

Laporan Penelitian**Pemeriksaan EBER sebagai identifikasi infeksi virus *Epstein-Barr* pada karsinoma nasofaring****Achmad Chusnu Romdhoni*, Muhammad Noer Shoffi*****Departemen Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala Leher
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Dr. Soetomo**Bagian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala Leher
Rumah Sakit Tentara Nasional Indonesia Angkatan Laut Dr. Ramelan
Surabaya**ABSTRAK**

Latar belakang: Protein *Epstein-Barr Virus Encoded Small RNA* (EBER) ditemukan pada sebagian besar jaringan karsinoma nasofaring (KNF). Hal ini merupakan bukti bahwa infeksi virus *Epstein-Barr* (VEB) menjadi salah satu penyebab terjadinya KNF. Penurunan ekspresi EBER dipengaruhi oleh maturasi sel dan diferensiasi sel karsinoma. **Tujuan:** Mengidentifikasi hubungan ekspresi EBER dengan stadium dan jenis histopatologi pada penderita KNF. **Metode:** Penelitian observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Penelitian dilakukan di Unit Rawat Jalan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala Leher Rumah Sakit Umum Daerah Dokorr. Soetomo Surabaya mulai bulan November 2015 hingga Oktober 2016 dengan *consecutive sampling*. *Fisher exact test* untuk melihat hubungan ekspresi EBER dengan stadium KNF. **Hasil:** Ekspresi EBER dari seluruh sampel didapati negatif sebanyak 23,33%, positif lemah sebanyak 10%, positif sedang sebanyak 33,33%, dan positif kuat sebanyak 33,33%. Berdasarkan hasil uji statistik menunjukkan hubungan antara ekspresi EBER dengan stadium KNF didapatkan $p=0,623$, sedangkan ekspresi EBER dengan jenis histopatologi KNF diketahui $p=0,204$. **Kesimpulan:** Tidak terdapat hubungan antara ekspresi EBER dengan stadium KNF, maupun antara ekspresi EBER dengan jenis histopatologi KNF.

Kata kunci: Karsinoma nasofaring, ekspresi EBER, stadium dan jenis histopatologi**ABSTRACT**

Background: Protein of *Epstein Barr Virus Encoded Small RNA* (EBER) have found in most of the nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissue which prove that NPC was caused by *Epstein Barr Virus Infection* (EBV). EBER expression decreased was triggered by maturation and differentiation cell EBER expression in NPC patients. **Purpose:** To identify association between EBER expression and histopathological type of NPC. **Method:** This study was an observational analytic with cross-sectional design. This study occurred at Inpatients Unit of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery of Dr. Soetomo Hospital Surabaya, November 2015 - October 2016. Samples were collected by consecutive sampling. Statistical analysis was using Fisher's exact test. **Result:** The EBER expression from all sample there were 23.33% negative, 10.00% weak positive, 33.33% moderate positive, and 33.33% strong positive. Statistical analysis was obtained $p=0.623$ and the association between EBER expression with stage of NPC was obtained $p=0.204$. **Conclusion:** There was no association between EBER expression and stage NPC, nor histopathological type of nasopharyngeal carcinoma.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma, EBER expression, stage and histopathological type**Alamat korespondensi:** Dr. A.C. Romdhoni, ORL-HNS (C), Ph.D., FICS. Departemen Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Email: romdhoni-a-c@fk.unair.ac.id.

PENDAHULUAN

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan keganasan yang paling sering dijumpai pada daerah kepala leher di Indonesia.¹ Frekuensi relatif KNF berkisar antara 38,1–71,8%. Berdasarkan data kombinasi klinik dan patologi dari berbagai rumah sakit di Indonesia, frekuensi relatif KNF menduduki peringkat ke-6 dari tumor ganas tubuh manusia, setelah tumor ganas leher rahim, hati, payudara, paru, dan kulit. Pada keganasan kepala dan leher, KNF menduduki urutan pertama dengan frekuensi sekitar 60%.²

Di negara Kaukasia, insiden KNF kurang dari 1 per 100.000. Angka ini berlawanan dengan insiden pada penduduk Guangdong di Cina Selatan, Inuit di Alaska, dan penduduk Greenland. Khusus untuk orang Kanton yang mendiami daerah sentral dari Provinsi Guangdong, insidennya adalah 15-25 kasus per 100.000, sehingga KNF disebut juga “*Canton tumor*”.³

Insiden KNF di Eropa, Amerika Utara, Jepang, dan India mencapai 0,5-1,0 per 100.000 penduduk per tahun.⁴ Insiden KNF juga dilaporkan di Hongkong sebesar 20 per 100.000 penduduk, sedangkan Taiwan dan Singapura sebesar 18,1 dan 7,4 per 100.000 penduduk. KNF dilaporkan sebagai tumor ganas terbanyak di antara penderita tumor ganas kepala dan leher yang berobat di Rumah sakit (42%) di Taiwan.⁵

KNF lebih sering ditemukan pada laki-laki dibandingkan wanita. Rerata usia penderita yaitu 40-60 tahun. Rasio penderita KNF pada laki-laki dan wanita adalah 3:1.⁴ Penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya menjumpai bahwa mayoritas penderita KNF berumur 50-60 tahun, dengan rasio laki-laki dan wanita adalah 2,1:1.⁶

Hubungan antara virus *Epstein-Barr* (VEB) dengan KNF berkaitan erat dengan proses penularan melalui saliva, yang terjadi karena kontak oral yang intim, maupun saliva

yang tertinggal pada alat makan, minum, dan juga mainan, serta benda lain. *Portal of entry virus Epstein-Barr* (VEB) ini adalah orofaring. Virus ini akan melakukan replikasi pada elemen epitelial kelenjar parotis, faring, dan lidah, atau bisa juga pada sel limfosit B.⁷ Penularan seperti ini terjadi pada masyarakat yang kurang memperhatikan aspek kesehatan dan kebersihan, misalnya pada masyarakat yang berpenduduk padat, sosial-ekonomi rendah, dan tinggal dengan sarana higiene sanitasi yang tidak baik.⁸

