

Disertasi

ANALISA EKSPRESI GEN mRNA YY1 dan

GEN mRNA p53 terhadap TNM STADIUM KARSINOMA NASOFARING

Oleh:

Pulo Raja Soaloon Banjarnahor



PROGRAM PASCA SARJANA

UNIVERSITAS HASADUDIN

Makassar

2020

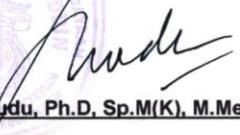
DISERTASI**ANALISA EKSPRESI MRNA GEN YY1 DAN mRNA GEN P53
TERHADAP TNM STADIUM KARSINOMA NASOFARING.**

Disusun dan diajukan oleh

**Pulo Raja S.Banjarnahor
P0200315014**telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 4 Januari 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasehat,


Prof. Dr. dr. Sutji Pratiwi Rahardjo, Sp.THT-KL(K)
Promotor
Prof. Dr. dr. Eka Savitri, Sp.THT-KL(K)
Ko-Promotor
Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
Ko-PromotorKetua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,
dr. Agussalim Buknani, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin
Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed

ABSTRACT

PULO RAJA SOALOON BANJARNAHOR. *An Analysis of YY1 mRNA Gene and p53 mRNA Gene Expressions on TNM Nasopharyngeal Carcinoma Stadium*, (supervised by **Sutji Pratiwi Rahardjo, Eka Savitri, and Mochammad Hatta**).

The purpose of this study is to determine the relationship between the expression of the 53 mRNA gene protein (p53) and the expression of the YY1 mRNA gene against TNM KNF stage

This research method used material and cross-sectional research methods on 20 WHOF KNF samples in the form of 3 samples post-radiochemotherapy, 17 pre-radiochemotherapy samples in the form of 8 TNM stage two, 7 samples of TNM stage three, and 2 samples TNM stage four. The YY1 mRNA gene expression and p53 mRNA gene expression were measured with RT-PCR, then the independent T-test was used to examine the average of post-radiochemotherapy group compared with the sample group pre-radiochemotherapy.

Results indicate that the expression of the YY1 mRNA gene in KNF post-radiochemotherapy had a mean value of 7.9096 compared with that of pre-radiochemotherapy with an average of 11,656 . The results of this statistical T test have a p-value of $0.00069 < 0.05$. TNF Stadium KNF that decreased after getting radiochemotherapy was found the expression of the YY1 mRNA gene also dropped. The expression of the p53 mRNA gene in KNF after radiochemotherapy had an average value of 12,924 compared to which never before getting radiochemotherapy 8.341. The results of this statistical T test had a p-value of $0.0001 < 0.05$. TNM Stadium KNF that descended after radiochemotherapy was found the expression of the p53 mRNA gene is getting higher. At the higher TNF KNM stages, is found the level of YY1 mRNA gene expression relatively higher. Post-KNF radiochemotherapy there is a high level of expression of the p53 mRNA gene compared to the non-radiochemotherapy group. It is concluded that the increased expression of p53 mRNA gene is associated with the decrease of YY1 mRNA gene expression in post-radiochemotherapy of nasopharyngeal cancer patients in which TNM Stadium is decreased.

Keywords : TNM nasopharyngeal cancer stage, p53, YY1



ABSTRAK

PULO RAJA SOALON BANJARNAHOR. *Analisis Ekspresi Gen mRNA YY1 dan Gen mRNA p53 terhadap TNM Stadium Karsinoma Nasofaring* (dibimbing oleh Sutji Pratiwi Rahardjo, Eka Savitri, Mochammad Hatta).

Penelitian ini bertujuan mengetahui hubungan antara ekspresi gen mRNA protein 53 (p53) dan ekspresi gen mRNA YY1 terhadap TNM stadium KNF.

Metode penelitian potong lintang terhadap 20 sampel KNF WH03 berupa 3 sampel paska radiokemoterapi, 17 sampel belum radiokemoterapi berupa 8 sampel TNM stadium dua, 7 sampel TNM stadium tiga dan 2 sampel TNM stadium empat. Dengan RT-PCR diukur ekspresi gen mRNA YY1 dan ekspresi gen mRNA p53 sampel, lalu Uji T independen rerata kelompok sampel paska radiokemoterapi dibandingkan dengan kelompok sampel sebelum radiokemoterapi.

Hasil Penelitian menunjukkan bahwa ekspresi gen mRNA YY1 pada KNF paska radiokemoterapi mempunyai nilai rerata 7.9096 dibandingkan dengan yang belum pernah radiokemoterapi dengan rerata 11.656. Hasil uji T statistik ini mempunyai nilai p-value 0.00069 <0.05. TNM Stadium KNF yang turun paska radiokemoterapi dijumpai ekspresi gen mRNA YY1 juga turun. Ekspresi gen mRNA p53 pada KNF paska radiokemoterapi mempunyai nilai rerata 12.924 dibandingkan dengan yang belum pernah radiokemoterapi 8.341 Hasil uji T statistik ini mempunyai nilai p-value 0.0001 <0.05. TNM stadium KNF yang turun paska radiokemoterapi dijumpai ekspresi gen mRNA p53 yang lebih tinggi. Pada TNM stadium KNF yang lebih tinggi dijumpai tingkat ekspresi gen mRNA YY1 relatif lebih tinggi. Paska radiokemoterapi KNF dijumpai tingkat ekspresi gen mRNA p53 yang tinggi dibandingkan kelompok belum radiokemoterapi. Dapat disimpulkan bahwa meningkatnya ekspresi gen mRNA p53 berhubungan dengan turunnya ekspresi gen mRNA YY1 pada pasien paska radiokemoterapi kanker nasofaring dimana TNM stadium yang turun.

Kata kunci: TNM Stadium Kanker Nasofaring, p53, YY1





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Pulo Raja S Banjarnahor
NIM : P0200315014
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

ANALISA EKSPRESI GEN mRNA YY1 dan GEN mRNA p53 terhadap TNM STADIUM KARSINOMA NASOFARING

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 8 Januari 2021

Yang menyatakan,



Pulo Raja S Banjarnahor

Abstrak

Kanker nasofaring (KNF) adalah suatu penyakit keganasan terbanyak di bagian kepala leher dan merupakan kanker urutan kelima pada tubuh manusia. Radiokemoterapi pilihan utama penanganan KNF. Gen protein 53 (p53) merupakan suatu gen penekan tumor. YinYang1 (YY1) merupakan ubiquitous & multifunctional zinc-finger transcription factor, yang memiliki peran penting pada kontrol siklus sel. YY1 dapat berfungsi sebagai aktivator, repressor atau initiator dari proses transkripsi gen.

Tujuan penelitian untuk mengetahui hubungan antara ekspresi gen mRNA protein 53 (p53) dan ekspresi gen mRNA YY1 terhadap TNM stadium KNF.

Material and metode penelitian potong lintang terhadap 20 sampel KNF WHO3 berupa 3 sampel paska radiokemoterapi, 17 sampel belum radiokemoterapi berupa 8 sampel TNM stadium dua, 7 sampel TNM stadium tiga dan 2 sampel TNM stadium empat. Dengan RT-PCR diukur ekspresi gen mRNA YY1 dan ekspresi gen mRNA p53 sampel, lalu Uji T independen rerata kelompok sampel paska radiokemoterapi dibandingkan dengan kelompok sampel sebelum radiokemoterapi.

Ekspresi gen mRNA YY1 pada KNF paska radiokemoterapi mempunyai nilai rerata 7.9096 dibandingkan dengan yang belum pernah radiokemoterapi dengan rerata 11.656. Hasil uji T statistik ini mempunyai nilai p-value 0.00069 <0.05. TNM Stadium KNF yang turun paska radiokemoterapi dijumpai ekspresi gen mRNA YY1 juga turun.

Ekspresi gen mRNA p53 pada KNF paska radiokemoterapi mempunyai nilai rerata 12.924 dibandingkan dengan yang belum pernah radiokemoterapi 8.341 Hasil uji T statistik ini mempunyai nilai p-value 0.0001 <0.05. TNM Stadium KNF yang turun paska radiokemoterapi dijumpai ekspresi gen mRNA p53 yang lebih tinggi.

Pada TNM stadium KNF yang lebih tinggi dijumpai tingkat ekspresi gen mRNA YY1 relatif lebih tinggi. Paska radiokemoterapi KNF dijumpai tingkat ekspresi gen mRNA p53 yang tinggi dibanding kelompok belum radiokemoterapi.

Disimpulkan bahwa meningkatnya ekspresi gen mRNA p53 berhubungan dengan turunnya ekspresi gen mRNA YY1 pada pasien paska radiokemoterapi kanker nasofaring dimana TNM Stadium yang turun.

Kata kunci: TNM stadium kanker nasofaring, p53, YY1

ABSTRACT

Nasopharyngeal cancer (NPC) is a malignant disease in the head and neck and is the fifth cancer in the human body. Radiochemotherapy is the first choice for handling NPC. The protein gene 53 (p53) is a tumor suppressor gene. YinYang1 (YY1) is a ubiquitous & multifunctional zinc-finger transcription factor, which has an important role in cell cycle control. YY1 can function as an activator, repressor or initiator of the gene transcriptional process.

The purpose of this study was to determine the relationship between the expression of the 53 mRNA gene protein (p53) and the expression of the YY1 mRNA gene against NPC TNM Stage.

Material and methods cross-sectional research on 20 WHO3 NPC samples in the form of 3 samples after radiochemotherapy, 17 samples of non-radiochemotherapy is consist of 8 stage two TNM samples, 7 stage three TNM samples and 2 stage four TNM samples. With RT-PCR, YY1 mRNA gene expression and p53 mRNA gene expression were measured, then the independent T-test of the mean sample group radiochemotherapy.

YY1 mRNA gene expression in NPC post-radiochemotherapy has a mean value of 7.9096 compared to that which has never been radiochemotherapy with an average of 11,656. The results of this statistical T test have a p-value of 0.00069 <0.05. NPC Stadium that descended after radiochemotherapy found expression of the YY1 mRNA gene also dropped.

Expression of the p53 mRNA gene in NPC after radiochemotherapy had an average value of 12,924 compared with never before radiochemotherapy 8.341 The results of this statistical T test had a p-value of 0.0001 <0.05. TNM Stadium NPC that descended after radiochemotherapy was found to be higher expression of the p53 mRNA gene.

At higher NPC TNM stages, the level of YY1 mRNA gene expression was relatively higher. NPC Post-radiochemotherapy there was a high level of expression of the p53 mRNA gene compared to the non-radiochemotherapy group.

It was concluded that the increased expression of the p53 mRNA gene was associated with a decrease in the expression of the YY1 mRNA gene in post-radiopharyngeal cancer patients in which TNM Stadium was decreased.

Keywords: Nasopharyngeal cancer TNM stage, p53, YY1

Pengesahan Disertasi

ANALISA EKSPRESI GEN mRNA YY1 dan GEN mRNA p53 terhadap TNM STADIUM KARSINOMA NASOFARING

diajukan oleh

Pulo Raja Soaloon Banjarnahor

NIM: P0200315014

*telah diperiksa dan dinyatakan memenuhi syarat untuk melaksanakan
seminar usul penelitian*

Menyetujui

Tim Promotor,

Prof. Dr. dr. Sutji Pratiwi, Sp.T.H.T.-K.L(K)

Promotor

Tanggal : 15 Oktober 2020

Prof.Dr.dr. Eka Savitri,Sp. T.H.T.- K.L.(K) Prof.dr. Mochammad Hatta, PhD, SpMK(K)

Kopromotor

Tanggal : 15 Oktober 2020

Kopromotor

Tanggal :15 Oktober 2020

Ketua Program Studi Doktor/S3Ilmu Kedokteran,
Sekolah Pascasarjana UNHAS

dr, Agussalim Bukhari, M,Med, PhD, Sp.GK (K)

Daftar Isi

BAB I.....	4
1.1 Latar Belakang	4
1.2 Identifikasi dan Rumusan Masalah	8
1.3 Pertanyaan Penelitian.....	8
1.4 Hipotesis Penelitian	8
1.5 Tujuan Penelitian	8
1.6 Manfaat Penelitian	9
BAB II	10
2.1 Kanker Nasofaring	10
2.1.1 Pengertian kanker nasofaring dan penyebabnya	10
2.1.2 Faktor resiko KNF	10
2.1.3 Etiologi patogenesis KNF.....	15
2.1.4 Diagnosis KNF.....	30
2.1.5 Tatalaksana KNF.....	32
2.1.6 Prognosis KNF	46
2.2 Protein 53 (p53)	47
2.2.1 Struktur p53	48
2.2.2 Peran p53	51
2.3 Yin-Yang 1 (YY1).....	57
2.3.1 Struktur YY1	58
2.3.2 Ciri Protein YY1.....	58
2.3.3 Profil Ekspresi YY1	60
2.3.4 Mekanisme Regulasi Transkripsi oleh YY1	60
2.3.5 Gen YY1 dengan p53	61
2.3.6 Gen YY1 pada Kanker Nasofaring.....	62
2.4 Siklus sel normal	64
Pembelahan sel.....	65
2.4.1 MITOSIS.....	66
2.4.2. MEIOSIS.....	67
2.5 GEN PENEKAN TUMOR.....	72
2.6 APOPTOSIS	74
2.6.1 Pengertian apoptosis	74
2.6.2 mRNA caspase-3	83
2.6.3 Indek <i>Apoptosis</i>	87
2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)	89
2.7.1 Definisi	89
2.7.2 Aplikasi PCR.....	89
2.7.3 Tipe PCR.....	92
2.7.4 Komponen PCR.....	93
2.7.5 Prosedur.....	95
BAB III.....	97
3.1 Kerangka Teori.....	97

3.2 Kerangka Konsep	98
3.3 Definisi Operasional.....	98
BAB IV	99
4.1 Design Penelitian	99
4.2 Waktu dan Tempat penelitian	99
4.3 Populasi dan sampel penelitian	99
4.4 Kriteria inklusi dan eksklusi	99
4.5 Estimasi besar sampel	100
4.6 Instrumen dan tatacara pengumpulan data	100
4.7 Cara pengambilan sampel	101
4.7.1 Primer p53.....	105
4.7.2. Primer YY1.....	108
4.8 Alur penelitian	111
4.9 Pengolahan Data.....	112
4.10 Uji Perbedaan Variansi (Fisher Test)	Error! Bookmark not defined.
4.11 Uji Independen Perbedaan Rata-Rata (Student's T-Test)	112
4.11 Estimasi Biaya Penelitian	112
4.12 Timeline Penelitian	112
BAB V	113
5.1 Gambaran Sampel	113
5.2 Hasil Analisa Uji Perbedaan Mean Dua Kelompok	Error! Bookmark not defined.
5.3 Pembahasan hasil penelitian	120
BAB VI	128
6.1 Kesimpulan.....	128
6.2 Saran	128
1. Penelitian ini dapat dilanjutkan untuk mengenai sifat gen YY1 apakah ada hubungannya dengan Epstein Barr Virus yang paling banyak diduga pemicu terjadinya karsinoma nasofaring dan efek radiokemoterapi terhadap YY1	Error! Bookmark not defined.
Daftar Pustaka	129

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan keganasan yang angka kejadiannya sekitar 2% dari karsinoma sel skuamosa pada kepala dan leher. (Adham, Antonius, & Ika, 2012)

Sebuah buku yang berisikan kumpulan jurnal berjudul “*Nasopharyngeal Cancer*” keluaran tahun 2010, oleh Jun, Cao dan Sheng, Xin menulis tentang epidemiologi karsinoma KNF di mana secara regional dibagi menjadi 3 pembagian yakni insidens tinggi, menengah, dan rendah. Insidens terbanyak terdapat di China bagian selatan terutama di provinsi Guangdong, laki-laki ditemukan sekitar 20-50/100.000 penduduk yang terdiagnosis KNF. Unikanya terdapat perbedaan yang signifikan antara China Selatan dan Utara, sebab di daerah Utara angka kejadian KNF tergolong rendah. Sedangkan untuk insidens menengah atau sedang ada pada daerah Asia Timur, Mediterania dan Timur tengah yaitu Afrika utara, Italia Selatan, Yunani, dan Turki. Lalu untuk angka kejadian yang rendah dipegang oleh kaum kaukasian yaitu Amerika Utara dan negara-negara selatan. Sedangkan berdasarkan jenis kelamin, perbandingan laki-laki dengan perempuan yakni sekitar dua sampai tiga kali lebih besar. (Jun & Sumei, 2010) (Keiji & Mashiro, 2011)

Sebuah Penelitian di Indonesia tahun 2012 oleh Marlinda dan timnya yang dipublikasi oleh Chinese Journal of Cancer mengatakan bahwa prevalensi KNF di Indonesia sekitar 6,2/100.000 penduduk yakni 13.000 kasus baru setiap tahunnya yang terdata di Insidens KNF pada Asia Timur-Selatan termasuk insidens menengah yakni pada Singapura (15/100.000), Malaysia (9,7/100.000), Vietnam (7.5/100 000), Taiwan (7/100 000), and the Philippines (6.4/100 000). Di Indonesia kasus KNF merupakan kasus tersering keempat setelah kanker serviks, kanker payudara dan kanker kulit. Pada jurnalnya dikatakan bahwa KNF berkaitan dengan virus EBV secara 100%. (Adham, Antonius, & Ika, 2012)

WHO membagi KNF menjadi 3 tipe yakni tipe 1 karsinoma sel gepeng berlapis tanduk, tipe 2 dan 3 merupakan karsinoma sel gepeng tanpa lapis tanduk. Tipe 2 dan 3 dibagi menjadi 2 lagi yakni karsinoma diferensiasi baik dan karsinoma diferensiasi

buruk. (Keiji & Mashiro, 2011) (Mu-Sheng & Yi-Xin, 2010) Pada kenyataannya, yang paling sering ditemukan ialah ialah KNF tipe III *undifferentiated* menurut klasifikasi WHO. (Adham, Antonius, & Ika, 2012)

KNF biasanya disebabkan dari kombinasi dari 3 efek faktor etiologi, yakni:

Etiologi pertama ialah faktor lingkungan yang karsinogenik, seperti: asap rokok, ikan asin, bumbu yang terbuat dari udang (terasi), dan nitrosamin. Nitrosamin menginduksi kerusakan DNA, inflamasi kronik pada mukosa nasofaring, dan mempredisposisikan orang untuk terinfeksi EBV sehingga meningkatkan risiko terjadinya KNF.

Faktor kedua setelah lingkungan ialah genetik. (Shumaila & C.W, 2014) Beberapa hubungan telah dinyatakan antara Human leukocyte antigen (HLA) kelas I pada populasi tertentu dengan risiko terjadinya KNF. Pada orang yang risiko KNFnya meningkat biasanya disertai dengan peningkatan HLA. Selain itu juga terjadi inaktivasi tumor suppressor gen. (Keiji & Mashiro, 2011) Secara spesifik, gen pada HLA dan beberapa non-HLA menginduksi gamma-aminobutyric acid. B receptor 1 (GABBR1) dan Major histocompatibility complex class I polypeptide-related sequence A (MICA). Selain itu, DNA repair gene berperan penting pada setiap individu dalam susceptibilitas terhadap terkena kanker. (Keiji & Mashiro, 2011)

Faktor ketiga atau terakhir ialah EBV. Di dunia hampir menginfeksi 95% populasi orang dewasa. Di Hongkong, anak-anak berusia 6 tahun yang terinfeksi EBV sebanyak 80% sedangkan umur 10 tahun hampir 100%.

Telah dibuktikan bahwa faktor-faktor transkripsi memainkan peran penting dalam kontrol pertumbuhan sel, pengembangan dan diferensiasi. Cacat pada protein ini akan berkorelasi dengan kelainan perkembangan dan tumorigenesis. Pada proses transkripsi merupakan langkah awal penting dalam kaskade ekspresi gen, dengan memahami mekanisme kerja transkripsi regulator ini penting bagi kita untuk mengetahui gambaran program molekuler yang mendasari beragam biologis proses dalam sel-sel eukariotik.

YY1 diidentifikasi beberapa tahun yang lalu dan segera menarik perhatian karena sifat uniknya yaitu suatu protein multifungsi yang dapat bertindak sebagai transkripsi represor, aktivator, atau elemen inisiator

mengikat protein yang mengarahkan dan memulai transkripsi in vitro (Berns & Bohenzky, 1987) (Shi, Seto, Chang, & Shenk, 1991)

Yin Yang 1 (YY1) merupakan ubiquitous & multifunctional zinc-finger transcription factor, yang memiliki peran penting di kontrol dari siklus sel. YY1 memiliki peran regulasi pada *cell growth*, development, dan diferensiasi dengan cara mempengaruhi level Cyclin D1, c-Myc, Rb, MDM2 dan p53 (Begon, Delacroix, Vernimmen, Jackers, & Winkler, 2005) (Park & Atchison, 1991) (Zaravinos & Spandidos, 2010) (Baritaki, et al., 2007) (Shi, Lee, & Galvin, Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1, 1997). YY1 mampu melakukan regulasi negatif pada p53 dengan cara meningkatkan interaksi MDM2-p53 yang akan berujung pada ubiquitinasi dan degradasi p53 (Park & Atchison, 1991) (He, Hang, Y Zhou, Wang, & Duru, 2011). YY1 pertama kali diidentifikasi 20 tahun lalu oleh 3 grup independen dan memiliki nama asli YY1, DELTA1 or nuclear factor-E1. Berdasarkan beberapa studi selama 2 dekade terakhir seperti yang dilakukan oleh (Bauknecht, et al., 1995) Guifen He pada tahun 2011 di China, YY1 bisa berfungsi sebagai aktivator, repressor atau initiator dari proses transkripsi gen. Diperkirakan YY1 mungkin meregulasi kurang lebih 10% dari total gen pada manusia (Zaravinos & Spandidos, 2010) Selain itu, Zaravinos yang meneliti tentang ekspresi YY1 pada tumor di manusia menerangkan bahwa YY1 memiliki peran sebagai inhibitory signal pada p300 yang merupakan co-activator dari p53. (Baritaki, et al., 2007) (Bauknecht, et al., 1995). Terlebih lagi, Stavroula pada tahun 2007 menjelaskan bahwa over-ekspresi dari YY1 berhubungan dengan progresi low-grade menjadi high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) (Bauknecht, et al., 1995).

Tata laksana KNF bervariasi berdasarkan staging dari KNF itu sendiri. Sistem staging yang digunakan untuk KNF dibuat oleh *American Joint Committee on Cancer*, berdasarkan pada sistem TNM.

T menyatakan penilaian terhadap tumor primernya,

N menyatakan penilaian terhadap persebaran tumor menuju nodul limfatik regional, sedangkan

M menyatakan ada atau tidaknya metastasis jauh dari jaringan tumor.

Beberapa terapi yang dapat diberikan kepada pasien KNF adalah sebagai berikut: (Van & Ng, 1991)

Radioterapi adalah terapi pilihan untuk pengobatan KNF meskipun nantinya masih dibutuhkan terapi *adjuvant* untuk pelengkap. Meskipun Radioterapi dikatakan sebagai terapi terbaik untuk pasien KNF fase awal (meskipun tanpa kemoterapi), bukan berarti metastasis tidak akan terjadi. Radioterapi yang diberikan kepada pasien akan berbeda berdasarkan staging yang dimiliki oleh pasien.

Pembagian tersebut meliputi :

Stadium 1 Radioterapi yang diberikan untuk pasien dengan stadium 1 ini adalah Radioterapi untuk tumor atau KNF sendiri dan nodus limfa di leher. Stadium 1 ini adalah tingkatan dimana KNF memiliki lokalisasi yang baik sehingga Radioterapi saja sudah cukup untuk stadium ini (tanpa adjuvant). Radiasi akan dilaksanakan 5 hari dalam 1 minggu selama 7 minggu dengan dosis terapi 66-70 Gy. (Van & Ng, 1991) Suatu penelitian mengatakan bahwa Radioterapi yang dilakukan pada saat stadium 1 (tanpa bantuan kemoterapi) memiliki bukti *10 years survival rate* sebesar 98%.

Stadium 2 Radioterapi yang digunakan sama dengan pada pasien untuk stadium 1. Hal yang berbeda adalah penggunaan kemoterapi untuk terapi adjuvant atau terapi tambahan

Stadium 3 Radioterapi untuk KNF stadium 3 sama dengan stadium 2 dengan tambahan pembedahan kanker yang ada di leher yang melibatkan nodus limfa. Kemoterapi yang diberikan sebelum, pada saat, dan sesudah Radioterapi.

Stadium 4 telah melibatkan metastasis kanker ke daerah yang jauh. Terapi yang diberikan kepada pasien KNF stadium 4 sama dengan stadium 3 dengan tambahan kemoterapi untuk daerah metastasis.

Studi ini dilakukan dengan tujuan untuk analisa hubungan antara ekspresi gen mRNA YY1 dan ekspresi gen mRNA p53 pada pasien KNF akan dinilai secara kualitatif menggunakan real time PCR analysis untuk menilai staging. Dengan adanya eksplorasi di hal yang baru ini, diharapkan dapat menjadi dasar untuk menilai keparahan dan penelitian lebih lanjut dalam upaya penanganan kanker nasofaring.

1.2 Identifikasi dan Rumusan Masalah

1. Kanker nasofaring menduduki peringkat pertama kanker pada kepala dan leher memiliki angka mortalitas yang tinggi serta penanganan radiokemoterapi masih jadi modalitas utama.
2. Disregulasi dari p53 merupakan fokus utama dalam proses patogenesis kanker Nasofaring.
3. YY1 bisa berfungsi sebagai aktivator, repressor atau initiator dari proses transkripsi gen.

1.3 Pertanyaan Penelitian

1. Apakah tingkat ekspresi gen mRNA YY1 yang tinggi berhubungan dengan stadium kanker nasofaring yang tinggi.
2. Apakah tingkat ekspresi gen mRNA p53 yang rendah berhubungan dengan stadium kanker nasofaring yang tinggi.
3. Apakah paska radiokemoterapi akan dijumpai ekspresi gen mRNA YY1 yang rendah dan ekspresi gen mRNA p53 yang tinggi.

1.4 Hipotesis Penelitian

1. Pada stadium KNF yang lebih tinggi dijumpai ekspresi gen mRNA YY1 tinggi dan ekspresi gen mRNA p53 yang rendah
2. Paska radiokemoterapi pasien KNF dijumpai ekspresi gen mRNA YY1 rendah dan ekspresi gen mRNA p53 yang tinggi.

1.5 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan yang ingin dicapai melalui penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan antara ekspresi gen mRNA p53 dan ekspresi gen mRNA YY1 terhadap staging penderita KNF.

1.6 Manfaat Penelitian

1.6.1 Manfaat bagi pengetahuan

Penelitian ini diharapkan menjadi masukan atau tambahan pengetahuan dalam rangka mendukung pengembangan ide pemanfaatan gen YY1 sebagai salah satu kemajuan terapi yang bisa dipertimbangkan dalam penanganan penderita KNF

1.6.2 Manfaat bagi pelayanan

Penelitian ini juga diharapkan dapat memperkaya (seperti cakupan ilmu pengetahuan) medis untuk diagnosis ataupun progresi dari kanker nasofaring.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Nasofaring

2.1.1 Pengertian kanker nasofaring dan penyebabnya

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan keganasan epitelial daerah nasofaring (Pollard 2008). Nasofaring merupakan daerah berbentuk kubus terletak di belakang hidung, dengan ukuran diameter 4-5 centimeter. Gejala dan tanda KNF berupa tinnitus, pendengaran berkurang, otitis media berulang, obstruksi hidung, apabila sudah lanjut dan metastasis dijumpai benjolan di leher yang membesar dan tidak terasa nyeri tekan, kelemahan saraf kranial, suara sengau, dan sakit kepala. (Sharma, et al.)

Karsinoma nasofaring (KNF), tumor ganas daerah kepala dan leher yang paling banyak ditemukan. Di Indonesia, 60% tumor ganas kepala leher adalah KNF dan menduduki urutan kelima dari seluruh keganasan setelah tumor ganas mulut rahim, payudara, kelenjar getah bening, dan kulit. Di Amerika dan Eropa, prevalensi KNF sangat sedikit yaitu 0,5 per 100.000 penduduk per tahun dan hanya 1–2% dari seluruh tumor ganas kepala dan leher. Sebaliknya China Selatan dan Hongkong memiliki prevalensi KNF yang tinggi yaitu 50 per 100.000 penduduk per tahun.

Kesulitan diagnosa dini pada KNF sampai saat ini masih tetap merupakan masalah besar. Hal ini disebabkan oleh karena gejala penyakit yang tidak khas dan letak tumor yang tersembunyi sehingga sulit diperiksa. Di samping itu pemeriksaan serologi dan histopatologi yang belum memadai seperti perwarnaan immunohistokimia serta hampir seluruh penderita datang pada stadium lanjut.

Pada penelitian Soetjipto (1993), hanya 0,9–2,9% penderita yang datang pada stadium dini. Keadaan inilah yang menyebabkan penatalaksanaan KNF belum memberikan hasil yang memuaskan.

2.1.2 Faktor resiko KNF

(Vineis, et al., 2004) (Hsu, Chen, & Chien, 2009) (Sharma, et al.) (Yang, et al., 2005) (Shri, 2003) (Lee & Chan, 2008) (Guo, et al., 2009) (Friborg, et al., 2007) (Chang & Adami, 2006)

Beberapa faktor risiko karsinoma nasofaring antara lain virus Epstein Barr, ikan asin, kurang konsumsi buah dan sayuran segar, tembakau, asap lain, obat herbal, paparan pekerjaan, paparan lain, *familial clustering*, *Human Leukocyte Antigen Genes*, dan variasi genetik lain.

- Virus Epstein Barr

EBV merupakan faktor risiko terbesar untuk terjadinya karsinoma nasofaring. Umumnya infeksi EBV tidak menimbulkan gejala. EBV menginfeksi dan menetap secara laten pada 90% populasi dunia. Di Hong Kong, 80% anak terinfeksi pada umur 6 tahun, hampir 100% mengalami serokonversi pada umur 10 tahun. Infeksi EBV primer biasanya subklinis. Transmisi utama melalui saliva, biasanya pada negara berkembang yang kehidupannya padat dan kurang bersih. Limfosit B adalah target utama EBV, jalur masuk EBV ke sel epitel masih belum jelas, replikasi EBV dapat terjadi di sel epitel orofaring (Chang & Adami, 2006). Virus Epstein-Barr dapat memasuki sel-sel epitel orofaring, bersifat menetap (persisten), tersembunyi (laten) dan sepanjang masa (*life-long*). Antibodi Anti-EBV ditemukan lebih tinggi pada pasien karsinoma nasofaring, pada pasien karsinoma nasofaring terjadi peningkatan antibodi IgG dan IgA, hal ini dijadikan pedoman tes skrining karsinoma nasofaring pada populasi dengan risiko tinggi. (Chang & Adami, 2006)

- Ikan asin

Paparan non-viral yang paling konsisten dan berhubungan kuat dengan risiko karsinoma nasofaring adalah konsumsi ikan asin. Konsumsi ikan asin meningkatkan risiko 1,7 sampai 7,5 kali lebih tinggi dibanding yang tidak mengkonsumsi. Diet konsumsi ikan asin lebih dari tiga kali sebulan meningkatkan risiko karsinoma nasofaring. (Ondrey & SK, 2003) Potensi karsinogenik ikan asin didukung dengan penelitian pada tikus disebabkan proses pengawetan dengan garam tidak efisien sehingga terjadi akumulasi nitrosamin yang dikenal karsinogen pada hewan (Chang & Adami, 2006). Enam puluh dua persen pasien karsinoma nasofaring mengkonsumsi secara rutin makanan fermentasi yang diawetkan (Sharma, et al.). Tingginya konsumsi nitrosamin dan nitrit dari daging, ikan dan sayuran yang berpengawet selama masa kecil meningkatkan risiko karsinoma nasofaring (Yang, et al., 2005). Delapan puluh delapan persen penderita karsinoma nasofaring mempunyai riwayat konsumsi daging asap secara rutin.

- Kurang Buah dan Sayuran Segar

Konsumsi buah dan sayuran segar seperti wortel, kobis, sayuran berdaun segar, produk kedelai segar, jeruk, konsumsi vitamin E atau C, karoten terutama pada saat anak-anak, menurunkan risiko karsinoma nasofaring. Efek protektif ini berhubungan dengan efek antioksidan dan pencegahan pembentukan nitrosamin. (Chang & Adami, 2006)

- Tembakau

Sejak tahun 1950 sudah dinyatakan bahwa merokok menyebabkan kanker. Merokok menyebabkan kematian sekitar 4 sampai 5 juta per tahunnya dan diperkirakan menjadi 10 juta per tahunnya pada 2030 (Vineis, et al., 2004). Rokok mempunyai lebih dari 4000 bahan karsinogenik, termasuk nitrosamin yang meningkatkan risiko terkena karsinoma nasofaring. Kebanyakan penelitian menunjukkan merokok meningkatkan risiko karsinoma nasofaring sebanyak 2 sampai 6 kali. Sekitar 60% karsinoma nasofaring tipe I berhubungan dengan merokok sedangkan risiko karsinoma nasofaring tipe II atau III tidak berhubungan dengan merokok. (Chang & Adami, 2006) Perokok lebih dari 30 bungkus per tahun mempunyai risiko besar terkena karsinoma nasofaring. Kebanyakan penderita karsinoma nasofaring merokok selama minimal 15 tahun (51%) dan mengkonsumsi tembakau dalam bentuk lain (47%) (Sharma, et al.). Merokok lebih dari 25 tahun meningkatkan risiko karsinoma nasofaring. Merokok lebih dari 40 tahun meningkatkan 2 kali lipat risiko karsinoma nasofaring. (Friborg, et al., 2007)

- Obat Herbal

Pada populasi Asia, beberapa penelitian melaporkan 2 sampai 4 kali lipat peningkatan risiko karsinoma nasofaring karena penggunaan obat herbal tradisional, tetapi tiga penelitian di Cina Selatan tidak menemukan hubungan obat herbal dengan karsinoma nasofaring. Di Filipina, penggunaan obat herbal tradisional meningkatkan risiko karsinoma nasofaring, terutama pada orang yang mempunyai titer antibodi anti-HBV tinggi. (Chang & Adami, 2006)

- Paparan Pekerjaan dan aroma

Beberapa peneliti menyatakan bahwa insidens karsinoma nasofaring yang tinggi di Cina Selatan dan Afrika Utara disebabkan karena asap dari pembakaran kayu bakar (Chang & Adami, 2006). Sembilan puluh tiga persen penderita karsinoma nasofaring tinggal di rumah dengan ventilasi buruk dan mempunyai

riwayat terkena asap hasil bakaran kayu bakar (Sharma, et al.). Paparan asap hasil kayu bakar lebih dari 10 tahun meningkatkan enam kali lipat terkena karsinoma nasofaring.

