

Laporan Penelitian**Ekspresi protein P53 dan HSP70
pada sel punca karsinoma nasofaring yang resisten terhadap radioterapi****Muhtarum Yusuf, Ahmad Chusnu Romdhoni, Widodo Ario Kentjono*
Fedik Abdul Rantam*****Departemen Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala Leher
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Dr. Soetomo***Institute of Tropical Disease Center* Universitas Airlangga
Surabaya**ABSTRAK**

Latar belakang: Pada penderita Karsinoma Nasofaring (KNF) masih sering ditemukan kekambuhan meskipun sudah mendapat terapi yang lengkap. Penelitian terbaru membuktikan bahwa kekambuhan disebabkan oleh sel punca KNF yang resisten terhadap radioterapi. Mekanisme resistensi sel punca kanker terhadap radioterapi diduga karena hambatan terhadap apoptosis dan atau memicu proliferasi. Hambatan terhadap apoptosis disebabkan oleh penurunan protein p53 (*wild type*), selain *over*-ekspresi Hsp70. **Tujuan:** Menjelaskan mekanisme resistensi sel punca KNF terhadap radioterapi berdasarkan profil ekspresi protein p53 (*wild type*) dan Hsp70. **Metode:** Penelitian *true experimental* dengan menggunakan rancangan randomisasi kelompok kontrol sebelum dan sesudah tes. Kultur sel punca KNF dibagi menjadi dua kelompok, masing-masing 16 sampel. Pada kelompok perlakuan diberikan paparan radioterapi dengan dosis 1,5 Gy menggunakan pesawat Linac, lalu diinkubasi selama 24 jam. Sebelum dan sesudah perlakuan pada kedua kelompok diperiksa ekspresi p53 (*wild type*) dan Hsp70. Pemeriksaan menggunakan metode *flowcytometry*. **Hasil:** Ekspresi p53 (*wild type*) antara kelompok perlakuan dan kontrol terdapat perbedaan yang tidak bermakna dengan $p=0,576$ ($p \geq 0,05$). Ekspresi Hsp70, antara kelompok perlakuan dan kontrol terdapat perbedaan yang tidak bermakna dengan $p=0,172$ ($p \geq 0,05$). **Kesimpulan:** Tidak terdapat perubahan ekspresi p53 (*wild type*) dan Hsp70 pada sel punca KNF yang resisten terhadap radioterapi.

Kata kunci : Sel punca KNF, p53 (*wild type*), Hsp70, karsinoma nasofaring**ABSTRACT**

Background: Recurrences are frequently occurred in nasopharyngeal carcinoma (NPC) patients, even though they had received complete therapy. Recent studies have proved that those recurrences were caused by NPC cancer stem cells that resistant to radiotherapy. Mechanisms of resistance of cancer stem cells to radiotherapy is assumed due to the block of apoptosis and or proliferation inducing. The block of apoptosis was caused by the decrease of p53 (*wild type*) expression, in addition to Hsp70 over expression. **Objective:** To find out the mechanism of NPC stem cells that resistant to radiotherapy based on profiles of protein p53 (*wild type*) and Hsp70 expression. **Methods:** Using true experimental study by randomized pre and post test control group design. The cultured NPC stem cells were divided into two groups, with 16 samples each. The treatment group had 1,5Gy dose of radiotherapy exposure with Linac device, then incubated for 24 hours. Both groups were examined for p53 (*wild type*) and Hsp70 expressions before and after treatment. The examinations were conducted by flowcytometry method. **Result:** The P53 (*wild type*) expression between the treatment and control group showed insignificant difference with $p=0.576$ ($p \geq 0.05$). The Hsp70 expression between treatment and control group showed insignificant difference with $p=0.172$ ($p \geq 0.05$). **Conclusion:** There were no changes of p53 (*wild type*) and Hsp70 expressions on NPC stem cells that resistant to radiotherapy

