin. Seluruh subyek penelitian terlebih dahulu telah memberikan *informed consent* sebelum diikutsertakan dalam penelitian ini. Contoh surat *informed consent* dapat dilihat pada lembar lampiran 2. Diagnosis KNF ditegakkan berdasarkan pemeriksaan histopatologi yang telah dilakukan oleh para dokter di Bagian Telinga Hidung dan Tenggorokan (THT) RSCM/FKUI Jakarta.

2. Isolasi DNA virus

Sebanyak 100 µl plasma dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml dan ditambahkan 350 µl TE, 30 µl SDS 10%, dan 1 µl Proteinase K, kemudian divortex

selama 1 menit dan dilanjutkan dengan inkubasi di dalam *waterbath* dengan suhu 65° C selama kurang lebih 1 jam. Setelah diinkubasi, kemudian ditambahkan 200 µl Phenol dan 200 µl C-IAA (*Cloroform-Iso Amyl Alcohol*), lalu divortex kembali selama 3 menit dan disentrifugasi pada suhu 20° C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Dalam tabung eppendorf yang telah disentrifugasi akan terbentuk *aqueous layer* (bagian atas) yang berwarna jernih. *Aqueous layer* kemudian diambil dengan pipet dan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru, ke dalam tabung tersebut ditambahkan 100 µl Phenol dan 300 µl C-IAA, lalu divortex kembali selama 3 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada suhu 20° C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Setelah sentrifugasi, dalam tabung eppendorf akan terbentuk *aqueous layer*, kemudian langkah tersebut diulangi dengan mengambil *aqueous layer* dan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru, lalu ditambahkan 100 µl Phenol dan 300 µl C-IAA, divortex kembali selama 3 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada suhu 20° C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Langkah ini diulang sebanyak 2-3 kali. Setelah pengulangan ke-3, sebanyak 200-300 µl *aqueous layer* dipindahkan ke dalam eppendorf baru, kemudian ditambahkan 30 µl Na-asetat pH 4,2 dan 1 ml Etanol absolute (100%) dingin, lalu diinkubasi pada suhu -20° C selama semalam.

Setelah diinkubasi, tabung eppendorf yang berisi sampel dilanjutkan dengan disentrifugasi pada suhu 20° C dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Sentrifugasi dilakukan sebanyak 2 kali, tetapi diberi waktu sela antara sentrifugasi pertama dan kedua. Setelah disentrifugasi, pada tabung eppendorf akan terlihat pellet berwarna putih, kemudian supernatan dibuang dengan sangat hati-hati (pellet jangan sampai terbuang), lalu dilanjutkan dengan menambahkan 500 µl Etanol 70% dingin dan disentrifugasi kembali pada suhu 20° C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan perlahan, kemudian dikering anginkan selama 30 menit. Selama dikering anginkan, tabung eppendorf ditelungkupkan dengan posisi kurang lebih 45°. Setelah kering, ke dalam tabung eppendorf ditambahkan 20 µl larutan TE, lalu disimpan pada suhu 4° C untuk dilanjutkan ke tahap berikutnya.

3. Amplifikasi DNA gen LMP1

Amplifikasi gen LMP1 dilakukan dengan menggunakan metode *nested* PCR. Untuk PCR yang pertama, primer *outer* yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Khanim *et al* di tahun 1996, yaitu 5'- gac atg gta atg cct aga ag -3' untuk *forward* dan 5'- gcg act ctg ctg gaa atg at -3' untuk *reverse* primer. Primer yang kedua (primer *inner*) didesain dengan menggunakan software Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>) yaitu, 5'- gtc atc atc tcc acc gga ac -3' untuk *forward* dan 5'- cca caa ttg acg gaa gag gtt -3' untuk *reverse* primer. Adapun kondisi optimal yang digunakan untuk PCR dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kondisi *nested* PCR gen LMP1

