

**Laporan Penelitian****Ekspresi Interleukin-35 pada penderita karsinoma nasofaring  
*undifferentiated* stadium lanjut****Imam Prabowo\*, Siti Nurhikmah\*, Made Setiamika\*, Dyah Budiani\*\***

\*Bagian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok- Bedah Kepala Leher

\*\*Bagian Patologi Anatomi

Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret/Rumah Sakit dr. Moewardi  
Surakarta**ABSTRAK**

**Latar belakang:** Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan keganasan pada kepala leher yang berasal dari epitel nasofaring. Sel pada tumor ini dapat memproduksi interleukin-35 (IL-35) yang mendukung pertumbuhan tumor, angiogenesis, dan stimulus radikal bebas melalui jalur *myeloid dendritic suppressor cells* (MDSC) serta menghambat respons imun. **Tujuan:** Penelitian bertujuan untuk menganalisis ekspresi IL-35 pada penderita karsinoma nasofaring *undifferentiated* pada stadium lanjut tanpa metastasis. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan *consecutive sampling* pada 30 sampel jaringan biopsi penderita KNF *undifferentiated* yang dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi *monoclonal rabbit anti IL-35 (RabMAbs)* untuk mengetahui ekspresi IL-35 kemudian dilakukan penghitungan dengan *Intensity Distribution Score (IDS)*. **Hasil:** Pengukuran IDS ekspresi IL-35 dari 30 sampel penderita didapatkan sebagian besar kelompok menunjukkan hasil positif kuat dan sangat kuat sebanyak 27 penderita, 2 penderita positif lemah, dan 1 penderita negatif dengan rerata (*mean*) serta simpang baku (SD) 224,67±78,00. **Kesimpulan:** Terdapat peningkatan (*overexpression*) ekspresi IL-35 pada KNF *undifferentiated* stadium lanjut.

**Kata kunci:** KNF *undifferentiated* stadium lanjut, interleukin-35, faktor prediktif**ABSTRACT**

**Background:** *Nasopharyngeal carcinoma (NPC)* is a head and neck malignancy originated from nasopharyngeal epithelium. The tumor cells produced interleukin-35 (IL-35), which support the growth of tumors, angiogenesis, and stimulation of free radical pathways through *myeloid dendritic suppressor cells (MDSC)*, and also inhibition of the immune response. **Purpose:** This study aimed to analyze the expression of IL-35 in the end state of *undifferentiated nasopharyngeal carcinoma*. **Methods:** Analytic observational study with *consecutive sampling* from 30 samples of biopsy tissue of *undifferentiated NPC* which underwent immunohistochemical detection with rabbit monoclonal antibody anti IL-35 (*RabMAbs*) to determine the expression of IL-35, and scoring by *Intensity Distribution Score (IDS)*. **Results:** The expression IL-35 by IDS measurement from 30 samples resulted mostly as strong to very strong in 27 samples, weak positive in 2 samples and negative in 1 sample with mean and standard deviation 224.67±78.00. **Conclusion:** There was an *overexpression* of IL-35 in the end state of *undifferentiated nasopharyngeal carcinoma*.

**Keywords:** *Nasopharyngeal carcinoma undifferentiated, Interleukin-35, predictive factor***Alamat korespondensi:** dr. Imam Prabowo, Sp.T.H.T.K.L. Bagian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok- Bedah Kepala Leher Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret/Rumah Sakit dr. Moewardi Surakarta. E-mail: diazyudis@yahoo.com

## PENDAHULUAN

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan keganasan pada kepala leher yang berasal dari epitel nasofaring dengan insidens tertinggi setelah kanker serviks, kanker payudara dan kanker kulit. Dilaporkan angka prevalensi KNF di Indonesia adalah 6,2 per 100.000 penduduk atau terdapat 12.000 kasus baru yang dilaporkan per tahun.<sup>1</sup> Di RSUD Dr. Moewardi Surakarta selama tahun 2012-2014 didapatkan 298 kasus KNF.<sup>2</sup>