Keywords: NPC stem cells, p53 (*wild type*), Hsp70, nasopharyngeal carcinoma**Alamat korespondensi:** Muhtarum Yusuf, Departemen Ilmu Kesehatan THT-KL FK Unair/RSUD Dr. Soetomo, Surabaya. **Email:** muhtarumyusuf@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Pada penderita karsinoma nasofaring (KNF) masih sering ditemukan kekambuhan meskipun sudah mendapat terapi yang lengkap. Kejadian kekambuhan tersebut sebagai bentuk manifestasi klinis dari resistensi sel kanker terhadap radioterapi. Kekambuhan merupakan indikator prognosis yang buruk, karena menjadi penyebab utama kematian penderita KNF.¹ Penelitian terbaru membuktikan bahwa kekambuhan disebabkan karena adanya sel punca KNF atau *Cancer Stem Cells* (CSCs) yang resisten terhadap radioterapi.^{2,3} Sampai saat ini, mekanisme sel punca KNF yang resisten terhadap radio terapi masih belum dapat dijelaskan.

Radioterapi merupakan terapi utama KNF, namun untuk jangka panjang hasilnya kurang efektif karena masih banyak penderita yang mengalami kekambuhan. Angka kekambuhan masih cukup tinggi yaitu sekitar 19-56% lima tahun pascaradioterapi. Respons tumor terhadap radioterapi secara keseluruhan sebesar 25-65%.¹ Radioterapi akan membunuh sel kanker, sedangkan sel punca kanker tetap bertahan hidup. Sel punca kanker yang resisten akan tumbuh kembali sehingga menjadi penyebab kekambuhan.^{4,5}

Mekanisme resistensi sel punca kanker terhadap radioterapi diduga terkait dengan sifat biologi sel punca kanker. Radioterapi memberikan efek terapi berupa kematian sel dengan cara menginduksi apoptosis. Di pihak lain, sel kanker mempunyai mekanisme untuk mempertahankan diri agar tetap hidup. Mekanisme tersebut dengan cara hambatan terhadap apoptosis dan atau memicu proliferasi. Hambatan terhadap apoptosis disebabkan karena defek gen yang meregulasi jalur apoptosis. Defek tersebut berupa penurunan pengaturan protein pro-apoptosis misalnya protein p53 (*wild type*), di samping *over*-ekspresi gen anti-apoptosis misalnya Hsp70 (*heat shock protein-70*).^{6,7}

Protein p53 (*wild type*) adalah protein yang dikode oleh gen p53 (tumor suppressor gen), merupakan faktor transkripsi yang melekat pada sekuen DNA yang spesifik. Dalam keadaan normal p53 (*wild type*) mempunyai peran sentral dalam mengatur proses penting seperti penghentian siklus sel (*cell cycle arrest*), perbaikan DNA, apoptosis dan penuaan sel (*senescence*). Pada KNF terjadi inaktivasi gen p53 (*wild type*) yang menyebabkan terbentuknya p53 mutan. Gen p53 mutan menyebabkan peningkatan gen penghambat apoptosis yang berakibat sel menjadi lebih resisten terhadap radioterapi. Penelitian pada sel punca kanker kepala dan leher tikus model secara *in vivo*, membuktikan bahwa transfeksi Ad-p53 (*Adenoviral p53*) meningkatkan kepekaan sel terhadap radioterapi.^{8,9}

Heat shock protein-70 merupakan molekul chaperone yang berfungsi untuk melindungi protein lain dari agregasi, membantu pelipatan protein baru atau pelipatan protein yang rusak. Dalam kondisi normal, mayoritas Hsp70 terekspresi dalam bentuk constitutive yang dinamakan Hsc70, sedangkan yang terekspresi karena paparan stres disebut *inducible* Hsp70. Dalam bentuk *inducible*, Aktivitas Hsp70 di bawah kontrol Hsf dan berperan dalam berbagai proses fisiologis seperti siklus sel, proliferasi dan diferensiasi. Radioterapi pada sel kanker akan memicu ekspresi Hsp70. Hsp70 sebagai molekul anti-apoptosis bekerja pada berbagai level, yaitu menghambat penguatan procaspase 3 dan 9. Penelitian pada sel punca kanker payudara, glioblastoma dan leukemia, membuktikan adanya pengaruh Hsp70 terhadap resistensi sel punca kanker.^{10,11}