Pajanan pekerjaan terhadap *fume*, asap, debu atau bahan kimia lain meningkatkan risiko karsinoma nasofaring 2 sampai 6 kali lipat. Peningkatan risiko karsinoma nasofaring karena pajanan kerja terhadap formaldehid sekitar 2 sampai 4 kali lipat, didukung oleh penelitian pada tikus, terutama untuk tipe I tetapi tidak untuk tipe II dan III (Ondrey & SK, 2003) (Chang & Adami, 2006). Namun sebuah meta-analisis dari 47 penelitian tidak mendukung hubungan formaldehid dengan karsinoma nasofaring.

Stimulasi dan inflamasi jalan nafas kronik, berkurangnya pembersihan mukosiliar, dan perubahan sel epitel mengikuti tertumpuknya debu kayu di nasofaring memicu karsinoma nasofaring, paparan ke pelarut dan pengawet kayu, seperti klorofenol juga memicu karsinoma nasofaring. Paparan debu katun yang hebat meningkatkan risiko karsinoma nasofaring karena iritasi dan inflamasi nasofaring langsung atau melalui endotoksin bakteri. Paparan tempat kerja yang panas atau produk bakaran meningkatkan dua kali lipat risiko terkena karsinoma nasofaring. Paparan debu kayu di tempat kerja lebih dari 10 tahun meningkatkan risiko terkena karsinoma nasofaring. (Yang, et al., 2005)

- Pajanan Lain

Riwayat infeksi kronik telinga, hidung, tenggorok dan saluran napas bawah meningkatkan risiko karsinoma nasofaring sebanyak dua kali lipat. Bakteri yang menginfeksi saluran nafas dapat mengurai nitrat menjadi nitrit, kemudian dapat membentuk bahan N-nitroso yang karsinogenik. Di Taiwan, kebiasaan mengunyah *betel nut (Areca catechu)* selama lebih dari 20 tahun berhubungan dengan peningkatan 70% risiko karsinoma nasofaring. Sebuah penelitian ekologi di Cina Selatan menemukan 2 sampai 3 kali lipat kadar nikel di nasi, air minum, dan rambut penduduk yang tinggal di wilayah yang tinggi insiden karsinoma nasofaringnya. Penelitian lain menyatakan bahwa kandungan nikel, zinc dan cadmium pada air minum lebih tinggi di wilayah yang tinggi insiden karsinoma nasofaringnya. Kadar nikel pada air minum, kadar elemen alkali seperti magnesium, kalsium, strontium yang rendah pada tanah, dan tingginya kadar radioaktif seperti thorium dan uranium pada tanah berperan pada mortalitas

karsinoma nasofaring, namun masih perlu dibuktikan dengan penelitian epidemiologi analitik. Risiko karsinoma nasofaring juga meningkat berhubungan dengan makanan berpengawet lain seperti daging, telur, buah dan sayur terutama di Cina Selatan, Asia Tenggara, Afrika Utara/Timur Tengah dan penduduk asli Artik. (Chang & Adami, 2006)

- **Keturunan**

Kerabat pertama, kedua, ketiga pasien karsinoma nasofaring lebih berisiko terkena karsinoma nasofaring. Orang yang mempunyai keluarga tingkat pertama karsinoma nasofaring mempunyai risiko empat sampai sepuluh kali dibanding yang tidak. Risiko kanker kelenjar air liur dan serviks uterus juga meningkat pada keluarga dengan kasus karsinoma nasofaring. Faktor risiko lingkungan seperti ikan asin, merokok dan paparan pada produk kayu meningkatkan *level* antibodi anti-EBV dan beberapa polimorfasi genetik. Kasus familial biasanya pada tipe II dan III, sedangkan tipe I non familial. (Chang & Adami, 2006)

- **Ras *Human Leukocyte Antigen Genes***

Di Cina Selatan dan populasi Asia lain, *Human Leukocyte Antigen-A2-B46* dan *B-17* berhubungan dengan peningkatan dua sampai tiga kali lipat risiko karsinoma nasofaring. Sebaliknya *Human Leukocyte Antigen-A11* menurunkan 30%-50% risiko terkena karsinoma nasofaring pada ras Kulit Putih dan Cina, *B13* pada ras Cina, dan *A2* pada ras Kulit Putih. Sebuah meta analisis pada populasi di Cina Selatan menunjukkan peningkatan karsinoma nasofaring pada *HLAA2*, *B14* dan *B46*, dan penurunan karsinoma nasofaring pada *HLA-A11*, *B13* dan *B22*. (Chang & Adami, 2006)

- **Variasi Genetik Lain**

Polimorfi di sitokrom P450 2E1 (*CYP2E1*) dan *CYP2A6* dan ketiadaan Glutation S-transferase M1 (*GSTM1*) dan atau *GSTT1* berhubungan dengan peningkatan risiko dua sampai lima kali lipat terkena karsinoma nasofaring. Di Thailand dan Cina, polimorfi pada *polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)*, sebuah reseptor permukaan sel memudahkan masuknya EBV masuk ke epitel hidung dan meningkatkan risiko karsinoma nasofaring. (Chang & Adami, 2006)

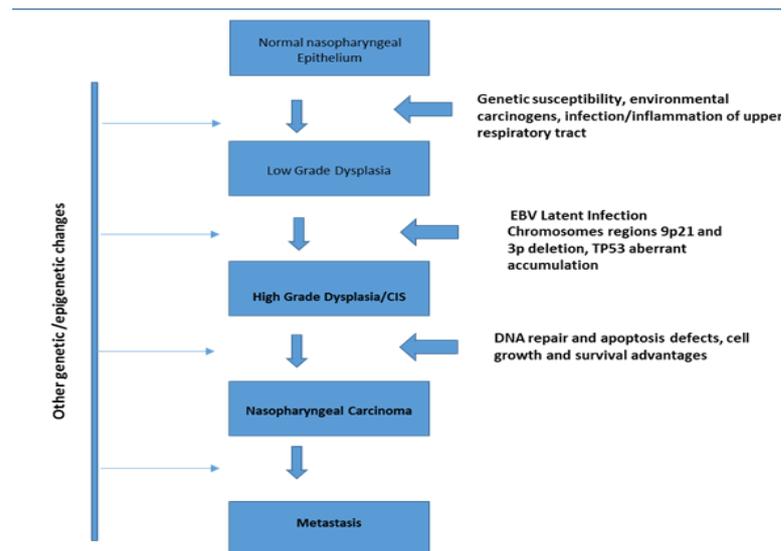
2.1.3 Etiologi patogenesis KNF

Etiologi KNF biasanya disebabkan dari kombinasi dari 3 efek faktor etiologi, yakni: Yang pertama ialah faktor lingkungan yang karsinogenik, seperti: asap rokok, ikan asin, bumbu yang terbuat dari udang (terasi), dan nitrosamin. Nitrosamin menginduksi kerusakan DNA, inflamasi kronik pada mukosa nasofaring, dan mempredisposisikan orang untuk terinfeksi EBV sehingga meningkatkan risiko terjadinya KNF. Dalam sebuah studi populasi di China, insidens KNF meningkat dari 1 per 100.000 menjadi 3 per 100.000 pada populasi yang sering memakan ikan asin. Di China bagian Selatan orang-orangnya dikenal sebagai cantonese, dan mereka mempunyai adat memakan ikan asin, lalu merekapun menyebut karsinoma nasofaring sebagai “canton tumor”. Oleh karena adat ini, kemungkinan penyebab China Selatan lebih banyak yang terkena KNF ketimbang China Utara ialah karena ikan asin. Setelah diteliti lebih lanjut ternyata bukan kadar garamnya yang menyebabkan KNF akan tetapi dalam proses pembentukan ikan asin, rata-rata tidaklah efisien sehingga membuat ikan menjadi sedikit busuk yang mana mengakumulasi nitrosamin sebagai zat karsinogen pada ikan yang normalnya tidak ada menjadi ada. Selain itu pada ikan asin ditemukan pula mutagens, genotoksin direk, dan substansi reaktif-EBV. (Mu-Sheng & Yi-Xin, 2010) Beberapa studi di Amerika menyatakan bawah keturunan China Selatan yang dari kecil hingga dewasa tinggal di Amerika memiliki faktor risiko yang kecil dalam terkena KNF. Dari sini dapat ditarik arti, bahwa genetik bukanlah penyebab utama dalam insidens KNF yang tinggi di China Selatan. Masih dalam etiologi pertama, dari penelitian yang berbeda yakni dari Asia dan Amerika Utara mengkonfirmasi bahwa makanan dari suku cantonese terutama ikan asin dan makanan kaleng yang diawetkan mengandung banyak Nitrosodimethyamine (NMDA), N-nitrosopyrrolideane (NYPR) dan N-Nitrosopiperidine (NPIP) yang memungkinkan menjadi faktor penyebab KNF. Sebab semakin muda orang terpapar ikan asin di China selatan, semakin cepat pula terkena KNF. Selain itu pula, dalam eksperimen pada hewan yakni tikus, tikus tersebut diinduksi dengan pemberian makanan ikan asin setiap harinya, lalu dapat timbul tumor nasal dan juga nasofaring. (Keiji & Mashiro, 2011)

Faktor kedua setelah lingkungan ialah genetik. Beberapa hubungan telah dinyatakan antara Human leukocyte antigen (HLA) kelas I pada populasi tertentu dengan risiko terjadinya KNF. Pada orang yang risiko KNF nya meningkat biasanya disertai dengan peningkatan HLA. Selain itu juga terjadi inaktivasi tumor supresor gen.

(Mu-Sheng & Yi-Xin, 2010) Secara spesifik, gen pada HLA dan beberapa non-HLA menginduksi gamma-aminobutyric acid. B receptor 1 (GABBR1) dan Major histocompatibility complex class I polypeptide-related sequence A (MICA). Selain itu, DNA repair gene berperan penting pada setiap individu dalam susceptibilitas terhadap terkena kanker. Karakteristik yang penting pada genetik ialah dapat diturunkan yang dikenal sebagai istilah *familial cancer*. Risiko terkena KNF dari keluarga termasuk kategori yang cukup tinggi dibandingkan keganasan lainnya (Suarez et al 2006). (Keiji & Mashiro, 2011) Oleh karena diturunkan, KNF biasanya muncul pada umur yang lebih muda. Biasanya KNF terdiagnosis pada kisaran umur 40-60, akan tetapi pada kasus di mana orang tua terkena KNF maka anaknya berisiko terkena KNF di bawah umur 30 tahun, dan umumnya penyebab KNF di bawah 30 tahun yakni karena peningkatan level LMP1. (Adham, Antonius, & Ika, 2012) (Keiji & Mashiro, 2011) Sehingga perlu dicari lebih dalam lagi apakah penyebab KNF usia muda oleh LMP1 dikarenakan genetik atau melalui etiologi patofisiologi virus EBV.

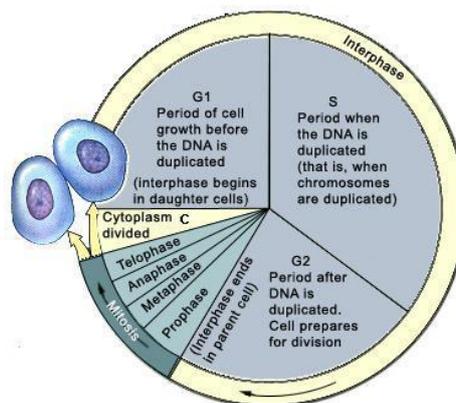
Faktor ketiga ialah EBV. Di dunia hampir menginfeksi 95% populasi orang dewasa. Di Hongkong, anak-anak berusia 6 tahun yang terinfeksi EBV sebanyak 80% sedangkan umur 10 tahun hampir 100%. Gejala infeksi primer EBV biasanya subklinis akan tetapi virus ini dapat berhubungan dalam perkembangan selanjutnya yakni karsinoma sel skuamosa. EBV ditransmisikan melalui air ludah dan infeksi primer biasanya pada anak-anak dengan replikasi virus di sel permukaan orofaring yang kemudian disusul infeksi laten oleh limfosit B. Pada keadaan ini, titer EBV-antigen (terutama IgA dan anti-DNase) akan naik. Selain itu, pada sel orofaring ditemukan infeksi EBV yang laten dan kolonisasi genom EBV pada karsinoma invasif, ditemukan juga lesi displasia derajat tinggi. (Mu-Sheng & Yi-Xin, 2010) (Shumaila & C.W, 2014) Mekanisme infeksi EBV bukan secara langsung menginduksi sel untuk proliferasi akan tetapi membuat sel epitel merubah susunan genetiknya sehingga nantinya menyebabkan pertumbuhan dari sel-sel yang terinfeksi. Penelitian terbaru mengatakan bahwa sel-sel yang terinfeksi pada fase premalignan atau displasia, mengekspresikan Cyclin D1 lebih banyak. Selain itu di studi lain diteliti tentang EBV-related proteins and genes seperti EBER (EBV-encoded RNA) dan latent membrane protein1 (LMP-1). LMP-1 merupakan kunci regulator dari glikolisis yang diakibatkan EBV dalam sel.



Gambar 2.1 Perubahan epigenetic nasofaring (Kwok-Wai & Dolly, 2002)

Fisiologi siklus sel normal

Regulasi sel bertujuan untuk menghasilkan pembelahan sel secara terkontrol. Pembelahan sel terbagi menjadi 2 proses utama yakni replikasi dan pembelahan kromosom. Pembelahan sel dibagi menjadi 2 tahap yaitu mitosis (M) yakni pembelahan 1 sel menjadi 2 sel dan interfase yakni proses di antara sebelum mitosis. Interfase terdiri dari fase G1, S (sintesis DNA) dan G2. (Moon-Taek & Su-Jae, 2003)

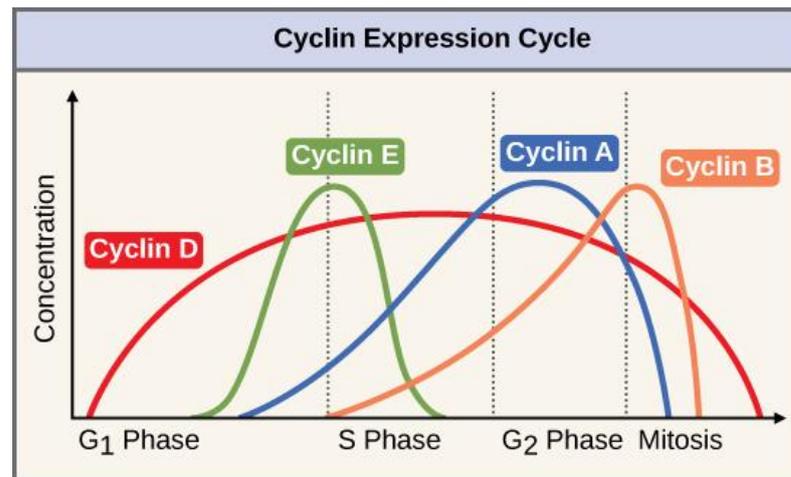


Gambar 2.2. Pembelahan sel normal

Setiap tahap dalam siklus sel dikontrol secara ketat oleh regulator siklus sel, yaitu:

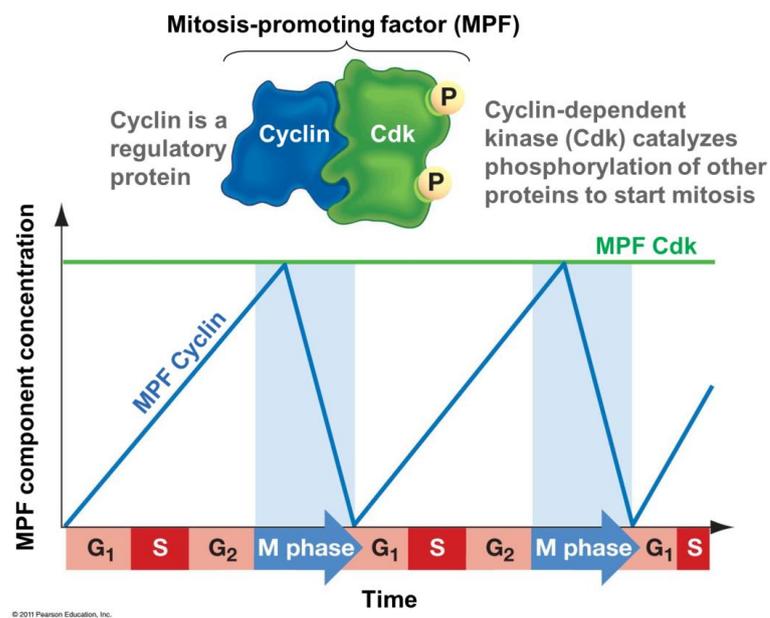
- Cyclin.** Jenis cyclin utama dalam siklus sel adalah cyclin D, E, A, dan B. Cyclin diekspresikan secara periodik akan tetapi selalu disintesis selama ada stimulasi growth factor. (Bill & Knudsen, 2012) (Moon-Taek & Su-Jae, 2003)

b)



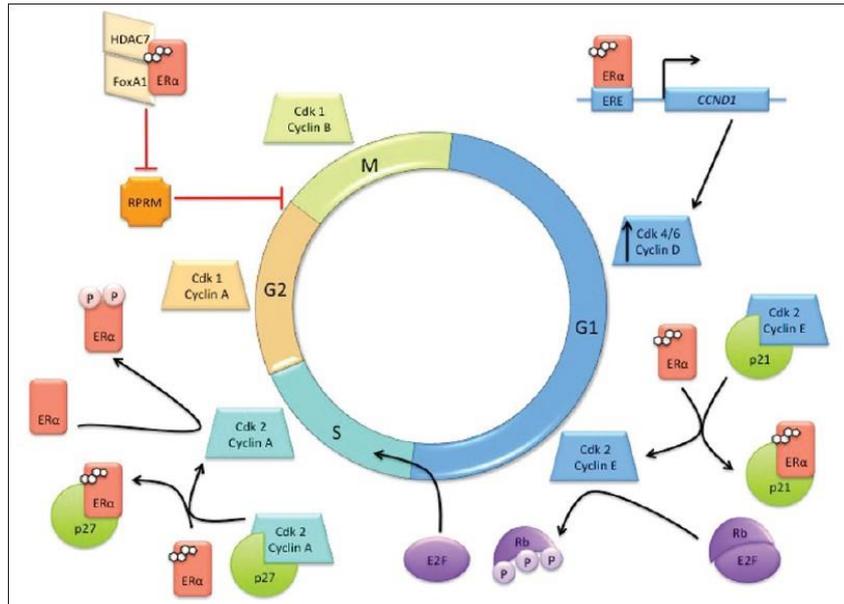
Gambar 2.3 Siklus sel

- c) Cyclin-dependent kinases (Cdk). Cdk utama dalam siklus sel adalah Cdk 4, 6, 2, dan 1. Cdk merupakan protein yang harus berikatan dengan cyclin untuk aktivasinya. Konsentrasi Cdk fluktuatif di dalam sel. Ketika akan mitosis kadar Cdk meningkat seiring dengan cyclin. Cdk dalam keadaan bebas (tak berikatan) adalah inaktif karena catalytic site, tempat ATP dan substrat berikatan diblok oleh ujung C-terminal dari CKIs. Cyclin akan menghilangkan pengeblokan tersebut. Ketika diaktifkan, cdk-cyclin complex disebut juga sebagai mitosis promoting factor akan memacu proses mitosis dengan cara memfosforilasi protein spesifik. (Bill & Knudsen, 2012) (Moon-Taek & Su-Jae, 2003)



Gambar 2.4 Mitosis sel

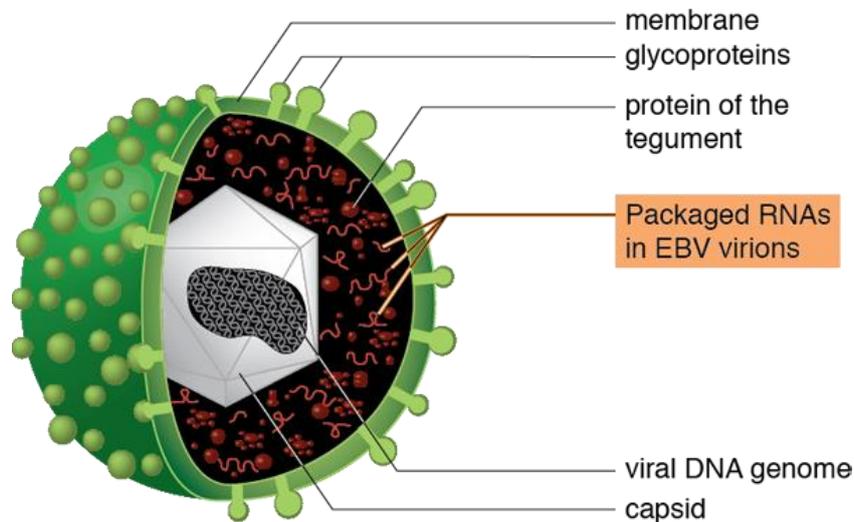
- d) Cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI), merupakan protein yang dapat menghambat aktivitas Cdk dengan cara mengikat Cdk atau kompleks cyclin-Cdk. Cyclin-dependent kinase inhibitor terdiri dari dua kelompok protein yaitu INK4 (p15, p16, p18, dan p19) dan CIP/KIP (p21, p27, p57). Keluarga INK4 membentuk kompleks yang stabil dengan Cdk sehingga mencegah Cdk mengikat cyclin D. INK4 bertugas mencegah progresi fase G1. Keluarga CIP/KIP meregulasi fase G1 dan S dengan menghambat kompleks G1 cyclin Cdk dan cyclin B-Cdk1. Protein p21 (p21) juga menghambat sintesis DNA dengan menonaktifkan proliferating cell nuclear antigen (PCNA) dan juga menginduksi apoptosis. Ekspresi p21 diregulasi oleh p53, karena p53 merupakan faktor transkripsi untuk ekspresi p21 (Bill & Knudsen, 2012) (Moon-Taek & Su-Jae, 2003).
- e) Check point pada siklus sel, Apabila terdapat kerusakan DNA, checkpoint akan memacu cell cycle arrest sementara untuk perbaikan DNA atau cell cycle arrest permanen sehingga sel memasuki fase senescent. Check point dikenal juga sebagai restriction point (R) dan muncul menjelang akhir G1. Pada check point ini DNA sel dicek apakah ada yang rusak atau tidak. Bila ada yang rusak masa siklus sel berhenti dan digantikan dengan mekanisme repair DNA hingga selesai. Bila mekanisme cell cycle arrest tidak cukup menjamin DNA yang rusak diduplikasi, maka sel akan dieliminasi dengan cara apoptosis. (Bill & Knudsen, 2012) (Moon-Taek & Su-Jae, 2003)
- f) p53 dikontrol oleh mdm2 dan p19ARF dan memiliki kadar rendah di dalam sel. Tetapi ketika ada DNA yang rusak, sekali distimulasi maka level p53 akan cepat meningkat.



Gambar 2.5

Protein-protein yang berperan dalam siklus sel (Moon-Taek & Su-Jae, 2003)

Patogenesis sel kanker pada karsinoma nasofaring karena EBV:



Gambar 2.6 Epstein Bar Virus (Mu-Sheng & Yi-Xin, 2010)

EBV merupakan grup dari herpes virus dan merupakan herpes virus (Keiji & Mashiro, 2011). EBV memiliki struktur capsid yang didalamnya mengandung double stranded DNA (dsDNA). Untuk tegument (ruang antara capsid dan dinding virus) mengandung substansi virus (RNA) dan senyawa-senyawa protein yakni enzim yang akan berinteraksi dengan sel normal agar dapat merusak mekanisme pertahanan sel tersebut dan virus dapat masuk. EBV masuk pada sel normal dengan menyatu pada

membran sel yang akan diserang lalu melepaskan capsid ke dalam sel, kemudian DNA keluar ke nukleus ketika capsid sudah masuk di *nucleus pore*.

Berdasarkan Control Disease Center (CDC) tahun 2014, Penularan EBV yakni melalui cairan tubuh secara non seksual (paling sering melalui saliva) ataupun secara seksual. Virus ini dipresentasikan dalam dua fase yakni fase aktif dan fase laten. Virus dapat ditularkan hanya ketika virus berada dalam fase aktif pada seseorang. Ketika sudah menjadi laten, virus dapat kembali menjadi aktif pada keadaan imun turun. Untuk mengetahui apakah orang terinfeksi EBV dapat dilakukan dengan tes darah terhadap antibodi. Gejala dari infeksi EBV ialah lemah, lemas, demam, sakit tenggorokan, pembesaran KGB di leher, pembesaran limpa, pembesaran hati, dan bisa juga timbul bintil-bintil merah.

EBV dapat menyebabkan beberapa penyakit lain dan yang paling sering ialah mononucleosis, Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, KNF, dan kanker lambung. (Mu-Sheng & Yi-Xin, 2010)

Pada tahun 1964, EBV pertama kali ditemukan pada orang Afrika yang menderita Burkitt Lymphoma yakni keganasan pada Limfosit B. Setelah diteliti ternyata cara EBV laten di tubuh manusia bukan karena virus ini terus menerus replikasi, bahkan virus ini tidak replikasi serta memproduksi virion baru pada fase laten, melainkan virus ini direplikasi oleh tubuh manusia melalui DNA polimerase dan episome kromosom ekstra. (Mu-Sheng & Yi-Xin, 2010)

Infeksi EBV primer yakni di oropharynx dan virus ini akan menginfeksi atau menyerang limfosit B yang tidak aktif (*resting*) sebagai tempat replikasi dan tempat infeksi laten. Dalam sebuah studi secara *in vitro* EBV mengaktivasi sel B dengan menempel pada dua reseptor komplemen pada permukaan sel B yakni CR2 atau CD21, lalu mengubahnya menjadi sel lymphoblastoid lines (LCLs) ini yang disebut sebagai transformasi pertumbuhan dan sebagai tanda dari infeksi virus. Perlu diketahui bahwa EBV tidak langsung menginfeksi sel epitel karena sel epitel hanya mengekspresikan sedikit reseptor CR2. Oleh karena itu dalam pengecekan EBV positif pada KNF yakni dengan mengecek penempelan virus pada dinding Sel B. Dari sini dapat dikatakan bahwa sebenarnya relevansi tes serologi untuk infeksi EBV terhadap KNF tidaklah jelas karena yang dicek bukanlah presentasi virus dalam sel epitel yang akan berubah menjadi KNF. (Mu-Sheng & Yi-Xin, 2010) Belakangan diketahui bahwa pada KNF

hasil serological EBV selalu tinggi di daerah endemis ataupun tidak. Titer antibodi EBV pada KNF melebihi dari burkitt's lymphoma dan selain dari antibodi tersebut, pasien KNF biasanya memiliki kadar igA dan IgG yang tinggi terhadap EBV antigen termasuk viral capsid antigen (VCA), diffused early antigen (EA-D), viral nuclear antigen 1 (EBNA1), glycoprotein 78 (gp78), dan transcription activators Zta dan Rta.

Pada sebuah studi dikatakan bahwa apabila EBV menjadi faktor yang mempengaruhi tingkat antibodi, maka apabila terdapat keturunan KNF atau genetik maka seharusnya orang tersebut memiliki titer EBV antibodi lebih tinggi dari pada populasi yang sehat (tanpa keturunan). Akan tetapi pada penelitian lain mereka tidak menemukan hasil yang signifikan, malah sama saja. Sehingga penyebabnya masih belum jelas. EBV kemungkinan bukan menjadi faktor pertama yang menyebabkan KNF. Dari studi lain dikatakan bahwa merokok dapat mengaktivasi EBV. (Moon-Taek & Su-Jae, 2003)

Terdapat 4 tipe model yang dipikirkan dapat menjelaskan transisi EBV laten dari limfosit B ke tempat replikasi secara produktif di epitel oral:

Model 1 : Infeksi laten teraktivasi lalu EBV menyebar ke epitel melalui darah

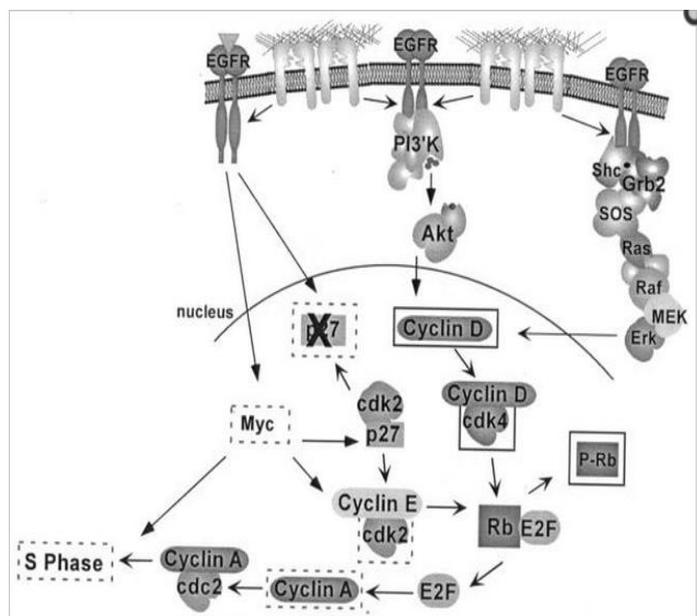
Model 2: Virion EBV yang diproduksi limfosit B menempel pada submukosa IgA lalu masuk via endositosis melalui reseptor Ig.

Model 3 : Limfosit B mendapat akses dari epitel sel yang mengalami kerusakan akibat infeksi

Model 4 : EBV sudah menginfeksi laten pada limfosit B serta epitel mulut dari awalnya

Melalui studi *in vitro* maupun *in vivo* (Altmann et al. 2005) Gen vBcl-2 merupakan gen yang penting dalam mencegah apoptosis pada sel yang terinfeksi virus sehingga virus tidak dapat mati begitu pula dengan sel yang diinfeksi tidak akan mati. Hal ini dapat menjelaskan mengapa EBV dapat menyebabkan lymphoma. Diteliti bahwa selama virus laten di sel B, tidak terjadi sintesis dari virus, genome virus tetap berada dalam plasmid sel yang terinfeksi. Sehingga gambaran seperti ini dapat menjadi tanda bahwa EBV berada dalam fase laten. Ketika EBV genome masuk ke nukleus akan memulai program transformasi. Natural killer cell atau sel NK akan teraktivasi dan dendritic cell atau sel presentasi akan membasmi infeksi primer sampai imunitas adaptif dapat mengambil alih.

Pada KNF, beberapa mutasi telah diketahui yakni Metinhibitors (proto-onkogen berguna sebagai mencegah sel berproliferasi dengan genetik yang berbeda) menjadi teraktivasi, ekspresi berlebihan IL-6 berfungsi dalam sinyal migrasi dan invasi sel yang dimediasi oleh matrix metalloproteinase (MMP-2 dan MMP-9). Selain itu yang berperan penting dalam terbentuknya KNF adalah tingginya kadar EGFR merupakan salah satu untuk menilai tumor di kepala dan di leher karena 80-100% kadar EGFR naik pada tumor kepala dan leher. Lalu ada juga VEGF yang diekspresikan KNF sebanyak 67% kasus di mana membantu dalam proses metastasis. Terakhir adalah HIF-1 alpha (hypoxia inducible factor) diekspresikan oleh VEGF dan positif pada 50% KNF. Kedua substansi yakni VEGF dan HIF-1 mempunyai peranan penting sebagai mediator dari angiogenesis.



Gambar 2.7 Perananan EGFR dalam siklus sel (Moon-Taek & Su-Jae, 2003)

Gambar berikut menjelaskan tentang perananan EGFR dalam siklus sel. EGFR distimulasi oleh FN atau integrin. Adhesi integrin ke sel epitel akan menstimulasi EGFR yang lalu akan mengaktivasi PI-3k/Akt yang kemudian meningkatkan sintesis cyclin D1. Lalu cyclin D1 akan mengaktivasi cdk4 dan memfosforilasi Rb. Fosforilasi Rb juga dipengaruhi oleh cyclin E, akan tetapi induksi Myc tidak terlalu kuat oleh EGFR sehingga aktivasi cdk2 lemah juga, akhirnya produksi Cyclin A menurun dan sel tidak masuk ke fase S (sintesis). EGFR juga bekerja dalam menginaktifkan p27 yang mana merupakan cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) yakni bersifat menghambat pertumbuhan dan mencegah berkembang menjadi kanker.