*Epsteinn-Barr Virus* (EBV) diketahui memiliki hubungan yang kuat dengan KNF terutama tipe *undifferentiated*.<sup>3,4</sup> Sel-sel tumor berkembang antara lain karena dapat menghindari dari sistem imun dan membuat suatu *microenvironment* yang memungkinkan tumor untuk berkembang.<sup>5-7</sup>

Sitokin adalah suatu protein yang berperan sebagai mediator, pengatur imunitas, inflamasi dan hematopoiesis. Sitokin berukuran 8-30 kDa, merupakan peptida intraseluler pembawa sinyal yang bekerja secara autokrin, parakrin maupun endokrin, dihasilkan oleh sel-sel dari sistem imun yang spesifik maupun non spesifik sebagai respons terhadap antigen. Sitokin dapat diklasifikasikan berdasarkan struktur reseptornya. Ada beberapa kelas sitokin, yang paling besar adalah sitokin kelas I (reseptor hematopoetin) yaitu IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, *granulocyte macrophage colony stimullating factor* (GM-CSF), *granulocyte colony stimullating factor* (G-CSF), *leukemia inhibitory factor* (LIF), *oncostatin M*, *thrombopoietin*, *erythropoitein*, *growth hormone*, dan prolaktin. Sitokin kelas II (reseptor interferon) berupa IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  dan IL-10. Sitokin kelas III (reseptor *tumor necrosis factor* (TNF)) dan sitokin kelas IV (*family* reseptor IL-1).<sup>8</sup> Interleukin-35 adalah sitokin yang baru ditemukan, merupakan *family* dari IL-12 dengan komposisi sub unit IL-12 p35, IL-12 p40 dan *EBV-induced gene3* (EBI3). Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa IL-35 berperan dalam menurunkan/menekan respons imun, mensupresi proliferasi (sel T, CD4+ dan CD8+) dan menekan respons Th-17.<sup>9-12</sup>

Selain itu IL-35 juga membantu pertumbuhan tumor dengan mengakumulasi *mieloid dendritic supressor cells* (MDSC) yang berperan dalam tumorigenesis dengan berbagai mekanisme<sup>13,14</sup> dan menyebabkan angiogenesis sehingga massa tumor akan semakin membesar.<sup>11</sup> Hal ini berbeda pada penyakit inflamasi, model tumor menunjukkan bahwa IL-35 berkontribusi pada tumorigenesis. Efek ini dimediasi baik melalui *immune-directed* ataupun melalui *tumor-directed*.<sup>11</sup>

IL-35 diproduksi pada jaringan kanker manusia yaitu pada KNF dan limfoma Hodgkin. Selain itu IL-35 akan menekan sel T terutama CD8<sup>+</sup> sehingga menurun baik jumlah maupun fungsi efektor sel T sehingga berkurang kemampuan dalam mengeliminasi sel tumor.<sup>11</sup> IL-35 dapat merupakan faktor yang penting pada *microenvironment* yang berpengaruh pada respons sel T spesifik tumor dan progresifitas tumor.<sup>11,12</sup>

Penelitian Nishino et al<sup>15</sup> yang mengevaluasi kadar EBI3 pada pasien kanker paru menunjukkan bahwa peningkatan kadar EBI3 berbanding lurus dengan keganasan dan prognosis yang buruk dan merupakan indikator prognosis independen. Mengikuti *binding* IL-35 pada reseptor adalah transduksi sinyal melalui *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1 dan STAT 4 yang juga dapat membentuk formasi unik heterodimer dan menghasilkan ekspresi gen target termasuk p35 dan EBI3 yang akan meningkatkan ekspresi IL-35 secara maksimal. Keunikan lain dari IL-35 adalah reseptor IL-35 dapat berupa reseptor homodimer dari subunit. Namun, pada saat IL-35 berikatan dengan reseptor homodimer hanya salah satu STAT yang teraktivasi sehingga terdapat pengurangan aktivitas supresi dari IL-35.<sup>10,16</sup>