Virus yang telah masuk dalam limfosit B dan epitel nasofaring manusia akan tinggal secara laten untuk jangka waktu lama tanpa menyebabkan suatu kelainan. Virus akan diaktivasi oleh beberapa faktor: 1) konsumsi ikan asin (kandungan zat nitrosamin yang merupakan zat karsinogen seperti yang terkandung dalam ikan atau makanan yang diawetkan); 2) ekstrak tumbuhan yang banyak digunakan pada pengobatan tradisional (*Burdock* yang mengandung *N-Butyric acid* yang dikenal sebagai promotor VEB); 3) faktor lain seperti karsinogen lingkungan (bahan karsinogen di samping nitrosamin adalah *benzopyrene*, *benzoanthracene*, gas kimia, dan asap industri).⁹

Setelah menginfeksi sel B, virus akan membentuk beberapa protein, antara lain EBNA1 (*Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1*), EBNA2, LMP1 (*Latent Membrane Protein 1*), LMP2, EBER1, EBER2, dan BARF1. *Epstein-Barr Virus encoded small RNA* (EBER) dijumpai pada sebagian besar sel yang mengalami infeksi VEB laten. EBER termasuk protein VEB yang diekspresikan pada infeksi VEB jenis laten I pada limfoma Burkitt (LB). Jenis laten II pada KNF dan jenis laten III pada mononukleosis infeksiosa. EBER digunakan sebagai molekul target pada pemeriksaan *hibridisasi in situ* (HIS) jaringan yang mengalami infeksi VEB, sebagai penanda adanya VEB pada sel yang mengalami infeksi VEB laten. Studi terbaru menyatakan bahwa jalur EBER berperan pada onkogenesis VEB.^{2, 3, 10, 11}

Protein *Epstein-Barr virus encoded small RNA* menginduksi ekspresi sitokin yang berperan sebagai faktor pertumbuhan autokrin, antara lain interleukin 10 (IL-10) pada sel limfoma Burkitt, IL-9 pada limfoma sel T, dan *insulin like growth factor 1* (IGF1) pada sel KNF yang menyebabkan pertumbuhan dan proliferasi sel tidak terkontrol. Protein EBER juga menyebabkan sel menjadi resisten terhadap apoptosis melalui mekanisme hambatan terhadap aktivitas *RNA-dependent protein kinase* (PKR). Meningkatnya pertumbuhan dan proliferasi sel serta menurunnya apoptosis menyebabkan pertumbuhan invasif lapisan sel epitel nasofaring yang bersifat independen sehingga pada akhirnya menjadi sel karsinoma.^{12,13}

Ditemukannya protein EBER pada sebagian besar jaringan karsinoma nasofaring merupakan bukti bahwa infeksi virus *Epstein-Barr* menjadi salah satu penyebab terjadinya KNF.^{2,5,6,14} Pada berbagai negara seperti Jepang, Taiwan, Turki, Spanyol, Iran, Cina, dan Turki, protein EBER diekspresikan pada sebagian besar sel KNF sebesar 100%; 98,1%; 96,8%; 95%; 91,43%; dan 86,9%. Hal tersebut meliputi ketiga jenis histopatologi KNF, terutama jenis karsinoma yang tidak berkeratinisasi (WHO tipe II) dan karsinoma tidak berdiferensiasi (WHO tipe I).^{14,15}

Berdasarkan uraian tersebut bahwa protein EBER merupakan gen yang diekspresikan pada sebagian besar sel KNF. Namun sampai saat ini belum diketahui hubungan ekspresi EBER dengan berbagai jenis histopatologi dan stadium pada penderita KNF di Poli Telinga Hidung Tenggorok – Bedah Kepala Leher (THT-KL) Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. Soetomo Surabaya. Oleh sebab itu, peneliti bermaksud untuk mengidentifikasi hubungan ekspresi EBER dengan berbagai jenis histopatologi dan stadium pada penderita KNF yang datang berobat di poli THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

Dengan terbuktinya penelitian ini maka diharapkan dapat dilakukan pemilihan terapi yang lebih tepat untuk kasus KNF tersebut agar memberikan hasil terapi yang lebih baik. Tahap stadium dan jenis histopatologi pada penderita KNF. pemeriksaan EBER sebagai identifikasi virus epstein barr pada KNF.

METODE

Studi dilakukan dengan rancangan observasional analitik secara *cross-sectional*. Teknik pengambilan sampel adalah *consecutive sampling*. Sampel diambil dari penderita KNF yang berobat di Unit Rawat Jalan Telinga Hidung Tenggorok Bedah - Kepala Leher Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya sejak bulan Januari hingga Juni 2016 dengan hasil histopatologi dari biopsi nasofaring dan telah ditegakkan sebagai KNF WHO tipe I, II dan III.

Kriteria inklusi penelitian ini adalah penderita KNF yang belum mendapatkan terapi definitif yaitu radioterapi, kemoterapi atau kombinasi radioterapi dan kemoterapi. Penderita KNF mempunyai bahan biopsi nasofaring yang cukup untuk dapat dilakukan pemeriksaan HIS ekspresi EBER dan setuju untuk diikuti sebagai sampel penelitian (*informed consent*).

Pemeriksaan HIS EBER merupakan suatu metode pemeriksaan untuk mendeteksi urutan asam nukleat di sel atau jaringan KNF dengan menggunakan *Biotin-labeled oligonucleotide probe* yang berlabel *Zyto Fast EBV* dan *Zyto Fast Plus CISH Implementation Kit HRP-DAB* (dari *Zyto Vision GmbH Fischkai, Bremer haven, Germany*) kemudian diberi pewarnaan Mayer's hematoxylin. Ekspresi HIS EBER setiap sampel dinilai secara semi-kuantitatif menurut metode *Immunoreactive score* (IRS). Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan uji *Fisher exact test* untuk menentukan hubungan antara jenis histopatologi KNF dengan ekspresi EBER pada KNF.