Jadi secara singkat EGFR diperlukan agar sel dapat masuk ke fase S. (Moon-Taek & Su-Jae, 2003) Akan tetapi dari studi lain dikatakan pula apabila EGFR terlampaui banyak akan menimbulkan sintesis DNA yang berlebihan sehingga mempercepat pertumbuhan dan perkembangan sel, invasi, dan metastasis.

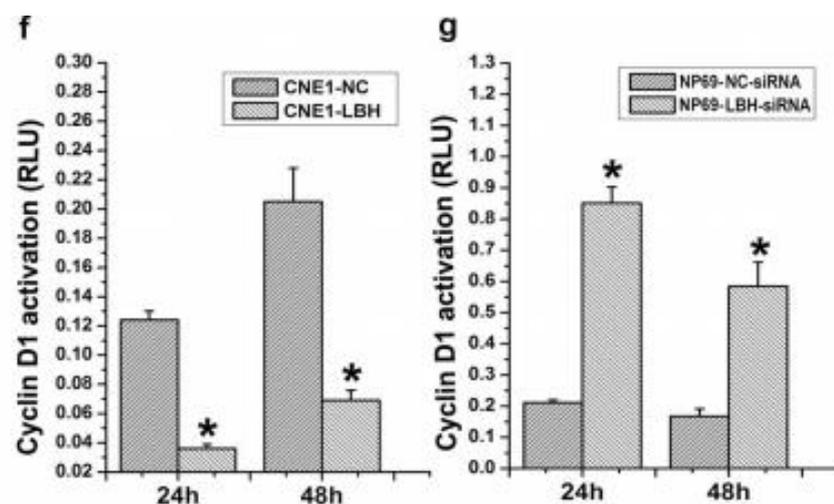
Menurut review yang dibuat oleh Shumaila dan Tony yang mengambil bidang radiasi onkologi pada jurnal bernama “*Nasopharyngeal Carcinoma: Current treatment options and future directions*”, Beberapa onkogen yang masuk dalam patogenesis KNF dibagi menjadi 3 golongan yakni:

<i>Mutation</i>	<i>Amplification</i>	<i>Overexpression</i>
PIK3CA (Phosphoinositide 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide)	PIK3CA (Phosphoinositide 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide)	PIK3CA (Phosphoinositide 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide)
DeltaNp63/TP73L (Tumor protein p73-like, p63 splicing variants lacking NH(2)-terminal transactivating domain)	—	DeltaNp63/TP73L (Tumor protein p73-like, p63 splicing variants lacking NH(2)-terminal transactivating domain)
—	CCND1 (Cyclin D1)	CCND1 (Cyclin D1)
—	MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue ,avian)	MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue, avian)
—	EGFR (Epidermal growth factor receptor)	EGFR (Epidermal growth factor receptor)
—	NRAS [Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homologue] [12]	A20/TNFAIP3 (Tumor necrosis factor alpha induced protein 3)
—	INT2/FGF3 [Fibroblast growth factor 3]	BCL2 (B-cell CLL/ lymphoma 2)
—	—	HER2/ERBB2 (v-erb-b2 erythroblastic leukaemia viral oncogene homologue 2)
—	—	HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homologue)
—	—	ID1 (Inhibitor of DNA binding protein)
—	—	MDM2 (Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2; p53-binding protein)
—	—	MET (Met proto-oncogene; hepatocyte growth factor receptor)

Berdasarkan penelitian terakhir pada tahun 2015 oleh Xiaoying dengan temannya Qicai Liu, dan lain-lain mengatakan peranan LMP-1 (latent membrane protein-1) masih belum dimengerti mekanisme jelasnya. Merekapun meneliti tentang hubungan LBH (Limb-bud Heart) yang berfungsi sebagai Tumor suppressore gene (TSG) pada KNF dengan menginduksi siklus sel berhenti di G1/S1. Diagnosispun dilakukan dengan melakukan tindakan biopsi jaringan dan mengetes kadar LBH pada sel epitel. LBH normalnya membuat siklus sel berhenti, sehingga apabila LBH

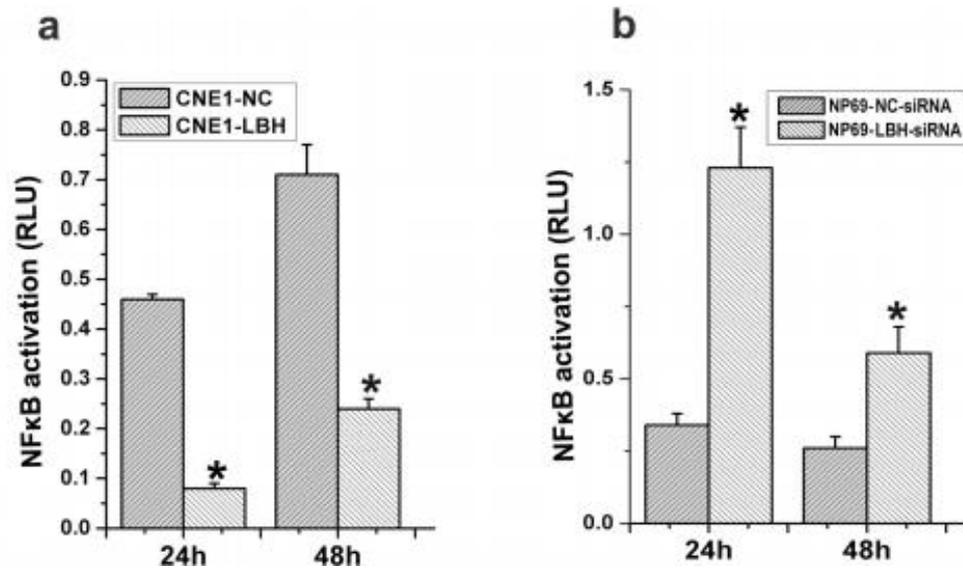
diberikan pada KNF, perkembangan tumor dapat tertekan. Telah diselidiki bahwa ternyata pada epitel KNF, kadar LBH hampir sama sekali tidak ada bahkan kadang tidak ditemukan. Padahal pada sel normal ekspresi LBH ditemukan.

Dalam penelitiannya secara *in vivo*, LBH menekan pertumbuhan sel KNF dengan *downregulating* LMP-1 sebagai mediasi aktivitas transkripsi NF- κ B. Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF- β 1) normalnya memproteksi sel dari pertumbuhan tumor dengan menekan proliferasi sel. TGF- β 1 bekerja melalui jalur SMAD dan menginduksi apoptosis. Tetapi pada KNF akan terjadi resistensi terhadap reseptor ini. Mereka menemukan bahwa TGF- β 1 menghambat aktivitas transkripsi NF- κ B dan sel proliferasi pada KNF dengan meregulasi ekspresi LBH menjadi turun. Memang data ini baru dan belum diketahui sebelumnya tentang mekanisme LBH, sehingga memberikan konsep baru dan strategi terapi baru untuk LMP1-pemicu onkogenesis pada KNF. Selain dengan pewarnaan LBH, dengan imunohistomikimia menunjukkan bahwa pada KNF type undifferentiated kadar LBH menurun ketimbang kadar LBH pada tikus kontrol. (Qicai & Xiaoying, 2015) Pada sel yang diinduksi CNE1-LBH, kadar c-Myc, Cyclin E1 dan E2 turun. Selain itu juga kadar Cyclin D1 dan aktivasi NF- κ B juga turun. Sebaliknya pada sel normal yang diinduksi CNE1 yang mempresentasikan KNF akan sebaliknya, semuanya yang disebut di atas akan menjadi tinggi.



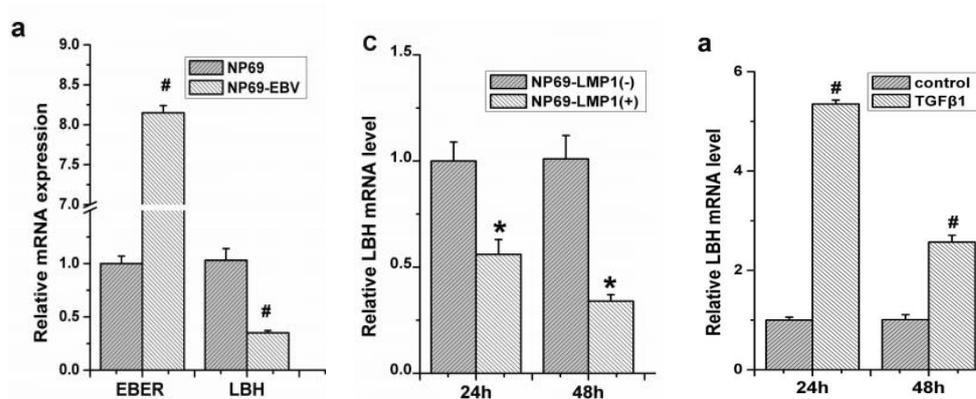
Gambar 2.8 Kadar LBH pada KNF dibandingkan tikus kontrol

(Qicai & Xiaoying, 2015)



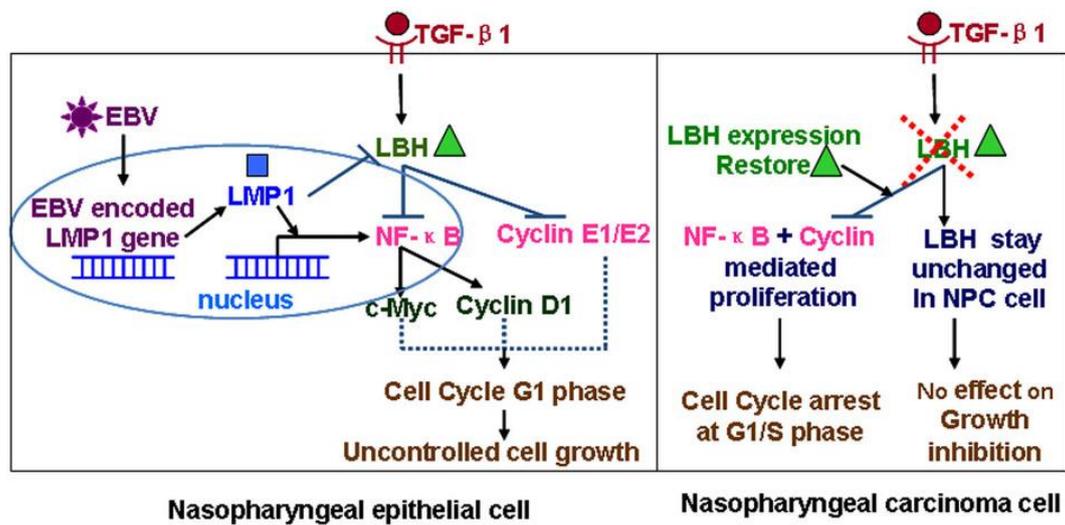
Gambar 2.9

Xiaoying Guan Dan Qicai Liu serta teman-temannya juga meneliti secara in vitro pada sel khusus yang disebut sel NP69. Sel tersebut kemudian diinduksi dengan EBV. Hasilnya dapat dilihat sebagai berikut:



Pada gambar a. Ekspresi mRNA EBER meningkat apabila diinduksi dengan EBV, sedangkan menurun bila diinduksi LBH. Pada gambar c. Hubungan antara LBH mRNA dengan LMP dapat dikatakan bahwa level LBH menurun 48 jam setelah ekspresi LMP1. Pada gambar a2. Level mRNA LBH tinggi akan menginduksi TGF-β1 untuk naik pula dan tidak berlaku sebaliknya.

Dari beberapa hasil penelitian ini maka dapat dibuat bagan patogenesis antara hubungan EBV dengan LBH:



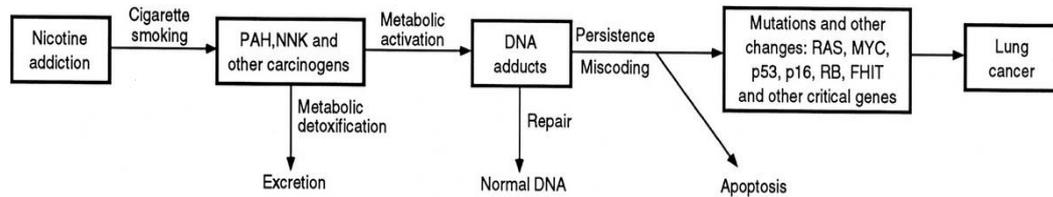
Gambar 2.10 Patogenesis EBV berhubungan dengan LBH

KNF karena lingkungan

Pada sebuah studi meta analisis berjudul “*Tobacco smoking and cancer*” oleh Gandini 2008, dikatakan bahwa pada orang yang merokok, tempat yang paling sering muncul keganasan ialah paru, laring, dan faring; kemudian baru disusul oleh saluran pencernaan atas dan juga mulut. Tobacco memiliki sekitar 4200 bahan kimia. Terekspos terhadap berbagai bahan karsinogen setiap harinya sebanyak lebih dari 30 batang per hari meningkatkan risiko KNF. Setelah diteliti, pada pasien yang menderita KNF akibat merokok ternyata terjadi perubahan abnormal pada kromosom 8q24.

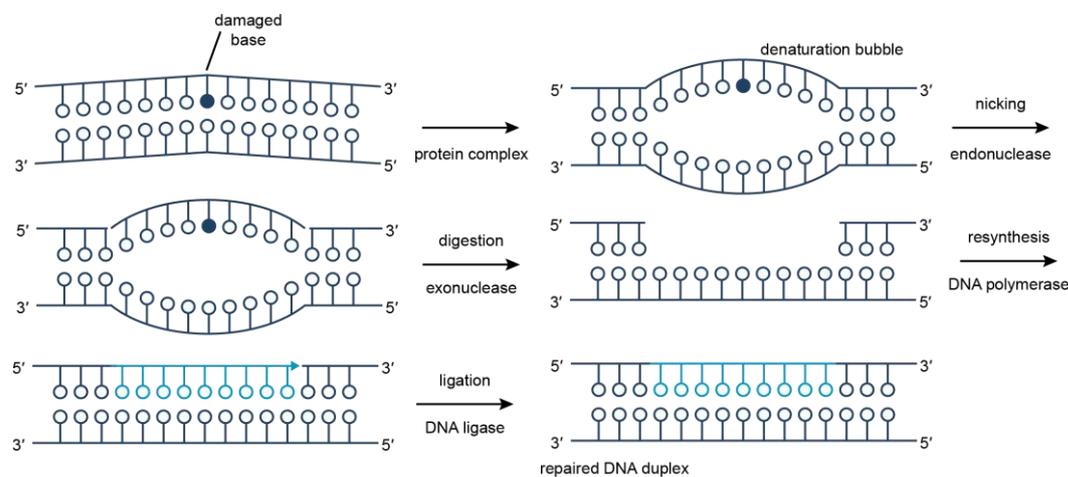
Sampai saat ini penelitian patofisiologi secara molekular untuk merokok menyebabkan KNF belum terbukti Murdiyo mengatakan tidak didapatkan hubungan bermakna antara riwayat merokok dengan terjadinya mutasi *N-ras*, *Hras* dan *p53*. Tidak ada perbedaan bermakna rata-rata jumlah, lamanya dan paparan kumulatif rokok antara subjek yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi *N-ras*, *H-ras* dan *p53* (Murdiyo, Sunihapsari, & Rahaju, 2013). Penelitian yang sudah ada yakni merokok menyebabkan pada kanker paru. Pada sebuah penelitian yakni dari seorang profesor di Oxford tahun 1999, ada dua senyawa pada asap rokok yang menginduksi terjadinya kanker paru yakni polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) dan nitrosamine (NNK).

Proses terjadinya kanker paru sebagai gambar berikut:



Gambar 2.11 Patofisiologi kanker paru akibat merokok

Banyak produk metabolit dari P450 bereaksi dengan DNA atau molekul-molekul makro lain membentuk produk ikatan kovalen yang disebut sebagai *adducts*. Proses DNA repair sangatlah penting untuk menentukan apakah terdapat DNA *adducts*. Karena merokok adalah kebiasaan yang kronik, keseimbangan pada level *adducts* DNA hanya dapat dicapai apabila perbaikan DNA lebih besar dari pada kerusakan yang terjadi. Ada 3 mekanisme dalam perbaikan DNA, yakni: *Direct repair*, *base excision repair* dan *nucleotide excision repair*. Pada PAH, jenis perbaikan yang dialami ialah *nucleotide excision repair*.



Gambar 2.12 *nucleotide excision repair*. (Stephen, 1999)

Baik merokok atau ikan asin kas masakan Conton (China Selatan), keduanya mengandung kadar nitrosamine yang tinggi di mana merupakan faktor karsinogen pemicu KNF. Beberapa studi telah menyatakan terdapat asosiasi antara ikan asin terhadap KNF, yakni terekspos nitrosamin pada usia muda menaikkan persentase sebanyak 2,6 kali menjadi KNF. KNF terkait dengan 2 faktor secara genetik, yakni faktor yang mempengaruhi kerusakan DNA dan perbaikannya serta hubungan sistem imun dengan EBV. Berbagai macam bentuk gen berpengaruh dalam aktivasi nitrosamin

menjadi menengah reaktif dalam merusak DNA atau dalam memperbaiki kerusakan DNA dalam perkembangan menuju KNF. Gen itu antara lain CYP2E1, XRCC1 dan hOGG1 disugesti sebagai faktor risiko KNF. Faktor imun juga diasosiasikan terhadap KNF, yakni antigen leukosit (HLA) bertanggung jawab dalam mempresentasikan virus EBV ke imun sistem. (Lori, Srikumar, & al, 2006) Dalam penelitian ini berbagai macam gen diperiksa akan lokasi dan abnormalitasnya. Hasilnya adalah sebanyak 93% jalur perbaikan DNA diekspresi secara berlebih pada tumor dibandingkan dengan spesimen normal. Sedangkan pada jalur nitrosamine pasien KNF, 100% hasil ekspresinya di bawah dari orang normal. Kromosom 4 dan 14 dinilai menghasilkan ekspresi yang berbeda dari normalnya. Diketahui bahwa kromosom 4 (62% ekspresi rendah dan 38% tinggi) dan kromosom 14 (100% ekspresi rendah dibandingkan normal). Sebenarnya persentase perbaikan DNA diekspresi secara berlebih menandakan respon yang tidak begitu bagus, sebab hal itu menandakan perbaikan DNA gagal berkali-kali dan DNA terus-menerus mencoba memperbaikinya. (Yi, et al., Nasopharyngeal carcinoma treated by radical radiotherapy alone: ten-year experience of a single institution, 2006) (Wolff, et al., 2010)

KNF secara genetik Sebuah penelitian genetik sebagai faktor risiko KNF tahun 2014 oleh Xiuchan Guo dan rekan-rekannya memperdalam tentang studi yang mengatakan tentang gen HLA. Xiuchan setuju dengan HLA sebagai faktor risiko, tetapi dalam penelitiannya ia menambahkan bahwa terdapat genome wide association studies (GWAS). Grup ini diasosiasikan terhadap kromosom 6 yakni HLA-A, HLA-F, gen GABBR1, dan HCG9. Penelitiannya menggunakan serum EBV/igA/VCA dan EA untuk menentukan bahwa orang yang diteliti memiliki KNF atau tidak. (Chang & Adami, 2006) (Xiuchan, Winkler, Li, & al, 2014) Lalu ditanyakan tentang riwayat KNF dari 3 generasi di keluarga, pola diet, kebiasaan merokok, ekspos terhadap kayu bakar, dan pekerjaan. Untuk pola diet, ditanyakan frekuensi konsumsi makan ikan asin dan makanan daging kaleng (>3 x/ bulan atau <3x/ bulan), dan masih banyak kriteria inklusi dan eksklusi pada penelitian ini.

Dalam penelitiannya, ada beberapa tujuan yang ingin dikemukakan, yakni:

1. Untuk meningkatkan keakuratan diagnosis KNF secara genetik
2. Menentukan apakah benar faktor genetik tersebut menyebabkan KNF
3. Apakah serum IgA merupakan diagnosis yang akurat

Xiuchan dan teman-temannya telah meneliti gen yang paling berperan sebagai penyebab KNF yakni HCG-rs9260734 bukan HLA-A walau keduanya sama-sama tinggi hasil tes SNP. Akan tetapi setelah dibandingkan dengan EBV/IgA/VCA/EA ternyata spesifisitasnya hanya 9,3% dan keakuratannya dibawah 50%.

The diagnosis performance of IgA/VCA and IgA/EA and genetic signature

Test	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
EBV/IgA/VCA	95.7	56.9	69.8
EBV/IgA/EA	68.6	97.5	87.9
HCG9-rs9260734	95.6	9.3	38.0

Gambar 2: 13

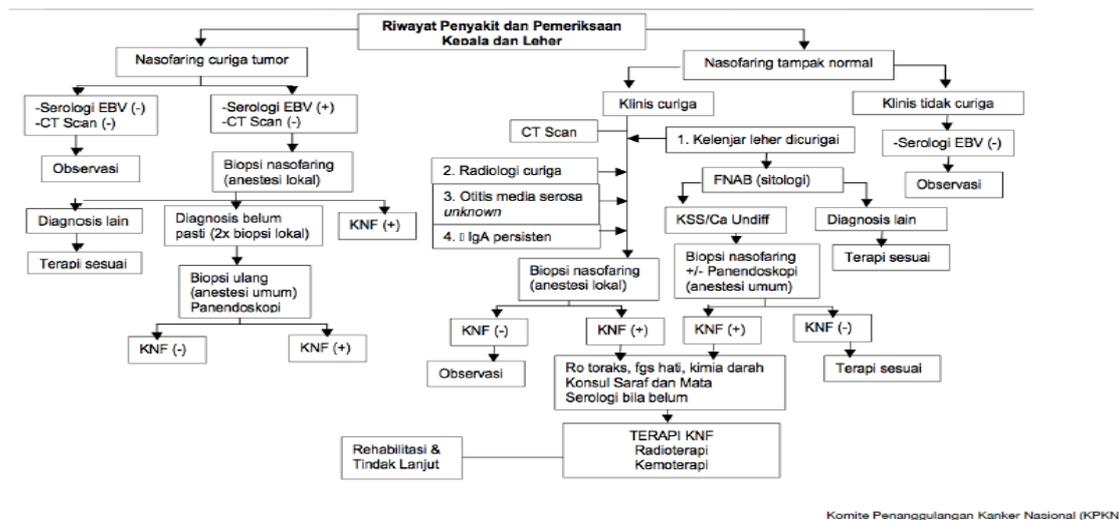
Note: the threshold for IgA/VCA is 1 : 10 and for IgA/EA is 1 : 5.

Konklusi dari pada studi penelitiannya bahwa gabungan EBV IgA antibodi dengan genetik *markers* tidak terlalu berguna dalam mendiagnosis prognosis dari KNF. Selain itu mereka mengatakan faktor-faktor genetik berdiri secara independen terhadap faktor risiko lingkungan dalam menyebabkan KNF.

2.1.4 Diagnosis KNF

Diagnosis KNF ditegakkan berdasarkan riwayat penyakit dengan gejala dan tanda serta pemeriksaan histopatologi.

Algoritma Diagnosis KNF menurut Panduan Nasional Penanggulangan Kanker 2015



Gambar 2.14 Algoritma penanganan kanker nasofaring

Penentuan stadium KNF berdasarkan klasifikasi TNM oleh UICC (*Union Internationale Contre Cancer*) edisi V adalah :

T menggambarkan keadaan tumor primer, besar dan perluasannya

T1 : Tumor terbatas pada nasofaring

T2 : Tumor meluas ke orofaring dan atau fosa nasal

T2a : Tanpa perluasan ke parafaring

T2b : Dengan perluasan ke parafaring

T3 : Invasi ke struktur tulang atau sinus paranasal

T4 : Tumor meluas ke intrakranial dan atau mengenai saraf otak, fosa infra temporal, hipofaring atau orbita

N menggambarkan keadaan kelenjar limfe regional

N0 : Tidak ada pembesaran kelenjar

N1 : Terdapat pembesaran kelenjar ipsilateral < 3 cm

N2 : Terdapat pembesaran kelenjar bilateral < 6cm

N3 : Terdapat pembesaran kelenjar > 6 cm atau ekstensi ke supraklavikular

M menggambarkan metastasis jauh

M0 : Tidak ada metastasis jauh

M1 : Terdapat metastasis jauh

Berdasarkan TNM tersebut diatas, stadium KNF dapat ditentukan sebagai berikut :

Stadium I : T1, N0, M0

Stadium IIA : T2a, N0, M0

Stadium IIB : T1, N1, M0 ; T2a, N1, M0 atau T2b, N0-1, M0

Stadium III : T1-2, N2, M0 atau T3, N0-2, M0

Stadium IVA : T4, N0-2, M0

Stadium IVB : Tiap T, N3, M0

Stadium IVC : Tiap T, Tiap N, M1(9)

2.1.5 Tatalaksana KNF

Tatalaksana KNF sangat bervariasi, ditentukan oleh staging dari KNF itu sendiri. Sistem staging yang digunakan untuk KNF dibuat oleh *American Joint Committee on Cancer*, berdasarkan pada sistem TNM. T menyatakan penilaian terhadap tumor primernya, N menyatakan penilaian terhadap persebaran tumor menuju nodus limfatik regional, sedangkan M menyatakan ada atau tidaknya metastasis jauh dari jaringan tumor. Beberapa terapi yang dapat diberikan kepada pasien KNF adalah sebagai berikut:

Radioterapi adalah modalitas terapi pertama yang dipilih untuk pengobatan KNF meskipun nantinya masih dibutuhkan terapi *adjuvant* untuk pelengkap. Meskipun Radioterapi dikatakan sebagai modalitas terbaik untuk pasien KNF fase awal (meskipun tanpa kemoterapi), bukan berarti metastasis tidak akan terjadi. (PubMed Health Nasopharyngeal Cancer Treatment September 25, 2015)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032845/>

Radioterapi yang diberikan kepada pasien akan berbeda berdasarkan staging yang dimiliki oleh pasien.

Pembagian tersebut meliputi :

Stadium 1

Radioterapi yang diberikan untuk pasien dengan stadium 1 ini adalah Radioterapi untuk tumor atau KNF sendiri dan nodus limfa di leher. Stadium 1 ini adalah tingkatan dimana KNF memiliki lokalisasi yang baik sehingga Radioterapi saja sudah cukup untuk stadium ini (tanpa adjuvant). Radiasi akan dilaksanakan 5 hari dalam 1 minggu selama 7 minggu dengan dosis terapi 66-70 Gy. Suatu penelitian mengatakan bahwa Radioterapi yang dilakukan pada saat stadium 1 (tanpa bantuan kemoterapi) memiliki bukti *10 years survival rate* sebesar 98%.

Stadium 2

Untuk stadium 2, Radioterapi yang digunakan sama dengan pada pasien untuk stadium 1. Hal yang berbeda adalah penggunaan kemoterapi untuk terapi adjuvant atau terapi tambahan. (PubMed Health Nasopharyngeal Cancer Treatment September 25, 2015)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032845/>

Stadium 3

Radioterapi untuk KNF stadium 3 sama dengan stadium 2 dengan tambahan pembedahan kanker yang ada di leher yang melibatkan nodus limfa. Kemoterapi yang diberikan sebelum, saat, dan sesudah Radioterapi.

Stadium 4

Stadium 4 telah melibatkan metastasis kanker ke daerah yang jauh. Terapi yang diberikan kepada pasien KNF stadium 4 sama dengan stadium 3 dengan tambahan kemoterapi untuk daerah metastasis.

Melihat guideline yang dikeluarkan oleh NIH di atas, dapat dikatakan bahwa Radioterapi menjadi pilihan utama dalam pengobatan KNF. Radioterapi terbukti lebih efektif dibandingkan terapi pembedahan baik bersama dengan adjuvant kemoterapi maupun tidak. Meskipun KNF paling banyak terjadi pada daerah nasofaring tersendiri, penggunaan Radioterapi tidak terbatas pada nasofaring. Beberapa daerah di sekitar nasofaring harus juga mendapatkan Radioterapi untuk mengatasi adanya ekspansi KNF pada jaringan lunak.

Daerah	Keterangan
Nasofaring	Daerah utama karsinoma
Bagian posterior cavum nasalis	Sejauh 2 cm
Bagian posterior sinus ethmoidalis	
Sinus sphenoid	
Tulang basis occipitalis	
Sinus kavernosus	
Basis kranii	Termasuk foramen ovale, kanal karotis, foramen spinosum lateral
Fossa pterigoid	
Posterior sinus maxillary ketiga	
Dinding orofaring hingga fossa midtonsiliar	
Nodus retrofaringeal	
Nodus pada leher bilateral	

Radioterapi yang dilakukan untuk terapi KNF menggunakan pesawat *kobalt 60*. Pesawat kobalt 60 merupakan suatu isotop buatan yang memancarkan radiasi sinar

gamma (γ) dengan harga yang relatif murah. Pesawat ini memiliki enersi sebesar 1,17 dan 1,33 *Mega Elektron Volt (MEV)* dan sering digunakan untuk terapi (Radioterapi) kanker yang terletak dipermukaan tubuh antara lain payudara, ekstremitas dan kepala-leher. Perkembangan dibidang radiasi eksterna semakin pesat yaitu sejak diciptakannya pesawat Radioterapi modern dengan energi lebih tinggi yang disebut *Linier Accelerator (Linac)*. Pesawat ini mempunyai kemampuan menghasilkan sinar foton (sinar X) dan elektron. Radioterapi KNF menggunakan pesawat Linac dengan tenaga 4 atau 10 MegaVolt dipandang lebih baik karena mempunyai daya tembus tinggi, memberikan batas tepi lapangan radiasi yang amat tegas dan daya hambur yang minimal sehingga tanpa atau sedikit sekali menimbulkan kelainan kulit. Perkembangan Radioterapi semakin baik lagi dengan ketemukannya CT scan. Dibandingkan sebelumnya hasil Radioterapi dengan bantuan CT scan jelas lebih baik karena lokasi dan perluasan tumor akan tampak dalam 2 dimensi sehingga Radioterapi yang diberikan lebih terarah. Terapi radiasi dengan bantuan CT scan (2 dimensi) ini disebut *2 dimensional radiation therapy (2 DRT)*. Dengan teknik 2 dimensi, lokal kontrol Radioterapi sebesar 80% dan overall survival pada Radioterapi sebesar 85% pada stadium I dan II, 55% pada stadium III dan IV.

Akan tetapi, dapat juga digunakan alat akselerator linier untuk terapi awal KNF. Terapi ini ditembakkan ke bagian yang telah dituliskan di tabel atas. Pada intinya, daerah yang harus terpajan Radioterapi adalah bagian nasofaring, ruang parafaringeal, aliran getah bening, hingga bawah klavikula. Semua daerah ini harus terpajan, meskipun belum terjadi pembesaran pada kelenjar getah bening. Radioterapi konvensional dengan 66-70 Gy diberikan dalam fraksi sebesar 2 Gy selama 7 minggu, dipakai dalam KNF.

Apabila Radioterapi eksterna di atas masih belum dapat mengurangi KNF yang terjadi, Radioterapi dapat dilakukan secara brakhiterapi. Teknik ini dapat membantu untuk lebih menyerang sel kanker yang ada. Pada Radioterapi interna atau brachiterapi, sumber energi diletakkan di dalam tumor atau berdekatan dengan tumor di dalam rongga tubuh. Cara ini juga dapat digunakan untuk kasus yang kambuh. Radioterapi yang paling baru dan mutakhir adalah *Intensified Modulated Radiation Therapy (IMRT)* yang dapat menjangkau paranasal dan mengurangi komplikasi, terutama pada daerah tiroid. Terdapat beberapa komplikasi yang terjadi pada Radioterapi untuk KNF. Komplikasi tersebut antara lain dapat terjadi pada:

- Hipopituari primer atau sekunder
- Nekrosis otak (jarang)
- Hipotiroid. Namun, hal ini dibantah oleh studi yang membuktikan bahwa hipertiroid dan grave's disease juga dapat terjadi pada komplikasi Radioterapi KNF. Namun demikian, mekanisme yang untuk terjadinya komplikasi ini masih belum diketahui.
- Gangguan pada pertumbuhan dan pematangan tulang
- Lemas secara keseluruhan dan pada ekstremitas (Hussey D. H., 2006)
- Komplikasi pada medulla spinalis dan batang otak (komplikasi ini dapat direduksi dengan IMRT)
- Fibrosis pada otot pterigoid
- Kelumpuhan pada nervus IX hingga nevus XII
- Komplikasi pada mata seperti neuritis optik.

Radioterapi pada karsinoma nasofaring

Pilihan utama terapi KNF adalah Radioterapi karena sel-sel kanker radiosensitif sedangkan terapi pembedahan sulit dilakukan karena letak anatominya dan berdekatan dengan basis otak. Pengobatan KNF dengan radiasi menggunakan sinar gamma dimana efek sinar pada sel berupa kerusakan DNA sel sehingga sel tumor mati.

Faktor-faktor yang mempengaruhi respon KNF terhadap radiasi antara lain : keadaan umum, sistem imun, kadar hemoglobin, derajat defferensiasi, jenis histopatologi dan dosis radiasi. Keadaan umum penderita saat radiasi menentukan respon sel tumor terhadap radiasi. Kadar hemoglobin rendah akan mempengaruhi oksigenasi sel kanker dimana sel kanker yang mengalami hipoksik akan berkurang respon radiasinya menjadi radioresisten. Jumlah leukosit juga akan berpengaruh terhadap sistem pertahanan tubuh, sehingga tubuh kurang mampu untuk melindungi paparan dari luar baik itu berupa antigen maupun bakteri.