Ternyata, tidak hanya sel imun yang bisa mengekspresikan IL-35 tetapi juga sel tumor dan bahkan beberapa jaringan yang terkena inflamasi. Keberadaan IL-35 pada sel tumor juga membuat peningkatan ekspresi gp 130. Hal ini sangat menarik karena gp 130 diketahui mempunyai kemampuan untuk

membuat sel kanker lebih resisten terhadap kemoterapi.<sup>11</sup>

Penelitian ini bertujuan untuk melihat ekspresi IL-35 pada KNF *undifferentiated* yang berperan dalam mekanisme sistem imun, faktor prediktif serta progresivitas tumor terhadap usia dan stadium lanjut.

## METODE

Penelitian ini menggunakan rancangan observasional analitik dengan mengukur tingkat ekspresi IL-35 pada penderita KNF *undifferentiated* stadium lanjut. Populasi dalam penelitian ini adalah semua penderita yang datang berobat ke poliklinik THT-KL RSUD Dr. Moewardi Surakarta dan telah dilakukan biopsi nasofaring dengan hasil histopatologi menunjukkan *undifferentiated carcinoma*. Sampel penelitian adalah penderita KNF yang memenuhi kriteria penelitian. Kriteria inklusi adalah: 1) penderita dengan hasil histopatologi biopsi jaringan nasofaring adalah *undifferentiated carcinoma*; 2) bersedia menjadi subjek penelitian dengan menandatangani formulir persetujuan setelah mendapatkan penjelasan (*informed consent*).

Sedangkan untuk kriteria eksklusi adalah sebagai berikut: 1) sampel jaringan biopsi mengalami kerusakan pada pemeriksaan imunohistokimia selama penelitian berlangsung; 2) penderita sebelum dibiopsi nasofaring sudah menerima kemoterapi atau radioterapi.

Penelitian ini melibatkan 30 penderita dengan KNF yang telah dilakukan biopsi dengan hasil *Undifferentiated carcinoma* dan telah dilakukan *staging* menurut UICC (*International Union Against Cancer*) 1997 dengan CTscan nasofaring tanpa kontras, foto Rontgen toraks dan USG abdomen. Penggolongan stadium dibagi dalam dua kriteria yaitu stadium I-II (stadium awal) dan III-IV (stadium lanjut). Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *consecutive sampling* sampai besar sampel terpenuhi. Ekspresi IL-35 yang berasal dari jaringan KNF *undifferentiated* pada stadium lanjut, merupakan ekspresi protein pada sitoplasma

yang dilihat dengan menggunakan pewarnaan imunohistokimia (IHC) di bawah mikroskop per sembilan lapangan pandang dengan pembesaran 400 kali, menggunakan mikroskop Outilab Olympus CX.21. Ekspresi sel target ditunjukkan dengan warna kuning emas hingga cokelat tua. Imunoreaktivitas menggunakan antibodi IL-35 dengan *antibody monoclonal rabbit anti IL-35* (RabMAbs) dan pengukuran tingkat ekspresi IL-35 menggunakan skala rasio *Intensity Distribution Score* (IDS) dengan rumus dengan rentang nilai 0-300 sebagai berikut:<sup>17</sup>

$$IDS = (3 \times \% IK) + (2 \times \% IS) + (1 \times \% IL) + (0 \times \% IN)$$

### Keterangan:

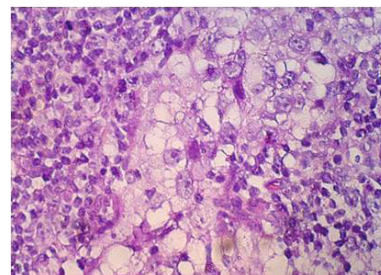
IK: intensitas positif kuat dengan warna cokelat tua