Berdasarkan paparan teori tersebut di atas, diduga (hipotesis) mekanisme efek radioterapi pada sel punca KNF yang resisten yaitu ekspresi protein p53 (*wild type*) menurun, sedangkan ekspresi Hsp70

meningkat. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis perubahan ekspresi protein p53 (*wild type*) dan Hsp70 pada sel punca KNF yang resisten terhadap radioterapi. Terungkapnya mekanisme efek radioterapi pada sel punca KNF yang resisten ini membuka peluang untuk pengembangan strategi terapi baru dengan target eradikasi sel punca kanker. Terbuktinya penelitian ini dapat dipakai sebagai dasar pengembangan antibodi selektif terhadap ekspresi protein yang secara bermakna berpengaruh pada sel punca KNF yang resisten terhadap radioterapi, sehingga diharapkan hasil terapi KNF menjadi lebih baik dan angka harapan hidup lebih meningkat karena risiko kekambuhan dapat ditekan.

METODE

Jenis penelitian ini adalah *true experimental* laboratorik *in vitro* dengan menggunakan rancangan randomisasi kelompok kontrol sebelum dan sesudah tes. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dan ada kontrol pembanding. Sampel penelitian adalah kultur primer sel punca KNF yang diperoleh dari bahan biopsi nasofaring penderita KNF yang datang berobat ke Unit Rawat Jalan Ilmu Kesehatan THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Penderita KNF tersebut belum pernah mendapat terapi definitif sebelumnya, baik radioterapi, kemoterapi atau kombinasi keduanya. Besar sampel 32 yang terdiri dari 16 sampel perlakuan (radioterapi) dan 16 sampel sebagai kontrol.

Radioterapi pada kultur sel punca KNF dengan memakai sinar X yang berasal dari pesawat Linac Varian 600C/D, energi 6 MV (*Megavolt*). Dosis radioterapi sebesar 1,5 Gy dipaparkan satu kali pada daerah radiasi 8x12 cm, pada jarak 100 cm selama 36 detik, dan kultur sel punca KNF diinkubasi selama 24 jam. Sel punca KNF adalah sel yang terdapat pada kultur jaringan KNF yang mengekspresikan CD44+. Ekspresi CD44+ di-

periksa dengan menggunakan imunositokimia dan *flowcytometry*. Pemeriksaan imunositokimia dilakukan dengan memberikan reagen anti-human CD44+ (Bioscience, USA). Sel punca KNF yang resisten adalah kemampuan sel punca KNF untuk tetap hidup setelah mendapat dosis radioterapi. Untuk melihat sel hidup atau viabilitas sel dilakukan dengan pewarnaan *trypan blue*, dilihat dengan mikroskop *inverted* (Nikon TMS, Jepang) pembesaran 40x. Sel yang hidup tidak menyerap warna sehingga tampak jernih, sedangkan sel yang mati menyerap warna dan tampak biru.

Protein p53 (*wild type*) adalah suatu protein supresor tumor yang disandi TP53, mempunyai peranan penting dalam proses apoptosis. Ekspresi p53 (*wild type*) diperiksa dengan *flowcytometry* FACS - Calibur dengan reagen anti-human p53 FITC (Bioscience, USA). Data yang digunakan adalah persentase ekspresi p53 pada sel punca KNF. *Heat shock protein-70* (Hsp70) adalah suatu protein fungsional dengan berat molekul 70 kilo Dalton, dan termasuk protein anti-apoptosis. Ekspresi Hsp70 diperiksa dengan *flowcytometry* FACS-Calibur dengan reagen anti-human Hsp70 PE (Bioscience, USA). Pada pemeriksaan ini didapatkan data jumlah dan persentase sel punca yang mengekspresikan Hsp70, sedangkan data yang diambil adalah persentase ekspresi Hsp70.

Penelitian dikerjakan di Unit Rawat Jalan Departemen/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL FKUA/RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Di unit tersebut dilakukan biopsi nasofaring penderita dengan klinis KNF. Bahan biopsi dibagi dua, sebagian dikirim ke Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya untuk pemeriksaan histopatologi, sebagian lagi dikirim ke laboratorium *Stem-cell Institute Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga, Surabaya, untuk dilakukan kultur dan karakterisasi sel punca KNF. Pelaksanaan perlakuan dengan radioterapi

dilakukan di Instalasi Radioterapi RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Pemeriksaan *flow-cytometry* dilakukan di Instalasi Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Penelitian dilakukan selama enam bulan, mulai dari persiapan bahan, alat, perlakuan, pemeriksaan, dan penyusunan laporan penelitian.

