

DISERTASI

**ANALISIS EKSPRESI EKSOSOM RNA DAN HUBUNGANNYA DENGAN
EKSPRESI P53 PADA PENDERITA KANKER NASOFARING**

**ANALYSIS OF EXOSOM RNA EXPRESSION AND ITS RELATIONSHIP WITH P53
EXPRESSION IN NASOFARING CANCER PATIENTS**

Hamsu Kadriyan

C013181018



PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2021

Judul Penelitian

**ANALISIS EKSPRESI EKSOSOM RNA DAN HUBUNGANNYA DENGAN
EKSPRESI P53 PADA PENDERITA KANKER NASOFARING**

Disertasi
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi
Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

HAMSU KADRIYAN

Kepada

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021

DISERTASI

**ANALISIS EKSPRESI EKSOSOM RNA DAN HUBUNGANNYA DENGAN
EKSPRESI PROTEIN P53 PADA PENDERITA KANKER NASOFARING**

Disusun dan diajukan oleh

**Hamsu Kadriyan
C013181018**

*Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 10 Februari 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

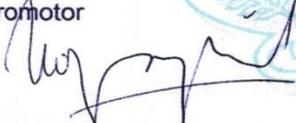
Menyetujui

Promotor,


Prof. Dr. dr. Abdul Qadar Punagi, Sp.THT-KL(K)
Nip. 196302161989101001

Co. Promotor

Co. Promotor


Dr. dr. Nova Audrey L Pieter, Sp.THT-KL(K)
Nip. 19661124199803 2 001


Dr. dr. Masyita Gaffar, Sp.THT-KL(K)
Nip. 19670927199903 2 001

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)
Nip. 19700821 199903 1 001


Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
Nip. 19661213 199503 1 009

ABSTRACT

HAMSU KADRIYAN. *Analysis of exosomal RNA Concentration and Its Relationship with p53 Expression among Patients with Nasopharyngeal Cancer* (Supervised by **Abdul Qadar Punagi, Nova Audrey L Pieters, and Masyita Gaffar**)

The aims of this study is to compare the concentration of exosome and the characteristic of p53 inside exosome before or after chemotherapy in patient with nasopharyngeal cancer. Nasopharyngeal cancer remains a highest head and neck malignancy in Asia, especially in Southeast Asia. Exosome is a nano carrier who has a role in inhibiting or promoting the progression of cancer as well as the marker to know the response of therapy depending on its carrier inside. One of the important exosome carrier is p53. Wild type p53 is known as the main inhibition factors of cancer growth through apoptotic pathways.

This study was a prospective, observational, before and after treatment. Subject was recruited voluntary and should include the criteria patients to AJCC 2018. Baseline data such as staging, clinical characteristics, and concentration of exosome RNA and expression of 3 different exon of p53 were collected before chemoradiation. On the other hand, post treatment data collection including the clinical therapy response, concentration of exosome RNA and expression of p53. The concentration of exosome RNA was measured by nanodrops and p53 will obtain using RT-PCR with an appropriate primer. The analysis of difference before and after treatment will be done by paired t-test and Pearson correlation test with significant level less than 0.05.

There are 8 patients who fulfill the criteria and followed until they finish the chemoradiation. The mean age is 37.5 years old (SD 9.9), most of them is in stage 3. The mean exosome RNA concentration is decreased significantly ($p=0.003$). The expression p53 before and after chemoradiation are expressed in exon 4 and 5-6, on the other hand, exon 7 is not expressed. The decreased of exosome RNA concentration is associated conversely with increased of p53 expression although the correlation is not significant.

Keyword: Nasopharyngeal cancer, exosome, p53, chemoradiation



ABSTRAK

HAMSU KADRIYAN. *Analisis Konsentrasi RNA Eksosom dan Hubungannya dengan Ekspresi p53 Pasien Kanker Nasofaring* (dibimbing oleh Abdul Qadar Punagi, Nova Audrey L. Pieters, Masyita Gaffar).

Penelitian ini bertujuan membandingkan konsentrasi eksosom dan karakteristik p53 di dalam eksosom sebelum dan sesudah kemoterapi pada penderita kanker nasofaring. Kanker nasofaring masih menjadi keganasan kepala dan leher tertinggi di Asia terutama di Asia Tenggara. Exosome merupakan nano carrier yang berperan dalam menghambat atau mendorong perkembangan kanker serta sebagai penanda untuk mengetahui respons terapi tergantung pada carrier di dalamnya. Salah satu pembawa eksosom yang penting adalah p53. P53 tipe liar dikenal sebagai faktor penghambat utama pertumbuhan kanker melalui jalur apoptosis.

Penelitian ini bersifat prospektif, observasional, sebelum dan sesudah perlakuan. Subjek direkrut secara sukarela dan harus memasukkan kriteria pasien dengan kanker nasofaring stadium III atau IV menurut AJCC 2018. Data dasar seperti stadium, karakteristik klinis, dan konsentrasi RNA eksosom dan ekspresi 3 ekson berbeda p53 dikumpulkan sebelum kemoradiasi. Adapun pengumpulan data pascaperawatan meliputi respons terapi klinis, konsentrasi RNA eksosom dan ekspresi p53. Konsentrasi RNA eksosom diukur dengan nanodrops dan didapatkan p53 menggunakan RT-PCR dengan primer yang sesuai. Analisis perbedaan sebelum dan sesudah perlakuan dilakukan dengan uji paired t-test dan uji korelasi pearson dengan taraf signifikansi kurang dari 0,05.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada 8 pasien yang memenuhi kriteria dan diikuti hingga selesai kemoradiasi. Rerata umur 37,5 tahun (SD 9,9), sebagian besar berada pada taraf 3. Rerata konsentrasi RNA eksosom menurun secara signifikan ($p = 0,003$). Ekspresi p53 sebelum dan sesudah kemoradiasi diekspresikan dalam ekson 4 dan 5-6, sedangkan ekson 7 tidak diekspresikan. Penurunan konsentrasi RNA eksosom berhubungan sebaliknya dengan peningkatan ekspresi p53 meskipun korelasinya tidak signifikan.

Kata kunci: Kanker Nasofaring, Eksosom, p53, Kemor.





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Hamsu Kadriyan
NIM : C013181018
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

Analisis Ekspresi Eksosom RNA dan Hubungannya dengan Ekspresi Protein P53 pada Penderita Kanker Nasofaring.

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

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

Makassar, 10 Februari 2021

Yang menyatakan,



Hamsu Kadriyan

Daftar Isi

Hasil Penelitian	Error! Bookmark not defined.
Judul Penelitian.....	1
Halaman Pengesahan	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI.....	Error! Bookmark not defined.
Daftar Gambar	xi
Daftar Lampiran	xii
Daftar Singkatan	xiii
Abstract.....	xv
BAB I	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Identifikasi dan Rumusan Masalah.....	5
1.3. Pertanyaan Penelitian.....	6
1.4 Tujuan Penelitian	7
1.4.1. Tujuan Umum	7
1.4.2. Tujuan Khusus.....	7
1.5 Manfaat Penelitian	7
1.5.1 Manfaat Bagi Pengembangan Ilmu	7
1.5.2. Manfaat Aplikasi.....	8
1.6 Hipotesis Penelitian	Error! Bookmark not defined.
BAB II	9
TINJUAN PUSTAKA.....	9
II.1 Kanker Nasofaring	9
II.2 Faktor-faktor risiko	10
II.3 Patofisiologi Timbulnya Kanker Nasofaring.....	11
II.4 Eksosom dan perannya pada patogenesis infeksi virus	13
II.4.1 Struktur eksosom.....	14
II.4.2 Biogenesis eksosom	14
II.4.3 Peranan eksosom pada kanker	15
II.5 Kanker Nasofaring dan Eksosom	17
II.5.1. EBV-related eksosom	18

II.5.2.	Eksosom yang dihasilkan oleh KNF	18
II.5.3.	Fungsi Eksosom pada kanker nasofaring	20
II.6	Protein 53 (p53)	24
II.7	Diagnosis KNF	28
II.7.1.	Keluhan penderita dan gejala klinis	28
II.7.2.	Pemeriksaan radiologis dan pemeriksaan endoskopi.....	29
II.7.3.	Pemeriksaan histopatologi	30
II.7.4.	Pemeriksaan serologis.....	30
II.8	Penatalaksanaan KNF	32
BAB III		36
KERANGKA KONSEP		36
III.1.	Kerangka Teori	36
III.2.	Kerangka Konsep.....	37
..... <i>Error! Bookmark not defined.</i>		
III.3.	Definisi Operasional	37
BAB IV.....		40
METODE PENELITIAN.....		40
IV.1.	Desain Penelitian	40
IV.2.	Waktu dan Tempat penelitian	40
IV.3.	Populasi dan sampel penelitian	40
IV.4.	Kriteria inklusi dan eksklusi	41
II.4.4	Kriteria inklusi.....	41
II.4.5	Kriteria eksklusi	41
IV.5.	Estimasi besar sampel	41
IV.6.	Instrumen dan tata cara pengumpulan data.....	42
IV.7.	Cara pengambilan sampel	43
IV.8.	Prosedur Isolasi eksosom	44
IV.9.	Prosedur Ekstraksi nucleic acid RNA dan cDNA:.....	46
IV.10.	Pemeriksaan <i>nano drops</i>	47
IV.11.	Pemeriksaan RT-PCR untuk mengamati ekspresi LMP-1	47
IV.12.	Pemeriksaan RT-PCR untuk mengamati ekspresi p53.....	48
IV.13.	Alur penelitian	49
IV.14.	Pengolahan Data	50

