

**HUBUNGAN EKSPRESI E-CADHERIN JARINGAN DAN MIKRO RNA
9 DARAH DENGAN UKURAN NODUL METASTASIS DI LEHER PADA
PENDERITA KARSINOMA NASOFARING WHO TIPE 3 DENGAN
LMP-1 POSITIF**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :

**Francisca Dela Verna
155070101111044**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

HUBUNGAN E-CADHERIN JARINGAN DAN MIKRO RNA-9 DARAH DENGAN
UKURAN NODUL METASTASIS DI LEHER PADA PENDERITA KARSINOMA
NASOFARING WHO TIPE 3 DENGAN LMP-1 POSITIF

Oleh:

Fransisca Dela Verna

NIM: 155070101111044

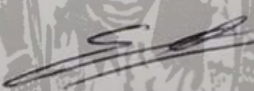
Telah diuji pada

Hari: Jumat


Tanggal: 21 Desember 2018

dan dinyatakan lulus oleh:

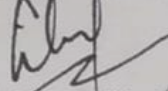
Penguji I


Edwin Widodo, S.Si, M.Sc, PhD
NIP.198105042005011001

Penguji II / Pembimbing I

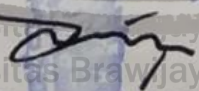

dr. Soehartono, Sp.THT-KL(K)
NIP.196907142009041001

Penguji III / Pembimbing II


Dr. Lilik Zuhriyah, SKM., M.Kes
NIP.197306061997022001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter


dr. Triwahyu Astuti, M.Kes, Sp.P(K)
NIP.196310221996012001

IDENTITAS TIM PENGUJI

JUDUL SKRIPSI:

Hubungan Ekspresi E-cadherin Jaringan dan Mikro RNA 9 Darah Dengan Ukuran Nodul Metastasis Di Leher Pada Penderita Karsinoma Nasofaring WHO Tipe 3 Dengan LMP-1 Positif

Nama Mahasiswa : Fransisca Dela Verna

NIM Program Studi S1 : 155070101111044

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Edwin Widodo, S.Si, MSc, PhD

Dosen Penguji 2 : dr. Soehartono, Sp.THT-KL(K)

Dosen Penguji 3 : Dr. Lilik Zuhriyah, SKM, M.Kes

Tanggal Ujian : 21 Desember 2018





KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang 65145, Jawa Timur Indonesia
 Telp. (041) 551611 Pos. 213 214, 569117, 567192 Fax. (62) 0341) 564755
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail: sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor: 644 /UN10 F08.08/PN/2018

Berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal IJRA
 Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah berikut

Judul: Hubungan Ekspresi E-Cadherin Jaringan Darah Mikro RNA 9 Darah Dengan
 Ukuran Nodul Metastasis Di Leher Pada Penderita Karsinoma Nasofaring
 WHO Tipe 3 Dengan LMP-1 Positif

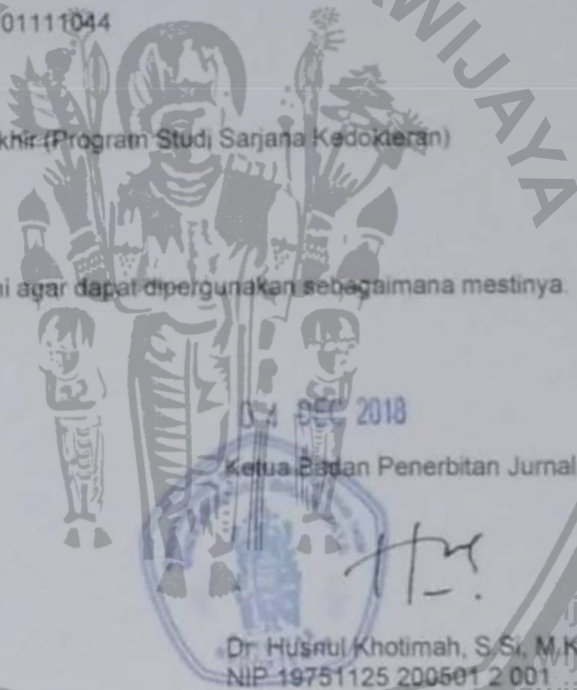
Penulis : Fransisca Dela Verna
 NIM : 155070101111044

Jumlah Halaman : 10

Jenis Artikel : Tugas Akhir (Program Studi Sarjana Kedokteran)

Kemiripan : 10 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.



2018
 Ketua Badan Penerbitan Jurnal,

Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
 NIP. 19751125 200501 2 001

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama Lengkap : Fransisca Dela Verna

Tempat & tanggal lahir : Jakarta, 01 April 1997

Alamat : Jl. Kayu Jati I gang 2 no 23A, Rawamangun

Jenis Kelamin : Perempuan

Status Perkawinan : Belum Menikah

Agama : Katolik

No Telp : 0816-1713-2866

Email : fdelaverna@gmail.com

Pendidikan Formal:

2015 – 2018 : Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

2012 – 2015 : SMAN 68 Salemba

2009 – 2012 : SMP Tarakanita 4

2003 – 2009 : SD Marsudirini Matraman

Pendidikan Informal:

2012 – 2014 : Kursus Bahasa Jerman Goethe Institute, Jakarta

2012 : LIA Preparation Course for The TOEFL

2010 – 2012 : English for Teens LBPP LIA, Jakarta

2007 – 2010 : English for Children LBPP LIA, Jakarta

Pengalaman narasumber/pemateri:

- 2017 : Guest Speaker dalam Global Guardians Project AIESEC 2017
- 2016 : Pemateri dalam acara Pengembangan Pendidikan Inklusi yang diselenggarakan oleh Direktorat Pembelajaran dan Kemahasiswaan, Ditjen *Dikti* bekerja sama dengan PSDL *Universitas Brawijaya*
- 2016 : Pemateri dalam acara Diffable Corner yang diselenggarakan oleh Eksekutif Mahasiswa Universitas Brawijaya

Pengalaman Organisasi:

- 2017-2018 : Steering Committee International Seminar and Scientific Competition of Medical Fiesta FKUB 2018
- 2016-2017 : Koordinator Sie Materi International Seminar and Scientific Competition of Medical Fiesta FKUB 2017
- 2016-2017 : Staff Sie Acara Program Pemenangan PIMNAS FKUB 2017
- 2016-2017 : Koordinator Sie Humas EXTRACTION AMSA FKUB 2017
- 2015-2016 : Wakil koordinator Sie Humas ATP AMSA FKUB 2016
- 2015-2016 : Staff Sie Materi International Seminar and Scientific Competition of Medical Fiesta FKUB 2016

Pelatihan/seminar yang pernah diikuti:

- 2018 : Guest Lecture on "Molecular Aspect of Stem Cell & Metabolic" (FKUB)
- 2017 : Simposium Internasional "Clinical Update in Emergency Medicine" (Medical Fiesta)
- 2017 : Simposium "Emergency in Traffic Accident" Training Kegawatdaruratan Medis (LAKESMA FKUB)

- 2016 : Seminar Medik dan Etika Biomedik dengan tema “Respecting The Unborn: Challenges of Catholic Doctors in Modern Technology Era” (Komisi Kesehatan dan Komunitas Medik Katolik Indonesia KAJ)

Sertifikat:

- 2018 : TOEFL ITP bersertifikat Brawijaya Language Center, Malang
- 2016 : professional competency training and assessment titled: Microsoft Office Desktop Application



UCAPAN TERIMA KASIH



Teriring Ucapan Terima Kasih kepada:

Papa dan Mama tersayang

ABSTRAK

Verna, Fransisca Dela. 2018. *Hubungan Ekspresi E-cadherin Jaringan dan Mikro RNA 9 Darah Dengan Ukuran Nodul Metastasis Di Leher Pada Penderita Karsinoma Nasofaring WHO Tipe 3 Dengan LMP-1 Positif*. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Pembimbing: (1) dr. Soehartono, Sp.THT-KL(K) (2) Dr. Lilik Zuhriyah S.K.M., M.Kes.

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan penyumbang kasus kanker kepala dan leher terbanyak, dan berada pada urutan ke-4 terbanyak di Indonesia. Karsinoma nasofaring memiliki probabilitas metastasis yang lebih tinggi dibandingkan karsinoma sel skuamosa kepala leher lainnya. Beberapa molekul adhesi termasuk E-cadherin diakui berpotensi sebagai biomarker kejadian metastasis tumor. Studi terbaru menemukan misregulasi miRNA-9 pada beberapa jenis sel kanker yang mengarah pada terjadinya metastasis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan E-cadherin jaringan dan mikro RNA 9 darah dengan ukuran nodul metastasis di leher. Penelitian ini adalah penelitian observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Data yang terdiri dari 26 subyek penelitian pasien KNF WHO Tipe 3 dengan LMP-1 Positif yang belum menjalani terapi dari tahun 2017-2018 di poliklinik THT RSUD dr. Saiful Anwar Malang diperoleh secara *consecutive sampling*. Spesimen jaringan diperoleh melalui biopsi nasofaring. Sampel serum diperoleh dari darah vena mediana cubiti. Karakteristik sampel dan ukuran nodul leher diperoleh dari data logbook terapi pasien kanker poli THT RSUD dr. Saiful Anwar. Deteksi ekspresi LMP-1 dan E-cadherin dari spesimen jaringan menggunakan metode imunohistokimia. Status terdeteksinya ekspresi mir-9 dideteksi dengan menggunakan instrumen RT-qPCR Thermal Cycler CFX96 (BioRad). Melalui uji Chi Square ($p=0.804$) didapatkan data bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna proporsi antara status terdeteksinya ekspresi miRNA-9 serum dengan ukuran nodul metastasis (nilai N). Uji Kruskal Wallis ($p=0.003$) menunjukkan perbedaan yang signifikan antara ekspresi E-cadherin jaringan pada berbagai kelompok ukuran nodul metastasis di leher (nilai N). Uji Mann Whitney menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok N1 dengan N3 dan kelompok N2 dengan N3. Namun tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok N1 dengan N2. Uji korelasi Spearman menunjukkan koefisien korelasi sebesar -0.488 , berarti terdapat hubungan negatif yang cukup kuat antara ekspresi E-cadherin dengan volume nodul. Dapat disimpulkan bahwa semakin rendah ekspresi E-cadherin jaringan, semakin besar volume nodul di leher.

Kata Kunci: E-cadherin, miRNA-9, KNF WHO Tipe 3

ABSTRACT

Verna, Fransisca Dela. 2018. *Relationship between E-cadherin Tissue and Micro RNA 9 Blood Expression with the Size of Metastatic Nodule in Neck of WHO Type 3 Nasopharyngeal Carcinoma with Positive LMP-1*. Final Project, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Advisors: (1) dr. Soehartono, Sp.THT-KL(K) (2) Dr. Lilik Zuhriyah S.K.M., M.Kes.

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is the largest contributor to head and neck cancer, and ranks 4th most commonly diagnosed cancer in Indonesia. Nasopharyngeal carcinoma has a higher metastatic probability than other neck and head squamous cell carcinomas. Several adhesion molecules including E-cadherin are recognized as potential biomarkers of tumor metastatic events. The latest study found misregulation of miRNA-9 in several types of cancer cells that lead to the occurrence of metastasis. This study aimed to determine the relationship of E-cadherin tissue and blood micro RNA 9 with the size of metastatic nodules in the neck. This study was an observational analytic study with a cross sectional approach. The data consisted of 26 research subjects in WHO Type 3 NPC patients with Positive LMP-1 who had not undergone therapy from 2017-2018 in the ENT polyclinic of the RSUD dr. Saiful Anwar Malang was obtained by consecutive sampling. Tissue specimens were obtained through nasopharyngeal biopsy. Serum samples were obtained from the mediana cubiti vein blood. Sample characteristics and size of neck nodules were obtained from logbook data on therapy of ENT polyclinic cancer patients at RSUD dr. Saiful Anwar. Detection of LMP-1 and E-cadherin expression from tissue specimens was carried out using immunohistochemical methods. The detection of the expression mir-9 status was detected using the Thermal Cycler CFX96 (BioRad) qPCR instrument. The Chi Square test ($p = 0.804$) shows that there is no significant difference in the proportion between the detected status of serum miRNA-9 expression and the size of metastatic nodules (N value). The Kruskal Wallis test ($p = 0.003$) shows significant difference between tissue E-cadherin expression in various categories of metastatic nodule size in the neck (N value) (Kruskal Wallis, $p = 0.003$). The Mann Whitney test shows a significant difference between groups N1 and N3 and groups N2 with N3. However, there is no significant difference between the N1 and N2 groups. The Spearman correlation test shows a correlation coefficient of -0.488 , meaning that there is a moderately strong negative relationship between the expression of E-cadherin and the volume of nodules. It can be concluded that the lower the expression of tissue E-cadherin, the greater the volume of nodules in the neck.

Keywords: E-cadherin, miRNA-9, KNF WHO Type 3

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Yesus Kristus, oleh karena anugerah dan kasih setia-Nya yang melimpah akhirnya penulis dapat menyelesaikan penulisan Tugas Akhir dengan judul: "Hubungan Ekspresi E-cadherin Jaringan dan Mikro RNA 9 Darah dengan Ukuran Nodul di Leher pada Penderita Karsinoma Nasofaring WHO Tipe 3 dengan LMP-1 Positif".

Penyusunan Tugas Akhir ini dapat berlangsung dan selesai berkat dari bantuan berbagai pihak, karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr.dr. Sri Andarini, M.Kes, dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. dr. Tri Wahyu Astuti, M.Kes, Sp.P(K), selaku Ketua program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas motivasinya selama penulis menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. dr. Soehartono, Sp.THT-KL(K) sebagai pembimbing pertama atas kesediaan waktu, bimbingan, dan perhatiannya terhadap keperluan mahasiswa bimbingannya. Terima kasih atas masukan dan saran yang membangun dari Dokter. Terima kasih dan mohon maaf bila ada kesalahan yang penulis lakukan.
4. Dr. Lilik Zuhriyah, SKM., M.Kes sebagai pembimbing kedua yang dengan segala kesibukan dalam pekerjaan masih bersedia untuk membimbing penulis dalam penyusunan Tugas Akhir ini. Terima kasih atas masukan

dan saran yang membangun dari Ibu. Terima kasih atas dan mohon maaf bila ada kesalahan yang penulis lakukan.

5. Edwin Widodo, SSi., MSc., PhD sebagai penguji dalam seminar hasil

Tugas Akhir ini atas kesediaan waktu, tanggapan, dan saran yang telah diberikan.

6. Ibu Kas dan Mas Panji sebagai analis di Laboratorium Sentral RSSA yang telah membantu dalam berlangsungnya pengolahan sampel penelitian.

7. Petugas Laborat Laboratorium Patologi Anatomi FKUB yang telah membantu dalam berlangsungnya pengolahan sampel penelitian.

8. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu melancarkan urusan administrasi, sehingga penulis dapat melaksanakan Tugas Akhir dengan lancar.

9. Yang tercinta, kedua orang tua (Andreo Wahyudi Atmoko dan Maria Eva Dana) yang selalu menyertai saat suka dan terlebih saat duka. Kasih sayang, doa, dukungan emosional, dan materil yang selama ini diberikan sangat berperan dalam seluruh perjalanan studi penulis. Terima kasih telah mengiringi perjalanan hidup penulis.

10. Kembaranku dan adikku, Teresa Nirmala dan Ignatius Mario yang selalu memberi dukungan, kasih sayang, dan menciptakan kebahagiaan bagi penulis.

11. Om Hok, Tante Melani, dan Cece Dea yang telah memberi dukungan moral, rohani, dan materil.

12. Thea, Mitha, Maria, Bila, Sofi, Ayu, Zuke, dan teman-teman lain yang telah memberikan perhatian kepada penulis, membuat penulis semangat berkuliah, dan membantu penulis dalam bentuk apapun selama masa perkuliahan.

13. Teman-teman Pendidikan Dokter angkatan 2015, terutama teman-teman PD-A yang telah menemani perjuangan penulis dalam masa studi di FKUB.

14. Sanjung sebagai partner dalam penelitian payung ini yang telah membantu penulis terutama saat situasi genting.

15. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari kesempurnaan karena menyadari segala keterbatasan yang ada, untuk itu penulis membutuhkan kritik dan saran yang bersifat membangun. Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan masukan bagi pembaca.

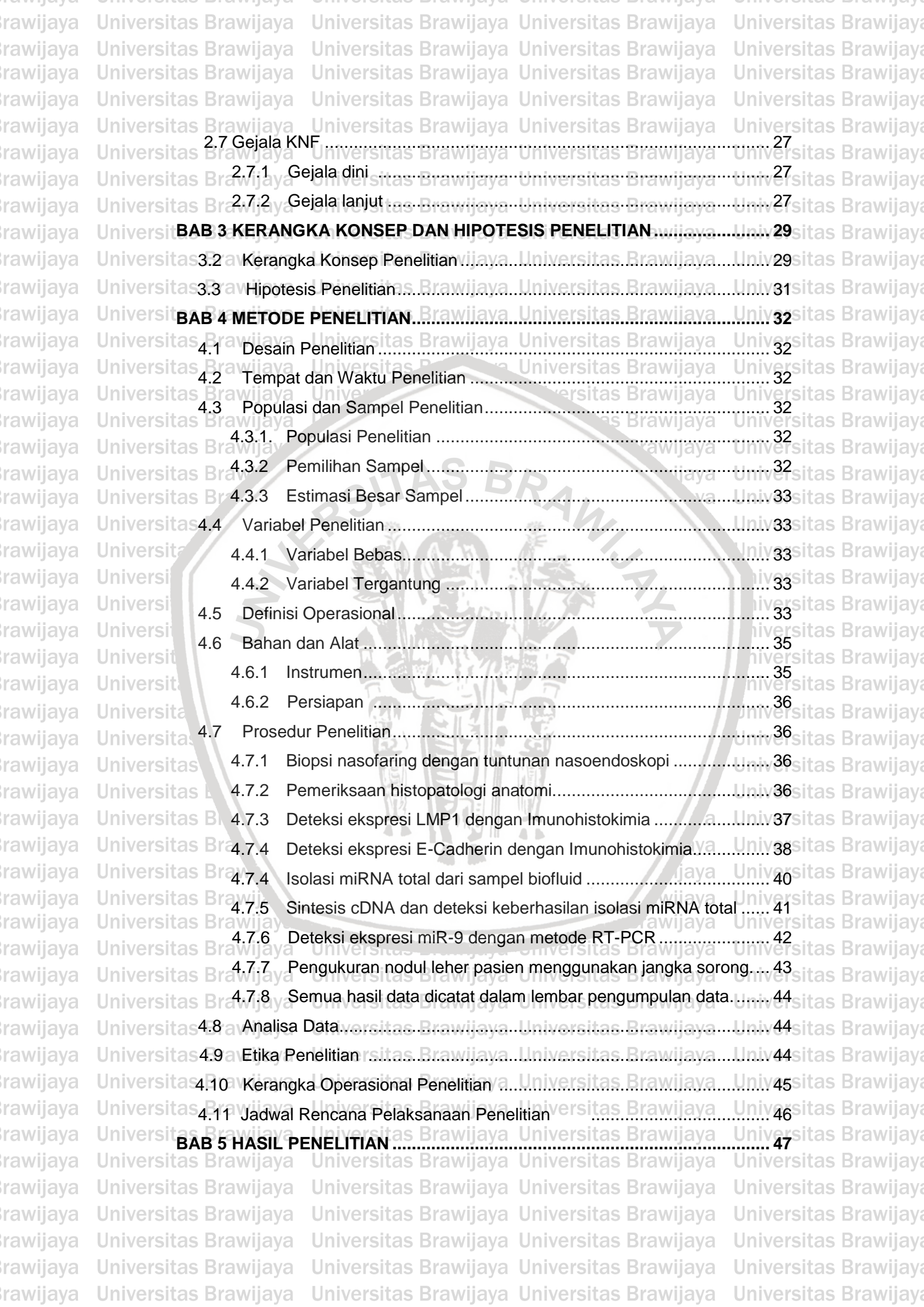
Malang, 7 Desember 2018

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Akademis	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Karsinoma Nasofaring	6
2.1.1 Definisi Karsinoma Nasofaring	6
2.1.2 Epidemiologi KNF	6
2.1.3 Etiologi KNF	7
2.2 Karsinogenesis Karsinoma Nasofaring	8
2.3 LMP-1	9
2.3.1 Patomekanisme LMP-1 pada invasif dan metastasis sel KNF	10
2.4 E-cadherin dan Metastasis	12
2.5 Mikro RNA	16
2.5.1 Definisi dan Biogenesis	16
2.5.2 Profil Ekspresi Mikro RNA Pada Karsinoma Nasofaring	19
2.5.3 Mikro RNA 9	21
2.5.4 Mikro RNA dalam serum dan plasma	24
2.6 Histopatologi	26



2.7 Gejala KNF	27
2.7.1 Gejala dini	27
2.7.2 Gejala lanjut	27

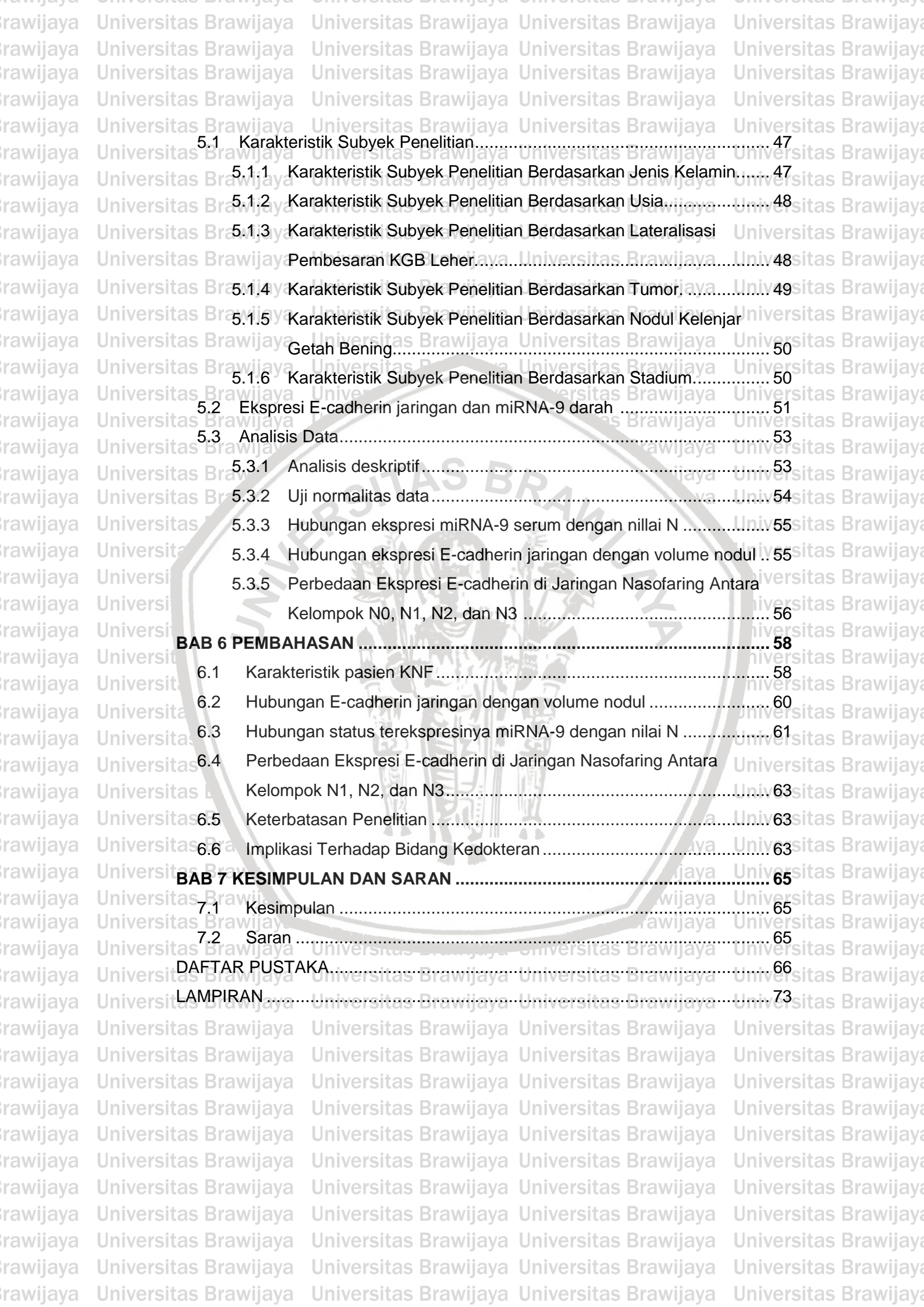
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN..... 29