Pesawat Cobalt 60 merupakan isotop buatan yang memancarkan sinar γ . Radioterapi sinar γ diberikan beberapa kali dengan dosis terbagi (fraksinasi) yaitu Radioterapi dosis 200 cGy setiap fraksi pemberian 5 kali seminggu selama 6 - 7,5 minggu. Dosis untuk eradikasi tumor tergantung dari banyaknya sel kanker dan besarnya tumor. KNF stadium dini (T1-T2) dapat diberikan dosis 200-220 cGy per fraksi, 5 kali seminggu tanpa istirahat sehingga mencapai dosis total 6000-6600 cGy

selama 7 minggu. Sedangkan KNF dengan ukuran tumor yang lebih besar (T3 dan T4) dianjurkan diberikan dosis total Radioterapi yang lebih tinggi yaitu 7000-7500 cGy.

Booster diberikan dengan Radioterapi interna bila masih didapatkan residu tumor di nasofaring. Area penyinaran diperkecil hanya pada tumor di nasofaring saja sebesar 1000 – 1500 cGy sehingga mencapai dosis total 7500-8000 cGy.

Efek radiasi pada sel dan keadaan sistemik

Radiasi yang diberikan sebagai diagnostik maupun terapi akan berpengaruh pada sel dan keadaan sistemik. Sinar gamma akan menimbulkan berbagai efek fisik, kimia dan biologi apabila melintasi sel.

Di bawah ini akan dibahas kedua efek tersebut :

Efek radiasi pada sel

Radiasi terhadap sel menimbulkan serangkaian proses pada sel yang dapat dibagi menjadi tiga fase

Fase fisika Interaksi sinar gamma dengan atom penyusun sel atau jaringan terjadi pada fase ini, akibatnya satu atau lebih elektron di lintasan luar (*orbital electron*) terlepas atau terjadi ionisasi dan mengeluarkan atom atau molekul yang berenergi besar (*excitation*). Elektron yang lepas akan mengionisasi dan mengeksitasi atom atau molekul lain yang ada di sekitarnya bila masih mempunyai cukup energi. Rantai ionisasi tersebut akan berlangsung sampai energi elektron lemah dan berhenti berinteraksi.

Fase kimia Reaksi antar atom atau molekul yang terionisasi dan tereksitasi dengan komponen seluler lainnya secara reaksi kimia terjadi pada fase ini. Ionisasi dan eksitasi mengakibatkan putusannya ikatan kimia molekul dan menghasilkan molekul radikal bebas. Radikal bebas sangat reaktif, akan menyebabkan reaksi berantai dan berhenti bila telah terjadi keseimbangan elektron. Reaksi berantai radikal bebas berlangsung selama 1 milisecon sejak dilakukan radiasi. Kompetisi antara *scavenging reactions* yaitu menginaktifkan radikal bebas dan *fixation reactions* atau reaksi yang membuat molekul biologis menjadi stabil juga terjadi dalam fase ini.

Fase biologi Fase ini mencakup semua proses kelanjutan dari fase sebelumnya yaitu perbaikan semua struktur kimia yang rusak dimana masih bisa diperbaiki atau menjadi mati, proses perbaikannya melalui reaksi enzimatik.

Selain proses di atas, akibat radiasi pada molekuler akan terjadi pemecahan beberapa senyawa, antara lain :

Air

Air merupakan komponen terbesar penyusun sel, dengan demikian sebagian besar proses ionisasi radiasi terjadi pada molekul air. H₂O akan terionisasi menjadi radikal bebas hidrogen (H[•]) dan radikal hidroksil (OH[•])



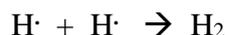
Hidrogen dan hidroksil bukan ion, masa hidupnya pendek dan merupakan radikal yang sangat reaktif. Ionisasi berarti memecah ikatan kovalen senyawa dimana akan terjadi kekosongan elektron di orbitnya, sehingga menjadikan atom netral. Atom netral akan mencari atom lain untuk mengisi kekosongan elektron yang ada di orbitnya.

Efek selanjutnya radikal hidrogen dan hidroksil sangat tergantung kepada *linier energy transfer* (LET) yang dimiliki oleh kedua partikel tersebut. Radikal hidrogen dan hidroksil akan bereaksi membentuk :

Pertama, kembali bergabung menjadi air.

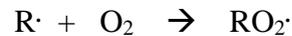


Kedua, dua atom hidrogen akan membentuk gas hidrogen dan hidroksil dan bergabung menjadi hidrogen peroksida.



Kedua reaksi ini tergantung pada LET kedua partikel. Hidrogen peroksida merupakan oksidan toksik yang akan menyebabkan peroksidasi PUFA terutama dalam membran sel, yang akan berakibat rusaknya membran sehingga menyebabkan kematian sel, selain membran, senyawa yang terdapat dalam sel juga akan mengalami oksidasi seperti glutathion, merusak enzim katalase dan peroksidase. Akibat lain dari rantai reaksi akan membentuk radikal hidroksil baru.

Oksigen Oksigen merupakan sumber radikal bebas oksigen reaktif. Oksigen juga mempunyai afinitas tinggi terhadap radikal bebas ($R\cdot$) yang terjadi akibat radiasi dan interaksi antara keduanya akan menghasilkan produk yang dapat menimbulkan kerusakan molekul lebih parah.

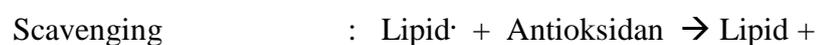
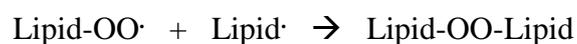
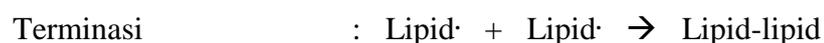
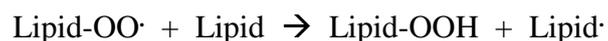
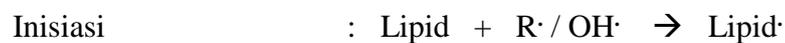


$RO_2\cdot$ melakukan reaksi berantai sampai akhirnya terbentuk $ROOH$.

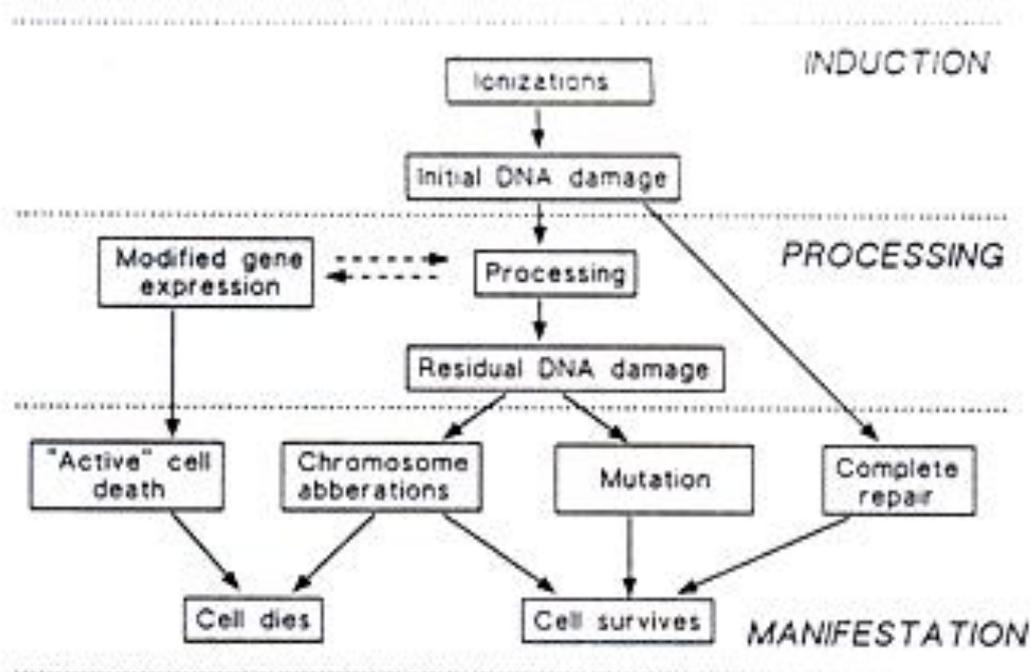
DNA Radiasi sinar gamma dapat menimbulkan kerusakan pada rantai helix molekul DNA baik secara langsung maupun tidak langsung. Kerusakan DNA karena radiasi berkaitan siklus sel, terdapat 4 fase dalam siklus proliferasi sel, yaitu ; fase G1 (fase pertumbuhan) yang dimulai dari mitosis (M) sampai ke sintesis (S), pada fase ini terjadi persiapan sintesis DNA. Fase G2 (pertumbuhan 2) dimana fase ini terjadi setelah pembentukan DNA sampai mitosis, pada fase mitosis ini ditemukan banyak DNA sehingga waktu atau fase ini merupakan radiosensitif, sedangkan fase S paling radioresisten karena fase ini saat reparasi DNA. Perbaikan sel dilakukan melalui beberapa mekanisme yaitu siklus sel berhenti pada fase G1, fase S menurun (sintesis DNA), menurunnya proses mitosis terjadi setelah 2 jam radiasi, berlangsung selama 8 jam dan menghilang setelah 15 jam, berhentinya sel melakukan mitosis merupakan waktu untuk perbaikan kerusakan.

Polyunsaturated fatty acid (PUFA)

Efek radiasi pada PUFA terjadi secara langsung maupun tidak langsung melalui interaksi dengan radikal bebas. PUFA merupakan komponen terbesar molekul penyusun membran sel. Peroksidasi PUFA dapat mengakibatkan gangguan fungsi sel bahkan dapat melisis sel.



Efek radiasi pada tingkat molekuler adalah kerusakan DNA. Kerusakan yang terjadi pada *single strand break* atau *double strand break* rantai DNA, perubahan atau kehilangan basa pembentuk DNA dan terjadinya reaksi silang antara DNA dengan protein kromosom. Kerusakan yang terjadi diikuti oleh proses reparasi baik secara sempurna maupun sebagian. Kerusakan ini dikenal sebagai efek langsung, sementara itu efek tidak langsung terjadi akibat terjadinya ionisasi molekul air, lipid dan protein yang akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas dan oksidan. Radikal bebas dan oksidan ini merupakan senyawa yang paling destruktif pada sel. Proses fisika dan kimia radiasi ini akan mengakibatkan terjadinya proses biokimia dan interaksi biologi berkelanjutan pada intrasel dan ekstra sel dengan akibat kerusakan sel dan jaringan.



Gambar 2.13 Proses ionisasi sel oleh paparan radiasi yang akan mengakibatkan kematian sel (diambil dari McMillan TJ and Steel GG)

Efek radiasi pada keadaan sistemik

Efek yang timbul setelah pemberian radiasi tergantung dari sensitifitas individual organ dan efek seluler dari radiasi. Dua fase respon organ terhadap radiasi yaitu perubahan cepat dan lambat morfologi organ. Perubahan organ secara umum dapat terjadi pada sistem hemopoetik. Sel-sel hemopoetik dibagi menjadi 3 kategori, sebagai dasar untuk memahami arti radiosensitif. Ketiga kategori tersebut adalah ; sel prekursor, sel

defferensiasi dan sel matur. Prekursor adalah bentuk immatur, mitosis sangat aktif untuk menggantikan sel yang mati dan sangat sensitif terhadap radiasi. Sel differensiasi berasal dari sel prekursor yang mempunyai ciri dan fungsi spesifik dimana masih terjadi pembelahan sel aktif dan sensitif terhadap radiasi. Sel matur adalah sel yang sudah menjalankan fungsinya secara optimal, namun masih dijumpai adanya pembelahan sel tetapi sedikit, sel matur lama yang melakukan fungsinya akan bersifat radioresisten atau kurang sensitif terhadap radiasi.

Radioterapi menggunakan energi pengion dan non pengion. Pengobatan dengan radiasi dapat diberikan sendiri atau dapat juga dilakukan secara kombinasi, baik dengan pembedahan maupun kemoterapi. Radioterapi dapat diberikan pada semua jenis kanker dan stadium. Tindakan untuk membunuh sel tumor, memperkecil ukuran tumor , mengurangi nyeri dan obstruksi Dengan tujuan maksimum mengontrol tumor dengan kerusakan minimal pada jaringan normal Pemberian Radioterapi dapat berupa Sinar luar diberi dalam dosis yang disesuaikan dengan kemampuan pasien atau sinar dalam untuk tumor yang terletak pada rongga tubuh

Efek samping radiasi kulit (radiasi luar): lecet, kemerahan, kehitaman dinding mulut: sariawan/luka, nyeri, liur berkurang pencernaan: mual/muntah, diare, perdarahan, pneumonitis radiasi 1-3 bulan setelah terapi batuk,demam.

Kemoterapi pada karsinoma nasofaring

Kemoterapi adalah cara terapi dengan menggunakan obat sitostatika yang diberikan secara oral maupun intravena dengan tujuan membunuh sel kanker. Kemoterapi ini menyebar ke seluruh tubuh sehingga memiliki kemampuan membunuh sel kanker yang jauh dari tumor primernya. Vaskularisasi jaringan tumor yang masih baik, akan lebih sensitif menerima kemoterapi sebagai obat anti neoplastik. Karsinoma sel skuamosa biasanya sangat sensitif terhadap kemoterapi.

Manfaat pemberian kemoterapi adalah untuk meningkatkan penanganan secara lokoregional seperti halnya Radioterapi dan pembedahan, selain itu untuk mengurangi resiko terjadinya metastasis jauh. Kemoterapi dapat diberikan secara tunggal atau diberikan bersamaan dengan pembedahan dan Radioterapi untuk mencegah kekambuhan tumor.

Kemoterapi secara tradisional dipertimbangkan pada pemberian kemoterapi murni sebagai standar terapi untuk penderita dengan metastasis, rekuren, serta persisten setelah pengobatan lokal. Saat ini, kemoterapi dipertimbangkan sebagai komponen standar terapi bersama Radioterapi pada sebagian besar kanker yang tidak bisa dioperasi. Cara penggunaan kemoterapi ini dapat dilakukan sebagai induksi (*neoadjuvan*) yaitu kemoterapi mendahului Radioterapi atau operasi, maupun bersamaan dengan radiasi (*concomittan*) yaitu dengan memberikan kemoterapi sebagai *radiosensitizer* bersamaan dengan Radioterapi.

Kemoterapi dan Radioterapi pada prinsipnya terdapat persamaan. Keduanya bekerja pada sel yang terus tumbuh, misalnya sel tumor, sel kulit dan sel mukosa. Perbedaannya, kemoterapi mempengaruhi seluruh sistem tubuh karena diberikan secara sistemik, sedangkan Radioterapi hanya mempengaruhi bagian jaringan yang disinari.

Tiga klasifikasi terpenting kelompok sediaan kemoterapi berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu; sediaan yang menghalangi sintesis DNA, sediaan anti metabolit yang mengganggu sintesis asam nukleat, dan sediaan antibiotik anti tumor yang menghalangi sintesis DNA serta merusak inti pada fase mitosis.

Beberapa pilihan obat kemoterapi

<i>Class of drugs</i>	<i>Examples</i>
<i>Alkylating agent</i>	<i>Nitrogen mustard, cyclophosphamide, chlorambucil, melphalan, nitroureas, cisplatin</i>
<i>Antimetabolites</i>	<i>Methotrexate, 5-flourouracil, cytosine arabinoside, hydroxyurea, gemcitabine</i>
<i>Natural product</i>	
<i>Vinca alkaloids</i>	<i>Vincristine, vinblastine, vinorelbine</i>
<i>Antibiotics</i>	<i>Doxorubicin, bleomycin, dactinomycin, mitomycin C, etoposide</i>
<i>Taxanes</i>	<i>Paclitaxel, docetaxel</i>
<i>Topoisomerase I</i>	<i>Irinotecan, topotecab inhibitor</i>
<i>Hormones</i>	<i>Tamoxifen, leuprolide</i>

Kelemahan kemoterapi adalah meningkatnya efek samping pada sistem tubuh atau organ lain seperti hepar, jantung dan ginjal, serta pada organ dimana selnya selalu membelah dengan cepat secara normal. Mukosa gastrointestinal, sumsum tulang, sel-sel rambut atau sel kelenjar merupakan contoh sel yang cepat membelah sehingga kemoterapi sering menimbulkan efek samping mual, muntah, mukositis, diare, rambut rontok, anemia, trombositopeni dan lekopeni. Kondisi ini menyebabkan penundaan sementara pemberian kemoterapi, bila dipaksakan pemberian kemoterapi dapat berakibat fatal karena efek toksisitas begitu besar.

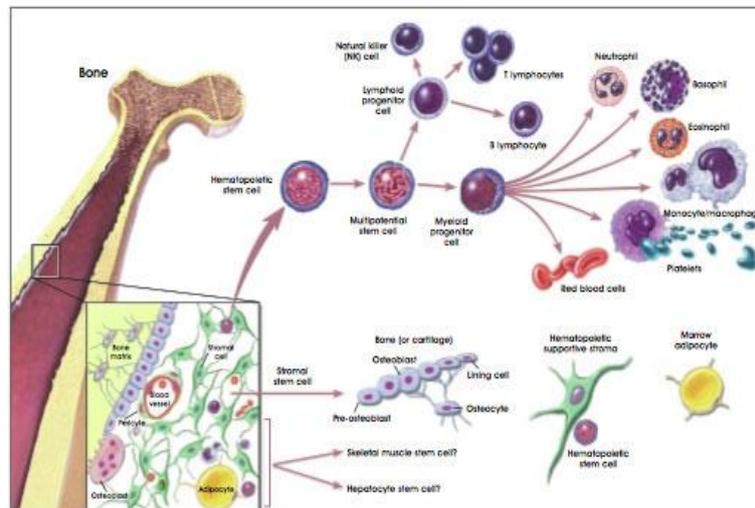
Toksitasitas obat kemoterapi terhadap organ tubuh

Nama Obat	Toksitasitas organ	Tanda & Gejala
<i>Methotrexate</i>	Gastrointestinal Sumsum tulang Hepar	Mual, muntah, mukositis dan ulserasi GI Penurunan sel darah putih (<i>severe</i>) Peningkatan kadar transaminase Fibrosis porta/sirosis
<i>5-Fluorouracil</i>	Gastrointestinal Jantung	Mual, muntah, mukositis, diare + dar Angina / Infark miokard
<i>Cisplatin</i>	Gastrointestinal Sumsum tulang Ginjal Jantung	Mual dan muntah berat Penurunan jumlah sel darah putih (<i>mild</i>) Kumulatif efek pada tubulus renal Hipomagnesemia/hipokalsemia Angina / Infark Miokard
<i>Cyclophosphamide</i>	Gastrointestinal Sumsum tulang Saluran kemih Jantung	Mual, muntah, mukositis, diare Penurunan sel darah putih (<i>severe</i>), <u>perdarahan</u> Hemorrhagi cystitis, tubular injury water Gagal jantung kongestif, Miokarditis / perikarditis
<i>Vincristine</i>	Gastrointestinal Jantung	Konstipasi, ileus Infark miokard

Dosis kemoterapi yang berpengaruh pada sel embrional darah tergantung jenis kemoterapi yang mempunyai efek samping khusus pada sumsum tulang.

Peter Barrett-Lee et. al (2005) : meneliti pengaruh kemoterapi terhadap sumsum tulang pada 274 kanker ginekologi dan 503 kanker payudara. Penurunan sistem hemopoetik mulai terjadi pada waktu kapan pun siklus kemoterapi diberikan dan kecenderungan meningkat pada akhir-akhir siklus kemoterapi. Dari 28.8% pasien yang mengalami penurunan sistem hemopoetik, mulai terjadi penurunan pada siklus I (34.7%); siklus II (63.4%), dan siklus III (75.7%) pada kanker ginekologi sedangkan pada kanker payudara mulai terjadi pada siklus I (26.2%) ; siklus II (53%), dan siklus (72.1%).

Sistem Hemopoetik

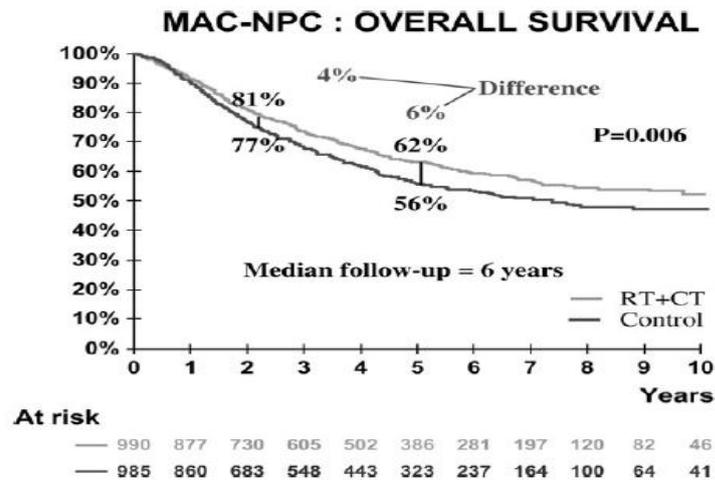


Gambar 2.14 Sistem Hemopoetik

Sistem hemopoetik terdiri dari : eritrosit, leukosit dan trombosit. Fungsi masing-masing komponen akan membuat suatu keadaan hemodinamik dari sirkulasi tubuh. Stem sel sistem hemopoetik diproduksi di sumsum tulang : sternum, tulang iga, tulang panggul, tulang belakang, tulang kepala dan mandibula serta tulang anggota gerak atas dan bawah. Berdasarkan prosentase dapat dilihat pada tabel.

Ketika berbicara kemoterapi, yang menjadi suatu pertanyaan klinis adalah seberapa besar efek kemoterapi apabila Radioterapi telah menjadi modalitas terapi utama untuk KNF. Suatu review mengatakan bahwa Radioterapi yang dikombinasikan dengan kemoterapi akan menghasilkan terapi yang lebih bagus, terutama untuk pencegahan relapse dan *survival rate* meskipun benefit secara langsung masih belum diketahui. Sebuah meta analisis membandingkan antara pasien yang diberi terapi kombinasi Radioterapi dan kemoterapi dengan kontrol Radioterapi saja. Oleh karena itu, kombinasi terapi ini sekarang menjadi *gold standar* untuk terapi KNF. Hasilnya adalah seperti pada grafik di bawah ini:

Gambar 2.15 Grafik Meta Analisis Ko



mbinasi Radioterapi dan Kemoterapi (Yi, et al., Nasopharyngeal carcinoma treated by radical radiotherapy alone: ten-year experience of a single institution, 2006)

Kemoterapi sebagai adjuvant untuk Radioterapi yang diberikan di Indonesia adalah *Cis-platinum, bleomycin, dan 5-fluorouracil*. Ketiga kemoterapi ini membuahkan hasil yang cukup memuaskan di RSCM. Namun terdapat suatu penelitian bahwa pemberian *interferon-beta* setelah dilakukan kombinasi Radioterapi dan kemoterapi ini membuahkan hasil yang lebih baik. Pada awalnya hal ini dituliskan pada *regimen NPC-91-GOPH*. Regimen ini diperuntukkan untuk anak-anak. Namun, penelitian yang baru dilakukan melakukan percobaan pada dewasa dan membuahkan hasil yang cukup memuaskan untuk pemberian *interferon-beta* ini. (Chan, 2010) Namun demikian masih terdapat efek samping yang diterima oleh pasien yang menggunakan regimen kemoterapi ini, seperti infertilitas, hipopituitari, hingga gangguan pendengaran akibat pajanan pada daerah telinga.

Terapi pembedahan

Terapi pembedahan bukan menjadi terapi lini pertama untuk karsinoma nasofaring. Terdapat alasan yang menyebutkan bahwa pembedahan tidak dapat memberikan hasil yang maksimal karena KNF menempel pada tulang tengkorak. Terapi pembedahan dilakukan pada pasien apabila benjolan leher yang diberikan Radioterapi dan kemoterapi tidak membaik atau bahkan muncul kembali. Akan tetapi terdapat beberapa syarat yaitu tumor primer tidak ada metastasis.

Terapi yang dijelaskan di atas merupakan terapi utama yang diberikan pada pasien KNF, yaitu Radioterapi, kemoterapi, dan terapi pembedahan. Terdapat terapi lanjutan untuk pasien KNF, yaitu perawatan paliatif. Perawatan paliatif ini lebih menuju pada pemberian edukasi kepada pasien akibat dari komplikasi Radioterapi dan kemoterapi. Perawatan paliatif yang utama dilakukan untuk daerah lidah pasien. Pasien dianjurkan untuk makan makanan yang berkuah, banyak minum, dan makan makanan yang cenderung asam. Hal ini untuk mengurangi keringnya lidah akibat rusaknya kelenjar air liur akibat Radioterapi. Mukositis pada rongga mulut, kehilangan nafsu makan, dan mual muntah juga mengikuti komplikasi ini. Leher yang menjadi kaku dan kepala yang sakit akibat fibrosis pada daerah sekitar setelah Radioterapi juga harus diketahui oleh pasien.

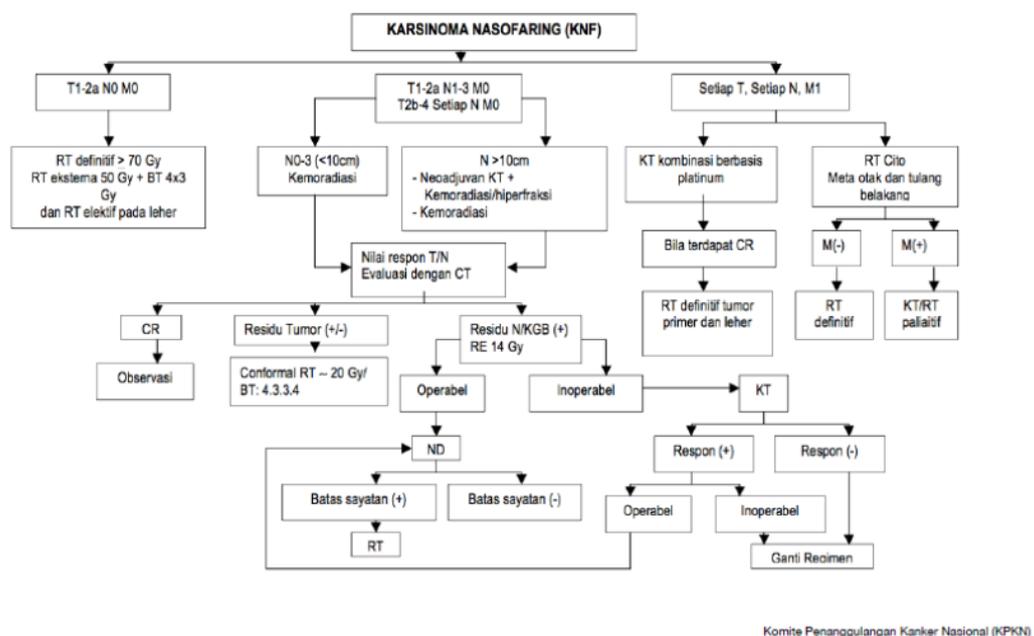
Perawatan atau terapi paliatif yang paling penting adalah terapi untuk metastasis KNF. Radiasi dan kemoterapi sangat dibutuhkan untuk menangani masalah metastasis. Radioterapi dapat mengurangi rasa nyeri yang dimiliki oleh pasien dengan metastasis. Kemoterapi yang digunakan adalah kombinasi dua regimen, yaitu *cisplatin* dan 5-FU (terapi utama) serta *gemcitabine* dan *paclitaxel*. Regimen kombinasi tiga obat atau lebih diduga tidak efektif karena menimbulkan toksisitas.

Tidak seperti keganasan kepala leher lainnya, KNF mempunyai risiko terjadinya rekurensi dan follow up jangka panjang diperlukan. Kekambuhan tersering terjadi kurang dari 5 tahun, 5-15% kekambuhan sering kali terjadi antara 5- 10 tahun. Sehingga pasien KNF perlu dilakukan follow up setidaknya dalam 10 tahun setelah terapi. Pemeriksaan periodik meliputi pemeriksaan pada nasofaring, leher, fungsi saraf cranial, dan adanya keluhan sistemik untuk menilai ada tidaknya metastasis. Pada tumor T3-T4, maka perlu dilakukan MRI nasofaring dan basis kranii setiap 6-12 bulan. Evaluasi fungsi tiroid juga diperlukan khususnya pada pasien dengan penatalaksanaan radiasi pada setelah 1, 2, 5 tahun.

Pencegahan KNF dapat dilakukan dengan memodifikasi berbagai faktor risiko yang bisa dikontrol diantaranya:

- Berhenti merokok
- Migrasi penduduk dari daerah dengan prevalensi tinggi ke daerah yang prevalensinya rendah.
- Edukasi masyarakat mengenai kebiasaan hidup sehat.
- Skerining untuk mengetahui apakah seseorang mempunyai risiko tinggi menderita karsinoma nasofaring.

Algoritma Terapi KNF menurut Panduan Nasional Penanggulangan Kanker 2015



2.1.6 Prognosis KNF

Prognosis untuk individu dengan karsinoma nasofaring dapat ditentukan oleh berbagai macam faktor seperti: stadium dari karsinoma itu sendiri, tipe dari kanker nasofaringeal, ukuran tumor, usia pasien, dan kondisi medis atau kesehatan pasien secara umum.

Penentuan prognosis ini merupakan bagian yang penting, karena dengan penentuan prognosis, seorang klinisi dapat menentukan angka bertahan hidup individu untuk 5 tahun ke depan. Penentuan angka bertahan hidup 5 tahun ini dapat ditegakkan dengan lebih baik apabila klinisi telah melihat dan mengkaji ulang seluruh riwayat pengobatan dan kondisi pasien dalam 5 tahun terakhir. Meskipun demikian, angka

bertahan hidup 5 tahun ini tidak bisa menjadi patokan utama dalam mengkaji kondisi pasien, karena dalam perjalanan penyakitnya pun, seseorang dengan karsinoma nasofaring dapat mengalami perbaikan atau perburukan secara tiba-tiba.

Berdasarkan data yang tercatat, ditemukan bahwa karsinoma nasofaring tipe 1 (karsinoma sel skuamosa) memiliki prognosis yang lebih buruk dibandingkan dengan karsinoma nasofaring tipe 2 dan 3. Hal ini disebabkan karena pada karsinoma nasofaring tipe 1, metastasis lebih mudah terjadi. Secara keseluruhan, angka bertahan hidup dalam lima tahun adalah 45%. Prognosis dapat diperburuk oleh beberapa faktor seperti: stadium yang lebih lanjut, usia lebih dari 40 tahun, jenis kelamin (laki-laki lebih buruk dibandingkan dengan wanita), Ras Mongoloid (Cina) lebih buruk apabila dibandingkan dengan ras kulit putih, adanya pembesaran kelenjar leher, adanya kelumpuhan saraf otak, adanya kerusakan tulang tengkorak, adanya metastasis jauh.

Berdasarkan data dari AJCC Cancer Staging Manual yang dirilis pada tahun 2010, angka 5 tahun bertahan hidup pada pasien dengan karsinoma nasofaring stadium I dapat mencapai angka 72%, stadium II mencapai 64%, stadium III mencapai 62%, sedangkan pada pasien dengan karsinoma nasofaring stadium IV, presentasi angka 5 tahun bertahan hidup hanya mencapai 38%. Berdasarkan data yang ada di Indonesia, pasien karsinoma nasofaring juga memiliki perbedaan prognosis yang mencolok pada stadium awal dan stadium lanjut. Pada stadium I memiliki angka harapan hidup lima tahun presentasi 76.9%, stadium II 56%, stadium III 38.4%, dan stadium IV hanya mencapai angka 16.4%.

2.2 Protein 53 (p53)

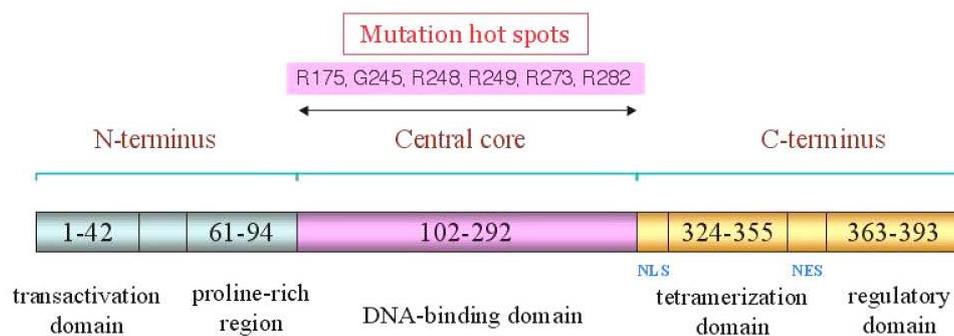
Protein 53 atau p53 merupakan suatu polipeptida yang diekspresikan atau dikode oleh gen p53 yang berperan dalam menjaga keutuhan sel atau integritas genom melalui proses transkripsi dan translasi. Dahulu diduga bahwa protein 53 merupakan suatu onkogen karena ditemukan secara berlebihan dalam sel-sel yang mengalami transformasi. Dugaan ini muncul karena pada beberapa penelitian telah diisolasi beberapa klon p53 yang terbukti mampu mempertahankan sel dalam kultur hidup terus (immortal) dan dengan bekerja sama dengan onkogen ras, p53 meningkatkan terjadinya transformasi sel dalam kultur. Namun kemudian diketahui bahwa p53 yang terdapat dalam sel-sel yang mengalami transformasi itu merupakan bentuk mutan dari p53. Dari penelitian lain lanjutan menunjukkan bahwa p53 normal (wild type) menekan transformasi sel yang disebabkan onkogen dalam kultur dan dapat menghambat potensi pembentukan sel tumor pada

binatang percobaan, sehingga p53 kemudian digolongkan sebagai gen suppressor. (Feng, Zang, Levine, & Jin, 2005)

Gen p53 tersebut merupakan suatu gen penekan tumor atau supresor tumor. Pada awalnya, p53 diperkirakan sebagai suatu onkogen oleh karena ditemukan dalam jumlah yang berlebihan atau overekspresi pada sel-sel yang mengalami keganasan. Penelitian terhadap p53 menunjukkan bahwa p53 dapat diisolasi dari sejumlah klon yang terbukti mampu mempertahankan sel kultur agar tetap hidup. Kemudian diketahui bahwa p53 yang terdapat dalam sel tersebut merupakan bentuk mutan dari p53. Penelitian berikutnya terungkap bahwa p53 mampu menghambat pertumbuhan sel yang disebabkan oleh onkogen dan dapat menghambat potensi tumorigenik sel pada binatang. Hal tersebut membuktikan bahwa p53 merupakan suatu gen supresor tumor.