HASIL

Penderita KNF pada penelitian ini berusia 32-72 tahun. Kelompok usia terbanyak adalah 50-59 tahun, yaitu sebanyak 16 penderita (53,33%). Perbandingan antara perempuan dan laki-laki yang menderita KNF adalah 1,3:1. Jenis pekerjaan terbanyak adalah wiraswasta sebesar 9 penderita (30%). Tidak terdapat penderita KNF stadium I. Sebagian besar penderita KNF adalah stadium IV, yaitu 27 penderita (90%). Jenis histopatologi terbanyak adalah WHO tipe III sebanyak 14 penderita (46,66%) dan terendah adalah tipe I sebanyak 4 penderita (13,34%) (tabel 1).

Dari seluruh sampel didapatkan ekspresi EBER negatif pada 7 penderita yang terdiri dari 1 penderita KNF stadium II dan 6 penderita KNF stadium IV. Hasil positif lemah (+) pada 3 penderita yang terdiri dari 1 penderita KNF stadium III dan 2 penderita KNF stadium IV. Hasil positif sedang (++) pada 10 penderita yang terdiri dari 1 penderita KNF stadium III dan 9 penderita KNF stadium IV. Hasil positif kuat (++++) pada 10 penderita yang terdiri dari 10 penderita KNF stadium IV. Pada penelitian ini stadium IV paling banyak menunjukkan ekspresi positif sedang (++) dan positif kuat (+++). Ekspresi

Tabel 1. Karakteristik umum penelitian (n=30)

Karakteristik responden	Jumlah (n)	Persentase (%)
Usia (tahun)		
30-39	2	6,67
40-49	5	16,67
50-59	16	53,33
60-69	6	20,00
70-79	1	3,33
Jenis kelamin		
Laki-laki	17	56,67
Perempuan	13	43,33
Jenis pekerjaan		
Petani	7	24,44
Karyawan pabrik	1	3,33
Wiraswasta	9	30,00
Pedagang	4	14,46
Ibu rumah tangga	7	24,44
Pegawai negeri sipil	1	3,33
Stadium		
I	0	0
II	1	3,33
III	2	6,67
IV	27	90,00
Jenis histopatologi (WHO)		
Tipe I	4	13,34
Tipe II	12	40,00
Tipe III	14	46,66
Total	30	100,00

EBER dengan stadium histopatologi pada penderita KNF menunjukkan hasil hubungan yang tidak bermakna ($p>0,05$) (tabel 2).

Dari seluruh sampel didapatkan ekspresi EBER negatif pada 7 penderita, terdiri dari 1 penderita KNF WHO tipe I, 2 penderita KNF WHO tipe II, dan 4 penderita KNF WHO tipe III. Positif lemah (+) pada 3 penderita, terdiri dari 1 penderita KNF WHO tipe I dan 2 penderita KNF WHO tipe II. Hasil positif sedang (++) pada 10 penderita yang terdiri dari 1 penderita KNF WHO tipe I, 5 penderita KNF WHO tipe II, dan 4 penderita KNF WHO tipe III. Positif kuat (+++) pada 10 penderita yang terdiri dari 1 penderita KNF WHO tipe I, 4 penderita KNF WHO tipe II, dan 5 penderita KNF WHO tipe III. Pada penelitian ini jenis histopatologi tipe II dan III paling banyak menunjukkan ekspresi positif sedang (++) dan positif kuat (+++). Ekspresi EBER dengan jenis histopatologi (WHO tipe I, II, III) pada penderita KNF menunjukkan

hubungan yang tidak bermakna ($p>0,05$). Ekspresi EBER dengan jenis histopatologi (WHO tipe I, II, III) pada penderita KNF menunjukkan hasil hubungan yang tidak bermakna ($p>0,05$) (tabel 3).

Hasil pemeriksaan hibridisasi *in situ* (HIS) ekspresi EBER pada jaringan KNF diidentifikasi dengan adanya pulasan warna kecoklatan pada nukleus sel tumor. Pengamatan dan penilaian ekspresi EBER dilakukan dengan mikroskop binokuler dengan pembesaran 400x.

Tidak tampak pulasan warna kecoklatan pada inti sel, menunjukkan ekspresi EBER negatif (-) (gambar 1a). Tampak pulasan warna kecoklatan intensitas lemah pada nukleus (tanda panah merah) dengan proporsi sel yang terwarnai antara 6-25% menunjukkan ekspresi EBER positif lemah (+) (gambar 1b). Tampak pulasan warna kecoklatan intensitas sedang pada nukleus (tanda panah merah)

Tabel 2. Hasil pemeriksaan EBER pada berbagai stadium KNF

Ekspresi EBER (skala IRS)	Stadium KNF			<i>P</i> value
	II	III	IV	
Negatif (-)	1 (14,33%)	0 (0%)	6 (85,70%)	0,204
Positif lemah (+)	0 (0%)	1 (33,33%)	2 (66,70%)	
Positif sedang (++)	0 (0%)	1 (10,0%)	9 (90,0%)	
Positif kuat (+++)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100,0%)	
Total	1 (3,33%)	2 (6,67%)	27 (90,00%)	