<i>Nested</i> PCR	Kondisi PCR			Produk (pb)
	Denaturasi	Annealing	Ekstensi	
PCR pertama (primer <i>outer</i>) 5'- gac atg gta atg cct aga ag -3' 5'- gcg act ctg ctg gaa atg at -3'	94°C, 30''	55°C, 90''	70°C, 120''	260
PCR kedua (primer <i>inner</i>) 5'- gtc atc atc tcc acc gga ac -3' 5'- cca caa ttg acg gaa gag gtt -3'	94°C, 30''	59°C, 90''	70°C, 120''	162

Deteksi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 2% pada tegangan 90 volt selama 55 menit. Gen LMP1 yang tidak mengalami delesi diperlihatkan oleh pita berukuran 162 pb, sedangkan gen LMP1 yang mengalami delesi diperlihatkan oleh pita berukuran 132 pb.

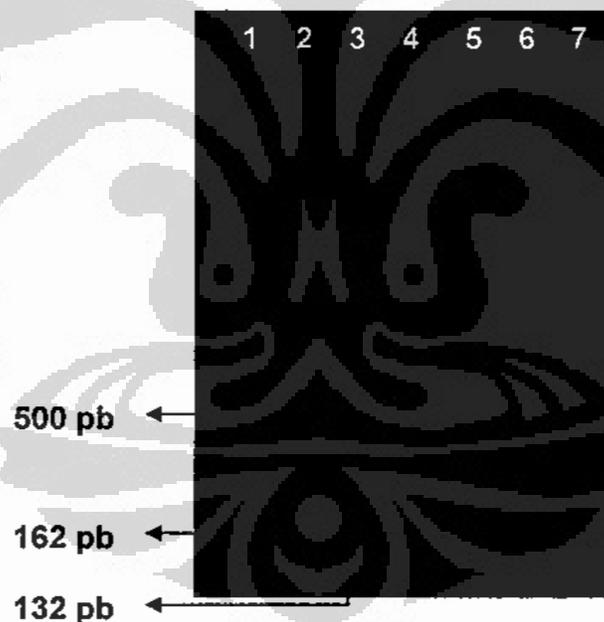
Setelah dielektroforesis dan muncul pita dengan ukuran yang sesuai dengan primer, kemudian dilakukan sekuensing DNA. Sampel yang disekuensing hanya perwakilan dari masing-masing pita DNA yang memiliki ukuran 162 pb dan 132 pb pada saat dideteksi dengan elektroforesis. Sampel tersebut kemudian akan menjadi marka untuk setiap proses elektroforesis yang dilakukan.

4. Analisis gen LMP1

Untuk menganalisis hubungan antara delesi 30 pb dengan status patologi KNF, maka digunakan uji statistik Chi-square (Tabel 2 x k). Bila data yang diperoleh tidak memenuhi syarat untuk uji Chi-square, maka dilanjut dengan uji Fisher's Exact. Hasil dinyatakan bermakna bila $p < 0,05$, yang berarti hipotesis diterima.¹²

HASIL PENELITIAN

Dengan menggunakan *nested* PCR, maka semua sampel penderita KNF yang terkumpul dapat diidentifikasi. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada gambar 1, sedangkan hasil penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Gambaran elektroforesis hasil PCR kedua dengan menggunakan primer *inner*. Keterangan : kolom 1: DNA ladder tiap 100 pb; kolom 2: sampel no.25 sebagai kontrol untuk 162 pb; kolom 3: sampel no.34 sebagai kontrol untuk 132 pb; kolom 4: kontrol negatif; kolom 5-7: sampel no. 23, 24, dan 29.