Analisis statistik yang digunakan adalah untuk uji normalitas data menggunakan Uji Kolmogorov-Smirnov satu sampel.

Uji homogenitas data, untuk data dengan distribusi normal menggunakan Uji-T, sedangkan yang tidak normal menggunakan *Mann-Whitney U-test*. Untuk melihat efek radioterapi pada ekspresi protein p53 (*wild type*), Hsp70 sebelum dan sesudah perlakuan, menggunakan *Analysis of Covariance* (Anacova) pada data yang tidak homogen, sedangkan yang homogen menggunakan *Mann-Whitney U-test*. Untuk analisis jalur menggunakan Uji Regresi.

HASIL

Tabel 1. Data deskriptif hasil pemeriksaan ekspresi p53 (*wild type*), Hsp70 pada kelompok perlakuan dan kontrol sebelum perlakuan (*pre*).

Variabel	Kelompok	Mean	Median	SD	Min	Max	P
p53	P	27,73	28,99	2,8	25,47	35,72	0,200
	K	26,65	25,77	4,99	18,49	37,07	0,200
Hsp70	P	6,64	6,63	1,13	4,60	8,57	0,200
	K	5,36	5,36	1,08	4,05	7,31	0,200

Keterangan : P = kelompok perlakuan, K = kelompok kontrol

Tabel 2. Data deskriptif hasil pemeriksaan ekspresi p53 (*wild type*), Hsp70 pada kelompok perlakuan dan kontrol setelah perlakuan (*post*).

Variabel	Kelompok	Mean	Median	SD	Min	Max	P
p53	P	15,70	15,76	2,81	11,70	20,08	0,200
	K	14,99	15,00	1,50	12,71	17,33	0,200
Hsp70	P	6,41	6,36	0,81	4,50	7,76	0,200
	K	6,1	5,96	1,03	4,64	7,83	0,200

Keterangan : P = kelompok perlakuan, K = kelompok kontrol

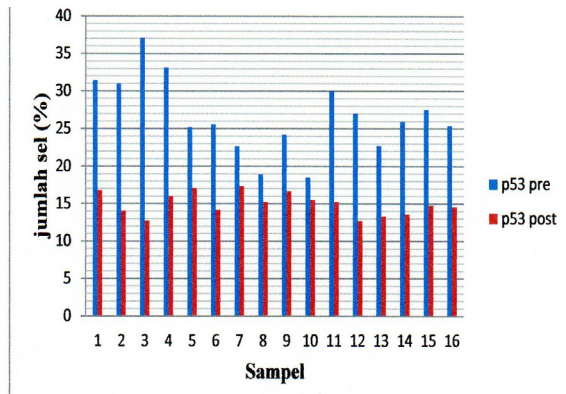
Data hasil pemeriksaan ekspresi p53 (*wild type*), Hsp70 pada kelompok perlakuan dan kontrol sebelum dan sesudah perlakuan, terangkum dalam data pada tabel 1 dan 2.

Pada data dasar tabel 1 dan 2 tersebut di atas untuk melihat normalitas data, dilakukan uji normalitas dengan Uji Kolmogorov-Smirnov satu sampel. Pada perhitungan uji ini data yang berdistribusi normal ($p \geq 0,05$) adalah p53 *pre* dan *post*, Hsp70 *pre* dan *post*. Untuk melihat homogenitas data *pre* antara kelompok perlakuan dan kontrol dilakukan

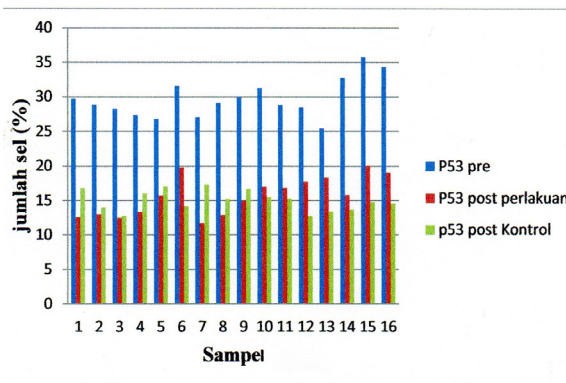
uji beda. Pada data yang terdistribusi normal dilakukan dengan Uji-T, didapatkan hasil bahwa p53 dan Hsp70 terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) atau tidak homogen.