Keterangan: Skala IRS

Negatif (-), bila hasil skala IRS bernilai 0

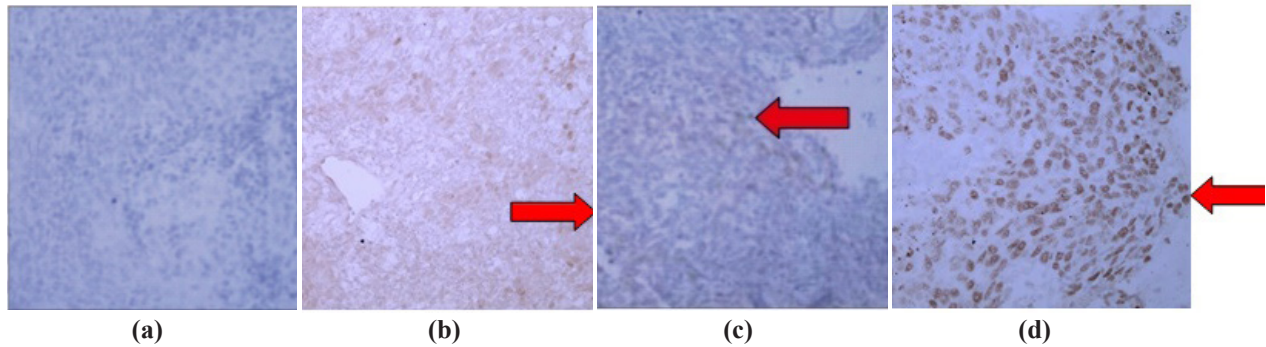
Positif lemah (+), bila hasil skala IRS antara 1–2

Positif sedang (++) , bila hasil skala IRS antara 3–4

Positif kuat (+++), bila hasil skala IRS antara 5–6

Tabel 3. Hasil pemeriksaan ekspresi EBER pada berbagai jenis histopatologi KNF

Ekspresi EBER (Skala IRS)	Jenis histopatologi KNF (WHO)			<i>P</i> value
	Tipe I	Tipe II	Tipe III	
Negatif (-)	1 (14,33%)	2 (28,66%)	4 (57,11%)	0,623
Positif lemah (+)	1 (33,33%)	2 (66,66%)	0 (0,00%)	
Positif sedang (++)	1 (10,00%)	5 (50,00%)	4 (40,00%)	
Positif kuat (+++)	1 (10,00%)	3 (30,00%)	6 (60,00%)	
Total	4 (13,33%)	12 (40,00%)	14(46,66%)	



Gambar 1. Hasil pengecatan EBER pada jaringan KNF dengan teknik HIS.

dengan proporsi sel yang terwarnai antara 26-50% menunjukkan ekspresi EBER positif sedang (++) (gambar 1c). Tampak pulasan warna kecoklatan intensitas kuat pada nukleus (tanda panah merah) dengan proporsi sel yang terwarnai >50% menunjukkan ekspresi EBER positif kuat (+++) (gambar 1d).

Data analisis hubungan ekspresi EBER dengan stadium KNF dinilai menggunakan uji *Fischer exact test* didapatkan nilai $p=0,204$. Ekspresi EBER dengan stadium histopatologi pada penderita KNF menunjukkan hasil hubungan yang tidak bermakna ($p>\alpha=0,05$). Berdasarkan hasil statistik menunjukkan ekspresi EBER dengan jenis histopatologi (WHO tipe I, II, dan III) pada penderita KNF menunjukkan hasil hubungan yang tidak bermakna $p(0,623) > \alpha(0,05)$.

DISKUSI

Pada penelitian ini, proporsi usia penderita KNF yang didominasi usia ≥ 40 tahun menunjukkan bahwa teori karsinogenesis bersifat *multistep*, multifaktor, dan membutuhkan waktu yang lama atau terlambat didiagnosis.¹⁶ Infeksi VEB pada epitel nasofaring sebagai suatu faktor risiko KNF memiliki masa laten sekitar 20-25 tahun tanpa menimbulkan gejala. Infeksi VEB primer terjadi pada masa kanak-kanak dan bersifat asimtomatis. Reinfeksi VEB yang terjadi setelah infeksi laten, paparan bahan karsinogenik atau polusi yang lebih banyak pada usia produktif, dan

penurunan faktor imunitas diduga sebagai predisposisi timbulnya KNF. Hal tersebut yang menyebabkan insiden KNF tinggi pada usia 40-60 tahun.¹⁷

Dari hasil penelitian terdahulu, didapati penderita KNF didominasi oleh laki-laki. Tingginya insiden pada laki-laki diduga disebabkan oleh kebiasaan hidup dan pekerjaan sehingga laki-laki lebih sering kontak dengan karsinogen, penyebab KNF. Kebiasaan hidup seperti merokok, paparan uap, asap debu dan gas kimia di tempat kerja meningkatkan risiko KNF 2-6 kali. Paparan formaldehid di tempat kerja meningkatkan risiko KNF 2-4 kali. Zat tersebut mengalami proses metabolisme oleh enzim tubuh menjadi *ultimate-carcinogen* sehingga dapat menyebabkan mutasi genetik. Penggunaan kayu bakar, paparan panas industri, dan produk pembakaran juga meningkatkan risiko KNF 2 kali lipat.¹¹

Mayoritas penderita KNF adalah wiraswasta, atau bekerja seperti tukang las dan pedagang kaki lima yang mempunyai aktivitas di luar rumah lebih lama. Paparan sinar ultra violet, asap kendaraan bermotor, dan polusi udara dalam jangka waktu lama, dimungkinkan dapat meningkatkan risiko KNF. Penelitian epidemiologi menunjukkan selain kerentanan genetik dan infeksi laten VEB, paparan dini terhadap karsinogen kimia (terutama ikan asin) merupakan faktor etiologi utama pada KNF. Makanan yang diawetkan juga berperan sebagai faktor etiologi KNF. Metode memasak juga berpengaruh pada

volatile nitrosamin yang terhirup. Faktor etiologi lain pada KNF adalah kandungan *nitrosodietylamin* pada daging asap dan dendeng, penggunaan obat herbal intranasal, serta pengawetan bahan makanan yang tidak tepat (penggunaan formalin) yang sering ditemukan di Indonesia.¹⁸