Tabel 2. Hasil *nested* PCR pada penderita KNF

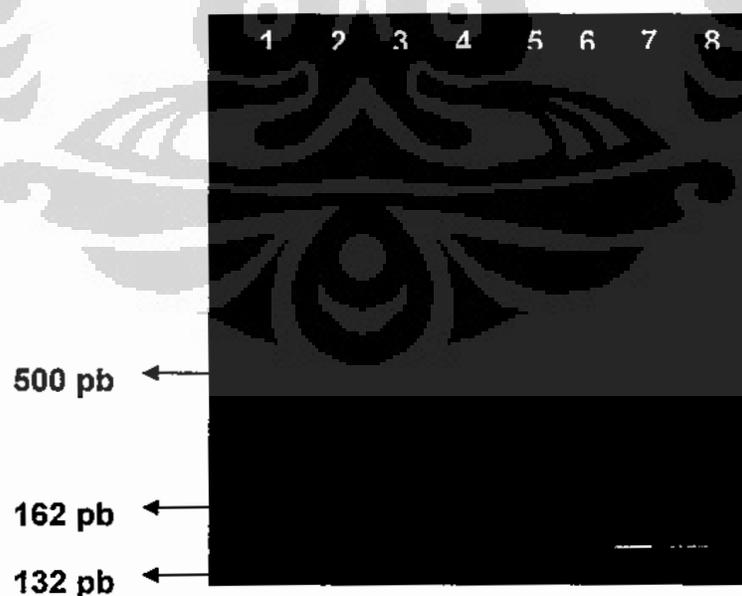
Identifikasi gen LMP1	Jumlah
132 pb	8
162 pb	71
132 pb & 162 pb	21
Total	100

Berdasarkan hasil *nested* PCR yang diperoleh dari 100 sampel penderita KNF, maka ada 29 sampel yang menunjukkan pita spesifik yang berada pada ukuran 132 pb. Dengan demikian, berarti hanya 24% yang mengalami delesi 30 pb gen LMP1. Sementara itu, pita spesifik 162 pb diperoleh pada 92 sampel plasma darah penderita KNF, yaitu 76%. Sementara itu, bila hasil *nested* PCR tersebut dihubungkan dengan tingkat stadium pasien KNF, maka secara lengkap hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil *nested* PCR terkait dengan tingkat stadium pasien KNF

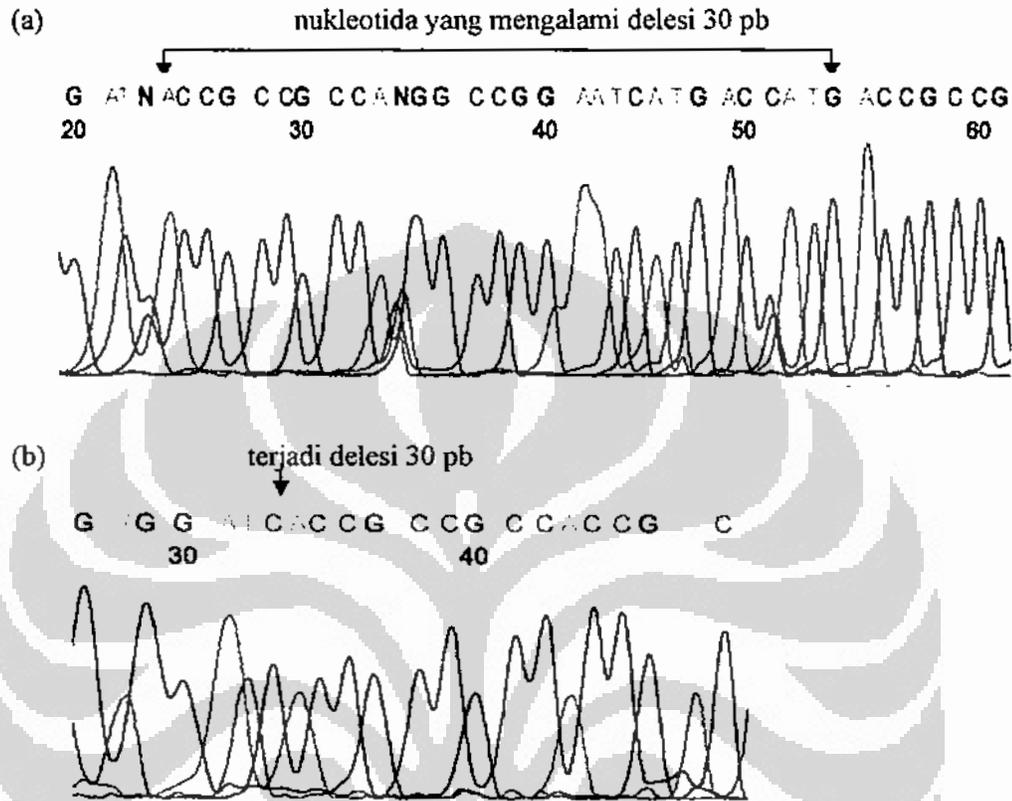
Identifikasi gen LMP1	Jumlah Pasien	
	Stadium awal	Stadium lanjut
132 pb	1	5
162 pb	9	55
132 pb & 162 pb	3	15