3.2 Kerangka Konsep Penelitian	29
3.3 Hipotesis Penelitian	31

BAB 4 METODE PENELITIAN..... 32

4.1 Desain Penelitian	32
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	32
4.3 Populasi dan Sampel Penelitian.....	32
4.3.1. Populasi Penelitian	32
4.3.2 Pemilihan Sampel.....	32
4.3.3 Estimasi Besar Sampel.....	33
4.4 Variabel Penelitian	33
4.4.1 Variabel Bebas.....	33
4.4.2 Variabel Tergantung	33
4.5 Definisi Operasional.....	33
4.6 Bahan dan Alat	35
4.6.1 Instrumen.....	35
4.6.2 Persiapan	36
4.7 Prosedur Penelitian.....	36
4.7.1 Biopsi nasofaring dengan tuntunan nasoendoskopi	36
4.7.2 Pemeriksaan histopatologi anatomi.....	36
4.7.3 Deteksi ekspresi LMP1 dengan Imunohistokimia	37
4.7.4 Deteksi ekspresi E-Cadherin dengan Imunohistokimia.....	38
4.7.4 Isolasi miRNA total dari sampel biofluid	40
4.7.5 Sintesis cDNA dan deteksi keberhasilan isolasi miRNA total	41
4.7.6 Deteksi ekspresi miR-9 dengan metode RT-PCR	42
4.7.7 Pengukuran nodul leher pasien menggunakan jangka sorong....	43
4.7.8 Semua hasil data dicatat dalam lembar pengumpulan data.....	44
4.8 Analisa Data.....	44
4.9 Etika Penelitian	44
4.10 Kerangka Operasional Penelitian	45
4.11 Jadwal Rencana Pelaksanaan Penelitian	46

BAB 5 HASIL PENELITIAN..... 47



5.1	Karakteristik Subyek Penelitian.....	47
5.1.1	Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Jenis Kelamin.....	47
5.1.2	Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Usia.....	48
5.1.3	Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Lateralisasi Pembesaran KGB Leher.....	48
5.1.4	Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Tumor.....	49
5.1.5	Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Nodul Kelenjar Getah Bening.....	50
5.1.6	Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Stadium.....	50
5.2	Ekspresi E-cadherin jaringan dan miRNA-9 darah	51
5.3	Analisis Data.....	53
5.3.1	Analisis deskriptif.....	53
5.3.2	Uji normalitas data.....	54
5.3.3	Hubungan ekspresi miRNA-9 serum dengan nilai N	55
5.3.4	Hubungan ekspresi E-cadherin jaringan dengan volume nodul ..	55
5.3.5	Perbedaan Ekspresi E-cadherin di Jaringan Nasofaring Antara Kelompok N0, N1, N2, dan N3	56

BAB 6 PEMBAHASAN **58**

6.1	Karakteristik pasien KNF	58
6.2	Hubungan E-cadherin jaringan dengan volume nodul	60
6.3	Hubungan status terekspresinya miRNA-9 dengan nilai N	61
6.4	Perbedaan Ekspresi E-cadherin di Jaringan Nasofaring Antara Kelompok N1, N2, dan N3.....	63
6.5	Keterbatasan Penelitian	63
6.6	Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran.....	63

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN **65**

7.1	Kesimpulan	65
7.2	Saran	65

DAFTAR PUSTAKA..... **66**

LAMPIRAN..... **73**

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur signaling LMP-1 pada Karsinogenesis.....	10
Gambar 2.2 Mekanisme metastasis.....	13
Gambar 2.3 Intercellular Junctional Complex (IJC).....	14
Gambar 2.4 Mekanisme yang mempengaruhi transisi EMT.....	15
Gambar 2.5 Biogenesis mikro RNA.....	18
Gambar 2.6 Skematik jalur CXCR4/CXCL12 intraseluler.....	22
Gambar 2.7 JalurTNF-alpha/NF-kappaB/Snail.....	24
Gambar 2.8 Biogenesis dan pelepasan miRNA ke lingkungan ekstraseluler ..	26
Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian.....	29
Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian.....	45
Gambar 5.1 Hasil pemeriksaan IHK E-cadherin.....	51
Gambar 5.2 Kurva amplifikasi miRNA-9 sampel 9A.....	52
Gambar 5.3 Kurva amplifikasi miRNA-9 sampel 22A, 23A, 24A.....	52
Gambar 5.4 Kurva amplifikasi miRNA-9 sampel 1A, dan miRNA-16 sampel 1A, 2A, 3A, dan 4A.....	53
Gambar 5.5 Diagram korelasi ekspresi E-cadherin dengan volume nodul.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Ekspresi mikroRNA pada KNF	20
Tabel 4.1 Stadium KNF	34
Tabel 4.2 Jadwal Rencana Pelaksanaan Penelitian	46
Tabel 5.1 Karakteristik pasien KNF berdasarkan jenis kelamin	47
Tabel 5.2 Karakteristik pasien KNF berdasarkan kelompok usia	48
Tabel 5.3 Karakteristik pasien KNF berdasarkan lateralisasi pembesaran kelompok KGB leher	49
Tabel 5.4 Karakteristik pasien KNF berdasarkan tumor	49
Tabel 5.5 Karakteristik pasien KNF berdasarkan nodul	50
Tabel 5.6 Karakteristik pasien KNF berdasarkan stadium	50
Tabel 5.7 Deskriptif volume nodul dan E-cadherin	53
Tabel 5.8 Uji normalitas ekspresi miRNA-9 darah	54
Tabel 5.9 Uji normalitas kelompok nilai N	54
Tabel 5.10 Uji normalitas volume nodul	54
Tabel 5.11 Uji normalitas ekspresi E-cadherin	55
Tabel 5.12 Status terdeteksinya miRNA-9 darah pada setiap kelompok N	55
Tabel 5.13 Hasil pemeriksaan Imunohistokimia ekspresi E-cadherin	57

DAFTAR SINGKATAN

AP-1	: Activator Protein -1
Akt	: Activated <i>serin-threonin protein kinase</i> .
APC	: <i>adenomatus poliposis coli</i>
Bcl - 2	: <i>B- Cell Leukemia-2</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
cGy	: <i>CentiGray</i>
CDK	: <i>cyclin dependent kinase</i>
CSC	: <i>Cancer stem cell</i>
CTNNB1	: Catenin, Beta Interacting Protein 1
CXCR4	: Chemokine receptor type 4
CXCL12	: Chemokine ligand-12 = SDF-1 : stromal-derived factor-1
DNA	: <i>Deoxiribonucleic acid</i>
EBV	: <i>Epstein-Barr Virus</i>
EGFR	: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	: Epithelial-Mesenchymal Transition
ERK	: <i>extraceluller signal regulated kinase</i>
Fz	: frizzled (Fz)
GSK3	: <i>Glycogen Sintetase Kinase 3</i>
JNK	: <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Gp	: <i>Glikoprotein</i>
GAP	: <i>GTP-ase Activating Protein</i>
hTERT	: <i>Human Telomerase Reverse Transkriptase</i>
IAP	: <i>inhibitor of apoptosis protein</i>
KDa	: <i>Kilo Dalton</i>
KNF	: <i>Karsinoma Nasofaring</i>
LMP-1	: <i>Latent Membrane Protein-1</i>
LRP	: <i>low density lipoprotein receptor related protein</i>
NF- κ B	: <i>Necrosing Factor κ B lymphocyte</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
Mek	: <i>mitogen extraceluller-signal-regulated kinase</i>
MMP	: <i>Matriks metalloproteinase</i>
mRNA	: <i>mesenger RNA</i>
miR-9	: <i>Mikro RNA-9</i>

miRNA : mikro RNA
NF-Kb : Nuclear Factor-kB
PI3K : phosphoinositide 3 kinase
RNA : Ribonucleic acid
TRAFs : Tumor necrosis factor receptor-associated factor
Wnt : Wiggless signalling pathway



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat kelayakan Etik	73
Lampiran 2. Sebaran data	74
Lampiran 3. Hasil RT-qPCR ekspresi miRNA-9 serum	77
Lampiran 4. Data uji statistik	78
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	81



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan keganasan sel-sel epitel yang melapisi dinding nasofaring. Karsinoma nasofaring sering tumbuh di permukaan lateral nasofaring dan paling sering di fossa Rossenmuller (Adham *et al.*, 2012).

Gejala dini dari KNF sering tidak khas sehingga sering diabaikan. Sebagian besar pasien baru memeriksakan diri ke dokter setelah tumor bermetastasis ke kelenjar getah bening (KGB) leher. Pembesaran KGB leher merupakan gejala lanjut KNF (Guo *et al.*, 2009).

Berdasarkan wilayah, kanker nasofaring paling banyak terjadi di China, Asia Tenggara, dan Afrika (Chang & Adami, 2006; Adham *et al.*, 2012). Di Indonesia, KNF menjadi penyumbang kasus kanker kepala dan leher terbanyak, dan berada pada urutan ke-4 terbanyak setelah kanker payudara, kanker leher rahim, dan kanker paru (DepKes RI, 2006). Insiden KNF diperkirakan mencapai 6.2 per 100.000 penduduk atau sekitar 12.000 kasus baru per tahun. Bandung, Malang, Denpasar, Manado, and Surabaya merupakan daerah dengan insiden KNF tertinggi (Adham *et al.*, 2012). Di RSUD dr. Saiful Anwar Malang tercatat kasus baru KNF sebanyak 78 pasien baru pada tahun 2015 dan 77 pasien baru pada tahun 2016 (SMF THT RSSA, 2016).

World Health Organization (WHO) mengklasifikasi KNF menjadi dua tipe histologis utama berdasarkan gambaran sel tumor di bawah mikroskop—*keratinizing squamous cell carcinoma* (tipe I) and *non-keratinizing squamous cell carcinoma*. Tipe *non-keratinizing* kemudian dibagi lagi menjadi *non-keratinizing carcinoma* (tipe II) dan *undifferentiated carcinoma* (tipe III) (Chan 2005). Tipe *undifferentiated* merupakan tipe KNF yang paling sering ditemukan dan merupakan endemik di daerah tertentu, terutama di Asia Tenggara (Hsu *et al.*, 2006; Chua *et al.*, 2016).

Di Asia, KNF disebabkan oleh beberapa faktor (multifaktorial) dan muncul sebagai keganasan akibat interaksi dari infeksi kronik virus *oncogenic gamma-herpesvirus* Epstein-Barr, faktor lingkungan, faktor genetik, dan proses karsinogenik yang bertahap (Zhou *et al.*, 2007). Banyak penelitian yang menunjukkan bahwa EBV mempunyai peran besar dalam transformasi sel epitel

nasofaring menjadi sel kanker yang invasif, terutama pada KNF WHO tipe II dan III. Semua kasus KNF WHO tipe 3 atau tipe *undifferentiated* menunjukkan EBV positif, dimana virus ditemukan pada semua sel tumor, terlepas dari asal geografi tumor. Infeksi primer dapat terjadi asimtomatik. Pada fase laten infeksi EBV, terjadi integrasi genom virus dengan genom sel penjamu. Genom EBV bereplikasi pada epitel nasofaring selama pembelahan sel (Chang et al., 2006).

Infeksi laten sering berlanjut menjadi keganasan. Berbagai antigen yang disandi oleh virus dapat diidentifikasi dalam nukleus, sitoplasma dan membran sel terinfeksi.

Gen *Latent Membrane Protein-1* (LMP-1) merupakan membran protein integral yang dikode oleh EBV pada fase laten. LMP-1 memediasi proses karsinogenesis KNF mengubah *signaling pathway* intraselular. Induksi yang cukup dari protein LMP-1 pada beberapa jalur seperti β -catenin, NF- κ B, dan AP-1 dapat mengarah pada disregulasi proliferasi sel (c-Myc), transformasi sel (hTERT), peningkatan angiogenesis (IL-8), dan metastasis (E-cadherin, MMPs), dan hambatan terhadap apoptosis (Bcl-2, p53) (Tulalamba and Janvilisri, 2011). Dapat dikatakan bahwa LMP-1 berpengaruh terhadap proses pertumbuhan sel tumor seperti angiogenesis, migrasi, dan proliferasi dengan cara mengubah beberapa protein, RNA dan jaras sinyal sel.

Metastasis menjadi penyebab 90% kematian dari semua kanker (Yilmaz et al., 2007). Berbeda dengan karsinoma sel skuamosa (KSS) kepala leher lainnya, KNF memiliki probabilitas metastasis yang lebih tinggi, menginvasi daerah yang berdekatan seperti dasar tulang tengkorak, limfonodi servikal, dan organ jauh. Diseminasi KNF dapat terjadi secara limfogen ataupun hematogen (Wei & Sham, 2005). Metastasis terjadi pada lebih dari 60% pasien KNF. Apabila telah terjadi metastasis maka prognosis penyakit menjadi buruk (Cao et al., 2011).

Metastasis menunjukkan proses yang terkoordinasi, memiliki tahapan-tahapan, meliputi pemisahan sel dari tumor primer untuk berkembang menjadi lesi baru di organ jauh. E-cadherin merupakan salah satu protein adhesi transmembran yang dikode oleh gen CDH1. E-cadherin memiliki peran dalam adhesi sel pada jaringan epitel. Supresi ekspresi E-cadherin pada jaringan menyebabkan disfungsi adhesi antar sel. Oleh karena itu, hilangnya fungsi E-cadherin sebagai *tumor suppressor protein* berkorelasi dengan metastasis sel

tumor (Bossche *et al.*, 2012). Dari penelitian terdahulu, ekspresi E-cadherin mempunyai nilai signifikan dalam korelasinya dengan perilaku sel tumor KNF yang lebih invasif, cepat bermetastasis, dan resisten terhadap obat kemoterapi sehingga menyebabkan prognosis pasien KNF menjadi lebih buruk (Kim and Kim, 2007).

MikroRNA (miRNA) merupakan suatu tipe dari *non-codingRNAs* kecil yang memiliki fungsi regulasi sel. Sel normal selain mengekspresikan molekul fungsional yang menyandi translasi protein (*coding RNA*), juga yang tidak menyandi protein (*non-coding RNA*). MiRNA secara spesifik menarget mRNA dengan menghambat translasi atau mengarahkan proses degradasi mRNA. MiRNA berperan dalam berbagai proses penting meliputi proses proliferasi, apoptosis, transformasi, dan proses seluler lainnya. Karena itu miRNA diduga memegang peran dalam mekanisme terjadinya kanker. Beberapa penelitian membuktikan bahwa ekspresi miRNA yang abnormal dapat mempromosikan tumorigenesis, metastasis, dan sifat kanker yang lainnya (Slack and Weidhaas, 2008). Disregulasi ekspresi miRNA berperan besar dalam progresivitas sel kanker dengan berfungsi sebagai *oncosuppressor* (*tumor suppressor gene*) dan *oncogene* (Propkopi *et al.*, 2015).

MiRNA dalam serum dan plasma tidak terpengaruh oleh RNase eksogen dan endogen secara cepat. Keduanya tidak terdegradasi dalam waktu yang lama dalam temperatur ruangan dan tetap stabil setelah proses *freezing* dan *thawing*. MiRNA ini juga dapat stabil pada kondisi pH yang bervariasi. Selain itu, pada individu yang sehat, kadar miRNA dalam serum cukup konsisten, tidak ada perbedaan yang signifikan antar individu (Zheng *et al.*, 2012). Pada beberapa penelitian terdahulu, ditemukan miRNA dapat berfungsi sebagai biomarker molekular untuk menentukan diagnostik, dan prognostik, serta target terapi kanker (Li *et al.*, 2010). Dengan dasar penemuan di atas, miRNA serum dapat dikembangkan dengan keuntungan bahwa miRNA memiliki keterkaitan dengan tumor, sampel darah dapat diperoleh dengan cara yang tidak invasif, perbedaan dalam populasi yang tidak terlalu kentara, dan berada di dalam serum secara stabil.

Salah satu miRNA yang paling sering terlibat dalam patogenesis KNF adalah miRNA-9 (Yuva *et al.*, 2011). Hasil penelitian terdahulu menunjukkan pada penderita KNF, kadar ekspresi miRNA-9 cukup rendah (Lu *et al.*, 2014).

Selain KNF, miRNA-9 telah terlibat dalam berbagai keganasan lainnya, dan fungsi penekan tumornya telah ditemukan pada beberapa penelitian terdahulu. MiRNA-9 berperan dalam regulasi berbagai proses seluler penting termasuk proses tahapan metastasis seperti angiogenesis dan transisi epitel-mesensimal (EMT) (Ma *et al.*, 2010; Gwak *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014). Rendahnya tingkat ekspresi miRNA-9 pada KNF berhubungan dengan fenotip yang lebih agresif dan prognosis yang lebih buruk. MiRNA-9 telah terbukti berfungsi sebagai penekan tumor di KNF dengan menargetkan kemokin reseptor (CXCR4) untuk menghambat proliferasi sel, migrasi dan invasi. Kemampuan miRNA-9 sebagai biomarker prognostik individu pada metastasis KNF juga telah dibuktikan, dimana rendahnya tingkat ekspresi miRNA-9 berkorelasi dengan adanya pembesaran KGB leher (Lu *et al.*, 2014).

Atas dasar latar belakang tersebut diatas, penulis tertarik untuk meneliti lebih lanjut korelasi E-cadherin jaringan dengan volume nodul metastasis di leher dan miRNA-9 serum dengan ukuran nodul metastasis di leher (nilai N). Diharapkan dengan penelitian ini diperoleh pemahaman yang lebih baik mengenai peran E-cadherin dan miRNA-9 dalam tahap perkembangan KNF menuju terjadinya metastasis.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi E-cadherin jaringan dengan volume nodul di leher pada penderita KNF WHO tipe 3?
2. Apakah terdapat hubungan antara status terdeteksinya ekspresi miRNA-9 darah dengan besarnya ukuran nodul metastasis di leher pada penderita KNF WHO tipe 3?
3. Apakah terdapat perbedaan ekspresi E-cadherin jaringan nasofaring penderita KNF WHO tipe 3 antara kelompok N1, N2, dan N3?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Mengetahui hubungan ekspresi E-cadherin jaringan dengan volume nodul di leher pada penderita KNF WHO tipe 3.

2. Mengetahui hubungan status terdeteksinya miRNA-9 darah dengan besarnya ukuran nodul metastasis di leher pada penderita KNF.
3. Mengetahui perbedaan ekspresi E-cadherin jaringan nasofaring penderita KNF WHO tipe 3 antara kelompok N1, N2, dan N3.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari pelaksanaan penelitian ini adalah

1.3.1 Manfaat Akademis

1. Menambah wawasan keilmuan dan pemahaman mahasiswa mengenai hubungan ekspresi E-cadherin jaringan dan mi-RNA darah dengan ukuran nodul metastasis pada KNF WHO tipe 3.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Menjadi masukan dalam mendukung pengembangan dan pemahaman marker biologi serta pemanfaatan ekspresi E-cadherin jaringan dan mi-RNA darah sebagai faktor prognostik untuk penderita KNF.
2. Memberikan informasi kepada klinisi mengenai gambaran ekspresi E-cadherin jaringan dan miRNA darah seiring progresivitas metastasis tumor sehingga penanganan KNF menjadi lebih tepat.
3. Menjadi salah satu dasar pengembangan terapi dengan memodifikasi ekspresi E-cadherin dan miRNA.
4. Menjadi dasar pengembangan dan pemahaman miRNA serum sebagai biomarker molekular yang tidak invasif.
5. Menjadi dasar penelitian selanjutnya dengan sebaran sampel penelitian yang lebih luas.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinoma Nasofaring

2.1.1 Definisi Karsinoma Nasofaring

Karsinoma Nasofaring (KNF) merupakan tumor ganas dari epitel mukosa dan jaringan limfoepitelial sub mukosa yang melapisi dinding nasofaring. (Thompson, 2007; Adham *et al*, 2012). Lokasi KNF secara anatomis paling sering adalah di fossa Rossemuller. Fossa Rossemuller merupakan suatu resesus di posterior dan superior dari torus tubarius. Ada dua jenis epitel yang melapisi nasofaring, epitel skuamosa berlapis (yang terdiri dari 60% permukaan epitel total nasofaring) dan epitel kolumnar pseudostratifikasi bersilia dengan sel goblet. Epitel fossa Rossemuller adalah daerah transisi dimana epitel kolumnar menjadi epitel skuamosa. (Wei and Chua. 2014). Karena nasofaring kaya dengan jaringan limfatik, penyebaran ke kelenjar getah bening (KGB) leher sering ditemukan pada penderita KNF. Aliran limfatik dari fossa Rossemuller mengalir ke kelenjar getah bening retrofaring dan berlanjut ke KGB leher lainnya (Guo *et al.*, 2009; Adham *et al.*, 2012).

2.1.2 Epidemiologi Karsinoma Nasofaring

KNF merupakan keganasan yang jarang ditemukan di Amerika Serikat, dengan rasio insiden 0.5-2/100.000. Angka tersebut jauh berbeda dengan angka insiden di negara endemis KNF. Data statistik global dari *International Agency for Research on Cancer* menunjukkan lebih dari 84.000 kasus baru KNF ditemukan per tahunnya, dengan presentase 80% kasus ada di Asia. Di China dan Asia Tenggara, rasio insiden mencapai 15-50/100.000. Insiden KNF tertinggi adalah 50 kasus per 100.000 penduduk di Cina selatan, terutama di Provinsi Guan Dong (Adham *et al*, 2012). Di Indonesia, KNF berada pada urutan ke-4 terbanyak setelah kanker payudara, kanker leher rahim, dan kanker paru (DepKes RI, 2006). Insiden KNF diperkirakan mencapai 6.2 per 100.000 penduduk atau sekitar 12.000 kasus baru per tahun. KNF dapat terjadi pada semua usia, tetapi sangat jarang pasien di bawah usia 20 tahun dan usia terbanyak antara 45-54 tahun. Pasien KNF laki-laki lebih banyak daripada wanita dengan rasio antara 2 - 3: 1. Kebanyakan dari pasien-pasien KNF di beberapa kota di Indonesia dirujuk

ke rumah sakit pada stadium yang sudah buruk (Adham et al, 2012). Di RSUD dr. Saiful Anwar Malang, KNF dengan histopatologi WHO tipe 3 tercatat sebesar 99,19%. Berdasarkan stadium, pasien KNF stadium I adalah 0,81%, stadium II 4,88%, stadium III 38,21%, dan stadium IV 56,10% (SMF THT RSSA, 2016).

2.1.3 Etiologi Karsinoma Nasofaring

Penyebab pasti KNF belum dapat dipastikan sampai sekarang, namun ada beberapa faktor resiko penyakit ini. Faktor-faktor tersebut antara lain infeksi kronik virus *oncogenic gamma-herpesvirus* Epstein-Barr, faktor lingkungan, faktor genetik, dan proses karsinogenik yang bertahap (Zhou et al, 2007). Infeksi primer EBV dapat terjadi pada usia muda, dan asimtomatik. Terjadi integrasi genom virus dengan genom sel penjamu. Genom EBV bereplikasi pada epitel nasofaring selama pembelahan sel dan menyebabkan infeksi laten. Virus bereplikasi pada epitel nasofaring dan menjadi faktor resiko mayor dalam perkembangan keganasan (Chang & Adami, 2006; Zhou et al, 2007).

Faktor lingkungan dikaitkan dengan dampak akumulasi kontak dengan zat yang dianggap bersifat karsinogenik. Konsumsi ikan diasinkan dan makanan diawetkan secara signifikan meningkatkan resiko timbulnya KNF karena mengandung kadar nitrosamin tingkat tinggi. Makanan diawetkan memiliki kandungan komponen N-nitroso yang lebih tinggi daripada makanan segar (Wei-Hua et al, 2010). Faktor resiko lingkungan lainnya yaitu asap dari pembakaran hutan (kayu) dan pembakaran fosil yang mengandung *benzopyrene*, *benzanthracene*, dan hidrokarbon aromatik polisiklik. Selain itu pewarnaan makanan berbahan pewarna tekstil juga menjadi sumber hidrokarbon karsinogenik. Paparan lingkungan pekerjaan terhadap debu, kabut asap kimia, dan ventilasi yang buruk juga menjadi faktor resiko (Adham et al, 2012).

Faktor genetik meliputi adanya riwayat keluarga yang menderita KNF. Adanya lokus yang rentan pada regio HLA (*human leukocyte antigen*) seperti HLA-A2, HLA-B17, menjadi faktor resiko dalam KNF. Penelitian luas terkait studi tentang genom mengonfirmasi keterlibatan molekul HLA dalam timbulnya KNF (Bei et al, 2010; Tse et al, 2009). Orang dengan kondisi genetik ini lebih *susceptible* dengan bahan karsinogenik yang ada di lingkungan serta adanya infeksi virus Epstein Barr. Alterasi gen selular juga berkontribusi dalam

perkembangan KNF, terutama inaktivasi *tumor suppressor gene* tertentu (Zhang, 2008).