Pada penelitian ini didapati ibu rumah tangga merupakan penderita KNF terbanyak kedua, setelah yang bekerja sebagai wiraswasta. Pada penelitian ini tidak dilakukan pengumpulan data mengenai metode memasak, tetapi faktor tersebut memungkinkan individu bukan pekerja seperti ibu rumah tangga dan pelajar tetap dapat terpapar dengan karsinogen KNF melalui makanan atau kegiatan memasak di rumah, sehingga dapat berisiko cukup tinggi menderita KNF. Aktivitas dalam rumah tangga yang sering mengalami paparan asap pembakaran gas dan bahan kimia seperti pemutih serta pembersih lantai meningkatkan risiko KNF. Kekurangan diet buah, sayuran, daging merah, dan makanan kurang iodium dalam rumah tangga juga berisiko menderita KNF.¹⁹

Risiko KNF meningkat pada petani, yang dapat disebabkan paparan ultra violet, kontak dengan pestisida, bahan kimia bersifat asam maupun basa, dan asap pembakaran kayu atau tanaman. Penelitian menunjukkan risiko paparan selama 10-20 tahun memiliki hubungan yang bermakna dengan kejadian KNF dan dihitung sebagai efek masa laten.²⁰ Penelitian di Cina bagian selatan mendapatkan faktor risiko dalam pekerjaan yang menjadi predisposisi KNF meliputi paparan terhadap asap kayu bakar lebih dari 10 tahun dan paparan bahan pelarut kurang dari 10 tahun.²¹ Paparan pada pekerja yang dihubungkan dengan kejadian KNF adalah paparan debu atau partikel dengan ukuran sedang (5-10 mm) yang mudah diserap oleh mukosa nasofaring. Bahan karsinogenik dapat masuk ke dalam tubuh melalui proses hirupan udara atau lewat oral.

Penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa pekerja yang terpapar debu kayu pada periode dan dosis tertentu dapat mengalami peningkatan risiko KNF. Akan tetapi, rasio paparan pekerja tidak dapat ditentukan karena tergantung oleh kekerapan dan area yang endemik.¹⁵ Penelitian di Malaysia menunjukkan bahwa paparan bahan berbahaya (radiasi ion, logam berat, asap, debu kayu dan bahan kimia volatil) di lingkungan kerja berhubungan signifikan sebagai faktor risiko KNF.¹² Paparan sinar ultra violet matahari juga dapat meningkatkan insiden kanker.¹⁶

Penderita KNF berdasarkan klasifikasi stadium terbanyak pada penelitian ini adalah stadium IV, diikuti stadium III, dan stadium II. Hasil tersebut serupa dengan penelitian sebelumnya di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya mendapatkan stadium IV sebesar 71,42%, diikuti stadium II, dan III masing-masing 14,29%.²² Penelitian di Inggris juga didapatkan stadium IV sebesar 52,20%, stadium III 31,30%, dan stadium II 14,90%, sedangkan stadium I tidak didapatkan.²³ Penderita KNF sering datang dalam keadaan lanjut. Faktor penyebabnya meliputi keterlambatan dalam mengakses pengobatan, pengetahuan tentang KNF yang rendah, jauhnya tempat penanganan dan tingkat sosio-ekonomi yang rendah. Penelitian di India menunjukkan 66,0% penderita KNF mempunyai status sosio-ekonomi rendah dan 88,4% berasal dari pedesaan.⁴ Penelitian di Taiwan menunjukkan bahwa faktor sosio-ekonomi mempunyai hubungan signifikan dengan keterlambatan terapi KNF, sedangkan tempat tinggal atau asal penderita tidak ada hubungan signifikan dengan keterlambatan terapi.²⁴ Penelitian KNF di Indonesia menunjukkan bahwa penderita datang dalam kondisi lanjut akibat kurangnya pengetahuan petugas kesehatan di tingkat pelayanan primer dan keterlambatan dalam rujukan ke senter yang lebih tinggi.²¹

EBER terutama berada di nukleus yang dibuktikan melalui pewarnaan hibridisasi *in*

situ (HIS) EBER. Pemeriksaan ini merupakan pemeriksaan baku emas untuk mendeteksi dan mengetahui lokasi VEB laten pada sampel jaringan. EBER diekspresikan secara konstan pada semua tumor VEB positif, terutama pada jaringan limfoid dari pasien mononukleosis infeksiosa. EBER jarang ditemukan pada sel terinfeksi flora normal, maupun pada individu karier virus yang sehat. Studi terbaru menyebutkan bahwa EBER digunakan sebagai penanda yang sensitif untuk mengetahui sel KNF di tempat metastase dengan menggunakan pemeriksaan HIS. Pada kasus metastase kanker yang tidak diketahui asalnya, dipertimbangkan suatu KNF bila VEB didapatkan pada sel tumor.⁴

Infeksi VEB laten mengekspresikan 6 antigen VEB, 2 tipe RNA non translasi, dan 2 protein membran yang bisa mengubah jalur sinyal siklus sel. Hal ini dapat mengubah mukosa nasofaring, termasuk memodulasi perlawanan respons tubuh. Deteksi VEB penting untuk diagnosa dini dan prediksi perkembangan nasofaring.²⁵

Metode HIS EBER berdasarkan amplifikasi biologis alami dari sekuens target yang menghasilkan sejumlah besar transkrip EBER yang ekspresinya pada infeksi laten berjumlah 10^7 kopi per sel.^{25,26} Sebagai alat deteksi VEB pada kasus KNF, HIS EBER lebih sensitif dibandingkan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Studi di Taiwan membuktikan dari 107 kasus KNF, VEB terdeteksi pada 97 kasus dengan PCR, namun dengan HIS EBER dapat mendeteksi 105 kasus. Pemeriksaan hibridisasi pada epitel normal jaringan bukan kanker menunjukkan hasil negatif. Hal tersebut dibuktikan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa tidak ada sinyal VEB yang terdeteksi pada pemeriksaan EBER HIS jaringan biopsi nasofaring normal dari subyek di Malaysia.²⁷