IV.15.	Uji Statistik.....	50
IV.16.	Estimasi Biaya Penelitian	51
IV.17.	Jadwal Penelitian	51
BAB V.....	53
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	53
V.1. Hasil Penelitian.....	53
V.2 Pembahasan.....	64
BAB V	72
KESIMPULAN DAN SARAN.....	72
Daftar Pustaka.....	74

Daftar Tabel

No. Tabel	Judul tabel	Halaman
Tabel II.1	Mutasi p53 pada KNF	26
Tabel IV.1	Definisi operasional dari variabel yang diteliti	36
Tabel IV.2	Jadwal penelitian	49
Tabel V.1.1	Karakteristik klinis subyek penelitian.....	52
Tabel V.1.2	Konsentrasi eksosom RNA sebelum dan sesudah kemoradiasi	52
Tabel V.1.3	Rerata konsentrasi eksosom pada berbagai variabel klinis	53
Tabel V.1.4	Ekspresi LMP-1 pada eksosom pasien KNF sebelum dan sesudah kemoradiasi	54
Tabel V.1.5	Ekspresi p53 pada ekson 4,5-6, dan 7 pada eksosom pasien KNF sebelum dan sesudah kemoradiasi	57

Daftar Gambar

No. Gbr	Judul	halaman
Gbr II.1	Alur perubahan sel nasofaring normal menjadi karsinoma invasif	11
Gbr II.2	Overview galur-galur pensignal pada pathogenesis KNF ...	12
Gbr II.3	Gambar skematik struktur eksosom	13
Gbr II.4	Biogenesis eksosom	14
Gbr II.5	Efek-efek eksosom pada berbagai sel imun dan jalur untuk memicu perkembangan dan metastasis tumor	15
Gbr II.6	Proses lingkungan mikro tumor yang dimediasi eksosom yang dihasilkan oleh sel kanker	15
Gbr II.7	Komponen-komponen KNF-Ekso	18
Gbr II.8	Gambar skematik varian p53	24
Gbr II.9	Pedoman alur penegakan diagnosis KNF	30
Gbr II.10	Pedoman alur penatalaksanaan KNF	33
Gbr III.1	Kerangka teori	35
Gbr III.2	Kerangka konsep penelitian	36
Gbr IV.1	Alur penelitian	48
Gbr V.1.1	Perbandingan konsentrasi eksosom RNA sebelum dan sesudah kemoradiasi	54
Gbr V.1.2	Ekspresi LMP-1 sebelum dan sesudah kemoradiasi	55
Gbr V.1.3	Hasil floresensi LMP-1 dari eksosom	55
Gbr V.1.4	Ekspresi gen relatif LMP-1 terhadap <i>house keeping gene</i> ...	56
Gbr V.1.5	Ekspresi p53 pada eksosom di exon 4, 5-6, dan 7	58
Gbr V.1.6	Flouresensi p53 pada ekson 5-6 dari eksosom yang diisolasi	58
Gbr V.1.7	Flouresensi p53 pada ekson 4 dari eksosom yang diisolasi ..	58
Gbr V.1.8	Flouresensi p53 pada ekson 7 yang tidak terekspresi	59
Gbr V.1.9	Ekspresi gen relatif p53 ekson 5-6 terhadap <i>house keeping gene</i>	60
Gbr V.1.10	Ekspresi gen relatif p53 ekson 4 terhadap <i>house keeping gene</i>	61
Gbr V.1.11	Hasil pemeriksaan sekuensing yang menunjukkan adanya mutasi pada sampel 10 (pre kemoterapi) pada ekson 5	65

Daftar Lampiran

No. lampiran	Judul lampiran	Halaman
Lampiran 1	Daftar pertanyaan untuk data epidemiologi penderit	75
Lampiran 2	Lembar persetujuan mengikuti penelitian	76
Lampiran 3	Penilaian indeks Karnofksy	78
Lampiran 4	Rekomendasi Persetujuan Etik	79
Lampiran 5	Data hasil RT-PCR	80
Lampiran 6	Hasil analisis data dengan SPSS	85
Lampiran 7	Hasil pemeriksaan histopatologi	92
Lampiran 8	Hasil pemeriksaan sekuensing	93

Daftar Singkatan

Singkatan	Kepanjangan
AJCC	American joint committee on cancer
AMV	Apparatus multi vesikel
APC	Antigen presenting cell
CCE	Cancer cell exosome
CD	Cluster differentiation
CT scan	Computed tomography scan
CTL	Cytotoxic T cell
DNA	Dioksiribonucleic acid
EBNA	Ebstein Barr Nuclear Antigen
EBV	Ebstein Barr virus
Ekso	Eksosom
ELISA	Enzyme linked immunoassay
EMT	Epitelial to mesenchymal transition
Exo	Exosome
FGF	Fibroblast growth factors
Gy	Gray
HSP	Heat stroke protein
IL	Interleukin
JNK	Jun-N terminal Kinase
KGB	Kelenjar getah bening
KNF	Kanker Nasofaring
LCL	Lymphoblastoid cell line
LMP	Lethal membrane protein
M	Metastasis
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MHC	Major histocompatibility complex
miRNA	Micro RNA
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRI	Magnetic resonance imaging
MSC	Mesenchymal stem cell
MVB	Multivesikuler bodies
N	Nodul regional
NCCN	National comprehensive cancer network
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NPC	Nasopharyngeal carcinoma
P13k/Akt	Phosphatidylinositol 13 kinase/Ak strain transforming
P53	Protein 53
PCR	Polymerase chain reaction
PGE	Prostaglandin E
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Real time PCR
T	Tumor primer
TERT	Cell transformation
TGF	Tumor growth factors
TNM	Tumor Nodul Metastase

TSAP6	Tumor suppressor activated pathway 6
VE	Vesikel ekstraseluler
VIL	Vesikel intraluminar
WHO	World Health Organization

Abstract

Analysis of exosomal RNA expression and its relationship with p53 expression among patients with nasopharyngeal cancer

Hamsu Kadriyan¹, Abdul Qadar Punagi¹, Nova Audrey L. Pieters¹, Masyita Gaffar¹

Hasanuddin University, Makassar, Indonesia

Abstract

Introduction. Nasopharyngeal cancer remains a highest head and neck malignancy in Asia, especially in Southeast Asia. Exosome is a nano carrier who have a role in inhibition or promote the progression of cancer as well as the marker to knows the response of therapy depending on its carrier inside. One of the important exosome's carier is p53. Wild type p53 known as the main inhibition factors of cancer growth through apoptotic pathways. The aim of this study is to compared the concentration of exosome and the characteristic of p53 inside exosome before and after chemotherapy in patient with nasopharyngeal cancer.

Methods. This study was a prospective, observational, before and after treatment. Subject was recruited voluntary and should include the criteria nasopharyngeal cancer stage III or IV according to AJCC 2018. Baseline data such as staging, clinical characteristics, and concentration of exosome RNA and expression of 3 different exon of p53 are collected before chemoradiation. On the other hand, post treatment data collection including the clinical therapy response, concentration of exosome RNA and expression of p53. The concentration of exosome RNA was measure by nanodrops and p53 will obtained using RT-PCR with an appropriate primer. The analysis of difference before and after treatment will done by paired t-test and Pearson correlation test with significance level less than 0,05. Sequence analysis was done to explore the possibility of p53 mutation.

Result. There were 8 patients who fulfill the criteria and followed until they finished the chemoradiation. The mean age was 37,5 years old (SD 9,9), most of them was in stage 3. The mean exosome RNA concentration was decreased significantly ($p=0,003$). The expression p53 before and after chemoradiation were increased significantly in exon 4 and 5-6, on the other hand, exon 7 was not expressed. The decreased of exosome RNA concentration was associated conversely with increased of p53 expression although the correlation was not significant. Sequence analysis indicate the mutation of p53 in exon 5. The mutation type was an insertion of G base.

Conclusions. There was a significance difference between concentration of exosome before and after chemoradiation and p53 was increased significantly except on exon 7.