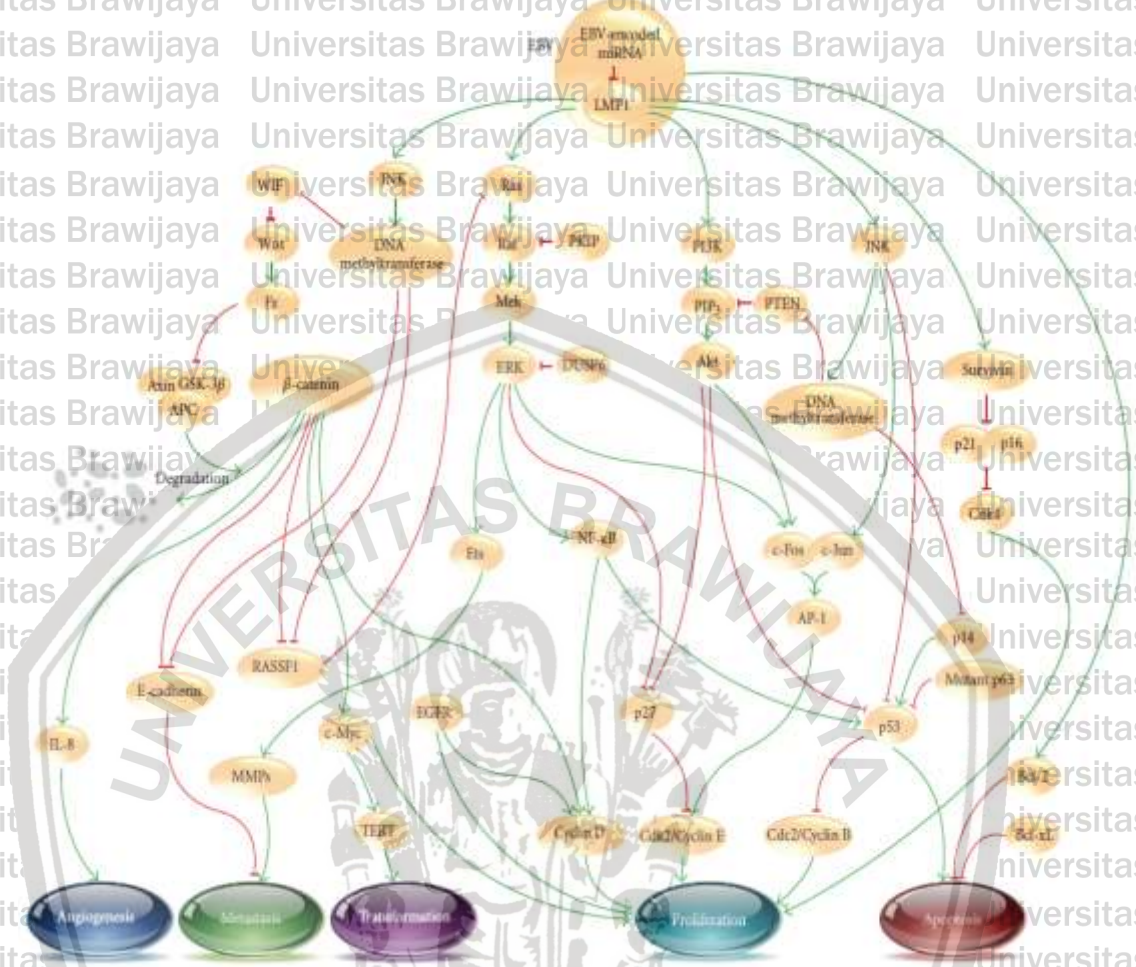
2.2 Karsinogenesis Karsinoma Nasofaring

Kanker disebabkan oleh terganggunya pengendalian pertumbuhan dan diferensiasi sel, sehingga sel menjadi yang tidak normal. Ganggunya proses pengendalian ini disebabkan oleh mutasi gen pada tiga kelompok gen yaitu kelompok gen penekan tumor (*tumor suppressor*), kelompok gen proto-onkogen, dan kelompok gen DNA *repair*. Kelompok gen proto-onkogen mengkode protein-protein yang mengatur proliferasi sel. Mutasi pada kelompok gen ini dapat menyebabkan ketidakaturan proliferasi sel. Proto-onkogen yang mengalami mutasi disebut onkogen. Kelompok gen penekan tumor berperan dalam mengatur siklus sel. Mutasi pada kelompok ini menyebabkan disregulasi pengendalian siklus sel dan adhesi sel. Kelompok gen ini juga berperan menghambat pertumbuhan sel atau menginduksi *apoptosis* (kematian sel terprogram). Gen penekan tumor dikenal sebagai anti-onkogen, karena berfungsi melakukan kontrol negatif pada pertumbuhan sel. Kelompok gen yang terakhir berperan dalam mempertahankan integritas *genomik* dengan mendeteksi kesalahan pada genom dan memperbaikinya. Mutasi pada gen-gen ini meningkatkan resiko terbentuknya kanker (Malarkey, 2013). Transformasi sel terbentuk dari interaksi akumulasi mutasi beberapa gen (*multiple genetic alteration*). Tumorigenesis berlangsung melalui proses yang kompleks dan bertahap (Yoshizaki, 2012). Salah satu penyebab transformasi sel adalah infeksi virus, dimana terjadi integrasi antara bagian DNA maupun RNA virus dengan gen sel penjamu. Integrasi menjadi tahap penting dalam proses transformasi karena DNA / RNA virus yang terintegrasi dan akan direplikasi bersamaan dengan DNA sel penjamu pada waktu pembelahan sel. Replikasi ini menyebabkan genom virus juga akan bertambah banyak dan berkelanjutan. Status transformasi dapat menetap dengan adanya produk virus yang berkelanjutan. Aktivasi gen regulator pertumbuhan sel akibat integrasi DNA virus dan penjamu sel terus aktif bertumbuh dan terjadi proliferasi tidak terkendali (Kresno, 2012). Dapat dikatakan, KNF merupakan hasil interaksi kondisi genetik yang *susceptible*, adanya infeksi virus Epstein Barr, dan bahan karsinogenik yang ada di lingkungan (*environmental carcinogen*). Ditemukannya DNA virus Epstein Barr

pada sel KNF, merupakan bukti bahwa virus ini terlibat dalam proses karsinogenesis dari sel nasofaring (Young and Dawson, 2014). Titer sel penjamu yang terinfeksi EBV pada KNF menunjukkan pola infeksi fase laten yang mengekspresikan LMP-1. Hubungan antara KNF WHO tipe 2 dan 3 telah terbukti konsisten dengan infeksi EBV. Bahkan, KNF WHO tipe 3 dianggap 100% berasosiasi dengan infeksi EBV (Barnes et al., 2005).

2.3 LMP-1

Gen *Latent Membrane Protein-1* (LMP-1) merupakan membran protein integral yang berpotensi untuk memediasi proses karsinogenesis KNF dengan mengubah *signaling pathway* intraselular (Zheng et al., 2007). Sebagai salah satu protein onkogen, LMP-1 berpotensi dalam peningkatan progresifitas dan invasi sel KNF dengan meregulasi ekspresi dirinya sendiri dan ekspresi gen manusia. LMP-1 merupakan protein transmembran dengan berat molekul 60–66 kDa. LMP-1 mempunyai struktur yang menyatu dengan membran protein yang terdiri dari tiga domain yaitu domain 1-*Intracytoplasmic Nitrogen Terminus*, domain 6-*Hydrofobik Transmembran* dan domain 3-*Intracytoplasmic Carbon Terminus*. Sebagian besar aktivitas LMP-1 terjadi pada domain *Intracytoplasmic Carbon Terminus*. Domain *Intracytoplasmic Carbon Terminus* dibagi atas 3 region yaitu Carbon Terminal Activation Region (CTAR)1, CTAR2 dan CTAR3. Ketiga region ini berperan sebagai domain aktivasi. CTAR1 berfungsi menginisiasikan proliferasi sel. CTAR2 berfungsi mengaktifasi NF κ B yang kemudian menginduksi immortalisasi dan menghambat apoptosis. Diantara CTAR1 dan CTAR2, ada CTAR3 yang berfungsi menginduksi jalur JAK3/STAT dan AP-1. Jalur ini pada akhirnya meningkatkan transkripsi VEGF untuk memacu invasi dan metastasis sel ganas (Zheng, 2007). LMP-1 dalam sel menginisiasikan proliferasi, menginduksi imortalisasi dan menghambat apoptosis, serta memacu metastasis, oleh karena itu dapat dikatakan bahwa LMP-1 memiliki peran sebagai virus onkogen dalam tahapan proses karsinogenesis KNF seperti terlihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Jalur signaling LMP-1 pada Karsinogenesis KNF (Tulalamba, 2011)

2.3.1 Patomekanisme LMP-1 pada sifat invasif dan metastasis sel KNF

Jalur sinyal protein Wnt menjaga homeostasis jumlah β-catenin sehingga fungsi regulasi diferensiasi dan adhesi sel dalam tubuh manusia dapat berjalan normal. Jalur ini dapat diaktifkan oleh gen LMP-1. Jalur sinyal Wnt merupakan sekelompok jalur transduksi sinyal dari interaksi beberapa protein yang meneruskan sinyal dari luar sel melalui reseptor permukaan sel ke dalam sel. Pada jalur ini, β-catenin berfungsi sebagai transduser sinyal. Selain berperan sebagai transduser sinyal, β-catenin yang mempunyai 2 peran, yaitu memediasi regulasi adhesi sel dan transkripsi gen. Dalam peran transkripsi gen, β-catenin akan mengalami translokasi ke dalam inti sel serta secara kontinyu menjalankan transkripsi dari target organnya. β-catenin meregulasi pertumbuhan sel dan bertanggung jawab dalam mentransmisikan sinyal inhibisi sehingga sel berhenti

membelah. Ketika molekul Wnt berikatan dengan 2 reseptornya yaitu *frizzled* (*Fz*) dan *low density lipoprotein receptor related protein* (LRP), akan terjadi aktivasi kaskade sinyal intrasel untuk stabilisasi β -catenin. β -catenin kemudian mengalami translokasi ke inti sel dan berikatan dengan faktor transkripsi *t cell factor* (TCF) atau *lymphoid enhancer factor* (LEF). β -catenin adalah proto-onkogen. Ikatan β -catenin dengan gen targetnya di inti sel akan mengontrol proses differensiasi, migrasi (komunikasi intraseluler), dan proliferasi sel. Peningkatan translokasi β -catenin dari sitoplasma menuju inti sel akan meningkatkan protein interleukin-8. IL-8 merupakan faktor angiogenetik di sekitar sel KNF. Peningkatan IL-8 menyebabkan neovaskularisasi dan hal ini akan memudahkan invasi sel KNF ke sekitarnya (Valkenburg *et al.*, 2011)

Catenin beta interacting protein 1 (CTNNB1) merupakan subunit dari kompleks protein cadherin. β -catenin adalah bagian dari kompleks protein yang membentuk hubungan antar sel yang disebut adherens. Kompleks adhesi sel-sel diperlukan untuk penciptaan dan pemeliharaan lapisan sel epitel. Sebagai komponen kompleks ini, β -catenin meregulasi ikatan (adhesi) antar sel. Kompleks E-cadherin - β -catenin - α -catenin memiliki hubungan yang lemah dengan filamen sitoskeleton aktin. Beta-catenin juga dapat bertindak sebagai morfogen. Bersama dengan TGF- β , peran penting β -catenin adalah untuk menginduksi perubahan morfogenik dalam sel epitel. Proses morfogenik ini mendorong β -catenin untuk meninggalkan fungsi adhesinya dan terkait dengan fenotipe mesensimal yang lebih *mobile* dan longgar. Selama proses ini, sel-sel epitel kehilangan ekspresi protein salah satunya adalah E-cadherin. Aktivasi Wnt / beta-catenin yang patologis pada KNF menyebabkan terganggunya regulasi penurunan beta-catenin. Potensi β -catenin untuk mengubah fenotip epitelial menjadi fenotipe mesenkim yang invasif sangat berkontribusi terhadap pembentukan metastasis. Fungsi E-cadherin sebagai stabilisator komunikasi antar sel sehat juga akan terhambat akibat peningkatan stimulasi β -catenin. Implikasi dari stabilitas antar sel sehat yang terganggu, perubahan fenotipe tumor, dan neovaskularisasi, sel ganas akan dengan mudah bermetastasis (Zhang *et al.*, 2011).

Aktivasi yang menyimpang dari jalur Wnt telah terjadi dalam proses patologis seperti kanker. Pada KNF, LMP-1 mengaktifkan jalur Wnt sehingga stimulasi yang terus menerus oleh protein Wnt akan menyebabkan tertumpuknya

β -catenin di sitoplasma dan mengalami translokasi ke dalam nukleus. Akumulasi β -catenin di nukleus memicu proliferasi, metastasis dan angiogenesis (Fodde and Brabletz, 2007). β -catenin diregulasi dan dihancurkan oleh *adenomatous polyposis coli* (APC). Ikatan antara molekul Wnt dengan Fz dan LRP akan menghambat ikatan gabungan antara protein kompleks destruksi Axin, *glycogen synthase kinase-3 β* (GSK-3 β), dan protein adenomatous polyposis coli (APC).

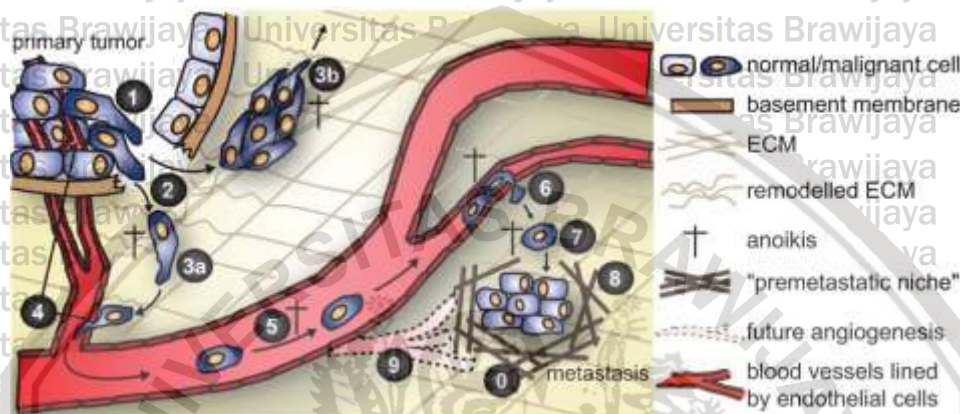
Akibatnya efek fosforilasi yang menyebabkan degradasi β -catenin tidak terjadi, dan terjadilah proliferasi dan diferensiasi sel yang tidak normal (Tulalamba, 2012).

2.4 E-cadherin dan metastasis sel KNF

Kemampuan sel tumor untuk menyebar ke jaringan yang berdekatan (invasi) dan menyebar ke organ jauh (metastasis) merupakan ciri biologis keganasan suatu sel tumor (Bossche, 2012).

Metastasis dalam prosesnya yang dinamis, namun terkoordinasi dan memiliki tahapan-tahapan melibatkan interaksi antar sel tumor sendiri dan antara sel tumor dengan jaringan normal dengan tujuan membentuk pertumbuhan baru tumor sekunder. Pada setiap proses metastasis, terjadi interaksi biokimiawi yang sangat kompleks antara sel tumor dengan lingkungannya. Dimulai dari terjadinya multiplikasi tak terkontrol, sel-sel kanker kemudian terjadi pembentukan suplai darah baru ke tumor (angiogenesis). VEGF-A (faktor pertumbuhan endotel vaskular-A) merupakan faktor limfangiogenik yang diproduksi oleh tumor premetastasis. VEGF-A menginduksi limfangiogenesis tumor dan nodus limfa. Sel-sel kanker kemudian menginvasi jaringan sekitar dengan melakukan infiltrasi jaringan ikat sekitar. Sel sel tersebut kemudian menembus membran basalis. Setelah itu terjadilah proses sekresi enzim protease yang merusak matriks molekul protein pengikat/protein jaringan ikat disekitar sel tumor dan enzim kolagenase yang melarutkan kolagen pada membran basal di sekitar sel sehingga dapat ditembus oleh sel tumor. Sel-sel tumor kemudian menempel pada lapisan endotel dan masuk ke saluran pembuluh darah/limfe terdekat (intravasasi). Sel-sel tumor tersebut dibawa ke tempat yang jauh dari asalnya melalui sistem sirkulasi darah atau limfe. Pembuluh limfatik yang mendrainase tumor menunjukkan ukuran yang membesar dan aliran getah bening yang meningkat (Laksmi, 2011). Kemudian sel-sel tumor menempel ke dinding

pembuluh dan keluar dari pembuluh (ekstravasasi) ke organ atau bagian lain dari tubuh. Di organ yang baru tersebut, sel-sel tumor primer tadi akan membentuk koloni untuk pertumbuhan tumor sekunder. Proses biokimiawi di atas melibatkan banyak faktor, di antaranya berbagai reseptor yang membentuk jembatan antar sel, misalnya cadherin, integrin dan lain-lain (Geiger, 2009). Hal ini dapat dilihat dari gambar skematik berikut ini.



Gambar 2.2 Mekanisme metastasis (Geiger, 2009).

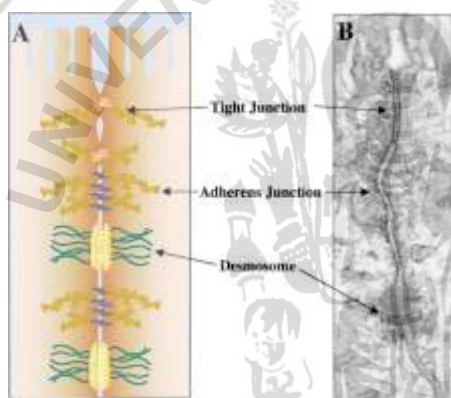
Molekul adhesi juga berperan penting pada kaskade metastasis, yaitu saat sel tumor melepaskan diri dari tumor primer dan saat berinteraksi dengan dinding pembuluh darah maupun membran basal di organ baru. Saat sel tumor melepaskan diri dari masa tumor primer, pengaruh molekul-molekul adhesi tertentu perlu dihilangkan. Tetapi saat tiba di organ sasaran metastasis, sel tumor akan mengalami interaksi adhesi dengan dinding pembuluh darah maupun membran basal agar bisa menetap di tempat (organ) baru. Pada kanker, pola ekspresi berbagai molekul adhesi ternyata juga mengalami perubahan (Geiger, 2009).

Kondisi adhesi antar sel sangat dibutuhkan untuk pemeliharaan integritas sel dan jaringan. Telah diketahui beberapa molekul adhesi sel sebagai penanda untuk potensi kejadian metastasis tumor padat. Salah satunya adalah E-cadherin. E-cadherin merupakan salah satu glikoprotein transmembran yang penting dalam adhesi, dan migrasi sel. Ditunjukkan pada suatu penelitian terbaru terhadap E-cadherin, bahwa penurunan ekspresi protein ini berperan dalam metastasis tumor (Martin *et al.*, 2013).

Cadherin merupakan superfamili molekul adhesi sel. Cadherin berfungsi memediasi interaksi antar sel berupa ikatan *Ca²⁺-dependent*, sehingga disebut

sebagai *calcium-dependent cell adhesion molecules* (CAMs). Pada grup cadherin klasikal, berdasarkan lokasinya cadherin dibagi menjadi dari E (epitel), N (neuron), dan P (plasenta) cadherin. E-cadherin diekspresikan oleh semua sel epitel. Gen E-cadherin terdapat pada kromosom 16q22.1.

Intercellular Junctional Complex (IJC) menghubungkan sel-sel epitel erat. Secara umum adhesi antar sel epitel dimediasi oleh 3 jenis *Intercellular Junction* yaitu: *Tight Junctions* (TJs), *Adherens Junctions* (AJs), dan desmosomes (gambar 2.3) (Moreno *et al.*, 2003). *Adherens junctions* dibentuk oleh protein adhesi transmembran E-cadherin (Emilio, 2014). Kompleks E-cadherin- β -catenin- α -catenin berhubungan lemah dengan filamen aktin, maka *adherens junctions* membentuk hubungan dinamis dan bukan stabil seperti sitoskeleton aktin.



Gambar 2.3 (Moreno *et al.*, 2003)

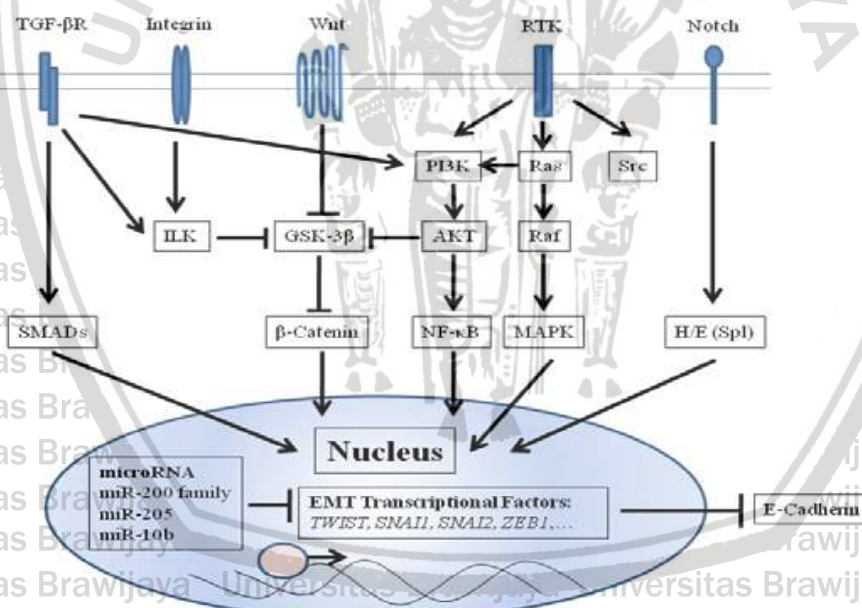
Untuk membangun dan mempertahankan hubungan antar sel, hubungan homofilik *Ca²⁺-dependent* yang merupakan reseptor adhesi dan berlokasi di basolateral membran pada AJs difasilitasi oleh E-cadherin. Di dalam sel, E-cadherin berikatan dengan catenin α , β , dan γ -catenin (plakoglobin) yang menghubungkan E-cadherin dengan aktin sitoskeleton (Tian *et al.*, 2013). Pada kompleks protein, β -catenin berikatan dengan E-cadherin dan memainkan peran sebagai transduser sinyal intraseluler dalam jalur sinyal Wnt.

Mayoritas kanker pada manusia (80-90%) berasal dari sel epitel, dan E-cadherin berperan sebagai molekul utama adhesi antar sel pada sel-sel epitel ini. Hilangnya fungsi E-cadherin mendorong aktifitas invasi sel karsinoma (Petrova *et al.*, 2016). Sel-sel kanker pertama kali kehilangan kemampuan perekatan antar sel, kemudian meninggalkan tumor primer dan menyebarkan ke organ jauh (Yilmaz *et al.*, 2007). Studi imunohistokimia (IHK) telah menunjukkan bahwa

dalam berbagai jenis karsinoma, kehilangan ekspresi E-cadherin merupakan peristiwa yang sering terjadi (Petrovaa *et al.*, 2016).

Sel epitel mengekspresikan kadar E-cadherin tinggi, sedangkan sel mesenkim mengekspresikan N-cadherin. Represi ekspresi E-cadherin pada sel kanker epitel merupakan ciri khas terjadinya Epithelial–mesenchymal transition (EMT). EMT menginduksi perubahan bentuk dan motilitas sel epitel.

Setelah berubah menjadi fenotip mesensimal, sel-sel kanker kehilangan kontak dan menjadi *mobile* dan invasif untuk menyebar ke jaringan terdekat dan kemudian menjadi organ jauh. Pertumbuhan di tempat (organ) jauh memerlukan sel kanker metastatik untuk menjalani transisi mesenchymal-epithelial (MET), proses *reverse* EMT, di mana mereka memiliki kembali sifat epitel. Beberapa molekul diketahui bertindak sebagai represor ekspresi E-cadherin termasuk ZEB, Twist, Snail, Slug dan TGF- β epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Iwatsuki, 2010).



Gambar 2.4 Mekanisme yang mempengaruhi transisi EMT (Iwatsuki, 2010).

Iwatsuki menggambarkan jalur sinyal Wnt/ β -Catenin menginduksi terbentuknya EMT melalui aktivasi Slug yang merupakan target langsung faktor transkripsi dan diperantarai ikatan β -Catenin dengan TCF serta stabilisasi dari Snail, melalui hambatan terhadap proses fosforilasi dan degradasinya. Hal tersebut sesuai dengan hambatan pada aktivitas GSK3 mendorong ke arah

transkripsi Snail, penekanan E-Cadherin, dan EMT. Dimana Snail yang berikatan dengan β -Catenin akan meningkatkan sinyal Wnt yang telah teraktivasi (Iwatsuki, 2010).

Molekul lain yang terlibat dalam represi E-cadherin adalah lymphoid enhancer factor (LEF) -1, faktor transkripsi yang biasanya dikaitkan dengan jalur Wnt (Jamora et al., 2003). Wnt, yang telah ditemukan penting untuk merangsang EMT dengan mendorong stabilisasi sitoplasma β -catenin. Hal ini terjadi melalui fosforilasi glikogen sintase kinase (GSK) -3 β , yang memisahkan kompleks ubiquitin (yang mendegradasi sitoplasma β -catenin) yang terdiri dari GSK-3 β , Axin, dan adenomatosis polyposis coli (APC) (Zhang et al., 2011).