Ada yang menarik pada hasil penelitian ini. Pada penelitian ini diperoleh hasil dimana ada dua pita DNA spesifik yang terdapat pada satu sampel. Dari seluruh sampel plasma darah penderita KNF yang diidentifikasi, ada 21 sampel yang menunjukkan 2 pita spesifik. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2. Gambaran elektroforesis hasil *nested* PCR dengan 2 pita spesifik.

Keterangan : kolom 1: DNA ladder tiap 100 pb; kolom 2: sampel no.34 sebagai kontrol untuk 132 pb; kolom 3: sampel no.25 sebagai kontrol untuk 162 pb; kolom 4: kontrol negatif; kolom 5-8: sampel no. 57, 58, 59, dan 60.

Hasil sekuensing pada sampel no. 25 dan no. 34 yang digunakan sebagai kontrol dapat dilihat pada gambar. Daerah yang akan mengalami delesi terdapat pada urutan nukleotida mulai dari nukleotida ke-24 sampai ke-54. Sedangkan pada sampel no. 34, urutan nukleotida yang mengalami delesi tidak terbaca.



Gambar 3. Hasil sekuensing DNA.

(a). Hasil sekuensing DNA sampel no. 25 dengan daerah gen LMP1 yang tidak mengalami delesi 30 pb. Delesi terjadi pada nukleotida ke-24 sampai nukleotida ke-54.
 (b). Hasil sekuensing DNA sampel no. 34 dengan daerah gen LMP1 yang mengalami delesi 30 pb (antara nukleotida ke-33 dan ke-34).

Berdasarkan data seluruh sampel, ada 12 sampel yang tidak lengkap data status patologinya, maka hanya 88 sampel yang dapat diuji statistik terkait dengan status patologi. Uji Chi-square (Tabel 2 x 2) yang dilakukan ternyata tidak terpenuhi. Sesuai prosedur maka dilanjut dengan uji Fisher's Exact.

Dengan uji Fisher's Exact nilai p yang diperoleh adalah 0,745. Hasil ini menunjukkan bahwa hipotesis tidak bermakna (tidak diterima), karena nilai $p > 0,05$, berarti tidak ada hubungan bermakna antara delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan 24% penderita KNF mengalami delesi 30 pb gen LMP1. Hasil ini tentu jauh lebih rendah dibandingkan negara-negara Asia lainnya dimana insiden KNF termasuk dalam urutan tertinggi. Rendahnya angka terjadinya delesi 30 pb pada penelitian ini belum dapat dijelaskan dengan pasti. Namun hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh See *et al* (2008) di Malaysia,

sebanyak 24,1% (7 dari 29 sampel) plasma darah penderita KNF mengalami delesi 30 pb.⁵

Penelitian yang dilakukan oleh Knecht *et al* (1993) memperlihatkan bahwa delesi 30 pb berasosiasi dengan tingkat keganasan penyakit.¹³ Asosiasi ini juga diperlihatkan dari beberapa penelitian yaitu, pada 30% penderita limfoma Hodgkin dan 65% penderita periphera T-cell lymphomas (PTL) di Eropa, serta pada 100% penderita PTL di Malaysia.¹⁴ Penelitian yang dilakukan oleh Santón *et al* (1995) di Spanyol juga menunjukkan hal yang sama. Secara histologi dan klinik, terjadi peningkatan agresifitas tumor pada penderita limfoma Hodgkin yang mengalami delesi 30 pb gen LMP1.¹⁵