Menurut penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa sinyal VEB tidak terdeteksi pada 8 individu normal di area endemis tinggi KNF di Cina. Hal tersebut

menunjukkan bahwa tidak ada VEB yang terdeteksi pada limfosit normal dan epitel di sekitar tumor.¹²

VEB terdeteksi dengan pemeriksaan EBER HIS. Hubungan antara VEB dengan KNF WHO tipe II dan III diketahui setelah ditemukan pada semua kasus tanpa menentukan asal daerah penderita. Hal tersebut menunjukkan bahwa infeksi VEB berperan dalam patogenesis KNF WHO tipe II dan III.²⁸ Deteksi VEB menggunakan EBER HIS didapatkan pada area dengan tingkat endemis yang berbeda di dunia, antara lain Malaysia, Jepang dan Taiwan yang merupakan area endemis KNF yang tinggi. Italia, Spanyol, Amerika, Maroko, Iran dan Turki yang merupakan area endemis KNF intermediet. Di Jepang, EBER ditemukan pada KNF WHO tipe I. Di Malaysia, genom virus ditemukan pada semua pasien (120 penderita KNF). VEB tersebut terdeteksi pada sediaan biopsi jaringan KNF.⁷

Berdasarkan hasil pemeriksaan HIS menunjukkan peningkatan ekspresi EBER pada penderita KNF tidak sejajar dengan stadium II, III dan IV. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa tidak didapatkan hubungan antara ekspresi EBER dengan stadium KNF, pada penelitian ini. Hasil penelitian serupa juga didapatkan pada penelitian analisis ekspresi EBER pada karsinoma nasofaring di India Timur Laut menyatakan bahwa tidak ditemukan hubungan signifikan antara ekspresi EBER dengan stadium karsinoma nasofaring.²⁹ Hasil penelitian ini tidak sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa terdapat hubungan antara ekspresi EBER dengan stadium KNF pada 908 kasus KNF yang menunjukkan adanya korelasi positif kuat ($p=0,002$) antara ekspresi EBER dengan stadium KNF. Hal tersebut menunjukkan bahwa infeksi VEB merupakan faktor prognostik terutama pada pasien dewasa dan stadium lanjut KNF.¹⁵

Pada keganasan epitel yang dipengaruhi VEB, infeksi laten sel epitel *undifferentiated*

dan aktivasi program litik virus diinduksi oleh diferensiasi sel. Pada pasien yang memiliki gangguan imun, infeksi VEB litik terjadi pada leukoplakia *oral hairy* di sisi lateral lidah. Ekspresi gen litik awal, BZLF1 terdeteksi di lapisan diferensiasi epidermis atas. Respons elemen diferensiasi ditemukan pada *promoter* (Zp) dari gen BZLF1. Sel epitel yang terinfeksi VEB menginduksi diferensiasi sel melalui TGF- β 1 yang berkaitan dengan ekspresi BZLF1 dan reaktivasi infeksi VEB litik. Hal tersebut menunjukkan bahwa pentingnya diferensiasi sel pada infeksi VEB laten persisten di sel epitel.³⁰

Protein p63 merupakan bagian dari kelompok p53 isoform. Protein p63 banyak diekspresikan pada sel *undifferentiated* di lapisan basal epitel *stratified* dan berperan penting dalam jalur diferensiasi skuamosa. Pada KNF yang disebabkan oleh VEB, p63 umumnya diekspresikan dalam jumlah yang besar dan dipertahankan selama infeksi VEB laten. Protein p63 *knockdown* pada infeksi VEB fase telomerase keratinosit oral normal yang immortal dapat menginduksi ekspresi gen litik. Di lain pihak, gangguan genetik pada sel epitel premaligna dapat menyebabkan gangguan diferensiasi selular pada infeksi VEB laten. Ekspresi berlebihan dari *cyclin D1* dalam serum menurunkan respons diferensiasi sel epitel nasofaring yang immortal dan menekan ekspresi gen VEB litik sel yang terinfeksi. Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa diferensiasi epitel sel berperan penting dalam infeksi laten dan litik VEB pada KNF.²⁴

Studi histologi menunjukkan perbedaan jenis histopatologi KNF merupakan variasi homogen pada kelompok neoplasma. Secara histogenetik, semua jenis KNF berasal dari skuamosa dan untuk membedakan antara KNF WHO tipe II dengan III digunakan mikroskop elektron dan pemeriksaan imunohistokimia.¹⁴ Kegagalan diferensiasi tumor terjadi pada sarkoma. Fenomena tersebut dapat terjadi pada KNF dan jarang

terjadi pada lesi yang kambuh, tumor yang mengalami metastase ke limfonodi dan menunjukkan jenis histopatologi yang dapat berbeda dibandingkan saat awal diagnosis. Penelitian sebelumnya menemukan bahwa 8% KNF WHO tipe III dan 26% KNF WHO tipe II dapat dipresentasikan sebagai KNF WHO tipe I saat lesi mengalami kekambuhan atau metastase.¹³ Hal tersebut sama dengan data yang menyatakan bahwa 50% tumor yang awalnya didiagnosis sebagai KNF WHO tipe I, kemudian mengalami kekambuhan didiagnosis sebagai KNF WHO tipe II dan III. Menurut studi morfologi bahwa jenis histopatologi KNF campuran, fenomena dediferensiasi dan evolusi secara biologi dapat menjelaskan secara histogenetik keterkaitan dari ketiga jenis histopatologi KNF.²⁹