Represi awal E-cadherin melalui Slug dan Snail mengurangi tingkat substrat untuk β -catenin dalam membran sel. β -catenin sitoplasma (dan juga Snail) distabilkan oleh fosforilasi dan inaktivasi fungsional GSK-3 β (Zhou et al., 2004). TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3 semua sinyal melalui PI3K, yang menyebabkan fosforilasi GSK-3 β melalui *downstream signaling* molekul ILK dan AKT (Hannigan et al., 2005). Kelebihan β -catenin di dalam sitoplasma kemudian bebas untuk diasosiasikan dengan LEF-1. Ikatan β -catenin dengan gen targetnya akan meregulasi proses diferensiasi, migrasi (komunikasi intraseluler), dan proliferasi sel. Kompleks transkripsi β -catenin-LEF-1 atau β -catenin-Snail di inti sel kemudian menyebabkan peningkatan ekspresi gen target (vimentin, fibronectin, α -SMA) yang lebih banyak dan mendorong pembentukan fenotip mesensimal (Zhang et al., 2011).

2.5 Mikro RNA

2.5.1 Definisi dan Biogenesis

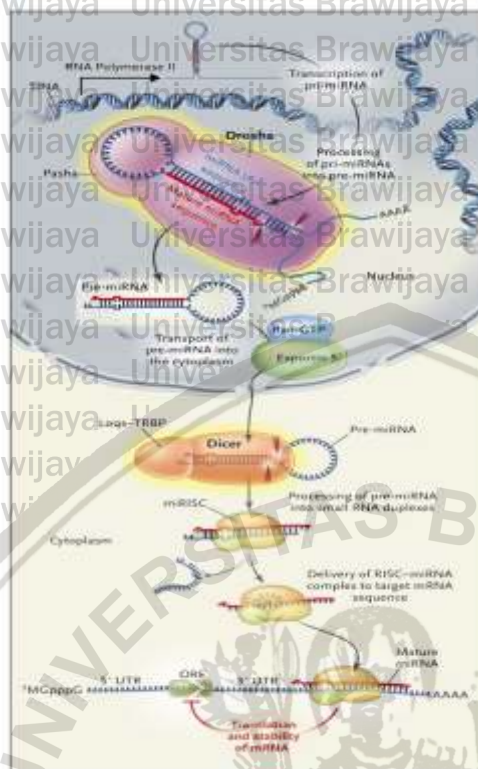
Lee pada tahun 1993 menemukan *micro ribonucleic acid* (miRNA), namun pada tahun 2001 istilah miRNA baru dikemukakan. Sedikitnya tersandi 1000 miRNA dalam genom manusia yang terletak pada semua kromosom kecuali kromosom Y. Dibuktikan miRNA memegang peran penting pada berbagai jalur proliferasi, diferensiasi dan apoptosis sel (Propkopi et al, 2015).

Mikro RNA merupakan keluarga *ribonucleic acid* (RNA) yang tidak menyandi protein (*non-coding* RNA). MiRNA tersusun atas 19-24 nukleotida yang mengatur stabilitas *mesenger ribonucleic acid* (mRNA) dengan memediasi

degradasi mRNA atau ares translasi. Pada manusia panjang rata-rata regio 3' dari mRNA adalah 700 nukleotida.

Dalam genetika molekuler, tiga daerah utama *untranslated region* (3'-UTR) adalah bagian/regio RNA pembawa pesan (mRNA) yang mengikuti kodon terminasi translasi. Molekul mRNA ditranskripsi dari sekuens/urutan DNA dan kemudian diterjemahkan ke dalam protein. Beberapa daerah dari molekul mRNA tidak mengalami translasi, termasuk daerah 5' cap, 5' *untranslated region*, 3' *untranslated region*, dan *the poly(A) tail*. Mikro RNA secara khas mengikatkan diri (*hybridize*) pada regio 3' dari mRNA yang tidak mengalami translasi. Regio 3' dari mRNA memiliki dua situs pengikatan untuk protein regulator dan untuk mikroRNA. Dengan mengikat ke situs tertentu dalam region 3' dari mRNA, miRNA dapat menurunkan ekspresi gen berbagai mRNA dengan menghambat translasi atau secara langsung menyebabkan degradasi hasil paska transkripsi mRNA yang bersangkutan (Marcucci *et al*, 2011). Regio 3' dari mRNA juga memiliki daerah *silencer* yang mengikat protein represor dan akan menghambat ekspresi mRNA. Dengan demikian miRNA terlibat dalam fase paska transkripsi dan translasi dengan mendegradasi atau memblokir translasi mRNA target, akibatnya terjadi modifikasi ekspresi gen (Bhagavathi and Czader, 2010).

Proses pembentukan miRNA diawali dari miRNA primer sering disebut sebagai pri-miRNA (Slack, 2008).



Gambar 2.5 Biogenesis mikro RNA (Slack, 2008).

Pri-miRNA ditranskripsikan oleh RNA polymerase II. MikroRNA primer dipecah oleh ribonuklease III Drosha dan protein pengikat untai ganda *deoxyribonucleic acid (DNA)* Pasha menjadi struktur pre-miRNA berbentuk seperti jepit rambut (*hairpin*) yang besarnya 70-100 nukleotida. Pre-miRNA kemudian diekspor ke sitoplasma oleh *exportin 5 / Ran GTP*. Selanjutnya pre-miRNA diproses oleh *ribonuclease III enzyme* dari Dicer menjadi miRNA yang besarnya 19-24 nukleotida. Dicer bersama-sama dengan Loqs-TRBP melaksanakan pemotongan kedua pada pre-miRNA untuk menghasilkan dupleks mi-RNA matang (*mature miRNA*). Dupleks ini kemudian masuk ke dalam kompleks protein ke-tiga yang disebut *RNA-induced silencing complex (RISC)* yang menghasilkan dan mengarahkan miRNA matang ke sasarannya (Slack, 2008).

Mikro RNA matang kemudian berikatan pada regio 3' UTR dan regio penyandi mRNA sasaran. Secara khusus, sasaran miRNA sebagian besar merupakan pasangan basa dalam untai (sekuen) kecil terdiri atas 7 nukleotida pada ujung 5' miRNA yang sekuen-nya cocok atau merupakan sekuen komplementer (*matching sequences, sequence complementarity*) dari mRNA.

Derajat kecocokan sekuen kecil yang disyaratkan ini memberikan fleksibilitas yang besar. Karena itu miRNA diduga dapat mengatur sepertiga dari semua gen penyandi dalam sel manusia. Karena itu pula ditengarai kalau ada kaitan yang nyata antara miRNA dengan faktor-faktor pengatur siklus sel, dan bahwa sel kanker sering memodifikasi fungsi regulasi miRNA tersebut yang menguntungkan proses proliferasi itu sendiri (Wang and Blelloch, 2009).

Target sasaran miRNA dikenali berdasarkan sekuen komplementer. Sebagian miRNA matang, komplementer dengan satu atau lebih mRNA. Pada manusia, situs komplementer ini biasanya terletak pada regio 3' mRNA sasaran yang tidak tertranslasi. Supaya menjadi efektif, miRNA matang membentuk kompleks dengan *RNA-induced silencing complex* (RISC). Mikro RNA yang terinkorporasi dalam *silencing complex* tersebut dapat berikatan dengan mRNA sasaran melalui pasangan basa (*base pairing*). *Base pairing* ini selanjutnya menyebabkan inhibisi translasi protein dan atau degradasi mRNA. Konsekuensinya adalah kadar protein gen sasaran berkurang, tetapi di lain pihak kadar mRNA sendiri dapat berkurang ataupun tetap (Sassen *et all.* 2008).

2.5.2 Profil Ekspresi Mikro RNA Pada Karsinoma Nasofaring

Hubungan antara miRNA dan patogenesis KNF masih sulit untuk dijelaskan. Walaupun bersifat *non-coding*, mikro RNA ikut berperan dalam proses seluler seperti inflamasi, regulasi siklus sel, respon stress seluler, diferensiasi, apoptosis, dan migrasi sel karena miRNA dapat menghambat proses translasi protein dan mengurangi stabilitas *messenger RNA* (Leva, 2014). Pada studi penelitian yang ada, ditemukan bahwa kerja beberapa miRNA dalam meregulasi targetnya mengikuti jalur pada umumnya. Hal di atas menunjukkan bahwa analisis patomekanisme miRNA merupakan solusi terbaik dalam mengevaluasi konsekuensi patobiologi dari disregulasi miRNA (Cloonan, 2008). Dari tabel 1 berikut, dapat kita lihat ekspresi beberapa miRNA pada jaringan KNF.

MicroRNA	Chromosome	Mean expression ^a		Fold change
		Normal	NPC	
Upregulated				
miR-196b	7p15	4.04	6.75	6.54
miR-138	3p21, 16q13	4.58	7.27	6.45
miR-153	21q21	7.50	10.09	6.04
miR-142-3p	17q22	9.43	11.73	4.92
miR-18a	13q31	5.20	7.50	4.92
miR-25 ^a	7q22	7.22	9.28	4.18
miR-205	1q32	16.01	18.02	4.00
miR-106a	Xq26	9.25	11.18	3.80
miR-17	13q31	10.67	12.41	3.34
miR-15b	5q26	4.68	6.59	3.27
miR-17 ^a	13q31	5.15	6.84	3.22
Downregulated				
miR-204	9q21	10.37	4.91	-4.15
miR-449a	5q11	8.54	4.42	-17.45
miR-34c-3p	11q23	11.92	8.15	-13.64
miR-187	18q12	10.23	6.80	-10.74
miR-145	5q33	16.77	13.39	-10.42
miR-143	5q33	12.50	9.17	-10.07
miR-34c-5p	11q23	9.30	6.04	-9.63
miR-34b	11q23	8.36	5.37	-7.92
miR-100	11q24	12.93	10.05	-7.36
miR-9	1q22, 5q14, 15q26	7.16	4.34	-7.07
miR-139-5p	11q13	11.59	8.83	-6.75
miR-195	17p13	9.98	7.26	-6.61
miR-149b	7p15	8.13	5.46	-6.36
miR-30a ^a	6q13	10.08	7.50	-5.99
miR-497	17p13	12.12	9.63	-5.62
miR-135a	3p21, 12q23	7.88	5.71	-4.49
miR-130a	11q12	9.94	7.84	-4.29
miR-31	9q21	12.53	10.51	-4.05
miR-199b-5p	9q34	7.67	5.74	-3.83
miR-200a	1p36	7.32	5.59	-3.32
miR-29c	1q32	7.78	6.09	-3.25
miR-152	17q21	10.30	8.65	-3.13
miR-200b	1p36	12.01	10.36	-3.13
miR-532-3p	Xp11	13.52	11.92	-3.03

Tabel 2.1 Ekspresi mikroRNA pada KNF (Chen *et al*, 2009).

Dapat dilihat bahwa pada kasus KNF, mikro RNA yang berfungsi sebagai onkogen, ekspresinya meningkat. Sementara miRNA yang berfungsi sebagai *tumor suppressor gene*, ekspresinya menurun (Chen *et al*, 2009). Informasi profil ekspresi miRNA pada jaringan KNF ini dapat digunakan untuk diagnosis ataupun penanda prognosis dari hasil terapi pada penderita KNF. Beberapa penelitian terhadap miRNA menemukan bahwa miRNA memiliki pengaruh dalam setiap fase regulasi tumorigenesis. MiRNA yang berfungsi sebagai *tumor suppressor gene* pada KNF antara lain adalah miRNA-9, miR-26, miR-29c, miR-200, dan miR-Let 7 (Iorio and Croce, 2012).

MiRNA-9 sebagai salah satu miRNA yang cukup penting pada proses patobiologi KNF, biasanya ekspresinya menurun pada KNF. Menurunnya ekspresi miRNA-9 memicu proses proliferasi, *epithelial-mesenchymal transition* (EMT), invasi, metastasis, apoptosis, dan angiogenesis sel kanker. Pada KNF, miRNA-9 berfungsi sebagai *tumor suppressor gene*. Peningkatan stadium klinis

KNF dan invasi kelenjar limfatik regional leher berhubungan dengan penurunan kadar ekspresi miRNA-9. MiRNA-9 dapat mengikat kutup 3'UTR dari CXCR4 sehingga menyebabkan penurunan ekspresi CXCR4. Penurunan CXCR4 mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan, migrasi, dan invasi sel tumor (Lu *et al*, 2014).

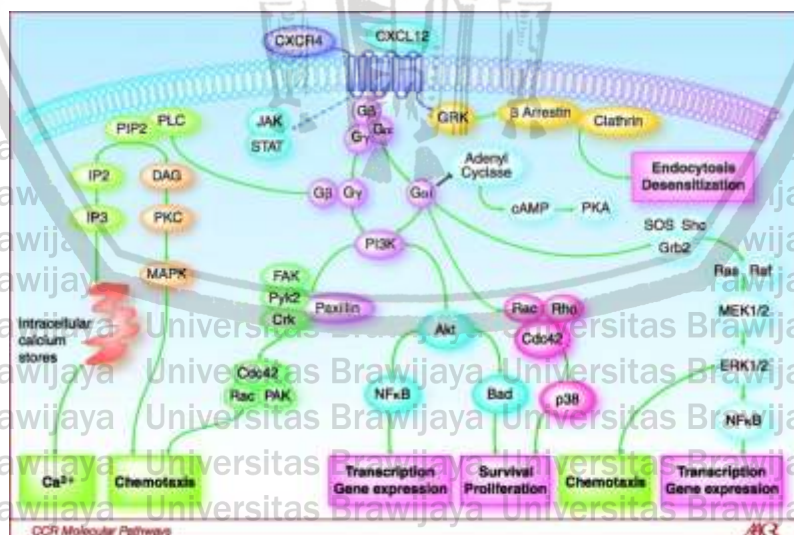
MiRNA pada KNF yang dapat mempengaruhi proses migrasi dan metastasis antara lain, miRNA 93, miRNA 378, miRNA 30a, miRNA 155, miRNA 144, miRNA 200a, dan miRNA 9. MiRNA 200a dan miRNA 9 sebagai *tumor suppressor gene*, akan menekan proses proliferasi, migrasi, dan kemampuan invasi sel ganas. Penurunan ekspresi dan miRNA 9 pada tumor primer dan plasma darah menunjukkan adanya dugaan kemampuan metastasis sel ganas, yang secara signifikan juga berkorelasi dengan stadium klinisnya dan peningkatan invasi ke kelenjar getah bening leher (Xia, 2010. Lu *et al*, 2014). miRNA terlibat dalam karsinogenesis epitel nasofaring, apoptosis sel KNF, transisi epitelial mesenkim, migrasi, dan invasi. Beberapa miRNA dikaitkan dengan prognosis klinis. Tanda + menunjukkan *upregulated* miRNA, minus tanda *downregulated* miRNA.

2.5.3 Mikro RNA 9

Mikro RNA (miRNA) merupakan molekul RNA yang tersusun oleh nukleotida yang pendek. MiRNA bersifat *non-coding*, namun dapat mempengaruhi ekspresi gen melalui *messenger* RNA (mRNA) yang menyandi protein. Sehingga diduga beberapa miRNA telah berperan dalam patogenesis keganasan.

Ekspresi miRNA-9 (miRNA-9) diatur oleh kromosom 1, 5 dan 15, dengan panjang 21 nukleotida (Tan *et al*, 2015). Penurunan ekspresi miRNA-9 memiliki konsekuensi fungsional terhadap gen target yang ada, dimana jumlah ekspresinya berkorelasi terbalik terhadap stadium klinis dan progresifitas dari tumor lokoregional menjadi tumor metastasis. Beberapa penelitian menemukan perubahan ekspresi miRNA dipengaruhi oleh perubahan epigenetik. Adanya mutasi gen melalui hipermetilasi pada daerah CpG di DNA sel ganas juga menyebabkan penurunan ekspresi miRNA-9. Metilasi DNA merupakan penambahan gugus metil pada basa sitosin tanpa disertai perubahan susunan urutan basa. Pulau CpG merupakan daerah promotor. Hipermetilasi DNA pada

CpG island mengacu pada penambahan metilasi DNA yang normalnya tidak termetilasi. Daerah promotor yang mengalami metilasi akan mengikat protein *Methyl CpG Binding Domain* (MBD), sehingga mencegah ikatan dengan faktor transkripsi. Proses terhambatnya transkripsi oleh karena metilasi pada promotor DNA menyebabkan gen tersebut tidak terekspresi. Apabila hipermetilasi terjadi pada promotor *tumor suppressor gene*, maka akan mengakibatkan terganggunya proses selular seperti kontrol proliferasi, diferensiasi dan apoptosis, yang memicu terjadinya kanker. Dapat dikatakan bahwa hipermetilasi *tumor suppressor gene* berhubungan dengan progresivitas kanker. Rendahnya tingkat miRNA-9 ekspresi pada KNF berhubungan dengan fenotip yang lebih agresif dan tingkat *survival* yang lebih buruk. Akan tetapi sampai saat ini fungsi miRNA-9 terhadap secara molekuler dalam memodulasi fenotip keganasan KNF belum semua dapat dijelaskan. Dari penelitian Lu *et al.*, dapat diketahui bahwa ekspresi miRNA-9 berfungsi sebagai *tumor suppressor gene* dan mengalami penurunan ekspresi pada KNF. miRNA-9 mentarget kemokin CXCR4 untuk menghambat proliferasi, migrasi, dan invasi sel. Pada KNF, ekspresi miRNA-9 tidak mampu menekan ekspresi reseptor CXCR4 serta aktifnya jalur *p38 mitogen activated protein kinase* (MAPK) sehingga akan meningkatkan tingkat *survival* sel serta berpotensi metastasis (Lu *et al.*, 2014). Mekanisme jalur CXCR4 – MAPK pada keganasan dapat dilihat pada gambar 2.6 berikut.



Gambar 2.6 Skematik jalur CXCL12/CXCR4 intraseluler (Teicher, 2010).

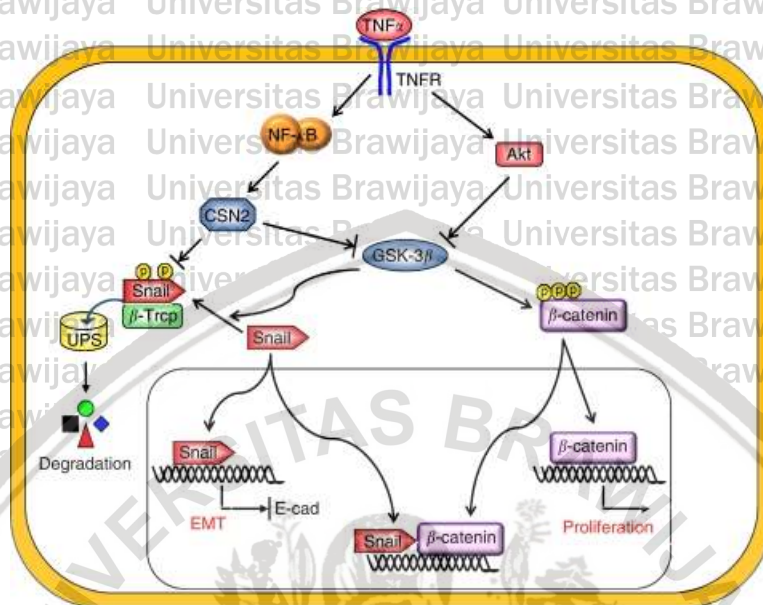
Ikatan kemokin CXCR4 dan reseptor juka akan mengaktifkan jalur *phosphoinositide 3 kinase* (PI3K). Pada proses karsinogenesis KNF, aktivasi

jalur PI3K akan memicu aktivasi *serin-threonin protein kinase* (Akt). Aktifnya *threonin* protein kinase kemudian akan memblokir gen penekan tumor p53 sehingga sel ganas mampu menghindari dari proses apoptosis. Melalui pelepasan cytochrome-c, gen p53 dapat memicu terjadinya mekanisme apoptosis. Jika terjadi keseimbangan antar protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis yang tidak stabil, maka sel kanker akan menghindari dari proses apoptosis. Sel ganas dapat bertahan untuk selalu melakukan proliferasi. Jalur *mitogen activated protein kinase* (MAPK) juga teraktivasi oleh ikatan CXCL12-CXCR4 yang akan memicu proses kemotaksis sel ganas untuk melakukan metastasis ke sel target/organ yang baru (Teicher and Flicker, 2010).

Telah dapat ditemukan beberapa miRNA yang dapat memicu proses migrasi dan metastasis sel ganas yang ada. Hal ini diketahui dengan adanya pengaruh pada proses EMT, migrasi, dan angiogenesis (Hurst *et al.*, 2009). Adanya keterlibatan transisi epitelial-mesenkimal (*Epithelial Mesenchymal Transition/ EMT*) berkaitan dengan berlangsungnya metastasis. Didapatkan penurunan jumlah faktor transkripsi *Twist* oleh siRNA pada sel kanker, dimana diketahui *Twist* berperan dalam proses awal metastasis. Peningkatan ekspresi dari *Twist* menyebabkan EMT pada sel ditandai dengan turunnya jumlah E-cadherin. Hal ini disebabkan oleh promotor *E-cadherin* yang menekan *Twist* melalui elemen E-box.

Sitoskeleton aktin mengontrol proses kompleks motilitas dan invasi sel ganas. NF- κ B1 merupakan tanda yang kuat dari sel ganas yang ikut dikontrol oleh sitoskeleton aktin. *Snail1* merupakan penginduksi potensial terhadap terjadinya proses EMT dan metastasis sel ganas. Transkripsi *Snail1* diatur oleh NF- κ B1. *Snail1* merupakan faktor transkripsi utama yang bertanggung jawab terhadap turunnya ekspresi *E-cadherin*. Turunnya ekspresi *E-cadherin* memicu perubahan fenotip sel *non-motile* menjadi sel yang *motile*. Sel ganas yang motil tersebut cenderung menginvasi target/organ lainnya. Penelitian Liu *et al.* mendapatkan bahwa efek penekanan tumor oleh miRNA-9 terjadi melalui ikatan secara langsung pada kutub 3'-UTR dari NF- κ B1 yang menyebabkan penekanan pada *Snail1* dan terjadilah peningkatan ekspresi E-cadherin. Implikasinya, penurunan ekspresi miRNA-9 pada akhirnya akan menyebabkan berkurangnya ekspresi E-cadherin juga sehingga sel ganas akan lebih mudah melakukan metastasis (Wu Y. and Zhou BP, 2010; Liu S. *et al.*, 2012). Berikut adalah

gambaran skematis jalur *TNF-alpha/NF-kappaB/Snail* pada migrasi dan invasi sel ganas gambar 2.7.



Gambar 2.7 Jalur TNF- α /NF- κ B/Snail (Wu Y. and Zhou BP. 2010).

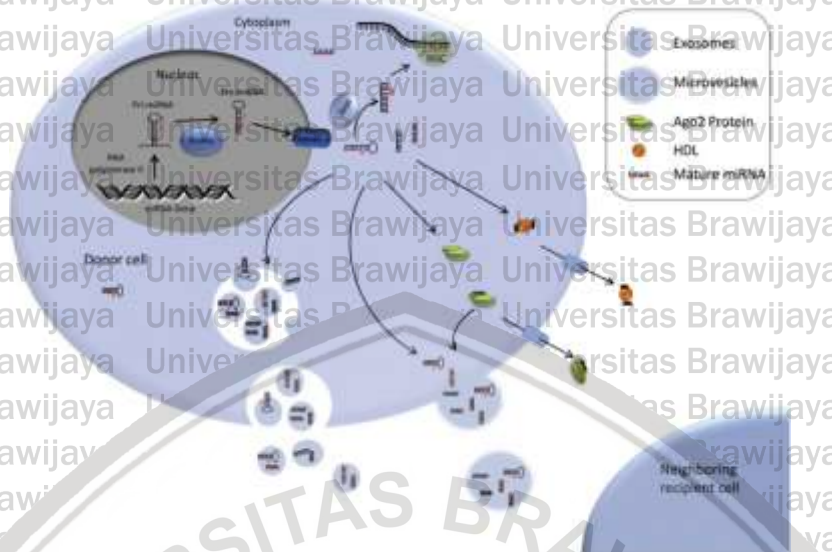
2.5.4 MikroRNA dalam serum atau plasma

Penelitian mengenai kegunaan klinis diagnostik miRNA sudah berjalan lebih dari satu dekade. Keterlibatan miRNA sebagai regulator mRNA dalam proses karsinogenesis menjadikan diagnosis yang dipandu mikroRNA (miRNA) adalah pendekatan molekuler yang kuat untuk mendapatkan informasi klinis yang signifikan dari sampel pasien. miRNA telah berhasil digunakan untuk mengidentifikasi asal jaringan kanker, menentukan prognosis dan perkembangan penyakit, memprediksi *chemoresistance*, memantau terapi, dan skrining penyakit. Deteksi disregulasi miRNAs dalam sampel klinis padat dan cairan sangat menjanjikan untuk digunakan sebagai biomarker kanker karena miRNA memiliki stabilitas yang sangat tinggi pada jaringan yang difiksasi dengan formalin (Gustafson, 2016).