Keyword: Nasopharyngeal cancer, exosome, p53, chemoradiation

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Kanker nasofaring (KNF) merupakan keganasan di daerah kepala dan leher yang paling sering ditemukan di Indonesia dan beberapa negara lain di wilayah Cina bagian selatan serta negara-negara Asia Tenggara, sedangkan di negara-negara Eropa dan Amerika angka kejadiannya relatif lebih rendah. Di Cina, insidensi kanker nasofaring mencapai 20/100.000 penduduk, sedangkan di Indonesia mencapai 5,66/100.000 penduduk sehingga diperkirakan di Indonesia akan ditemukan 15.500 kasus baru setiap tahunnya. (Adham *et al.*, 2012) Berdasarkan hasil penelitian *Global Cancer Network* pada tahun 2018, diperkirakan terdapat 129,079 kasus baru penderita kanker nasofaring dengan 72,987 kematian dalam setahun di seluruh dunia. (Bray *et al.*, 2018)

Penelitian di RSUD provinsi NTB pada tahun 2017 ditemukan 48 kasus baru kanker nasofaring. Kasus terbanyak ditemukan pada laki-laki dengan perbandingan laki-laki dan perempuan adalah 2:1 dan umur rata-rata penderita 43,5 tahun. (Kadriyan *et al.*, 2018)

Berdasarkan beberapa penelitian ditemukan sebagian besar kanker nasofaring ditemukan pada stadium lanjut 3 dan 4. He dkk (2017) pada penelitiannya menemukan 31 dari 33 penderita (93,3%) dengan stadium 3 dan 4. (He *et al.*, 2017) Di India, pada tahun 2017 ditemukan 83,2% kasus pada stadium lanjut, yang terdiri dari 59 (41,3%) stadium 3 dan 60 (41,9%) stadium 4. (Haleshappa *et al.*, 2017)

Stadium klinis pada KNF sangat penting dalam perencanaan terapi dan evaluasi serta prognosis hasil terapi. Sistem klasifikasi stadium penilaian TNM (ukuran tumor, kelenjar getah bening (KGB) yang terlibat,

metastasis): tumor primer (T), kelenjar regional (N), metastasis (M). Klasifikasi T pada KNF menurut *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) edisi ke 8 tahun 2018 yaitu: T1 adalah tumor yang berada pada nasofaring atau tumor yang sudah ekstensi ke orofaring dan atau kavum nasi tanpa ekstensi ke parafaringeal; T2 adalah tumor yang sudah ekstensi ke parafaringeal dan atau keterlibatan jaringan sekitar (otot pterygoid medial, pterygoid lateral, prevertebral); T3 adalah tumor yang melibatkan struktur tulang dari basis kranii, vertebra servikal, struktur pterygoid dan atau sinus paranasal; T4 adalah tumor yang sudah ekstensi intrakranial, terdapat keterlibatan nervus kranialis, hipofaring, orbita, kelenjar parotis, dan atau infiltrasi jaringan ikat ekstensif melewati permukaan lateral dari otot pterygoid lateralis. (AJCC, 2018)

Untuk keterlibatan KGB leher, N1 adalah metastasis unilateral dan atau metastasis KGB retrofaringeal unilateral, berukuran <6 cm, di atas batas kaudal kartilago krikoid, N2 merupakan metastasis bilateral dengan ukuran <6 cm, diatas batas kaudal kartilago krikoid dan N3 adalah KGB dengan ukuran >6 cm dan atau ekstensi ke bawah batas kaudal kartilago krikoid. M1 jika terdapat metastase jauh sedangkan M0 tidak ada metastase jauh. Pembagian stadium untuk KNF adalah: stadium 0 (Tis N0 M0), stadium I (T1 N0 M0), stadium II (T0,T1 N1 M0, T2 N0,N1 M0), stadium III (T0,T1,T2 N2 M0, T3 N0,N1,N2 M0), Stadium IVA (T4 N0,N1,N2 M0, semua T N3 M0), stadium IVB (semua T, semua N M1). (AJCC, 2018)

Dalam beberapa tahun terakhir ini, vesikel ekstraseluler, salah satunya dikenal dengan nama eksosom, menarik perhatian beberapa peneliti. Eksosom merupakan vesikel kecil yang terikat membran yang diekskresikan oleh sel. Vesikel ekstraseluler (VE) ini membawa berbagai macam molekul yang berimplikasi pada komunikasi antar sel sehingga ia berperan dalam patogenesis berbagai macam penyakit dan infeksi. Terdapat berbagai macam tipe VE yang dapat berupa badan apoptosis (500-2000 nm), mikrovesikel (50-1000 nm) dan eksosom (30-100 nm). (Lässer, Eldh and Lötvall, 2012)

Eksosom secara umum mengandung protein, lemak, asam nukleat dan berbagai bahan lainnya. Saat ini terdapat 4.563 protein, 194 jenis lemak, 1.639 mRNA dan 764 mikro RNA serta berbagai *non-coding* RNA (ncRNA), juga mtDNA, ssDNA dan dsDNA yang telah teridentifikasi dalam eksosom. (Mathivanan *et al.*, 2012), (Camacho, Guerrero and Marchetti, 2013) Melalui fusi membran dengan sel target, komponen eksosomal masuk ke dalam sel resipien dan berperan dalam sejumlah proses fisiologi dan patofisiologi yang vital. Beberapa protein yang dikeluarkan oleh eksosom antara lain CD9, CD63, CD81 dan CD82, tetapi eksosom juga mengandung beberapa protein jaringan spesifik. Sebagai contoh, *human nasopharyngeal carcinoma-derived eksosom* (KNF-Ekso) yang mengandung LMP-1 yang merupakan protein virus. Dengan demikian, eksosom berperan penting sebagai kendaraan interseluler untuk perpindahan bahan-bahan tertentu dan berperan juga sebagai biomarker untuk diagnosis penyakit. (Zhou *et al.*, 2018)

Pada kanker, eksosom berpartisipasi pada pertukaran informasi genetik antara sel tumor dengan sel stroma dan mendorong terjadinya angiogenesis, selanjutnya menyebabkan pertumbuhan sel, migrasi, invasi dan metastase jauh. Sebagai contoh, eksosom yang dihasilkan oleh sel nasofaring yang terinfeksi EBV akan mengandung LMP-1 dan mikro RNA virus yang mengaktifkan jalur signaling pada sel resipien seperti Wnt, P13k/Akt, JNK, MAPK dan NF- κ B. Onkogen utama EBV (LMP-1) pada eksosom dapat menstimulasi sekresi pro-invasif *fibroblast growth factor 2*, sehingga mendorong terjadinya invasi sel nasofaring. Eksosom juga terlibat dalam infeksi laten virus dan virus tumor seperti EBV yang dapat memanipulasi lingkungan mikro tumor melalui sekresi eksosom yang telah mengandung komponen spesifik virus. (Zhou *et al.*, 2018)

Beberapa jenis eksosom telah diisolasi dari serum penderita kanker nasofaring (KNF), seperti *EBV-related exosome* dan eksosom yang dihasilkan oleh KNF yang sesungguhnya. Kedua eksosom ini mengandung

bahan yang berbeda, sehingga peran mereka tentu berbeda dalam komunikasi lintas host-tumor dan modulasi respon imun, angiogenesis, proliferasi sel, komunikasi antar sel dan invasi tumor.(Wan *et al.*, 2018) Sebagai contoh, mikro RNA yang dihasilkan oleh KNF-ekso meregulasi ekspresi gen yang terlibat dalam proliferasi sel, diferensiasi dan respon stress. Sesungguhnya, eksosom yang berkaitan dengan KNF tidak hanya KNF-ekso, dapat juga *mesenchymal stem cell (MSC)-derived exosome* dan *human EBV-transformed lymphoblastoid cell line (LCL)-derived exosome*. (Zhou *et al.*, 2018)

Penelitian eksperimental yang dilakukan oleh Mutschelknaus dkk (2016) pada kanker kepala dan leher menemukan peningkatan jumlah dan penggunaan eksosom setelah radiasi. Pada penelitian tersebut juga ditemukan bahwa eksosom yang diisolasi dari sel yang telah di radiasi memiliki peran dalam peningkatan proliferasi sel yang tidak terkena radiasi serta peningkatan survival sel yang di radiasi. Mekanisme peningkatan survival ini dibuktikan dengan ditemukannya perbaikan *DNA double stranded* yang rusak akibat radiasi. (Mutschelknaus *et al.*, 2016) Penelitian eksperimental lainnya menunjukkan bahwa setelah kemoterapi sel kanker nasofaring, juga ditemukan peningkatan jumlah eksosom. Hal ini mengakibatkan jumlah tumor supresor menjadi predominan dibandingkan onkogen pada profil miRNA eksosom. (Harmati *et al.*, 2017) Hasil sebaliknya didapatkan oleh Theodorika dkk (2019) yang melakukan penelitian pada penderita kanker kepala dan leher yang menunjukkan bahwa rerata konsentrasi eksosom mengalami penurunan setelah kemoradiasi, khususnya pada penderita yang mengalami respon yang baik. Tetapi, hasil sebaliknya terjadi peningkatan pada penderita yang mengalami relaps.(Theodoraki *et al.*, 2019)

Protein p53 (*wild type*) adalah protein yang dikode oleh gen p53 (*tumor suppressor gen*), merupakan faktor transkripsi yang melekat pada sekuen DNA yang spesifik. Dalam keadaan normal p53 (*wild type*) mempunyai peran sentral dalam mengatur proses penting seperti

penghentian siklus sel (*cell cycle arrest*), perbaikan DNA, apoptosis dan penuaan sel (*senescence*). (Juan Liu *et al.*, 2019) Penelitian di Indonesia pada tahun 2000 menemukan terjadinya overekspresi p53 pada penderita kanker nasofaring dengan pemeriksaan imunohistokimia, yaitu sebesar 79% (38 dari 48 kasus). (Kurniawan and Leong, 2000) Pada KNF terjadi inaktivasi gen p53 (*wild type*) yang menyebabkan terbentuknya p53 mutan. Gen p53 mutan menyebabkan peningkatan gen penghambat apoptosis yang berakibat sel menjadi lebih resisten terhadap radioterapi. (Yusuf *et al.*, 2018)

Tumor suppression-activated pathway 6 (TSAP 6) yang merupakan gen target p53, secara genetik pertama kali dibuktikan oleh Lespagnol Adkk (2008), bahwa sekresi eksosom dikendalikan oleh TSAP 6 akibat respon terhadap adanya kerusakan DNA (seperti oleh akibat radiasi) dan aktivasi p53. Pada laporan tersebut juga menemukan aktivasi p53 oleh kerusakan DNA akan menimbulkan peningkatan sekresi eksosom. (Lespagnol *et al.*, 2008)

Penelitian pada kanker kolon menemukan bahwa p53 mutan yang singgah di sel kanker tersebut secara selektif melepaskan eksosom yang mengandung miRNA-1246. *Uptake* eksosom ini oleh sel makrofag yang berada di dekat sel kanker akan memicu pemrograman ulang miRNA-1246 menjadi keadaan yang mempromosikan kanker. (Cooks *et al.*, 2018)

Belum ditemukan penelitian yang secara khusus meneliti hubungan antara eksosom pada kanker nasofaring stadium lanjut dengan ekspresi protein p53 sebelum dan setelah kemo-radioterapi.

I.2. Identifikasi dan Rumusan Masalah

1. Kanker nasofaring merupakan kanker yang tersering di daerah kepala dan leher, dapat ditemukan mulai stadium 1 sampai 4.
2. Sebagian besar kasus kanker nasofaring ditemukan pada stadium lanjut (stadium 3 dan 4).

3. Penatalaksanaan utama pada penderita kanker nasofaring pada stadium 3 dan 4 adalah dengan kombinasi radioterapi dan kemoterapi
4. Eksosom merupakan vesikel ekstra vesikuler yang berperan dalam komunikasi interseluler yang dapat mengakibatkan sel normal di sekitar sel kanker mentranskripsikan protein yang salah sehingga dapat memperberat kankernya. Eksosom yang dihasilkan oleh KNF mengandung LMP-1.
5. Hasil penelitian konsentrasi eksosom RNA pada berbagai kasus kanker ditemukan masih berbeda-beda antar peneliti, khususnya bila dibandingkan antara sebelum dan setelah kemo-radioterapi.
6. Protein 53 (*wild type*) yang merupakan protein proapoptosis dapat ditemukan di dalam eksosom penderita kanker nasofaring.
7. Pada kanker nasofaring stadium lanjut, p53 (*wild type*) ditemukan dalam jumlah yang sedikit dan akan meningkat setelah kemo-radioterapi.

I.3. Pertanyaan Penelitian

1. Bagaimana karakteristik konsentrasi eksosom RNA pada penderita kanker nasofaring stadium lanjut sebelum dan sesudah kemo-radiasi?
2. Bagaimana ekspresi LMP-1 dalam eksosom sebelum dan sesudah kemoradiasi pasien KNF stadium lanjut?
3. Bagaimana karakteristik ekspresi p53 (*wild type*) yang dibawa oleh eksosom pada penderita kanker nasofaring stadium lanjut, sebelum dan sesudah kemo-radioterapi?
4. Bagaimana hubungan konsentrasi eksosom RNA dan ekspresi p53 (*wild type*) pada penderita kanker nasofaring stadium lanjut sebelum dan sesudah kemo-radioterapi?

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan konsentrasi eksosom RNA dan kandungan LMP-1 dan P53 di dalamnya sebelum dan sesudah kemo-radiasi pada pasien kanker nasofarings.

1.4.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui karakteristik konsentrasi eksosom RNA pada penderita kanker nasofaring stadium lanjut sebelum dan sesudah kemo-radiasi
2. Untuk mengetahui eksosom yang diisolasi berasal dari sel KNF atau bukan dengan melihat ekspresi LMP-1.
3. Untuk mengetahui karakteristik ekspresi p53 (*wild type*) yang dibawa oleh eksosom pada penderita kanker nasofaring stadium lanjut, sebelum dan sesudah kemo-radioterapi
4. Untuk mengetahui hubungan konsentrasi eksosom RNA dan ekspresi p53 (*wild type*) pada penderita kanker nasofaring stadium lanjut sebelum dan sesudah kemo-radioterapi

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Bagi Pengembangan Ilmu

1. Mengembangkan pengetahuan tentang eksosom yang dapat menjadi transporter bagi berbagai material genetik seperti LMP-1 dan p53.
2. Mengembangkan pengetahuan tentang eksosom yang dapat dihasilkan oleh sel kanker khususnya kanker nasofarings.
3. Menambah Pemahaman tentang eksosom dan bawaannya,

khususnya LMP-1 dan p53 yang dipengaruhi oleh kemoradiasi.

1.5.2. Manfaat Aplikasi

1. Dapat mengetahui pengaruh kemoradiasi terhadap eksosom dan bawaannya pada kanker nasofarings sehingga dapat dilakukan penelitian-penelitian lanjutan untuk dijadikan biomarker diagnosis, penatalaksanaan, dan pemantaun prognosis pada kanker nasofarings.
2. Menambah Referensi terkait eksosom dan bawaannya, khususnya LMP-1 dan p53 pada kanker nasofarings.

BAB II

TINJUAN PUSTAKA

II.1 Kanker Nasofaring

Kanker nasofaring (KNF) merupakan keganasan yang terjadi di rongga nasofaring yang meliputi rongga yang berada di belakang kavum nasi. Rongga ini dibatasi oleh koana di bagian anterior, basis kranii di bagian atas, vertebra cervikalis di bagian posterior dan di bagian inferior dibatasi oleh uvula. (Adham, 2018)

Di Cina, insidensi kanker nasofaring mencapai 20/100.000 penduduk, sedangkan di Indonesia mencapai 5,66/100.000 penduduk sehingga diperkirakan di Indonesia akan ditemukan 15.500 kasus baru setiap tahunnya. (Adham *et al.*, 2012) Penelitian pada tahun 2018, ditemukan 129,079 kasus baru kanker nasofaring dengan 72,987 kematian selama setahun di seluruh dunia. (Bray *et al.*, 2018) Di RSUD Provinsi NTB, selama tahun 2017 ditemukan 48 kasus baru kanker nasofaring. (Kadriyan *et al.*, 2018)

Berdasarkan beberapa penelitian ditemukan sebagian besar kanker nasofaring ditemukan pada stadium lanjut, yaitu stadium 3 dan 4. He dkk (2017) pada penelitiannya menemukan 31 dari 33 penderita (93,3%) dengan stadium 3 dan 4. (He *et al.*, 2017) Di India, pada tahun 2017 ditemukan 83,2% kasus pada stadium lanjut, yang terdiri dari 59 (41,3%) stadium 3 dan 60 (41,9%) stadium 4. (Haleshappa *et al.*, 2017) Pada penelitian tentang efek kemoterapi pada pasien kanker nasofaring di Lombok, menemukan 20 (60,6%) penderita pada stadium 3 dan 11 (39,4%) penderita pada stadium 4. (Kadriyan, Muhammad Alfian Sulaksana, *et al.*, 2019)

II.2 Faktor-faktor risiko

Terdapat berbagai faktor risiko timbulnya kanker nasofaring, antara lain higiene dan sanitasi yang buruk, kebiasaan memakan makanan yang diawetkan seperti ikan asin, terpapar zat karsinogenik, konsumsi nitrosamine dan berbagai faktor lainnya. Dalam 2 dekade terakhir, infeksi virus Epstein Barr banyak dikaitkan dengan timbulnya kanker nasofaring sehingga banyak peneliti yang melakukan riset tentang hal tersebut. (Adham, 2018)