2.2.1 Struktur p53

p53 merupakan suatu nuklear fosfoprotein yang memiliki berat molekul sebesar 53 kilo Dalton (kDa). Protein ini dikode oleh 20 kilobasa (kb) gen yang mengandung 11 ekson dan 10 intron, terletak pada bagian lengan pendek dari kromosom 17. p53 mengandung sebanyak 393 asam amino dan terdiri dari beberapa struktur atau komponen penting yang dapat dilihat pada gambar 2.2.1



Gambar 2.2. 1 Struktur skematik dari protein p53

Bagian N-terminal mengandung daerah domain terminal amino, yaitu residu 1 sampai 42 dan daerah yang memiliki asam amino prolin yang tinggi atau *proline-rich region*, yaitu residu 61 sampai 94 dengan urutan sekuen PXXP yang berulang, di mana X adalah asam amino. Selain itu, terdapat sebuah daerah domain inti sentral atau *central core*, yaitu residu 102 sampai 292 dan daerah domain C-terminal, yaitu residu 324

sampai 393. Bagian C-terminal tersebut dapat dibagi menjadi dua bagian, yaitu daerah yang mengandung domain oligomerisasi atau tetramerisasi, pada residu 324 sampai 355 dan domain regulasi pada terminal karboksil, merupakan daerah dasar yang kuat pada residu 363 sampai 393. Daerah domain terminal asam amino digunakan untuk aktivitas transaktivasi dan interaksi dengan berbagai macam faktor transkripsi, meliputi asetiltransferase dan *Murine Double Minute 2* (MDM2). Daerah yang kaya akan prolin memainkan peranan penting dalam stabilitas dari p53 yang diregulasi oleh MDM2 tersebut, di mana p53 menjadi lebih rentan terhadap degradasi oleh MDM2 jika daerah yang kaya akan prolin tersebut dihilangkan. Sehingga, MDM2 merupakan suatu protein yang berperan khusus dalam menghancurkan protein p53. Bagian domain inti sentral dari protein p53, terutama dibentuk oleh ikatan *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), di mana merupakan dominan yang dibutuhkan dalam sekuen ikatan DNA spesifik yang terdiri dari dua buah kopi rantai 5'-PuPuPuC(A/T)-(T/A)GPyPyPy-3'. Pada bagian C-terminal dari p53 juga berfungsi sebagai domain regulasi negatif yang memiliki fungsi untuk menginduksi proses kematian sel atau apoptosis dan mengatur kemampuan domain *binding DNA* inti sebagai bentuk yang laten. Apabila interaksi antar C-terminal dan domain *binding DNA* inti diputus atau dihilangkan oleh modifikasi pascatranslasi, seperti proses fosforilasi dan asetilasi, domain *DNA binding* akan menjadi teraktivasi, sehingga akan menginduksi terjadinya aktivitas transkripsi

Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa mayoritas mutasi terhadap p53 yang ditemukan dalam berbagai keganasan berupa *missense mutation* dan sebagian besar terletak pada domain *DNA binding* inti. Penelitian lainnya terhadap p53 yang dimasukkan ke dalam sel kanker yang sebelumnya telah kehilangan fungsi p53 secara endogen, ternyata dapat memperkecil proses pembentukan tumor atau tumorigenesis. Namun, sebaliknya adanya pemberian mutan p53 dapat memperbesar proses tumorigenesis. Beberapa mekanisme inaktivasi fungsi p53 dalam berbagai keganasan dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.2 Mekanisme Inaktivasi Gen p53

Mekansime inaktivasi gen p53	Efek inaktivasi
Mutasi perubahan asam amino pada domain <i>DNA binding</i>	Menghalangi p53 dari binding pada deret DNA spesifik dan mengaktifkan gen didekatnya
Delesi karboksil terminal domain	Menghalangi pembentukan tetramer p53
Penggandaan gen MDM2	MDM2 ekstra menstimuli degradasi p53
Delesi gen p14ARF	Kegagalan menghambat MDM2 dan menahan degradasi p53 tetap terkendali
Mis-lokasi p53 pada sitoplasma, di luar inti	Kegagalan fungsi p53, karena p53 berfungsi hanya dalam inti

2.2.2 Peran p53

p53 merupakan suatu polipeptida yang diekspresikan atau dikode oleh gen p53 yang berperan dalam menjaga keutuhan sel atau integritas genom melalui jalur transkripsi tetramerik. p53 ini ditemukan dalam jumlah yang sangat rendah pada sel yang tidak terpapar oleh stressor. Namun, apabila terjadi suatu stressor, baik berupa hipoksia, kerusakan pada integritas seluler dan onkogen yang tidak sesuai, maka p53 tersebut akan diekspresikan dalam jumlah yang lebih tinggi untuk mengaktifkan berbagai jalur menuju ke arah modifikasi pascatranslasi protein dan stabilisasi. Adanya akumulasi p53 tersebut selanjutnya akan mengaktifkan transkripsi berbagai gen yang terlibat dalam menimbulkan efek antiproliferasi atau penghentian siklus dan aktivasi apoptosis. Sehingga p53 dianggap sebagai suatu monitor sentral terhadap stressor yang dapat mengarahkan sel untuk memberikan respon yang sesuai, baik berupa penghentian siklus ataupun apoptosis .

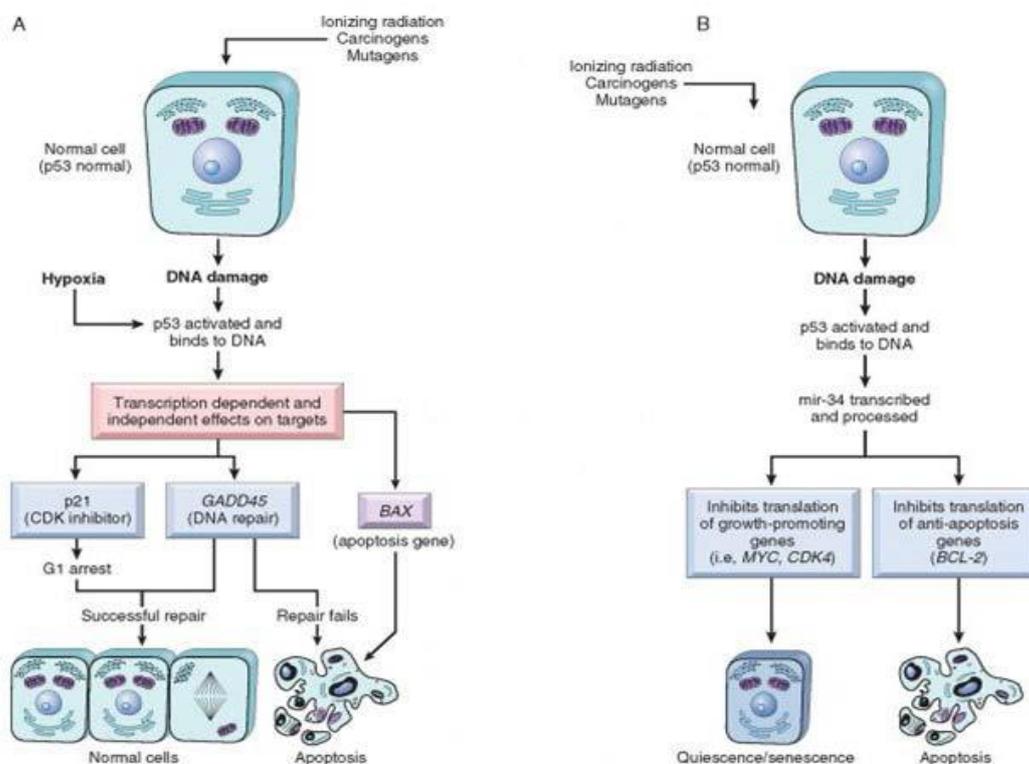
p53 secara normal di dalam sel yang tidak mengalami stress memiliki waktu paruh yang sangat pendek, kurang lebih dua puluh menit. Waktu paruh yang relatif pendek tersebut disebabkan oleh karena adanya ikatan p53 dengan *Murine Double Minute 2* (MDM2) (Bai dan Zhu, 2006). MDM2 merupakan suatu protein yang berperan khusus dalam menghancurkan p53. p53 mengalami modifikasi pascatranskripsi yang membebaskan protein tersebut dari MDM2 sehingga dapat

meningkatkan lama waktu paruhnya. Selama proses pembebasan dari MDM2, protein tersebut mengalami aktivasi menjadi suatu faktor transkripsi .

Apabila terdapat suatu stressor, baik berupa hipoksia, kerusakan pada integritas seluler atau *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) dan onkogen yang tidak sesuai maka akan terjadi aktivasi p53. Namun apabila perbaikan kerusakan DNA tersebut gagal, maka p53 yang normal akan mengarahkan sel pada kematian yang terprogram atau proses apoptosis

2.2.2.1 Peran p53 dalam perbaikan kerusakan DNA

Siklus replikasi sel dibagi menjadi empat fase, yaitu: fase gap 1 (G1), sintesis (S), gap 2 (G2), dan mitosis (M). Replikasi DNA berlangsung pada fase S dan mengalami pemisahan secara mitosis menjadi *sister chromatid* berlangsung pada fase M. Fase S dan M adalah fase yang paling sensitif terhadap berbagai macam faktor risiko terjadinya kerusakan DNA. Oleh karena itu, apabila terdapat suatu faktor risiko tertentu, seperti pajanan radiasi, sel tetap berada pada tahap *arrest*, yaitu fase G1 atau G2. Namun, apabila perbaikan DNA tersebut telah selesai, maka pembelahan sel akan berlanjut dan memasuki fase berikutnya



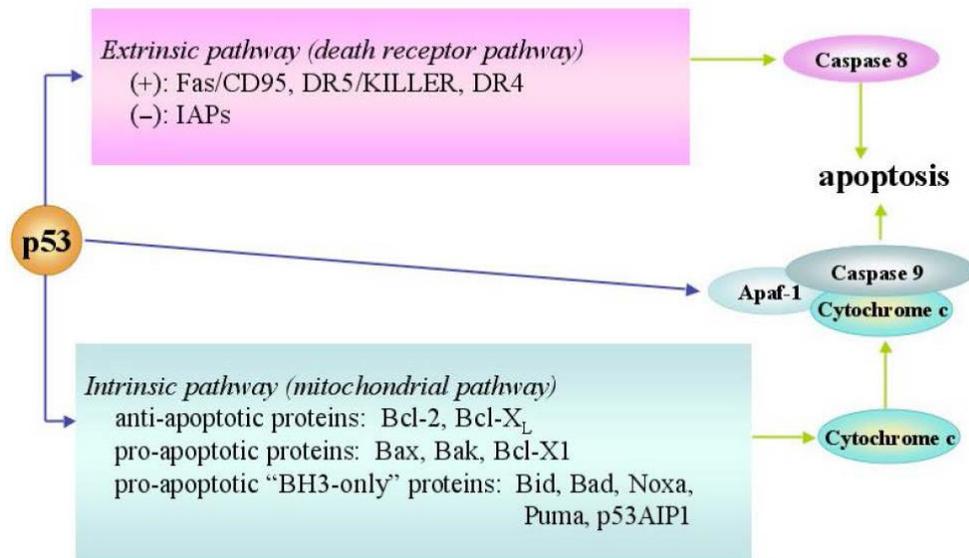
Gambar 2.2.2 Peran p53 dalam mempertahankan stabilitas genom

(Fridman & Lowe, 2003)

p53 merupakan salah satu gen penekan kanker atau supresor tumor yang berperan penting dalam melindungi siklus sel. Apabila terjadi kerusakan pada sel, maka p53 di dalam inti akan teraktivasi sehingga dapat mensintesis p53. Aktivasi p53 tersebut akan meningkatkan proses transkripsi pada beberapa gen target seperti gen *inhibitor kinase dependent-cyclin*, yaitu CDKN1A (P21) dan GADD45. Selanjutnya aktivasi p21 menyebabkan siklus sel terhenti atau *arrest* pada akhir fase G1. Sementara siklus sel berhenti pada fase G1, aktivasi GADD45 selanjutnya berperan dalam melakukan perbaikan DNA. Apabila perbaikan DNA tersebut berhasil maka p53 akan meningkatkan transkripsi MDM2, yang kemudian menekan pembentukan p53, sehingga akan menghilangkan hambatan terhadap siklus sel. Selanjutnya, sel tersebut dapat melanjutkan siklus pembelahannya (Syaifudin, 2007). Namun apabila perbaikan kerusakan DNA tersebut gagal maka p53 yang normal akan mengarahkan sel pada kematian yang terprogram atau proses apoptosis. Selain itu, p53 juga dapat mengaktivasi gen represi melalui proses aktivasi terhadap mir-34 yang merupakan keluarga mikroRNAs (miRNAs). Selanjutnya, mir-34 akan menghambat proses translasi dari gen-gen pemicu pertumbuhan atau *growth promoting genes*, seperti MYC dan CDK4 sehingga mengakibatkan terhentinya proses pertumbuhan sel. Protein aktivasi mir-34 juga menghambat proses translasi dari gen anti-apoptosis sehingga dapat memicu terjadinya proses apoptosis

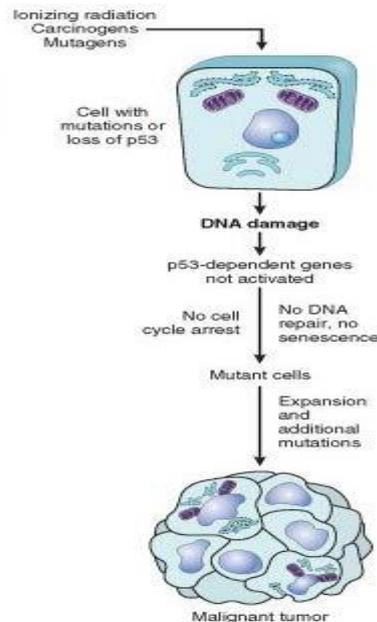
2.2.2.2 Peran p53 pada proses apoptosis

Apoptosis merupakan program bunuh diri intra seluler yang dilakukan dengan cara mengaktifkan protein kaspase, yang merupakan suatu sistein protease. Secara umum, terdapat dua jalur utama dalam proses apoptosis, yaitu: jalur intrinsik dan ekstrinsik. Jalur intrinsik meliputi pemberian kode yang memicu proses *mitokondria-dependent* melalui pelepasan sitokrom c dan pengaktifan kaspase-9. Jalur ekstrinsik bekerja dengan cara mengaktifkan reseptor kematian atau *Death Reseptor* (DR), seperti Fas (reseptor 1 *Tumor Necrotic Factor* (TNF)), DR4 dan DR5. Adanya interaksi dengan ligan yang sesuai akan mengarah kepada proses transduksi sinyal yang diawali dengan peliputan molekul yang berhubungan dengan DR seperti *Fas-Associative Death Domain* (FADD), yang selanjutnya akan mengaktifkan kaspase-8. Kaspase ini kemudian mengkatalis sederet proses proteolitik yang menghasilkan perubahan biokimia dan morfologi khas yang berhubungan dengan apoptosis. Selain itu, apoptosis juga merupakan suatu proses yang aktif, di mana menginduksi gen seperti BAX dan ekspresi antigen Fas maupun represi atau penekanan simultan gen seperti BCL2



Gambar 2.2.3 Mekanisme Intrinsik dan Ekstrinsik pada Apoptosis
(Bai, 2006)

p53 memiliki peranan yang penting dalam pengaturan siklus sel dengan melakukan kontrol terhadap sejumlah gen, termasuk gen untuk apoptosis jika terdapat kerusakan seluler yang berat. Peran p53 dalam proses apoptosis ini, terutama melibatkan mitokondria sebagai peran utama melalui pembebasan sitokrom c. Efek proapoptosis oleh p53 diperantarai melalui peningkatan sintesis Bax. Selanjutnya protein Bax tersebut akan mendorong pelepasan sitokrom c pada mitokondria, yang akhirnya akan membentuk suatu kompleks dengan *Apoptosis Inducing Factor-1* (APAF-1), prokaspase-9 dan *Adenosine-Triphospat* (ATP). Komplek tersebut mengakibatkan terjadinya aktivasi prokaspase-9 menjadi kaspase-9. Kemudian kaspase-9 akan memicu aktivasi dari kaspase-3. Kaspase-3 merupakan kaspase terakhir atau eksekutor yang memecah DNA dan substrat lainnya sehingga mengakibatkan terjadinya kematian sel



Gambar 2.2.5 Proses Karsinogenesis akibat kegagalan p53

(Fridman & Lowe, 2003)

Kompleks p53-E6 dan p53 mutan adalah stabil, sedangkan p53 wild type adalah labil dan hanya bertahan 20-30 menit.

Apabila terjadi degradasi fungsi p53 maka proses karsinogenesis berjalan tanpa kontrol oleh p53. Oleh karena itu, p53 juga dapat dipakai sebagai indikator prognosis molekuler untuk menilai baik perkembangan lesi pre-kanker maupun keberhasilan terapi kanker (Kaufman et al, 2000)

Gen supressor tumor p53 bermutasi pada 50% tumor-tumor manusia di berbagai organ tubuh, dan dianggap sebagai gen yang paling sering bermutasi pada tumor ganas manusia.

Pada tumor ganas kepala leher dijumpai mutasi gen supressor p53 sebanyak 60% dan dapat ditemukan pada lesi pre malignant. Over-ekspresi protein p53 mutan mempunyai hubungan erat dengan meningkatnya insiden tumor primer dan dapat dijadikan marker untuk stadium molekuler dari tumor ganas kepala leher. Overekspresi protein p53 mutan dapat memprediksi kekambuhan tumor dan respons tumor terhadap neoadjuvant kemoterapi pada tumor ganas kepala leher.

Berdasarkan penelitian Effert dkk. (1992) dijumpai bahwa KNF yang terjadi oleh karena proliferasi klon p53 sel epitel diawali dengan infeksi Epstein-Barr Virus dan dapat menyebabkan mutasi p53 sehingga menghilangkan fungsi p53 wild supressor yang kemudian berlanjut pada proses keganasan pada nasofaring.

Penyebab KNF masih belum diketahui dengan pasti tetapi diduga oleh karena faktor kelainan genetik dan faktor lingkungan. Faktor kelainan genetik seperti adanya genotype HLA-A2 dan HLA Bsin2 pada penduduk China Selatan, adanya beberapa kromosom yang abnormal dan adanya gen supressor tumor yang inaktif. Faktor lingkungan dapat berupa infeksi Epstein-Barr Virus, radiasi, ikan asin yang mengandung nitrosamin, makanan yang diawetkan dan kontak dengan zat-zat karsinogen.

Dengan perkembangan teknik biologi molekuler akhir-akhir ini maka dapat menjelaskan bahwa salah satu penyebab terjadinya proses keganasan adalah kegagalan atau inaktivasi dari gen supressor tumor p53. Gen supressor tumor p53 adalah gen resesif pada kromosom 17 lengan pendek p53 yang bekerja pada alel type wild dan berfungsi menghambat pertumbuhan dan diferensiasi sel sehingga mencegah timbulnya transformasi sel yang mengarah kepada keganasan. Jika terjadi kerusakan atau mutasi dari gen supressor tumor p53 yang disebabkan oleh faktor-faktor genetik dan lingkungan maka terbentuklah protein p53 mutan yang tidak stabil dan tidak menghambat fase G1 ke S sehingga kerusakan-kerusakan sel tidak dapat diperbaiki. Akibatnya sel yang rusak terus berdiferensiasi dan menyebabkan timbulnya proses keganasan pada sel epitel yang melapisi nasofaring.

p53 yang meningkat memicu proses apoptosis yang utama pada kematian sel, dan mitokondria sebagai target utama. Radioterapi berfungsi menguatkan peran untuk p53. (Berns & Bohenzky, 1987)

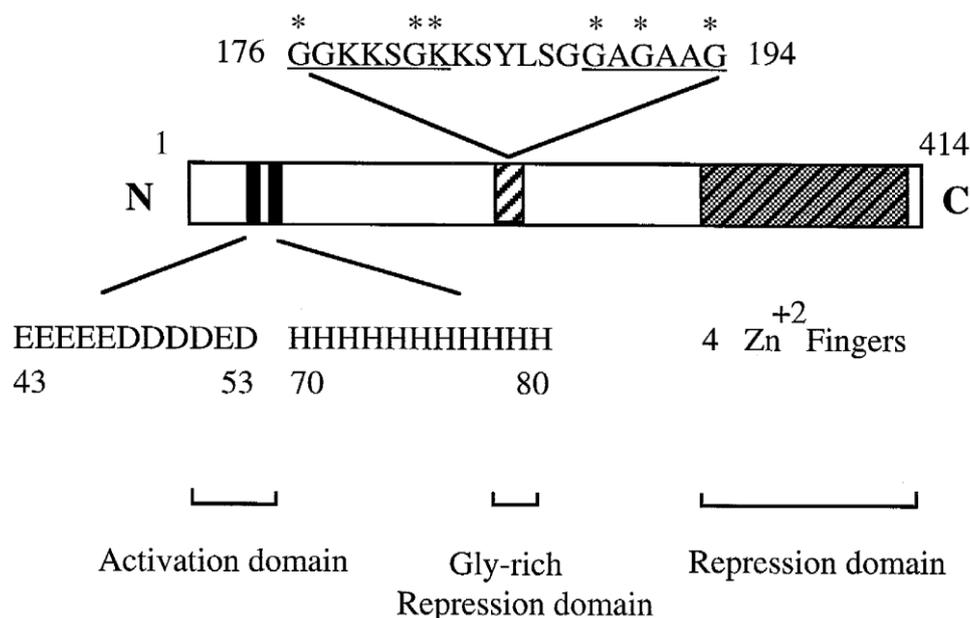
2.3 Yin-Yang 1 (YY1)

YY1 atau YY1 merupakan suatu ubiquitous & *multifunctional zinc-finger transcription factor*, yang memiliki peran penting di kontrol dari siklus sel. (Flanagan, et al., 1992) YY1 pertama kali diidentifikasi pada tahun 1991 dan secara cepat mampu menarik perhatian dikarenakan memiliki sifat yang unik yaitu berfungsi sebagai *multifunctional* protein yang berfungsi sebagai *transcriptional* represor, aktivator ataupun komponen inisiator yang secara langsung menginisiasi proses transkripsi in vitro. Nama YY1 diberikan karena mencerminkan aktifitas transkripsional ganda sebagai faktor transkripsi. (Flanagan, et al., 1992) Pada 2 studi independen yang dilakukan terhadap efek YY1 pada carcinoma ovarium dan carcinoma serviks memiliki hasil yang sangat bertolak belakang. Baritaki pada tahun 2007 mendapat korelasi positif antara ekspresi YY1 dengan progresi kanker (Baritaki, et al., 2007), sedangkan

Berchuck dan Matsumura mendapatkan hasil bahwa ekspresi YY1 memiliki korelasi positif dengan masa survival yang lebih panjang.

2.3.1 Struktur YY1

YY1 merupakan suatu protein yang mengkodekan 414 asam amino dan diperkirakan memiliki berat molekul sebesar 44kDa. Seperti yang terlihat di gambar 2.6 bahwa YY1 mengandung 4 C₂H₂-type zinc fingers yang berlokasi di C-terminus (aa 298-397) yang berperan dalam sequensi spesifik aktifitas DNA-binding dan juga sekaligus untuk fungsi represi dari YY1. (Lee, et al., 1995) (Lee, See, Galvin, Wang, & Shi, 1995)



Gambar 2.3.1 Diagram skematik dari protein YY1.

Dekat bagian N-terminus (aa 43-53), terdapat 11 asam amino berurutan dan regio yang didominasi glycines, diikuti oleh 11 asam amino histidine pada aa 70-80 yang berfungsi untuk menjadi domain aktifasi dari YY1.

2.3.2 Ciri Protein YY1

Kerangka utama cDNA YY1 manusia mengkode protein dengan 414 asam amino dengan prediksi bobot molekulnya 44 kDa. Namun, YY1 bermigrasi pada gel SDS sebagai protein 65-68 kDa, kemungkinan karena struktur proteinnya. Sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.3.1. YY1 mengandung empat cabang C₂H₂-jenis zinc yang

berlokasi pada terminus C (aa 298 – 397) yang mana bertanggungjawab untuk aktivitas pengikatan DNA spesifik sekuens (Lee, See, Galvin, Wang, & Shi, 1995) juga sebagai fungsi penekan YY1 (Lee, et al., 1995) (Lee, Zhang, & Schwartz, Bifunctional transcriptional properties of YY1 in regulating muscle actin and c-myc gene expression during myogenesis, 1994) Mendekati terminus N (aa 43 – 53), terdapat perpanjangan dari 11 asam amino acidic yang merupakan bagian dari domain aktivasi YY1 dan daerah yang utamanya adalah glisin, selanjutnya diikuti dengan 11 histidine berurutan pada aa 70 – 80. Perpanjangan homopolimerik histidin telah ditemukan dalam beberapa faktor transkripsi lain meliputi domain POU mengandung penekan transkripsi SCIP (Monuki, Kuhn, Weinmaster, Trapp, & Lemke, 1990) (Becker, Jedlicka, Templeton, Liotta, & Ozato, 1994). Penyusunan asam amino YY1 mendukung spekulasi bahwa histidine basic dapat menetralkan asam amino didekatnya di bawah kondisi ketika fungsi YY1 menjadi penekan transkripsi. Namun, YY1 mutan kekurangan histidine disebabkan penekanan transkripsi yang sama efisiennya dengan YY1 jenis tidak teratur. Kemudian, pemanjangan histidine ini tidak ada pada protein YY1 (xYY1) yang diisolasi dari *Xenopus laevis* (Pisaneschi, et al., 1994), menunjukkan bahwa ciri ini tidak dibalik secara evolusi. Sehingga, meskipun pemanjangan histidine omopolimerik telah banyak ditemukan dalam sejumlah faktor transkripsinya, perannya dalam transkripsi masih belum jelas.

Pertengahan dari protein YY1 (aa 154 – 201) memiliki persentase tinggi residu glisin dan alanine (sekitar 55%). Baru-baru ini, aa 170 – 201 telah menunjukkan aktivitas penekan transkripsi. Sehingga, dua domain penekan telah berhasil diidentifikasi sejauh ini dari YY1, satu dikolokasikan dengan cabang zinc, dan yang lain memiliki konteks tinggi glycine. Yang menarik, domain kaya glycine merupakan satu dari dua daerah YY1 (yang lainnya menjadi pemanjangan histidine yang tidak ditemukan pada x YY1) yang jarang ditemukan antara manusia dan *Xenopus laevis*. (Pisaneschi, et al., 1994)

Motif sekuens menarik lain dilokasikan pada posisi asam amino 176 – 182 (GGKKSGK) dan 189-195 (GAGAAG) yang berada dalam domain yang baru diidentifikasi penekan kaya glycine dari YY1 sebagaimana didiskusikan di atas. Sekuens GGKKSGK menkonformasi dengan baik dengan motif consensus (GxxxxGK) yang muncul dalam semua protein berikatan mononukleotida, meliputi ATPase. Sekuens GAGAAG cocok dengan motif ikatan consensus dinukleotida (GxGxxG) dan juga dilindungi dalam banyak kinase (Dong & Pfister, 1999). Motif GGKKSGK dilindungi dalam osilasi YY1 manusia, tikus dan *Xenopus laevis*, meskipun GAGAAG

hanya ditemukan pada YY1 manusia dan tikus. Meskipun hal ini mendorong spekulasi bahwa YY1 dapat merupakan protein berikatan nukleotida juga dengan aktivitas enzimatik, namun eksperimen utama didesain untuk menunjukkan aktivitas biokimia untuk YY1 menunjukkan hasil negative (Pisaneschi, et al., 1994). Hal ini masih belum jelas jika motif tersebut memainkan peran dalam penekanan dimediasi oleh domain kaya glycine dari YY1.

2.3.3 Profil Ekspresi YY1

mRNA YY1 diidentifikasi dalam selusin atau lebih jaringan tikus, menunjukkan bahwa ekspresinya terjadi dimana-mana (Pisaneschi, et al., 1994). YY1 juga dideteksi dalam sejumlah baris sel, meliputi HeLa, NIH3T3, sel teratokarsinoma manusia dan tikus. Karena YY1 merupakan target oncoprotein E1A adenovirus, hal ini mungkin jika YY1 memainkan peran dalam regulasi proliferasi sel. Konsisten dengan hipotesis ini, telah ditunjukkan bahwa nilai YY1 meningkat cepat dalam sel NIH3T3 dalam responnya kepada terapi serum dan faktor 1 pertumbuhan menyerupai insulin (Flanagan, Autologous stimulation of YY1 transcription factor expression: role of an insulin-like growth factor. *Cell growth & differentiation*, 1995). Aktivitas pengikatan DNA YY1 telah ditunjukkan diregulasi selama diferensiasi. Mudahnya, aktivitas ikatan DNA YY1 menurun selama diferensiasi pada sel teratokarsinoma manusia (Liu, Baillie, Sissons, & Sinclair, 1994) dan diferensiasi myoblast (Lee, Shi, & Schwartz, Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal alpha-actin transcription in embryonic myoblasts, 1992), tetapi meningkat selama penuaan.

2.3.4 Mekanisme Regulasi Transkripsi oleh YY1

Analisis struktur-fungsi dilakukan oleh beberapa laboratorium untuk mengidentifikasi domain YY1 yang berperan dalam regulasi transkripsional. Penghapusan searah mutan YY1 tergabung dalam domain pengikatan DNA GAL4 dan dianalisis untuk aktivitas transkripsinya dalam riwayat transfeksi sementara. Dalam dua penelitian, dua domain transkripsi YY1 diidentifikasi: penekanan domain dilokasikan pada daerah terminal C yang berkoinidensi dengan motif cabang zinc pengikatan DNA, dan aktivasi domain pada terminus N, dalam asam amino 90 atau 69 pertama dari YY1. Dalam penelitian ketiga, domain penekan dipetakan ke dalam cakupan daerah dari aa 333 hingga aa 397, yang berhubungan dengan cabang zinc dua terakhir dan sebagian dari YY1. Dalam penelitian yang sama tersebut, aktivasi domain juga

dipetakan kedalam daerah terminal N dari YY1, tetapi kemudian dibagi menjadi dua subdaerah dari aa 16 hingga 29 dan aa 80 hingga 100. Meskipun penelitian ini sedikit berbeda dalam batas yang tepat penekanan dan domain aktivasi, kesimpulan utamanya sama, misalnya YY1 terdiri dari dua domain fungsional dengan domain penekanan pada daerah terminal C dan domain aktivasi pada daerah domain N YY1. Penemuan ini kemudian menjadi dasar structural ganda aktivitas transkripsi YY1. Menggunakan perpaduan GAL4 berbasis uji kadar, Shenk dan kolega mengidentifikasi domain penekan kedua yang terdapat pada 201 asam amino pertama YY1 dalam sel HeLa (Park & Atchison, 1991). Yang menarik, inklusi lebih banyak asam amino antara aa 201 dan 331 YY1 dapat menutupi aktivitas domain penekan kedua ini. Yang menarik, penggabungan protein GAL4-YY1 yang hampir identik (GAL4-YY1 1 – 200) berfungsi sebagai aktivator transkripsi kuat ketika diuji dalam sel NIH3T3 (Shi, Seto, Chang, & Shenk, 1991). Sehingga, hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas dorman penekan kedua ini kemungkinan merupakan sel tipe-bergantung. Baru-baru ini, Seto dan kolega telah lebih jauh memetakan domain penekanan kedua dari aa 170 dan 200 dari YY1 (Bauknecht, See, & Shi, A novel C/EBP beta-YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region, 1996).

2.3.5 Gen YY1 dengan p53

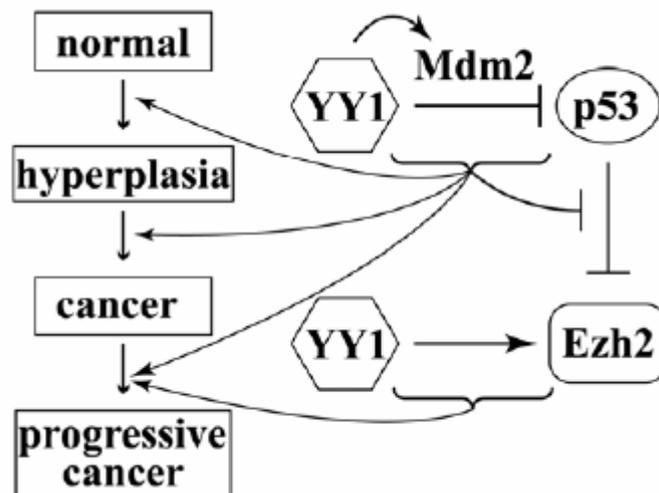
Peran YY1 dalam tumorigenesis didukung oleh adanya interaksi dengan regulasi siklus sel. Adanya siklus sel yang tidak terkontrol menjadi peran utama dalam tumorigenesis. Beberapa molekul yang berperan untuk mencegah pembelahan sel yang tidak terkontrol adalah p53.