Sementara sebagian besar miRNA terdeteksi di lingkungan seluler, ternyata sejumlah miRNAs, yang umumnya dikenal dengan miRNA sirkulasi atau miRNA ekstraseluler (ECmiRNA) juga terdeteksi di lingkungan ekstraseluler, termasuk cairan biologis yang berbeda (Mitchell *et al.*, 2008). miRNA ini ternyata stabil dalam sampel serum dan plasma. Walaupun serum mengandung RNase, adanya miRNA dalam serum menunjukkan bahwa miRNA resistan terhadap

perombakan oleh RNase. miRNA juga stabil pada kondisi yang tidak menguntungkan seperti pada pemanasan atau suhu tinggi, pH tinggi/rendah, tindakan pembekuan-pencairan berulang kali, dan waktu penyimpanan yang lama. (Brase *et al.*, 2010). Dalam serum, miRNA resisten terhadap pencernaan RNase, perebusan, pH rendah / tinggi, ekstensi masa penyimpanan atau siklus *freeze-thawing* yang multiple. Hal ini diduga disebabkan miRNA dibungkus dengan vesikel membran (eksosom) yang menghantarkan miRNA di lingkungan ekstraseluler dan melindunginya terhadap degradasi RNase (Sohel, 2016). Karena mikrovesikel dan eksosom juga dapat dijumpai dalam cairan tubuh lain, miRNA kemungkinan besar juga dapat ditemukan dalam cairan tubuh lain selain serum (Kosaka *et al.*, 2010; Brase *et al.*, 2010). Walaupun demikian, profil ekspresi miRNA dalam cairan tubuh seperti urin, saliva, cairan amnion, dan cairan pleura berbeda dengan profil ekspresinya dalam darah, yang membuktikan hipotesis bahwa profil mikroRNA dalam cairan tubuh merefleksikan fisiologi (Gilad *et al.*, 2008). Dalam keadaan normal, kadar *cell-free-miRNA* dalam serum stabil dan profil-nya sesuai dengan sel-sel darah dalam sirkulasi. Karena itu, perubahan dalam kadar mikroRNA serum dapat digunakan sebagai indikator adanya perubahan fisiologis maupun patologis dan dapat digunakan sebagai biomarker non-invasif. Pada beberapa penelitian terdahulu, ditemukan miRNA dapat berfungsi sebagai biomarker prognostik kanker (Li *et al.*, 2010).

Proses biogenesis miRNA dimulai dari pri-miRNA yang ditranskripsi oleh RNA polimerase II dan kemudian diproses oleh Drosha menjadi Pre-miRNA. Exportin5 mentransfer Pre-miRNA ini dari inti ke sitoplasma dimana Dicer mengolahnya menjadi miRNA matang/matur. MiRNA matang dapat digabungkan secara selektif ke dalam eksosom atau digabungkan dengan protein Ago2 dan dilepaskan ke lingkungan ekstraselular. Sebagai alternatif, mereka dapat dibungkus dengan mikrovesikel atau dilekatkan pada HDL dan kemudian dilepaskan ke lingkungan ekstraselular. Dapat dilihat pada gambar 2.8 proses biogenesis miRNA dan pelepasannya ke lingkungan ekstraselular.



Gambar 2.8 Biogenesis dan pelepasan miRNA ke lingkungan ekstraseluler (Sohel, 2016)

Saat ini, metode quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) atau reaksi rantai polimerase transkripsi balik kuantitatif dianggap sebagai metode *gold standart* dalam kuantifikasi ECmiRNA (Sohel, 2016).

2.6 Histopatologi Karsinoma Nasofaring

Klasifikasi gambaran histopatologi oleh Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) sejak tahun 1991, dibagi menjadi 3 tipe (Chan 2005).

- a) WHO tipe 1 Karsinoma sel skuamosa dengan keratinisasi (*Keratinizing Squamous Cell Carcinoma*). Tipe ini menunjukkan diferensiasi yang baik dan menghasilkan relatif cukup banyak bahan keratin.
- b) WHO tipe 2 Karsinoma sel skuamosa tanpa keratinisasi (*Nonkeratinizing Carcinoma*). Tipe ini menunjukkan diferensiasi sedang. Sel-sel ganas tersusun *stratified* atau berimpitan menyerupai gambaran pada karsinoma sel transisional tanpa keratinisasi.
- c) WHO tipe 3 Karsinoma tanpa diferensiasi (*Undifferentiated Carcinoma*). Tipe ini mempunyai gambaran patologi yang sangat heterogen dengan batas sel yang tidak jelas.

2.7 Gejala Karsinoma Nasofaring

Berdasarkan gejala terkait lokasinya, gejala pada penderita KNF menjadi empat kategori:

1. Gejala yang disebabkan akibat adanya massa tumor pada nasofaring (epitaksis, obstruksi nasal, dan *discharge*).
2. Gejala terkait dengan disfungsi tuba eustachius.
3. Gejala terkait ekstensi superior tumor (sakit kepala, diploia, nyeri wajah, kebas).
4. Massa leher

KNF sulit didiagnosis karena lokasi isolasi anatomisnya. Gejala awal tersering dialami oleh pasien adalah gangguan telinga unilateral, kemudian diikuti dengan kongesti nasal persisten disertai darah. Hanya sedikit pasien yang datang ke spesialis THT sebelum terjadi pembesaran kelenjar limfe, gejala lanjut KNF (Tabuchi, 2011; Wei & Sham, 2005).

2.7.1 Gejala Dini

Gejala telinga (Wang <i>et al</i> , 2017)	Gejala hidung
1. disfungsi tuba Eustachius: efusi telinga tengah	1. hidung tersumbat
2. otitis media serosa	2. lendir bercampur darah, epitaksis
3. tuli konduksi	3. gejala menyerupai sinusitis

2.7.2 Gejala Lanjut

1. Pembesaran kelenjar limfe regional servikal. Karena nasofaring kaya dengan jaringan limfatik, penyebaran ke nodus limfe sering ditemukan pada pasien. Nodus yang paling sering terlibat adalah nodus yang berada di level area leher II-III, terletak di bawah ujung *planum mastoid*, di belakang *angulus mandibula*, bagian tengah dari ujung atas otot sternokleidomastoid (Guo *et al*, 2009; Adham *et al*, 2012).
2. Gejala akibat perluasan tumor ke jaringan sekitar. Penjalaran tumor ke rongga tengkorak melalui foramen laserum akan mengenai saraf otak ke III, IV, V1, V2, VI. Manifestasi neuropati saraf kranial yang tersering adalah diploia (parese saraf ke III, IV, dan VI), diikuti oleh kebas pada wajah, perot wajah, dan hilangnya fungsi pengecap lidah. Penjalaran KNF ke rongga parafaringeal kemudian melalui foramen jugulare dapat mengenai

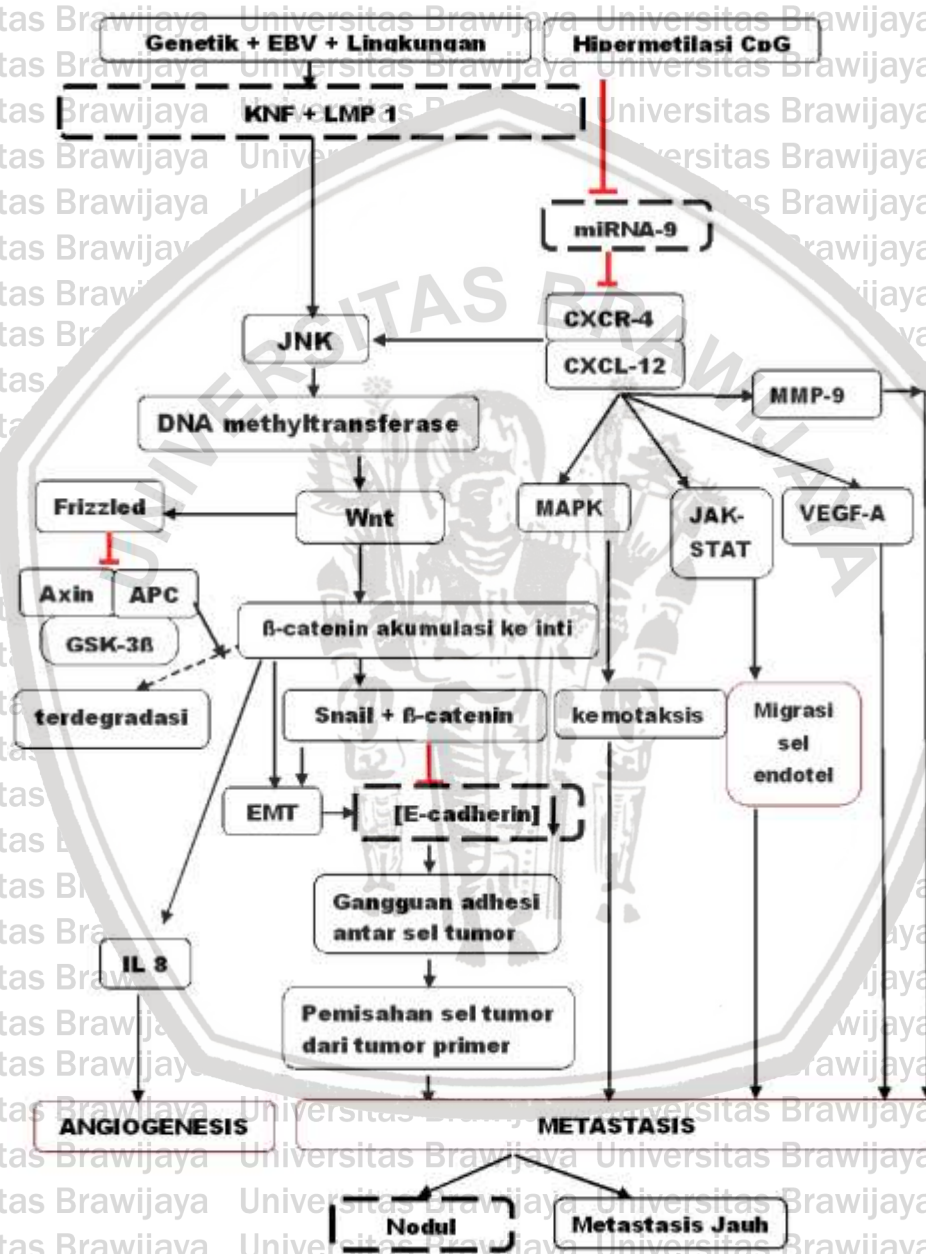
saraf otak ke IX, X, XI, XII, dan saraf simpatis. Gejala meliputi kesulitan menelan, kelemahan otot trapezius dan sternocleidomastoid, deviasi lidah, dan uvula, dan sindrom horner. Trismus juga dapat muncul jika tumor mengenai otot pterigoideus atau saraf V3 (Wang *et al*, 2017).

3. Gejala akibat metastasis. Secara berurutan dari yang tersering metastase terjadi pada tulang, hati, paru-paru (Wei & Sham, 2005).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

□ : tidak diteliti □ : diteliti

Penjelasan Kerangka Konsep

Sel nasofaring normal yang terinfeksi dengan virus Epstein Barr dan memiliki kondisi lingkungan di sekitar sel yang mendukung proses karsinogenesis akan memungkinkan virus tersebut untuk mengekspresikan beberapa onkogen laten. LMP-1 adalah onkogen potensial yang berpengaruh pada proses transformasi sel normal menjadi sel ganas melalui proses patologis molekuler di dalam sel. Selain itu, mutasi gen melalui hipermetilasi pada daerah CpG di DNA sel ganas berpengaruh pada inaktivasi fungsi supresi tumor dari miRNA-9 pada sel kanker

Aktivasi jalur Wnt menyebabkan akumulasi β -catenin di nukleus. β -catenin akan memicu proliferasi, metastasis dan angiogenesis. β -catenin akan menyebabkan penurunan kadar E-cadherin. Kadar E-cadherin yang berkurang akan menyebabkan gangguan adhesi antar sel tumor dan terjadinya pemisahan sel tumor dari tumor primer. Pada akhirnya, sel tumor mampu bermetastasis ke kelenjar getah bening regional di leher dan terus menjadi bermetastasis jauh.

MikroRNA-9, sebagai *tumor gene suppressor*, akan menghambat ekspresi reseptor CXCR4, yang kemudian menekan jalur pensinyalan CXCR-CXCL12 dan berakibat pada terhambatnya semua jalur pensinyalan yang dimediasi LMP-1 dan beberapa jalur lainnya. Jalur *mitogen activated protein kinase* (MAPK) teraktivasi oleh ikatan CXCL12-CXCR4 yang akan memicu proses kemotaksis sel ganas untuk melakukan metastasis ke sel target/organ yang baru (Teicher and Flicker, 2010). CXCR4/*Stromal Derivate Factor-1* (SDF-1) juga berperan dalam menginduksi sel tumor untuk mengeluarkan Matriks metalloproteinase 9 (MMP 9) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF-A) pada angiogenesis. VEGF-A menginduksi pertumbuhan pembuluh limfatik primer tumor, juga limfangiogenesis dalam KGB sentinel. Metastasis tumor primer melibatkan drainase KGB yang paling proksimal (sentinel) sebelum menyebar ke KGB lain. Beberapa penelitian menunjukkan hubungan yang signifikan antara peningkatan ekspresi CXCR4 dan VEGF-A dengan metatase ke KGB dan metastasis jauh (Luh, 2013).

Keseluruhan mekanisme di atas pada akhirnya menyebabkan ekspresi miRNA-9 berkurang sehingga menyebabkan efek hambatan terhadap proses metastasis berkurang, sehingga jalur Wnt dan beberapa jalur lainnya akan terus berjalan dan seluruh proses karsinogenesis KNF akan meningkat.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terdapat hubungan ekspresi E-cadherin jaringan dengan volume nodul di leher pada penderita KNF WHO tipe 3 dengan LMP-1 positif.
2. Terdapat hubungan status terdeteksinya ekspresi miRNA-9 darah dengan ukuran nodul pada KNF WHO tipe 3 dengan LMP-1 positif.
3. Terdapat perbedaan ekspresi E-cadherin jaringan nasofaring penderita KNF WHO tipe 3 antara kelompok N1, N2, dan N3.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan ekspresi miRNA-9 serum, E-Cadherin jaringan, dan nilai N sebelum pemberian kemoterapi neoadjuvan. Kemudian dari hasil pemeriksaan, dianalisis hubungan ekspresi miRNA-9 serum, E-cadherin jaringan, dengan nodul metastasis di leher.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di poliklinik THT RSUD dr. Saiful Anwar Malang, kamar operasi THT RSUD dr. Saiful Anwar Malang, Laboratorium patologi anatomi RSUD dr. Saiful Anwar Malang, Laboratorium Patologi Anatomi FK Universitas Brawijaya Malang dan di Laboratorium sentral RSSA FKUB setelah didapatkan *ethical clearance*. Waktu penelitian dilaksanakan pada November 2017- November 2018.

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah penderita karsinoma nasofaring. Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah penderita KNF baru yang datang berobat ke poliklinik THT RSUD dr. Saiful Anwar Malang pada periode waktu penelitian.

4.3.2 Pemilihan Sampel

Pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan tehnik *consecutive sampling*. Sampel penelitian adalah penderita KNF baru dengan histopatologi karsinoma undifferentiated (WHO tipe 3) dan pada pemeriksaan imunohistokimia didapatkan hasil LMP-1 positif, yang datang berobat di poliklinik THT RSUD dr. Saiful Anwar Malang dan memenuhi kriteria inklusi.

Kriteria penerimaan (inklusi):

- Penderita KNF baru dengan metastasis regional dinyatakan pada setiap N yang belum mendapat terapi kemoterapi ataupun radioterapi.
- Penderita KNF WHO tipe III.

Estimasi Besar Sampel

Penghitungan jumlah subyek menggunakan rumus Lemeshow, yaitu:

$$n = \frac{Z\alpha^2 PQ}{d^2}$$

n : besar subyek minimum

Z α : Nilai normal baku pada α 10 % yaitu 1,96

Q : 1 – P

P : Proporsi obyek mengenai karakteristik yang dipelajari diperoleh dari penelitian sebelumnya atau informasi lain. Dalam penelitian ini P adalah proporsi penderita KNF baru pada poli onkologi RSUD dr. Saiful Anwar Malang pada tahun 2013 berdasarkan data Evaluasi dan Pelaporan RSUD dr. Saiful Anwar Malang yaitu sebesar 0.0056 (Evapor, 2013)

d : Simpangan proporsi subyek yang akan diperoleh terhadap proporsi populasi yang masih ditolerir secara teoritis. Dalam penelitian ini d = 0,03

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,0056 \times (1 - 0,0056)}{0,03^2}$$

$$n = 23,7$$

Sehingga jumlah subyek minimal yang dibutuhkan sebanyak 26 orang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah :

1. Ekspresi E-cadherin jaringan
2. Ekspresi miRNA-9 darah

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah :

1. Ukuran nodul metastase regional (nilai N)

4.5. Definisi Operasional

1. Histopatologi KNF menurut WHO tipe 3 yaitu karsinoma undifferentiated dimana jaringan biopsi nasofaring memiliki gambaran histopatologi sel

ganas yang sangat heterogen, berbentuk *syncytial* dengan batas yang tidak jelas.

2. Ekspresi LMP-1 adalah adanya reseptor onkogen LMP-1 yang diperoleh dengan pemeriksaan imunohistokimia oleh seorang ahli dalam bidang Patologi Anatomi. Data yang diperoleh merupakan skala nominal. Hasilnya positif jika tampilan pulasan warna cokelat. Hasil negatif jika tidak didapatkan tampilan pulasan cokelat pada sel KNF.
3. E-Cadherin adalah ekspresi protein E-Cadherin yang ditentukan dengan pemeriksaan imunohistokimia oleh seorang ahli dalam bidang Patologi Anatomi. Data kuantitatif diperoleh dalam berupa skala ukur persentase (rasio). Persentase data merupakan jumlah tampilan pulasan warna cokelat per seluruh lapang pandang.
4. Mikro RNA 9 adalah ekspresi miR-9 yang ditentukan dengan pemeriksaan RT-PCR dengan menggunakan miRCURY RNA Isolation Kit-Biofluids (Exiqon) oleh seorang ahli dalam bidang Patologi Klinik. Data diperoleh dalam skala nominal berupa status terdeteksinya (terdeteksi/tidak terdeteksi) ekspresi miRNA-9 serum pada siklus 60x pemeriksaan RT-PCR.
5. Ukuran/volume besarnya nodul di leher (nilai N) akan diukur menggunakan jangka sorong dan dinyatakan dalam satuan sentimeter. Data diperoleh dalam skala ordinal berupa nilai N berdasarkan AJCC tahun 2012.
6. Data kuantitatif E-cadherin, dan miRNA merupakan data primer. Besarnya ukuran nodul diukur merupakan data sekunder yang diperoleh dari logbook terapi pasien kanker poli THT RSUD dr. Saiful Anwar.
7. Stadium KNF berdasarkan AJCC tahun 2012.

Kategori		AJCC/UICC
T (Tumor)	T1	Terbatas pada nasofaring atau tumor meluas ke orofaring dan/ kavum nasi tanpa perluasan ke parafaring
	T2	Tumor dengan perluasan ke daerah parafaring
	T3	Melibatkan struktur tulang dasar tengkorak dan/atau sinus paranasalis

	T4	Perluasan intrakranial dan/atau terlibatnya saraf kranial hipofaring, orbita, atau dengan perluasan ke fossa infratemporal/ruang masticator
	N0	Tidak ada metastasis ke KGB regional
N (Node)	N1	Metastasis KGB leher unilateral dengan diameter terbesar 6 cm atau kurang, di atas fossa supraklavikular, dan/atau unilateral atau bilateral kelenjar getah bening retrofaring dengan diameter terbesar 6 cm atau kurang
	N2	Metastasis kelenjar getah bening bilateral dengan diameter terbesar 6 cm atau kurang, di atas fossa supraklavikular
	N3	Metastasis pada kelenjar getah bening diatas 6 cm dan/atau pada fossa supraklavikular (a) Diameter terbesar > 6 cm (b) Perluasan ke fossa supraklavikula
M (Metastase)	M0	Tidak ada metastasis jauh
	M1	Ada metastasis jauh
Stadium I	T1 N0 M0	
Stadium II	T1 N1 M0 T2 N0 / N1 M0	
Stadium III	T1 / T2 N2 M0 T3 N0 / N1 / N2 M0	
Stadium IV	(a) T4 N0 / N1 / N2 M0 (b) Semua T, N3 M0 (c) Semua T, semua N, M 1	

Tabel 4.1 Stadium KNF

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1. Instrumen Penelitian

1. Set biopsi nasofaring
2. Nasoendoskopi
3. *Automatic tissue processor* dengan nama dagang Microm

4. Pemotong parafin dengan nama dagang Leica
5. Mikroskop binokuler tipe CX21 dengan nama dagang Olympus
6. Alat sentrifugasi

4.6.2. Persiapan

1. Membuat proposal penelitian, lembar pengumpul data, dan surat persetujuan ikut serta penelitian.
2. Memberikan penjelasan tentang penelitian ini kepada mitra kerja yang terdiri dari dokter dan perawat di poliklinik THT-KL RSUD dr Saiful Anwar Malang, petugas kamar operasi THT RSUD dr Saiful Anwar Malang, petugas laborat di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr Saiful Anwar Malang, petugas laborat di Laboratorium Sentral RSUD dr Saiful Anwar Malang serta petugas laborat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Biopsi nasofaring dengan tuntunan nasoendoskopi

- a) Biopsi nasofaring dilaksanakan di kamar operasi THT RSSA.
- b) Biopsi nasofaring dilakukan oleh dokter ahli THT seksi Onkologi di kamar operasi THT RSSA.
- c) Teknik biopsi nasofaring
 1. Penderita posisi duduk atau tidur terlentang.
 2. Anestesi dengan memasang tampon lidokain 2 % cum efedrin 1 % dan atau lidocain 8 % selama \pm 15 menit, bila perlu ditambah spray xylocain 10 %
 3. Nasoendoskopi dimasukkan ke dalam rongga hidung diposisikan pada daerah nasofaring
 4. Dilakukan biopsi dengan *Blakesley* pada jaringan nasofaring
 5. Dipasang tampon hidung
 6. Spesimen jaringan difiksasi dengan larutan formalin 10 % untuk pemeriksaan patologi anatomi.

4.7.2 Pemeriksaan histopatologi anatomi.

- A. Pemeriksaan histopatologi anatomi dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi RSSA.

B. Pemeriksaan histopatologi dilakukan oleh dokter yang bertugas di Laboratorium Patologi Anatomi RSSA.

C. Teknik Pemeriksaan

1. Fiksasi dengan buffer formalin 10% selama 2 jam
2. Dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 95% dan absolut tiga kali masing-masing selama 1,5 jam
3. *Clearing* dengan xilol tiga kali, yang pertama selama 1 jam dan berikutnya masing-masing selama 1,5 jam
4. Infiltrasi parafin cair dua kali, yang pertama selama 1,5 jam dan kedua selama 2 jam

5. Pemotongan dengan *rotary microtome*.

6. Inkubasi dengan suhu 50° C selama 15 menit

7. Pengecatan dengan *Hematoxylin Eosin*

8. Hasil diperiksa di bawah mikroskop

4.7.3 Deteksi ekspresi LMP1 dengan imunohistokimia

1. Pengukuran LMP1 dengan imunohistokimia dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UNIBRAW

2. Pengukuran LMP1 dengan imunohistokimia dilakukan oleh tenaga ahli Laboratorium Patologi Anatomi FK UNIBRAW

3. Teknik pemeriksaan imunohistokimia

1) Pembuatan paraffin block

a) Jaringan dicuci dengan PBS

b) Difiksasi dengan formalin 10%

c) Dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut)

d) *Clearing* menggunakan xilol 2 kali, masing-masing 60 menit

e) Infiltrasi menggunakan paraffin lunak selama 60 menit pada suhu 480°C.

f) *Block* dalam paraffin keras pada cetakan dan didiamkan sehari.

g) Tempelkan. Pada *holder* dilakukan pemotongan setebal 4-6 mm dengan *rotary microtome*.

h) *Mounting* pada objek dengan gelatin 5%

2) Proses deparafinisasi

a) *Slide* direndam xilol 2 kali, masing-masing selama 5 menit.