Ekspresi p53 (*wild type*)

Ekspresi p53 (*wild type*) setelah radiasi pada kelompok perlakuan sebesar 12,59%, sedangkan pada kelompok kontrol sebesar 16,80%.



Gambar 1. Perbandingan hasil pemeriksaan ekspresi p53 (*wild type*) pada kelompok kontrol.

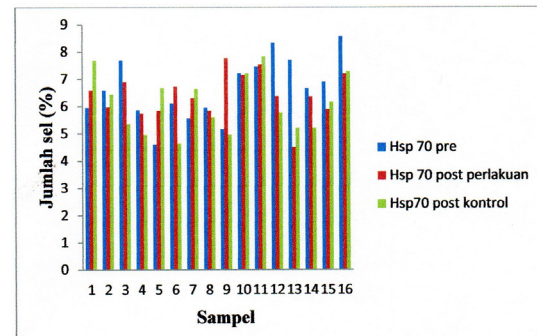


Gambar 2. Perbandingan hasil pemeriksaan ekspresi p53 (*wild type*) antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Data kelompok perlakuan dan kontrol menunjukkan perbedaan ekspresi p53 (*wild type*). Rerata ekspresi p53 (*wild type*) setelah radiasi pada kelompok perlakuan sebesar 15,7031, sedangkan kelompok kontrol sebesar 14,9906 (Tabel 2). Uji beda antara kelompok perlakuan dan kontrol didapatkan $p=0,576$, berarti ekspresi p53 (*wild type*) antara kelompok perlakuan dan kontrol didapatkan $p=0,576$, berarti ekspresi p53 (*wild type*) antara kelompok perlakuan dan kontrol terdapat perbedaan yang tidak bermakna ($p \geq 0,05$).

Hasil pemeriksaan ekspresi Hsp70 dengan *flowcytometry* pada kelompok perlakuan dan kontrol tampak pada gambar 4.

Ekspresi Hsp70 setelah radiasi pada kelompok perlakuan sebesar 5,97%, sedangkan pada kelompok kontrol sebesar 6,44% .



Gambar 3. Perbandingan hasil pemeriksaan Hsp70 antara kelompok perlakuan dan kontrol

Data kelompok perlakuan dan kontrol menunjukkan perbedaan ekspresi Hsp70. Rerata ekspresi Hsp70 setelah radiasi pada kelompok perlakuan sebesar 6,4150 sedangkan kelompok kontrol sebesar 6,1006 (Tabel 2). Uji beda antara kelompok perlakuan dan kontrol didapatkan $p=0,172$, berarti ekspresi Hsp70 antara kelompok perlakuan dan kontrol terdapat perbedaan yang tidak bermakna ($p \geq 0,05$).

DISKUSI

Mekanisme resistensi sel punca kanker terhadap radioterapi diduga terkait dengan sifat biologi sel punca kanker. Radioterapi memberikan efek terapi berupa kematian sel dengan cara menginduksi apoptosis. Di pihak lain, sel kanker mempunyai mekanisme untuk mempertahankan diri agar tetap hidup. Mekanisme tersebut dengan cara hambatan terhadap apoptosis dan atau memicu proliferasi.⁷ Protein p53 (*wild type*) dipilih sebagai variabel karena mempunyai peran sentral dalam apoptosis. Resistensi sel kanker terjadi karena hambatan pada p53 (*wild type*), sementara pada sel normal protein p53 (*wild type*) pada level yang rendah, aktifitasnya menjadi meningkat bila sel terkena radiasi.⁹

Heat shock protein-70 dipilih karena merupakan salah satu protein yang paling melimpah, jumlahnya sebanyak 1-2% dari total protein seluler. Protein ini berperan dalam berbagai proses fisiologis, seperti siklus sel, proliferasi dan diferensiasi. Aktivitas Hsp70 berhubungan dengan beberapa molekul kunci yang mengontrol siklus sel, seperti p53 (*wild type*). *Heat shock protein-70* merupakan molekul *chaperone* yang berfungsi untuk melindungi protein lain dari agregasi, membantu pelipatan protein baru atau pelipatan protein yang rusak.^{12,13} Protein Shh dan Bmi-1 dipilih karena kedua protein tersebut sebagai karakteristik kepuncaan dari sel punca KNF. Kedua protein tersebut berperan pada jalur sinyal yang mengatur sifat *self-renewal* dan proliferasi sel punca kanker.^{6,7}