IS: intensitas positif sedang dengan warna cokelat muda

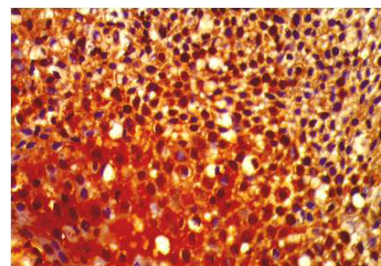
IL: intensitas positif lemah dengan warna kuning keemasan

IN: intensitas negatif dengan warna biru

Interpretasi peneliti nilai IDS secara semikualitatif adalah: 1) Negatif=0-60; 2) Positif lemah=61-120; 3) Positif sedang=121-180; 4) Positif kuat =181-240; 5) Positif sangat kuat=241-300.



**Gambar 1.** Pengecatan HE pada karsinoma nasofaring *undifferentiated* dengan pembesaran 400x pada mikroskop Outilab Olympus CX.21 yang difoto dengan *software* kamera Scopelimage 9.0 (H1C).



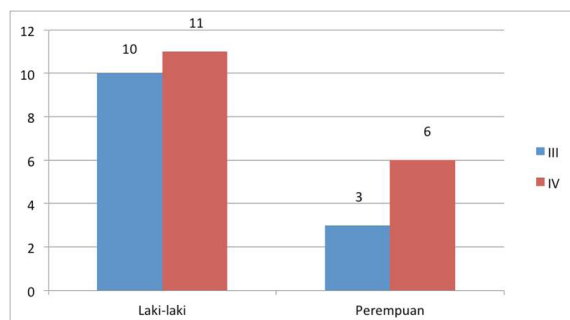
**Gambar 2.** Ekspresi IL-35 dengan pengecatan imunohistokimia pada karsinoma nasofaring *undifferentiated* dengan pembesaran 400x pada mikroskop Outilab Olympus CX.21 yang difoto dengan *software* kamera Scopelimage 9.0(H1C).

## HASIL

**Tabel 1. Gambaran karakteristik umum subyek penelitian**

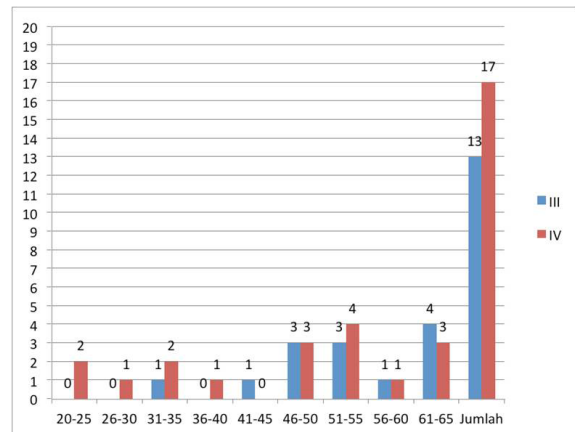
Variabel	Frekuensi	Persentase (%)
<b>Umur (tahun)</b>		
20-29	3	10,0
30-39	4	13,3
40-49	7	23,3
50-59	8	26,7
60-69	8	26,7
<b>Jenis kelamin</b>		
Laki-laki	21	70,0
Perempuan	9	30,0
<b>Stadium</b>		
III	13	43,3
IV	17	56,7

Karakteristik umum penderita KNF *undifferentiated* memiliki rentang umur yang bervariasi dari 20-69 tahun. Meskipun demikian, distribusi penderita tidak merata, sebagian besar berumur 40 tahun ke atas dan paling banyak pada kelompok umur 50-59 tahun dan 60-69 tahun (masing-masing 26,7%).



**Gambar 3.** Perbandingan laki-laki dan perempuan pada stadium KNF *undifferentiated*

Penderita laki-laki cukup dominan (70,0%), jumlahnya lebih dari dua kali lipat jumlah sampel penderita perempuan (30,0%). Jumlah penderita laki-laki pada stadium III lebih tinggi bila dibandingkan dengan jumlah penderita wanita, sedangkan pada stadium IV didapatkan pola yang berimbang antara penderita laki-laki dan perempuan dari keseluruhan jumlah sampel penderita.