- b) Rehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolute) masing-masing 5 menit
- c) Bilas dengan H₂O selama 5 menit
- 3) Proses imunohistokimia terhadap reseptor LMP1.
 - a) *Slide* preparat dicuci dengan PBS pH 7,4
 - b) Aplikasikan 3% H₂O₂ (daco, Inc) selama 10 menit.
 - c) Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
 - d) *Blocking* menggunakan serum 2% BSA (Sigma USA) selama 60 menit (1%)
 - e) Inkubasi dengan antibodi primer LMP1 semalam pada suhu 40C (1:100)
 - f) Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
 - g) Tetesi dengan antibodi sekunder berlabel dan inkubasi selama 1 jam (1:200)
 - h) Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
 - i) Tetesi dengan SA-HKP (*Strep Avidin horse radis peroxidase*) selama 40 menit (1:500)
 - j) Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
 - k) Aplikasikan kromogen untuk HRP yaitu DAB (*Diamono Benzidine*)
 - l) Bilas dengan H₂O
 - m) Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
 - n) *Counter staining* dengan *Mayer Hematoxilen* (lab Vision) 10 menit
 - o) Cuci dengan *tap water*
 - p) Kering anginkan dan *mounting*
 - q) menggunakan entelan serta *cover glass*
- 4) Dilakukan interpretasi pembacaan hasil imunohistokimia

4.7.4 Deteksi Ekspresi E-Cadherin dengan metode Imunohistokimia.

1. Pengukuran E-cadherin dengan imunohistokimia dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UNIBRAW.
2. Pengukuran E-cadherin dengan imunohistokimia dilakukan oleh tenaga ahli Laboratorium Patologi Anatomi FK UNIBRAW
3. Tehnik pemeriksaan imunohistokimia
 - 1) Pembuatan paraffin block
 - a) Jaringan dicuci dengan PBS
 - b) Difiksasi dengan formalin 10%

- c) Dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut)
 - d) *Clearing* menggunakan xilol 2 kali, masing-masing 60 menit.
 - e) Infiltrasi menggunakan paraffin lunak selama 60 menit pada suhu 480°C.
 - f) *Block* dalam paraffin keras pada cetakan dan diamkan selama sehari.
 - g) Tempelkan. Pada *holder* dilakukan pemotongan setebal 4-6 mm dengan *rotary microtome*.
 - h) *Mounting* pada objek dengan gelatin 5%
- 2) Proses deparafinisasi
- a) *Slide* direndam xilol 2 kali, masing-masing selama 5 menit.
 - b) Rehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolute) masing-masing 5 menit
 - c) Bilas dengan H₂O selama 5 menit
- 3) Proses imunohistokimia terhadap reseptor E-cadherin.
- a) *Slide* preparat dicuci dengan PBS pH 7,4
 - b) Aplikasikan 3% H₂O₂ (daco, Inc) selama 10 menit.
 - c) Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
 - d) *Blocking* menggunakan serum 2% BSA (Sigma USA) selama 60 menit (1%)
 - e) Inkubasi dengan antibodi primer E- Cadherin semalam pada suhu 40C (1:100)
 - f) Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
 - g) Tetesi dengan antibodi sekunder berlabel dan inkubasi selama 1 jam (1:200)
 - h) Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
 - i) Tetesi dengan SA-HKP (*Strep Avidin horse radis peroxidase*) selama 40 menit (1:500)
 - j) Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
 - k) Aplikasikan kromogen untuk HRP yaitu DAB (*Diamono Benzidine*)
 - l) Bilas dengan H₂O
 - m) Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali
 - n) *Counter staining* dengan *Mayer Hematoxilen* (lab Vision) 10 menit
 - o) Cuci dengan *tap water*
 - p) Kering anginkan dan *mounting*

q) Menggunakan entelan serta *cover glass*

r) Dilakukan interpretasi pembacaan hasil imunohistokimia dengan menggunakan *software immunoratio*.

4.7.4 Isolasi miRNA total dari Sampel Biofluid

Tahapan isolasi miRNA dan qPCR miRNA-9 meliputi proses ekstraksi RNA total dari biofluid, sintesis cDNA miRNA dan qPCR miRNA berdasarkan protokol miRNA Exiqon.

1. Persiapan reagent RNA Spike In Kit Template (Exiqon #203203),

a. Spin down vial/tube semua reagent kit sebelum dibuka

b. Tambahkan 80 μL ddH₂O kedalam masing-masing vial, kemudian diamkan selama 20 menit didalam ice

c. Kemudian Vortek dan spin down. Simpan kedalam -20°C

d. Untuk memulai ekstraksi RNA, tambahkan 1 μL RNA Spike-in kit per reaksi/sampel yang akan diisolasi.

- Pada 600 μL lisis buffer tambahkan 1 μL RNA Spike-in template sebelum ditambahkan kedalam sampel yang akan diisolasi (biopsi);

- Pada 60 ul lisis solution BF tambahkan 1 μL RNA Spike-in template sebelum ditambahkan kedalam sampel yang akan diisolasi (biofluid).

b) Ekstraksi/purifikasi miRNA total dari sampel biofluid dilakukan dengan menggunakan miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids (Exiqon #300112).

a. Cairkan larutan biofluid dalam ice dengan kebutuhan sampel sbb:

	Blood/plasma	Urine	CSF	Other biofluids*
Human samples	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
Rodent samples	50 μL **	200 μL	Not tested	50 μL **
RNA eluate input to 20 μL cDNA synthesis reaction***	4 μL	4 μL	8 μL	4 μL

b. Note: Jika sampel kurang 200 ul dapat ditambahkan ddH₂O hingga vol 200 ul

c. Sentrifuse sampel pada 3000xg selama 5 menit, kemudian ambil 200 ul supernatan kedalam tube baru

d. Supernatan ditambahkan 60 ul *lisis solution* BF, kemudian vorteks selama 5 menit dan inkubasikan selama 3 menit pada suhu ruang. Rekomendasi tambahkan 1 ul RNA spike-in kedalam 60 ul *lisis solution* BF.

e. Tambahkan 20 ul protein precipitation solution BF, kemudian vortek selama 5 detik inkubasi selama 1 menit pada suhu ruang

- f. Sentrifuse sampel selama 3 menit pada 11000 x g
- g. Pindahkan supernatan yang bening kedalam tube 2ml baru
- h. tambahkan 270 ul Isopropanol kemudian vorteks selama 5 detik
- i. Tempatkan kolom microRNA mini spin columns BF dan masukkan sampel kedalam kolom, inkubasi selama 2 menit pada suhu ruang. Kemudian, sentrifuse 11000 xg selama 20 detik
- j. Tambahkan 100 ul Wash silution 1 BF kedalam kolom BF, kemudian sentrifuse pada 11000xg selama 30 detik
- k. Tambahkan 700 ul Wash solution 2 BF kedalam kolom dan sentrifuse pada 11000xg selama 30 detik
- l. Tambahkan 250 ul wash solution 2 BF kedalam kolom BF. Kemudian sentrifuse 2 menit selama 11000xg
- m. Tempatkan kolom BF dalam tube baru (1.5 mL), kemudian tambahkan 50 ul RNase free H₂O/ elution buffer kemudian inkubasi selama 1 menit dalam suhu ruang dan tutup tube sentrifuse 11000xg selama 1 menit
- n. Simpan sampel RNA total kedalam -80°C

4.7.5 Sintesis cDNA dan deteksi keberhasilan hasil isolasi miRNA total

Proses sintesis DNA dari sample RNA dapat dilakukan dengan memanfaatkan enzyme reverse transcriptase. Melalui proses reaksi reverse transcriptase, template RNA akan diubah menjadi first-strand cDNA yang selanjutnya dapat digunakan sebagai template untuk proses Polymerase Chain Reaction (PCR). Tahapan sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit II (Exiqon #203301).

Prosedur miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR

➤ Sintesis cDNA

1. Dilusi RNA. Ukur konsentrasi RNA total hasil ekstraksi dengan nanodrop, kemudian dilusi menjadi 5 ng/ul menggunakan ddH₂O
2. Mastermix cDNA. Buat mastermix dengan komposisi sbb:

Reagent	Volume (μL), RT reaction
5x Reaction buffer	2
Nuclease-free water	4.5
Enzyme mix	1
Synthetic RNA spike ins, optional replace with H ₂ O if omitted	0.5
Template total RNA (5 ng/ μL)	2
Total volume	10

- Mix dan spin reagent. Campurkan setiap tube dengan pipeting pastikan semua tercampur dengan sempurna, setelah itu lakukan spin down
- Inkubasi dan inaktivasi. Atur pada mesin PCR/ inkubator dengan program berikut

Step 1 : Inkubasi 42°C selama 60 menit

Step 2 : Inaktivasi pada 95°C selama 5 menit

Step 3 : Cooling 4°C

- Simpan cDNA yang telah di sintesis di 4°C/ freezer hingga saat akan digunakan.

4.7.6 Deteksi Ekspresi miR-9 dengan metode RT-qPCR.

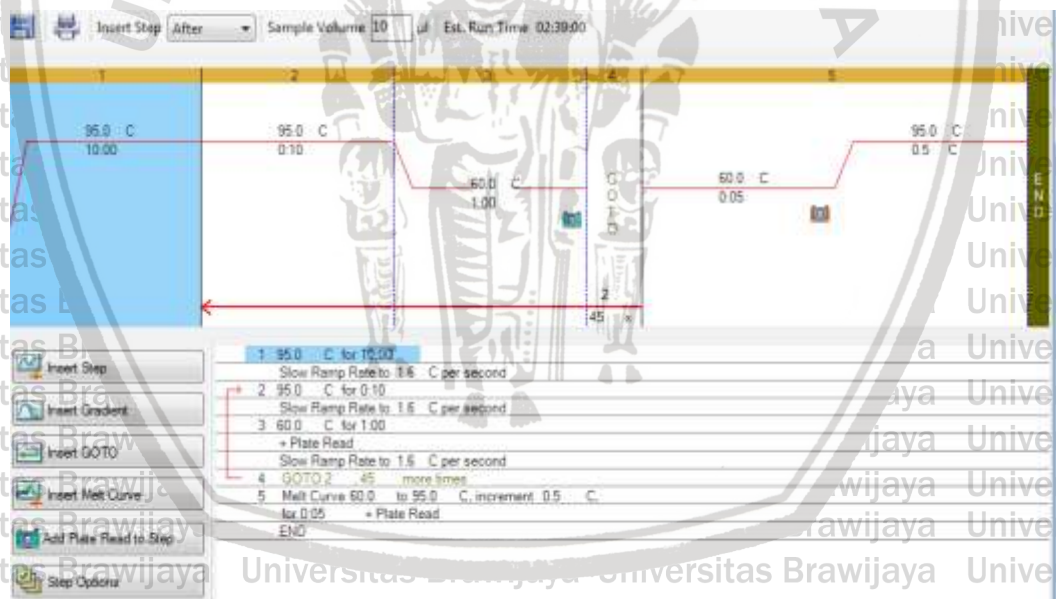
➤ Prosedur qPCR miRNA EXIQON

- Preparasi reagent realtime. Siapkan semua reagent (ddH₂O, mastermix, primer LNA) kedalam ice selama 15 - 20 menit (tunggu hingga mencair). Kemudian, vortek dan spin down reagent tersebut
- Dilusi cDNA 80x dalam ddH₂O. Dilusi cDNA yang dihasilkan menjadi 80x kedalam ddH₂O (contoh. Tambahkan 395 μL ddH₂O setiap 5 μL cDNA).
Note: tidak direkomendasikan dilusi cDNA 1:80 untuk disimpan.
- Pembuatan mastermix qPCR.

Reagent	Volume (μL)/ reaction
PCR Master mix	5
PCR primer set	1
Diluted cDNA template	4
Total volume	10

4. Mix dan spin reagent. Pada qPCR Tube (BioRad #TLS0851 dan #TCS0803), campurkan reagent qPCR kemudian spindown selama 2 menit
5. Realtime PCR amplifikasi. Protocol qPCR Biorad (CFX96 qPCR) untuk miRNA Exiqon sbb:

Process step	Settings, other instrument
Polymerase	
Activation/ Denaturation	95°C, 10 min
Amplification	40 amplification cycles at 95°C, 10 s 60°C, 1 min, ramp-rate 1.6°C/s6) Optical read
Melting curve analysis7)	Yes



6. Data analisis: Analisis hasil qPCR, rumus percobaan dengan ratio ekspresi= $2^{-\Delta\Delta Ct}$

4.7.7 Pengukuran nodul leher pasien menggunakan jangka sorong

1. Pengukuran nodul leher pasien dilakukan dengan menggunakan jangka sorong dengan taraf ketelitian 0,05.

2. Bersihkan permukaan nodul dan jangka sorong dari segala sesuatu yang dapat memengaruhi hasil pengukuran.
3. Pengukuran nodul leher pasien dilakukan dengan mengukur diameter terbesar nodul leher pasien.
4. Pengukuran dilakukan oleh PPDS THT RSSA

4.7.8 Semua hasil data dicatat dalam lembar pengumpulan data.

4.8 Analisis Data

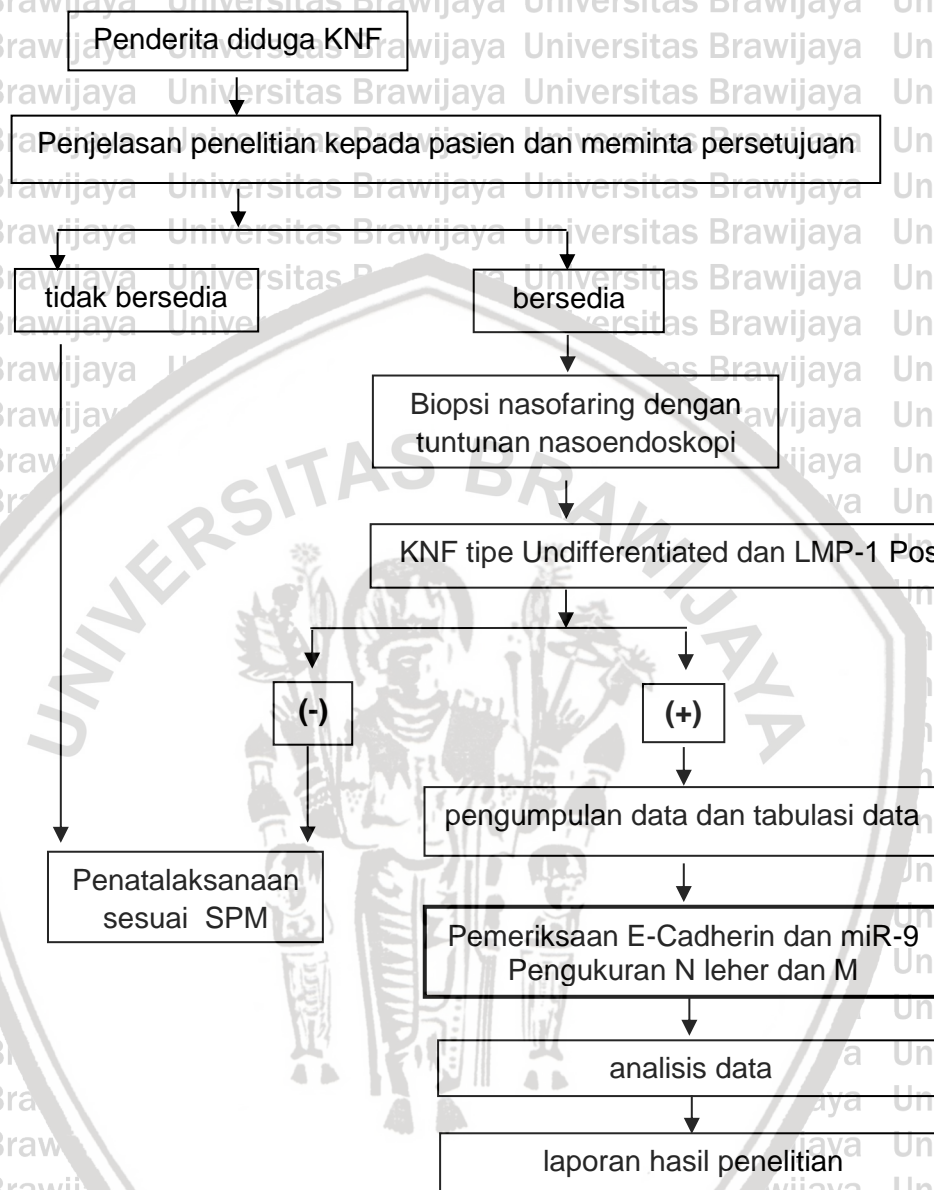
Seluruh teknis pengolahan data hasil penelitian dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solution*, IBM SPSS Statistics 24 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif adalah sebagai berikut :

1. Uji normalitas dengan SPSS dapat dilakukan dengan uji Shapiro wilk.
2. Hubungan antara ekspresi E-cadherin jaringan dengan volume nodul dianalisis menggunakan uji Pearson.
3. Hubungan antara status terdeteksinya ekspresi miR-9 darah dengan ukuran nodul yang terpalpasi (nilai N) dianalisis menggunakan uji Chi-Square.
4. Perbedaan ekspresi E-cadherin jaringan nasofaring penderita KNF WHO tipe 3 antara kelompok N0, N1, N2, dan N3 dianalisis menggunakan Mann-Whitney

4.9 Etika Penelitian

Ethical clearance telah diajukan pada tim etik penelitian di rumah sakit Saiful Anwar Malang.

4.10 Kerangka Operasional Penelitian

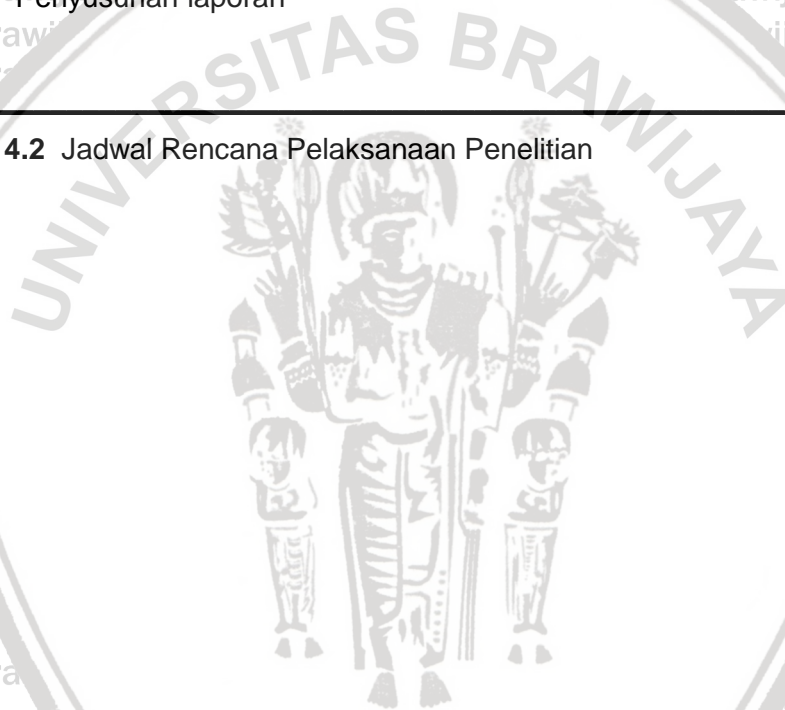


Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

4.11 Jadwal Rencana Pelaksanaan Penelitian

Kegiatan	Bulan ke-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Proposal				√	√	√						
2. Ethical clearance dan persiapan bahan				√								
3. Pengumpulan data					√	√	√	√	√	√		
4. Evaluasi hasil, analisis dan pengolahan data										√	√	√
5. Penyusunan laporan												√

Tabel 4.2 Jadwal Rencana Pelaksanaan Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Rancangan penelitian ini adalah observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional* untuk mengetahui hubungan ekspresi E-cadherin jaringan dan miRNA-9 darah dengan besarnya ukuran nodul metastasis di leher pada penderita KNF. Semua subyek dilakukan pemeriksaan ekspresi E-cadherin dari jaringan biopsi nasofaring, dan miRNA-9 dari serum vena perifer, dan dilakukan pengukuran diameter nodul metastasis di leher menggunakan jangka sorong. Sampel yang digunakan dalam penelitian yaitu penderita KNF baru dengan gambaran histopatologi karsinoma *undifferentiated* (WHO tipe 3) dan pada pemeriksaan imunohistokimia didapatkan ekspresi LMP-1 positif, yang datang berobat di poliklinik THT RSUD dr. Saiful Anwar Malang. Kriteria inklusi penelitian ini adalah penderita KNF baru dengan metastasis regional dinyatakan pada setiap N, dan belum pernah menjalani radioterapi ataupun kemoterapi. Pada penelitian yang telah dilakukan, peneliti memperoleh sampel sebanyak 26 pasien. Hasil penelitian ini disajikan secara deskriptif maupun analitik. Beberapa karakteristik umum dari subyek penelitian dapat dilihat dari data-data berikut:

5.1 Karakteristik Subyek Penelitian

5.1.1 Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Jenis Kelamin

Dari 26 subyek penelitian sebagian besar dari sampel yang didapatkan adalah laki-laki dengan jumlah yang lebih besar daripada perempuan. Jumlah laki-laki 21 orang atau sekitar 81% dari seluruh sampel dan jumlah perempuan dengan jumlah 5 orang atau 19%. Oleh karena itu, rasio antara kelompok sampel laki-laki dan perempuan sebesar 4,3:1. Rasio tersebut memberikan gambaran bahwa jumlah pasien laki-laki lebih dominan dibandingkan dengan perempuan.

Berikut adalah karakteristik subyek penelitian berdasarkan jenis kelamin:

Tabel 5.1 Karakteristik Subyek Berdasarkan Jenis Kelamin

No	Jenis Kelamin	Jumlah	Persentase
1	Laki-laki	21	81%
2	Perempuan	5	19%
	Jumlah Total	26	100%

Sumber data sekunder: logbook terapi pasien kanker poli THT RSUD dr. Saiful Anwar tahun 2017-2018 yang diolah oleh peneliti.

5.1.2 Karakteristik subyek Penelitian Berdasarkan Usia

Berikut adalah karakteristik subyek penelitian berdasarkan usia:

Tabel 5.2 Karakteristik Subyek Berdasarkan Usia

Kelompok Usia		
Umur Pasien	Jumlah (n)	Persentase (%)
11-20 tahun	1	4%
21-30 tahun	1	4%
31-40 tahun	3	12%
41-50 tahun	6	23%
51-60 tahun	7	27%
61-70 tahun	7	27%
>=71 tahun	1	4%
Total	26	100%
Usia rerata	51.5	

Sumber data sekunder: logbook terapi pasien kanker poli THT RSUD dr. Saiful Anwar tahun 2017-2018 yang diolah oleh peneliti.

Pasien KNF memiliki distribusi umur yang berbeda. Dari 26 sampel penelitian, didapatkan kelompok usia pasien karsinoma nasofaring terbanyak adalah usia 51-60 dan 61-70 tahun masing-masing sebanyak 7 orang (27%). Kelompok usia penderita terbanyak berikutnya adalah kelompok usia 41-50 sebanyak 6 orang (23%). Selanjutnya, kelompok usia 31-40 tahun sebanyak 3 orang (12%). Kelompok usia 11-20 tahun, 21-30, dan >=71 tahun masing-masing hanya 1 orang (4%). Usia termuda pasien KNF pada penelitian ini adalah 19 tahun, dan usia tertua adalah 71 tahun, dengan usia rata-rata adalah 51.5 tahun.

5.1.3 Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Lateralisasi Pembesaran KGB Leher

Berikut adalah karakteristik subyek penelitian berdasarkan lateralisasi pembesaran KGB leher:

Tabel 5.3 Karakteristik Subyek Berdasarkan Lateralisasi Pembesaran KGB Leher

Lateralisasi	Jumlah (n)	Persentase (%)
Unilateral	8	31%
Bilateral	18	69%
Total	26	100%

Sumber data sekunder: logbook terapi pasien kanker poli THT RSUD dr.

Saiful Anwar tahun 2017-2018 yang diolah oleh peneliti.

Dari 26 sampel penelitian, didapatkan pembesaran kelompok KGB leher terbanyak di level II dengan lateralisasi paling banyak terjadi secara bilateral. Sebanyak 24 orang mengalami pembesaran kelompok KGB leher di level II. Pembesaran kelompok KGB bilateral ditemukan sebanyak 18 orang (69%), dan unilateral sebanyak 8 orang (31%).

5.1.4 Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Tumor

Dari hasil CT scan kepala dan leher, ditemukan terbanyak adalah gambaran tumor T2 sebanyak 9 orang (35%), selanjutnya gambaran tumor T3 sebanyak 8 orang (31%), T4 sebanyak 7 orang (27%), dan T1 sebanyak 2 orang (8%). Distribusi gambaran tumor berdasarkan hasil CT scan kepala dan leher dapat dilihat pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 Karakteristik Subyek Berdasarkan Tumor

Tumor	Jumlah (n)	Persentase (%)
T1	2	8%
T2	9	35%
T3	8	31%
T4	7	27%
Total	26	100%

Sumber data sekunder: logbook terapi pasien kanker poli THT RSUD dr.

Saiful Anwar tahun 2017-2018 yang diolah oleh peneliti.

5.1.5 Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Nodul Kelenjar Getah

Bening

Pada penelitian ini didapatkan nodul terbanyak yaitu nodul N3 sebanyak 11 orang (42%). Selanjutnya gambaran metastasis nodul KGB leher N1 sebanyak 8 orang (31%), N2 sebanyak 7 orang (27%). Distribusi pasien karsinoma nasofaring berdasarkan nodul kelenjar getah bening leher dapat dilihat pada tabel 5.5.

Tabel 5.5 Karakteristik Subyek Berdasarkan Nodul Kelenjar Getah Bening Leher

Nodul	Jumlah (n)	Persentase (%)
N1	8	31%
N2	7	27%
N3	11	42%
Total	26	100%

Sumber data sekunder: logbook terapi pasien kanker poli THT RSUD dr.

Saiful Anwar tahun 2017-2018 yang diolah oleh peneliti.

5.1.6 Karakteristik Subyek Penelitian Berdasarkan Stadium

Stadium KNF subyek penelitian berdasarkan AJCC/UICC tahun 2012 terbanyak adalah karsinoma nasofaring stadium IV sebanyak 14 orang (54%). Pasien dengan karsinoma nasofaring stadium III sebanyak 9 orang (35%), stadium II sebanyak 3 orang (12%), dan tidak ditemukan karsinoma nasofaring stadium I.