Pada penelitian ini, delesi 30 pb dijumpai pada sampel no. 21, 24, 34, 72, 74, 82, 96, dan 97. Bila dilihat pada data stadium sampel tersebut, maka diantara kedelapannya berada pada stadium yang berbeda, yaitu 1 sampel berada pada stadium II, 2 sampel berada pada stadium III, 3 sampel berada pada stadium IV, dan 2 sampel tidak memiliki status patologi. Berdasarkan hasil uji Fisher's Exact, maka diperoleh nilai p adalah 0,745. Hal ini berarti bahwa hipotesis tidak diterima, karena nilai $p > 0,05$. Hasil berupa hipotesis tidak diterima menunjukkan bahwa pada penelitian ini tidak ada hubungan bermakna antara delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF.

Penelitian yang dilakukan oleh Dolcetti *et al* (1997) juga memperlihatkan hal yang sama, bahwa delesi 30 pb tidak berhubungan dengan faktor resiko perkembangan EBV yang berasosiasi dengan penyakit Hodgkin.¹⁶ Menurut Hahn *et al* (2001), tidak ada hubungan antara delesi 30 pb dengan tingkat induksi NFκB, sehingga delesi 30 pb tidak menjadi faktor predisposisi untuk kasus KNF di Rusia.¹¹

Di Taiwan, delesi 30 pb merupakan varian virus yang dominan pada penderita KNF, karena pada 446 (82,3%) penderita KNF mengalami delesi 30 pb. Namun demikian, berdasarkan studi kohort retrospektif, secara statistik delesi 30 pb tidak terkait dengan prognosis KNF. Adanya delesi 30 pb gen LMP1 hanya sebuah fenomena polimorfisme pada daerah endemik KNF.¹⁷ Ada kecenderungan bahwa hasil penelitian ini sama dengan yang terjadi di Taiwan. Delesi 30 pb yang terjadi di Indonesia merupakan fenomena polimorfisme pada gen LMP1.

Bila dilihat dari beberapa studi epidemiologi KNF, maka insiden delesi 30 pb gen LMP1 berbeda pada setiap populasi berdasarkan letak geografisnya. Secara umum, kawasan Asia sebagai wilayah endemik KNF memiliki angka delesi yang tinggi dibandingkan wilayah lainnya. Meskipun menurut data yang diperoleh, di Indonesia, KNF merupakan tumor ganas terbanyak di bidang THT dan merupakan urutan ke-4 terbanyak setelah kanker leher rahim, kanker payudara, dan kanker kulit.⁷ Namun demikian, hasil penelitian ini tidak menunjang pernyataan tersebut. Di Indonesia, khususnya Jakarta, delesi 30 pb pada penderita KNF sangat rendah hanya 24%. Angka delesi 30 pb yang rendah umumnya diperoleh dari wilayah bukan endemik KNF.

Hal yang menarik diperoleh pada hasil penelitian ini, yaitu ditemukannya 2 varian gen LMP1 (132 pb & 162 pb), yang berarti terdapat gen LMP1 yang mengalami delesi dan tidak mengalami delesi 30 pb pada satu individu. Dari 100 sampel, diperoleh 20 sampel penderita KNF yang teridentifikasi dengan dua pita spesifik tersebut. Hal ini dimungkinkan karena telah terjadi lebih dari satu kali infeksi, dimana infeksi dilakukan oleh EBV dengan varian gen LMP1 yang berbeda.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Tan *et al* (2003), menemukan 2 varian gen LMP1 (132 pb & 162 pb) pada sampel biopsi penderita KNF.¹⁸ Penelitian lain oleh See *et al* (2008) juga menemukan *coexistence* 2 varian gen LMP1. See *et al* menggunakan sampel dari biopsi dan plasma darah penderita KNF. Dengan menggunakan sampel plasma darah, diperoleh 5/29 (17,2%) penderita KNF mempunyai *coexistence* 2 varian gen LMP1, sedangkan pada sampel biopsi tidak ditemukan adanya *coexistence* 2 varian gen LMP1.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat ditarik dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Di Indonesia, khususnya Jakarta, pada penderita KNF ditemukan adanya delesi 30 pb gen LMP1.
2. Dari 100 sampel penderita KNF, diperoleh hasil sebagai berikut: 24% sampel mengalami delesi 30 pb, sedangkan 76% sampel tidak mengalami delesi 30 pb. Pada penelitian ini juga ditemukan adanya *coexistence* varian gen LMP1.
3. Tidak ada hubungan bermakna antara delesi 30 pb gen LMP1 dengan status patologi KNF.