**Gambar 4.** Pola distribusi pada stadium lanjut dan usia penderita KNF *undifferentiated*

Gambar 4 menunjukkan dari jumlah sampel penderita yang mengikuti penelitian ini didapatkan jumlah penderita dengan stadium IV sebanyak 17 orang (56,7%) lebih tinggi bila dibandingkan dengan stadium III sebanyak 13 orang (43,3%). Usia penderita di bawah 50 tahun didapatkan sebanyak 17 orang (50,67%)

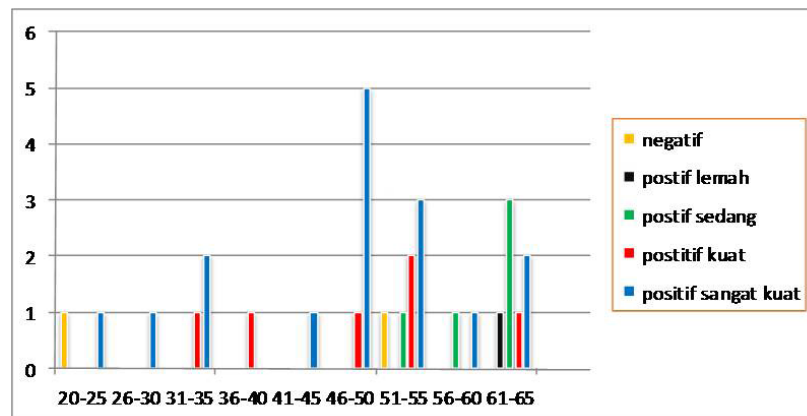
Variabel dan data dasar yang diamati adalah ekspresi IL-35 yang dapat dinyatakan secara numerik dalam bentuk IDS (*Intensity Distribution Score*) maupun secara kategorik dalam bentuk derajat dengan makna semi kualitatif.

**Tabel 2. Deskripsi ekspresi IL-35**

IL-35	Frekuensi (%)	Mean $\pm$ SD
Negatif	2 (6,7)	
Positif lemah	1 (3,3)	
Positif sedang	5 (16,7)	224,67 $\pm$
Positif kuat	6 (20,0)	78,00
Positif Sangat Kuat	16 (53,3)	

Pada tabel 2 dapat dilihat bahwa ekspresi IL-35 cukup kuat ditandai dengan rerata (Mean) IDS 224,67 dengan simpang baku sebesar (SD) 78,00. Sebagian besar sampel memiliki ekspresi IL-35 yang tergolong positif sangat kuat yaitu sebanyak 16 orang (53,3%). Gambar 5 menunjukkan distribusi penderita berdasarkan perhitungan dengan menggunakan IDS, dimana didapatkan hasil positif sangat kuat pada 16 penderita.





Gambar 5. Distribusi IDS dan interpretasi usia penderita KNF *undifferentiated*

## DISKUSI

Penelitian ini dilakukan pada 30 penderita KNF yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi di poliklinik THT-KL RSUD Dr. Moewardi Surakarta. Pengambilan sampel dilakukan secara *consecutive sampling* dengan metode penelitian observasional analitik yang bertujuan untuk mengetahui ekspresi IL-35. Pada 30 sampel penderita KNF WHO tipe *undifferentiated* didapatkan kelompok umur terbanyak pada 50-69 tahun sebanyak 16 pasien (26,7%). Karsinoma nasofaring dapat mengenai semua umur. Pada penelitian yang dilakukan di di RSUP H. Adam Malik Medan didapatkan kelompok umur terbanyak adalah 40-60 tahun.<sup>18</sup> Penelitian Siswadi<sup>2</sup> di RSUD Dr. Moewardi menunjukkan kelompok umur terbanyak pada 51-60 tahun yaitu 32,7%. Berdasarkan penelitian terdahulu, umur pasien dalam penelitian ini tidak jauh berbeda yaitu terbanyak dalam rentang usia 50-59 tahun dan kelompok umur 60-69 tahun masing-masing sebanyak 8 pasien (26,7%). Kecenderungan KNF terjadi pada usia di atas 40 tahun atau lebih, karena sistem imun yang menurun sehingga tidak dapat mengeliminasi antigen tumor atau virus EBV dengan baik. Selain itu mekanisme *DNA repair* kurang berfungsi dengan baik sehingga gagal dalam memperbaiki mutasi gen.<sup>19</sup>