Tabel 5.6 Karakteristik Subyek Berdasarkan Stadium

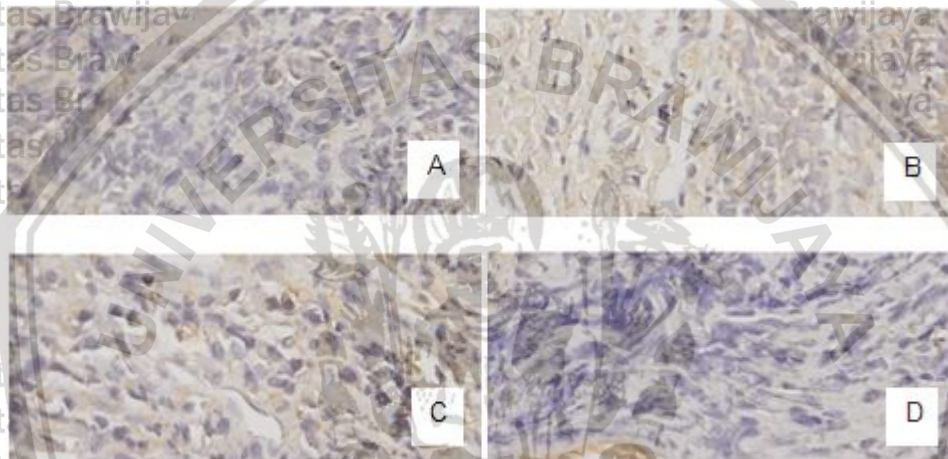
Stadium	Jumlah (n)	Persentase (%)
I	0	0%
II	3	12%
III	9	35%
IVa	1	4%
IVb	10	38%
IVc	3	12%
Total	26	100%

Sumber data sekunder: logbook terapi pasien kanker poli THT RSUD dr.

Saiful Anwar tahun 2017-2018 yang diolah oleh peneliti.

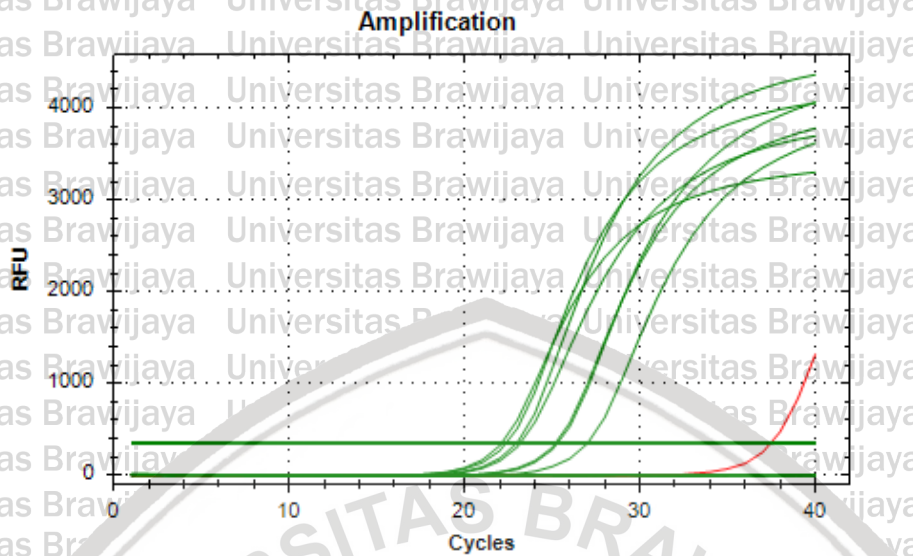
5.2 Ekspresi E-cadherin Jaringan dan miRNA-9 Darah Pasien KNF WHO Tipe 3 dengan LMP-1 Positif

Ekspresi protein E-cadherin ditentukan dengan pemeriksaan IHK. Data kuantitatif diperoleh dalam berupa skala ukur persentase (rasio) menggunakan perangkat lunak *ImmunoRatio*. Persentase data merupakan jumlah ekspresi miRNA-9 yang ditentukan dengan pemeriksaan RT-PCR. Data yang digunakan dalam penelitian ini berupa skala nominal dengan menilai terdeteksi atau tidak terdeteksinya ekspresi miRNA-9. RT PCR akan memonitor amplifikasi target secara *real time* melalui sinyal pendaran spesifik target yang dipancarkan selama amplifikasi.

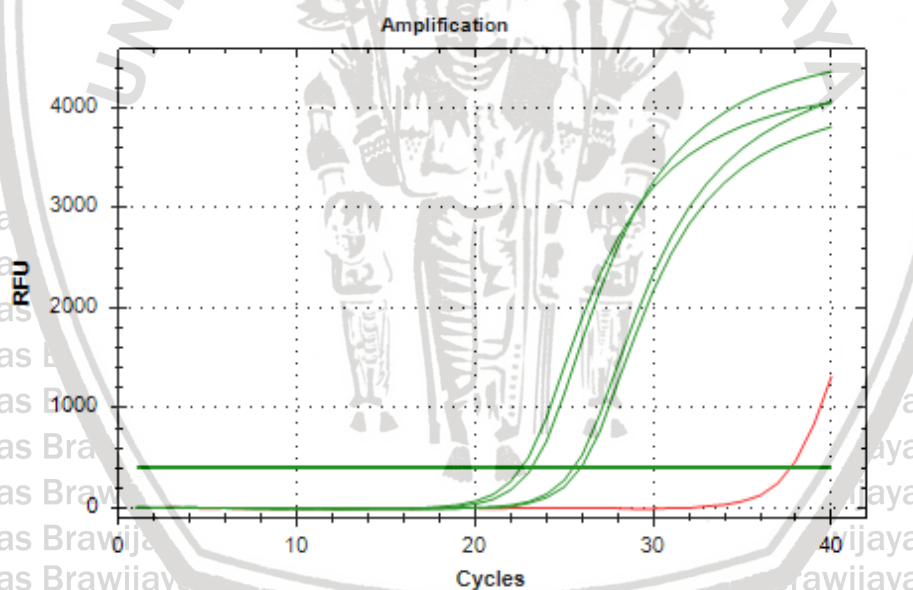


Gambar 5.1 Hasil Positif Pulasan Imunohistokimia: (A) Ekspresi E-cadherin sebanyak 26.6% dinilai dengan perangkat lunak *ImmunoRatio*; (B) Ekspresi E-cadherin sebanyak 69.2% dinilai dengan perangkat lunak *ImmunoRatio*; (C) Ekspresi E-cadherin sebanyak 64.1% dinilai dengan perangkat lunak *ImmunoRatio*; (D) Ekspresi E-cadherin sebanyak 14.5% dinilai dengan perangkat lunak *ImmunoRatio*.

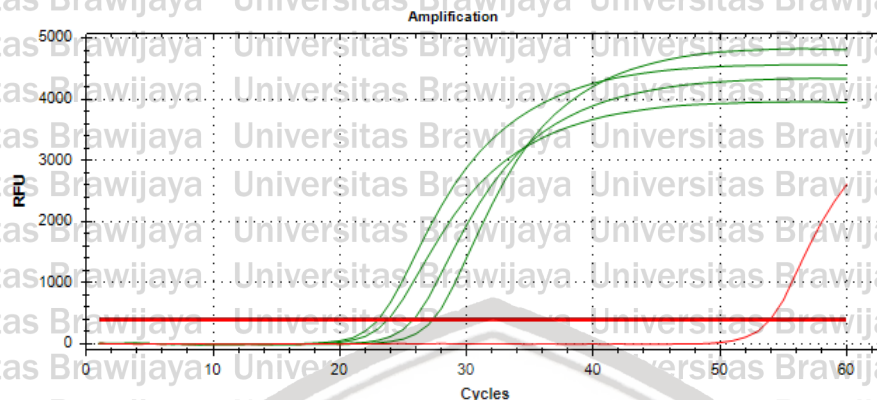
Untuk mencapai garis ambang fluoresensi sampel 1A memerlukan 54 siklus amplifikasi DNA. Sementara sampel 5A hanya memerlukan 38 siklus dan sampel 9A memerlukan 39 siklus.



Gambar 5.2 Kurva amplifikasi miRNA-9 sampel 9A (garis merah) dan gen housekeeping miRNA-16 sampel 2A, 4A, 5A, dan 9A (garis hijau).



Gambar 5.3 Kurva amplifikasi miRNA-9 sampel 5A (garis merah) dan gen housekeeping miRNA-16 sampel 5A, 6A, 7A, dan 8A (garis hijau).



Gambar 5.4 Kurva amplifikasi miRNA-9 sampel 1A (garis merah) dan gen housekeeping miRNA-16 sampel 1A, 2A, 3A, dan 4A (garis hijau).

5.3 Analisis Data

5.3.1 Analisis Deskriptif

Analisis deskriptif pada data volume nodul, dan ekspresi E-cadherin pada pasien dilakukan untuk mengetahui nilai minimal, maksimal, rata-rata dan standar deviasinya. Dari hasil analisis deskriptif didapatkan volume nodul paling kecil dari sampel ke 11 yaitu 0.02 cm^3 dan paling besar dari sampel ke 22 sebesar 1800 cm^3 . Rata-rata volume nodul didapatkan sebesar 217.71 cm^3 dengan simpangan baku sebesar 394.06 cm^3 . Berarti volume nodul pada 26 pasien terpusat di angka $217.71 \pm 394.06 \text{ cm}^3$. Dari hasil analisis deskriptif didapatkan *relative expression* E-cadherin paling rendah dari sampel ke 8 yaitu sebesar 12.5% dan paling tinggi dari sampel ke 11 sebesar 66.05%. Rata-rata *relative expression* E-cadherin didapatkan sebesar 39.91% dengan simpangan baku sebesar 14.45%. Berarti rerata ekspresi E-cadherin pada 26 pasien terpusat di angka $39.91 \pm 14.45\%$.

Tabel 5.7 Tabel Deskriptif Volume Nodul dan Ekspresi E-cadherin

	Minimum	Maksimum	Rata-rata	Simpangan Baku
Volume nodul	0.02	1800.00	217.71	394.06
Ekspresi E-cadherin	12.50	66.05	39.91	14.45

5.3.2 Uji Normalitas Data

Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui apakah sebaran data terpenuhi normalitasnya sehingga dapat diuji menggunakan uji parametrik. Pengujian normalitas menggunakan uji Shapiro Wilk dimana dikatakan data normal jika nilai $p > 0.05$. Dari hasil analisis diketahui bahwa status terdeteksinya miRNA-9 serum dan kelompok nilai N didapatkan nilai signifikansi (p) pada uji Shapiro Wilk adalah 0.000 ($p < 0.05$) yang menunjukkan bahwa pola distribusi data tidak normal.

Tabel 5.8 Hasil Uji Normalitas Data miRNA-9

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
miRNA-9	.436	26	.000	.583	26	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 5.9 Hasil Uji Normalitas Data Kelompok Nilai N

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Nodul	.270	26	.000	.773	26	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Dari hasil analisis diketahui bahwa variabel volume nodul nilai signifikansi (p) pada uji Shapiro Wilk adalah 0.000 ($p < 0.05$) sehingga data dinyatakan berdistribusi tidak normal. Pada ekspresi E-cadherin didapatkan pola distribusi data normal ($p = 0.091$ (Shapiro-Wilk)).

Tabel 5.10 Hasil Uji Normalitas Volume Nodul

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Nodul	.290	26	.000	.594	26	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 5.11 Hasil Uji Normalitas Data Ekspresi E-cadherin

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
E-cadherin	.191	26	.015	.933	26	.091

a. Lilliefors Significance Correction

5.3.3 Hubungan Ekspresi miRNA-9 Serum Darah dengan Besarnya Ukuran Nodul Metastasis di Leher pada Penderita KNF WHO Tipe 3 dengan LMP-1 Positif

Chi-Square adalah salah satu jenis uji komparatif non parametris yang dilakukan pada dua variabel, di mana skala data variabel adalah nominal ataupun kategorik. Hasil uji statistik diperoleh nilai 0.804, dengan demikian p value lebih besar dari alpha 0.05 sehingga H_0 diterima, berarti tidak ada perbedaan yang bermakna proporsi antara kedua kelompok tersebut. Dengan kata lain dapat disimpulkan bahwa tidak ada hubungan antara status terdeteksinya miRNA-9 serum dengan ukuran nodul metastasis (nilai N).

Tabel 5.12 Status terdeteksinya miRNA-9 darah pada setiap kelompok N

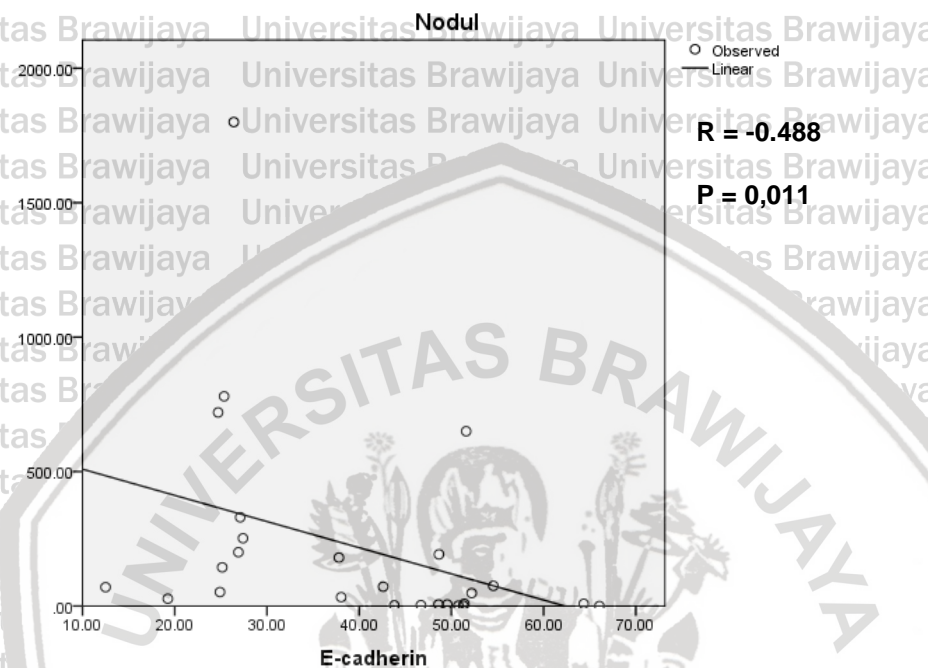
	N1		N2		N3		Total	
	f	%	f	%	f	%	f	%
Detected	1	13%	4	50%	3	38%	8	100%
Undetected	7	39%	3	17%	8	44%	18	100%
Total	8	31%	7	27%	11	42%	26	100%

$Df = 1; \chi^2 = 0.062; p = 0.804$

5.3.4 Hubungan Ekspresi E-cadherin Jaringan dengan Volume Nodul Metastasis di Leher pada Penderita KNF WHO Tipe 3 dengan LMP-1 Positif

Hubungan volume nodul dengan ekspresi E-cadherin dianalisis menggunakan uji korelasi Spearman karena distribusi data volume nodul tidak normal. Uji korelasi Spearman ini merupakan uji statistik untuk mengetahui

hubungan antara dua atau lebih variabel berskala ordinal atau numerik, dan cara untuk menginterpretasikan sejauh mana hubungan antara variabel independen dan variabel dependen berdasarkan koefisien korelasi.



Gambar 5.5 Diagram Korelasi Ekspresi E-cadherin pada jaringan dengan volume nodul

Berdasarkan hasil uji korelasi Spearman di atas dapat disimpulkan bahwa ada hubungan yang signifikan antara ekspresi E-cadherin dengan volume nodul ($p = 0.011$). Didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.488 , berarti terdapat hubungan negatif yang cukup kuat antara ekspresi E-cadherin dengan volume nodul. Semakin rendah ekspresi E-cadherin jaringan, semakin besar volume nodul di leher.

5.3.5 Perbedaan Ekspresi E-cadherin di Jaringan Nasofaring Antara Kelompok N1, N2, dan N3 Penderita KNF WHO Tipe 3 dengan LMP-1 Positif

Dari uji Kruskal Wallis didapatkan adanya perbedaan signifikan secara statistik ($p=0.003$) antara ekspresi E-cadherin jaringan pada berbagai kelompok ukuran nodul metastasis di leher (nilai N).

Dari hasil uji Mann Whitney didapatkan perbedaan yang signifikan dari ekspresi E-cadherin antara pasien N1 dengan N3 ($p=0.001$) dan N2 dengan N3

($p=0.033$) namun tidak didapatkan perbedaan yang signifikan dari ekspresi E-cadherin antara pasien N1 dengan N2 ($p=0.165$).

Tabel 5.13 Hasil pemeriksaan Imunohistokimia ekspresi E-cadherin.

No	N1	N2	N3
1	66.05	46.7	24.9
2	54.55	48.65	27.4
3	42.6	52.2	51.6
4	43.8	51.4	12.5
5	51.3	48.6	37.8
6	64.35	38.05	25.35
7	49.55	19.25	24.7
8	50.75		26.9
9			25.15
10			27.1
11			26.4
\bar{x}	52.86875	43.55	28.16364

Df = 2; $\chi^2 = 11.951$; $p = 0.003$

Untuk uji beda antara N1 dan N2, $p = 0.165$

Untuk uji beda antara N1 dan N3, $p = 0.001$

Untuk uji beda antara N2 dan N3, $p = 0.033$

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Pasien KNF

Pada penelitian didapatkan rasio antara subyek laki-laki dan perempuan sebesar 4,3:1. Ini sesuai dengan penelitian Adham *et al.* yang menyatakan bahwa angka kejadian KNF pada laki-laki 2-3 kali lebih banyak daripada perempuan. Hasil penelitian di Tiongkok dan Pakistan juga menunjukkan proporsi pasien KNF laki-laki 1,8 lebih banyak dibandingkan dengan perempuan.

Demikian pula, hasil penelitian proporsi pasien KNF di Brunei Darussalam pada etnis populasi Cina, India, dan Melayu juga menunjukkan hasil yang sama dengan proporsi di Tiongkok dan Pakistan (Chang & Adami, 2006). Kemungkinan hal ini disebabkan pasien laki-laki memiliki pola hidup yang lebih berisiko terkena KNF seperti kebiasaan merokok, minum alkohol, paparan debu, dan paparan asap dibandingkan dengan pasien perempuan (Ji *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini didapatkan kelompok usia pasien karsinoma nasofaring terbanyak adalah usia 51-60 dan 61-70 tahun masing-masing sebanyak 7 orang (27%). Pada daerah endemik, insiden meningkat sejak usia 20 tahun dan mencapai puncak pada dekade IV dan V (Adham *et al.*, 2012). Di Indonesia, KNF terutama ditemukan 60% pada pasien berusia antara 25 hingga 60 (Kementerian Kesehatan RI Pusat Data dan Informasi Kesehatan, 2014). Kecenderungan penderita KNF lebih banyak menyerang usia antara 40-50 tahun mungkin dapat dijelaskan oleh patogenesis terjadinya karsinoma nasofaring karena proses yang kronis (Chang & Adami, 2006). Pada penelitian ini hanya didapatkan 1 subyek berusia \geq 71 tahun, mungkin dapat dijelaskan dengan umur harapan hidup di Indonesia saat ini yaitu 71 tahun (BPS, 2017).

Karena nasofaring kaya dengan jaringan limfatik, penyebaran ke nodus limfe sering ditemukan pada pasien. Pembesaran KGB leher adalah akibat penyebaran KNF secara limfogen. Sistem drainase jaringan limfatik normal yaitu melalui kapiler limfatik, limfatik pengumpul, dan nodus limfatik. Metastasis tumor secara limfogen didahului oleh adanya faktor limfangiogenik yang diproduksi oleh tumor premetastasis. Faktor-faktor tersebut diambil oleh kapiler limfatik peritumoral dan diangkut melalui limfatik pengumpul menuju nodus limfatik sentinel yang mendrainase tumor, di mana mereka akan menginduksi

limfangiogenesis. Pembuluh limfatik yang mendrainase tumor menunjukkan ukuran yang membesar (Laksmi, 2011). Nodus yang paling sering terlibat adalah nodus yang berada di level area leher II-III, terletak dibawah ujung *planum mastoid*, dibelakang *angulus mandibula*, bagian tengah dalam dari ujung atas otot sternocleidomastoid. Pembesaran KGB teraba keras, tidak nyeri bila ditekan, tidak mudah digerakkan karena biasanya juga telah mengenai jaringan otot di bawahnya (Guo *et al*, 2009; Adham *et al*, 2012). Pada penelitian ini didapatkan pasien mengalami pembesaran kelompok KGB leher terbanyak di level II, yaitu sebanyak 24 subyek. Sebanyak 18 pasien mengalami lateralisasi pembesaran KGB secara bilateral 69%. Penyebaran limfatik di KGB leher berlangsung berantai secara teratur dari KNF primer dimulai dari pembuluh getah bening yang saling menyilang dibagian tengah nasofaring dan menuju ke kelenjar Rouviere yang terletak pada bagian lateral ruang retrofaring, selanjutnya menuju ke kelenjar limfa disepanjang vena jugularis dan kelenjar limfa yang terletak dipermukaan superfisial (Laksmi, 2011). Penelitian Ho *et al* berdasarkan hasil meta-analisis dari 13 uji klinis menemukan bahwa KGB leher yang paling sering terlibat meliputi KGB retrofaringeal lateral dan KGB level II dengan kemungkinan metastasis masing masing 69,4% & 70,4%. Selanjutnya diikuti oleh kelompok KGB level III, VA, dan IV. Beberapa kelompok KGB leher, termasuk level I, level VI, parotis dan kelenjar supraklavikula memiliki risiko yang sangat rendah untuk metastasis KNF (Ho *et al*, 2012).

Dari hasil CT scan kepala dan leher, ditemukan T2 sebanyak 9 orang (35%), selanjutnya gambaran tumor T3 sebanyak 8 orang (31%), T4 sebanyak 7 orang (27%), dan T1 sebanyak 2 orang (8%). KNF sulit didiagnosis karena lokasi anatomisnya yang tersembunyi dan gejala awal yang kadang tidak khas dengan pola mirip dengan kelainan umum di hidung dan telinga seperti gangguan telinga unilateral, kemudian diikuti dengan kongesti nasal persisten disertai darah (Tabuchi, 2011; Wei & Sham, 2005). Dari gambaran nodul kelenjar getah bening leher, didapatkan bahwa pasien terbanyak dengan pembesaran kelenjar getah bening N3 sebanyak 11 subyek (42%), N1 sebanyak 8 subyek (31%), N2 sebanyak 7 subyek (27%). Kelenjar getah bening leher dirasakan tidak nyeri dan membesar perlahan. Pembesaran KGB leher yang merupakan gejala lanjut KNF, dan merupakan keluhan yang paling sering yang menyebabkan penderita datang berobat (Tabuchi, 2011; Wei & Sham, 2005).

Pada penelitian ini, stadium KNF subyek penelitian berdasarkan AJCC/UICC tahun 2012 paling banyak adalah KNF stadium IV sebanyak 14 subyek (54%). Pada penelitian ini tidak didapatkan pasien yang datang dengan stadium I. Penelitian lain di RSUP Dr. Moehammad Hoesin Palembang mendapatkan sebanyak 138 dari 164 pasien (84,1%) datang pada stadium lanjut (stadium III dan IV). Karsinoma nasofaring pada stadium awal sulit didiagnosis secara klinis karena lokasi anatomisnya yang tersembunyi, kurangnya pengetahuan pasien tentang tanda dan gejala awal KNF, dan keadaan ekonomi yang terbatas yang dapat menunda pasien untuk datang dan mendapatkan pelayanan kesehatan. Di samping itu, gejala awal dari KNF yang kurang spesifik menyebabkan kekeliruan diagnosis dari dokter dengan infeksi saluran nafas atas, sinusitis yang berulang, dan otitis media akut atau kronik. Sedikit pasien yang datang ke spesialis THT sebelum terjadi pembesaran kelenjar KGB leher, sehingga pasien datang sudah dalam stadium yang lanjut (Adham *et al.*, 2012).

6.2 Hubungan ekspresi E-cadherin jaringan dengan volume nodul

Berdasarkan hasil uji korelasi Spearman, dapat disimpulkan bahwa ada hubungan yang signifikan antara ekspresi E-cadherin dengan volume nodul ($p = 0.011$). Didapatkan koefisien korelasi sebesar -0.488 , berarti terdapat hubungan negatif yang cukup kuat antara ekspresi E-cadherin dengan volume nodul. Semakin rendahnya dengan ekspresi E-cadherin jaringan berkorelasi dengan semakin besarnya volume nodul metastasis.