Penelitian ini membuktikan bahwa radioterapi tidak mempunyai pengaruh yang bermakna terhadap perubahan ekspresi p53 (*wild type*) ($p=0,576$). Hasil penelitian ini tidak sesuai dengan hipotesis penelitian, yang berdasarkan teori bahwa p53 (*wild type*) mempunyai peran sentral dalam apoptosis. Resistensi sel kanker terjadi karena hambatan pada p53 (*wild type*), sementara pada sel normal protein p53 (*wild type*) pada level yang rendah, aktifitasnya menjadi meningkat bila sel terkena radiasi. Fakta penelitian ini menunjukkan bahwa pada sel punca KNF yang resisten tidak melibatkan peran p53 (*wild type*).

Gen p53 (*wild type*) merupakan salah satu target utama radiasi pengion, akan tetapi pada kondisi tertentu p53 (*wild type*) tidak berfungsi meskipun tidak mengalami mutasi. Keadaan ini disebabkan karena p53 (*wild type*) diikat dan menjadi tidak aktif oleh protein seluler seperti onkoprotein *mouse double minute-2* (Mdm-2). Pada keadaan Mdm-2 *over*-ekspresi maka akan menginaktifkan transduksi p53 (*wild type*), meskipun Mdm-2 adalah target untuk aktivasi transkripsi oleh p53 (*wild type*). Terdapat

mekanisme *negative feedback* antara p53 (*wild type*) dan Mdm-2. Protein p53 (*wild type*) dapat menstimulasi transkripsi Mdm-2, sebaliknya Mdm-2 dapat memediasi degradasi p53 (*wild type*).¹⁴

Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian Romdhoni,¹⁵ yang dilakukan pada sel punca KNF yang diberi cisplatin terbukti bahwa ekspresi p53 (*wild type*) meningkat secara bermakna, namun peningkatan p53 (*wild type*) tidak berkontribusi pada kematian sel. Hal ini diduga p53 (*wild type*) tidak aktif, karena adanya defek pada salah satu di antara sub-unit tetramer terganggu substitusi asam aminonya akibat cisplatin. Penyebab lainnya adalah adanya defek pada salah satu alelnya. Protein p53 (*wild type*) akan berfungsi dengan baik kalau keempat sub-unitnya normal. Hasil penelitian ini didukung oleh Teodoro et al,¹⁶ yang membuktikan bahwa apoptin (*chicken anemia virus protein*) menginduksi apoptosis tanpa tergantung p53 (*wild type*). Penelitian ini menggunakan model kultur *transformed cells*, terungkap bahwa apoptin menghambat fungsi *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome* (APC/C) sehingga siklus *sel arrest* pada fase G2/M dan menginduksi apoptosis. Hasil penelitian ini juga didukung oleh Ahmed et al,¹⁷ yang membuktikan bahwa radiasi ionisasi dapat menyebabkan apoptosis meskipun tidak ada peran p53. Penelitian ini menggunakan model kultur *human prostate cancer cells PC-3 lack functional p53 wild type protein*. Radiasi ionisasi akan meningkatkan ekspresi *gen transcription factor early growth response-1* (EGR-1) dan *cytokine tumor necrosis factor- α* (TNF- α), sehingga menginduksi apoptosis. Hambatan terhadap EGR-1 dan TNF- α akan menurunkan apoptosis yang diinduksi radiasi ionisasi. Radiasi akan meningkatkan ekspresi TNF- α yang diikuti pengikatan TNF- α dengan reseptor TNF-R1. Pengikatan ini akan memicu aktivasi kaskade kaspase, selanjutnya akan memicu protein kinase, akhirnya menyebabkan apoptosis.