Pada penelitian ini didapatkan bahwa penderita laki-laki lebih banyak dibanding perempuan. Jumlah laki-laki sebanyak 21

orang (70%) sementara untuk perempuan sebanyak 9 orang (33,3%). Siswadi<sup>2</sup> menyatakan 74,5% penderita KNF yang datang ke Poliklinik THT-KL RSUD Dr. Moewardi selama rentang tahun 2012-2014 adalah laki-laki. Penelitian oleh Muaba,<sup>20</sup> menunjukkan rasio penderita KNF laki-laki banding perempuan adalah 2,78:1. Jumlah penderita yang datang ke Poliklinik Onkologi THT-KL RSUD dr Moewardi Surakarta terbanyak pada stadium IV sejumlah 17 orang (56,7%) dan stadium III sebanyak 13 orang (43,3%).<sup>21</sup> Penderita KNF memang sering datang dalam stadium lanjut karena gejala KNF yang tidak khas pada stadium awal. Penelitian yang dilakukan oleh Chang<sup>22</sup> menunjukkan jumlah penderita KNF pada stadium III sebanyak 13 orang (26%) dan stadium IV sebanyak 22 penderita (44%). Penelitian Sari<sup>23</sup> menemukan bahwa 60,1% penderita datang pada stadium IV, kemudian berturut-turut stadium III (38,5%), stadium II (1,4%) dan tidak ada yang datang pada stadium I. Demikian juga pada penelitian ini, meskipun pengambilan sampel dilakukan secara *consecutive*, tetapi semua penderita berada pada stadium lanjut sesuai dengan penelitian sebelumnya.

Pada penelitian ini hasil pemeriksaan imunohistokimia dengan pengukuran IDS, ekspresi IL-35 pada 30 sampel menunjukkan (*mean*) 224,67 dengan (SD) 78,00. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa IL-35

terekspresi positif sangat kuat pada KNF *undifferentiated* pada stadium lanjut.<sup>14</sup> Zhang et al<sup>14</sup> melakukan pengecatan imunohistokimia dengan EB13 dan IL-12 p35 yang merupakan dua sub unit IL-35 pada 80 pasien KNF, menunjukkan bahwa IL-35 terekspresi sangat kuat pada sebagian besar sampel tersebut sedangkan pada penderita non tumor didapatkan IL-35 negatif. Ekspresi IL-35 juga didapatkan pada kanker paru, *multiple myeloma* dan kanker kolon.<sup>16,24</sup>

Interleukin-35 dapat mengakumulasi MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*) yang merupakan grup sel imun yang *heterogenous* yang berasal dari *myeloid lineage*.<sup>11,25</sup> Berbeda dengan tipe sel myeloid lain yang bersifat stimulator imun, MDSC bersifat menekan sistem imun yang sangat kuat. Pada kanker kepala leher paling banyak terdapat jenis *Monocytic*-MDSC.<sup>26</sup>

Akumulasi IL-35 terhadap MDSC pada sel tumor akan membantu progresifitas tumor tersebut dengan mengaktivasi *myelopoeisis* yang abnormal dan mengumpulkan sel *myeloid immature* ke dalam jaringan tumor serta merangsang proses angiogenesis.<sup>11</sup> MDSC mempunyai peranan lain dalam meningkatkan produksi radikal bebas yaitu ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) dan RNS (*Reactive Nitrogen Spesies*).<sup>13,26-28</sup>