Pada penelitian ini, ekspresi EBER bernilai positif didapatkan pada KNF WHO tipe I (3 penderita), KNF WHO tipe II (10 penderita) dan KNF WHO tipe III (10 penderita). Hal tersebut diduga bahwa *toll-like receptors*, TLR3 mengaktifkan kaskade sinyal melalui Toll/ reseptor IL-1 (TIR) *domain containing adaptor inducing* IFN- β (TRIF) yang mengaktifkan sinyal NF- κ B. Selain itu, LMP2A juga dapat mengaktifkan sinyal NF- κ B dan STAT pada sel epitel yang terinfeksi VEB melalui transkripsi dan sekresi IL6. Aktivasi sinyal NF- κ B menginduksi peningkatan ekspresi p63 yang berperan dalam diferensiasi sel KNF baik pada jenis histopatologi WHO tipe I, II maupun III.^{12,29}

Hasil penelitian ini menunjukkan tidak didapatkan hubungan antara ekspresi EBER dengan jenis histopatologi KNF. Hasil penelitian serupa juga ditemukan pada keganasan selain KNF. Penelitian yang meneliti VEB pada limfoma Hodgkin anak di Iran menyatakan bahwa tidak ditemukan hubungan signifikan antara ekspresi EBER dengan jenis histopatologi limfoma Hodgkin yang memberikan hasil $p=0,76$.¹⁵ Penelitian VEB pada karsinoma gaster juga tidak ditemukan adanya hubungan signifikan antara

ekspresi EBER dengan jenis histopatologi karsinoma gaster yang memberikan hasil $p=0,07$.^{28,29} Penelitian yang meneliti VEB pada karsinoma *mammae* menunjukkan bahwa tidak didapatkan hubungan signifikan antara ekspresi EBER dengan jenis histopatologi karsinoma *mammae* pada wanita Mesir yang memberikan hasil $p=0,53$.³⁰

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah studi terbaru melaporkan ekspresi EBER bersifat heterogen pada sel KNF. Beberapa sel KNF mengekspresikan EBER dengan nilai positif kuat. Beberapa sel KNF yang lain mengekspresikan EBER dengan nilai positif lemah dan bahkan beberapa sel KNF yang lainnya mengekspresikan EBER dengan nilai negatif. EBER tidak diekspresikan pada jaringan yang mengalami replikasi VEB aktif antara lain pada leukoplakia *oral hairy*, sindrom Sjogren, limfoma *saliva gland* atau papiloma oral. Hal tersebut diduga karena EBER tidak diekspresikan pada *permissively infected cells*, tetapi EBER selalu diekspresikan pada sel yang mengalami infeksi VEB laten.³⁰

Berdasarkan hasil penelitian terdapat 7 dari 30 sampel dengan ekspresi EBER negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada etiologi KNF selain infeksi VEB, juga dapat disebabkan oleh faktor genetik maupun faktor lingkungan. Hasil tersebut sesuai dengan studi sebelumnya yang menyatakan bahwa pada pemeriksaan PCR 8 sampel KNF WHO tipe I dari 87 sampel KNF tidak dapat mendeteksi adanya DNA VEB.²⁷ DNA VEB terdeteksi hanya 68 dari 77 kasus KNF WHO tipe III dan 1 kasus KNF WHO tipe II. Ekspresi EBER negatif disebabkan oleh hambatan terhadap diferensiasi sel KNF yang diinduksi oleh aktivasi LMP1 dan LMP2A melalui aktivasi β catenin.^{17, 28}

Disimpulkan tidak terdapat hubungan antara ekspresi EBER dengan stadium karsinoma nasofaring, dan tidak terdapat hubungan antara ekspresi EBER dengan jenis histopatologi karsinoma nasofaring.

Perlu dilakukan penelitian seperti ini dengan sampel yang lebih banyak dan komposisi yang lebih proporsional agar hasil penelitian tersebut dapat digeneralisasi ke populasi. Diperlukan pemeriksaan DNA VEB untuk konfirmasi hasil pemeriksaan HIS berdasarkan keterkaitan VEB dengan jenis histopatologi, serta perlunya pemeriksaan ekspresi LMP1, LMP2A, dan EBNA2 dari spesimen jaringan KNF tersebut untuk mengetahui peran diferensiasi sel pada ketiga jenis histopatologi KNF.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mulyarjo. Diagnosis dan penatalaksanaan karsinoma nasofaring. Dalam: Mulyarjo, Soedjak S, Wisnubroto, Harmadji S, Hasanusi R, Artono, dkk. Naskah Lengkap Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan III Ilmu Kesehatan THT-KL. Surabaya: Laboratorium/SMF Ilmu Penyakit THT-KL FK Unair/ RSUD Dr. Soetomo; 2002. Hal 38-48.
2. Iwakiri D. Epstein barr virus encoded RNAs: key molecules in viral pathogenesis cancers (Basel) [Internet]. 6: pp. 1651-30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
3. Takada K. Role of EBER and BARF1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumorigenesis. Seminars in Cancer Biology [Internet]. 2012. Vol. 22 (2): 162-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.007>.
4. Ertan Y, Hekimgil M, Kaarsian S, Soydan S. Expression of Epstein barr virus encoded small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma of Aegeanturkish patients. Virchow Arch. 2008; 452:411-4.
5. Tsang C, Zhang G, Seto E, Takada K, Deng W, Yip Y. Epstein-barr virus infection in immortalized nasopharyngeal epithelial cells: regulation of infection and phenotypic characterization. Int J Cancer [Internet]. 2010; 127(7): 1570-83. Available from : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