Ekspresi E-cadherin yang menurun akan menyebabkan gangguan adhesi antar sel tumor dan terjadinya pemisahan sel tumor dari tumor primer. Pada akhirnya, sel tumor mampu bermetastasis ke kelenjar getah bening regional di leher dan terus menjadi bermetastasis jauh. E-cadherin bertindak sebagai penekan tumor (*tumor suppressor*) sehingga bisa menekan proses invasi dan metastasis sel kanker (Taufiqurrahman dkk., 2015). Pada penelitian Hugo *et al.* ekspresi E-cadherin yang rendah-sedang didapatkan pada jaringan pasien KNF tipe 3. Sebaliknya, ekspresi E-cadherin yang tinggi didapatkan pada jaringan non-tumor, sehingga penurunan regulasi ekspresi E-cadherin dalam jaringan KNF dapat menunjukkan kemampuan yang lebih besar untuk invasi dan metastasis. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa berkurangnya ekspresi E-cadherin adalah prediktor yang baik dari metastasis KGB pada kanker

sel skuamosa kepala dan leher. Zhi *et al.* menemukan korelasi antara berkurangnya ekspresi E-cadherin dan metastasis kelenjar KGB pada KNF (Zhi *et al.*, 2004). Hasil penelitian Taufiqurrahman dkk. menemukan bahwa pasien KNF dengan ekspresi E-cadherin negatif memiliki risiko 87,4 kali metastasis dibandingkan dengan pasien KNF dengan ekspresi E-cadherin positif. Hasil ini menunjukkan bahwa pasien KNF dengan ekspresi E-cadherin positif memiliki E-cadherin yang cukup stabil, dengan tidak terbuktinya metastasis baik ke KGB regional maupun organ jauh (Taufiqurrahman dkk., 2015). Hasil tersebut sejalan dengan pemaparan Xu *et al.*, yang mendapatkan pasien KNF dengan ekspresi E-cadherin negatif dan telah terjadi metastasis ke KGB sebanyak 65 pasien (65%) dan yang belum mengalami metastasis 17 pasien (35,5%). Kesimpulan dari penelitian tersebut adalah adanya hubungan yang signifikan antara penurunan ekspresi E-cadherin dengan kejadian metastasis (Xu *et al.*, 2013).

6.3 Hubungan antara status terdeteksinya ekspresi miRNA-9 darah dengan ukuran nodul yang terpalpasi (nilai N)

Dari hasil uji Chi-Square diperoleh nilai $p = 0.364$, dengan demikian p value lebih besar dari alpha 0.05 sehingga H_0 diterima, berarti tidak ada perbedaan proporsi yang bermakna antara kedua status terdeteksinya miRNA-9 serum dengan ukuran nodul metastasis (nilai N). Dengan kata lain dapat disimpulkan bahwa tidak ada hubungan antara status terdeteksinya miRNA-9 serum dengan ukuran nodul metastasis (nilai N). Deteksi miRNA-9 darah dilakukan dengan metode Real Time PCR (qPCR).

Real Time PCR (qPCR) digunakan untuk mengamplifikasi dan secara simultan mengukur molekul DNA target. Keberadaan DNA hasil amplifikasi dapat diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi dari probe (penanda). Reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus. Sinyal fluoresensi yang dipancarkan akan meningkat secara proporsional setiap siklus PCR telah berhasil dilakukan sejalan dengan bertambahnya produk DNA (DNA hasil amplifikasi) yang dihasilkan. Makin tinggi tingkat ekspresi target gen maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Pardal 2010). Kuantitas urutan DNA target dicapai dengan menentukan jumlah siklus amplifikasi. Kuantitas yang didapat berupa jumlah relatif setelah dinormalisasi dengan gen normalisasi tambahan. Pada

pemeriksaan menggunakan RT-qPCR, setelah beberapa siklus amplifikasi dan melewati garis ambang siklus, produk PCR akan dihasilkan berdasarkan fluoresensi di awal fase eksponensial PCR. Jumlah siklus amplifikasi yang diperlukan untuk mencapai ambang batas fluoresensi disebut Ct. Dari pemeriksaan menggunakan RT-qPCR dapat dikatakan karena kuantitas urutan DNA target tinggi di awal reaksi sampel 1A lebih rendah dibandingkan dengan sampel 5A dan 9A, nilai Ct akan lebih lambat diketahui.

Pada penelitian ini, gen normalisator untuk kontrol internal yang digunakan adalah miRNA-16. Pada penelitian ini didapatkan miRNA-16 terdeteksi dalam jumlah yang cenderung stabil, sehingga dapat dikatakan rangkaian proses dari isolasi miRNA-9 total darah sampai deteksi ekspresi miRNA-9 darah menggunakan RT-qPCR sudah berjalan baik dan berhasil. Song *et al.* mengungkapkan miR-16 dan miR-93 merupakan gen referensi yang paling stabil, untuk kuantifikasi miRNA serum di semua pasien dan kontrol yang sehat. Efek dari strategi normalisasi yang berbeda juga dibandingkan. Ketika data dinormalkan ke miR-16 dan miR-93, atau kombinasi miR-93 dan miR-16, perbedaan signifikan terdeteksi (Song *et al.* 2012). Didapatnya jumlah ekspresi miRNA-16 yang meningkat di awal siklus menunjukkan kadar miRNA-16 dalam serum relatif besar, proses ekstraksi berhasil, dan serta *primer* yang digunakan sudah baik. Pemeriksaan nanodrop juga dilakukan untuk mengetahui kadar miRNA total sehingga terbukti proses hasil isolasi miRNA total telah berhasil. Hasil replika miRNA-16 dalam PCR real-time memiliki *plateau heights* yang berbeda-beda mungkin dikarenakan perbedaan dalam kinetika reaksi untuk setiap sampel. Meskipun replikasi dimulai dengan jumlah target templat yang identik, laju berkurangnya reagen, dan titik ketika akumulasi eksponensial produk PCR berhenti dan menjadi linier, berbeda di antara hasil replika. Ini akan menghasilkan *plateau heights* yang berbeda-beda, tahap di mana reaksi PCR terhenti, dan sedikit atau tidak ada produk PCR tambahan yang diamplifikasi (Gevertz *et al.*, 2005).

Pada penelitian ini tidak terdeteksinya miRNA-9 serum mungkin disebabkan oleh belum terlepasnya mikrovesikel yang membawa miRNA-9 dari jaringan ke sirkulasi atau rendahnya jumlah ekspresi relatif miRNA-9 darah. Rendahnya jumlah ekspresi miRNA-9 dapat terlihat dari kurva amplifikasi yang menunjukkan peningkatan ekspresi miRNA-9 terjadi di sekitar akhir dari 50

siklus. Kadar miRNA-9 yang rendah memerlukan siklus amplifikasi yang lebih besar supaya dapat terdeteksi. Pada penelitian yang sejalan, dengan sampel berupa miRNA-9 jaringan didapatkan terdeteksinya ekspresi miRNA-9 jaringan pada 25 sampel dari total 26 sampel. Hal ini berarti miRNA-9 dalam tubuh pasien KNF WHO tipe 3 belum keluar dari sel nasofaring, dimana miRNA-9 memang lebih banyak bekerja di jaringan.

6.4 Perbedaan ekspresi E-cadherin jaringan nasofaring penderita KNF WHO tipe 3 antara kelompok N1, N2, dan N3

Dari uji Kruskal Wallis didapatkan adanya perbedaan signifikan secara statistik antara ekspresi E-cadherin jaringan pada berbagai kelompok ukuran nodul metastasis di leher (nilai N). Dari hasil uji Mann Whitney didapatkan perbedaan yang signifikan dari ekspresi E-cadherin antara pasien N1 dengan N3 dan N2 dengan N3. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya. Liu *et al.*, mengungkapkan seiring perkembangan tahap N, tingkat ekspresi E-cadherin lebih rendah. Ditemukan tingkat ekspresi tinggi E-cadherin (48,1%) dalam metastasis KGB tunggal secara signifikan lebih tinggi daripada yang mengalami metastasis di multipel KGB (25,0%). Penelitiannya menyimpulkan, tingkat ekspresi E-cadherin mempengaruhi metastasis KGB pada KNF, dimana semakin rendah tingkat ekspresi E-cadherin, jumlah KGB yang terkena semakin banyak, dan nilai N (N stage) semakin tinggi (Liu *et al.*, 2010).

6.5 Keterbatasan Penelitian

1. Keterbatasan penelitian ini yaitu protein lain pada beberapa jalur sinyal seperti seperti ekspresi vimentin, MMP-9, dan reseptor CXCR4 yang juga berperan terhadap metastasis KNF tidak diteliti karena keterbatasan dana penelitian.
2. Pengamatan mikroskopis E-cadherin dilakukan oleh peneliti sendiri.

6.6 Implikasi Penelitian

Pada penelitian ini didapatkan penurunan ekspresi E-cadherin jaringan dan miRNA-9 serum yang berpengaruh pada besarnya ukuran nodul metastasis di leher pada penderita KNF WHO tipe 3 dengan LMP-1 positif. Dengan adanya penelitian ini diharapkan dapat diketahui pola metastasis KNF yang melibatkan

E-cadherin dan miRNA-9, dan dapat ditemukan biomarker prognostik berbasis serum yang dapat diperoleh dengan cara tidak invasif. Dengan mengetahui gambaran ekspresi E-cadherin jaringan dan miRNA-9 serum seiring progresivitas metastasis tumor, dan prognosis penderita KNF, penanganan KNF menjadi lebih tepat.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian yang telah dilakukan tentang hubungan ekspresi E-cadherin jaringan dan miRNA-9 darah pada penderita KNF WHO tipe 3 dengan LMP-1 positif, dapat disimpulkan bahwa:

- a. Semakin rendah ekspresi E-cadherin jaringan, semakin besar volume nodul di leher pada penderita KNF WHO tipe 3 dengan LMP-1 positif,
- b. Tidak adanya hubungan antara status terdeteksinya miRNA-9 serum dengan ukuran nodul metastasis (nilai N) pada penderita KNF WHO tipe 3 dengan LMP-1 positif.
- c. Ada perbedaan signifikan secara statistik antara ekspresi E-cadherin jaringan pada berbagai kelompok ukuran nodul metastasis di leher (nilai N).
- d. Semakin rendah ekspresi E-cadherin pada jaringan nasofaring penderita KNF WHO tipe 3, semakin tinggi nilai N, namun hasil tersebut secara statistik hanya signifikan pada perbandingan N1 dengan N3 dan N2 dengan N3.

7.2 Saran

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diajukan beberapa saran yang diharapkan dapat memberikan manfaat bagi pihak-pihak yang berkepentingan:

1. Perlu dilakukan kajian lebih lanjut tentang pemeriksaan ekspresi E-cadherin jaringan dan miRNA serum pada KNF tipe 3 sebagai indikator keberhasilan terapi dan untuk mendapatkan pengetahuan yang lebih luas.
2. Perlu dilakukan kajian lebih lanjut tentang hubungan ekspresi E-cadherin jaringan dan miRNA serum dengan *survival rate* pada KNF WHO tipe 3.
3. Perlu penelitian serupa dengan sebaran sampel penelitian yang lebih luas, yaitu dengan menambah jumlah penderita KNF WHO tipe 3 yang menjadi pasien di Rumah Sakit di daerah lain.
4. Pada penggunaan aplikatif biomarker ini di kemudian hari, pasien dengan ekspresi E-cadherin jaringan yang rendah sebaiknya diprioritaskan untuk mendapatkan terapi karena berisiko tinggi untuk terjadi metastasis, sehingga diharapkan prognosis penyakit menjadi lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

Adham, M., Kurniawan A. N., Muhtadi, A. I., Roezin, A., Hermani, B., Gondhowiarjo, S., Tan, I. B., and Middeldorp, J. M., 2012. Nasopharyngeal carcinoma in Indonesia: epidemiology, incidence, signs, and symptoms at presentation. *Chin J Cancer* Vol. 31(4): 185-96.

American Joint Committee on Cancer. 2012. AJCC cancer staging atlas: a companion to the 7th editions of AJCC cancer staging manual and handbook. Springer. 2nd ed.

Bhagavathi S., Czader M., 2010. MicroRNAs in Benign and Malignant Hematopoiesis. *Arch Pathol Lab Med*—Vol 134.

Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., & Sidransky, D., 2005. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. France : IARC Press.

Bei, J.X., Li, Y., Jia, W.H., Feng, B.J., Zhou, G., Chen, L.Z., Feng, Q.S., Low, H.Q., Zhang, H., He, F. and Tai, E.S., 2010. A genome-wide association study of nasopharyngeal carcinoma identifies three new susceptibility loci. *Nature genetics*, 42(7), pp.599-603.

Bossche J.V., Malissen B., Mantovani A., Baetselier P.D. and Ginderachter J.A.D. 2012. Regulation and function of the E-cadherin/catenin complex in cells of the monocyte-macrophage lineage and DCs. *BLOOD*, Volume 119, Number 7.

Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. Serum microRNAs as noninvasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer*. 2010;9:306 Diunduh dari <http://www.molecular.cancer.com/content/9/1/306>.

Landes Bioscience and Springer science <https://books.google.co.id/books?isbn=1461459478>

Cao, X., He, L.R., Xie, F.Y., Chen, Y.F., Wen, Z.S. 2011. Factors determining the survival of nasopharyngeal carcinoma with lung metastasis alone: does combined modality treatment benefit? *BMC Cancer*. 11(370):1-9.

Chang, E.T. and Adami, H.O., 2006. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 15(10), pp.1765-1777.

Chan J, Bray F, Mccarron P, Foo W. 2005. Nasopharyngeal Carcinoma. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidrasky D, editors. WHO Classification of

Tumours: Pathology and Genetic Head and Neck Tumours: Lyon: IARC Press; p. 85-97.

Chen H., Chen G., Chen Y., Liao W., Liu C., Chang K., Chang Y. and Chen S.; 2009 . MicroRNA deregulation and pathway alterations in NPC. British Journal of Cancer p.100, p.1002 – 1011.

Chiba K., Johnson J., Vogan J., Wagner T., Boyle J. And Hockemeyer D. 2015. Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing. eLife. DOI: 10.7554/eLife.07918

Chua ML, Wee JT, Hui EP, Chan AT. 2016. Nasopharyngeal carcinoma. Lancet. 387:1012-24; PMID:26321262; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00055-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00055-0)

Cloonan N, et all., 2008. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1-S phase cell cycle transition. Genome Biol 9. R127

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2015. Situasi penyakit kanker. Pusat Data dan Informasi Departemen Kesehatan RI. <http://www.depkes.go.id/download.php?file=download/pusdatin/infodatin/infodatin-kanker.pdf>.

Emilio S., 2014, Epithelial-mesenchymal transition_ classification and cancer

Gevertz JL, Dunn SM, Roth CM. Mathematical model of real-time PCR kinetics. Biotechnology and bioengineering. 2005 Nov 5;92(3):346-55.

Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. PLoS ONE 2008; 3(9): e3148. www.plosone.org.

Guo L., Tang M., Yang L., Xiao L., Bode A.M., Li L., Dong Z. and Cao Y. 2012. Epstein-Barr virus oncoprotein LMP-1 mediates survivin upregulation by 53 contributing to G1/S cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma International Journal of Molecular Medicine 29: 574-580.

Gustafson, D., Tyryshkin, K. and Renwick, N., 2016. microRNA-guided diagnostics in clinical samples. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 30(5), pp.563-575.

Gwak JM, Kim HJ, Kim EJ, et al MicroRNA-9 is associated with epithelial-mesenchymal transition, breast cancer stem cell phenotype, and tumor progression in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2014;147:39-49.

Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR. 2009; Metastamir : the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. Cancer Res. 69:7495–8.

Hsu, Y.C. and Su, C.Y., 2006. Tympanoplasty for chronic otitis media in post-irradiated nasopharyngeal carcinoma patients. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 115(5), pp.330-333.

lorio M. and Croce C. 2012. MicroRNA involvement in human cancer carcinogenesis.; 33:1126–33.

Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, et al. 2010. Epithelial–mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *CancerSci.*; 101(1):293-299.

Kalluri R and Weinberg RA. 2009. The Basics of Epithelial-mesenchymal Transition. *The Journal of Clinical Investigation*. 1420-1427.

Kim, K. & Kim, J.-W. 2007. Tumor Metastasis: Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Biowave*, 9.

Kong D, Li Y., Wang Z. and Sarkar F. * 2011. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers* vol. 3, p. 716-729;

Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sc* 2010; 101: 2087-92.

Kresno SB, 2012, 'Karsinogenesis' Onkologi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 256-261.

Leva G.D., Garofalo M. and Croce C.M. 2014. *Micro RNAs in cancer. Annu Rev Pathol.*; 9: 287–314.

Liu C. and Tang D. G., 2011. MicroRNA regulation of cancer stem cells *Cancer Res.*; 71(18): 5950–5954.

Liu, S. et al. (2012) MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF- κ B1-Snail1 pathway in melanoma. *J. Pathol.*, 226, 61–72.

Liu Q, Wang YD, Jing SH, Wang XL, Cheng YJ, Wu FP. Expression of E-cadherin in nasopharyngeal carcinoma and its relationship with cervical lymph node metastasis. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*. 2010 Jun;32(6):425-8.

Lu J, Luo H, Liu X, Peng Y, Zhang B, Wang L, et al. 2014. Mir-9 targets cxcr4 and functions as a potential tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma. *Carcinogenesis.*;35:554–63.

Lu J, Xu X, Liu X, Peng Y, Zhang B, Wang L, et al. 2014; Predictive value of mir-9 as a potential biomarker for nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Br J Cancer*. 110:392–8.

Luo Z, Dai Y, Zhang L, Jiang C, Li Z, Yang J, et al. 2013. Mir-18a promotes malignant progression by impairing microRNA biogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *Carcinogenesis*. 34:415–25.

Malarkey D., Hoenerhoff M. and Maronpot R. 2013. *Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations*. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, Third Edition, , 107–146

Martin TA, Ye L. and Sanders AJ, 2013. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective In: Madame Curie Bioscience Database. Landes Bioscience.

Marcucci G., Mro'zek K., Radmacher M., Garzon R. and Bloomfield C. 2011. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *BLOOD*, Volume 117, Number 4.

Ma L, Deng X, Wu M, Zhang G, Huang J. 2014. Down-regulation of miRNA-204 by Imp-1 enhances cdc42 activity and facilitates invasion of EBV-associated nasopharyngeal carcinoma cells. *FEBS Lett*. 588:1562–70.

Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. 2010. Mir-9, a myc/mycn-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol.*; 12:247–56.

Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Brian, K.C., Allen, A. and Lin, D.W., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), pp.10513-10518.

Megiorni F., Pizzuti A. and Frati L. 2011. Clinical Significance of MicroRNA Expression Profiles and Polymorphisms in Lung Cancer Development and Management. *Pathology Research International* Volume 2011, Article ID 780652, 7 pages doi:10.4061/2011/780652

Moreno, P.M., Jamora, C., Fuchs, E. 2003. Sticky Business: Orchestrating Cellular Review Signals at Adherens Junctions. *Cell*. 112:535–548.

National Comprehensive Cancer Network. 2012. NCCN clinical practice guideline in oncology (NCCN guidelines) head and neck cancer. Version 2.

Pardal SJ. 2010. Menguji ekspresi gen menggunakan real time PCR. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 32:13-14.

Petrovaa Y., Schectersonb L. and Gumbinerb B., 2016. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Molecular Biology of the Cell* Volume 27

Propkopi M., Kousparou C. A. and Epenetos A. A. 2015 The secret role of microRNAs in cancer stem cell development and potential therapy: a Notch-pathway approach www.frontiersin.org, Volume 4, Article 389.

Sassen S., Miska E., Caldas C. 2008. MicroRNA—implications for cancer *Virchows Arch* 452:1–10

Slack F.J. and Weidhaas J.B., 2008, “ MikroRNA in Cancer Prognosis”. *New England Journal of Medicine*. 359;25 : 2720-2722

SMF THT-KL. 2015. Laporan Tahunan SMF IK THT-KL RSUD dr. Saiful Anwar Malang.

SMFTHT-KL. 2016. Laporan Tahunan SMF IK THT-KL RSUD dr. Saiful Anwar Malang.

Sohel, M.H., 2016. Extracellular/circulating microRNAs: release mechanisms, functions and challenges. *Achievements in the Life Sciences*, 10(2), pp.175-186.

Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, Ma X, Han S, Zhang Z. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Digestive diseases and sciences*. 2012 Apr 1;57(4):897-904.

Tabuchi, K., Nakayama, M., Nishimura, B., Hayashi, K. and Hara, A., 2011. Early detection of nasopharyngeal carcinoma. *International journal of otolaryngology*, 2011.

Tan L, Loh T. 2015. *Benign and malignant tumors of the nasopharynx*. In: *Flint P, Haughey BH, Lund V, et al, editors. Cummings. Otolaryngology. 6th ed. Philadelphia. Saunder. p. 1420-31. 11.*

Taufiqurrahman T, Herdini C, Hariwiyanto B, Harijadi H. Ekspresi E-cadherin pada metastasis karsinoma nasofaring. *Oto Rhino Laryngologica Indonesiana*. 2015 Jun 30;45(1):28-35.

Teicher, B.A. and Flicker S.P. 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 16, 2927–2931.

Tian X., Liu Z., Niu B., Zhang J., Kui T., Tan, S.R., Zhao L., David C., Harris and Zheng G., 2014. E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier.

Tivnan A., Tracey L., Buckley P. G., Alcock L. C., Davidoff A. M., Stallings R. L., 2011. MicroRNA-34a is a potent tumor suppressor molecule in vivo in

neuroblastoma *BMC Cancer*, 11:33 <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/33>

Tse, K.P., Su, W.H., Chang, K.P., Tsang, N.M., Yu, C.J., Tang, P., See, L.C., Hsueh, C., Yang, M.L., Hao, S.P. and Li, H.Y., 2009. Genome-wide association study reveals multiple nasopharyngeal carcinoma-associated loci within the HLA region at chromosome 6p21. *The American Journal of Human Genetics*, 85(2), pp.194-203.

Tulalamba W. and Janvilisri T. 2012; Nasopharyngeal carcinoma signaling pathway. *International Journal of Cell Biology*.

Valkenburg KC, Graveel CR, Zylstra-Diegel CR, Zhong Z, Williams BO. 2011; Wnt/ β -catenin Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. *CancerSci*. 3:2050-2079.

Wang, K.H., Austin, S.A., Chen, S.H., Sonne, D.C. and Gurushanthaiah, D., 2017. Nasopharyngeal Carcinoma Diagnostic Challenge in a Nonendemic Setting: Our Experience with 101 Patients. *The Permanente Journal*, 21.

Wang Y. and Billeloch R., 2009. Cell Cycle Regulation by MicroRNAs in Embryonic Stem Cells. *Cancer Res.*; 69(10): 4093–4096.

Wang Z. M, Du W. J., Piazza G. A. And Yaguang X. 2013. MicroRNAs are involved in the self-renewal and differentiation of cancer stem cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 34 1374–1380.

Wei, W.I. and Sham, J.S., 2005. Nasopharyngeal carcinoma. *The Lancet*, 365(9476), pp.2041-2054.

Wei W. and Chua D. 2014. Nasopharyngeal Cancer. In: Bailey B, Johnson J, Newlands S, editors. *Head and Neck Surgery - Otolaryngology*: Lippincott Williams&Wilkins; Vol.2. p. 1875-1897.

Wu Y. and Zhou BP. 2010. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*. 102:639–644. [PubMed: 20087353]

Xia H.P., 2008. Great Potential of MicroRNA in Cancer Stem Cell. *Journal of Cancer Molecules* 4(3): 79-89

Xia H., Cheung W.K., Sze J., Lu G., Jiang S., Yao H., et al. 2010; Mir-200a regulates epithelial–mesenchymal to stem-like transition via zeb2 and beta-catenin signaling. *J Biol Chem*. 285: 36995–7004.

Xu L, Jiang Y, Zheng J, Xie G, Li J, Shi L, et al. Aberrant expression of β -catenin and E-cadherin is correlated with poor prognosis of nasopharyngeal cancer. *Hum Pathol*. 2013;44:1357-64.

Yilmaz, M., Christofori, G., Lehenbre, F. 2007. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends in Molecular Medicine*. 13(12):535-541.

Yoshizaki T., Ito M., Murono S., Wakisaka N., Kondo S., and K. Endo, 2012. "Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma," *Auris Nasus Larynx*, vol. 39, no. 2, pp. 137–144.

Young L.S. and Dawson C. W. 2014. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *Chinese Journal of Cancer* Vol. 33 Issue 12.

Yu T, Liu K, Wu Y, et al. MicroRNA-9 inhibits the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of CXCR4 via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncogene* 2014;33:5017-27.

Yuva-Aydemir Y, Simkin A, Gascon E, et al. MicroRNA-9: functional evolution of a conserved small regulatory RNA. *RNA Biol* 2011;8:557-64.

Zhang, L. Yu L. and Liu L., 2011, "LMP1 antagonizes WNT/ β -catenin signalling through inhibition of WTX and promotes nasopharyngeal dysplasia but not tumourigenesis in LMP1 B95-8 transgenic mice," *Journal of Pathology*, vol. 223, no. 5, pp. 574–583.

Zhang JX, Qian D, Wang FW, Liao DZ, Wei JH, Tong ZT, et al. 2013. Microrna-29c enhances the sensitivities of human nasopharyngeal carcinoma to cisplatin-based chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Lett.*;329:91–8.

Zheng H, lee L, Hu D, Deng X, Cao Y. 2007, 'Role of Ebstein Barr Virus Encoded Latent Membrane Protein 1 in The Carcinogenesis of The Nasopharyngeal Carcinoma. *Cellular and Molecullar Immunology*. 4(3):185-196.

Zhou, X., Cui, J., Macias, V., Kajdacsy-Balla, A.A., Ye, H., Wang, J. and Rao, P.N., 2007. The progress on genetic analysis of nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Genomics*, 2007.