DAFTAR REFERENSI

1. Brennan B. Carcinoma Nasopharyngeal. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2006; 1 (23): 1-5.
2. Shotelersuk K, Khorprasert C, Sakkikul S, Pornthanakasem W, Voravud N, Mutirangura A. Epstein-Barr virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 1046-51.
3. Middledrop JM et al. Human Herpesvirus 4 (HHV-4)/Epstein-barr virus (EBV). *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 45(1): 1-36.
4. Rowe DT. Epstein-Barr virus immortalization and latency. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4: 346-71.
5. See HS, Yap YY, Yip WK, Seow HF. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) 30-bp deletion and Xho I-loss is associated with type III nasopharyngeal carcinoma in Malaysia. *World Journal of Surgical Oncology* 2008, 6:18. Available from: <http://www.wjso.com/content/6/1/18>
6. Hirusantit R, Kongruttanachok N, Shotelersuk K, Suphiyapun P, Voravud N, et al. Polymeric immunoglobulin receptor polymorphisms and risk of nasopharyngeal cancer. *BMC Genetic* 2003;4:1-9.
7. Susworo, R. Kanker Nasofaring: Epidemiologi dan Pengobatan Mutakhir. *Cermin Dunia Kedokteran* 2004; 144: 16-9.
8. Hu LF, Zabarovsky ER, Chen F, Cao SL, Ernberg I, Chrisstenson B, Klein G, Weinberg G. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP-1) from a chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol*, 1991; 72: 2399-409.
9. Khanim F, Yao Y, Neidobitek G, Sihota S, Rickinson AB, Yaoung LS. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphism in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic location. *Blood*. 1996; 88: 3491-501.
10. Lin SX, Zong YS, Wu QL, Han AJ, Liang YJ. Loss of an Xho1-site within N-terminal region of Epstein-Barr virus LMP1 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Chinese journal of cancer*, 2003; 22(11): 1147-51.
11. Hahn P, Novikova E, Scherback L, Janik C, Pavlish O, Arkhipov V, Nicholls J, Muller-Lantzsch N, Gurtsevitch V, Grasser FA, The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion.[Abstrak] *Int J Cancer*, 2001; 91(6): 815-21.
12. Dahlan, S. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. Jakarta: PT ARKANS; 2004.
13. Knecht H, Bachmann E, Brousset P, Sandvej K, Nadal D, Bachmann F, Odermatt BF, Delsol G, Pallesen G. Deletion within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* 1993; 82(10): 2937-42.
14. Sanvej K, Gratama JW, Munch M, Zhou X-G, Bolhous RLH, Anderson BS, Gregersen N, Hamilton-Dutoit S. Sequence analysis of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates. *Blood* 1997; 90(1): 323-30.

RIWAYAT HIDUP

Nama lengkap : Sri Murni Asih
 NPM : 6105012089
 Tempat/tanggal lahir : Jakarta, 28 September 1980
 Agama : Islam
 Alamat : Jl. Tipar Cakung Rt05/03 No.199
 Sukapura Jak-Ut



Riwayat Pendidikan

SDN 04 Sukapura	Tahun 1987-1993
SMPN 30 Jakarta	Tahun 1993-1996
SMAN 13 Jakarta	Tahun 1996-1999
S-1 Biologi FMIPA-UI	Tahun 1999-2004
S-2 PMIB-FKUI kekhususan Biologi Kedokteran	Tahun 2005-2008

Sumber Dana Penelitian Tesis :

Hibah Tim Penelitian Pascasarjana-HTPP Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
 Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia.