

**ANALISIS ALEL GEN HLA- A24 PADA SAMPEL DARAH TEPI DAN
CYTOBRUSH NASOFARING PENDERITA KARSINOMA NASOFARING
DI MAKASSAR**

**THE ANALYSIS HLA-A24 GENE ALELLE IN THE PERIPHERAL BLOOD
SAMPLES AND NASOPHARYNGEAL *CYTOBRUSHINGS* OF
NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS IN MAKASSAR**

IMELDA GUNAWATI AGUS



**KONSENTRASI PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS TERPADU
BIDANG ILMU KESEHATAN TELINGA HIDUNG TENGGOROK KEPALA LEHER
PROGRAM PASCA SARJANA PROGRAM STUDI BIOMEDIK
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2014**

**ANALISIS ALEL GEN HLA- A24 PADA SAMPEL DARAH TEPI DAN
CYTOBRUSH NASOFARING PENDERITA KARSINOMA NASOFARING
DI MAKASSAR**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi Biomedik
Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu

Disusun dan Diajukan oleh

IMELDA GUNAWATI AGUS

kepada

**KONSENTRASI PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS TERPADU
PROGRAM STUDI BIOMEDIK PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2014**

TESIS

**ANALISIS ALEL GEN HLA-A24 PADA SAMPEL DARAH TEPI DAN
CYTOBRUSH NASOFARING PADA PENDERITA KARSINOMA NASOFARING
DI MAKASSAR**

Disusun dan diajukan oleh :

IMELDA GUNAWATI AGUS

Nomor Pokok : P1507208133

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

pada tanggal 18 Pebruari 2014

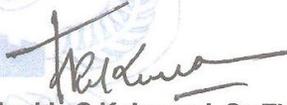
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui :

Komisi Penasihat,

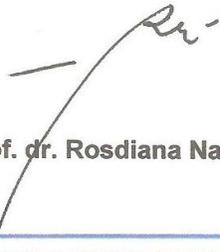


Dr. dr. Eka Savitri, Sp.THT-KL(K)
Ketua



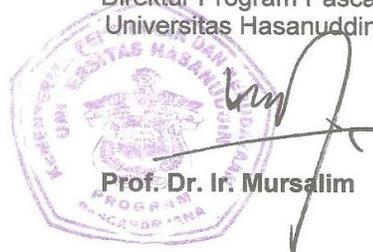
dr. Freddy G. Kuhuwael, Sp.THT-KL(K)
Anggota

Ketua Program Studi Biomedik,



Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D

Direktur Program Pascasarjana,
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. Ir. Mursalim

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Imelda Gunawati Agus

No.Stambuk : P 1507208133

Program studi : Biomedik

Konsentrasi : Combined Degree PPDS THT-KL

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Februari 2014

Yang menyatakan,

Imelda Gunawati Agus

PRAKATA

Puji dan syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala Berkat dan Kasih KaruniaNya sehingga tesis ini dapat saya selesaikan dengan baik.

Tesis ini disusun sebagai tugas akhir dalam Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Saya menyampaikan terima kasih yang tulus dan sedalam-dalamnya kepada ketua bagian Ilmu Kesehatan THT-KL FK UNHAS Prof. Dr. dr. Sutji Pratiwi Rahardjo, Sp.THT-KL(K) serta pembimbing saya Dr. dr. Hj. Eka Savitri, Sp.THT-KL(K), dr. Freddy G. Kuhuwael, Sp.THT-KL(K) dan Dr.dr. Burhanuddin Bahar ,MS yang telah memberikan bimbingan dan dorongan semangat sejak penyusunan konsep, pelaksanaan hingga selesainya penulisan tesis ini. Terima kasih pula kami sampaikan kepada para penguji tesis , berturut-turut kepada, Dr. dr. Hj. Eka Savitri, Sp.THT-KL(K), dr. Freddy G. Kuhuwael, Sp.THT-KL(K), Prof. Dr. dr. Sutji Pratiwi Rahardjo, Sp.THT-KL(K), Dr. dr. H. Abdul Qadar Punagi, Sp.THT-KL(K), dr. Nani Iriani Djufri, Sp.THT-KL(K) dan dr.Burhanuddin Bahar,MS.

Terima kasih yang tak terhingga juga saya sampaikan kepada Prof. dr. R. Sedjawidada, Sp.THT-KL(K), Prof. dr. H. Abdul Kadir, Sp.THT-KL(K), Ph.D. MARS, Prof. Dr. dr. Sutji Pratiwi Rahardjo, Sp.THT-KL(K), dr. H. Andi Baso Sulaiman, Sp.THT-KL(K), Dr. dr. H. Abdul Qadar Punagi, Sp.THT-KL(K), dr. Hj. Riskiana Djamin, Sp.THT-KL(K), dr. H. Aminuddin Azis, Sp.THT-KL(K), MARS, dr. Linda Kodrat, Sp.THT-KL(K), Dr. dr. Hj. Eka Savitri, Sp.THT-KL(K), Dr. dr. Muh Amsyar Akil, Sp.THT-KL(K), dr. Nani Iriani Djufri, Sp.THT-KL(K), Dr. dr. Nova A.L. Pieter, Sp.THT-KL, Dr.dr. M. Fadjar Perkasa, SpTHT-KL(K), dr. Mahdi Umar, Sp.THT-KL,

Dr. dr. Masyita Gaffar, Sp.THT-KL, dr. Rafidawati Alwi Sp.THT-KL, dr. Sri Wartati, Sp.THT-KL, dr. Amira T. Raihanah, Sp.THT-KL, dr. Yarni Alimah, Sp.THT-KL, dr. Trining Dyah, Sp.THT-KL, dr.Syahrijuwita, SpTHT-KL,Mkes, yang telah membimbing kami selama mengikuti pendidikan sampai pada penelitian dan penulisan karya akhir ini.

Pada kesempatan ini saya menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Pimpinan Fakultas Kedokteran Unhas, Ketua Program Pendidikan Dokter Spesialis yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan ahli di bagian Ilmu Kesehatan THT Fakultas Kedokteran UNHAS.
2. Direktur RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo, RS. Labuang Baji dan RS. Pelamonia, RS. Mitra Husada, RSU Haji Makassar, RS. Ibnu Sina, RS.Sayang Rakyat, RSUD Enrekang, RS.Pinrang, RS.Sengkang,RS.Bantaeng, RSUD Sinjai, RSUD Malinau, RSUD ABADI Samboja, atas segala bantuan yang telah diberikan.
3. Ketua Bagian Anatomi, Anestesiologi, Radiologi, Gastroenterohepatologi dan Pulmonologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin beserta staf yang telah membimbing saya selama mengikuti pendidikan integrasi.
4. Semua teman sejawat peserta pendidikan dokter spesialis di bagian THT atas bantuan dan kerjasamanya yang terjalin selama ini. Secara khusus untuk teman seangkatan selama pendidikan : dr. Yuliana dr. Ied Rakhma, dr. Rahmaeni, dr. Mardelina, dr.Annisah Said dan dr.Hilmiyah Syam, terima kasih atas kerjasama selama menjalani pendidikan, secara khusus terima kasih kepada dr. A.Tenri Uleg dan dr.Sufriani yang secara langsung membantu pelaksanaan penelitian ini.

5. Ir.Hayati Pide dan Mustari S.Sos., atas segala bantuan administrasi dan semua perawat dan pegawai administrasi di poli,ok dan bangsal THT semua rumah sakit yang telah bekerjasama dan membantu selama ini.
6. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan karya tulis ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Pada saat yang berbahagia ini saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada ayahanda Alm.Agustinus Alik dan ibunda Beatrix M., yang telah melahirkan,membesarkan,mendampingi dengan penuh kasih dan mendoakan dengan tulus disepanjang hidup saya hingga saat ini, saya persembahkan pencapaian ini untuk orangtua saya tercinta; serta kakak-kakak saya Dr.dra.Rosana Agus,MSi, Drs. Ferdy Agus, Dra.Fanny Agus dan Ir.Sylvia Agus yang telah memberikan dukungan semangat dan doa selama saya mengikuti pendidikan sampai selesainya tesis ini. Kepada sahabat dan teman di TJA, terimakasih atas doa, waktu, dukungan dan pengertiannya yang telah diberikan selama mengikuti pendidikan ini.

Saya menyadari bahwa penulisan tesis ini mempunyai keterbatasan dan kekurangan oleh karenanya saran dan kritik yang bertujuan untuk menyempurnakan karya akhir ini saya terima dengan segala kerendahan hati. Semoga Tuhan Yang Maha Esa senantiasa melimpahkan Berkat dan Kasih KaruniaNya kepada semua yang telah membantu, membimbing, mendoakan dan memberi makna dalam kehidupan saya.

Makassar, Februari 2014

Imelda Gunawati Agus

ABSTRAK

IMELDA GUNAWATI AGUS. *Analisis Alel Gen HLA-A24 pada Sampel Darah Tepid dan Cytobrush Nasofaring Penderita Karsinoma Nasofaring di Makassar (dibimbing oleh Eka Savitri dan Freddy G. Kuhuwael)*

Penelitian ini bertujuan mengetahui keberadaan alel gen HLA-A24 dalam darah tepi dan cytobrush nasofaring penderita KNF di Makassar.

Penelitian ini bersifat observasional dengan rancangan cross sectional study. Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober sampai dengan Desember 2013. Sampel yang diambil sebanyak 21 penderita KNF yang datang di Rumah Sakit Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar. Pengambilan sampel dilakukan melalui consecutive sampling. Pemeriksaan dilakukan dengan isolasi DNA dengan metode BOOM'S dilanjutkan PCR dengan primer forward dan reverse HLA-A24. Data dianalisis dengan menggunakan uji Fischer Exact test.

Hasil penelitian menunjukkan adanya alel gen HLA-A24 baik pada sampel darah tepi (37,5%) dan cytobrush nasofaring (42,9%). Berdasarkan hasil pemeriksaan sampel, keberadaan alel gen HLA-A24 yang ditemukan dalam cytobrush nasofaring 100% juga ditemukan dalam darah tepi penderita KNF. Dapat disimpulkan bahwa HLA-A24 ditemukan pada penderita KNF di Makassar.

Kata kunci : penderita KNF, darah, brushing nasofaring, HLA-A24



ABSTRACT

IMELDA GUNAWATI AGUS. *The Analysis of HLA-A24 Gene Allele in the Peripheral Blood Samples and Nasopharyngeal Cytobrushings of Nasopharyngeal Carcinoma Patients in Makassar* (Supervised by Eka Savitri and Freddy G. Kuhuwael)

This study aims to find out the occurrence of HLA-A24 gene allele in the peripheral blood samples and nasopharyngeal cytobrushings of nasopharyngeal carcinoma patients in Makassar.

The research used analytical observational cross sectional study design with Fischer Exact test on 21 samples of nasopharyngeal carcinoma patients admitted to Dr. Wahidin Sudirohusodo public hospital from October to December 2013. The samples were selected by using the consecutive sampling technique. The examination was conducted by isolating DNA with BOOM's method followed by PCR using primers forward and reverse HLA-A24.

The results reveal the occurrence of HLA-A24 gene allele in the samples of peripheral blood (37.5%) and nasopharyngeal cytobrushings (42.9%). With the technique of sample selection and examination in this study, HLA-A24 found in nasopharyngeal cytobrushings is also 100% found in the peripheral blood of nasopharyngeal carcinoma patients.

Keywords: nasopharyngeal carcinoma patients, blood, nasopharyngeal cytobrushings, HLA-A24



DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iii
PRAKATA	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR GRAFIK	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	5
D. Hipotesis	6
E. Manfaat Penelitian.....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
A. Kanker Nasofaring	8

1. Definisi dan Epidemiologi.....	8
2. Anatomi Rongga Nasofaring.....	10
3. Klasifikasi dan Stadium Karsinoma Nasofari.....	12
4. Etiologi	14
B. Patogenesis KNF	18
1. Gen HLA dan Epstein Barr Virus	18
2. Respon imun terhadap infeksi EBV.....	25
C. Gambaran Klinis.....	29
D. Diagnosis	31
E. Pemeriksaan Serologis EBV	31
F. Terapi	33
G. Kerangka Teori	36
H. Kerangka Konsep	37
III. METODE PENELITIAN	38
A. Desain Penelitian	38
B. Lokasi dan Waktu Penelitian	38
C. Populasi Penelitian	38
D. Sampel dan Cara Pemilihan Sampel.....	38
E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	39
F. Ijin Subyek Penelitian	39
G. Bahan dan Cara Penelitian	40
H. Identifikasi Variabel	44
I. Definisi Operasional	43

J. Metode Analisis	45
K. Alur Penelitian	46
IV. HASIL PENELITIAN.....	47
1. Karakteristik Umum Sampel	46
2. Hasil Pemeriksaan HLA-A24.....	49
V. PEMBAHASAN	53
VI. PENUTUP.....	57
A. Kesimpulan	57
B. Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	65

DAFTAR TABEL

nomor		halaman
1.	Karakteristik sampel penelitian	46
2.	Distribusi penderita berdasarkan gambaran histopatologi KNF.....	47
3.	Distribusi penderita berdasarkan stadium KNF AJCC 2010.....	47
4.	Perbandingan keberadaan HLA-A24 pada sampel darah tepi dan cytobrush nasofaring	49

DAFTAR GAMBAR

nomor	halaman
1. Anatomi Nasofaring dan struktur sekitarnya	11
2. Stadium KNF berdasarkan AJCC 2010.....	14
3. Letak HLA pada gen	18
4. Molekul HLA kelas I dan II	19
5. Interaksi virus dengan HLA kelas I dan II	23
6. Interaksi TcCD8+, CTL dan molekul HLA kelas 1.....	24
7. Infeksi primer dan persisten EBV	24
8. Ekspresi infeksi laten EBV pada beberapa penyakit	25
9. Hasil pemeriksaan PCR HLA-A24 pada sampel darah tepi	48
10. Hasil pemeriksaan PCR HLA-A24 pada sampel cytobrush nasofaring	49

DAFTAR GRAFIK

nomor		halaman
1.	Evaluasi sampel positif HLA-A24 berdasarkan suku	50
2.	Evaluasi sampel positif HLA-A24 berdasarkan histopatologi.....	50
3.	Evaluasi sampel positif HLA-A24 berdasarkan stadium KNF.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Gambar alat dan kegiatan penelitian

Lampiran 2: Naskah penjelasan untuk mendapat persetujuan dari subyek penelitian

Lampiran 3: Formulir persetujuan setelah penjelasan

Lampiran 4: Rekomendasi persetujuan etik

Lampiran 5: Case Report Form

Lampiran 6 : Daftar sampel penelitian

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	keterangan
KNF	Kanker Nasofaring
THT	Telinga-Hidung-Tenggorok
EBV	Epstein Barr Virus
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
LMP	Latent Membrane Protein
HLA	Human Leucocyte Antigen
WHO	World Health Organization
EBNA	EBV Nuclear Antigen
VCA	Viral Capsid Antigen
EBER	EBV –encoded RNA
MHC	Mayor Histocompatibility Complex
APC	Antigen Presenting Cell
TCR	T Cell Receptor
IL	Interleukin
TNF α	Tumour Necrotizing Factor alfa
bp	base pairs

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker Nasofaring (KNF) merupakan keganasan epitelial yang merupakan neoplasma dengan insiden tersering pada traktus aerodigestif bagian atas dan merupakan penyakit genetik multifaktor dengan karakter endemis. Ada sekitar 80.000 kasus baru setiap tahunnya dengan insidens tertinggi di Cina Selatan 2500 kasus per tahun. Insidens KNF tertinggi pada ras mongoloid dengan frekuensi yang cukup tinggi di Cina Selatan, Hongkong, Vietnam, Thailand, Malaysia, Singapura dan Indonesia. (Roezin ,2007)

KNF menduduki urutan ke-4 di Indonesia di antara semua penyakit kanker setelah kanker rahim, payudara, dan kulit, dengan insidens sekitar 4,7 per 100.000 penduduk. Seluruh bagian THT di Indonesia mendudukkan KNF pada peringkat pertama penyakit kanker pada daerah kepala leher dengan perbandingan antara laki-laki dan wanita adalah 2-3:1. Di Yogyakarta, KNF relatif lebih tinggi, mencapai 5,7 per 100.000 populasi. (Susworo,2007). Insidens di Makassar menurut Kuhuwael (2001), di RSUD Dadi dan RS.Dr.Wahidin Sudirohusodo selama periode 10 tahun (1990-1999) ditemukan 274 (47,98%) kasus KNF dari tumor ganas kepala dan leher dengan perbandingan antara laki-laki dan wanita adalah 2,6:1. Sedangkan periode Januari 2004 sampai dengan Juni 2007 didapatkan 33% dari keganasan di bagian telinga, hidung dan tenggorok (Punagi dan Savitri, 2007). RS.DR.Wahidin Sudirohusodo

melaporkan periode 10 tahun kedua (2000-2009) ditemukan 362 kasus (57,28%) dari tumor ganas kepala dan leher. (Kuhuwael 2010)

KNF menunjukkan beberapa gejala awal yang tidak spesifik dan letaknya yang tersembunyi sehingga seringkali terdiagnosis pada stadium lanjut, dengan angka keberhasilan pengobatan < 40% pada stadium III dan IV. (Kwong,2004)

Beberapa faktor resiko penyebab KNF, selain virus, juga etnik, pola makan, merokok, genetik dan gender. Virus yang berperan dalam meningkatkan resiko terjadinya KNF adalah Epstein Barr Virus (EBV). Virus ini menyerang hampir 95% populasi seluruh dunia dan bisa menyebabkan berbagai macam penyakit. EBV setelah menginfeksi limfosit B, dapat bersifat laten dan menetap seumur hidup pada host (Fachiroh et al,2006). Dalam beberapa studi juga ditemukan adanya DNA EBV dari sampel darah tepi penderita. (Stefi, 2006; Breda et al 2010, Savitri,2008). Hal ini menunjukkan bagaimana suatu EBV mampu menghindari sistem imun tubuh manusia sehingga bisa menetap di dalam sel limfosit B.

Sel B yang terinfeksi EBV akan mengekspresikan beberapa antigen laten seperti LMP1 dan LMP2 (LMP2A dan LMP2B). LMP2A merupakan salah satu antigen laten yang diekspresikan limfosit B yang terinfeksi EBV. (Hariwiyanto 2009). Oleh karena itu EBV bersirkulasi terus di dalam darah dan menetap seumur hidup pada hostnya.

Salah satu faktor genetik yang paling dicurigai adalah gen HLA. Gen ini diturunkan secara heterozigot dan bersifat kodominan. Akibatnya, kelompok masyarakat dengan HLA tertentu akan menghadapi resiko terjadinya penyakit tertentu (Abbas,2000). Beberapa penyakit diduga ada kaitannya dengan HLA, dalam arti penderita dengan penyakit tertentu sering dijumpai memiliki gen HLA tertentu. (Benacerraf,1985)

Berbagai penelitian telah menemukan hubungan antara HLA dengan KNF, baik hubungan HLA yang rentan maupun protektif terhadap KNF. Beberapa alel yang bersifat rentan terhadap KNF antara lain HLA-A2 pada ras Taiwan (Hildesheim et al,2002), HLA-A11 pada penduduk di Cina Selatan (Hu et al,2005).

Beberapa alel yang bersifat protektif di Cina Selatan A2, A31, A33, B13, B27,B39,B46,B55, dan B58 (Hu et al,2005).

Di Afrika Utara, beberapa alel yang rentan terjadinya KNF antara lain HLA-B13 di Tunisi, HLA-A3, B5 dan B15 di Aljazair dan HLA-B18 di Moroko. Sedangkan yang protektif terhadap KNF antara lain HLA-A*33 di Tunisia, B14 di Aljazair dan A9 di Moroko. (Laantri et al,2010)

Pada penelitian serupa terhadap ras Eropa yang bermukim di AS didapatkan HLA A2 dan A11 bersifat protektif terhadap KNF sedangkan HLA B5 bersifat rentan terhadap KNF.(Burt et al, 1996)

Di Malaysia,menurut Lee LK et al, alel A2, A11, A31, A32, A33, B8, B13,B38, B39, B44, B46, B55, B58, B61 dan B71 tidak berhubungan dengan kejadian KNF di ras Cina di Malaysia Barat.(Lee,2007)

Adanya hubungan antara HLA dengan KNF pada HLA – A 24 , HLA- A2 dan HLA- A11 pada populasi Jawa di Indonesia dan menyatakan bahwa HLA kelas 1 merupakan target utama sebagai marker genetik sistem imun pada KNF. (Judajana,2007)

Menurut penelitian pada populasi Asia Tenggara dan Caucasia, banyak ditemukan HLA-A24 dan HLA-A2 (Rickinson et al,1997). Orang Indonesia asli yang mempunyai HLA-A24 memiliki kemungkinan terhadap resiko tinggi terkena KNF (Wiqoyah 1999). Menurut Middleton *et al.*, 2003 alel gen HLA-A2402 merupakan alel

dari gen HLA-A24 banyak terdapat pada populasi Asia. Studi imunogenetik di Jakarta pada tahun 1997, didapatkan HLA-A24 dan HLA-B63 . Kedua fenotip antigen kelas I ini diduga sebagai faktor penyebab KNF bagi orang Indonesia asli. Sedangkan penelitian di Malaysia yang termasuk satu rumpun dengan Indonesia yang terbanyak diketemukan adalah antigen HLA-B17 dan B18. (Kolegium THT-KL,2010)

Menurut Munir (2007), pada tinjauan dua kasus pemeriksaan gen HLA penderita KNF pada suku Batak didapatkan HLA-DRB1.(Munir,2007) Oleh peneliti yang sama setahun kemudian yang memeriksa gen HLA-DQB1 pada 50 penderita KNF, disimpulkan bahwa alel gen HLA-DQB1 tidak berasosiasi dengan penyebab kerentanan timbulnya KNF pada suku Batak. (Munir,2008)

Berdasarkan ditemukannya dan meningkatnya kasus KNF di Indonesia dengan penanganan yang sulit karena penderita datang berobat pada stadium lanjut yang menyebabkan sering terjadi kegagalan terapi. Oleh karena itu perlu dilakukan skrining awal dari suatu keganasan. Profil genetik dapat digunakan sebagai skrining untuk deteksi dini dan pengembangannya dapat dimanfaatkan untuk menentukan prognosis KNF. Sehingga perlu dilakukan pemeriksaan alel HLA-A24 yang belum pernah dilakukan di Sulawesi Selatan khususnya Makassar

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah di atas maka dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut : Apakah alel HLA-A24 dapat ditemukan pada sampel darah tepi dan *cytobrush* nasofaring pada penderita KNF di Makassar ?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum :

Mengetahui keberadaan alel gen HLA- A24 dalam darah tepi dan *cytobrush* nasofaring penderita KNF di Makassar

2. Tujuan khusus :

1. Ditemukan adanya alel gen HLA-A24 dalam sampel darah tepi penderita KNF
2. Ditemukan adanya alel gen HLA-A24 dalam sampel *cytobrush* nasofaring penderita KNF
3. Membandingkan keberadaan alel gen HLA-A24 dalam darah tepi dan *cytobrush* nasofaring pada penderita KNF
4. Menentukan alel gen HLA penderita KNF di Makassar

D. Hipotesis

Adanya Human Leukocyte Antigen (HLA) - A24 pada Penderita Karsinoma Nasofaring

E. Manfaat Penelitian

1. Dapat dimanfaatkan untuk metode diagnostik deteksi dini dan *skrining* KNF pada orang normal dengan resiko tinggi.
2. Memberikan informasi awal pada kelompok resiko tinggi KNF sehingga dapat dilakukan pemeriksaan lanjutan (endoskopi, ct-scan dan biopsi) agar diagnosis KNF dapat ditegakkan secara dini dan ditangani lebih awal.

3. Data penelitian profil genetik dapat dipakai sebagai dasar penelitian lebih lanjut dalam bidang uji diagnostik KNF, dan dalam pengembangannya untuk menentukan prognosis.
4. Metode pengambilan sampel darah tepi ini nantinya potensial untuk diaplikasikan di klinik dengan menggunakan sampel darah tepi tanpa memerlukan tindakan invasif.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Kanker Nasofaring

1. Definisi dan epidemiologi

Nasopharyngeal Carcinoma atau Kanker Nasofaring (KNF) merupakan suatu tumor ganas yang tumbuh dari sel epitel yang melapisi nasofaring (Roezin,2007 dan Wei,2006). Secara epidemiologi KNF menunjukkan pola penyebaran yang menarik diberbagai belahan dunia, karena adanya variasi geografik yang khas. KNF paling banyak dijumpai pada ras Mongoloid, disamping Mediteranian, dan beberapa ras di Afrika bagian utara. Insidensi KNF menunjukkan adanya karakteristik geografis. Di seluruh dunia insidensi tertinggi KNF terdapat di Cina Selatan, dimana KNF merupakan keganasan yang endemis pada orang Canton di propinsi Guangdong Cina, dengan insiden 10 - 150 per 100.000 penduduk pertahun, dengan usia rata-rata 40-50 tahun. (Cheng,2001)

Menurut *the global registry of cancer incidence*, KNF menempati peringkat ke-11 dari semua keganasan di Cina tahun 2008 dengan insidens 2,8/100.000 pada laki-laki dan 1,9/100.000 pada wanita. (Cao,2011)

Prevalensi KNF di Indonesia 6,2/100.000 dan ditemukan 13.000 kasus baru setiap tahunnya. Dari studi yang dilakukan dari 1121 penderita KNF yang dirawat di RS

Cipto Mangunkusumo Jakarta dari tahun 1996-2005 didapatkan perbandingan laki-laki dan perempuan 2,4:1 dan merupakan kanker kepala leher tersering (28,4%). (Adham 2012). RS.DR.Wahidin Sudirohusodo melaporkan periode 10 tahun kedua (2000-2009) ditemukan 362 kasus (57,28%) dari tumor ganas kepala dan leher.(Kuhuwael 2010)

Insidens sedang KNF terdapat pada penduduk di daerah Asia Selatan, termasuk sub ras melayu yaitu Thailand, Vietnam, Malaysia, Singapura, Indonesia dengan angka sekitar 5 - 9 per 100.000 penduduk pertahun. Sedangkan Eropa atau Amerika Utara dan Jepang mempunyai angka kejadian 1 per 100.000 penduduk. (Cheng 2001)

KNF merupakan kanker genetik (*familial aggregation*) sehingga insidensnya tetap tinggi baik pada wilayah dengan prevalensi tinggi maupun rendah. Meskipun demikian proporsi terjadinya kanker pada pasien dengan riwayat keluarga penderita kanker lebih tinggi pada wilayah dengan prevalensi tinggi dibandingkan wilayah prevalensi rendah misalnya proporsi terjadinya KNF pada pasien dengan riwayat keluarga penderita KNF pada wilayah prevalensi tinggi di Hongkong (7,2%) dan Guangzhou (5,9%) sedangkan di wilayah dengan prevalensi rendah misalnya di Shanghai didapatkan 1,85%. Pada keluarga penderita KNF, didapatkan relatif lebih tinggi pada garis keturunan pertama dengan insidens 4 - 10 kali lebih tinggi dari kelompok kontrol. (Cao, 2011)

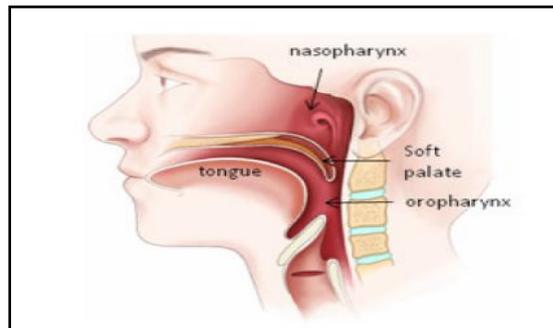
Berbagai studi epidemiologik mengenai angka kejadian ini telah dipublikasikan diberbagai jurnal. Salah satunya yang menarik adalah penelitian mengenai angka kejadian KNF pada para migran dari daratan Tiongkok yang telah bermukim secara turun temurun di China town (pecinan) di San Fransisco Amerika Serikat. Terdapat perbedaan yang bermakna dalam terjadinya KNF antara para migran dari daratan

Tiongkok ini dengan penduduk sekitarnya yang terdiri atas kulit putih (*Caucasians*), kulit hitam dan *Hispanics*, dimana kelompok Tionghoa menunjukkan angka kejadian yang lebih tinggi. Sebaliknya, apabila orang Tionghoa imigran ini dibandingkan dengan kerabatnya yang masih tinggal di daratan Tiongkok maka terdapat penurunan yang bermakna dalam hal terjadinya KNF pada kelompok migran tersebut. Jadi kesimpulan yang dapat diambil adalah, bahwa kelompok migran masih mengandung gen yang memudahkan untuk terjadinya KNF, tetapi karena pola makan dan pola hidup selama diperantauan berubah maka faktor yang selama ini dianggap sebagai pemicu tidak ada lagi maka kanker inipun tidak tumbuh (Susworo,2004)

2. Anatomi rongga nasofaring

Nasofaring adalah ruangan berbentuk persegi panjang, merupakan daerah peralihan antara kavum nasi dengan orofaring. Ukuran nasofaring bervariasi pada tiap-tiap individu, diameter antero-posterior rata-rata 2-3 cm dan diameter transversal dan vertikal hampir sama, sekitar 3-4 cm. Nasofaring merupakan bagian paling kranial dari faring dan terletak tepat dibawah basis kranii, dinding superior dan posterior merupakan lengkungan yang dibentuk oleh basis sfenoid, basis oksiput dan korpus vertebra servikalis I dan II. Dasar nasofaring terbuka ke arah orofaring dengan batas berupa garis imajiner setinggi palatum molle. Apabila isthmus faring tertutup, maka permukaan posterior palatum molle sebagai dinding inferior nasofaring. Di sebelah anterior, nasofaring terbuka ke arah koana. Pada dinding lateral nasofaring, kurang lebih 1 cm di posterior ujung konka inferior, terdapat orifisium tuba auditiva. Orifisium tuba auditiva mempunyai tonjolan ke arah medial, terdiri dari kartilago tuba auditiva dan jaringan lunak di tepi superior dan posteriornya yang disebut torus tubarius. Tepat di

supero-posterior *torus tubarius* terdapat suatu cekungan yang disebut fossa Rosenmuller. Fossa ini merupakan lokasi awal karsinoma nasofaring. Batas-batas nasofaring secara lebih jelas dapat dilihat pada gambar 1. (Wei,2006)



Gambar 1. Anatomi nasofaring dan struktur sekitarnya (dikutip dari kepustakaan Wei,2006)

3. Klasifikasi dan Stadium Karsinoma Nasofaring

Secara histopatologis, KNF dibedakan menurut *World Health Organization* (WHO) menjadi tiga tipe, yaitu: Tipe WHO 1, karsinoma sel skuamosa dengan keratinisasi; Tipe WHO 2, karsinoma sel skuamosa tanpa keratinisasi; Tipe WHO 3 adalah karsinoma tak berdiferensiasi. (Wei, 2006, Pathmanathan,1997, Smanmugaratnam et al,1979)

Pada pemeriksaan dengan mikroskop cahaya dapat digambarkan perbedaan dari ketiga jenis histopatologi karsinoma nasofaring. Pada karsinoma sel skuamosa dengan keratinisasi (tipe WHO I) tampak adanya diferensiasi sel skuamosa, dengan jembatan antar sel dan atau keratinisasi hampir menyeluruh lapangan pandang. Pada karsinoma sel skuamosa tanpa keratinisasi (tipe WHO II) tak tampak diferensiasi skuamosa, tetapi sel tumor memiliki batas sel yang jelas dan susunannya bisa bertingkat atau *pavemented*. Pada karsinoma tak terdiferensiasi (tipe WHO III), sel

tumor mempunyai inti pucat dan besar. Tak didapatkan batas sel yang jelas. Sel dapat tersusun tak teratur tetapi jelas membentuk kumpulan massa atau berupa sel lepas-lepas dalam jaringan limfoid. (Wei,2006 & Chan,2004)

Yang paling sering terjadi adalah KNF dengan tipe WHO III, yaitu sekitar 70 % dari seluruh KNF dan sekitar 60- 95 % penderita terdiagnosis pada stadium lanjut (III-IV) .(Wei,2006).

Di beberapa negara Asia digunakan penentuan stadium yang dikemukakan oleh Ho pada tahun 1978 (*Ho's system*), sementara di Amerika dan Eropa lebih disukai penentuan stadium sesuai dengan kriteria yang ditetapkan AJCC/UICC (*American Joint Committee on Cancer / International Union Against Cancer*). Cara penentuan stadium KNF yang terbaru adalah menurut AJCC/UICC tahun 2010

Klasifikasi TNM menurut AJCC 2010:

Tumor Primer (T)

Tx Tumor primer tidak dapat dinilai

T0 Tidak terbukti adanya tumor primer

Tis Karsinoma *in situ*

T1 Tumor terbatas di nasofaring atau tumor meluas ke orofaring dan / kavum nasi tanpa perluasan ke parafaring.

T2 Tumor dengan perluasan ke daerah parafaring.

T3 Tumor melibatkan struktur tulang dasar tengkorak dan/atau sinus paranasal

T4 Tumor dengan perluasan intrakranial dan/atau terlibatnya saraf kranial, hipofaring, orbita atau dengan perluasan ke fossa infratemporal / ruang mastikator.

KGB Regional (N)

NX KGB regional tidak dapat dinilai

N0 Tidak ada metastasis ke KGB regional

N1 Metastasis kelenjar getah bening leher unilateral dengan diameter terbesar 6 cm atau kurang, di atas fossa supraklavikular, dan/atau unilateral atau bilateral kelenjar getah bening retrofaring dengan diameter terbesar 6 cm atau kurang.

N2 Metastasis kelenjar getah bening bilateral dengan diameter terbesar 6 cm atau kurang, di atas fossa supraklavikular.

N3 Metastasis pada kelenjar getah bening diatas 6 cm dan/atau pada fossa supraklavikular:

N3a Diameter terbesar lebih dari 6 cm

N3b Meluas ke fossa supraklavikular

Metastasis Jauh (M)

M0 Tanpa metastasis jauh

M1 Metastasis jauh

Gambar 2. Stadium KNF berdasarkan AJCC 2010

Stadium	T	N	M
I	T ₁	No	Mo
II	T ₁	N ₁	Mo
	T ₂	N ₀₋₁	Mo
III	T ₁₋₂	N ₂	Mo
	T ₃	N ₀₋₂	
IV A	T ₄	N ₀₋₂	Mo
IV B	semua T	N ₃	M ₀
IV C	semua T	Semua N	M ₁

4. Etiologi

Secara umum, KNF disebabkan oleh 3 faktor yaitu kerentanan genetik, EBV, dan faktor lingkungan. Kerentanan genetik dan EBV merupakan faktor tetap sementara faktor lingkungan merupakan faktor pendukung.

a. Epstein- Barr Virus.

Epstein Barr Virus (EBV) berperan penting pada etiologi KNF, terutama tipe 2 dan 3. Hampir semua kasus KNF adalah positif EBV dan virus ini juga ditemukan pada semua sel tumor KNF. EBV merupakan suatu gamma herpes virus (ditemukan pada tahun 1964 oleh Epstein dan Barr), ditularkan melalui saliva, dan menginfeksi lebih dari 90% populasi dunia. Infeksi primer EBV umumnya terjadi sebelum umur 20 tahun. Sebagian besar orang akan terinfeksi EBV tanpa implikasi klinis yang serius, sementara pada sebagian kecil orang, virus EBV dapat bereaktivasi dan berkembang menjadi tumor di kemudian hari. Hal ini akan bergantung pada kerentanan genetik dan faktor lingkungan. (Thompson, 2004)

Beberapa penelitian membuktikan bahwa EBV mempunyai hubungan yang kuat dan konsisten sebagai penyebab KNF. Infeksi EBV berhubungan erat dengan derajat imunitas seluler, yang terkait pengaruh faktor imunogenetik. Salah satu faktor yang memiliki peran penting adalah HLA yang bekerja sebagai regulator pada respon imun, sekaligus sebagai petanda genetik setiap individu (Cooke, 2001).

Pada infeksi laten, terjadi rekombinan DNA EBV dan DNA host yang mengakibatkan terbentuknya gen-gen yang mengespresikan protein seperti EBNA, LMP, VCA, EBER yang berperan pada transportasi keganasan, dapat menyebabkan mutasi gen p53. Keadaan ini akan menekan proses apoptosis sehingga terjadi proliferasi sel yang tidak terkontrol yang mengarah pada proses keganasan. (Hu, 1996)

Bukti peranan EBV sebagai penyebab KNF (Kolegium THT-KL, 2010) :

1. Antibodi dengan titer yang tinggi terhadap antigen EBV dalam serum
2. Antigen inti EBV (EBNA) di dalam sel tumor nasofaring
3. Genom EBV dalam bentuk plasmid di jaringan tumor nasofaring dan isolasi virus
4. DNA EBV pada jaringan kanker nasofaring

5. mRNA-EBV (EBERs) di sel kanker nasofaring

Pada KNF tipe WHO 3, 100% berkorelasi dengan EBV dan dilaporkan angka insiden yang tinggi di Asia Tenggara (Stevens et al 2006)

b. Kerentanan Genetik

Adanya kecenderungan KNF lebih banyak terjadi pada ras tertentu (mongoloid) dan lebih sering terjadi pada pria dibandingkan wanita (2-3 : 1), menimbulkan dugaan adanya faktor genetik yang berperan dalam etiologi penyakit ini. Menurut Loh et al, resiko KNF meningkat secara signifikan pada generasi pertama, insidennya 6 kali lebih tinggi dibandingkan dengan populasi umum dan juga ditemukan pada generasi kedua dan ketiga. Angka kejadian KNF pada keluarga penderita KNF adalah 15,5% dengan 71% saudara kandung dan 29% orang tua kandung. (Loh 2006, Zhang 1999)

Studi imunogenetik di Jakarta pada tahun 1997 terhadap 20 penderita KNF (15 laki-laki, 5 wanita) yang diteliti didapatkan HLA-A24 (RR : 5,43) dan HLA-B63 (RR : 5,96). Kedua fenotip antigen kelas I ini diduga sebagai faktor penyebab KNF bagi orang Indonesia asli. Sedangkan penelitian di Malaysia yang termasuk satu rumpun dengan Indonesia yang terbanyak diketemukan adalah antigen HLA-B17 (RR; 3,4) dan B18 (RR : 4,4).(Kolegium THT-KL,2010)

c. Faktor Lingkungan.

Selain faktor genetik dan virus EBV, sejumlah makanan dan zat kimia juga diduga turut memicu terjadinya KNF. Konsumsi ikan asin dan beberapa makanan lain yang diasinkan, terutama pada masa anak-anak merupakan salah satu faktor resiko. Kandungan *N-nitrosodimethylamine* dalam makanan tersebut diduga sebagai

karsinogen dan dapat mengaktifkan virus EBV. Zat kimia seperti formaldehida, dan hidrokarbon aromatik tertentu juga turut berperan . (Wei,2006)

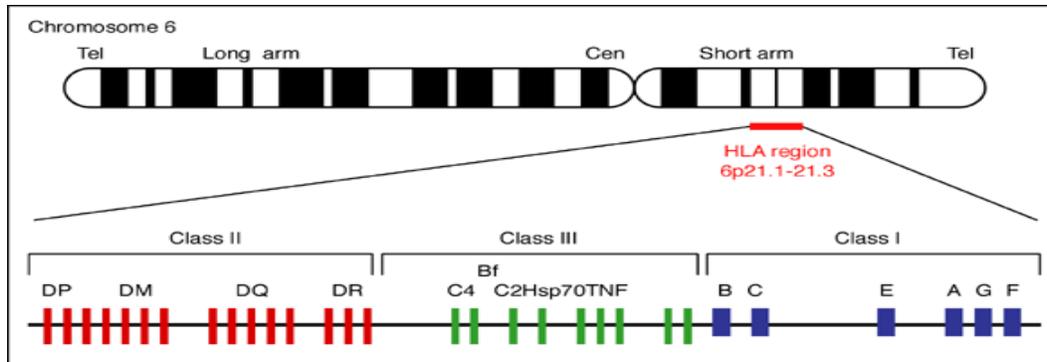
Pada penelitian hubungan pola makan dan kejadian KNF di Guandong, Cina tahun 2005-2007, didapatkan hasil yang serupa dengan penelitian-penelitian sebelumnya bahwa konsumsi ikan asin dan makanan lainnya yang diawetkan meningkatkan resiko terjadinya KNF, sedangkan konsumsi buah segar, teh herbal dan *herbal slow-cooked soup* memiliki insidens rendah terhadap KNF.(Wei,2006)

Beberapa penelitian menunjukkan adanya hubungan antara merokok dalam jangka waktu yang lama dengan resiko terjadinya KNF. Dilaporkan bahwa resiko terkena KNF pada perokok yang merokok lebih dari 20 batang sehari ternyata dua kali lipat lebih besar dari pada yang bukan perokok. Bahan karsinogenik di asap rokok yang diperkirakan berperan sebagai promotor terjadinya KNF yaitu *3, 4 benzyppyrene* dan *polycyclic aromatic hydrocarbon*. (Kolegium THT-KL,2010)

B. Patogenesis KNF

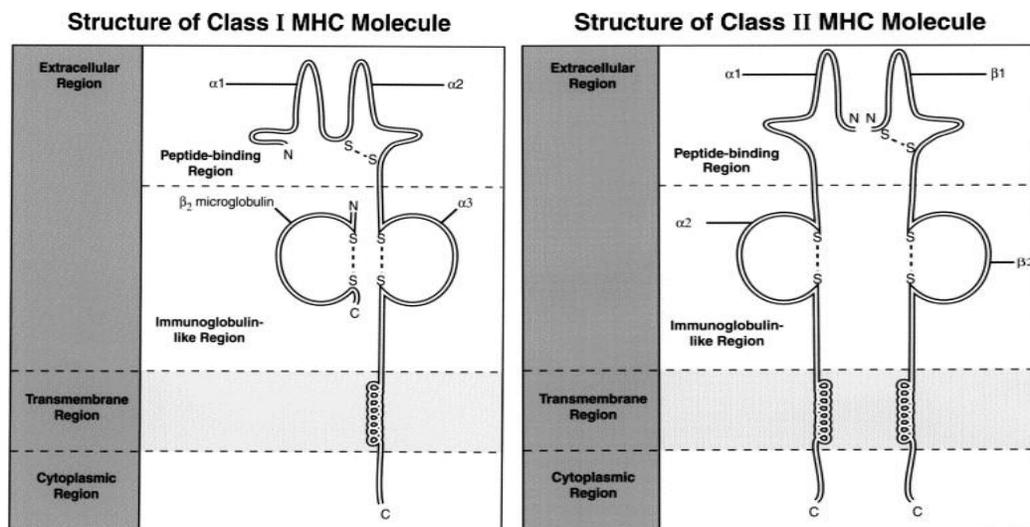
1. Gen HLA dan Epstein Barr Virus

Gen Mayor Histocompatibility Complex (MHC) terletak pada 4 megabase region di rantai pendek kromosom nomor 6 di dalam inti sel, menghasilkan protein yang disebut Human Leucocyte Antigen (HLA) dan berperan terhadap respon imun dimana antigen akan ditentukan nasibnya oleh keberhasilan molekul HLA mempresentasikan antigen sel T untuk dieliminasi (Judajana 2003 ; Abbas dan Lichtman 2009).



Gambar 3. Letak HLA pada gen (dikutip dari Mehra dan Kaur,2003)

Struktur molekul HLA kelas 1 terdiri dari *antigen binding region*, *immunoglobulin like region*, *transmembrane region* dan *cytoplasmic region*. *Antigen binding region* berfungsi untuk mengikat antigen asing. Bagian ini terbagi atas dua rantai $\alpha 1$ dan $\alpha 2$, sedangkan *immunoglobulin like region* terdiri dari rantai $\alpha 3$ dan $\beta 2$ microglubulin. Rantai $\alpha 3$ berfungsi sebagai tempat ikatan TcCD8+. *Transmembrane region* adalah polipeptida yang merupakan perpanjangan rantai $\alpha 3$ yang berfungsi sebagai jalur menuju sitoplasma dan merupakan tempat terikatnya molekul HLA pada membran sel (Abbas dan Lichtman 2009)



Gambar 4. Molekul HLA kelas I dan II (dikutip dari kepustakaan Peters VB,1999)

Gen HLA kelas I terdiri dari tiga lokus HLA-A, HLA-B dan HLA-C. Molekul HLA kelas I merupakan molekul yang diekspresikan oleh gen HLA kelas I dan terletak pada permukaan sel berinti, kecuali jaringan susunan saraf pusat, sperma, oosit dan plasenta yang ekspresinya sangat minimal. Manfaat biologik ekspresi gen HLA kelas I adalah memproses dan mempresentasikan antigen endogen, misalnya peptide terhadap sel T cytotoxic CD 8+ (TcCD8+) melalui molekul T cell receptor. Sedangkan gen HLA kelas II terdiri dari HLA-DP, DQ, DR α dan DR β . Molekul HLA kelas II terdapat pada sel dendrit, makrofag dan sel B. Ekspresi dari gen HLA kelas II ini adalah mempresentasikan molekul HLA kelas II pada peptida terhadap sel T helper CD4+ (ThCD4+) melalui TCR. (Abbas dan Lictman 2009)

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui hubungan HLA dengan KNF. Pada tahun 1974, Simon et al yang pertama melaporkan hubungan fenotip HLA-A2 dan resiko KNF pada suku bangsa Cina yang bermukim di Singapura dan mendapatkan HLA A2-BW46, A19-B17 dan A2-B16 beresiko tinggi menderita KNF. Sedangkan pada populasi KNF sedang-tinggi didapatkan B17-B18 dan B35 juga mengalami peningkatan frekwensi terjadinya KNF. Penelitian serupa yang dilakukan oleh Chan et al pada suku bangsa Cina di Asia Tenggara juga menyimpulkan hubungan HLA sebagai faktor resiko terjadinya KNF. Pada penelitian Cheng et al di Taiwan dapat disimpulkan bahwa hipotesa yang menghubungkan faktor genetik dengan kejadian KNF didapatkan bahwa regio HLA yang dimaksudkan adalah lokus HLA-A (Cheng et al, 2003).

Sejumlah penyakit yang belum diketahui etiologi dan patogenesisnya seperti KNF telah dideskripsikan mempunyai hubungan dengan faktor HLA yang spesifik. Hal

itu menunjukkan bahwa kerentanan terhadap penyakit berhubungan dengan gen yang menyandi molekul HLA. Melalui analisis urutan DNA dapat diketahui bahwa regio hipervariabel yang terletak dalam celah ikatan antigen pada molekul HLA merupakan kunci yang menentukan apakah molekul tersebut berperan pada predisposisi genetik terhadap suatu penyakit. Namun pandangan diatas masih belum dapat disimpulkan dengan pasti, melalui mekanisme mana HLA dapat berperan dalam kejadian penyakit.

Hal ini disebabkan alel HLA

yang berhubungan dengan penyakit tertentu dapat juga ditemukan dalam individu yang sehat, dan jika seluruh individu tersebut diikuti secara prospektif, sebagian mereka tidak pernah sakit. Berdasarkan hal tersebut maka menjadi jelas bahwa ekspresi gen HLA tertentu sendiri saja tidaklah cukup sebagai penyebab timbulnya penyakit. Gen HLA hanya merupakan salah satu dari beberapa faktor yang berkontribusi untuk terjadinya penyakit meskipun merupakan faktor yang terpenting. (Abbas,2000) Sehingga dapat disimpulkan bahwa HLA sebagai petanda genetik seseorang sangat berperan pada respon imun terutama pada infeksi intraselular seperti VEB. Infeksi VEB sebagai salah satu faktor penyebab KNF sangat ditentukan keberadaanya di dalam tubuh manusia oleh HLA. (Munir ,2006)

Pada saat infeksi oleh virus epstein barr, terjadi fagositosis antigen oleh APC (Antigen Presenting Cell), misalnya sel mononuclear, sel dendritik dan lain-lain, maka antigen seperti EBV mengalami endositosis dan di lokalisasi dalam vesikel yang disebut endosom dan lisosom. Kandungan vesikel dengan PH asam dan enzim proteolitik seperti cathepsin akan menyebabkan degradasi peptida antigen virus terutama oleh cathepsin. Gen HLA kelas II menangkap isyarat dari peptida antigen,

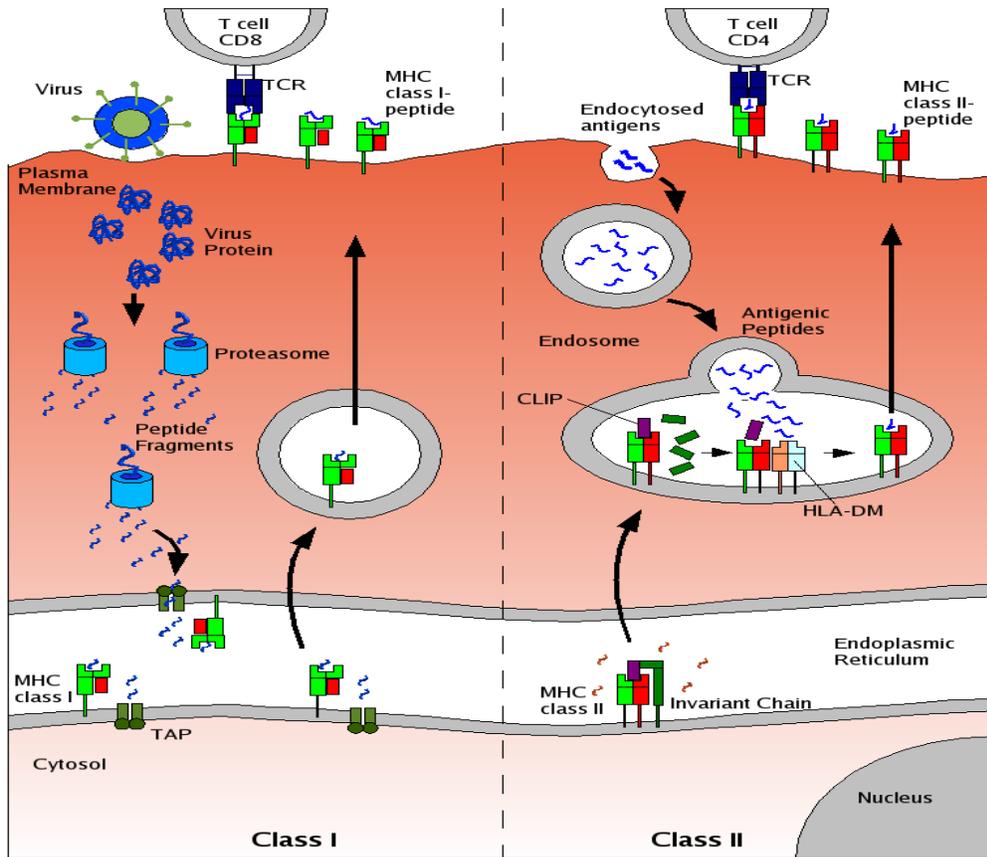
sehingga pada proses selanjutnya muncul kode genetik dari gen HLA kelas II untuk mensintesa molekul HLA kelas II didalam endoplasmic retikulum. Molekul yang baru dibentuk ini akan ditransportasikan ke badan Golgi dan membentuk *exocytic vesicle*. Vesikel yang berisi molekul HLA kelas II ini akan menyatu dengan lisosom yang berisi peptida antigen virus. Peptida antigen ini akan diikat oleh *binding clefts* yang dibentuk oleh rantai $\alpha 1$ dan $\beta 1$ dari molekul HLA kelas II. Ikatan peptida dengan molekul HLA kelas II ini akan dimunculkan ke permukaan sel. Molekul HLA kelas II selanjutnya akan mempresentasikan determinan antigen tersebut kepada sel limfosit Th CD4+ melalui TCR (T Cell Receptor). (Abbas,2000)

Ikatan molekul ini akan menimbulkan reaksi imunologik, dimana timbul proses imun yang menyebabkan ThCD4 berdiferensiasi menjadi limfosit *T helper 1* (Th1). Limfosit ini akan melepas IL2, TNF α . Dan INF γ . Bahan-bahan ini akan memicu limfosit Tc CD8+ untuk aktif mencari sel yang terinfeksi. Sel limfosit TcCD8 melalui reseptor TCR akan mengenal dan

mengikat antigen yang dipresentasikan oleh HLA kelas I. Interaksi dari kompleks trimolekuler tersebut merupakan langkah awal dalam proses imunitas spesifik dan berakhir dengan eliminasi antigen virus tersebut oleh TcCD8.(Judajana,2003)

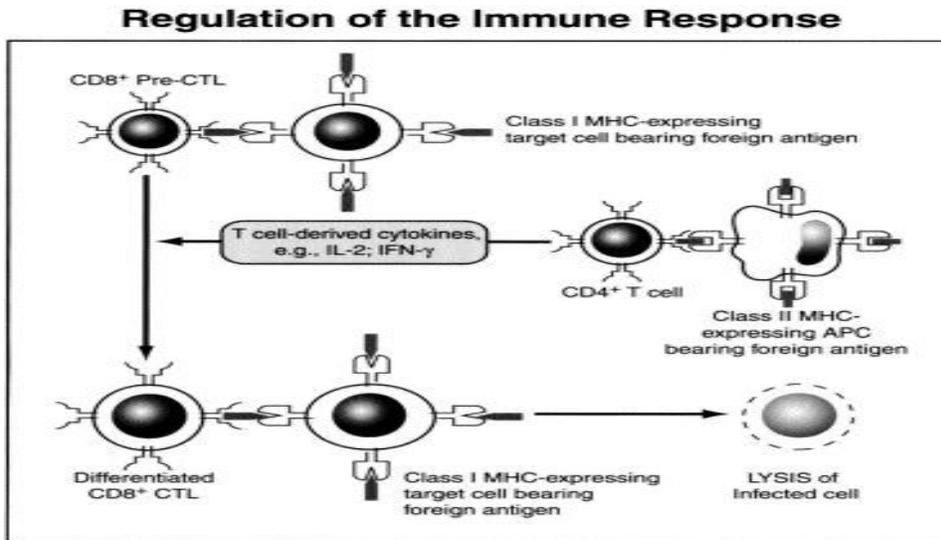
Sedangkan pada HLA kelas I, pada saat virus memasuki sel atau melalui fagosom, antigen intraselular seperti EBV, akan didegradasi menjadi peptida didalam sitosol oleh enzim proteolitik. Peptida antigen ini akan dikirim ke *endoplasmic reticulum* (ER) melalui *transporter associated with antigen processing* (TAP). Ketika peptida antigen memasuki endoplasmic reticulum, maka peptida akan terikat pada *binding clefts* yang dibentuk oleh rantai $\alpha 1$ dan $\alpha 2$ molekul HLA kelas I dengan bantuan tapasin. Setelah kompleks

peptida dan HLA kelas I lepas dari tapasin maka kompleks ini akan dikirim ke badan Golgi dan dikeluarkan ke permukaan sel melalui *exocytic vesicle*. Peptida yang dipresentasikan oleh molekul HLA kelas I ini akan dikenal dan berikatan dengan limfosit Tc CD8+ melalui reseptor TCR. (Abbas,2000) *



Gambar 5. Interaksi virus dengan HLA kelas I dan II (dikutip dari kepustakaan Peters VB,1999)

Ketika TCR berikatan dengan antigen yang dipresentasikan oleh HLA kelas I, limfosit TcCD8+ mengeluarkan granul untuk menghancurkan sel target. Perforin merupakan salah satu granul yang dapat melubangi membran sel target. Granzym (*Granule enzymes*) yang juga dibentuk oleh TcCD8+ akan masuk ke dalam sel target melalui lubang pada membran sel yang dibuat oleh perforin dan akan terjadi proses lisis pada sel target. (Behrens,2004)



Gambar 6. Interaksi TcCD8+, CTL dan molekul HLA kelas 1 (dikutip dari kepustakaan Peters VB,1999)

Dalam genetika, alel (dari bahasa Belanda, *allel*, dibentuk dari kata bahasa Yunani, *allélon*, "saling berhadapan") merupakan bentuk-bentuk alternatif dari gen pada suatu lokus. Alel terbentuk karena adanya variasi pada urutan basa nitrogen akibat peristiwa mutasi. Setiap individu mewarisi dua alel untuk setiap gen, masing-masing satu dari orang tua. Jika kedua alel sama, maka individu tersebut memiliki gen yang homozigot. Jika alelnya berbeda disebut gen yang heterozigot. (Biesecker,2010)

Hilangnya alel HLA kelas I atau kelas II (*allele HLA loss*) pada gen HLA tertentu diperkirakan menyebabkan kegagalan interaksi *HLA-peptide complex* dengan limfosit T *c/s* (CD8⁺) atau limfosit T *helper* (CD4⁺). Hal ini disebabkan karena tidak dimunculkannya antigen virus/tumor pada epitop (*antigenic determinant*) sehingga keberadaan virus EB didalam sel inang (limfosit B dan sel epitel faring) atau sel kanker tidak dapat dikenali oleh sel imunokompeten. Adanya kelainan genetik ini akan sangat merugikan karena sel yang terinfeksi virus maupun sel kanker dapat terhindar (lolos)

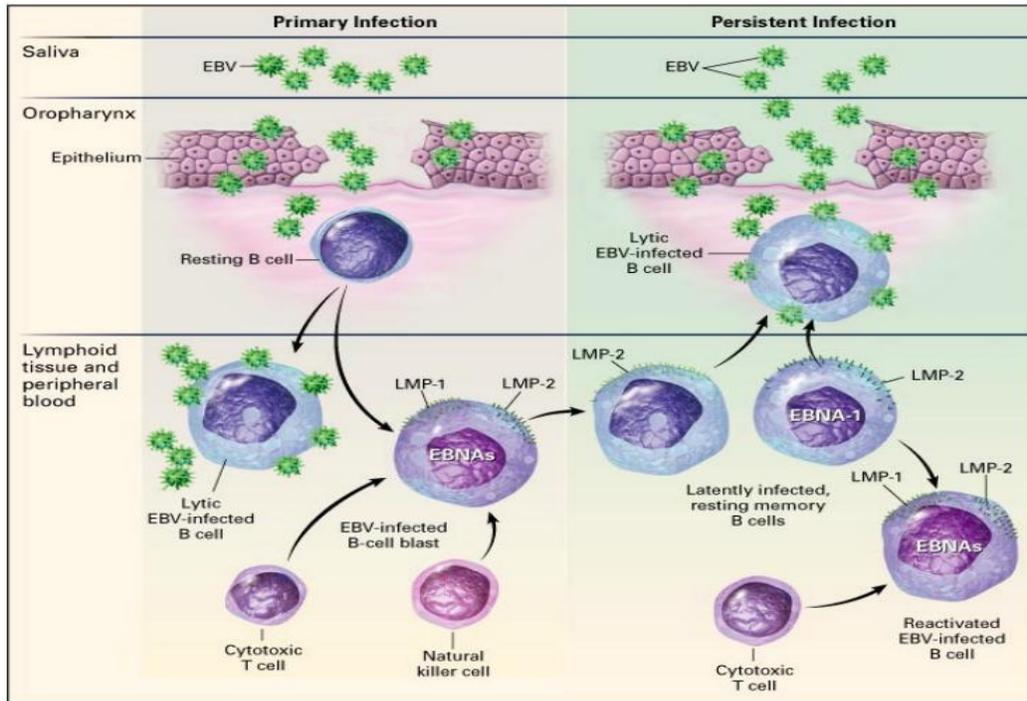
dari penghancuran melalui mekanisme imunologik, berakibat pertumbuhan kanker terus berlangsung. (Kolegium THT-KL,2010)

Analisis peptida antigen yang terikat, jelas menunjukkan bahwa molekul molekul HLA yang disandi oleh alel yang berbeda mempunyai pola pengikatan peptida yang berbeda. Adanya pola pengikatan peptida yang berbeda tersebut dapat menyebabkan suatu peptida antigen akan lepas dalam ikatan suatu molekul HLA sehingga menimbulkan pengaruh yang berbeda pada perangsangan aktivitas sel limfosit T. Terdapat bukti-bukti yang tidak langsung menyokong bahwa alel kerentanan dan protektif merupakan molekul mengikat dan menyajikan epitop peptida yang berbeda. (Devenport,1996)

2. Respon imun terhadap infeksi EBV

Infeksi EBV dapat menghalangi pengenalan sistem imunitas tubuh terhadap antigen, melalui ekspresi gen EBV yang terdapat pada sel memori limfosit B, melalui perubahan akibat proses ekspresi gen serta perubahan respon imun tubuh terhadap sel yang telah terinfeksi (Edwards et al,2004) . Terdapat dua jenis infeksi EBV yang terjadi yaitu infeksi litik, dimana DNA dan protein virus disintesis, disusul dengan perakitan partikel virus dan lisis sel. Jenis infeksi kedua adalah infeksi laten dimana DNA virus dipertahankan di dalam sel terinfeksi sebagai episom dalam waktu lama (20-25 tahun) tanpa menimbulkan gejala. Infeksi laten inilah yang sering berlanjut menjadi keganasan (Huang dan Lo,1999). Dalam beberapa studi juga ditemukan adanya DNA EBV dari sampel darah tepi penderita KNF (Stefi 2006; Breda et al 2010). Hal ini menunjukkan bagaimana suatu EBV mampu menghindari sistem imun tubuh manusia sehingga EBV

bisa menetap dalam sel limfosit B.



Gambar 7. Infeksi primer dan persisten EBV (dikutip dari Cohen,2000)

Virus Epstein Barr masuk melalui mukosa orofaring lewat saliva dan menginfeksi sel limfosit B yang berada di sub mukosa melalui ikatan CD21-Gp350. Selanjutnya EBV akan masuk ke dalam sitoplasma host dan menguraikan partikel-partikel EBV dan genomnya akan masuk ke dalam nucleus (gambar 7). Sehingga sel B yang terinfeksi akan mengekspresikan beberapa antigen laten seperti LMP1 dan LMP2 (LMP2A dan 2B). (Korcum et al,2006)

Bentuk umum infeksi laten EBV berdasarkan ekspresinya bisa dibedakan menurut 3 tipe yaitu 1) infeksi laten tipe 1 yang mengekspresikan EBER dan EBNA, 2) infeksi laten tipe 2 yang mengekspresikan protein LMP disamping EBER dan EBNA dan 3) infeksi laten tipe 3 yang akan mengekspresikan semua protein terkait.

Gambar 8. Ekspresi infeksi laten EBV pada beberapa penyakit (Cohen,2000)

	EBNA1	EBNA2	EBNA3	LMP1	LMP2	EBER	PENYAKIT
Tipe 1	+	-	-	-	-	+	Lomfoma burkit
Tipe 2	+	-	-	+	+	+	KNF,Hodgkin disease, Limfoma Sel T perifer
Tipe 3	+	+	+	+	+	+	Penyakit limfoproliferatif, Infeksi mononukleosis
Lainnya	±	-	-	-	+	+	Karier yang sehat

Pada studi reaksi EBV - Cytotoxic T Lymphocyte spesifik secara invitro dengan autolog LCL (Limphoblastoid Cell Lines) menunjukkan adanya pengelompokan pada protein virus laten, yang didominasi oleh satu atau lebih dari protein EBNA 3 (EBNA 3A,3B,3C) kemudian subdominan terhadap LMP2 dan kadang-kadang terhadap EBNA2, EBNA-LP dan LMPI (Khana,1992 ; Murray 1992) , sedangkan EBNA1 diproteksi terhadap proses konvensional HLA kelas 1 oleh karena EBNA1 mengandung Glycine-Alanine repeat (GAR) yang dominan yang mencegah degradasi kompleks proteasom. Sehingga hal ini dimanfaatkan untuk CTL-based therapy untuk KNF. Di lain pihak, pada penyakit limfoproliferatif trasplant, dimana gen laten EBV dengan seluruh komplemen diekspresikan, termasuk protein imunodominan kelompok EBNA3, sedangkan pada KNF protein virus yang tampak EBNA1, LMP1 (pada beberapa kasus) dan dari bukti analisa transkripsi yaitu LMP2. Oleh karena kelompok EBNA dianggap memiliki proteksi dalam proses HLA sehingga yang difokuskan adalah peranan LMP2. (Brooks, 1992; Busson 1992).

Latent Membran Protein 2A (LMP2A) merupakan salah satu antigen laten yang diekspresikan limfosit B yang terinfeksi EBV (Hariwiyanto,2009), bersifat imunogenik dan merupakan target utama bagi *Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL)* pada KNF (Khana et al 1996).

LMP2A inilah yang bertanggung jawab terhadap fase laten pada sel B yang terinfeksi EBV dengan cara menghambat reaktivasi sel litik EBV pada sel yang bersifat laten dengan mengganggu sinyal proses transduksi sel B, mengakibatkan virus tetap berada dalam stadium laten/persisten. Oleh karena itu, EBV bersirkulasi terus dalam darah dan menetap persisten seumur hidup dalam hostnya. (Kong et al,2010)

Sel T yang terlibat dalam respon imun seluler adalah *Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL)*. Berperan penting terhadap pengontrolan infeksi terhadap virus seperti EBV dengan cara mengenali antigen dalam bentuk peptide epitop yang berasosiasi dengan molekul MHC kelas 1 pada permukaan sel target. Sel yang terinfeksi EBV akan mengekspresikan antigen laten dalam sel dan dipresentasikan pada permukaan sel yang terinfeksi dalam bentuk kompleks epitop-HLA kelas 1 yang dapat menimbulkan respon sel T dalam hal ini CTL.

Beberapa epitop LMP2A seperti TYGPVFMCL dikenali oleh CTL pada individu yang memiliki HLA-A24 (Kobayashi et al,2009), epitop CLGGLLTMV yang dikenali oleh CTL pada individu dengan HLA-A2, sedangkan epitop lainnya yaitu SSCPLSKILL dikenali CTL pada individu dengan HLA-A11. Tipe HLA-A24, HLA-A11 dan HLA-A2 ditemukan pada penderita KNF pada populasi Asia tenggara dan Caucasia (Rickinson et al 1997, Khuzushima et al 2003). Pada penelitian pendahuluan kelompok EBV Australia dan Yogyakarta menunjukkan dari 9 orang, baik sehat maupun penderita KNF banyak ditemukan tipe HLA-A24 (88,9%), dibandingkan HLA-A11 (22%) dan HLA-A2 (44%). Orang Indonesia asli yang mempunyai HLA-A24 memiliki kemungkinan terhadap resiko tinggi terkena KNF (Wiqoyah 1999; Judajana 2009). Pada penelitian lainnya di Yogyakarta dengan isolasi limfosit dari darah untuk uji proliferasi limfosit T terhadap

mitogen PHA-P untuk mengetahui respon imun penderita, dan pembentukan Lymphoblastoid Cell Line (LCL), amplifikasi gen LMP 2A bagian epitop CTL yang terkait HLA-A2 (epitop CLGGLLTMV), HLA-A24 (epitop TYGPVFMCL) dan HLA-A11 (epitop SSCPLSKILL) dengan DNA dari darah dan LCL yang dilanjutkan dengan sekuensing, didapatkan bahwa respon proliferasi limfosit T rendah atau respon imun penderita jelek, dan terjadi perubahan nukleotida gen LMP 2A pada ketiga epitop CTL dibandingkan dengan Prototype (B 9 5.8). (Wiqoyah,1999)

C. Gambaran Klinis

Gelata-gejala awal yang muncul tidak spesifik seperti gangguan pendengaran, blood stained rinore dan obstruksi nasi dan bahkan ada yang tanpa gejala sama sekali pada tahap awalnya. Hal ini menyebabkan sekitar 60-95% penderita KNF terdiagnosis pada stadium lanjut (III atau IV). (Kwong 2004, Wei 2006).

Keluhan klinis sangat tergantung dengan lokasi tumor primer serta perluasannya, baik hanya terbatas pada jaringan sekitarnya atau sudah metastasis regional ke kelenjar getah bening maupun jauh. Gejala paling banyak dikeluhkan saat penderita datang adalah adanya benjolan di leher (60-97,5%), dimana benjolan ini merupakan tanda adanya metastasis tumor ke limfonodi leher. Limfonodi yang sering terlibat adalah kelompok limfonodi subdigastrik dan kelompok limfonodi jugularis superior (Wei, 2006, Kolegium THT-KL, 2010).

Gejala lain dapat berupa gangguan pada rongga hidung (56-79%); epistaksis, obstruksi nasi, ingus campur darah. Gangguan pada telinga (15-20%) ; telinga terasa penuh, tersumbat, tinitus, otitis media serosa atau penurunan pendengaran tipe konduktif. Gangguan neurologis; keatas mengenai grup anterior saraf kranial II, III, IV, V

dan VI dengan keluhan diplopia, hipestesi pipi, reflek kornea menurun dan sakit kepala. Jika semua saraf grup anterior terkena akan menyebabkan sindrom petrosphenoid berupa neuralgia trigeminal dan oftalmoplegia sepihak (unilateral). Perluasan kebelakang mengenai grup posterior saraf kranial VII, VIII, IX, X, XI dan XII, dapat mengenai otot rahang sehingga menimbulkan trismus . Bila terjadi kelumpuhan saraf kranial IX, X, XI, dan XII disebut sindrom retroparotidian atau sindrom Jackson. (Wei, 2006; Kuhuwael,2001; Kolegium THT-KL, 2010).

D. Diagnosis

Diagnosis ditegakkan berdasarkan anamnesis sistematis, pemeriksaan fisis THT, biopsi nasofaring dan pemeriksaan radiologi yang meliputi foto polos, CT-Scan dan atau MRI untuk melihat massa tumor, sedang untuk melihat adanya metastasis jauh, dapat diketahui melalui pemeriksaan foto toraks, bone survey/scaning dan USG abdomen.

Pemeriksaan patologi dapat berupa pemeriksaan sitologi; biopsi sikatan (brush) dan aspirasi jarum halus (FNAB) atau histopatologi dengan melakukan biopsi nasofaring dengan atau tanpa bantuan endoskop.

Pemeriksaan serologis yaitu dengan mendeteksi antibodi yang dihasilkan oleh EBV. Pemeriksaan antibodi spesifik sebagai tumor marker yang paling bermanfaat untuk diagnosis KNF adalah IgA anti EBV-VCA dan IgA anti EBV-EA (Wei, 2006 ; Kolegium THT-KL, 2010).

E. Pemeriksaan serologis EBV

Henle pertama kali mengemukakan bahwa antibodi IgA terhadap Epstein Barr Virus Viral Capsid Antigen (Ig A Anti-EBV VCA) dan antibodi IgA terhadap Epstein Barr Virus Early Antigen (IgA Anti-EBV EA) secara signifikan berkaitan dengan KNF (Wei, 2006).

Adanya KNF sangat ditunjang oleh pemeriksaan serologi. Diketemukannya virus Epstein-Barr yang mengandung antigen virus (antara lain EBV- VCA, EA, LMA 1-6 dan EBNA 1-3) sebagai etiologi KNF telah membuka jalan ke arah upaya diagnosis dini dan menilai perkembangan tumor (progresivitas) pasca radioterapi atau kemoterapi melalui pemeriksaan serologi. Pemeriksaan ini dilakukan untuk mendeteksi antibodi yang terbentuk yaitu IgA anti EBV-VCA, IgA anti EBV-EA, antibodi terhadap antigen membran, antibodi terhadap inti virus (*Epstein Barr Nuclear Antigen / EBNA*), antibodi terhadap EBV-Dnase dan *antibody dependent cellular cytotoxicity / ADCC*. Titer antibodi spesifik terhadap EBV ini dapat diperiksa dengan menggunakan berbagai macam cara antara lain imunofluoresensi (IF), *enzyme linked immunosorbent assay* (Elisa) dan *radio-immuno assay*. Beberapa antibodi terhadap virus EB pada KNF ini ternyata sangat spesifik, tidak dijumpai pada keganasan di daerah kepala dan leher lainnya. (Kolegium THT-KL,2010)

Ig A anti VCA adalah antibodi yang paling spesifik untuk diagnosis dini KNF dan dapat dipakai sebagai tumor marker. Antibodi ini dianggap positif bila titernya > 5, dan dapat digunakan untuk penapisan (*screening*), sebagai prognostikator dan sebagai petanda tumor (*tumor marker*) yang spesifik untuk deteksi KNF terutama pada stadium dini (nilai diagnostik), memantau hasil pengobatan dan memperkirakan kekambuhan (nilai

prognostik). Pemeriksaan titer IgA anti VCA dapat digunakan untuk mendeteksi kasus KNF yang masih asimtomatik.

Ig G anti EA kurang sensitif bila dibandingkan dengan Ig A anti VCA untuk diagnosis dini KNF. Tetapi antibodi ini berguna untuk menilai perjalanan penyakit dan menentukan prognosis, karena titernya akan meninggi bila penyakitnya bertambah berat. Antibodi ini dianggap positif bila titer > 10 .

Titer IgG anti EBV-EA dianggap positif bila $\geq 1/80$ yang menurun pada penderita KNF yang telah mendapatkan pengobatan dengan radiasi dan tidak pada penderita dengan kanker kepala dan leher lainnya. Bila titernya meningkat lagi harus dicurigai adanya kekambuhan atau metastasis. Dengan demikian pemeriksaan IgG anti EBV-EA (terutama tipe difus / D) lebih berguna untuk menentukan perjalanan penyakit dan prognosis KNF (nilai prognostik). (Kolegium THT-KL ,2010)

F.Terapi

Pengobatan pilihan utama KNF berupa radioterapi terutama bila masih stadium dini (stadium I, II).Radioterapi KNF dengan tujuan paliatif diberikan pada kasus lanjut, atau untuk mengurangi keluhan akibat tumornya baik tumor primer atau tumor kambuh setelah mendapat radiasi dosis penuh. Contoh radiasi paliatif misalnya tumor (KNF) besar yang menimbulkan gejala obstruksi jalan napas atas atau saluran makanan, penekanan organ sekelilingnya terutama orbita, perdarahan tumor yang tak dapat dihentikan dengan hemostasis, dan metastasis tulang. (Kolegium THT-KL,2010)

Dosis radiasi (T1 dan T2) diberikan radiasi sebesar 200 - 220 cGy per fraksi, 5 kali seminggu tanpa istirahat (continuous or conventional technique) selama sekitar 6 – 7,5

minggu sampai mencapai dosis total 6000 - 7000 cGy. Sedangkan untuk KNF dengan ukuran tumor yang lebih besar (T3 dan T4) diberikan dosis total radiasi pada tumor primer di nasofaring yang lebih tinggi yaitu 7000 - 7500 cGy. Bila tidak didapatkan metastasis di KGB leher (N0) maka diberikan radiasi profilaktik dengan dosis sekitar 4000 - 5000 cGy dalam empat atau empat setengah minggu, sedangkan bila ada pembesaran KGB di leher (metastasis regional) diberikan radiasi yang dosisnya sama dengan tumor primernya. Bila masih didapatkan residu tumor, diberikan radiasi tambahan (booster) dengan area diperkecil hanya pada tumornya saja sebesar 1000 - 1500 cGy sehingga mencapai dosis total sebesar 7500-8000 cGy. Selain radiasi eksterna, radiasi tambahan dapat diberikan dengan cara radiasi interna (brachytherapy). .(Kolegium THT-KL,2010)

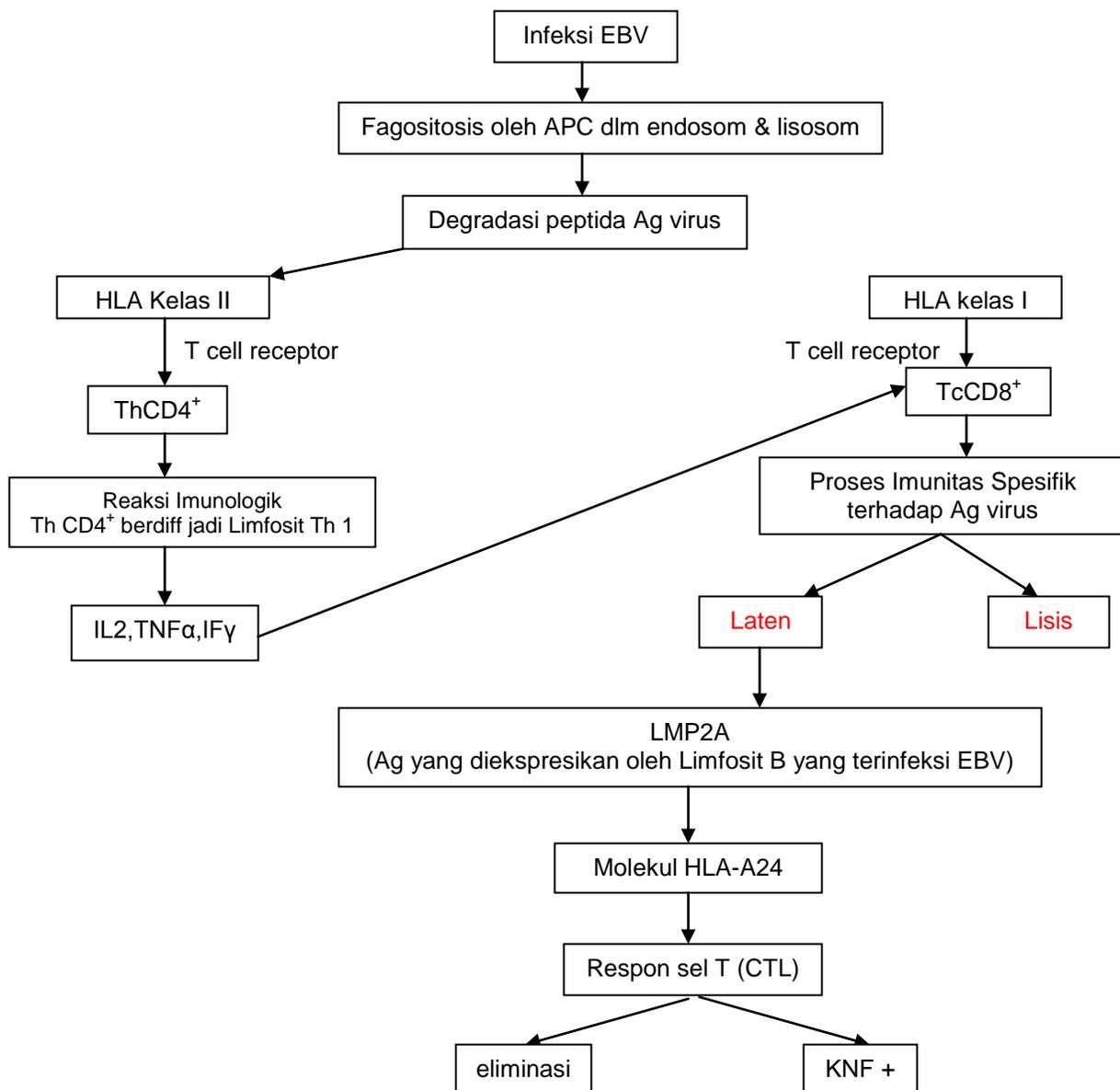
Respon radioterapi secara keseluruhan (overall response rate) antara 25% - 65%. Dilaporkan respons lengkap (RL) sekitar 43%- 65%, RS 24%-30%, TR 3,5%- 20% dan P sekitar 0-15%. Angka bertahan hidup 5 tahun untuk T1 sebesar 73%, T2 : 60%, T3 : 41% dan T4: 15%, sedangkan angka bertahan hidup 5 tahun untuk N0 sebesar 61%, N1 : 48%, N2 : 36% dan N3 : 12%. Dilaporkan juga angka bertahan hidup untuk 1, 2, 5 dan 10 tahun sebesar 82,7%, 67,4%, 47,8% dan 39,8%. Angka bertahan hidup 5 tahun rerata antara 24% - 58%. Sekitar separuh (50%) dari penderita KNF stadium lanjut ditemukan meninggal dalam tahun pertama setelah terapi radiasi. .(Kolegium THT-KL,2010)

Radioterapi KNF yang dikombinasi dengan kemoterapi dilaporkan respons rate dan survival yang lebih tinggi. Indikasi pemberian kemoterapi pada KNF antara lain residu lokal pasca radiasi interna, tumor residif, stadium III – IV dan metastasis jauh. Menurut

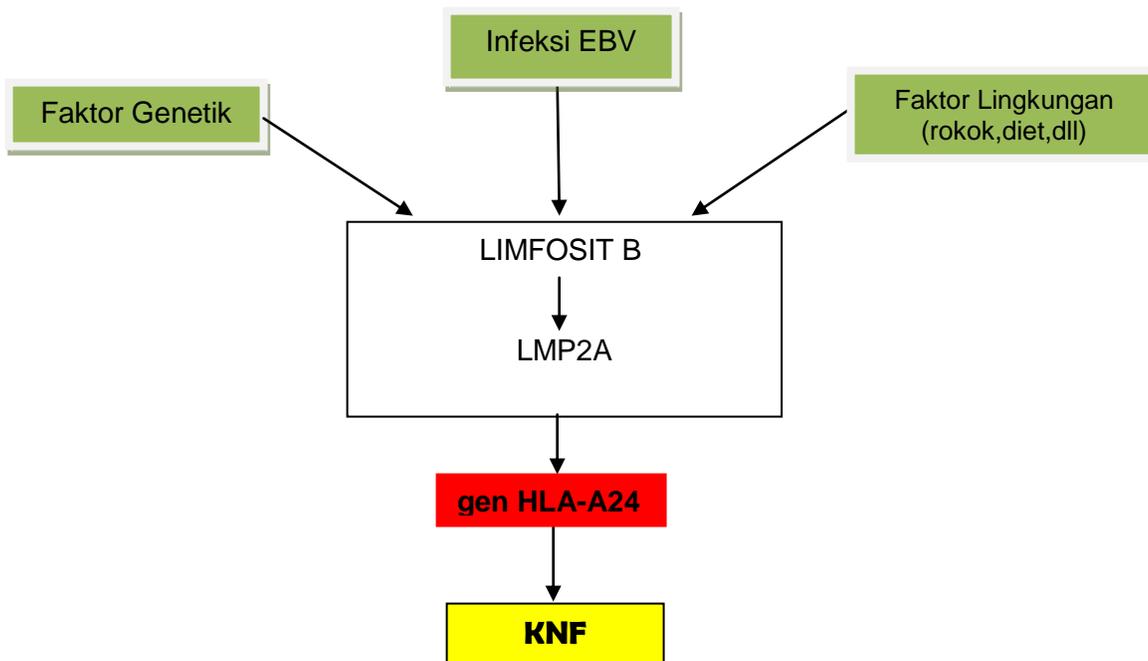
Denic (1998), program pengobatan kombinasi radioterapi dan kemoterapi untuk penderita karsinoma nasofaring stadium III dan IV dapat mengkombinasikan radioterapi dengan cisplatin dan fluorouracil atau kombinasi radioterapi dengan cisplatin dan bleomycin. (Kolegium THT-KL, 2010)

Prognosis penderita KNF sangat bergantung pada stadium klinis saat dilakukan diagnosis; dimana lebih dari 80% keberhasilan terapi terjadi pada stadium awal (stadium I-II) dan kurang dari 40% keberhasilan dapat diharapkan bila penderita didiagnosis pada stadium lanjut (stadium III-IV). (Kwong, 2004)

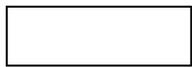
G. Kerangka Teori



H.Kerangka Konsep



tidak diteliti



= variabel antara



= variabel independent



= variabel terikat

= variabel

=Variab

= Varia

= Hubu

BAB III

METODE PENELITIAN

A Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksploratif yang bersifat analitik observasional. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan alel gen HLA- A24 pada sampel darah tepi dan *cytobrush* nasofaring penderita KNF di Makassar.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di RSUP Dr.Wahidin Sudirohusodo Makassar dan Laboratorium Biomolekuler Fakultas Kedokteran UGM sejak Oktober – Desember 2013

C. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah penderita KNF yang datang berobat ke poliklinik THT RSUP Dr.Wahidin Sudirohusodo, Makassar sejak Oktober- Desember 2013.

D.Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Sampel adalah seluruh populasi terjangkau yang memenuhi kriteria penelitian dan sampel penelitian diambil dari populasi penelitian yang telah diidentifikasi dan memenuhi kriteria inklusi. Pengambilan sampel dilakukan secara *consecutive sampling*.

E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria inklusi

- 1.a. Subyek penelitian adalah laki-laki atau perempuan penderita KNF berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologi.
- b. Bersedia menjadi sampel penelitian
- d. Pengambilan sampel darah tepi dan sampel cytobrush pada subyek kasus dilakukan setelah menandatangani informed consent penelitian.

2. Kriteria eksklusi

- 2.a. Penderita tidak kooperatif

F. Ijin Subyek Penelitian

Dalam pelaksanaan penelitian ini, setiap tindakan dilakukan atas seijin penderita/orang tua penderita melalui lembar *informed consent* dan dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk dilaksanakan dari Komisi Etik Penelitian Biomedik pada Manusia Fakultas Kedokteran Universitas Hassanudin No. 1410/H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2013.

G. Bahan dan Cara Penelitian

1. Bahan dan Alat penelitian

1.A. Bahan

- a. Sampel darah tepi penderita KNF
- b. Sampel cytobrush penderita KNF
- c. Nuclisens lysis buffer
- d. Nuclisens automated isolation reagent

- e. Aseton
- f. Etanol 70%
- g. H₂O steril
- h. HPLC Water
- i. Platinum taq DNA polymerase (include buffer, MgCL₂)
- j. 10mM dNTP mix
- k. UltraPure DNase/RNase
- l. Trisma base
- m. 100bp DNA ladder (marker)
- n. Lyophilized primer
- o. 100 nmol gen Imp2a
- p. ddNTP set Biochemika
- q. GF-1 PCR Clean Up Kit
- r. 100bp DNA ladder
- s. Loading buffer
- t. Agarose gel electrophoresis
- u. TAE buffer
- v. Ethidium bromide

1.B. Alat Disposable

- a. Mini brush
- b. Tabung EDTA 5ml
- c. *Vacumtainer*
- d. Needle holder
- e. Kapas + alkohol 70 %
- f. *Safelock tube 1,5 ml*
- g. *Microtube 1,5 ml*

- h. *PCR tube 0,2 ml*
- i. *Pipet tips 10 μ l (white tips)*
- j. *Pipet tips 200 μ l (yellow tips)*
- k. *Pipet tips 1000 μ l (blue tips)*
- l. *Screw capped conical tube 15 ml*
- m. *Screw capped conical tube 50 ml*
- n. *Gloves ukuran M dan L*
- o. *Microtube rack*
- p. *Alat cytobrush*

1.C.Alat Penelitian

- a. Teleskop 0° (Flegert Endotech) ; Light Source : Medicindo
- b. Mini set trifuse
- c. Vorteks mixer
- d. Spektrofotometer RNA/DNA calculator Mikropipet (10 μ , 200 μ ,1000 μ)
- e. PCR machine
- f. Termocycler
- g. Mupid elektroforesis UV gel doc dan kamera digital
- h. Light cycler/real time PCR

2. Prinsip kerja penelitian

- a. Dilakukan anamnesis.
- b. Dilakukan pemeriksaan THT: otoskopi, rinoskopi anterior, rinoskopi posterior dan faringoskopi.
- c. Bagi yang memenuhi kriteria inklusi, dimasukkan sebagai sampel penelitian.
- d. Dilakukan *Informed Consent* untuk kemudian ditanda tangani.

- e. Dilakukan pengambilan sampel darah tepi 3ml dari vena cubiti dan sampel cytobrush dengan brushing nasofaring dengan tuntunan nasoendoskopi .
 - 1. Cara pengambilan sampel darah tepi :
 - a. Pasang tourniquet di lengan atas
 - b. Identifikasi vena cubiti
 - c. Desinfeksi dengan kapas alkohol, ambil darah vena 3ml
 - d. Tutup luka dengan plester obat.
 - e. Sampel darah yang terkumpul disimpan dalam -80°C untuk kemudian dikirim ke laboratorium.
 - 2. Cara pengambilan sampel cytobrush
 - a. Tampon cavum nasi dengan efedrin 5% dan Lidokain 2% selama 5 menit.
 - b. Anestesi nasofaring dengan xylocain spray 10%.
 - c. Evaluasi nasofaring dengan nasoendoskopi
 - d. Ambil usapan nasofaring dengan brushing dengan visualisasi endoskopi.
 - e. Potongan mini brush yang mengandung brushing nasofaring tadi dimasukkan dalam larutan lisis buffer 2ml dan disimpan dalam suhu -80°C untuk dikumpulkan dan dikirim ke laboratorium.
- f. Isolasi DNA dari darah tepi dan cytobrush dengan Metode BOOM'S
- g. PCR dengan primer untuk HLA- A24 forward dan reverse
 - 1. Ukuran produk PCR 464 *base pair* (bp)
 - 2. Program PCR : 95°C selama 1 menit sebanyak 1 siklus ; 35 siklus (Denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik, Annealing pada suhu 53°C selama 10 detik, Extension pada suhu 72°C selama 1 menit). Hasil PCR divisualisasi dengan ethium bromida dibawah UV setelah elektroforesis pada 1,2% gel agarose.
- h. Analisa Hasil penelitian

H. Identifikasi Variabel

Dalam penelitian ini beberapa variabel dapat diidentifikasi berdasarkan peran dan skalanya :

1. Variabel independent adalah gen HLA-A24
2. Variabel terikat adalah KNF

I. Definisi Operasional

Sampel darah tepi adalah sampel darah penderita KNF yang diambil secara intravena sejumlah 3 ml.

Sampel cytobrush adalah sampel usapan nasofaring penderita KNF yang diambil dari hapusan nasofaring / brushing di daerah nasofaring dengan menggunakan sikat khusus dan anestesi lokal xylocain spray dengan tuntunan endoskopi.

Penderita KNF adalah penderita yang telah dilakukan anamnesa, pemeriksaan fisis serta terdiagnosa secara histopatologi menderita kanker nasofaring .

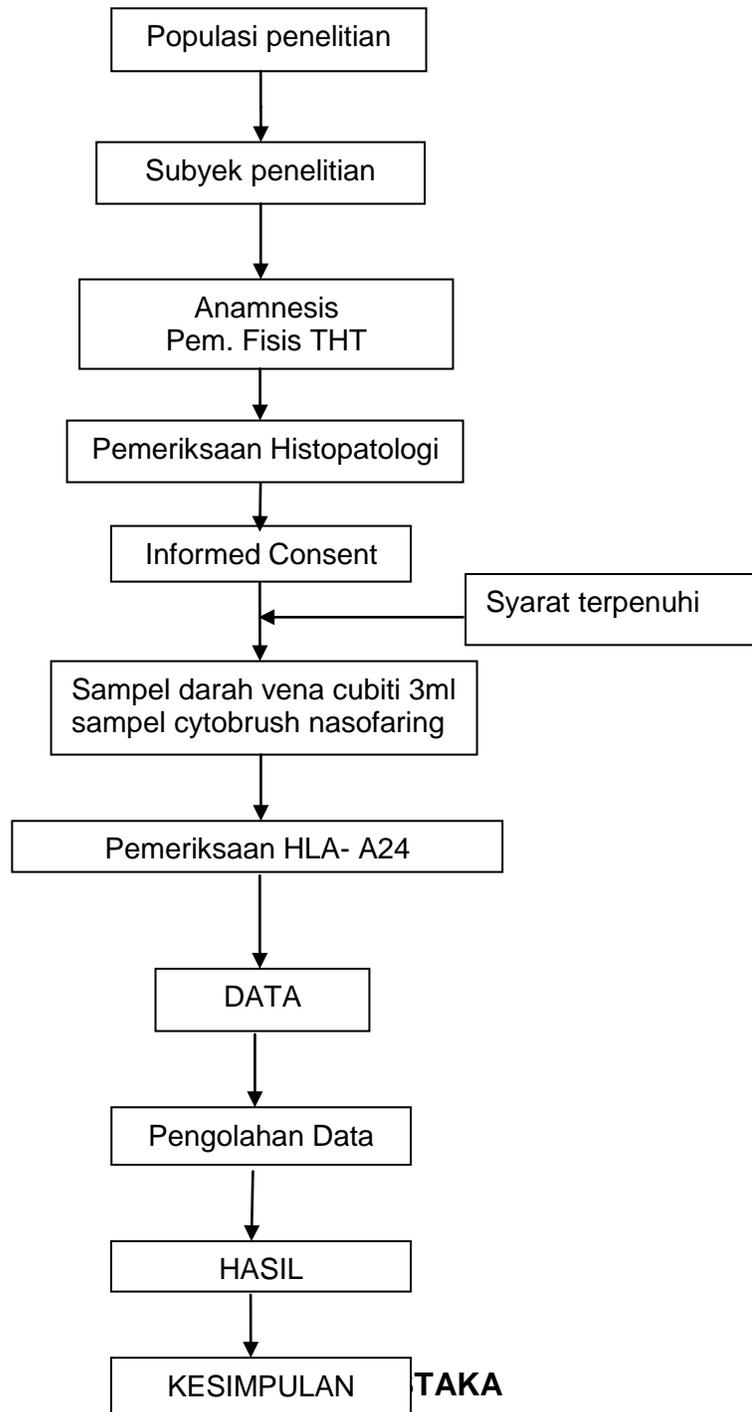
Gen LMP2A adalah gen latent membrane protein 2A yang merupakan tempat pengenalan/epitop dari Cytotoxic Lymphocyte-T yang dikenali oleh individu dengan HLA-A24 pada epitop TYGPVMCL

Gen HLA-A24 adalah gen yang didapatkan setelah PCR dengan melihat pita DNA pada 464 bp.

J. Metode Analisis

Data yang diperoleh, dikelompokkan sesuai dengan tujuan dan jenis data. Analisa dilakukan analisa bivariat dengan uji Fischer Exact Test.

K. Alur Penelitian



BAB IV

HASIL PENELITIAN

Selama periode bulan Oktober sampai Desember 2013 telah dilakukan penelitian untuk melihat alel gen HLA-A24 dari sampel darah tepi dan cytobrush nasofaring pada 30 penderita KNF, namun dari ke-30 sampel yang terkirim yang dapat diolah 16 sampel darah tepi dan 21 sampel cytobrush nasofaring. Hasilnya adalah sebagai berikut:

1. Karakteristik Umum Sampel

Tabel 1. Karakteristik sampel penelitian

Karakteristik	Penderita	%
Sex		
Laki-laki	16	76,2
Perempuan	5	23,8
Jumlah	21	100,0
Umur		
< 20	0	0
20-29	2	9,5
30-39	1	4,7
40-49	8	38,0
50-59	5	23,8
>60	5	23,8
Jumlah	21	100,0
Suku		
Bugis	9	42,8
Makassar	5	23,8
Toraja	1	4,7
Mandar	1	4,7
Bali	1	4,7
Buton	1	4,7
Termate	1	4,7
Luwuk Banggai	1	4,7
Kaili	1	4,7
Jumlah	21	100,0

Karakteristik sampel penelitian dapat dilihat pada Tabel 1, berdasarkan usia penderita Karsinoma Nasofaring, paling banyak pada rentang 40-49 tahun sebanyak 38,0%. Laki-laki 16 orang (76,2%) dan perempuan 5 orang (23,8%) dengan perbandingan 3,2 :1 terdiri dari suku Bugis 9 orang. (42,8%), Makassar 5 orang (23,8%), Toraja, Mandar dan di luar Sulawesi Selatan masing-masing 1 orang (4,7%).

Tabel 2. Distribusi Penderita berdasarkan Gambaran Histopatologi Penderita KNF

Gambaran Histopatologi(WHO)	Penderita	%
Type I (Karsinoma sel skuamosa berkeratinisasi)	0	0
Type II (Karsinoma berdiferensiasi tidak berkeratinisasi)	4	19,1
Type III (Karsinoma tidak berdiferensiasi / anaplastik)	17	80,9

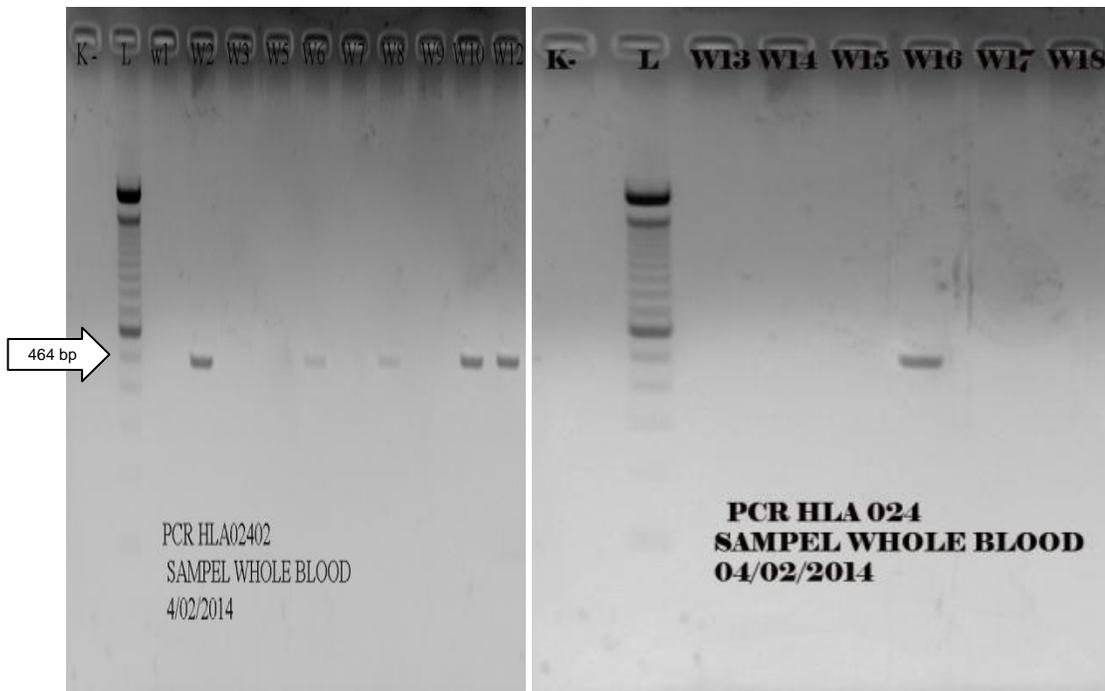
Distribusi gambaran histopatologi penderita KNF menurut WHO 1979 didapatkan terbanyak adalah WHO tipe III yaitu 17 orang (80,9%), selanjutnya WHO tipe II sebanyak 4 orang (19,1%) dan tidak didapatkan Who tipe I pada penelitian ini, dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 3. Distribusi Penderita berdasarkan Stadium KNF AJCC 2010

Stadium KNF	Penderita	%
I	0	0
II	6	28,6
III	4	19,0
IV A	6	28,6
IV B	4	19,0
IV C	1	4,7

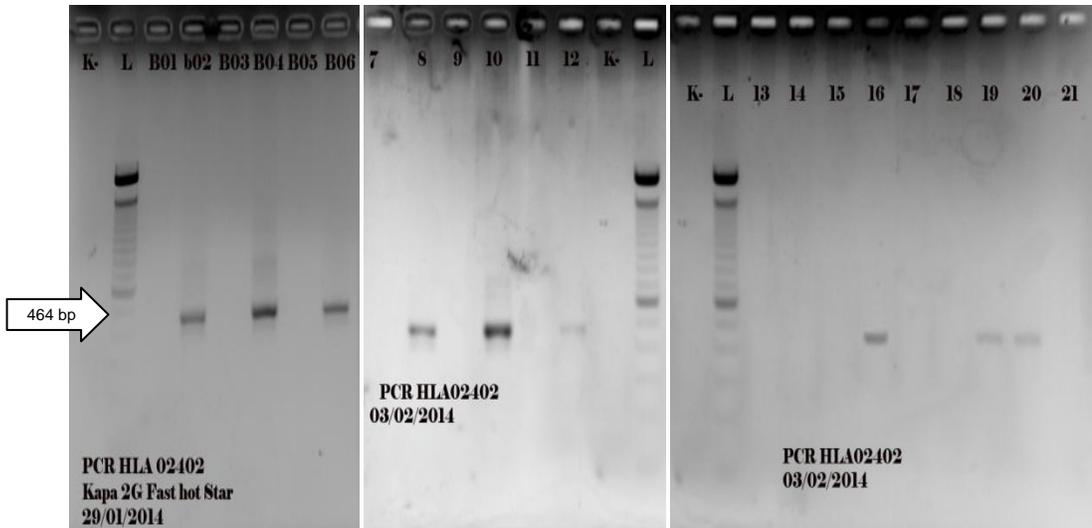
Gambaran distribusi penderita KNF berdasarkan stadium KNF menurut AJCC 2010 terbanyak stadium IV : 11 orang (52,4%), selanjutnya stadium II: 6 orang (28,6%) dan Stadium III: 4 orang (19,0%), dapat dilihat pada tabel 3.

2. Hasil pemeriksaan HLA-A24



Gambar 9. Hasil Pemeriksaan PCR HLA-A24 pada sampel darah tepi

Pada pemeriksaan sampel darah tepi, dari 16 sampel yang diamplifikasi sesuai dengan hasil optimasi PCR sebelumnya dengan besaran produk 464 bp, diperoleh hasil seperti yang tampak pada gambar 9. Tampak muncul pita DNA pada beberapa sampel dengan ketebalan bervariasi dan memunculkan 6 sampel (W2,W6,W8,W10,W12,W16) dari 16 sampel (37,5%).



Gambar 10. Hasil Pemeriksaan PCR HLA-A24 pada sampel cytobrush nasofaring

Pada pemeriksaan sampel cytobrush nasofaring, dari 21 sampel yang diamplifikasi sesuai dengan hasil optimasi PCR sebelumnya dengan ukuran produk 464 bp diperoleh hasil seperti yang tampak pada gambar 10. Tampak muncul pita DNA pada beberapa sampel dengan ketebalan bervariasi dan memunculkan 9 sampel (B02, B04, B06, B08, B10, B12, B16, B19, B20) dari 21 sampel (42,9%).

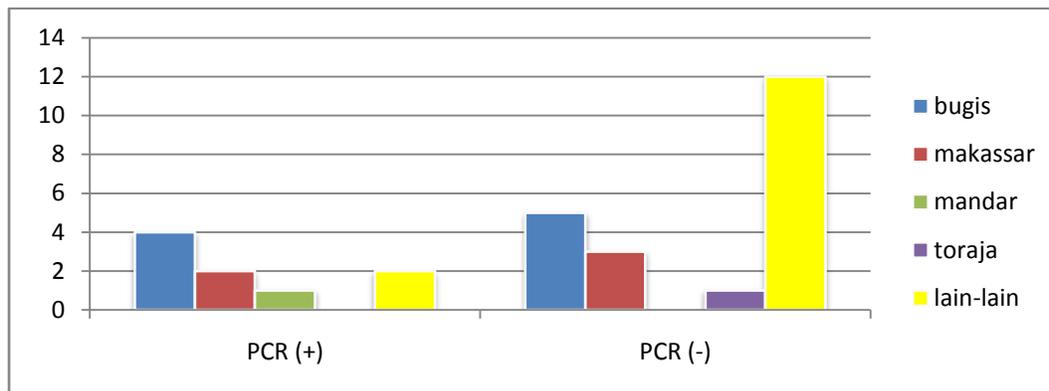
Tabel 4. Perbandingan keberadaan HLA-A24 pada sampel darah tepi dan cytobrush nasofaring

		Darah HLA-A24	
		Positif	Negative
Brush HLA- A24	positif	6	0
	negatif	0	10

Berdasarkan uji statistik (Fischer Exact test) pada 16 sampel berpasangan, menunjukkan bahwa HLA-A24 yang terdapat pada sampel cytobrush nasofaring 100%

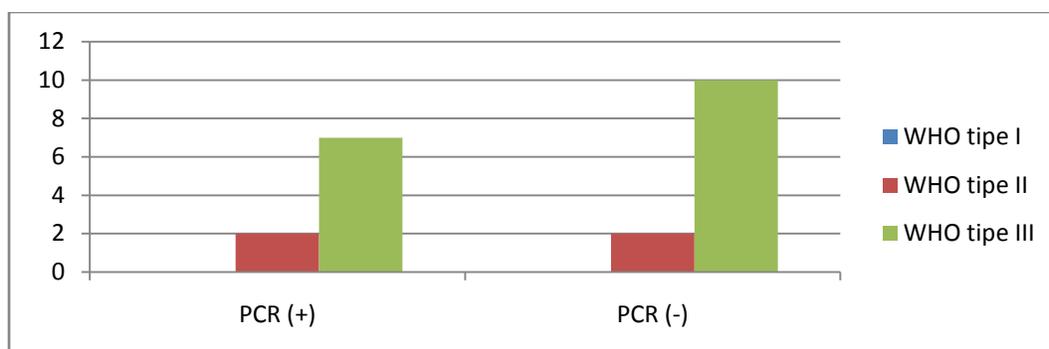
juga ditemukan di dalam darah tepi penderita KNF dan sebaliknya HLA-A24 yang terdapat dalam darah tepi juga didapatkan dalam cytobrush nasofaring.

Grafik 1. Evaluasi sampel positif HLA-A24 berdasarkan suku



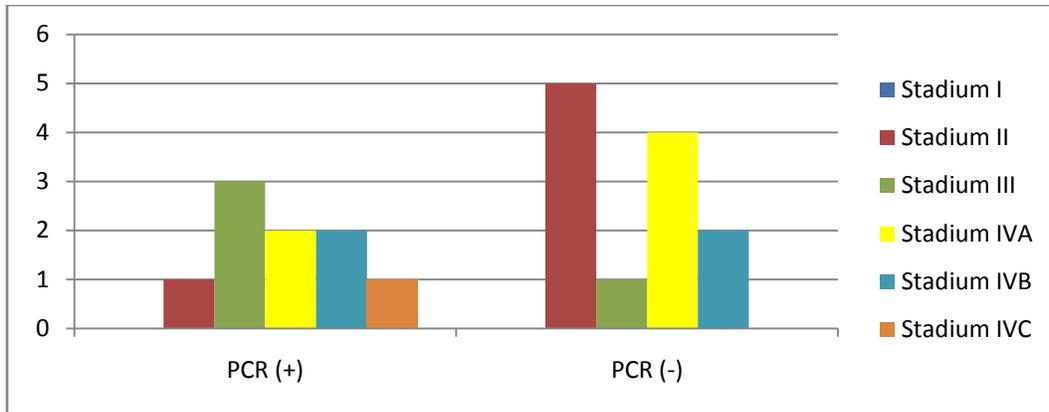
Pada evaluasi 21 sampel darah tepi dan atau cytobrush nasofaring pada grafik 1, didapatkan yang terbanyak HLA-A24 positif pada suku Bugis 4 sampel (19%), Makassar 2 sampel (9%), Mandar 1 sampel (4%), diluar Sulsel 2 sampel (9%).

Grafik 2. Evaluasi sampel positif HLA-A24 berdasarkan histopatologi



Berdasarkan grafik 2, 7 sampel (33,3%) dari 21 sampel yang positif mengandung HLA-A24 dengan WHO tipe III dan 2 sampel (9%) dengan WHO tipe II.

Grafik 3. Evaluasi sampel positif HLA-A24 berdasarkan stadium KNF



Pada grafik 3, dari 21 sampel tampak stadium III memiliki HLA-A24 positif pada 3 sampel (14,3%), stadium IVA dan IVB masing-masing 2 sampel (9%), dan stadium I dan IVC masing-masing 1 sampel (4%).

BAB V. PEMBAHASAN

Penelitian ini telah dilakukan Oktober sampai Desember 2013 dan didapatkan 30 sampel darah tepi dan 30 sampel cytobrush nasofaring yang dikirimkan ke Laboratorium Biomolekuler Universitas Gadjah Mada, namun dengan alasan non teknis dari keseluruhan sampel tersebut yang dilakukan pemeriksaan 16 sampel darah tepi dan 21 sampel cytobrush nasofaring.

Distribusi jenis kelamin pada 21 sampel didapatkan laki-laki 16 orang (76,2%) dan perempuan 5 orang (23,8%) dengan perbandingan 3,2 :1. Berdasarkan usia dan suku penderita Karsinoma Nasofaring, paling banyak pada rentang 40-49 tahun sebanyak 38,0%, terdiri dari suku Bugis 9 orang. (42,8%), Makassar 5 orang (23,8%) dan suku Toraja dan di luar Sulawesi Selatan masing-masing 1 orang (4,7%).

Distribusi gambaran histopatologi penderita KNF menurut WHO 1979 didapatkan terbanyak adalah WHO tipe III yaitu 17 orang (80,9%). Menurut Pieter (2013) di Makassar, dari 50 penderita KNF, 82,36% didapatkan WHO tipe III.

Berdasarkan stadium KNF menurut AJCC 2010 terbanyak didapatkan stadium IV 11 orang (52,4%) . Hasil penelitian Pieter (2013) juga mendapatkan stadium IV (32%).

Pada hasil PCR sampel darah tepi didapatkan adanya HLA-A24 dalam gambaran pita DNA pada 6 dari 16 sampel penderita KNF. Hasil ini serupa dengan yang didapatkan oleh Islami (2011) di Jogjakarta, pada penelitian tersebut juga didapatkan adanya HLA-A2402 pada sampel darah tepi penderita KNF. Demikian juga

dengan penelitian studi imunogenetik di Jakarta pada tahun 1997, didapatkan HLA-A24 dan HLA-B63; serta penelitian Judajana 2007 yang mendukung HLA-A24, HLA-A2 dan HLA-A11 yang merupakan HLA kelas 1 sebagai target utama sebagai marker genetik sistem imun pada KNF. (Judajana,2007)

Pada hasil PCR sampel cytobrush juga didapatkan adanya HLA-A24 dalam 9 sampel dari 21 sampel penderita KNF. Hasil penelitian Moningka (2012) juga mendapatkan HLA-A24 pada sampel cytobrush nasofaring. Berdasarkan penelitian tersebut, juga menjelaskan tidak tampaknya pita DNA pada beberapa sampel darah tepi dan cytobrush menunjukkan kemungkinan virus yang terambil sangat sedikit atau tidak terdapat antigen laten sehingga tidak teramplifikasi dalam pemeriksaan. (Moningka 2012). Menurut Munir (2008), terdapatnya alel gen kerentanan dan protektif yang berbeda-beda pada setiap lokasi dan etnik, diduga akibat molekul pengikat dan penyaji epitop peptida yang berbeda. Di samping itu juga akibat pengambilan sampel yang berbeda, distribusi gen HLA yang berbeda pada setiap populasi dan akibat pengaruh faktor lingkungan yang kuat terhadap kejadian KNF di lokasi tersebut.

Berdasarkan uji statistik, adanya HLA-A24 yang berada dalam cytobrush juga dapat ditemukan dalam sampel darah tepi. Hal ini menunjukkan keberadaan HLA-A24 pada jaringan KNF juga dapat ditemukan atau terwakilkan melalui pengambilan darah tepi..

Pada evaluasi gambaran suku pada penelitian ini yang pemeriksaan PCR positif HLA-A24, didapatkan suku Bugis (19%) terbanyak kemudian suku Makassar (9%) dan Mandar (4%). Menurut Munir (2007), Populasi di Indonesia merupakan suatu populasi yang unik, dikarenakan adanya proses pembauran ras akibat migrasi ataupun karena

gene flow. Beberapa penelitian menunjukkan kemiripan pola gen HLA populasi Indonesia dengan China. Pada studi populasi genetik di Jakarta dan sekitarnya, disimpulkan bahwa antigen HLA pada populasi Indonesia digolongkan dalam golongan Mongoloid. (Moeslichan,1990) Populasi Indonesia mempunyai tiga subras yang berbeda yaitu subras Paleomongoloid Proto Melayu, Paleomongoloid Deutro Melayu dan subras Proto Malanesia. (Pelly,1998). Suku Bugis Makassar termasuk subras Paleomongoloid Deutro Melayu. Pada populasi Jawa yang juga subras Paleomongoloid Deutro Melayu juga mendapatkan HLA – A 24 , HLA- A2 dan HLA- A11 (Judajana,2007).

Evaluasi gambaran histopatologi pada sampel dengan PCR positif HLA-A24 didapatkan WHO tipe III (33,3%) dan WHO tipe II (9%) dari 21 sampel. Sedangkan pada stadium KNF didominasi oleh Stadium III (14,3%) dan IVA, IVB, IVC (22%). Menurut Thompson (2004) EBV telah terdeteksi pada nasopharyngeal carcinoma *in situ*, sebelum undifferentiated Karsinoma (WHO tipe III), dan hal ini juga menentukan progresifitas keganasan. Hal ini menunjukkan infeksi EBV terjadi sebelum neoplasia. Jadi tidak ada hubungan adanya HLA dengan jenis histopatologi dan stadium namun mempertegas keberadaan EBV pada WHO tipe III seperti yang diungkapkan Stevens, et al (2006), WHO tipe III, 100% berkorelasi dengan EBV dan melaporkan angka insiden yang tinggi di Asia Tenggara.

EBV yang mengekspresikan antigen laten II, juga turut menghasilkan undifferentiated Karsinoma (WHO tipe III). Selain itu undifferentiated Karsinoma (WHO tipe III) juga disebabkan oleh adanya abnormal *cytogenetic* yang berhubungan yaitu delesi pada rantai pendek kromosom 3 lokus 3p25 dan 3p14. (Thompson,2004).

BAB V. PENUTUP

A. Kesimpulan

1. Terdapat alel gen HLA-A24 dalam sampel darah tepi penderita KNF
2. Terdapat alel gen HLA-A24 dalam sampel *cytobrush* nasofaring penderita KNF
3. Dengan teknik pengambilan sampel dan metode pemeriksaan dalam penelitian ini, didapatkan bahwa HLA-A24 yang terdapat dalam *cytobrush* nasofaring 100% dapat ditemukan dalam darah tepi penderita KNF.
4. Alel gen HLA-A24 merupakan salah satu alel gen penderita KNF di Makassar.

B.Saran

1. Dengan melakukan teknik yang sama, pengambilan sampel darah tepi dapat dijadikan *screening* untuk deteksi dini KNF pada orang normal dengan risiko tinggi KNF.
2. Diperlukan penelitian alel gen HLA lainnya untuk mencari faktor risiko genetik di Makassar.
3. Sebaiknya dilakukan penelitian lanjut subtype HLA-A24 untuk mengetahui subtype spesifik yang ada di Makassar.
4. Penelitian lanjut alel gen HLA-A24 terhadap suku-suku yang ada di Makassar dapat memberikan gambaran profil genetik penduduk asli Sulawesi Selatan.
5. Sebaiknya dilakukan penelitian menyeluruh agar didapatkan *mapping* HLA terhadap suku – suku yang ada di Indonesia
6. Diusulkan untuk dilakukan *screening* HLA-A24 untuk orang sehat dengan resiko tinggi KNF (saudara / anak).

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K. and Lichtman, A.H. 2000. *Cellular and Molecular Immunology* 5th edition. WB Saunders: Philadelphia.3-189.
- Adham M, Kurniawan A.N., Muhtadi A.I., Roezin A., Hermani B., Gondhowiardjo S., Tan I.B., Middeldorp J.M. 2012. *Nasopharyngeal Carcinoma In Indonesia: Epidemiology, Incidence, Signs, And Symptoms at Presentation. China Journal Cancer.* Apr;31(4):185-96
- Benacerraf B. 1985. *Significance and Biological Function Of Class II MHC Molecules. America Journal Pathology. I.* Volume 120 (3): 334-43.
- Behrens G., Li M., Smith C.M., Belz G.T., Mintern J., Carbone F.R. 2004. *Helper T cells ,dendritic cells and CTL immunity,* Immunology Cells Biology. Vol. 82 (1): 84-90.
- Biesecker L.G., Talking Glossary of Genetic Term. Available in <http://www.genome.gov/glossary/index>. diakses 11 Februari 2013.
- Breda E., Catarino R.J.F., Azevedo I. and Lobao M. 2010. *Epstein Barr Virus Detection in Nasopharyngeal Carcinoma Implication in Low Risk Area. Brazilian Journal Otorinolaryngoogy.*Vol. 76.(3) : 310-5
- Burt R.D., Vaughan T.L., McKnight B., Davis S., Beckmann A.M., Smith A.G., Nisperos B., Swanson G.M., and Berwick M. 1996. *Associations Between Human Leukocyte Antigen Type and Nasopharyngeal Carcinoma in Caucasians in The United States . Cancer Epidemiology Biomarkers.* 5:879-887
- Cao S.M. , Simons M.J., and Chao N an Qian. 2011. *The Prevalence and Prevention of Nasopharyngeal Carcinoma in China. China Journal Cancer.* Vol. 30 Issue 2. 114 – 19.
- Chan A.T.C., Teo P.M.L., Johnson P.J. 2004. *Nasopharyngeal Cancer.* In : *Rosen St, Cancer, Treatment and Research, Head and Neck Cancer, edited by Bruce Brockstein. Gregory Masters, Kluwer Academic Publishers, Newyork.* 275-77.
- Cheng H. 2001. *Nasopharyngeal Cancer and the Southeast Asian Patient. American Family Physicia.* 63:1776-82.
- Cheng-Chan Lu, Jung-Chin Chen, Ying-Tai Jin, Hsiao-Bai Yang, Shih-Huang Chan, Sen-Tien Tsai. 2003. *Susceptibility to Nasopharyngeal Carcinoma Within The Hla-A Locus in Taiwanese. International Journal Cancer.* 103, 745–51.
- Cohen J.I.,2000.Epstein Barr Virus Infection.New England Journal Medicine. 343 :481-92.

- Cooke A. 2001. *Regulation of the immune response. In: (Roitt I, Brostoff J, Male D) Immunology, 6th edition. Mosby. Toronto. 173-88*
- Dawson C.W., Port J.P., Young L.S., 2012. The Role of The EBV-Encoded Latent Membrane Proteins LMP1 And LMP2 in the Pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol. Birmingham Cancer Centre, United Kindom Apr;22(2):144-53.*
- Devenport M.P., Hill A.V.S. 1996. *Peptides Associated with MHC Class I and Class II Molecules. In. (Browning M.J. and Mc Michael A.J). HLA and MHC: Gene, Molecules and Function. Bios Sci Publ Ltd Oxfor. 277- 308*
- Edwards R.H., Sitki- green D., Moore D.T., 2004 *Potential Selection LMP1 Varians in Nasopharyngeal Carcinoma. Journal Virology. Vol. 78. (2); 868 - 81*
- Fachiroh J., Paramita D.K., Hariwiyanto B., Harijadi A., Indrasari S.R., Kusumo H., Zeng Y.S., Schouten T., Mubarika S., Middledrop J.M., 2006. *Single Assay Combination of Epstein Barr Virus (EBV) EBNA 1, And Viral Capsid Antigen – P18 Derived Syntetic Peptide For Measuring Anti EBV Immunoglobulin G (Igg) Level and IgA Antibody Levels in Sera From Nasopharyngeal Carcinoma Patients :Option For Field Screening. J.f.Clin. Bio 44(4) :1459 – 68.*
- Hariwiyanto B. 2009. Peran protein EBNA1, EBNA2, LMP1 dan LMP2 Virus Epstein-Barr sebagai faktor prognosis pada pengobatan Karsinoma Nasofaring. Disertasi tidak diterbitkan. Jogjakarta. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.
- Hildesheim A., Apple R.J., Chen C.J., Wang S.S., Cheng Y.J., Klitz W., Mack S.J., Chen I.H., Hsu M.M., Yang C.S., Brinton L.A., Levine P.H., Erlich H.A. 2002. *Association of HLA Class I and II Alleles and Extended Haplotypes with Nasopharyngeal Carcinoma in Taiwan. Journal National Cancer Institute. Vol. 94.(23):1780-9.*
- Hu, Li-Fu. 1996. *Nasopharyngeal Carcinoma and Epstein-Barr Virus. Thesis. Karolonska Institutet. Stockholm .1-78.*
- Hu S.P., Day N.E., Li D.R., Luben R.N., Cai K.L., T Ou-Yang, Li B., Lu X.Z., and Ponder B.A.J. 2005. *Further Evidence For an HLA-Related Recessive Mutation in Nasopharyngeal Carcinoma among the Chinese. . British Journal Of Cancer. 92, 967–70*
- Huang D.P., Lo K.W. 1999. *Aetological factor and Pathogenesis in Nasopharyngeal Carcinoma, 2nd edition, Hasselt CA and Gibb AG. The Chinese University Press, Hongkong, ...pp 31-50.*
- Islami H., 2011. Alel gen HLA-A2402 sebagai Faktor Risiko terjadinya Karsinoma Nasofaring di RSUP dr.Sardjito. Karya Akhir tidak diterbitkan. Jogjakarta. Program Studi Ilmu Penyakit Telinga Hidung Tenggorok Universitas Gadjah Mada. 1-56

- Judajana F.M., Subijanto P.S., Suhartono T.P. 2003. *Sistem Major Histocompatibility Complex .Gangguan Sistem Imun Mukosa Intestinal. Gideon .Surabaya. 12-30*
- Judajana F.M. 2009. *Asosiasi HumanLeukocyte Antigen (HLA) dengan Karsinoma Nasofaring (KNF). Indonesian Journal Of Clinical Pathology And Medical Laboratory Vol. 15 .No. 2 .52-56*
- Khanna, R., Burrows S. R., Kurilla M. G., Jacob C. A., Misko I. S., Sculley T. B., Kieff E., and Moss D. J. 1992. *Localization of Epstein-Barr Virus Cytotoxic T Cell Epitopes Using Recombinant Vaccinia: Implications For Vaccine Development. J. Exp. Med. 176:169.*
- Khana R.,Paulsen R., Moss DJ., Burrows S., Sillins J.L. and Burrows J.M. 2010. *Cytotoxic T-Lymphocytes Clones Specific For Immunodominant Epitop Display Discreening Antagonistic Response To Naturally Accuring Epstein Barr Virus. Journal Virology .70(10);7306-11.*
- Khana R., Burrows S., Sillins J.L., and Burrows J.M., 1997. *The Role of Cytotoxic T-Lymphocytes in The Evolution in Genetically Stable Virus.vTrend In Microbiology . 64.4(2)1-7.*
- Kuzushima K., Hayashi N., Kudoh A., and Akatsuka Y.. 2003..*Tetramer-Assisted Identification and Characterization of Epitopes Recognized by HLA A2402-Restricted Epstein Barr Virus-Spesific CD8 T Cells .Blood.101(4)*
- Kuhuwael FG.2001. *Aspek klinis karsinoma nasofaring di RSU Dadi dan RS.Wahidin Sudirohusodo tahun 1990-1999. Disajikan dalam Pertemuan Ilmiah Berkala XV. Fakultas Kedokteran UNHAS Makassar 5 September 2001.*
- Kuhuwael 2010.*Perbandingan Kasus Kanker Kepala Leher dalam Dua Dekade di Makassar. Makalah disajikan dalam KONAS PERHATI XV Makassar 3-5 Juli 2010.*
- Kobayashi,J. Torigoe T, Hirohashi Y and Idenoue S. .2009. *Comparative Study on The Immunogenicity Between an HLA A24-Restricted Cytotoxic T-Cell Epitope Derived From Surviving and that from its Splice Varian Surviving-2B In Oral Cancer Patients .Journal of Translational.7:1*
- Kong Q.L.,Hu L.J.,Cao Jy.,Huang Y.J., and Xu L.H. 2010. *Epstein Barr Virus Encoded LMP2A Induces an Epithelial Mesenchymal Transition and Increases the Number of Side Population Stem-Like Cancer Cells in Nasopharyngeal Carcinoma..Plos Pathogen.vol 6*
- Kolegium Ilmu Kesehatan THT-KL, Karsinoma Nasofaring, Modul Onkologi 2010.1-51.
- Korcum A.F., Ozyar E., Ayhan A. 2006. *Epstein-Barr Virus Genes and Nasopharyngeal Cancer. Turkish Journal of Cancer. 36:97-102.*

- Kwong D.L.W., Sham J.S.T., Au G.K.H. et al. 2004. *Concurrent and Adjuvant Chemoterapy for Nasopharyngeal Carcinoma: A Factorial Study. Journal of Clinical Oncology.* 22:2643-53.
- Lee L.K., Tan E.L., Gopala K., Sam C.K., 2007. *Human Leukocyte Class I Antigen Alleles A2 And A11 Are Not Associated With Nasopharyngeal Carcinoma In West Malaysia. Singapore Medical Journal.* 48 (7) : 632
- Loh K.S., Goh B.C., Lu J., Hsieh W.S., Tan L. 2006. *Familial nasopharyngeal carcinoma in a cohort of 200 patients Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 132(1):82-5
- Middleton D., Menchaca L., Rood H., Komerofsky R.. New Allele frequency Tissue Antigens 61(5) :403-7, (<http://www.allelefreqencies.net>., diakses 20 Maret 2013)
- Mehra N.K.,Kaur G.2003. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. *Molecular Medicine .Vol.5.* (<http://www.expertreviews.org/>. diakses 14 Juli 2013.)
- Moeslichan S. 1990.Penelitian Sistem HLA dalam Upaya Memperoleh Sumber Antibodinya. Disertasi. Universitas Indonesia.Jakarta
- Moningka M.E.W.,2012. Variasi Sekuen Gen LMP2A dari Virus Epstein Barr Bagian Epitop CTL terkait HLA-A24 pada sampel darah tepi dan cytobrush penderita Karsinoma Nasofaring. Tesis tidak diterbitkan. Jogjakarta. Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada.1-115
- Munir D, 2006. *Peran HLA pada Karsinoma Nasofaring.* Majalah Kedokteran Nusantara. Vol 39.No.3.1-7
- Munir D.,2007. Gen HLA-DRB1 pada Karsinoma Nasofaring Suku Batak.Majalah Kedokteran Nusantara. Vol 40.1-4
- Munir D.,2007. Peran Gen HLA-DRB1 pada penyebab kerentanan Karsinoma Nasofaring Suku Batak. Majalah Kedokteran Nusantara. Vol 41.1-6.
- Laantri N., M. Corbex,R. Dardari A., Benider B., El Gueddari, Khyatti M. 2010. *Epidemiological, Genetic and Immuno-Virological Peculiarities of Nasopharyngeal Carcinoma in North Africa EUROCANCER John Libbey Eurotext.* Paris pp. 127-8.
- Pathmanathan. 1997. *Pathology.* Dalam: Chong V.F.H., Tsao S.Y., eds. *Nasopharyngeal Carcinoma. Loi Printing.* Singapore. 6-13.
- Pelly U. Urbanization and Adaption Medan 1998, LP3ES: 81.
- Peters V.B.,Sperber K.E., 1999. The Effect of Viruses on the Ability to Present Antigens Via The Major Histocompatibility Complex. *Microbes and Infection.*Vol 1,Issue 4. 335-45.

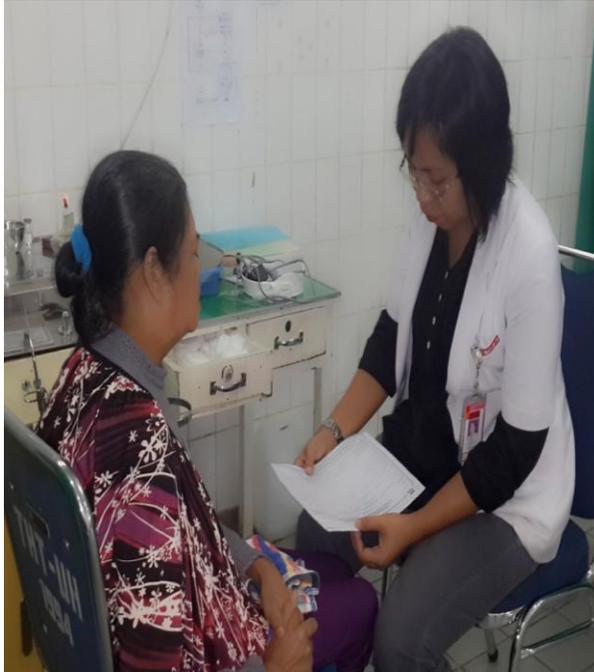
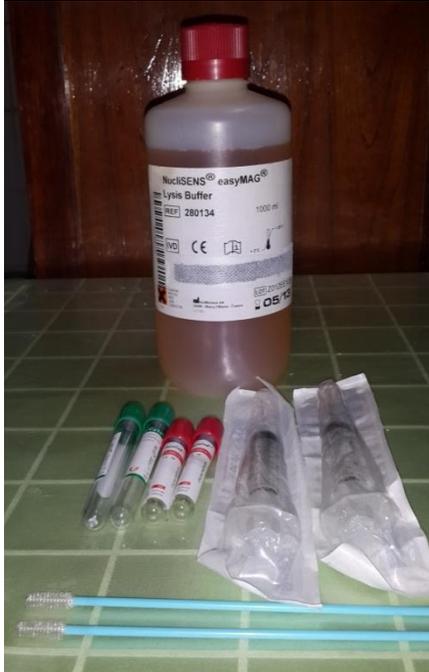
- Pieter N.A.L., 2013. Profil Iga(Vca-P18+Ebna1) Dan Viral Load DNA EBV Sebagai Faktor Resiko Keluarga Penderita Karsinoma Nasofaring Dengan EBV Positif. Disertasi tidak diterbitkan. Program Pasca Sarjana UNHAS. 1-50.
- Punagi A.Q., Savitri E. 2007. *Profil Karsinoma Nasofaring di Rumah Sakit Pendidikan FK.UNHAS Periode Januari 2004-Juni 2007.Bagian THT-FKUH, Makassar.* 1-5
- Rickinson A.B., and Moss D.J., 1997.*Human Cytotoxic T Lymphocyte Response to Epstein Barr Virus Infection.*Ann Rev.Imm. 15:407-12
- Roezin A., Adham M., 2007. *Karsinoma nasofaring. Dalam:Soepardi EA, Iskandar N, Bashiruddin J, Restuti RD, editor. Buku Ajar Ilmu Kesehatan:Telinga Hidung Tenggorok Kepala dan Leher. Edisi ke 6. Balai Penerbit FKU. Jakarta p. 182-7*
- Savitri E., Mubarika S., 2012. Profil Viral Load Ebstein-Barr Virus dan Titer Antibodi Ig A (VCA-P18+EBNA-1) pada Karsinoma Nasofaring di Makassar dan Yogyakarta .Majalah Kedokteran Indonesia.Vol 62.No.5.1-4
- Shanmugaratnam K., Chan S.H., de-The G, Goh J.E.H., Khor T.H., Simon M.J., Tye C.Y. 1979. *Histopatology of nasopharyngeal carcinoma: Correlation with epidemiology, survival rates and other biological characteristic. Cancer.* 44: 1029-44.
- Stevens S,J,C., Verkuijlen S.A.W., Hariwiyanto B. and Harijadi. 2006.*Noninvasive Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma: Nasopharyngeal Brushing Reveal High Epstein Barr Virus DNA Load and Carcinoma-Spesific Viral BARP1 mRNA.* International Journal Cancer. 119:608-14.
- Susworo R. 2004. *Kanker Nasofaring Epidemiologi dan Pengobatan Mutakhir.Cermin Dunia Kedokteran.* 144:16-18.
- Thompson M.P., Kurzrock R., 2004. *Epstein-Barr Virus and Cancer. Review.Clinical Cancer Research* ; 10: 803-821.
- Wei W.I. 2006. *Nasopharyngeal Cancer. In : Bailey BJ, Johnson JT. Head & Neck Surgery-Otolaryngology,4th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia .1657-68.*
- Wei-Hua Jia , Xiang-Yu Luo¹ , Bing-Jian Feng, Hong-Lian Ruan , Jin-Xin Bei , Wen-Sheng Liu , Hai-De Qin , Qi-Sheng Feng , Li-Zhen Chen , Shugart Y Yao and Yi-Xin Zeng.** 2010. *Traditional Cantonese diet and nasopharyngeal carcinoma risk: a large-scale case-control study in Guangdong, China.* Available in BMC Cancer.; 10: 446.
- Wiqoyah N., Kentjono W.A., Budi T.I., 2008. *Analisis Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Epstein-Barr Virus (EBV) ebagai Antigen Target pada Kanker Nasofaring*

(KNF): *Upaya Pengembangan Therapeutic Polyepitope-Vaccine di Indonesia.*Lembaga penelitian Universitas Airlangga. 1-52

Wiqoyah N.,Marsetyawan, Mubarika S.1999. *Analisis Sekuen Gen Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) Epstein-Barr Virus Bagian Epitop Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) pada Karsinoma Nasofaring.* Tesis tidak diterbitkan.Jogjakarta. Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. 1-76

Zhang F., Zhang J. 1999.*Clinical Hereditary Characteristics in Nasopharyngeal Carcinoma Through Ye-Liang's Family Cluster.* China Medical Journal (Engl). 112(2):185-7.

Lampiran 1
GAMBAR ALAT DAN KEGIATAN PENELITIAN



Lampiran 2

NASKAH PENJELASAN UNTUK MENDAPAT PERSETUJUAN DARI SUBYEK PENELITIAN

Selamat pagi bapak/ibu/saudara/adik, saya dr. Imelda Gunawati Agus dari Bagian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung dan Tenggorokan RS. Wahidin Sudirohusodo, yang akan mengajukan pertanyaan dan melakukan pemeriksaan darah tepi dan cytobrush nasofaring kepada Bapak/Ibu/Saudara/adik.

Kami bermaksud untuk mengadakan penelitian untuk menganalisa alel gen HLA-A24 pada sampel darah tepi dan cytobrush nasofaring penderita karsinoma nasofaring di Makassar. Pemeriksaan ini dilakukan untuk melihat apakah dalam darah dan usapan nasofaring bapak/ibu/saudara/adik terdapat gen HLA-A24 yang merupakan penanda karsinoma nasofaring di Indonesia juga ada di Makassar yang terdapat dalam darah atau usapan nasofaring bapak/ibu/saudara/adik. Untuk itu kami meminta kesediaan bapak/ibu/saudara/adik untuk mengizinkan kami melakukan pemeriksaan darah tepi dan cytobrush nasofaring serta kesediaan bapak/ibu/saudara/adik untuk meluangkan waktu mengisi questioner dan persetujuan pada lembar surat persetujuan yang terlampir. Pemeriksaan darah tepi adalah pemeriksaan darah yang cara pengambilan darah yang sama yang dilakukan pada pemeriksaan laboratorium umumnya. Darah yang diambil dari pembuluh darah di lengan atas sebanyak 3 ml. Sedangkan pemeriksaan cytobrush nasofaring adalah salah satu pemeriksaan di bidang THT yang dilakukan untuk melihat kondisi nasofaring dan mengambil sampel nasofaring dengan cara brushing atau usapan dengan semacam sikat yang sangat halus pada nasofaring yang didahului dengan anestesi atau menghilangkan nyeri sebelum brushing dengan memasang kapas obat dan obat seprot penghilang nyeri. Saat melakukan cytobrush atau usapan nasofaring, dilakukan secara prosedural dan hati-hati. Pemeriksaan ini membutuhkan waktu sekitar 15 menit.

Penelitian ini bersifat sukarela dan memeriksa untuk melihat ada tidaknya kelainan. Bapak/ibu/saudara/adik berhak menolak ikut serta atau menjawab pertanyaan tanpa resiko kehilangan hak pelayanan kesehatan yang harus diterima. Penolakan dan pengunduran diri dari penelitian tidak akan menghilangkan hak pelayanan kesehatan penderita yang harus diterima. Semua biaya pemeriksaan adalah tanggungan kami sepenuhnya serta hasil pemeriksaan yang kami dapatkan akan kami jamin kerahasiaannya.

Data yang kami peroleh dari penelitian ini akan bermanfaat menganalisa alel gen HLA-A24 pada sampel darah tepi dan cytobrush nasofaring penderita karsinoma nasofaring sehingga bila ditemukan dalam darah, nantinya dapat dimanfaatkan untuk keluarga penderita karsinoma nasofaring agar melakukan pemeriksaan sedini mungkin bila mengandung gen HLA-A24. Sehingga tindakan pencegahan yang akan dilakukan lebih cepat dan tepat.

Bila masih ada hal-hal yang ingin bapak ketahui atau masih ada hal-hal yang belum jelas, maka bapak/ibu/saudara/adik bisa bertanya atau meminta penjelasan pada kami secara langsung atau melalui telepon.

Semua data dari penelitian ini akan dicatat dan dipublikasikan tanpa membuka data pribadi bapak/ibu/saudara/adik. Data penelitian ini akan dikumpulkan dan disimpan dalam file manual atau elektronik, dan diproses serta dipresentasikan :

- Forum ilmiah Program Dokter Spesialis di bagian THT RS. Wahidin Sudirohusodo.
- Publikasi pada jurnal ilmiah di dalam negeri

Lampiran 3

FORMULIR PERSETUJUAN SETELAH PENJELASAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama :
Umur :
Jenis Kelamin :
Alamat :
Pekerjaan :

Setelah mendapatkan penjelasan dari peneliti dengan ini saya menyatakan bersedia secara sukarela tanpa paksaan untuk mengikuti penelitian ini dan mentaati semua prosedur yang akan dilakukan pada penelitian ini.

Saya tahu bahwa saya berhak untuk bertanya apabila masih ada hal-hal yang saya tidak mengerti.

Saya mengerti bahwa prosedur pemeriksaan sampel darah tepi dan cytobrush nasofaring terhadap diri saya dapat menyebabkan hal-hal yang merugikan, namun saya percaya bahwa akan dilakukan tindakan-tindakan kewaspadaan untuk mencegah hal-hal tersebut.

Saya tahu bahwa saya berhak mendapat penanganan atau kompensasi biaya dari peneliti bila terjadi efek samping dari pemeriksaan yang dilakukan.

Saya juga berhak menolak untuk tidak ikut dalam penelitian ini tanpa kehilangan hak saya untuk mendapat pelayanan kesehatan dari dokter.

Makassar,

2013

Nama Saksi

1. (.....)
Nama jelas/Tanda tangan

2. (.....)
Nama jelas/Tanda tangan

(.....)
Nama jelas/Tanda tangan

Peneliti Utama : **dr. Imelda Gunawati Agus**

Jl.Sungai Limboto No.34,Makassar

Telepon: 0411 3610284/ 0812 423 5925

Dokter Penanggung jawab medis : **Dr.dr. Eka Savitri,SpTHT-KL(K)**

Jl.Hertasning Barat II Griya panakukang indah blok E/8

Telepon: 0411-881728/ 081318494799

Lampiran 4



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN**

Sekretariat : Lantai 3 Gedung Laboratorium Terpadu
JL.PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10, Makassar. Telp. (0411)5780103, Fax (0411) 581431.
Contact person **dr. Agussalim Bukhari,PhD,SpGK** (HP: 081241850858), email: agussalimbukhari@yahoo.com

REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK
Nomor : 1410 /H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2013

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, setelah melalui pembahasan dan penilaian, pada rapat tertanggal **11 September 2013**, telah memutuskan, protokol penelitian berjudul:

*Analisa Alel Gen HLA-A24 Pada Sampel Darah Tepi Dan Cytobruh Nasofaring
Penderita Karsinoma Nasofaring di Makassar*

dengan Peneliti Utama: **dr. Imelda Gunawati Agus**

No. Register

U	H	1	3	0	8	0	3	1	8
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

yang diterima pada tanggal: **27 Agustus 2013**

Perbaikan diterima tanggal: **8 Oktober 2013**

dapat disetujui untuk dilaksanakan di RS dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar. Persetujuan Etik ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian.

Pada akhir penelitian, **laporan pelaksanaan penelitian** harus diserahkan kepada KEPK Fakultas Kedokteran Unhas. Jika ada perubahan protokol dan /atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Makassar, 9 Oktober 2013

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fak. Kedokteran Unhas

Ketua

Prof.Dr.dr.Suryani As'ad,M.Sc,Sp.GK
NIP 19600504 1986 01 2 002

Sekretaris

dr.Agussalim B. MMed,Ph.D,SpGK
NIP 19700821 1999 03 1 001



Lampiran 5 **CASE REPORT FORM**

Identitas Penderita

Nama :
Jenis kelamin/Umur : L/P
Agama :
Suku :
Pendidikan :
Alamat :

Anamnesis

Gejala pada Hidung

1. Apakah hidung anda sering mimisan ?
2. Apakah hidung anda sering pilek bercampur darah?
3. Apakah hidung anda sering tersumbat dan seperti pilek yang tak kunjung membaik?

Gejala pada Telinga

1. Apakah telinga anda sering berdengung?
2. Apakah telinga anda rasa tersumbat / penuh?
3. Apakah telinga anda terasa berair?
4. Apakah pendengaran anda berkurang?

Gejala pada Tenggorok

1. Apakah tenggorokan anda sering terasa sakit dan tak kunjung membaik?
2. Apakah anda sulit menelan makanan?
3. Apakah anda sulit membuka mulut?

Gejala pada Mata dan Syaraf

1. Apakah anda sering mengalami sakit kepala?
2. Apakah anda sering mengalami nyeri pada wajah dan leher?
3. Apakah anda sering mengalami penglihatan ganda/kabur?
4. Apakah anda merasa mata anda lebih menonjol keluar?
5. Apakah anda merasakan kelopak mata anda menghalangi pandangan anda/terjatuh?

Gejala Metastasis

1. Apakah ada benjolan di daerah leher anda?

Pemeriksaan Fisis Umum

Keadaan Umum :
Tekanan Darah : Suhu :
Denyut nadi : Pernapasan :

Pemeriksaan Fisis THT
Pemeriksaan Telinga

Kanan

Kiri

1. Daun telinga :
 - Bentuk :
 - Ukuran :
 - Sikatrik :
 - Infeksi :
 - Tumor :
2. Depan telinga
 - Abses/fistel :
 - Sikatriks :
 - Nyeri tekan :
3. Belakang telinga
 - Abses/fistel :
 - Nyeri tekan :
 - Tumor :
4. Liang telinga luar
 - Warna :
 - Edema :
 - Sekret :
 - Serumen :
5. Selaput gendang
 - Permukaan :
 - Warna :
 - Perforasi :
 - Pantulan cahaya :
6. Telinga tengah (bila ada perforasi)
 - Mukosa :
 - Sekret (sifat) :

Pemeriksaan Hidung

1. Bagian luar hidung
 - Bentuk :
 - Kelainan kulit:
 - Kolumella :
 - Nares anterior :
 - Fossa kanina:
 - Dinding media/atap orbita
2. Bagian dalam hidung (rinoskopi anterior)
 1. Vestibulum :
 2. Dasar rongga hidung
 - Sekret :
 - Edema/polip :

3. Dinding lateral

Meatus nasi inferior

Polip :
Edema :
Sekret :

Konka inferior

Warna :
Sekret (sifat) :
Permukaan :
Ukuran :

Meatus nasi media

Edema :
Sekret (sifat) :
Polip :

Konka media

Permukaan :
Warna :
Sekret :
Ukuran :

4. Dinding medial rongga hidung

Warna :
Permukaan (deviasi)
Edema :
Ekskoriasi :
Perforasi :

5. Dinding belakang (rinoskopi posterior)

Konka :
Palatum molle :
Ujung post. Konka inferior
Ujung post. Konka media
Meatus nasi media
Ostium tuba
Torus tubarius :
Fossa Rosenmuller
Adenoid :
Tonsila tubaria:

6. Sinus paranasalis :

7. Transiluminasi :

Pemeriksaan Gigi, Mulut, Kerongkongan dan Tenggorok

1. Gigi-geligi

Karies :
Abses :
Gusi :

2. Mulut

Bibir :
Lidah :
Mukosa bukal :
Palatum durum
Uvula :
Palatum molle :

3. Kerongkongan

Orofaring

Dinding dorsal
Mukosa :
Granula :
Deformitas:
Post nasal drips
Dinding lateral
Lateral band
Deformitas
Isthmus faucium
Arkus anterior :
Arkus posterior

Tonsila Palatina

Warna :
Pembesaran :
Detritus :
Kripte :
Perlekatan :

Hipofaring

Fossa piriformis
Vallekula :
Radiks lingua :
Dinding dorsal :

4. Tenggorok (laringoskopi direk dengan nasoendoskopi fleksibel)

Epiglotis :
Aritaenoid :
Plika ventrikularis
Plika vokalis :
Subglotis :
Trakea :
Kelainan motorik

Pemeriksaan pembesaran kelenjar leher :

Letak :
Ukuran :
Warna :
Konsistensi :
Mobilitas :
Nyeri tekan : ada / tidak ada

Pemeriksaan Tambahan:

Laboratorium : ada/ tidak ada
CT Scan : ada/tidak ada

Foto Thoraks : ada / tidak ada

Pemeriksaan lainnya :

HASIL PEMERIKSAAN

IV. Diagnosa :

V. Penatalaksanaan :

VI. Catatan :

Lampiran 6.

NO	NAMA	UMUR	SUKU	JK	ALAMAT	HITOPATOLOGI	STADIUM	PCR brush	PCR darah
1	BS	41th	Bugis	L	Enrekang	SCC non keratinisasi diff jelek (III) S/	T2N1M0/ II	tidak muncul	tidak muncul
2	NS	54 th	Bali	L	Masamba	SCC keratinisasi tdkberdiff bilat(III)	T4N3M0/ IVB	muncul	Muncul
3	DgS	61th	Makassar	P	Selayar	SCC tdk berkeratin,tdk berdiff(III)	T1N1M0/ II	tidak muncul	tidak muncul
4	Moh	47th	Kaili	L	Sulteng	SCC tdk berkeratin diff jelek (II)bilat	T1N2M0/ III	muncul	sampel tidak ada
5	AT	42th	Ternate	L	Ternate	Ca.anaplastik	T3N3aM0/ IVB	tidak muncul	tidak muncul
6	Js	55th	Bugis	P	Masamba	SCC tdk berkeratin,tdk berdiff (D)(III)	T2N1M0/ III	muncul	Muncul
7	Hd	66th	Bugis	L	Maros	SCC tdk berkeratin tdk berdiff (III)	T4N2M0/IVA	tidak muncul	tidak muncul
8	Hjr	51 th	mandar	L	majene	SCC non keratinisasi diff jelek bilateral (III)	T1N1M0/ II	muncul	Muncul
9	AR	23th	Makassar	L	Mks	SCC Non Keratinizing,tdk diff (III)	T1N1M0/ II	tidak muncul	tidak muncul
10	Mul	41th	Bugis	L	makassar	SCC tdk berkeratin,diff jelek	T2N3M0/ IV B	muncul	Muncul
11	AM	54 th	L.banggai	L	L.Banggai	SCC tdk berkeratin tdk berdiff (III)	T3N0M0/III	tidak muncul	sampel tidak ada
12	KDR	41th	Makassar	L	Takalar	SCC non keratinisasi berdiff (III)	T4N2M0/ IV A	muncul	Muncul
13	Rsn	55th	Bugis	P	makassar	SCC tdk berkeratin tdk berdiff (III)	T1N1M0/ II	tidak muncul	tidak muncul
14	RDN	49th	Makassar	L	Takalar	SCC non keratinisasi berdiff (II)bilat	T1N1M0/ II	tidak muncul	tidak muncul
15	His	22th	Buton	L	Kendari	SCC tdk berkeratin,berdiff(II)	T4N2M0/ IV A	tidak muncul	tidak muncul
16	AMA	45th	Bugis	L	Sengkang	SCC Non Keratinisasi berdiff bilateral (II)	T1N2M0/ III	muncul	Muncul
17	Pas	65th	Bugis	L	pangkep	SCC tdk berkeratin tdk berdiff (III)	T4N1M0/ IVA	tidak muncul	tidak muncul
18	Tns	60th	Toraja	L	Toraja	SCC tdk berkeratin,tidak diff (III)bilat	T4N2M0/ IV A	tidak muncul	tidak muncul
19	Sur	48 th	Bugis	L	Luwu Utara	SCC tidak berdiff (II)	T4N1M0/ IVA	muncul	sampel tidak ada
20	DgN	64 th	Makassar	p	Takalar	SCC non keratinisasi diff jelek (III)	T3N2M1/ IVC	muncul	sampel tidak ada
21	Ci	34 th	Bugis	P	Parigi-sulteng	SCC tdk berkeratin tdk berdiff (III)	T2N3M0/ IV B	tidak muncul	sampel tidak ada