Dengan tidak adanya gen YY1, maka akan meningkatkan jumlah p53, begitu pula sebaliknya. Dengan adanya gen yang teroverekspresi YY1 akan menimbulkan terjadinya penurunan kadar endogenous p53, sehingga akan menghambat fungsi dari p53 sebagai *Tumor suppressor gene*.

Dikatakan bahwa YY1 memiliki peranan penting di dalam tumorigenesis dan memiliki peranan yang potensial di dalam target terapi kanker. Peranan YY1 dalam tumorigenesis dijelaskan bahwa terdapat overekspresi dari gen YY1 pada pembentukan dan perkembangan kanker. Sebagai penjaga gen, p53 sebagai *tumor suppressor*

memiliki peran yang vital terhadap pencegahan tranformasi sel malignant. Dikatakan bahwa lebih dari 50% kanker dilaporkan memiliki mutasi pada gen p53.

Pada studi invitro maupun invivo juga mengindikasikan bahwa inaktivasi dari p53 dapat membuat sel-sel menjadi immortal dan memicu terjadinya pembentukan tumor. YY1 melawan p53 dengan berbagai mekanisme termasuk meningkatkan p53 *ubiquination* dan degradasi dari p53, memblokir p53 *acetylation*, melemahkan stabilisasi dari p14ARF, dan menghambat transkripsi mediasi dari p53. Ini merupakan efek negative YY1 pada stabilitas dan fungsi p53 sebagai target utama dalam overekspresi gen YY1 pada sel kanker dan sangat diduga bersifat onkogen atau memiliki peran proliferative dalam pembentukan kanker. Mereka melakukan hipotesa bahwa YY1 mengatur fungsi dari Ezh2 dan p53 untuk memfasilitasi pembentukan kanker. Ezh2 diidentifikasi sebagai onkogen yang terpercaya dan digunakan sebagai marker kanker dengan potensi yang agresif dan metastatik. Ezh2 penting dalam perkembangan dan penyebaran sel kanker dan adanya overekspresi dari ini menandakan bahwa gagalnya terapi yang dilakukan.



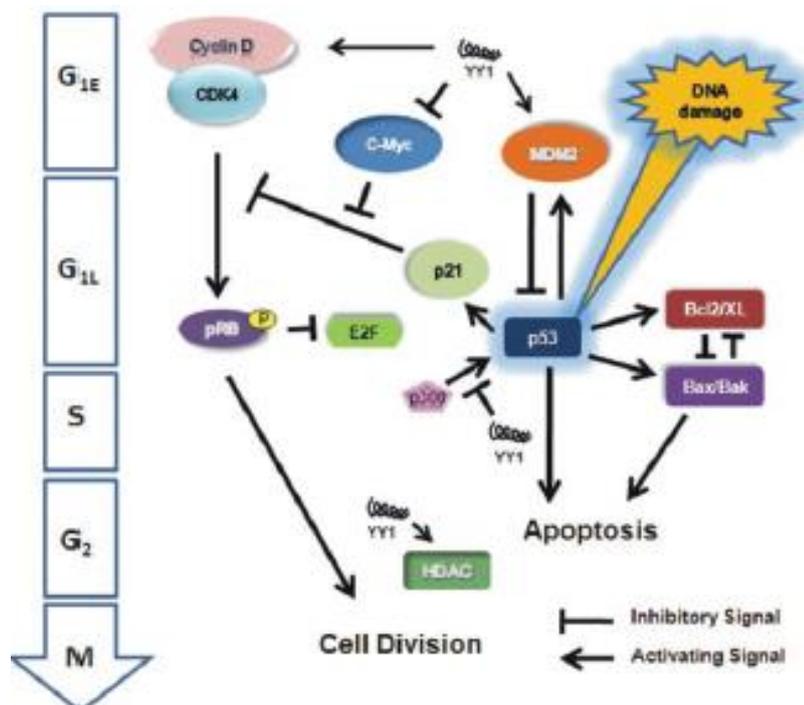
2.3.6 Gen YY1 pada Kanker Nasofaring

Sampai saat ini hubungan YY1 dengan KNF belum pernah di teliti sedang pada tumor esophagus squamous cell carcinoma YY1 mempromosikan invasi nya. Ditemukan bahwa tingkat protein dari YY1 secara signifikan lebih tinggi pada jaringan ESCC dengan metastasis kelenjar getah bening daripada mereka yang tidak metastasis kelenjar getah bening. Seperti masih belum jelas apakah YY1 mempengaruhi invasi sel ESCC, sistem Tran-membengkak klasik digunakan untuk mengetahui pengaruh YY1 di invasi sel kanker kerongkongan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah TE-1

sel bermigrasi melalui membran meningkat setelah transfeksi dengan vektor YY1 berlebih, dan secara signifikan menurun setelah membungkus dengan RNA jepit rambut kecil, menunjukkan bahwa YY1 meningkatkan kemampuan invasif TE-1 sel dan penghambatan YY1 bisa membalikkan promosi ini.

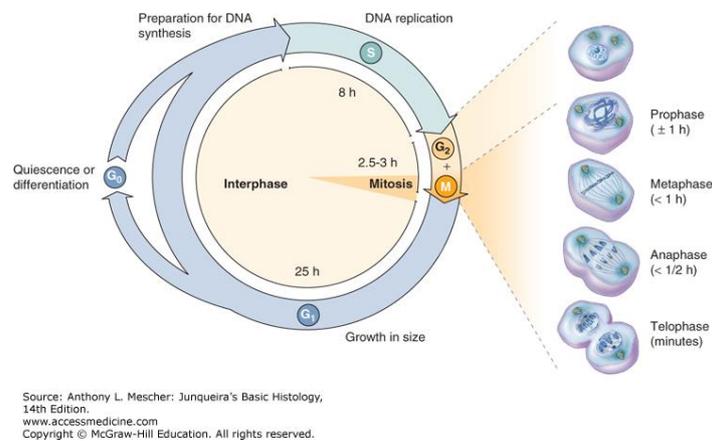
Menurut penelitian dari Guifen He, dkk mengatakan bahwa YY1 yang merupakan faktor transkripsi *zinc-finger* yang terlibat dalam pertumbuhan sel, pembentukan, dan pembelahan sel. Meskipun YY1 dapat meregulasi *human papilloma virus* (HPV) tipe viral onkogen E6 dan E7, tetapi masih belum diketahui peranan YY1 terhadap perkembangan kanker pada sel yang terinfeksi HPV, sehingga mereka melakukan penelitian mengenai peran YY1 terhadap kanker serviks yaitu YY1 merangsang jaringan kanker pada serviks atau YY1 menghambat peranan apoptosis pada sel kanker serviks yang merupakan peranan dari gen *dependent-p53*.

Dari penelitian yang telah dilakukan bahwa adanya overekspresi gen YY1 pada kanker serviks dan YY1 berperan penting di dalam perkembangan postif HPV pada kanker serviks, mereka juga menambahkan bahwa YY1 menghambat pengaktifan p53 dan menghambat apoptosis pada sel HeLa yang terinfeksi HPV.



2.4 Siklus sel normal

Pada dasarnya setiap sel akan mengalami sekuens yang sama dalam replikasi. Waktu generasi sel (*cell generation time*) adalah waktu yang dibutuhkan bagi suatu sel untuk menyelesaikan lima fase dari siklus sel. Siklus sel dibagi menjadi dua tahap besar, yaitu tahap interfase di mana sel sedang tidak membelah, dan tahap pembelahan atau fase M (mitosis). Selama tahap interfase, sel mengakumulasi nutrisi yang diperlukan untuk duplikasi DNA dan merupakan masa persiapan pembelahan sel. Interfase terdiri atas fase-fase G_1 (Gap 1), S (synthesis), dan G_2 (Gap 2). Suatu siklus sel berjalan sekitar 24 jam. Interfase memerlukan waktu 23 jam (90 % dari seluruh waktu siklus), sedangkan fase M hanya 1 jam. Bila sel keluar dari siklus, maka sel masuk ke dalam fase Dorman (G_0).



Gambar 2.4.1 Siklus sel

Fase G_1 , merupakan fase pertumbuhan dan persiapan untuk replikasi kromosom, antara lain sintesis protein dan organel-organel, sintesis RNA, dan reparasi DNA. Pada fase ini, bila kondisi tidak memungkinkan, sel dapat menunda pertumbuhan dan masuk ke fase Dorman (G_0) yang waktunya bervariasi. Fase G_0 bisa untuk sementara atau menetap. Fase G_0 akan menetap bila sel mengalami diferensiasi dan akhirnya mati. Sel lainnya bisa kembali masuk ke fase G_1 dan melanjutkan pertumbuhan.

Pada fase S, sel akan melakukan replikasi DNA, sintesis sentriol dari sentrosom, dan benang-benang kumparan. Bentuk molekul DNA menyerupai tangga yang berpilin menjadi dobel helix. Unit struktural DNA adalah empat nukleotida berbeda yang terpasang dalam satu rantai panjang DNA. Setiap nukleotida mengandung fosfat, gula deoksiribosa dan basa nitrogen, yang tersusun dengan urutan demikian. Keempat basa tersebut adalah adenine (A), guanine (G), sitosin (C), dan timin (T). Bagian samping tangga DNA terbentuk dari gabungan fosfat dan gula. Hubungan silang (anak tangga) terbentuk dengan cara memasang basa dengan basa melalui ikatan hydrogen lemah.

Dalam pasangan basa yang lengkap, adenine hanya berikatan dengan timin (A-T, T-A), sedangkan guanine hanya berikatan dengan sitosin (G-C, C-G). Meskipun hanya ada empat macam variasi ikatan, rangkaian linear tempat keempat ikatan tersebut berada dapat memberikan beragam kombinasi yang hampir tak terhitung.

Fase G₂ merupakan fase persiapan sebelum sel memasuki fase M, antara lain mempersiapkan energi.

Fase M merupakan fase pembelahan yang terdiri dari kariokinesis dan sitokinesis, terjadi kondensasi kromosom (peran protein kondensin) dan segregasi kromosom.

Fase G₁ dan G₂ merupakan fase penundaan yang memberi kesempatan sel untuk tumbuh. Fase itu digunakan oleh sel untuk memonitor kondisi lingkungan (internal dan eksternal) sehingga mencapai kondisi yang memungkinkan untuk masuk ke fase berikutnya. Khususnya pada fase G₁, kondisinya sangat ditentukan oleh faktor eksternal dan sinyal ekstraseluler dari sel lainnya.

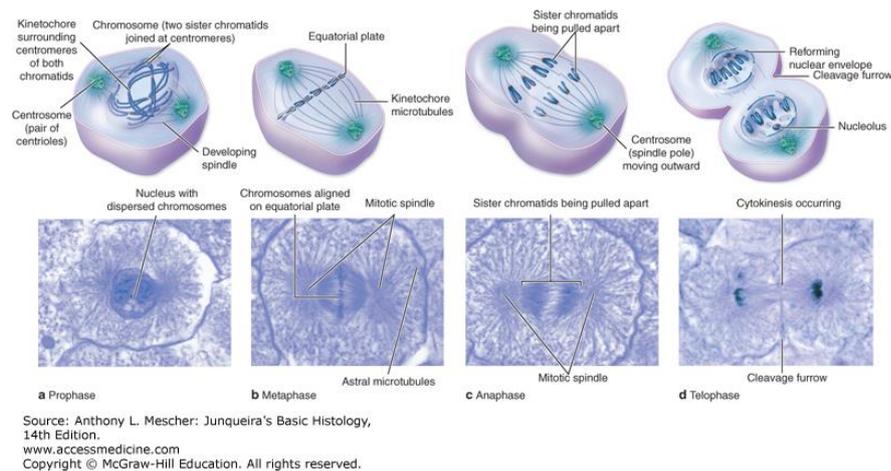
Pembelahan sel

Pembelahan sel ada dua macam yaitu mitosis dan meiosis. Mitosis terjadi pada sel-sel somatis yang membentuk sel-sel baru dengan jumlah kromosom yang sama dengan sel induk, sedangkan meiosis terjadi pada sel gamet (ovum dan sperma) di dalam gonad yang dikenal juga sebagai pembelahan reduksi karena menghasilkan sel dengan jumlah kromosom separuh dari jumlah kromosom sel induk.

Didalam proses pembelahan sel terjadi peristiwa kariokinesis dan sitokinesis. kariokinesis adalah proses pembelahan inti (karion, nukleus) yang merupakan pemisahan kromosom ke kutub yang berlawanan, peristiwa ini diawali ketika kromosom digandakan, namun tetap terikat pada sentromer. Sedangkan sitokinesis adalah pemisahan sitoplasma yang akan dibagikan pada dua sel anak. Pada proses pembelahan sel perlu dijaga agar kariokinesis dan sitokinesis dapat terjadi secara tepat dan dengan urutan yang benar. Motor penggerak dari kariokinesis dan sitokinesis adalah sitoskelet, dengan terbentuknya benang-benang spindel.

2.4.1 MITOSIS

Pembelahan mitosis terdiri atas empat tahap, yaitu profase, metafase, anafase, dan telofase (Gambar2). Tahap antara profase dan metafase, sering dimasukkan dalam tahap tersendiri yaitu prometafase.



Gambar 2.4.2. Tahap-tahap mitosis

1. Profase

Ditunjukkan pada gambar 2a, kromosom dalam nukleus yang dalam fase interfase terdiri atas rangkaian kumparan longgar, dipadatkan menjadi bentuk kromosom yang lebih kompak.

2. Prometafase

Sebagai fase lanjutan profase, duri-duri mikrotubulus yang sedang tumbuh dari aster menusuk dan memecahkan pembungkus nukleus. Pada waktu yang sama berbagai mikrotubulus dari aster melakat pada kromatid di sentromer, dimana kromatid yang berpasangan masih berikatan satu sama lain; tubulus kemudian menarik satu kromatid dari setiap pasang menuju satu kutub sel dan pasangannya menuju kutub yang berlawanan.

3. Metafase

Selama metafase (Gambar 2b), kedua aster dari apparatus mitosis akan didorong lebih jauh lagi. Keadaan ini diyakini karena duri-duri mikrotubulus dari kedua aster, dimana duri-duri tersebut saling berinterdigitasi satu sama lain untuk membentuk gelendong

mitosis saling mendorong satu dengan yang lainnya. Diyakini bahwa sejumlah kecil protein kontraktil yang disebut molekul motor yang mungkin terdiri atas protein otot aktin berperan dalam pergerakan ini. Secara bersamaan kromatid ditarik dengan kuat oleh mikrotubulus ke bagian pusat sel untuk membentuk lempeng ekuatorial dari gelendong mitosis.

4. Anafase

Selama fase ini (Gambar 2c), kedua kromatid dari setiap kromosom ditarik terpisah pada sentromer. Semua 46 pasang kromatid dipisahkan, membentuk dua perangkat 46 kromosom anak yang terpisah. Satu dari perangkat ini ditarik menuju satu aster mitotik dan yang lain menuju aster yang lain sewaktu kedua kutub yang bersebelahan dari sel yang membelah di dorong menjauh.

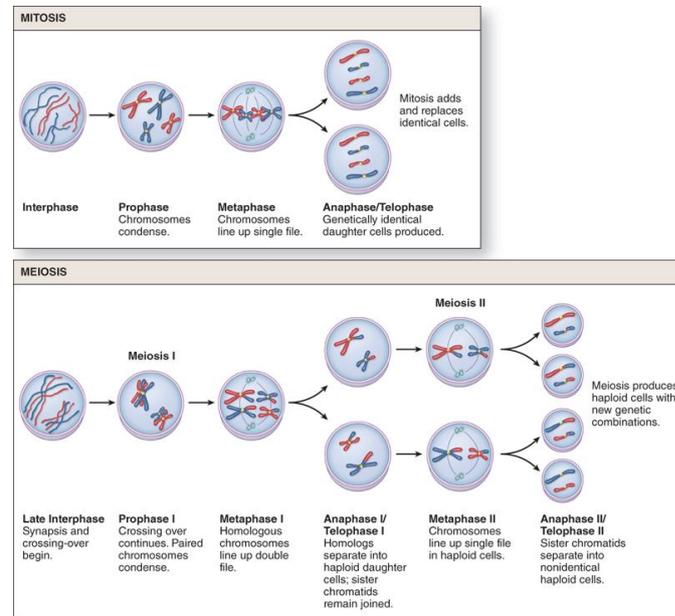
5. Telofase

Dalam telofase (Gambar 2d), kedua perangkat kromosom anak sekarang secara menyeluruh ditarik menjauh. Kemudian aparatus mitosis menghilang, dan terbentuk sebuah membran nukleus yang baru terbentuk di sekitar setiap perangkat kromosom. Membran ini dibentuk dari bagian retikulum endoplasmik yang sudah terdapat di sitoplasma. Segera setelah itu sel akan terjepit di bagian pertengahan antara kedua nukleus. Proses ini disebabkan oleh cincin kontraktil mikrofilamen yang terdiri atas aktin dan miosin, dua protein kontraktil otot, yang terbentuk pada persambungan dari sel yang baru terbentuk dan menjepitnya satu sama lain.

2.4.2. MEIOSIS

Meiosis disebut juga pembelahan reduksi karena sel anak mempunyai jumlah kromosom yang tereduksi menjadi separuh dari jumlah kromosom semula ($2N$ /diploid menjadi N /haploid). Pembelahan ini hanya terjadi pada gamet (sperma dan ovum) yang terletak di dalam gonad (testis dan ovarium). Tahap pembelahan meiosis hampir menyerupai mitosis, hanya saja terjadi dua kali pembelahan, yaitu meiosis I dan meiosis

II. Meskipun begitu, replikasi DNA hanya terjadi satu kali, sehingga terbentuk empat sel anak yang masing-masing hanya mengandung satu set kromosom. Pada profase I tahap meiosis dibagi menjadi lima tahap yaitu leptoten, zigoten, pakiten, diploten, dan diakinesis. Tahap profase I ini merupakan fase yang kritis, karena sebagai dasar dari morfologi kromosom.



Source: Anthony L. Mescher: Junqueira's Basic Histology, 14th Edition.
www.accessmedicine.com
Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

Gambar 2.4.3. Perbedaan mitosis dan meiosis³

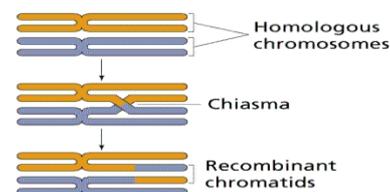
Seperti halnya mitosis, setelah selesai fase S, kromosom parental direplikasi sehingga masing-masing sel anak mempunyai *sister chromatid* yang identik. Pola segregasi kromosom pada meiosis I berbeda dengan mitosis, pasangan kromosom homolog yang disebut tetrad (bivalent) dengan empat kromatid. Pasangan kromatid ini bisa membentuk rekombinasi antara *sister chromatid* dengan terjadinya pertukaran segmen kromosom yang disebut pindah silang atau crossing over. Setelah replikasi DNA pada meiosis, pasangan kromosom homolog tidak hanya sebagai kunci dari segregasi kromosom tetapi juga merupakan rekombinasi antara kromosom maternal dan paternal.

Tahapan meiosis secara lengkap adalah sebagai berikut :

1. Interfase I, terjadi replikasi kromosom sama seperti mitosis dan menghasilkan dua *sister chromatid* yang tetap terikat pada

sentromer. Demikian pula sentriol mengalami replikasi menjadi satu pasang.

2. Profase I, waktunya lebih lama dari profase mitosis dan meliputi 90 % waktu yang diperlukan dari seluruh proses meiosis. Pada fase ini, dua kromosom homolog, yang masing-masing terdiri atas dua kromatid, saling berpasangan membentuk tetrad. Sering terjadi persilangan (crossing over) antara kromatid dari pasangan kromosom yang homolog pada tempat yang disebut chiasma. Profase I dibagi menjadi 5 tahap, yaitu :
 - a. Leptoten, pasangan kromosom homolog mengalami kondensasi tetapi *sister chromatid* masih belum tampak jelas.
 - b. Zigoten, kromosom homolog saling mendekat dan berpasangan (sinapsis) sehingga terbentuk tetrad (bivalent) yang masing-masing terdiri atas dua set *sister chromatid*
 - c. Pakiten, pasangan kromosom homolog (sinaps) telah sempurna dan kemungkinan terjadi crossing over (bukan dalam satu *sister chromatid*)
 - d. Diploten, *sister chromatid* dan chiasmata tampak jelas
 - e. Diakinesis, kromosom mengalami rekondensasi dan pemendekan

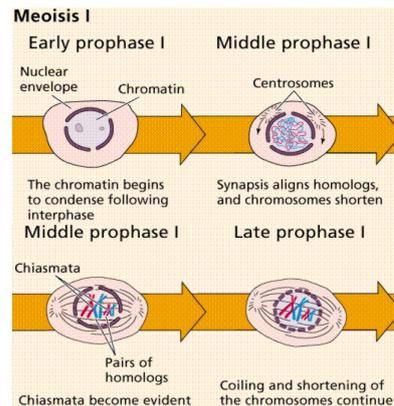


Gambar 2.4.4. Pindah silang (crossing over) yang terjadi pada meiosis profase I tahap pakiten

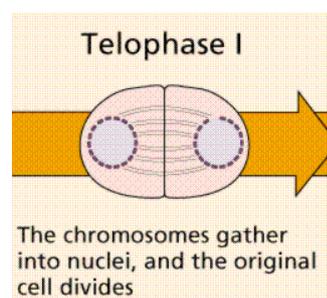
3. Metafase I, pasangan kromosom homolog (tetrad) tersusun pada bidang ekuator, terikat pada benang spindel dengan kinetokor salah satu *sister chromatid* pada arah yang sama, sedangkan kinetokor kromosom homolognya terikat pada

benang spindel yang lain, mengarah ke kutub yang berlawanan.

- Anafase I, seperti pada mitosis, benang spindel menggerakkan kromosom ke salah satu kutub dan kromosom homolognya bergerak ke kutub yang berlawanan. Pada tahap ini *sister chromatid* masih tetap terikat pada sentromer, sementara lengannya sudah terpisah (gambar 5)



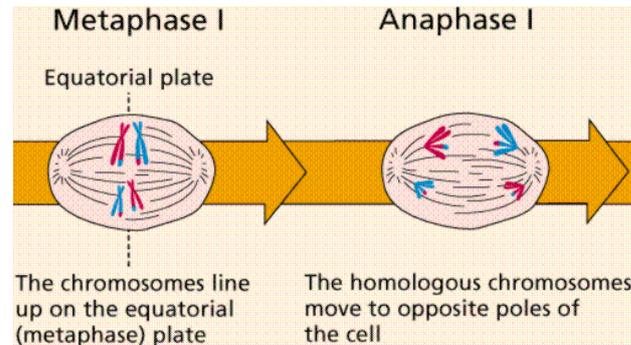
Gambar 5. Tahap Profase I, dari awal hingga akhir, peristiwa yang terjadi meliputi : kondensasi kromosom, pembelahan sentrosom. nembentukan *sister chromatid* dan sinansis. dan



Gambar 2.4.6. Tahap metafase I, kromosom (*tetrad*) terletak pada bidang ekuator, pada anafase I (kanan) kromosom yang homolog bergerak ke kutub yang berlawanan

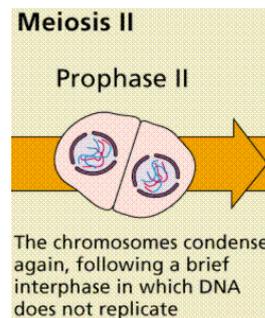
- Telofase I, masing-masing kromosom homolog telah sampai di kedua kutub. Jumlah kromosom pada masing-masing kutub

haploid, tetapi tetap sebagai dua kromatid. Pada fase ini terjadi sitokinesis sehingga terbentuk dua anak sel. Pada tahap selanjutnya, tidak terjadi replikasi materi genetik dan berjalan seperti mitosis.



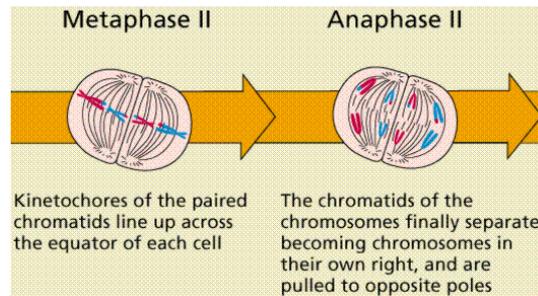
Gambar 2.4.7. Telofase I

6. Profase II, terbentuk apparatus spindle, dan kromosom bergerak ke bidang ekuator



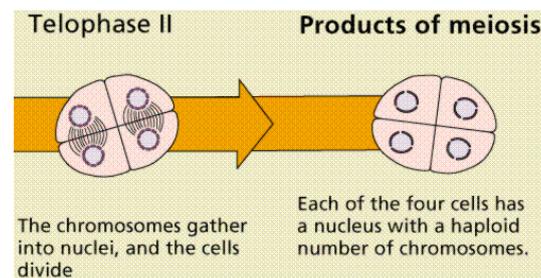
Gambar 2.4.8. Tahap profase II, kromosom terkondensasi tanpa replikasi DNA

7. Metafase II, kromosom telah sampai di bidang ekuator dan kinetokor dari masing-masing *sister chromatid* mengarahkan kromosom ke kutub yang berlawanan.
8. Anafase II, sentromer dari *sister chromatid* terpisah sehingga terbentuk kromosom tunggal yang bergerak ke arah kutub berlawanan.



Gambar 2.4.9. *Sister chromatid tersusun pada bidang ekuator, terbentuk benang spindel, sentriol dan sentrosom. Sister chromatid terpisah menjadi kromosom dan bergerak ke kutub yang berlawanan*

9. Telofase II, mulai membentuk nukleus pada kedua kutub dan terjadi sitokinesis. Dengan demikian, telah terbentuk empat anak sel yang masing-masing mempunyai jumlah kromosom haploid (N)



Gambar 2.4.10. *Tahap telofase II yang telah menghasilkan empat sel anak, masing-masing dengan kromosom haploid*

2.5 GEN PENEKAN TUMOR

Gen-gen yang berperan penting dalam pertumbuhan sel adalah proto-onkogen dan gen penekan tumor. Proto-onkogen mengkode faktor pertumbuhan, membran dan reseptor sitoplasma. Protein ini memainkan peranan dalam sinyal transduksi intraseluler. Proto-onkogen mengusahakan dampak positif dari proliferasi seluler, sebaliknya gen penekan tumor sebagai pengatur penghambat proliferasi seluler.

Proto-onkogen merupakan gen yang meningkatkan pertumbuhan sel dalam keadaan yang masih terkontrol. Protein yang dihasilkan proto-onkogen berperan penting pada pertumbuhan dan diferensiasi normal, tetapi apabila gen-gennya mengalami mutasi atau hiperaktif, proto-onkogen berubah menjadi onkogen, dimana proliferasi sel tetap berlangsung tetapi tidak normal.

Onkogen merupakan gen yang dominan dan akan memacu proses transformasi seluler, sehingga proto-onkogen dan onkogen memiliki andil besar pada patogenesis, sedangkan perkembangan kanker dan perilakunya tampak lebih berkaitan dengan aksi gen terkait tumor lainnya seperti gen penekan tumor, gen anti apoptosis atau gen anti metastasis.

Perubahan dari proto-onkogen menjadi onkogen biasanya melibatkan mutasi *gain-of-function*. Setidaknya ada 3 mekanisme yang dapat memproduksi onkogen dari proto-onkogen yaitu :

1. *Point* mutasi di proto-onkogen hasil dari pengkodean produk protein.
2. Reduplikasi lokal dari segmen DNA yang didalamnya ada proto-onkogen.
3. Translokasi kromosom yang menyebabkan pengontrol pembelahan sel menjadi tidak terkontrol.

Gen penekan tumor atau anti onkogen secara normal mengatur pertumbuhan sel, diferensiasi dan memainkan peranan penting dalam perkembangan kanker pada sel normal. Gen penekan tumor bekerja sebagai perusak sel, gen ini mengkode protein yang menghambat pertumbuhan sel dan mencegah sel menjadi ganas.

Beberapa kanker timbul sebagai akibat hilangnya atau tidak berfungsinya gen penekan tumor secara sempurna. Kunci dari protein pengatur gen adalah gen ini dikode dari dua protein penekan tumor yaitu pRB dan P53. Bentuk aktif pRB bertindak sebagai penghambat replikasi DNA. Mutasi dari gen *pRb* menyebabkan setiap protein yang dihasilkan menjadi tidak aktif dan mengakibatkan pembelahan sel tidak terkendali. Gen *p16* dan *pRb* bertindak sebagai pengatur siklus sel.

Gen penekan tumor merupakan gen normal yang berperan untuk mencegah perkembangan neoplasma. Gen penekan tumor umumnya mengkode protein yang menghambat proliferasi sel. Kehilangan regulator ini dapat menyebabkan terjadinya kanker. Lima kelas protein yang biasa dikode oleh gen penekan tumor yaitu:

1. Protein intraselluler, seperti *p16 cyclin-dependent kinase inhibitor*, yang menghambat pembelahan melalui fase tertentu dari siklus sel.
2. Hormon reseptor yang fungsinya untuk menghambat pembelahan sel.
3. Protein pengontrol *checkpoint* yang menghambat siklus sel jika terjadi kerusakan DNA atau kromosom abnormal.
4. Protein yang bisa menginduksi apoptosis.
5. Enzim yang berperan dalam perbaikan DNA.

Transformasi sel normal menjadi sel kanker disertai dengan hilangnya fungsi dari satu atau lebih gen penekan tumor, seperti gen yang mengkode faktor transkripsi (*p53* dan *WT1*), dan pengatur siklus sel (*pRb* dan *p16*), *NF1*, *PTEN*, dan *VHL*. Sebagian besar dari protein-protein ini dikode melalui kerja gen penekan tumor sebagai penghambat proliferasi sel apabila pertumbuhan sel mulai tidak terkontrol. Pada sebagian besar kanker terjadi inaktivasi protein-protein yang berfungsi normal pada siklus sel termasuk *p16*.

2.6 APOPTOSIS

2.6.1 Pengertian apoptosis

Fenomena kehidupan seperti pada orang dewasa normal diperkirakan proses kematian sel terprogram (*programmed cell death*) sekitar 50 – 70 milyar sel setiap hari, diantaranya sekitar 5×10^{11} sel darah di musnahkan setiap hari. Kematian sel terprogram ini mempunyai arti sama pentingnya dengan proses pertumbuhan jutaan sel tubuh setiap hari. Mekanisme kematian sel dan pertumbuhan sel masive ini dikontrol sangat ketat dan bertanggung jawab atas terjadinya keseimbangan sel atau organ atau jaringan tubuh (*interior melliue* atau *homeostasis*). Kematian sel terprogram atau *programmed cell death* lazim disebut dengan istilah *apoptosis*. Kata *apoptosis* berasal dari bahasa Yunani (*Greek word*) berarti daun atau tunas jatuh berguguran dari pohon, diperkenalkan pertama kali oleh John Kerr, Andrew Wyllie dan Alistair Currie pada tahun 1972 dengan mengacu terbentuknya "badan apoptotic" (*apoptotic bodies*) (de Bruin, *et al.*, 2008; Cooper and Hausman, 2009; Dorsey, *et al.*, 2009; Malik, 2010).

Apoptosis merupakan proses aktif dalam mekanisme kematian sel terprogram, bersifat fisiologi dan melibatkan berbagai macam molekul protein dengan berbagai perubahan kimiawi dan fisik. Terjadi secara bertahap dan terorganisasi dengan rapi, termasuk perubahan-perubahan pada membrane sel, sitoplasma, inti sel, dan berakhir dengan kematian sel. Proses kematian ini berawal sel melepaskan diri dari sel sekitar dan terjadi kehilangan kontak dan akhirnya sel mengkerut. Dalam sitoplasma terjadi pelebaran *reticulum endoplasmic* dan sisterna membengkak membentuk vesikel dan vakuola. Sedangkan pada inti terjadi kondensasi kromatin membentuk agregat kompak dan padat dan kemudian terjadi fragmentasi inter-nukleosum oleh enzim *endonuklease* dan berakhir terbentuk badan apoptotik (*apoptotic bodies*). Kejadian tersebut

merupakan karakteristik morfologi spesifik pada sel mengalami *apoptosis*. Proses *apoptosis* ini tertata sangat rapi dan begitu bersih, sehingga semua komponen dari kerusakan sel atau hancur masih terbungkus rapi dan terlokalisir dengan baik. Sel mengalami *apoptosis* akan mengekspresikan *phosphatidyl serine* (PS) kepermukaan sebagai signal berfungsi untuk dikenali (*find-me*) dan dicerna (*eat me*) oleh sel profesional seperti *macrophages cells* dan *dendritic cells*, sehingga tidak menimbulkan reaksi radang, berbeda dengan kematian sel melalui mekanisme nekrosis dan *autophagy*. Nekrosis merupakan peristiwa kematian sel melalui proses pasif dan bersifat sinkronus dimana satu sel yang mati akan berdampak terhadap kematian sel sekitarnya. Karakteristik kematian sel nekrosis tampak terjadi berbagai perubahan struktur kimia dan fisik. Dimana dinding sel lisis sehingga partikel – partikel dalam sel keluar dan berserakan kemudian menyebabkan terjadi proses inflamasi. (Vermeulen, *et al.* 2005; de Bruin and Medema, 2008; Cooper and Hausman, 2009).