Paparan non-viral yang paling konsisten dan berhubungan kuat dengan risiko karsinoma nasofaring adalah konsumsi ikan asin. Konsumsi ikan asin meningkatkan risiko 1,7 sampai 7,5 kali lebih tinggi dibanding yang tidak mengkonsumsi. Diet konsumsi ikan asin lebih dari tiga kali sebulan meningkatkan risiko karsinoma nasofaring. (Chalian and Litman, 2006) Potensi karsinogenik ikan asin didukung dengan penelitian pada tikus, proses pengawetan dengan garam tidak efisien sehingga terjadi akumulasi nitrosamin yang dikenal sebagai bahan karsinogen pada hewan (Chang dan Adami 2006). Enam puluh dua persen penderita karsinoma nasofaring mengkonsumsi secara rutin makanan fermentasi yang diawetkan. (Sharma *et al.*, 2011) Tingginya konsumsi nitrosamin dan nitrit dari daging, ikan dan sayuran yang diawetkan selama masa kecil meningkatkan risiko karsinoma nasofaring. (Yang *et al.*, 2005)

EBV merupakan faktor risiko terbesar untuk terjadinya karsinoma nasofaring. Umumnya infeksi EBV tidak menimbulkan gejala. EBV menginfeksi dan menetap secara laten pada 90% populasi dunia. Di Hong Kong, 80% anak terinfeksi pada umur 6 tahun, hampir 100% mengalami serokonversi pada umur 10 tahun. Infeksi EBV primer biasanya subklinis. Transmisi utama melalui saliva, biasanya pada negara berkembang yang kehidupannya padat dan kurang bersih. Limfosit B adalah target utama EBV, jalur masuk EBV ke sel epitel masih belum jelas, replikasi EBV dapat terjadi di sel epitel orofaring. (Chang and Adami, 2006) Virus Epstein-Barr dapat memasuki sel-sel epitel orofaring, bersifat menetap (persisten),

tersembunyi (laten) dan sepanjang masa (*life-long*). Antibodi Anti-EBV ditemukan lebih tinggi pada penderita karsinoma nasofaring, pada penderita karsinoma nasofaring terjadi peningkatan antibodi IgG dan IgA, hal ini menjadi salah satu domain tes skrining karsinoma nasofaring pada populasi dengan risiko tinggi. (Chang and Adami, 2006), (Adham, 2018)

II.3 Patofisiologi Timbulnya Kanker Nasofaring

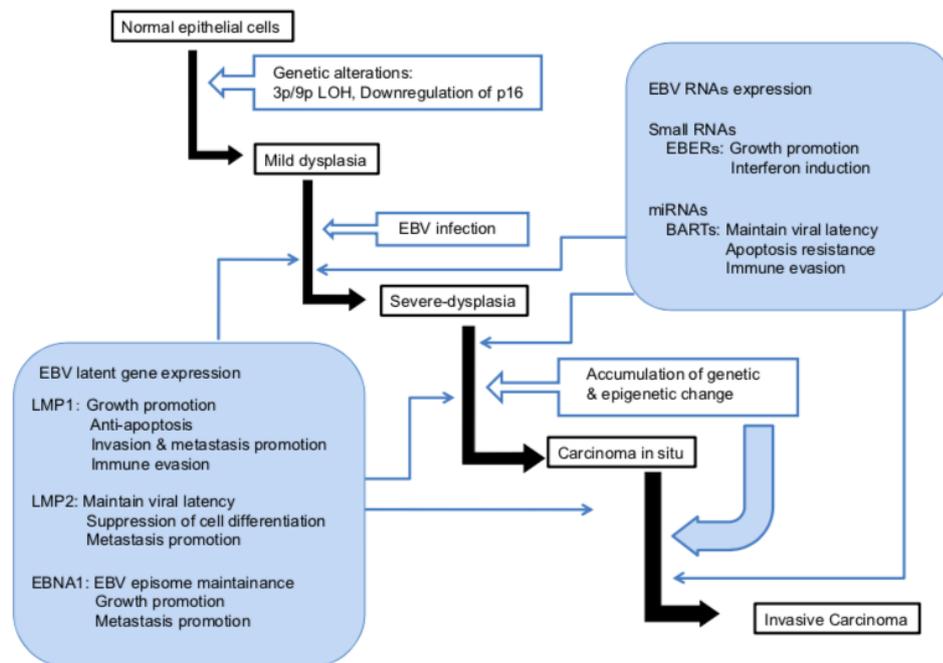
Sel nasofaring normal dapat berubah menjadi sel tumor diawali dengan adanya berbagai paparan faktor risiko dan adanya kerusakan genetik, khususnya pada 3p/9p LOH dengan adanya *down-regulasi* p16. Hal ini dapat menimbulkan displasia ringan.

Displasia ringan dapat berubah menjadi displasi berat apabila terdapat infeksi Epstein Barr virus yang ditandai oleh beberapa marker seperti ekspresi EBV RNA dan ekspresi gen laten EBV. Ekspresi EBV RNA dapat berupa: 1) small RNA (EBER yang menginduksi pertumbuhan promosi interferon), 2) mikro RNA (BART yang mempertahankan latensi virus, resistensi apoptosis dan menghindarnya sistem imun (*immune evasion*)). Di sisi lain ekspresi gen EBV laten yang antara lain ditunjukkan oleh: 1) LMP-1 (mempromosikan pertumbuhan, anti-apoptosis, promosi invasi dan metastasi tumor, serta *immune evasion*), 2) LMP2 (mempertahankan latensi virus, menekan diferensiasi sel dan mempromosikan terjadinya metastasis), 3) EBNA1 (mempertahankan episome EBV, mempromosikan pertumbuhan dan mempromosikan metastasis).

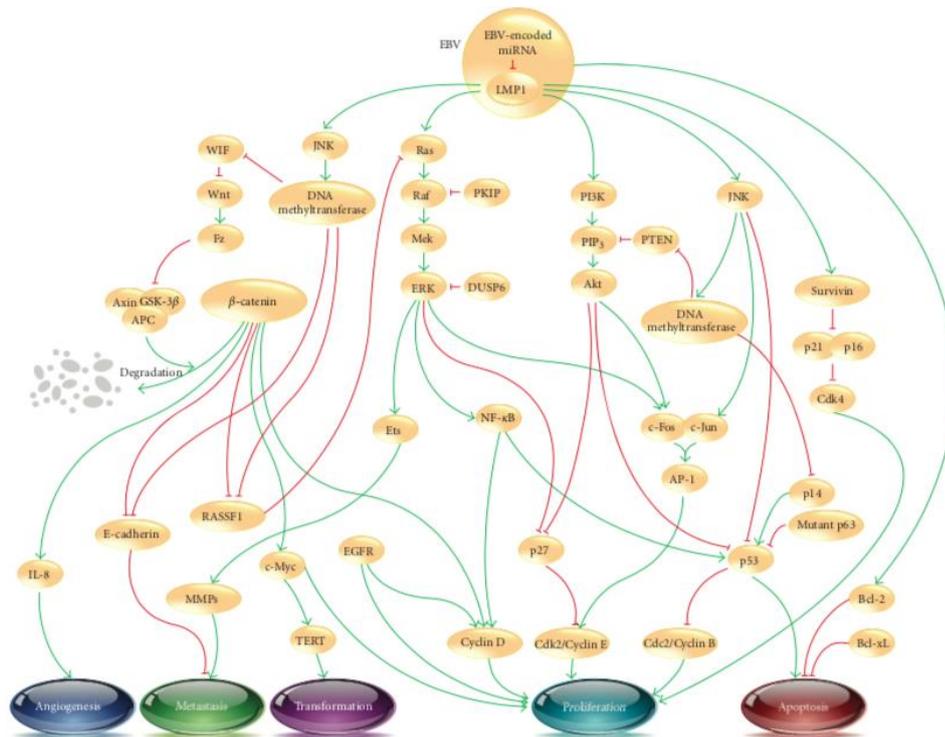
Disamping menyebabkan perubahan sel nasofaring dari displasi ringan menjadi berat, EBV dengan berbagai markernya tersebut juga berperan dalam perubahan sel nasofaring dari displasi berat menjadi karsinoma insitu. Hal ini juga didorong oleh adanya akumulasi perubahan genetik dan epigenetik.