Pada hasil penelitian ini, terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara ekspresi Hsp70 pada kelompok perlakuan dan kontrol ($p \geq 0,05$). Ekspresi Hsp70 setelah radiasi pada kelompok perlakuan sebesar 6,4150 sedangkan pada kelompok kontrol sebesar 6,1006 (Tabel 2). Hasil ini menunjukkan bahwa paparan radioterapi tidak mempengaruhi ekspresi Hsp70 dan hal ini tidak sesuai dengan hipotesis penelitian. Hipotesis penelitian ini didasarkan pada hasil penelitian sel punca kanker payudara dan glioblastoma yang membuktikan adanya pengaruh Hsp70 pada resistensi sel punca kanker.¹¹ Pada pasien kanker tertentu yang diterapi dengan radioterapi, tingginya ekspresi Hsp70 berkorelasi dengan resistensi terapi dan prognosis penderita yang buruk.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa respons terhadap stresor tidak selalu diikuti dengan peningkatan ekspresi Hsp70. Penelitian pada kultur primer jaringan *Glioblastoma multiforme* (GBM) terbukti bahwa paparan radiasi ionisasi tidak ada efek perubahan yang signifikan pada ekspresi Hsp70, tetapi berefek pada peningkatan yang signifikan pada ekspresi *early growth factor receptor* (EGFr). Data ini menunjukkan bahwa EGFr dihubungkan dengan radioresistensi GBM. Radiasi ionisasi meningkatkan aktivasi EGFr, aktivasi ini akan memicu proliferasi, menghambat apoptosis dan memicu pertumbuhan tumor.¹⁸

Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian Romdhoni¹⁵ yang dilakukan pada sel punca KNF yang diberi cisplatin terbukti bahwa ekspresi Hsp70 meningkat secara bermakna. Hasil penelitian ini sesuai dengan yang dilaporkan Alfonso et al.¹⁹ Penelitian dengan model pada *Haddock melanogramus Aeglefinus* suatu jenis ikan laut menunjukkan bahwa tidak ada respons peningkatan Hsp70 terhadap paparan peningkatan temperatur. Hasil ini didukung oleh penelitian pada *Gadus Marhua* suatu jenis ikan laut, yang menunjukkan bahwa

tidak terdapat perubahan tingkat ekspresi Hsp70 sebagai respons terhadap perubahan temperatur. Tidak adanya respons ini kemungkinan karena ekspresi *constitutive* Hsp70 sudah cukup tinggi sehingga mampu mengatasi stress berupa perubahan temperatur.²⁰

Heat shock protein adalah protein yang dihasilkan oleh karena adanya *heat shock response* (Hsr). *Heat shock response* diatur pada tingkat transkripsi oleh suatu mekanisme yang melibatkan *Heat Shock Transcription Factor* (Hsf). Pada manusia telah ditemukan tiga jenis gen Hsf yaitu Hsf-1, 2 dan 4, yang paling berperan dalam modulasi Hsr adalah Hsf-1. Pada keadaan tidak ada stressor, Hsf berada pada sitoplasma dan inti dalam bentuk monomer dan tidak ada aktivitas mengikat DNA melalui interaksi dengan Hsp70. Sebagai respons terhadap radiasi, Hsf berbentuk trimer dan mengikat elemen sekuen spesifik *heat shock gene promoters* (*heat shock element*). Aktivitas transkripsional Hsf akan meningkatkan ekspresi Hsp70 dan membentuk formasi kompleks Hsf-Hsp70. Aktifitas pengikatan ini tidak selalu berhubungan dengan aktifitas transkripsi.^{21,22}

Beberapa kemungkinan yang bisa menjelaskan fenomena tersebut adalah: pertama, tidak adanya Hsr karena disfungsi gen untuk *inducible* Hsp70 dan tidak berfungsinya Hsf.²³ Kedua, tidak adanya Hsr karena perubahan secara menyeluruh ekspresi gen *inducible* Hsp70, sementara ekspresi *inducible* Hsp70 berperan sebagai *constitutive* Hsp70.²⁴ Ketiga, tingkat ekspresi *constitutive* Hsp70 sudah cukup tinggi sehingga mampu mengatasi potensi efek yang merusak sel.²¹ Sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perubahan ekspresi p53 (*wild type*) dan Hsp70 pada sel punca KNF yang resisten terhadap radioterapi. Guna memastikan mekanisme yang menjadi penyebab tidak adanya perubahan ekspresi Hsp70 terhadap paparan

radiasi, perlu penelitian pada level genetik.