Kematian sel melalui proses *autophagy*, sering diterjemahkan dengan istilah *Self - eating*, suatu proses dimana terjadi degradasi komponen material dan organel – organel sitoplasma oleh enzim *lysosome* (*lysosome-mediated destruction*). Karakteristik enzim *lysosome* ini pertama kali diperkenalkan oleh Christian de Duve (1955), sebagai *membrane – bound compartment* mengandung asam (*acidic*) phosphatases. Kemudian *lysosome* lebih dikenal sebagai asam (*acidic*) mengandung berbagai macam asam (*acidic*) seperti acid hydrolases, nucleases, peptidases, proteases, phosphatases, sulfatases, glycosidases dan lipases. Dengan cara bekerja sama, enzim ini mendegradasi semua molekul – molekul dalam sel. Proses degradasi molekul – molekul ini kemudian dipakai kembali dalam proses biosintesis. Dikenal ada tiga *autophgy* antara lain : *Microautophagy* yaitu suatu proses invaginasi secara langsung berbagai material melalui membran lysosome; *Chaperone – mediated autophagy* yaitu suatu proses dengan mentarget protein – protein melalui *cis – squence* (KERFQ) oleh *chaperone* Hsc73 kemudian dibawa masuk ke dalam lysosome untuk didegradasi dan *Macroautophagy* disebut *autophagosome* dengan memanfaatkan *double - membrane* untuk mencerna sitoplasma serta organel – organel lebih besar seperti mitochondria (Dorsey, *et al.*, 2009).

Dalam proses *apoptosis* terjadi tiga fase utama : 1). fase inisiasi, dimana sel mulai mendapatkan setimulus untuk induksi *apoptosis*. 2). fase efektor, sel berkomitmen mengambil keputusan untuk mulai beraktivitas *apoptosis* 3). fase

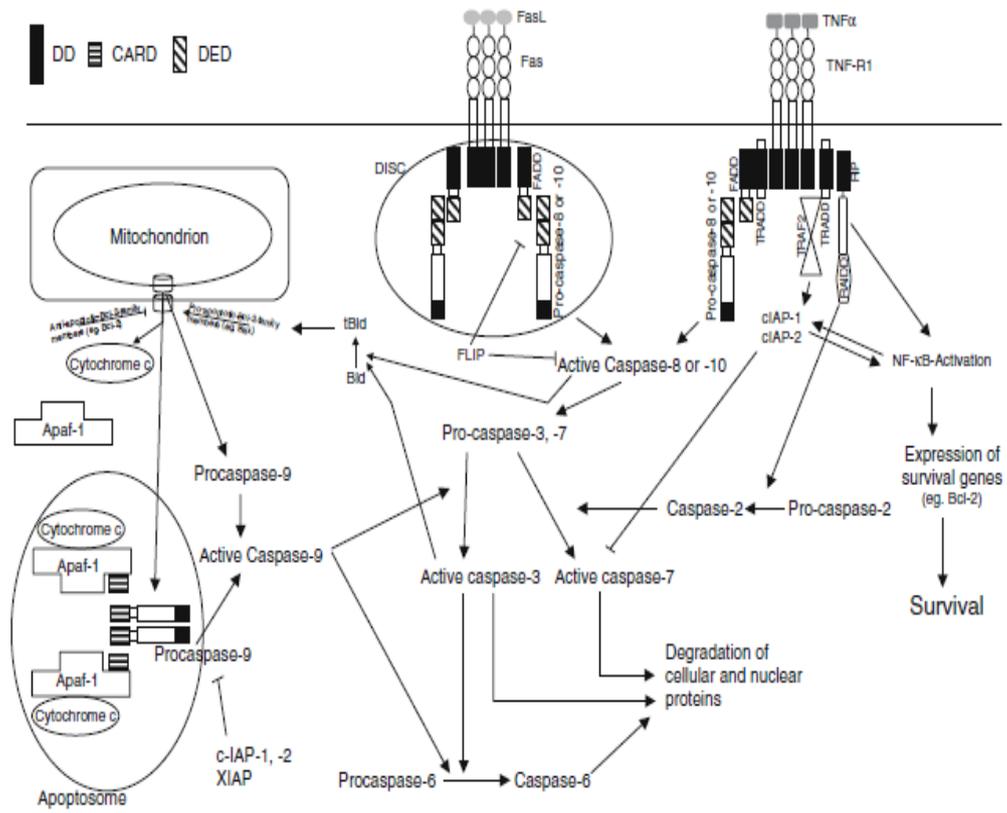
eksekusi, proses *apoptosis* mencapai tahap akhir dan sel memperlihatkan karakteristik biokimiawi dan morfologi *apoptosis* (Zornig, *et al.*, 2001; Malik, 2010).

Proses *apoptosis* terjadi dan di mulai karena adanya stimulus endogen (*growth factor deprivation*), maupun stimulus eksogen seperti ultraviolet, radiasi dan bahan-bahan kimia lain merusak DNA contohnya kemoterapi. Kerusakan DNA (*DNA damage*) ini merupakan salah satu prinsip dasar pencetus (*tiggers*) kematian sel terprogram dan awal usaha mengeliminasi sel-sel memiliki potensi untuk mutasi. Kegagalan kontrol terhadap proses *apoptosis* pada umumnya terjadi pada semua sel tumor, hal itu merupakan salah satu bagian dari mekanisme karsinogenesis. Sel tumor berusaha menghindari atau melepaskan diri dari ancaman *apoptosis* (*hallmark of cancer*), dimana sistem *apoptosis* merupakan penjaga keseimbangan antara sel tumbuh dan sel mati. Ada dua jalur utama (*basic pathways*) mekanisme *apoptosis* sudah banyak diteliti dan dapat menjelaskan bagaimana proses *apoptosis* terjadi. Kedua jalur tersebut antaralain : jalur eksternal (*extrinsic or death receptor-mediated pathway*) dan jalur internal (*intrinsic or mitochondrial pathway*). Jalur *apoptosis* lain, belum banyak diketahui seperti : *endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis* dan *caspase-independent apoptosis* (Vermeulen, *et al.* 2005; Elstrom and Thompson, 2008; Ellis and Horvitz, 2009; Hanahan and Weinberg, 2011).

Pada jalur eksternal (*extrinsic or death receptor-mediated pathway*), memicu terjadi *apoptosis* mulai dengan adanya kontak dan ikatan antara ligan dengan reseptor terletak pada membran sel. Reseptor tersebut yaitu *Tumor Necrosis Factor receptor superfamily* (TNF-R) seperti : Fas (Apo-1 atau CD95), *TNF-Receptor-1*(TNFR-1), *Death Receptor-3* (DR-3) atau *TNF-receptor-Related Apoptosis-Mediating Protein* (TRAMP) atau Apo-3, *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor-1* (TRAIL-R1 atau DR4), TRAIL-R2(DR / atau Apo-2) dan DR6. *Death receptor* banyak diteliti dengan baik adalah Fas *receptor*. Terjadinya ikatan antara reseptor dengan ligandnya (Fas –Fas ligand) akan menyebabkan terjadinya trimerisasi reseptor dan direkrutnya protein *adaptor* spesifik. Struktur anatomi Fas *receptor* terdiri dari *Death Domain* (DD) dalam sitoplasma tempat interaksi *adaptor* protein, *Fas-Associated Death Domain protein* (FADD) dan membentuk *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC). Disamping DD, FADD terdapat juga *Death Effector Domain* (DED) tempat dimana terjadinya pengrekrutan *caspase inisiator* seperti : *caspase-8*, *caspase-10* dan kemudian bergabung dalam DISC. *Inisiator caspase* sudah aktif (*procaspase-8,-10* menjadi

caspase-8,-10 aktif) selanjutnya akan mengaktifkan *caspase* efektor atau eksekutor (*effector caspase* atau *executor*), seperti *caspase-3,-6* dan *-7* akan mendegradasi target sel. *Death receptor* lainnya seperti TNF-R1 berikatan dengan *ligandnya* (TNF- α) memicu terjadinya trimerisasi dan membentuk ikatan dengan *TNF-R-Associated Death Domain protein* (TRADD) dan FADD kemudian mengaktifasi *procaspase-8,-10* menjadi *Caspase-8,-10* aktif dan kemudian mengaktifkan *Caspase* efektor atau eksekutor, seperti *caspase-3,-6* dan *-7* dan selanjutnya mendegradasi target sel. Mekanisme degradasi suatu target sel, *caspase* eksekutor mulai dengan aksi memecah berbagai substrat protein melalui proses proteolisis. Target *Caspase* substrat spesifik adalah *poly-(ADP-ribose) polymerase* (PARP) merupakan protein inti (*nuclear protein*) berperan dalam perbaikan DNA (*DNA-repair*). PARP merupakan protein spesifik sebagai target pertama *caspase* efektor atau eksekutor untuk dipecah sehingga peranan PARP untuk memperbaiki DNA terhambat. Pemecahan protein lain seperti *Inhibitor of Caspase-Activated DNAase* (ICAD / DFF45), kemudian menyebabkan *caspase-Activated DNAase* (CAD / DFF-40) berkesempatan aktif masuk kedalam inti (*translocate to nucleous*). *Caspase-Activated DNAase* (CAD / DFF-40) dalam inti bertanggung jawab atas terjadinya pemecahan DNA (*internucleosomal DNA cleavage*) dan kemudian terbentuk pecahan-pecahan DNA (*oligonucleosomal DNA fragments*). Perubahan biokimia dan morfologi ini sebagai karakteristik suatu kematian sel (*apoptosis*). Melalui *death receptor* ini (TNF-R) tidak sepenuhnya terjadi *apoptosis*, oleh karena dalam proses ini terjadi pula ikatan antara *TNF receptor-associated factor-2* (TRAF2) dengan TRADD dan kemudian merekrut *cellular Inhibitor of Apoptosis* (c-IAP-1 dan c-IAP-2), ikatan ini membentuk sinyal kemudian dapat memblokir aktivitas *Caspase-7* sebagai eksekutor target sel dan sinyal lain dapat mengaktifasi transkripsi gen anti *apoptosis* (Bcl-2) melalui aktivasi NF- κ B dan kemudian menyebabkan sel proliferasi. Bila TRADD berinteraksi dengan *receptor interaction protein* (RIP) akan membentuk sinyal mengaktifasi *transcription factor* NF- κ B, kemudian menyebabkan terjadinya transkripsi gen anti *apoptosis* (Bcl-2) dan berakhir dengan promosi sel berkembang (*cell survival*). Interaksi TRADD dengan RIP dapat pula membentuk sinyal lain dan mampu mengaktifasi *procaspase-2* menjadi *caspase-2* aktif dan kemudian mengaktifasi *procaspase-7* menjadi *caspase-7* aktif, sehingga terjadi proses degradasi target sel atau *apoptosis* (Vermeulen, et al. 2005; Wright, et al., 2007; Elstrom and Thompso, 2008; Cooper and Hausman, 2009; Malik, 2010)

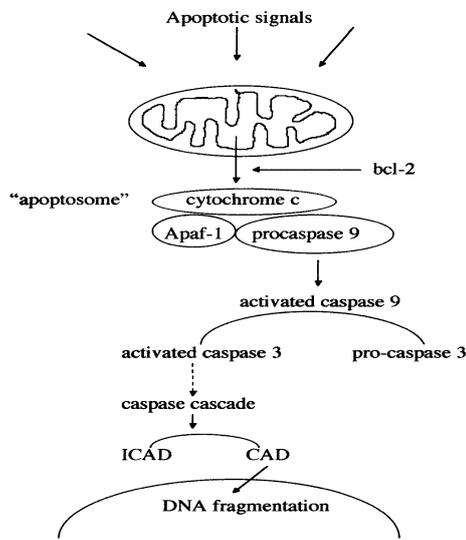
Pada jalur internal (*intrinsic or mitochondrial pathway*) oleh sesuatu peristiwa atau stres penyebab rusaknya DNA, seperti kemoterapi, radiasi dan peristiwa – peristiwa lainnya. Peristiwa ini akan mengawali sinyal *apoptosis* dengan dilepaskannya *cytochrom c* dan komponen *apoptosis* lainnya dari ruang antar membran mitokondria (*mitochondrial intermembrane space*) ke sitoplasma. *cytochrom c* akan berikatan dengan *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1), kemudian membentuk DISC atau disebut juga *apoptosome* sebesar 1 MDa, terdiri dari masing-masing 7 molekul Apaf-1, sitokrom c, (d) ATP dan akan mengaktivasi *procaspase-9* menjadi *caspase-9* (*inisiator caspase*) aktif. Kemudian kompleks ini akan mengaktifkan *caspase* efektor atau eksekutor (*caspase-3, -6 atau -7*). Aktivasi *caspase-3* diketahui akan memecah ICAD (*inhibitor caspase activated DNase*) / DFF-45 (*DNA Fragmentation Factor-45*) kemudian menyebabkan CAD (*caspase activated DNase*) / DFF-40 / CPAN (*DNA Fragmentation Factor-40*) secara aktif masuk kedalam inti sel dan berperan untuk memecah DNA dalam inti (*Intranucleosomal DNA cleavage*). Akhir dari proses tersebut terjadi eksekusi kematian sel atau *apoptosis*. Kedua jalur *apoptosis* ini tidak berjalan sendirian tetapi keduanya bekerja sama (*cross talk*) melalui peran p53 mengaktivasi famili Bcl-2 *proapoptosis*. Salah satu dari famili Bcl-2 adalah Bid dengan mengadakan kontak melalui tBid dan Bax, kemudian mengaktivasi *mitochondria* mengekspresikan *cytochrom C*. Proses *apoptosis* ini terjadi tergantung pada keseimbangan antara molekul- molekul *proapoptosis* (Bax, Bak, p53) dan *antiapoptosis* (Bcl-2, Bcl-Xl) (Gambar 2.4 dan 2.5) (Parton, *et al.* 2002; Vermeulen, *et al.* 2005; Wright, *et al.*, 2007; Elstrom and Thompson. 2008; Cooper and Hausman, 2009; Malik, 2010).



Gambar 2.6.1 Bagan Mekanisme Apoptosis (Vermeulen, et al., 2005. Ann Hematol)

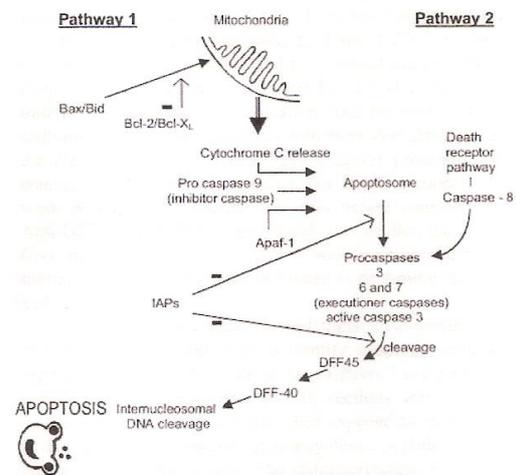
Jalur external apoptosis

(Extrinsic Pathway)

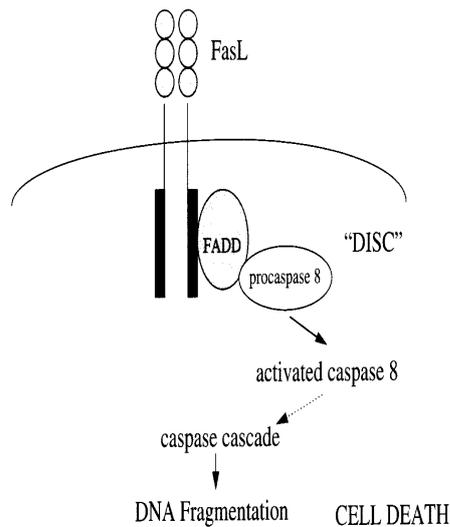


Jalur internal apoptosis

(Intrinsic Pathway)



(Intrinsic and Extrinsic Pathways)



Gambar 2.6.2. Bagan Mekanisme Apoptosis masing-masing jalur (Parton, et al. 2002. Clinical Cancer research)

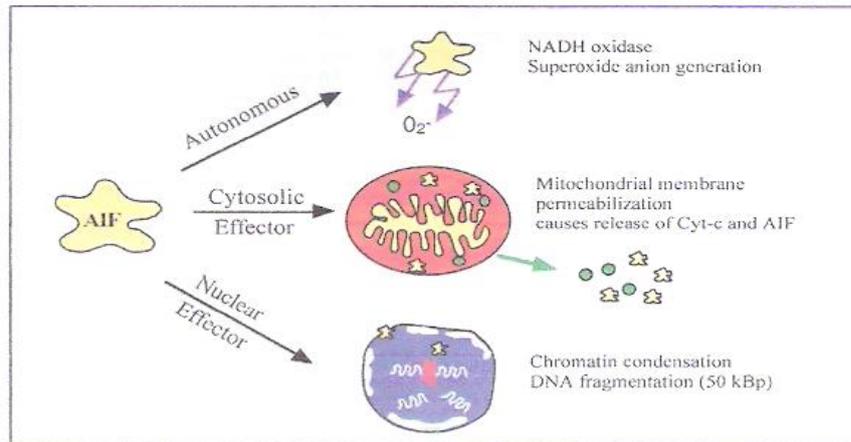
Jalur alternative (*alternate pathway*) seperti : *Endoplasmic Reticulum stress-induced apoptosis*. *Endoplasmic Reticulum* suatu *organela* dalam sitoplasma tempat dimana terdapat protein dalam bentuk mature seperti : protein dalam kondisi terlipat (*folding*) dan oligomerisasi sebagai hasil dari proses translasi sempurna. Bila didalam *endoplasmic riticulum* terdapat akumulasi protein–protein tidak mature seperti : protein

dalam kondisi tidak terlipat dengan benar (*misfolded*), maka akan menyebabkan terjadinya signal aktivasi terhadap *unfolded protein response* (UPR). Kondisi tersebut merangsang terjadi signal transduksi untuk memperbaiki protein dari *unfolded* menjadi *folding* protein. Pada kasus – kasus tertentu dimana terjadi kerusakan protein berlebihan dan tidak mampu diperbaiki, maka akan menimbulkan inisiasi untuk *apoptosis*. Mekanisme *apoptosis* melalui jalur ini melibatkan *mitochondria* dengan ditandai dilepaskannya *cytochrom-c*. Nampaknya *apoptosis* melalui jalur ini dihambat oleh *Bcl-2 family (antiapoptosis)* berlokasi didalam sel membrane *endoplasmic reticulum*. Disamping terdapat protein mature dalam *endoplasmic reticulum*, terdapat juga Ca^{++} dan keseimbangannya dikontrol oleh *Bcl-2 family (proapoptosis)*, bila terjadi gangguan keseimbangan atau terlepasnya Ca^{++} , ini akan mengaktifasi terjadi *apoptosis* dengan mempengaruhi membrane *mitochondria* atau *permiabelity transition pore (PTP)*. Peristiwa tersebut menyebabkan terjadi pelepasan *cytochrome-c* ke dalam sitoplasma dan juga secara langsung mengaktifasi *Caspase-12*. Mekanisme aktivasi *Caspase-12* belum diketahui secara pasti, namun diperkirakan ada dua faktor berperan yaitu : *Calpain- dependent removal of pro-domain* dan *self cleavage*. *Calpain* adalah Ca^{++} *dependent cytosolic cysteine protease*, dapat memediasi terjadinya *apoptosis* melalui *caspase-independent apoptosis pathway*. Disamping *Caspase-12*, ada melekul lain punya hubungan dengan *endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis* seperti : *Bap13* dimana melekul ini pengatur *procaspase-8* dan substrat *Caspase-8* itu sendiri (Vegran, *et al.*, 2006).

Jalur alternatif lain seperti : *Caspase-independent apoptosis pathway*. Beberapa sel mati tidak mudah dibedakan bahwa itu sel *apoptosis* atau sel nekrosis. Bila terjadi kematian sel dengan menampilkan melekul Z- VAD.fmk (*Caspase inhibitor*) tanpa terjadi fragmentasi DNA, kondensasi DNA atau *Caspase activation*, itu menunjukkan kematian sel melalui proses *apoptosis*. Molekul Z-VAD.fmk merupakan melekul protein menghambat kerja *Caspase* dengan cara mengadakan ikatan permanen pada bagian katalitik (*catalytic site*) semua *caspase*. Ikatan tersebut menyebabkan terjadinya *aspartic acid residue* menyerupai *cleavage site* dan *fluoromethyl ketone (fmk) group* membentuk *covalent inhibitor-enzyme complex*. Bila proses *apoptosis* hanya melibatkan *Caspase* saja maka sel akan hidup kembali bila diterapi atau dengan adanya Z-VAD.fmk. Hal inilah disebut kematian sel tidak tergantung dengan *caspase* (*caspase-independent apoptosis*). Kematian sel melalui jalur ini tidak selamanya

terbukti dengan kehadiran molekul Z-VAD.fmk. Suatu penelitian menunjukkan bahwa kematian sel melalui inisiasi *Bax-triggered cell death* dan perubahan permeabilitas membran *mitochondria* menyebabkan lepasnya *cytochrome-c* dan *apoptosis-inducing factor* (AIF) tidak terbukti dipengaruhi oleh Z-VAD.fmk. Bukti lain juga menjelaskan bahwa kematian sel melalui induksi TNF pada sel tertentu membutuhkan *caspase* dan contoh lain seperti kematian sel melalui proses nekrosis tanpa membutuhkan aktivasi *caspase*. Enzim bukan *caspase* (*non-caspase proteases*) lain seperti : *capthensins*, *calpains*, dan *serin protease* (granzyme A atau B dan Omi atau HtrA2) memiliki peran seperti *caspase* dalam proses *apoptosis*. Protein-protein ini dapat bekerja sama dengan *caspase* tapi dapat juga sebagai *triggers caspase-independent apoptosis* (Vermeulen, *et al.*, 2005).

Proses kematian sel melalui jalur *caspase-independent* ini lebih tegas dijelaskan pada AIF (*Apoptosis-inducing Factor*) merupakan suatu *phylogenetically* terdapat diantara membran *mitochondria* sebagai flavoprotein (*mitochondria intermembrane flavoprotein*) memiliki kemampuan unik untuk induksi terjadinya kondensasi chromatin dan fragmentasi DNA tanpa tergantung pada peranan *caspase* (*caspase-independen*). Pada mekanisme *apoptosis*, AIF berpartisipasi dalam mengatur permeabel membran *mitochondria* (*apoptotic mitochondria membrane permeabilization*) dan menunjukkan aktivitas *NADH oxidase*. Pada peristiwa induksi *apoptosis*, AIF akan masuk (*translocates*) kedalam sitoplasma dan kedalam inti sel, kemudian dalam sitoplasma berpengaruh terhadap *mitochondria* untuk mengeluarkan *cytochrome-c* dan AIF, sedangkan didalam inti berperan sebagai penyebab terjadinya proses kondensasi chromatin. Pada binatang coba, bila diinjeksi dengan *anti-AIF antibodies* atau dibersihkan (*knockout*) gen AIF telah didemonstrasikan bahwa AIF diperlukan selama proses *apoptosis*. AIF menjadi faktor penting dalam proses *apoptosis* dan menjadi peristiwa pertama pada *caspase-independent apoptosis pathway*.(Cande, *et al.*, 2002).



Gambar 2.6.3. Bagan Triggers Caspase-independent Apoptosis
(Cande, et al., 2002).

Apoptosis sebagai proses kematian sel terprogram terkontrol ketat oleh genetik, bila terjadi kegagalan fungsi dari *apoptosis* ini akan memberikan kontribusi terjadinya tumorigenesis dan kemoresisten pada kanker payudara (Vegran, et al., 2006).

2.6.2 mRNA caspase-3

Kejadian *apoptosis* begitu penting sehingga proses ini dipertahankan mulai organisme tingkat paling rendah sampai tingkat tinggi. Kejadian ini pertama kali diperkenalkan pada tahun 1960an sebagai suatu kejadian normal tentang proses kematian sel sangat teratur, spesifik dan dapat diamati secara sistematis pada makhluk hidup sederhana sejenis cacing nematode *Caenorhabditis Elegans* (*C. Elegans*). Secara fisik jenis cacing ini transparan sehingga perubahan *apoptosis* terjadi dapat diamati secara sistimatis dan teratur. Pada awal penemuan ini diisolasi gen - gen berhubungan dengan kematian disebut *ced-3* dan kemudian disusul dengan penemuan-penemuan jenis lain seperti *ced-4* dan *ced-9*. Penemuan gen kemudian pada makhluk dengan tingkatan lebih tinggi seperti lalat buah *Drosophila Melanogaster* dan pada mamalia dengan susunan lebih kompleks. Pada proses *cloning* dan *sequencing* nukleotida, bahwa gen *ced-3* mengcode *protease* dan sekarang telah diketahui *ced-3* merupakan belasan *prototype protease family* disebut *caspase* oleh karena memiliki *cystein* (C) dan *aspartic acid* (Asp). Gen tersebut memiliki spesifisitas berbeda seperti *ced-3* dan *ced-4* adalah gen berperan sebagai *proapoptosis*, sebaliknya gen *ced-9* adalah gen ketiga diidentifikasi berperan sebagai *antiapoptosis*. Ketiga gen tersebut memiliki homologi

dengan gen pada manusia, yaitu ced-3 identik dengan *Caspases* - 3, ced-4 identik dengan *apoptotic protease - activating factor-1* (=Apaf-1) sedangkan ced-9 identik dengan keluarga bcl-2. Ced-3 mengkode protein mirip dengan enzim *Interleukin (IL)-1 β -converting Enzyme* (ICE), kemudian akan mengantar sel ke proses *apoptosis*. Pada mamalia, ICE sendiri tidak langsung bertanggung jawab pada proses *apoptosis*, tetapi beberapa tipe *ICE - like proteases* disebut sebagai *caspases* (*Cystein Aspartyl - Specific Proteases*) bertanggungjawab pada kaskade *apoptosis*. Khususnya *caspase-3* merupakan *caspase* terminal (*downstream*) dalam proses *apoptosis* berlokasi pada kromosom 4q34 terdiri dari varian alfa dan beta dengan struktur anatomi masing – masing tersusun dari pasangan nukleotida berjumlah 2689 bp dan 2522 bp. Masing – masing memiliki *coding sequence* (CDS) 833 bp, mampu bertranslasi membentuk protein (Vermeulen, *et al.*, 2005; Manuaba, 2006; Anonim, 2011).

Normal *caspases* dalam kondisi tidak aktif (*procaspases*). *caspase* mampu mengaktivasi diri sendiri (*autoactivation*) dan sekali *caspase* teraktivasi, akan terjadi aktivasi pada *caspases* lain sehingga terjadilah kaskade *proteolisis*. Sampai saat ini telah dikenal kurang lebih 14 macam *caspases*, tujuh diantaranya bertanggung jawab pada proses *apoptosis* antara lain : empat *Caspases* sebagai inisiator (-2, -8, -9, dan -10) dan tiga *caspases* sebagai eksekutor atau efektor (-3, -6, dan -7) dan tujuh lainnya berkontribusi terhadap inflamasi. *Caspase* inisiator teraktivasi sebagai respon terhadap signal untuk memulai *apoptosis* sedangkan *caspases* efektor atau eksekutor akan melanjutkan proses *apoptosis* dan menimbulkan fragmentasi DNA dan diakhiri dengan kematian sel. Pada fase terakhir ini, terdapat satu faktor penting untuk aktivasi *caspases* efektor atau eksekutor yaitu *cytochrome c*, suatu komponen *mitochondria* berhubungan dengan proses respirasi. *Cytochrome c* mengaktivasi satu elemen *caspases* sentral penting yaitu *caspases-3* dan menyebabkan fragmentasi nukleus. *Cytochrome c* bersifat *proapoptosis* dan dapat dihambat oleh BCL-2 sebagai protein *antiapoptosis*. Ternyata *cytochrome c* ini sesuai dengan Apaf-2, sedangkan ced-4 adalah sesuai dengan Apaf-1 pada mamalia. Mekanisme pelepasan *cytochrome c* dari *mitochondria* belum sepenuhnya diketahui, namun diperkirakan terjadi oleh karena adanya *mitochondria permeability transition pore* (PTP) terletak pada pertemuan antara membran luar dan dalam *mitochondria* (*contact site outer & inner mitochondria membrane*). Komponen utama PTP ini adalah *adenine translocator* (ANT) pada membran dalam dan *voltage-dependent anion channel* (VDAC) disebut *porin* pada membran luar. Terbukanya *pore*

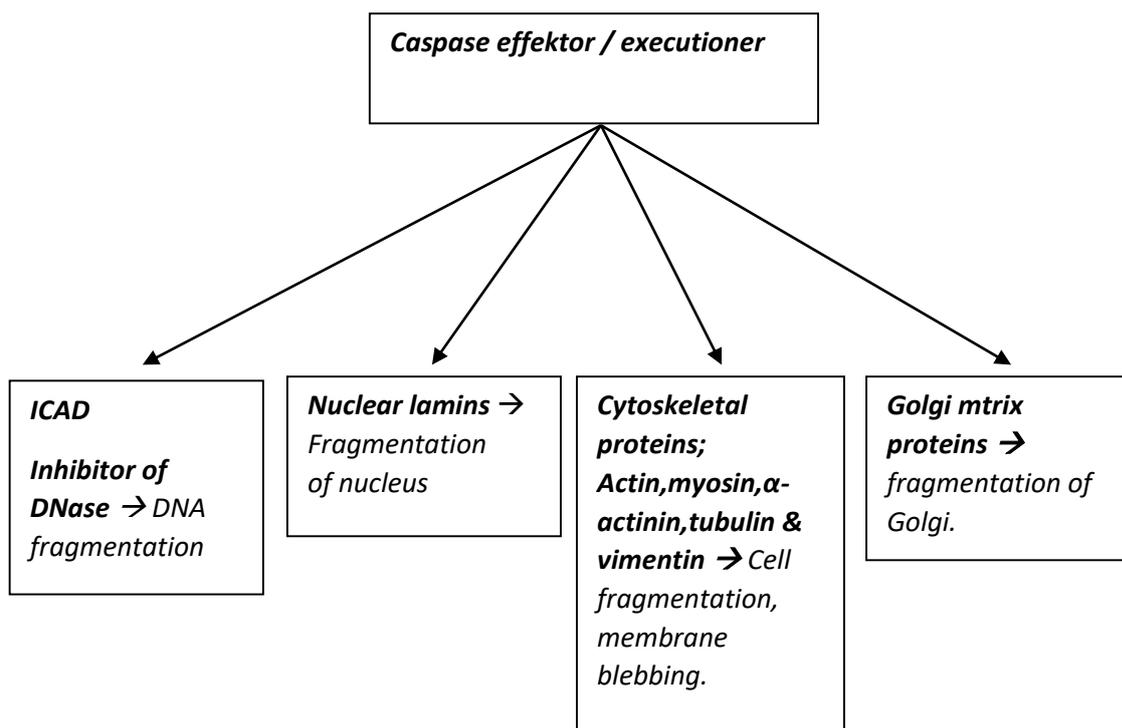
ini dipengaruhi oleh antara lain : *ions* (Ca^{++} & Mg^{++}), *protons*, konsentrasi ADP atau ATP, *mitochondria membrane potential* dan perubahan komposisi atau fungsi dari famili Bcl-2. Dengan adanya signal kematian, dinding *mitochondria* akan mengalami kerusakan, ditandai dengan terbukanya *porus* atau *pori*, kemudian *mitochondria* akan melepaskan *cytochrome c*, dan berinteraksi dengan Apaf-1, bersama ATP (sebagai sumber energi), membentuk kompleks komponen disebut DISC (*death induce signalling complex*) atau *apoptosome*. *Apoptosome* akan mengaktivasi *procaspase-9* menjadi *Caspase-9* aktif, selanjutnya kaskade *apoptosis* menjadi semakin ke distal, dimana *Caspase-9* mengaktivasi *procaspase-3* menjadi *caspase-3* aktif dan akhirnya *caspase-3* akan menjadi elemen *protease* penting dalam mekanisme *apoptosis* dan sebagai akibat terjadinya fragmentasi DNA, degradasi komponen skeleton sel seperti *actins* dan *lamins*. (Vermeulen, *et al.*, 2005; Elstrom and Thompson, 2008; Cooper and Hausman, 2009; Dorsey, *et al.*, 2009; Malik, 2010).

Suatu penelitian tentang peran masing – masing *caspase* seperti *caspase -3*, - 7 dan - 9 mengatakan bahwa, *caspase-9*, -3 dan -7 masing – masing mempunyai fungsi berbeda - beda pada proses *apoptosis* seperti : *caspase-9* berfungsi sebagai *remodelling mitochondria* dan meningkatkan produksi *reactive oxygene species* / ROS dengan cara membelah Bid menjadi tBid sedangkan *caspase-3* menghambat produksi *reactive oxygen species* / ROS dan berperan penting pada proses kematian sel atau *apoptosis*. Berbeda dengan *caspase-7* sebagai *caspase* eksekutor tidak signifikan memiliki peran dalam mekanisme kematian sel melalui jalur *intrinsic (Intrinsic Pathway)* tetapi bertanggung jawab dengan produksi ROS dan pelepasan sel *apoptosis* (Brentnall, *et al.*, 2013)

Banyak faktor prediktor telah establish mempengaruhi respon sistemik NAC seperti: umur penderita, ukuran tumor, stadium, grading, status histology, status reseptor estrogen, Her-2, Ki-67 dan lain-lain. Dari hasil penelitian, ternyata tidak ada memberikan hasil konsisten dan sebegini besar faktor tersebut tidak memberi pengaruh dan faktor di atas dikatakan sebagai petanda biologi tidak tergantung pada regimen atau kombinasi obat kemoterapi (Hortobagyi, *et al.*, 2010).