Seluruh faktor di atas juga turut berpengaruh terhadap perubahan karsinoma insitu menjadi karsinoma invasif. Secara skematik, perubahan tersebut tergambar pada gambar II.1. (Nakanishi *et al.*, 2017)

Inisiasi pensignal protein *upstream* pada KNF dimulai dengan LMP-1. Selanjutnya meginduksi aktivitas protein *downstream* pada beberapa galur seperti β -catenin, NF- κ β dan AP-1 yang mengakibatkan disregulasi pada proliferasi sel (cdk/cyclin protein), *cell transformation* (TERT), peningkatan angiogenesis (IL-8) and metastasis (E-cadherin, MMP) dan penghambatan apoptosis (Bcl-2, P53). (Tulalamba and Janvilisri, 2012)



Gambar II.1. Alur perubahan sel nasofaring normal menjadi karsinoma invasif (Nakanishi *et al.*, 2017)



Gambar II.2. Overview galur-galur pensignal pada patogenesis KNF. Keterangan: garis merah menunjukkan *down regulasi*, sedangkan garis hijau menunjukkan *up regulasi*. (Tulalamba and Janvilisri, 2012)

II.4 Eksosom dan perannya pada patogenesis infeksi virus

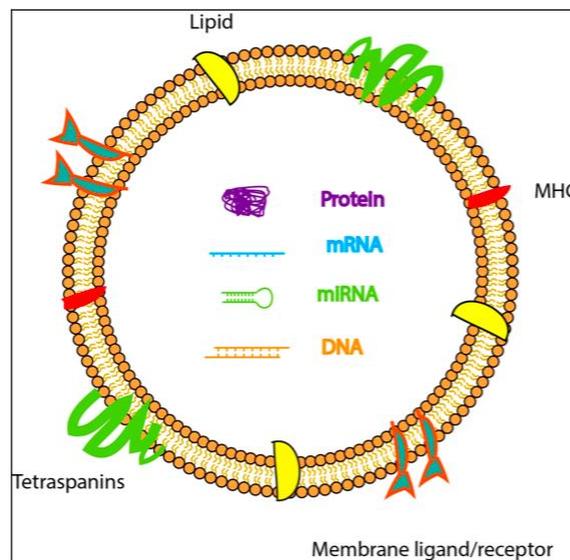
Eksosom merupakan vesikel kecil yang terikat membran yang diekresikan oleh sel. Vesikel ekstraseluler ini (VE) membawa berbagai macam molekul yang berimplikasi pada komunikasi antar sel sehingga ia berperan dalam patogenesis berbagai macam penyakit dan infeksi. Terdapat berbagai macam tipe VE yang dapat berupa badan apoptosis (500-2000 nm), mikrovesikel (50-1000 nm) dan eksosom (30-100 nm). (Roma-Rodrigues, Fernandes and Baptista, 2014), (Jella *et al.*, 2018)

Eksosom terbentuk melalui jalur endositik, dimana material endositosis dikirim ke endosom dini dan selanjutnya dikirim baik untuk degradasi setelah fusi dengan lisosom atau memasuki jalur sekretori

melalui aparatus multivesikel (AMV). Vesikel yang berada di dalam AMV dikenal dengan nama vesikel intraluminal (VIL) dan mereka disebut eksosom setelah mereka dilepaskan dari AMV dan selanjutnya mengalami fusi dengan membran plasma. (Roma-Rodrigues, Fernandes and Baptista, 2014), (Jella *et al.*, 2018)

II.4.1 Struktur eksosom

Struktur eksosom menunjukkan kandungan DNA, protein dan RNA yang dikelilingi oleh dua lapis lipid dengan membran reseptor/ligand, tetraspanins dan *major histocompatibility complex* (MHC). (Jella *et al.*, 2018)

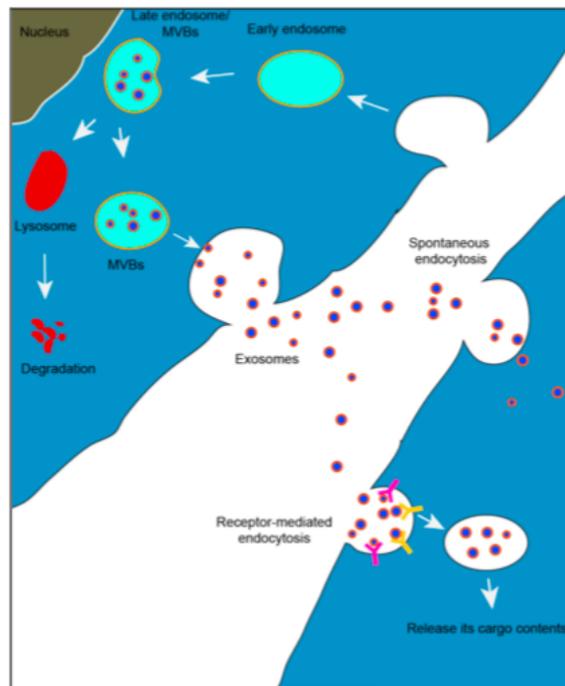


Gambar II.3. Gambar skematik struktur eksosom (Jella *et al.*, 2018)

II.4.2 Biogenesis eksosom

Biogenesis eksosom dimulai dengan *budding* endosom awal dan berlanjut ke endosom akhir yang dikenal dengan nama badan multivesikuler (BMV). Kemudian BMV berfusi ke dalam plasma membran untuk melepaskan eksosom ke lingkungan seluler luar untuk berkomunikasi dengan sel lain. Endosom akhir berfusi dengan lisosom untuk masuk ke dalam jalur degradasi. Pada sel resipien, eksosom di tangkap oleh reseptor

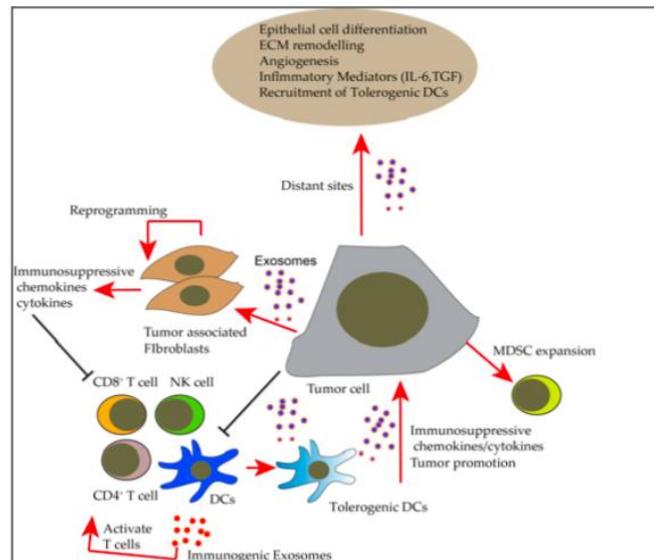
yang memediasi proses endositosis dan melepaskan bawasanya. (Jella *et al.*, 2018), (Lässer, Eldh and Lötval, 2012)



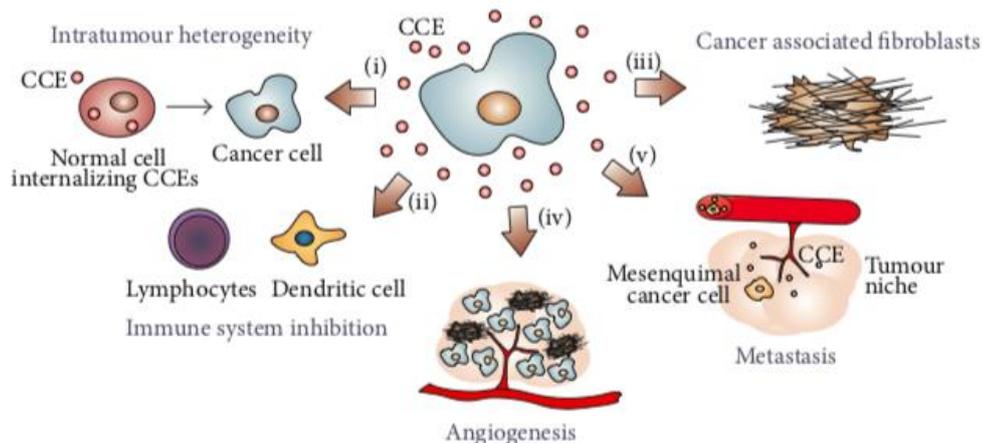
Gambar II.4. Biogenesis eksosom. (Jella *et al.*, 2018)

II.4.3 Peranan eksosom pada kanker

Pada kanker, eksosom berpartisipasi pada pertukaran informasi genetik antara sel tumor dengan sel stroma dan mendorong terjadinya angiogenesis, selanjutnya menyebabkan pertumbuhan sel, migrasi, invasi dan metastase jauh. Sebagai contoh, eksosom yang dihasilkan oleh sel nasofaring yang terinfeksi EBV akan mengandung LMP-1 dan mikro RNA virus yang mengaktifkan jalur signaling pada sel resipien seperti Wnt, P13k/Akt, JNK, MAPK dan NF- κ B. Onkogen utama EBV (LMP-1) pada eksosom dapat menstimulasi sekresi *pro-invasive fibroblast growth factor 2*, sehingga mendorong terjadinya invasi sel nasofaring. Eksosom juga terlibat dalam infeksi laten virus dan virus tumor seperti EBV yang dapat memanipulasi lingkungan mikro tumor melalui sekresi eksosom yang telah mengandung komponen spesifik virus. (Zhou *et al.*, 2018)



Gambar II.5. Efek-efek eksosom, pada berbagai sel imun dan jalur untuk memicu perkembangan dan metastasis tumor (Jella *et al.*, 2018)