DAFTAR PUSTAKA

- ToEW, LaiEC, Cheng JH, Pang PC, Williams MD, Teo PM. Nasopharyngectomy for recurrent nasopharyngeal carcinoma: a review of 31 patients and prognostic factors. *Laryngoscope* 2002; 112(10):1877-82.
- Wang J, Guo LP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH. Identification of cancer stem cell-like side-population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res* 2007; 67(8):3716-24.
- Su J, Xu XH, Huang Q, Lu MQ, Li DJ, Xue F, et al. Identification of cancer stem-like CD44+ cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Arch Med Res* 2011; 42(1):15-21.
- Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res* 2012; 2(3):340-56.
- Yoon SK. The biology of cancer stem cells and its clinical implication in hepatocellular carcinoma. *Gut Liver* 2012; 6(1):29-40.
- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(4):277-88.
- Cui XB, Liu W. In vitro study of expression and effect of HSP70/HSP90 in nasopharyngeal carcinoma cells after thermotherapy. *Sichuan Da Xue Xue Ban Yi Xue Ban* 2009; 40(4):628-31.
- Dharmayanti I. Kajian biologi molekuler: gen supresor tumor (p53) sebagai target gen dalam pengobatan kanker. *Wartazoa* 2003; 13:99-107.
- Wasita B. Peranan p53 terhadap tumorigenesis dan progresivitas glioblastoma. *Kesehatan* 2010; 17:1-9.
- Mitra D, Malkoski SP, Wang XJ. Cancer stem cells in head and neck cancer. *J Cancers* 2011; 3(1):415-27.
- Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, et al. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with stem cell hypothesis. *J Oncol* 2011; 2011:1-14.
- Jolly C, Morimoto RI. Role heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Nat Cancer Inst* 2000; 92(19):1564-72.
- Wijaya FF, Santosa LA, Waspadji S. Role of heat shock protein in insulin resistance. *Majalah Kedokteran Indonesia* 2009; 58:122-7.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69(7):1237-45.
- Romdhoni AC. Mekanisme resistensi sel punca karsinoma nasofaring terhadap cisplatin melalui peningkatan ekspresi protein CD44, Hsp70, p53 (wild type), Oct-4 dan β -catenin. Desertasi. Surabaya: Universitas Airlangga; 2013. p.60-85
- Teodoro JG, Heilman DW, Parker AE. The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53. *Genes Dev* 2004; 18(16):1952-7.
- Ahmed MM, Sells SF, Venkatasubbarao K, Fruitwala SM, Muthukkumar S, Harp C, et al. Ionizing radiation-inducible apoptosis in the absence of p53 linked to transcription factor EGR-1. *J Biol Chem* 1997; 272(52):33056-61.
- Fedrigo CA, Grivicich I, Schunemann DP, Chemale IM, Santos DD, Jacovas T, et al. Radioresistance of human glioma spheroids and expression of Hsp70, p53 and EGFR. *Radiat Oncol* 2011; 6:1-10.
- Alfonso LO, Hosoya S, Osborne J, Gamperl AK, Johnson S. Lack of glucose and Hsp70 responses in Haddock *Melanogrammus aeglefinus* subjected to handling and heat shock. *J Fish Biol* 2008; 72:157-67.
- Zakharov M, Wachter BD, Johansen T, Portner HO, Blust R. Hsp70 is not a sensitive indicator of thermal limitation in Gadus morhua. *J Fish Biol* 2005; 67:767-78.
- Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive and treatment implication. *Cell Stress Chaperones* 2005; 10(2):86-103.
- Morimoto RI. Cell in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science New Series* 1993; 259: 1409-10.
- Hofmann GE, Buckley BA, Airaksinen S, Keen JE, Somero GN. Heat shock protein expression is absent in the antarctic fish

- trematomus bernacchii (family nototheniidae). J Exp Biol 2000; 203(15):2331-9.
24. Place SP, Zippay ML, Hofmann GE. Constitutive role for inducible genes: evidence for the alteration in expression of the inducible Hsp70 gene in Antarctic notothenioid fishes. Am J Physiol 2004; 287(2):429-36.