Kemoterapi pada umumnya bekerja dengan cara merusak DNA dan hasil akhir terjadi kematian sel (*apoptosis*). *Apoptosis* sebagai suatu petanda biologi menentukan ada tidaknya respon kemoterapi melalui proses *caspase cascade*. *Caspase-3* disebut-

sebut sebagai *caspase* efektor atau eksekutor merupakan melekul protein (*enzyme*) menjadi kunci sentral pada kematian sel dengan salah satu target ICAD (*inhibitors of DNase*), bila diinaktivasi atau dibelah akan menyebabkan fragmentasi DNA, target lain seperti : *nuclear lamins* akan terjadi fragmentasi nucleus, terhadap *cytoskeletal proteins* (*actin, myosin, alpa-actinin, tubulin dan vementin*) akan terjadi fragmentasi sel dan *memberane blebbing* dan terhadap *Golgi matrix proteins* akan menyebabkan fragmentasi badan *Golgi* (gambar 2.7) (Ellis and Horvitz, 2009).



Gambar 2.6.4. Bagan Caspase effector (Ellis and Horvitz, 2009)

Caspase-3 sebagai *caspase* efektor atau eksekutor, telah dilaporkan dari beberapa penelitian, bahwa *caspase-3* cenderung dapat dipakai sebagai faktor prediktor terhadap respon NAC pada kanker payudara namun secara statistik memerlukan evaluasi dan penelitian dengan jumlah sampel lebih besar (Sharma, *et al.*, 2008) dan penelitian lain tentang faktor-faktor berkaitan dengan proses *apoptosis* dilaporkan bahwa, jumlah *apoptosis* dan ekspresi Bcl-2, merupakan faktor prediktor respon LABC pada pemberian kemoterapi kombinasi regimen CAF / CEF, sedangkan p53 tidak menunjukkan angka signifikan (Manuaba, 2006).

Penelitian *in vivo* pada kanker payudara dengan pemberian sebelum dan 24 jam setelah kemoterapi menunjukkan bahwa, hubungan antara komponen apoptosis (*active caspase-3*) dan komponen proliferasi (*expression of inhibitor of apoptosis protein /*

XIAP), 24 jam setelah kemoterapi secara signifikan menunjukkan peningkatan *apoptosis* dan penurunan proliferasi. Induksi kemoterapi dapat menginduksi proses *apoptosis* melalui peningkatan aktivasi *Bax* dan aktivasi *caspase-3* memecah substrat protein DFF-40 dan kemudian terjadi proses fragmentasi DNA dalam inti (*intranucleosomal DNA cleavage*) (Parton, *et al.*, 2002).

Penelitian lain dengan mempergunakan *cell line* (MCF-7) kanker payudara menunjukkan bahwa, defisiensi ekspresi *caspase-3* berpengaruh terhadap proses *apoptosis* sebagai respon kemoterapi (*doxorubicin*) dan merupakan faktor penting dalam pertumbuhan sel tumor (Devarajan, *et al.* 2002). Dilaporkan juga hasil penelitian bahwa fungsi antagonis diantara dua transkripsi *Caspase-3* dengan ratio tingkat ekspresinya menentukan LABC mana lebih menguntungkan terhadap pemberian NAC dengan komponen cyclophosphamide (Vegran, *et al.*, 2006).

Penelitian dengan sel kultur (*cell lines*) MCF-7, mempergunakan celastrol suatu zat aktif diisolasi dari *tripterygium regelii* mampu menginduksi *apoptosis* melalui aktivasi protein caspases (*caspase family proteins*). Celastrol juga mampu mengaktifasi memecah PARP, *caspase-8* memecah bid, pelepasan *cytochrome - c* dan AIF, menghambat *anti - apoptosis* Bcl-2 dan meningaktifasi protein *pro-apoptosis* Bax (Yang, *et al.*, 2011).

2.6.3 Indek Apoptosis

Apoptosis merupakan proses kematian sel terprogram dengan karakteristik adanya badan apoptotik (*apoptotic bodies*). Badan apoptotik itu sendiri merupakan bagian DNA mengalami degradasi berupa fragmen-fragmen intranukleusum terbungkus rapi dalam membran inti. Perbandingan antara jumlah sel mati dengan jumlah sel dihitung perlapang pandang (dikonversi per 1000 sel) atau presentase dari jumlah sel mati dari semua sel dihitung disebut Indek *apoptosis* (*Apoptosis Index*). Penilaian Indek *apoptosis* dihitung berdasarkan setidaknya-tidaknya 3.000 sel kanker dalam pembesaran 400 kali. (Potten. 1996; Burcombe, *et al.*, 2008).

Berbagai faktor diperkirakan mempunyai hubungan dengan respon NAC pada penderita LABC seperti : usia penderita, ukuran tumor, status menstruasi, jenis histopatologis, *grading* histologis, status receptor estrogen atau progesterone. Melihat dari hasil penelitian yang sudah ada, bahwa tidak ada petanda biologi tunggal (*single biomarker*) dapat membuktikan secara akurat adanya respon kemoterapi dan sebagian

besar faktor tersebut tidak mempunyai pengaruh. Faktor-faktor tersebut di atas dikatakan sebagai faktor atau petanda biologi tidak tergantung pada regimen atau kombinasi obat kemoterapi (Burcombe, *et al.*, 2008; Hartobagyi, *et al.*, 2010).

Hingga saat ini, penggunaan faktor-faktor klinis dan histopatologis telah banyak dipakai untuk menentukan respon terhadap pemberian NAC pada LABC, tetapi sejauh ini hasilnya belum ada satupun faktor prediktor akurat dan independen memprediksi respon kemoterapi. Namun demikian faktor klinis berhubungan dengan respon kemoterapi dan terbukti bermakna memperpanjang DFS adalah bila terjadi respon klinis komplrit (cCR) dan faktor histopatologi bermakna memperpanjang DFS dan OS bila terjadi respon histopatologi komplrit (pCR) (Cleator, *et al.*, 2005).

Kemoterapi berbasis *anthracyclines* bekerja melalui inhibisi topoisomerase II, merupakan enzim mengregulasi perubahan topologi dalam DNA. *Anthracyclines* juga berperan menghambat kemampuan enzim *helicase*. Hambatan ini menyebabkan terjadinya degradasi DNA dan diikuti dengan peningkatan *apoptosis* dari jaringan tumor. *Apoptosis* hanya akan berjalan normal apabila fungsi dan peran dari keluarga BCL-2 dan P53 bekerja dengan baik. Kerusakan dari proses *apoptosis*, BCL-2 dan P53, diperkirakan akan berpengaruh terhadap sensitifitas atau resistensi tumor terhadap kemoterapi (Coon, 2002; Vermeulen, *et al.*, 2005).

Apoptosis dikatakan sebagai suatu petanda biologi menentukan ada atau tidak respon terhadap pemberian kemoterapi preoperatif ditunjukkan dengan adanya peningkatan *apoptosis* (Indeks *apoptosis*). Peningkatan *apoptosis* dikatakan bermakna, terutama pada pasien dengan respon kemoterapi positif dibandingkan dengan pemberian *placebo*. Dilaporkan juga bahwa tumor dengan *apoptosis* tinggi, lebih sensitif dengan pemberian kemoterapi dan Indeks *apoptosis* juga dilaporkan meningkat secara significant setelah 24 jam pemberian kemoterapi (Dowsett, *et al.*, 1999).

Tiezzi, *et al.*, (2006) melaporkan bahwa adanya korelasi antara kenaikan indeks *apoptosis* dengan respon kemoterapi *neoadjuvant* sedangkan Burcombe, *et al.*, (2005) dalam penelitiannya mengatakan bahwa nilai klinis pada awal perubahan petanda biologi selama kemoterapi belum memberikan suatu kesimpulan signifikan dan tidak disarankan mempergunakan sebelum penelitian-penelitian prospektif lanjutan tentang petanda biologi dapat membuktikannya. Peneliti lain melaporkan bahwa peningkatan

Indek *apoptosis* pasca kemoterapi *neoadjuvant* siklus pertama berhubungan dengan respon kemoterapi positif pada *LABC* (Ali, *et al.*, 2011).

Penelitian klinis lain, tentang faktor-faktor terkait dengan proses *apoptosis* melaporkan bahwa, jumlah *apoptosis* dan ekspresi Bcl-2, merupakan faktor prediktif respon NAC dengan regimen CAF / CEF pada penderita *LABC* (Manuaba, 2006). Laporan suatu penelitian awal tentang perubahan petanda biologi tumor (Bcl-2, Indeks *apoptosis* dan *caspase-3*) terjadi 24 – 48 jam setelah pemberian NAC siklus I dan hasil perubahan tersebut cenderung dapat dipakai sebagai faktor yang dapat memprediksi respon kemoterapi. Tetapi secara statistik hasil tersebut masih perlu penelitian dengan jumlah sampel (*sample size*) lebih besar (Sharma, *et al.*, (2009).

2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.7.1 Definisi

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan sebuah teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi untuk memperkuat satu atau beberapa salinan dari sepotong DNA hingga beberapa lipat (10¹¹-10¹² salinan) dari urutan DNA tertentu. Hal tersebut melibatkan siklus berulang dari tiga langkah : denaturasi , anil dan ekstensi. Denaturasi terjadi pada ~ 95 °C selama 30 detik untuk 1 menit , menyebabkan dsstranded DNA yang akan dipisahkan menjadi ss - DNA. Di anil langkah , primer membentuk dasar-pasangan dengan situs tertentu dalam ss - DNA karena melengkapi basis. Mengikuti lampiran primer ke DNA , DNA polimerase yang bersifat stabil akan mengkatalisis penggabungan deoksiribonukleotida menjadi DNA.

2.7.2 Aplikasi PCR

PCR membantu dalam penyelidikan dan diagnosis semakin banyak penyakit. Hal ini juga lama menjadi metode standar di semua laboratorium yang melakukan penelitian atau dengan asam nukleat. Bahkan bersaing teknik seperti chip DNA sering membutuhkan amplifikasi DNA dengan cara PCR sebagai langkah awal yang penting. Polymerase chain reaction digunakan oleh spektrum yang luas dari para ilmuwan di berbagai terus meningkat dari disiplin ilmu. Penggunaan terbalik transkriptase untuk mengevaluasi tingkat RNA dan perluasan teknologi PCR untuk mengukur amplifikasi DNA secara real time telah membawa kemajuan besar untuk aplikasi PCR. Dengan

membiarkan penentuan dan kuantifikasi perubahan dalam ekspresi gen, teknik ini telah memberikan pemahaman yang lebih besar dari proses penyakit dan sekarang berfungsi sebagai dasar untuk diagnosa dan dasar research. Ilmu dalam mikrobiologi dan biologi molekuler, misalnya, PCR digunakan dalam penelitian laboratorium dalam prosedur kloning DNA, Southern blotting, sekuensing DNA, teknologi DNA rekombinan, untuk nama tapi beberapa. Di laboratorium mikrobiologi klinik PCR sangat berharga untuk diagnosis infeksi mikroba dan studi epidemiologi. PCR juga digunakan dalam forensik laboratorium dan ini sangat berguna karena hanya sejumlah kecil DNA asli diperlukan, misalnya, DNA yang cukup dapat diperoleh dari tetesan darah atau sehelai rambut. Bahkan, sejumlah percobaan menggunakan PCR untuk mendeteksi berbagai bakteri dalam spesimen CSF telah reported. Sejak budaya *C. pneumoniae* sulit di sebagian besar laboratorium klinis, penentuan bakteri ini di spesimen klinis telah banyak dilakukan dengan menggunakan teknik PCR meskipun tidak ada metode PCR standar untuk mendeteksi organisme ini. Bersarang PCR adalah salah satu protokol ini untuk mendeteksi hanya beberapa bakteri di specimens.

Klinis kualitatif PCR tentu saja dapat digunakan untuk mendeteksi tidak hanya gen manusia tetapi juga gen dari bakteri dan virus. Oleh karena itu salah satu aplikasi medis yang paling penting dari metode PCR klasik adalah deteksi patogen. Banyak virus mengandung RNA bukan DNA. Dalam kasus tersebut genom virus harus ditranskripsikan sebelum PCR dilakukan, dan karena itu RTPCR digunakan. Kadang-kadang juga diperlukan untuk mendeteksi patogen luar tubuh. Untungnya, metode PCR dapat mendeteksi DNA dari mikroorganisme dalam sampel, apakah cairan tubuh, bahan makanan atau air minum. PCR kuantitatif memberikan informasi tambahan di luar deteksi belaka DNA. Hal ini menunjukkan tidak hanya apakah segmen DNA tertentu hadir dalam sampel, tetapi juga berapa banyak dari itu ada. Informasi ini diperlukan dalam sejumlah aplikasi mulai dari tes diagnostik medis melalui pencarian target untuk penelitian dasar. Aplikasi lain yang penting dari PCR kuantitatif dalam diagnosis molekuler, yaitu diagnosis penyakit berdasarkan temuan molekuler bukan pada gejala fisiologis. Dalam hubungan ini diagnosis penyakit virus merupakan daerah yang mendapatkan pentingnya peningkatan. PCR adalah tes yang paling sensitif untuk virus herpes simplex, virus varicella-zoster, dan infeksi human papillomavirus. kegunaan diagnostik lainnya, termasuk tes untuk penyakit genetik, kanker, dan penyakit menular lainnya, adalah aplikasi penting evolving. Kuantitatif PCR digunakan juga dalam

bidang penyakit menular adalah AIDS. Hal ini dapat mendeteksi virus AIDS lebih cepat selama beberapa minggu pertama setelah infeksi daripada uji ELISA standar.

Faktor genetik selalu terlibat dalam perkembangan kanker. Kontribusi mereka sangat bervariasi tergantung pada jenis kanker. Gen tidak hanya membantu untuk menentukan perkembangan penyakit tetapi juga dapat memiliki pengaruh besar pada efektivitas perawatan yang tersedia. Mengidentifikasi gen yang berperan dalam perkembangan kanker karena merupakan langkah penting dalam meningkatkan perawatan.

Kualitatif dan kuantitatif PCR memainkan peran penting dalam melawan kanker. PCR dapat mengidentifikasi gen yang telah terlibat dalam perkembangan kanker. Ada banyak aplikasi untuk real-time PCR di laboratorium. Hal ini umumnya digunakan untuk kedua penelitian dasar dan digunakan sebagai alat untuk mendeteksi penyakit yang baru muncul, seperti flu, dalam tes diagnostik. Digital PCR memiliki banyak aplikasi potensial, termasuk deteksi dan kuantifikasi patogen tingkat rendah, urutan genetik langka, jumlah copy variasi, dan ekspresi gen relatif dalam sel tunggal. Amplifikasi klonal diaktifkan oleh satu langkah digital PCR merupakan faktor kunci dalam mengurangi waktu dan biaya banyak metode "generasi berikutnya sequencing" dan karenanya memungkinkan genomics. pribadi Inverse PCR sangat berguna untuk penentuan lokasi insert. Misalnya, berbagai retrovirus dan transposon secara acak mengintegrasikan ke dalam DNA genom. Untuk mengidentifikasi situs di mana mereka telah masuk, diketahui, "internal" virus atau transposon urutan dapat digunakan untuk merancang primer yang akan memperkuat sebagian kecil dari mengapit, genom DNA. Bersarang polymerase chain reaction "eksternal" adalah bagian kunci banyak laboratorium genetika penelitian, bersama dengan kegunaan dalam sidik jari DNA untuk forensik dan kasus genetik manusia lainnya. Konvensional PCR membutuhkan primer melengkapi termini dari DNA target. Masalah sering terjadi adalah primer 'mengikat daerah yang salah dari DNA, memberikan products.¹⁶ tak terduga RT-PCR umumnya digunakan dalam mempelajari genom virus yang genom terdiri dari RNA, seperti virus A Influenza dan retrovirus seperti HIV. PCR dapat digunakan untuk diagnosis leishmaniasis visceral India dengan akurasi besar. PCR juga dapat digunakan dengan presisi yang signifikan untuk memprediksi penyembuhan dari disease.²⁴ kloning Molekuler telah mendapatkan manfaat dari munculnya PCR sebagai teknik. kloning langsung pertama kali dilakukan menggunakan fragmen DNA diamplifikasi

dengan PCR dan oligonukleotida primer yang berisi pembatasansitus pengakuan endonuklease ditambahkan ke mereka 5 'ujungnya.

2.7.3 Tipe PCR

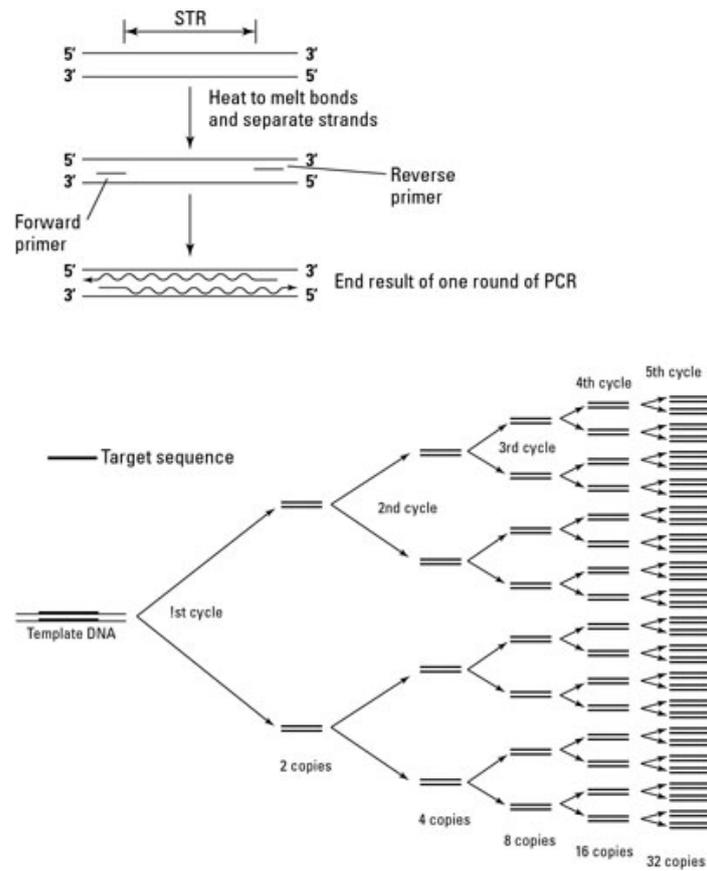
1. **Nested PCR** - Digunakan untuk mensintesis produk yang lebih handal - PCR menggunakan satu set luar primer dan produk PCR ini digunakan untuk reaksi PCR lanjut menggunakan *inner set* primer.
2. **Inverse PCR** – Digunakan untuk amplifikasi urutan yang telah dikenal. DNA dicerna, fragmen yang diinginkan disirkularisasi dengan ligasi, kemudian PCR menggunakan komplement primer untuk melengkapi urutan dikenal dan diperluas.
3. **AP-PCR (*arbitrary primed*) / RAPD (*random amplified polymorphic DNA*)** - metode untuk membuat genom sidik jari dari spesies dengan urutan sasaran sedikit diketahui dengan memperkuat menggunakan oligonukleotida *arbitrary*. Hal ini biasanya dilakukan pada kekuatan rendah dan kemudian tinggi untuk menentukan keterkaitan dari spesies atau untuk analisis Restriction Fragment Length Polimorfisme (RFLP).
4. **RT-PCR (*reverse transcriptase*)** - menggunakan RNA-*directed* DNA polimerase untuk mensintesis cDNA yang kemudian digunakan untuk PCR dan sangat sensitif untuk mendeteksi ekspresi urutan tertentu dalam jaringan atau sel. Hal ini juga dapat digunakan untuk mengukur transkrip mRNA.
5. **RACE (*rapid amplification cDNA ends*)** - digunakan dimana informasi tentang DNA urutan / protein terbatas. Memperkuat 3 'atau 5' ujung cDNA akan menghasilkan fragmen cDNA dengan hanya satu primer spesifik masing-masing (+ Satu adaptor primer). Produk RACE yang bersifat tumpang tindih kemudian dapat dikombinasikan untuk menghasilkan cDNA yang lengkap.
6. **DD-PCR (*display diferensial*)** - digunakan untuk mengidentifikasi gen diferensial yang diekspresikan pada jaringan yang berbeda. Langkah pertama melibatkan RT-PCR, kemudian amplifikasi menggunakan primer singkat dan nonspesifik. Didapatkan serangkaian *band* pada gel resolusi tinggi dan dibandingkan dengan yang didapat dari jaringan lain, *band*

apapun yang unik pada sampel tunggal dianggap diekspresikan secara berbeda.

7. **Multiplex-PCR** - 2 atau lebih unik target urutan DNA dalam spesimen yang sama diperkuat serentak. Satu dapat digunakan sebagai kontrol untuk memverifikasi integritas PCR. Selain itu, dapat juga digunakan untuk analisis mutasi dan identifikasi patogen.

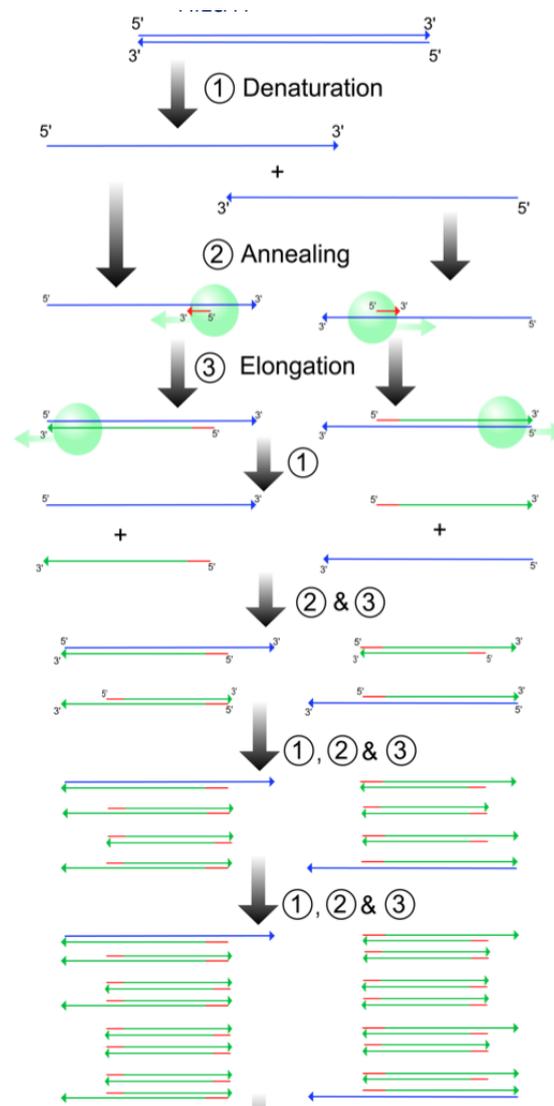
2.7.4 Komponen PCR

1. Sebuah teknik PCR dasar memerlukan komponen tertentu dan reagen yang meliputi:
2. Dua primer (*Forward & Reverse*),: potongan pendek DNA buatan yang akan menargetkan fragmen gen yang menarik di seluruh genom. Mereka melengkapi ujung 3' dari setiap untai gen sasaran double stranded yaitu DNA.
3. Taq polimerase (DNA polimerase): Ini adalah enzim yang berfungsi untuk memperpanjang untai DNA baru. Taq polymerase menempel dekat akhir primer dan mulai menambahkan nukleotida. Hal ini membutuhkan DNA beruntai ganda untuk menjadi fungsional. DNA polimerase dalam tubuh kita rusak pada suhu di bawah 95 °C - suhu yang diperlukan untuk memisahkan dua untai komplementer DNA dalam tabung reaksi. DNA polimerase (Taq polymerase) yang digunakan dalam PCR berasal dari strain bakteri yang disebut *Thermus aquaticus* yang hidup di sumber air panas. Hal ini dapat bertahan hidup di dekat suhu mendidih dan bekerja dengan baik pada 72 ° C.
4. Deoksinukleotida trifosfat (dNTP ini): Mereka adalah blok bangunan dari mana polimerase DNA mensintesis untai DNA baru. Taq polymerase meraih nukleotida yang mengambang di cairan di sekitarnya dan menempel mereka untuk akhir primer.
5. Solusi Buffer: menyediakan lingkungan kimia yang cocok untuk aktivitas dan stabilitas polimerase DNA optimal.
6. MgCl₂: bertindak sebagai kofaktor untuk enzim polimerase. 6. Extracted DNA sampel: mengandung wilayah target yang akan diperkuat.



Gambar 2.7.1. Proses PCR secara keseluruhan.⁵

2.7.5 Prosedur



Gambar 2.7.2. Proses replikasi DNA oleh polymerase chain reaction melalui 3 prosedur: 1.) Denaturasi, 2.) Anil dan 3.) Ekstensi/Elongasi.²

Polymerase chain reaction berfungsi untuk mengkopi DNA. Hal tersebut menggunakan siklus berulang, dimana pada setiap siklus terdiri dari 3 prosedur

1. Denaturasi
 - a. Reaksi solusi yang mengandung molekul DNA (yang akan dikopi), polimerase (yang mengkopi DNA), primer (yang berfungsi sebagai awal DNA) dan nukleotida (yang berikatan dengan primer) dipanaskan hingga $\sim 95^{\circ}\text{C}$ selama 1 menit. Pemanasan akan menyebabkan kedua untai komplimen menjadi terpisah, yang dikenal sebagai denaturasi.

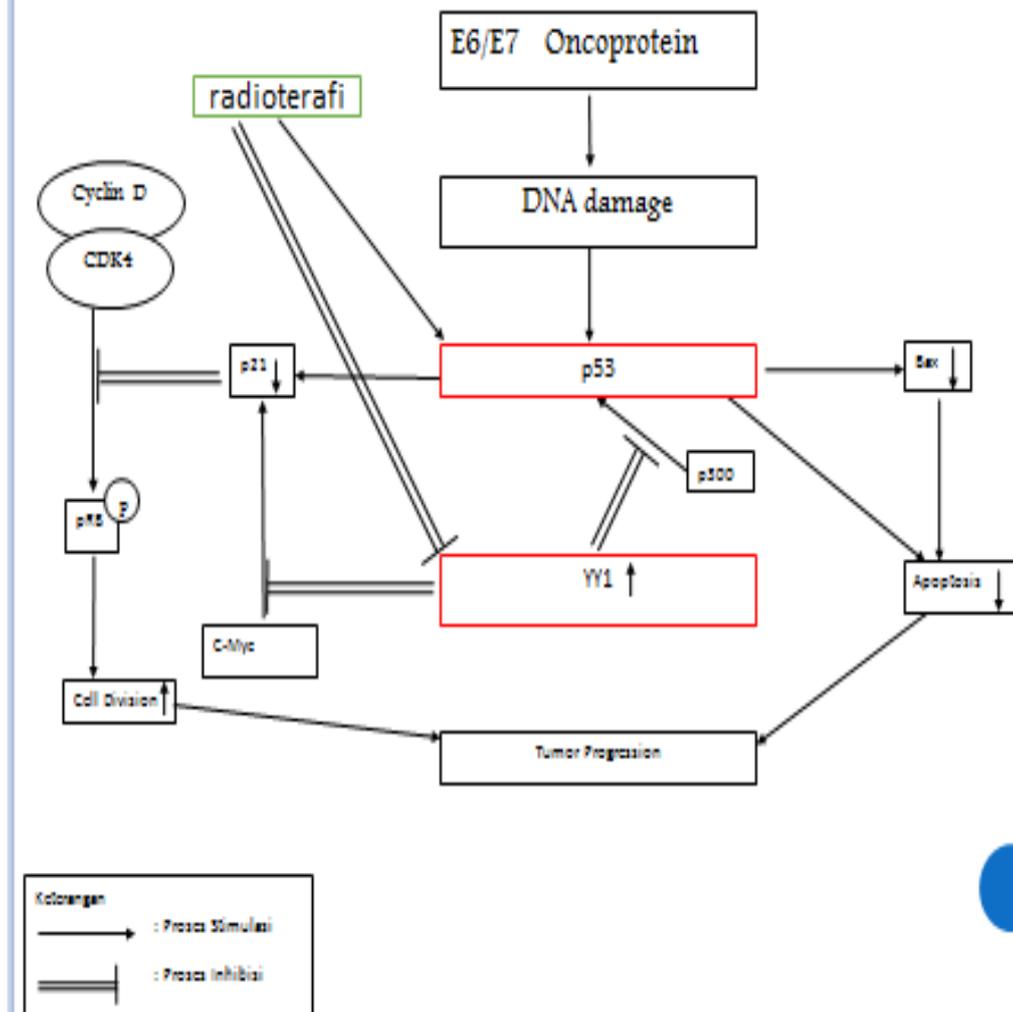
2. Anil
 - a. Penurunan temperatur sebanyak 55 °C selama 1 menit akan menyebabkan primer untuk menempel ke DNA, dikenal sebagai proses hibridisasi atau anil. Hasil dari ikatan tersebut dapat dinyatakan stabil apabila primer dan segmen DNA adalah komplemen. Polimerase lalu akan berikatan dengan komplemen nukleotida tambahan.
3. Ekstensi/Elongasi
 - a. Lalu temperatur dinaikan lagi, namun kali ini dinaikan sampai 72 °C. Temperatur tersebut merupakan temperatur yang ideal untuk digunakan oleh polimerase, yang akan menambahkan nukleotida lainnya pada DNA yang berkembang. Secara bersamaan, ikatan antara primer dan DNA yang tidak terbentuk akan dirusak.

Setiap kalinya ketiga proses tersebut diulang, jumlah molekul DNA yang dikopi bertambah dua kali lipat. Setelah 20 siklus, sekitar satu juta molekul terkopi dari sebuah segmen tunggal dari DNA.

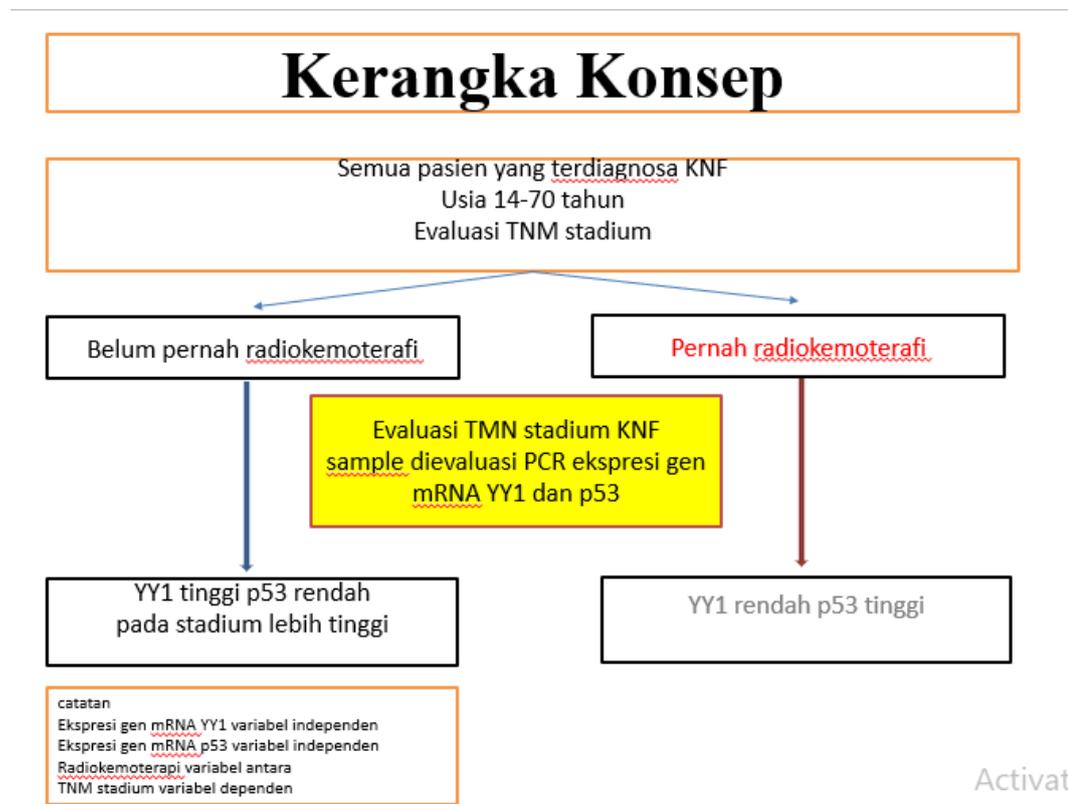
BAB III KERANGKA TEORI

3.1 Kerangka Teori

KERANGKA TEORI



3.2 Kerangka Konsep



3.3 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Indikator	Skala Pengukuran
Yin-Yang 1	Merupakan protein yang diekspresikan oleh gen YY1	Western Immunoblot	OPTIQUANT software	Ordinal
p53	Merupakan protein yang diekspresikan oleh gen p53	Western Immunoblot	DO-1 (monoclonal anti-p53 dari tikus)	Ordinal
Stadium Kanker nasofaring	Derajat KNF menurut TNM	CT Scan Nasofaring	hasil diagnosa dokter berdasarkan WHO	Ordinal