Pada penelitian ini terdapat ekspresi yang cukup kuat dari IL-35 pada KNF *undifferentiated* pada stadium lanjut, yang menunjukkan progresifitas tumor yang tinggi dengan mengakumulasi M-MDSC sebagai *immunosupressor* sistem imun, meningkatkan angiogenesis tumor dan pemicu peningkatan radikal bebas pada KNF *undifferentiated* pada stadium lanjut. Hal ini menjadikan salah satu faktor prediksi terjadinya ketidak seimbangan sistem imun dan penurunan kualitas kesehatan pada penderita.

Pada penelitian yang dilakukan Yongquan et al<sup>29</sup> peningkatan EB13 dan p35 berhubungan dengan prognosis yang kurang

baik pada KNF stadium lanjut. Berdasarkan hal tersebut, IL35 dapat menjadi biomarker baru sebagai faktor prediktif dan prognosis penderita KNF, serta menjadi penemuan baru yang cukup menjanjikan sebagai landasan dalam pemberian target terapi pada KNF *undifferentiated*.<sup>30</sup>

Peneliti menyadari tidak mungkin untuk memetakan seluruh komponen sistem imun yang berperan dalam penelitian KNF. Hal tersebut menjadi keterbatasan peneliti dan penelitian biomolekuler juga membutuhkan dana yang tidak sedikit.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Marlinda A, Antonius K, Arina M, Averdi R, Bambang H, Soehartati G, et al. Nasopharyngeal Carcinoma in Indonesia: Epidemiology, Incidence, Sign, and Symptoms at Presentation. *Chin J Cancer* 2012; Vol. 31 Issue 4.
2. Siswadi W, Prabowo I. Studi Demografi pada Penderita Karsinoma Nasofaring di Wilayah Surakarta dan Sekitarnya. Disampaikan pada PIN IX PERHATI-KL. Malang, 20-22 Agustus 2015.
3. Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T. The Immunological Aspect of Epstein\_Barr Virus Infection. *Crit Rev Oncol Hematol* . 2002. 44:203-15.
4. Korcum F, Ozyar E, Ayhan A. Epstein-Barr virus Genes and Nasopharyngeal Cancer. *Turkish Journal of Cancer* 2006. 36 (3) : 97-103
5. Grenberg PD. Mechanisme of tumor immunology. In : Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, editor. *Medical Immunology*. 7<sup>th</sup> edition. Singapore McGraw-Hill 2001. p : 568-76.
6. Abbas AK, Litchman AH. Immunity to Tumor in : *Cellular and Molecular Immunology*. Ed. 7<sup>th</sup>. Philadelphia. WB Saunders 2007. P : 397-439.