Gambar II.6. Proses lingkungan mikro tumor yang dimediasi oleh eksosom yang dihasilkan oleh sel kanker (CCE): (i) heterogenitas intratumor mengakibatkan modifikasi dari fenotip sel normal setelah internalisasi CCE; (ii) inhibisi respon imun terhadap sel tumor melalui inhibisi respon proliferative limfosit; (iii) aktivasi dan diferensiasi fibroblast menjadi *fibroblast associated cancer*; (iv) stimulasi proses angiogenik; (v) transisi epithelial menjadi mesenkimal (EMT) dan persiapan *premetastatic niche* pada lokasi yang jauh. (Roma-Rodrigues, Fernandes and Baptista, 2014)

Penelitian pada penderita kanker lambung ditemukan adanya eksosom dari serum penderita kanker tersebut. Pada eksosom tersebut ditemukan mensekresikan *epidermal growth factor reseptor* (EGFR), sedangkan pada orang normal EGFR tidak ditemukan. (Zhang *et al.*, 2017) Eksosom yang diisolasi dari supernatant sel tumor menginduksi pertumbuhan dan ekspansi sel T regulasi, sedangkan pada sel normal hal ini tidak terjadi. Eksosom juga memediasi konversi sel T CD4⁺CD25^{neg} menjadi CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg. (Szajnik *et al.*, 2010)

Eksosom yang dihasilkan oleh tumor memiliki efek pada lingkungan mikro tumor dengan memediasi terinduksinya *myeloid-derived suppressor cell* (MDSC) yang diketahui sebagai promotor progresi tumor dengan cara meregulasi penyortiran dan jumlah PGE2 dan TGF- β . (Xiang *et al.*, 2009) Sebaliknya, eksosom yang dihasilkan oleh sel dendritik dapat secara langsung membunuh sel tumor dan mengaktifkan sel NK melalui ligand superfamily TNF. Hal ini menunjukkan adanya potensi eksosom ini dapat digunakan sebagai salah satu cara dalam penatalaksanaan kanker. (Munich *et al.*, 2012)

II.5 Kanker Nasofaring dan Eksosom

Beberapa jenis eksosom telah diisolasi dari serum penderita kanker nasofaring, seperti *EBV-related exosome* dan eksosom yang dihasilkan oleh KNF yang sesungguhnya. Kedua eksosom ini mengandung bahan yang berbeda, sehingga peran mereka tentu berbeda dalam komunikasi lintas host-tumor dan modulasi respon imun, angiogenesis, proliferasi sel, komunikasi antar sel dan invasi tumor. (Wan *et al.*, 2018) Sebagai contoh, mikro RNA yang dihasilkan oleh *NPC-derived exosome* meregulasi ekspresi gen yang terlibat dalam proliferasi sel, diferensiasi dan respon stress. Sesungguhnya, eksosom yang berkaitan dengan KNF tidak hanya *NPC-derived exosome*, dapat juga *mesenchymal stem cell (MSC)-derived*

exosome dan *human EBV-transformed lymphoblastoid cell line (LCL)-derived exosome*. (Zhou *et al.*, 2018) Penelitian yang dilakukan oleh Ye *et al.* (2016), terdapat perbedaan yang signifikan antara eksosom dalam serum penderita kanker nasofaring dan orang sehat. Hal ini terlihat dari tingginya konsentrasi miR-24-3p pada eksosom dari serum penderita kanker nasofaring. (Ye *et al.*, 2016)

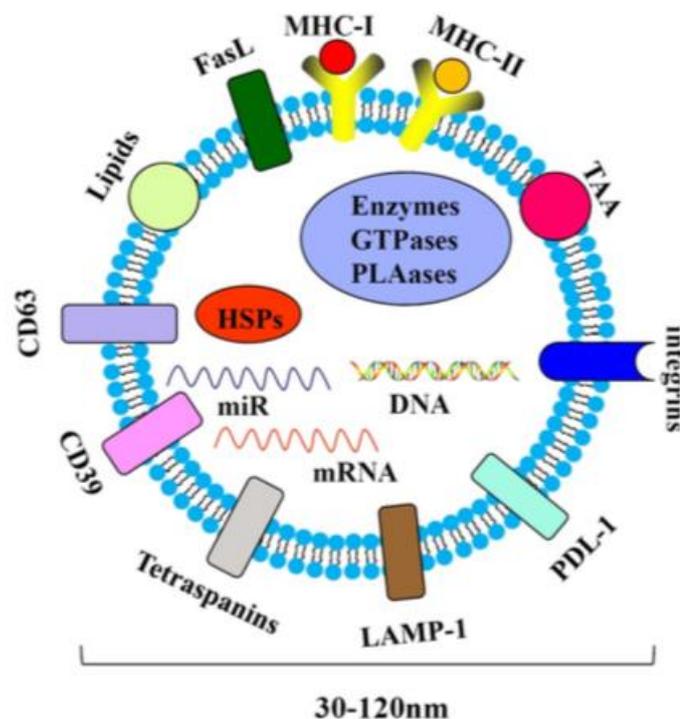
II.5.1. EBV-related eksosom

EBV merupakan gamma herpes virus yang utamanya patogen bagi manusia dan merupakan virus pertama yang diidentifikasi sebagai penyebab tumor pada KNF dan kanker lambung. (Zhou *et al.*, 2018) Eksosom pertama yang diidentifikasi mengandung protein virus berasal dari sel B yang telah terinfeksi oleh EBV. Eksosom dalam konteks komponen yang terinfeksi virus merupakan hal yang krusial dalam patogenesis dan dapat menginduksi toleransi imun lokal, terlibat dalam replikasi virus dan patogenesis terkait. (Gallo *et al.*, 2017) Eksosom yang dihasilkan oleh sel yang terinfeksi EBV dikenal dengan nama *EBV-related exosome* yang mengandung EBNA1, LMP-1, LMP2A, EBER dan BART yang dikode oleh EBV. *EBV-related exosome* dapat disekresikan dari berbagai tipe sel seperti sel EBV-positif KNF atau *EBV-transformed lymphoblastoid cell lines (LCL)*. (Gallo *et al.*, 2017) Selama proses infeksi EBV, *EBV-related exosome* mengaktifkan integrin, actin dan *nuclear factor kappa B (NF-κB)* untuk membantu virus bersembunyi dari respon imun host, hal ini menimbulkan lingkungan mikro yang baik bagi replikasi partikel virus dan tumorigenesis. Produk EBV yang seringkali terintegrasi, termasuk LMP2A, EBNA dan *non coding RNA* EBV, telah terdeteksi pada sel KNF yang terinfeksi EBV. (Zhou *et al.*, 2018)

II.5.2. Eksosom yang dihasilkan oleh KNF

Eksosom yang dihasilkan oleh tumor mengakibatkan supresi sistem imun tumor. Eksosom yang dihasilkan oleh KNF (KNF-ekso) membawa

marker molekuler seperti CD63, LMP-1, MHC klas I dan klas II, HSP70 dan mikro RNA. KNF-Ekso berada di lingkungan mikro tumor dan serum penderita KNF. Peranan KNF-ekso pada biologi tumor sangat kompleks. KNF-ekso mengandung antigen tumor yang dapat dipresentasikan kepada sel T sitotoksik (CTL) oleh APC untuk menghasilkan efek pembunuhan tumor; KNF-Ekso juga mempromosikan konversi CD4+/CD25- konvensional T sel (Tconv) menjadi Treg dan memacu kemoatraksi Treg melalui CCL20. (Ye *et al.*, 2014) Interaksi antara KNF-Ekso dan Treg mengatur tumor peripheral tolerans yang mengakibatkan sel tumor dapat bersembunyi dari pencarian sistem imun. (Mrizak *et al.*, 2015) KNF-Ekso dapat membangkitkan progresi tumor dan disfungsi sel T melalui penambahan mikroRNA eksosomal yang memodulasi jalur MAPK dan JAK/STAT. (Ye *et al.*, 2014)



Gambar II.7. Komponen-komponen KNF-Ekso (Zhou *et al.*, 2018)

Saat ini, miRNA 326 yang dihasilkan oleh KNF juga telah dideteksi pada KNF-Ekso dengan miRNA *chip microarray* analisis. Demikian juga miRNA 1511, 1686 dan 1229 telah dideteksi pada eksosom yang

dilepaskan oleh galur sel KNF TW03 (EBV+) dan TW 03 (EBV-) dan galur sel nasofaring normal NP69. Diantaranya, ada 5 miRNA yaitu miR-24-3p, miR-891a, miR106a-5p, miR-20a-5p dan miR-1908 yang paling sering ditemukan pada eksosom dari serum penderita, sel TW03 (EBV+) dan TW03 (EBV-). (Ye *et al.*, 2014) MiRNA kemungkinan berkontribusi pada komunikasi interseluler dan mempengaruhi fungsi sel tumor. Sebagai contoh, ekspresi target dari miR-24-3p pada KNF-Ekso menghambat proliferasi sel T dan diferensiasi sel T melalui fosforilasi protein ERK dan STAT melalui jalur MAPK. (Ye *et al.*, 2016)