6. Prasetyo A. Faktor risiko, EBER, IgA (EBNA1+VCAP18), LMP1 dan CD99 sebagai kombinasi baru diagnosis etiologi karsinoma nasofaring. Yogyakarta: Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada; 2014. 22-25.
7. Zeng MS. Pathogenesis and etiology of nasopharyngeal carcinoma. In: Lu JJ, Cooper JS and Lee AWM, eds. *Nasopharyngeal Cancer Multidisciplinary Management*. Springer [Internet]. 2010; 12-20. Available from : <http://www.springer.com/gg/book>.
8. Rusydi S. Asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi karsinoma nasofaring. Dalam: Karya akhir untuk memperoleh ijazah keahlian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala dan Leher, Departemen/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL FK UNAIR/RSUD Dr. Soetomo Surabaya; 2016.
9. Ma J, Cao S. The epidemiology of nasopharyngeal cancer. In: Lu JJ, Cooper JS, Lee AWM, eds. *Nasopharyngeal cancer multidisciplinary management*. Springer [Internet]. 2010; 2-6. Available from: <http://www.springer.com/gg/book>.
10. Kentjono WA. Karsinoma Nasofaring: etiologi, gejala, diagnosis, deteksi dini kanker nasofaring untuk dokter umum di puskesmas. Surabaya: Dept/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL FK Unair/ RSUD Dr. Soetomo; 2010. 13-41.
11. Terzic T, Boricic I, Penjer P, Zecevic R, Tomanovic R, Brasanac C, et al. Prognostic significance of clinical parameters and Einbarr virus infection in non endemic undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type: a serbian report. *Med Oncol*. 2011; 28: 1325-30.
12. Adham M, Kurniawan AN, Muhtadi AI, Roezin A, Hermani B, Gondhowiardjo S, et al. Nasopharyngeal carcinoma in Indonesia: epidemiology, incidence, signs, and symptoms at presentation. *Chinese J cancer*. 2011; 31:185-96.
13. Chang ET, Adami H. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(10):1765-77.
14. Hashim NAN, Ramzi NH, Velapasamy S, Alex L, Chahil JK, Lye SH, et al. Identification of genetic and non-genetic risk factors for nasopharyngeal carcinoma in a Southeast Asian population. *AsPac J Cancer Prev*. 2012; 13(12):6005-10.
15. Li AA, Ng E, Lee A, Chia M, Liu TJ, Huang D, et al. Potential efficacy of p16 gene therapy for EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 2005;110(3):452-8.
16. Kengjian K, Haiyun W, Sha F, Zichen Z, Liping D, Dabo L, et al. Epstein-Barr virus encoded RNAs as a survival predictor in nasopharyngeal carcinoma. *Chin Med J*. 2014; 127(2):294-9.
17. Loewe L. Genetic mutation. *Nature Education*. 2008; 1(1):113-4.
18. Guo X, Johnson RC, Deng H, Liao J, Guan L, Nelson GW, et al. Evaluation of non viral risk factors for nasopharyngeal carcinoma in a high risk population of Southern China. *Int J Cancer*. 2009; 124(12):2942-7.
19. Robinson M, Suh Y, Paleri V, Devlin D, Ayaz B, Pertl L, et al. Oncogenic human Papiloma virus-associated nasopharyngeal carcinoma: an observational study of correlation with ethnicity, histological subtype and outcome in a UK population. *Infectious AgentsCan*. 2013; 8:30-6.
20. Krishna SM, James S, Sreelekha TT, Kattoor J, Balaram P. Primary nasopharyngeal cancer of Indian origin and the viral link- a preliminary study. *Austral-Asian J Cancer*. 2006; 5(4):241-52.
21. Chen PC, Yang CC, Wu CJ, Liun WS, Huang WL, Lee CC. Factors predict prolonged wait time and longer duration of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma: a multilevel analysis. *Plos One*. 2014; 9(10): 1-7.

22. Wildeman MAM, Herdini C, Indrasari SR, Vincent AD, Tjokronagoro M, Stoker S, et al. Primary treatment results of nasopharyngeal carcinoma in Yogyakarta, Indonesia. In: Wildeman MAM, ed. Current problems and possible solutions in the treatment of nasopharyngeal carcinoma in Indonesia. PhD thesis, Library of University of Amsterdam, Amsterdam, Netherland. 2013; 40-9.
23. Tulalamba W, Janvilisri T. Nasopharyngeal carcinoma signaling pathway: an update on molecular biomarkers. *Int J Cell Bio.* 2012.; 4(2):1155-64.
24. Kamio Y, Sakai N, Takahashi G, Baba S and Namba H. Nasopharyngeal carcinoma presenting with rapidly progressive severe visual disturbance: a case report. *J Med Case Rep.* 2014;8: 361-8.
25. Saikia A, Raphael V, Shunyu NB, Khonglah Y, Mishra J, Jitani AK, et al. Analysis of Epstein-barr virus encoded RNA expression in nasopharyngeal carcinoma in north-eastern India: a chromogenic in situ hybridization based study. *Iranian Journal of Otorhinolaryngology.* 2016; 28(4): 267-74.
26. Tsao S, Tsang C, Tao K, Lo K. The role of Epstein-barr virus in epithelial malignancies. *Journal of Pathology.* 2015; 23(5): 323-33.
27. Pathmanathan R, Prasad U, Chandrika G, Sadler R, Flynn K, Traub NR. Undifferentiated, nonkeratinizing, and squamous cell carcinoma of the nasopharynx variants of Epstein-barr virus infected neoplasia. *American Journal of Pathology.* 1995; 146: 1355-67.
28. Young LS, Dawson CW. Epstein-barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *Chinese Journal of Cancer.* 2014; 33(12): 581-90.
29. Guerfali B, Ayadi W, Abdennadher I, Khabir A, Boudawara T, Gargouri A, et al. Characteristics of Epstein-barr virus variants associated with gastric carcinoma in southern tunisia. *Virology Journal.* 2011;l(8): 1-9.
30. Zekri N, Bahnassy A, Mohamed S, El Kassem A, El Khalidi J, Hafed M, et al. Epstein barr virus and breast cancer: epidemiological and molecular study on Egyptian and Iraqi women. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute.* 2012; 24: 123-31.