7. Finn OJ. Cancer Immunology. The New England Journal of Medicine 2008; 358: 2704-15.
8. Dy M, Vasquez A. General Aspect of Cytokine Properties and Functions. Theze J. The Cytokines Network and Immune Functions. Oxford University Press 2000. p 1-13.
9. Ning-Wei Z. Interleukin 35 is Raising Our Expectations. Rev Med Chile 2010;138: 758-66.
10. Collison LW, Chaturverdi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, Forbes D. Interleukin 35 Mediated Induction of Novel Regulatory T Cell Population. Nat Immunol 2010; 11(12): 1093-1101.
11. Wang Z, Liu JQ, Liu Z, Shen R, Zhang G, Xu J, Basu S. Tumor Derived IL 35 Promotes Tumor Growth by Enhancing Myeloid Cell Accumulation and Angiogenesis. The Journal of Immunology 2013; 1202535 : 1-9 .
12. Rubaei ZM. Study of IL 35 Levels in Multiple Myeloma Patients and Its Relation with Immunoglobulin. Journal of Natural Sciences Research 2013; 3(15):33-9.
13. Yang WC, Ma G, Chen S, Pan P. 2013. Polarization and Reprogramming of Myeloid Derived Suppressor Cells. Journal of Molecular Biology 2013; 5 : 207-9.
14. Zhang YL, Li J, Mo HY, Qiu F, Zheng LM, Qian CN, *et al.* Different Subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC Progression in different ways. Molecular Cancer. 2010. 9(4)
15. Nishino R, Takano A, Oshita H, Ishikawa N, Akiyama H, Ito H, Miyagi Y. Identification of Epstein-Barr Virus Induced Gene 3 As a Novel Serum and Tissue Biomarker and a Therapeutic Target for Lung Cancer. Clin Cancer Res 2011; 17 : 6272-86.
16. Olson B, Sullivan J, Burlingham W. Interleukin 35 : a Key Mediator of Suppression and The Propagation of Infectious Tolerance. Frontiers in Immunology 2013; 4 (315) : 1-12
17. Tuccari G, Villari D, Gluffre G, Simone A, Squadrito G, Raimondo G, *et al.* Immunohistochemical Evidence of Lactoferrin in Hepatic Biopsies of Patients with Viral or Cryptogenetic Chronic Liver Disease. Histol Histopathol 2002. 17;1077-1083.
18. Melani W. Karakteristik Penderita Karsinoma Nasofaring di Rumah Sakit H. Adam Malik Medan Tahun 2011. E-jurnal Fakultas Kedokteran USU 2013.
19. Abbas AK, Lichtman AH. Immunity to Tumor in : Cellular and Molecular Immunology. Ed. 7<sup>th</sup>. Philadelphia. WB Saunders 2007. P : 397-439.
20. Muaba F, Nuaba. Karakteristik Pasien Karsinoma Nasofaring di Poliklinik Telinga, hidung Tenggorok – Kepala Leher Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar. E-jurnal Medika Udayana 2015.
21. Brennan B. Nasopharyngeal Carcinoma. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006; 1 (23): 1-5.
22. Chang JT, Chan SH, Lin CY, Wang HM, Liao CT, Wang TH *et al.* Differentially Expressed Genes in Radioresistant Nasopharyngeal Cancer Cells : gp 96 and GDF 15. Molecular Cancer Therapeutic. 2007. Vol 6(8). 2271-9
23. Sari AK, Setiamika M. Gambaran Kejadian Karsinoma Nasofaring Tahun 2007-2009 di RSUD Dr. Moewardi Surakarta. Disampaikan pada KONAS PERHATI-KL XV Makassar, 7-9 Juli 2010.
24. Zeng JC, Zhang Z, Li TY, Liang YF, Wang HM, Bao JJ, Zhang JA. Assessing The Role of IL-35 in Colorectal Cancer Progression and Prognosis. Int J Clin Exp Pathol 2013; 6(9) : 1806-16.
25. Liao K, Bai X, Friedman A. Mathematical Modeling of Interleukin-35 Promoting Tumor Growth and Angiogenesis. PLOS One 2014. 9 (10)
26. Gabilovich D, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated Regulation of Myeloid Cells by Tumours. Nat Rev Immunol 2012; 12(4): 253-68.

27. Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor Escape Mechanism Governed by Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res* 2008; 68(8): 2561-63.
28. Tesone A, Svoronos N, Allegreza M, Conejo-Gracia J. Pathological Mobilization and Activities of Dendritic Cells in Tumor-Bearing Host : Challenges and Opportunities for Immunotherapy Cancer. *Frontiers in Immunology* 2013; vol 4 (435)
29. Yongquan Z, Hong S, Hui W, Qingdong T, Kai X. Interleukin 35 is An Independent Prognostic Factor And Therapeutic Target For Nasopharyngeal Carcinoma. *Contemp Onkol (Pozn)*2015;19(2):120-24.
30. Yulliya Pylayeva G. Molecular Pathways: Interleukin-35 is Autoimmunity and Cancer. *Clinical Cancer Research* 2016. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-16-0743.