Studi terbaru menunjukkan bahwa miR-20a-5p yang disekresikan oleh sel KNF yang radioresisten dan ditransfer ke sel KNF terdekat dengan cara eksosom mempromosikan radioresisten tersebut melalui represi Rab27B dengan targeting Rab27B 3'-UTR yang merupakan target miR-20a-5p terbaru. Sampai saat ini, banyak miRNA yang telah diketahui terlibat dalam patogenesis KNF melalui hubungan jejaring gen. (Huang *et al.*, 2017) Demikian juga dengan eksosom yang dihasilkan oleh stem sel mesenkimal diketahui meningkatkan progresi kanker nasofaring melalui aktivasi kaskade pensignal FGF-19/FGFR4/ERK. (Shi *et al.*, 2016)

II.5.3. Fungsi Eksosom pada kanker nasofaring

KNF eksosom yang berbeda dapat mengandung komponen yang berbeda, tetapi secara umum mereka mempromosikan pertumbuhan dan progresi tumor melalui mekanisme yang kompleks. Beberapa eksosom dapat menginduksi resistensi kanker terhadap kemoradiasi yang mengakibatkan terjadinya kegagalan pengobatan. Dengan demikian, eksosom sangat berpengaruh pada perkembangan, progresi dan prognosis KNF. Berikut beberapa efek eksosom pada KNF. (Zhou *et al.*, 2018)

1. Infeksi EBV dan *surveillance* imun

Infeksi EBV sangat terkait dengan perkembangan dan progresi KNF, tetapi masih perlu diklarifikasi bagaimana infeksi EBV dapat mendorong terjadinya tumorigenesis. Bukti baru menunjukkan

bahwa eksosom mungkin berperan penting sebagai mediator progress EBV-tumorigenik. Protein yang mengkode produk EBV dan fungsi host yang dibawa oleh eksosom dapat menginduksi persembunyian EBV dari supresi imun host dan dengan demikian dapat mempertahankan status infeksi. Eksosom yang disekresikan oleh LCL mengandung baik miRNA seluler viral maupun manusia, yang berkaitan dengan EBV. Studi terbaru menemukan bahwa semua miRNA EB-viral yang diekspresikan dalam LCL juga ada di dalam eksosom. Dari berbagai jenis miRNA ini, EBV-miR-BART3, EBV-miR-BHRF1-1, diekspresikan cukup tinggi pada eksosom yang dihasilkan oleh LCL. EBV-miR-BART3 dapat menginduksi sitokin IL-6 proinflammatory dan berimplikasi pada regulasi *system innate immunity host* melalui targeting importin-7 (IPO7) dan targeting caspase 3 exerting yang berefek anti-apoptosis untuk mempertahankan infeksi EBV. Kluster miRNA-BHRF1 tampak memiliki potensi kuat dalam mentransformasi sifat-sifat EBV dan utamanya telah ditemukan bahwa miR-BHRF1-1 berpotensi menimbulkan replikasi viral litik dengan cara menekan regulasi p53 pada sel KNF host, yang mengakibatkan adanya infeksi EBV yang persisten. Selanjutnya, resistensi apoptosis oleh eksosomal LMP-1 bersama-sama dengan sel Th1 apoptosis yang diinduksi oleh eksosomal galactose (galectin-9), merangsang sel KNF menghindari dari surveilans imun. Eksosomal dUTPase yang dikode oleh EBV menginduksi sel dendritik manusia, Th1 dan Th17 untuk mensekresikan sitokin dan merangsang terjadinya tumorigenesis dan inflamasi.

Eksosom yang mengandung miRNA virus dapat mempengaruhi lingkungan mikro sekitarnya seperti yang didemonstrasikan oleh miR-BART15 yang menghambat NLRP3 inflamasome pada sel yang tidak terinfeksi di sekitarnya. Eksosom yang dihasilkan oleh galur sel KNF TW03 dapat menghambat diferensiasi Th17 dan sel T

sitotoksik, lalu melemahkan sistem surveilans imun host. Singkatnya, eksosom dapat memediasi proliferasi sel T, diferensiasi dan sekresi sitokin dan menginduksi disfungsi sel T yang pada akhirnya mempertahankan infeksi laten EBV.

2. Komunikasi interseluler dan progresi karsinoma nasofaring

Eksosom kemungkinan besar berfungsi sebagai transportasi interseluler pensignal molekuler. Eksosom-eksosom seperti KNF-ekso memiliki kandungan protein, lemak, DNA dan RNA yang serupa. Molekul ini dapat berfungsi pada transduksi signal atau mengandung informasi genetik yang memediasi fungsi interaksi antar sel kanker dan lingkungan mikro tumor. Singkatnya, sitokin pada eksosom dilepaskan untuk berfungsi sebagai molekul autokrin atau parakrin untuk mempengaruhi sel parental atau sel target yang jauh. Signaling TGF- β dapat memediasi DNA, miRNA, mRNA, lemak dan protein yang dihasilkan oleh eksosom pada skuamous sel karsinoma termasuk KNF. T β RII ditemukan pada eksosom yang diisolasi lingkungan mikro tumor yang dapat ditransfer ke dalam sel KNF dan menstimulasi signaling TGF β yang tidak responsif kepada ligan TGF β . KNF-Ekso paling sering mentransfer miRNA berupa Let-7e, mir-15a, mir-186, mir-26b, mir-224, mir-31 dan mir-590. Mereka meregulasi ekspresi gen yang berkaitan pada perkembangan kanker, proliferasi dan diferensiasi sel, respon stress, memainkan peranan sebagai onkogenik, tumor-supresif atau kemo-resisten pada KNF. Ketidak seimbangan antara onkogenik dan supresif eksosomal miRNA memiliki efek terhadap perkembangan KNF.

Signal molekuler yang berhubungan dengan KNF eksosom dapat mengandung signal inhibitory yang menginduksi toleransi dan *escaping imun*, angiogenin dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang menstimulasi terjadinya angiogenesis dan sitokin serta faktor pertumbuhan yang menggagas divisi sel dan pertumbuhan tumor. Tentu saja KNF-ekso juga berfungsi pada presentasi antigen

spesifik tumor dan menginduksi respon imun anti-tumor. Seperti pedang bermata dua, eksosom pada respon sistem imun tumor merefleksikan stadium dari KNF yang akan menghasilkan protein dan asam amino yang berbeda. KNF-ekso juga berperan dalam metastasis.

3. Kemo-radioresisten

Angka kekambuhan KNF berkisar antara 15-58% setelah diberikan kemoradiasi primer, dan sensitivitas radioterapi dan kemoterapi mengalami penurunan pada kasus relaps. Dengan demikian resistensi kemoradiasi dan rekurensi KNF menjadi hal yang sangat penting bagi seorang klinisi. Mekanisme molekuler resistensi kemoradiasi cukup luas, termasuk *transporter pumps*, onkogen, tumor supresor gen, alterasi mitokondria, repair DNA, autofagi, *epithelial mesenchymal transition* (EMT) dan *stemness cancer*. Eksosom kemungkinan berkontribusi pada resistensi obat melalui transfer ke dalam protein sel kanker sensitif, miRNA dan lncRNA yang di tangkap oleh fenotif resisten. Kandungan eksosom yang dihasilkan oleh KNF-terasosiasi dengan fibroblast atau stem sel mesenkimal dapat ditransfer dari sel donor ke resipien, dan mengontrol jalur yang luas yang mempengaruhi resistensi obat dengan menghadirkan lingkungan mikro yang fertil dan menekan surveilan imun. MSC eksosom dapat menginduksi resistensi 5 FU dengan membuat antagonis 5 FU yang menginduksi apoptosis, mengaktifkan jalur CaM-Ks/Raf/MEK/ERk, dan mempromosikan ekspresi MDR, MRP dan LRP. Selanjutnya pada EBNA1 yang ada pada eksosom yang terakit EBV dapat menghambat miR-200a dan miR-200b dan selanjutnya memicu EMT dan resistensi obat. LMP-1 pada eksosom yang dihasilkan oleh infeksi EBV dapat mentriger jalur phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (P13K/AKT) untuk menstimulasi *stemness* dan resistensi kemoradiasi KNF.

4. Biomarker untuk diagnosis dan prognosis

Biopsi cair pada kanker akhir-akhir ini berkembang dengan pesat, eksosom dapat dideteksi pada serum, urin, semen, saliva, cairan amnion, cairan serebrospinal, empedu, asites, air mata, air susu dan darah. Eksosom-eksosom ini dihasilkan dari sel kanker dan dilepaskan ke dalam sirkulasi darah. Eksosom memiliki stabilitas yang tinggi selama 96 jam pada suhu 4 derajat. Sehingga eksosom yang berkaitan dengan KNF memiliki potensi dijadikan sebagai bahan biopsi cair sebagai biomarker noninvasif untuk deteksi dini, diagnosis dan monitoring pengobatan penderita KNF. Pada KNF, miRNA, khususnya EBV-BART-miRNA yang diekspresikan dalam eksosom yang berhubungan dengan KNF, tampak abnormal pada KNF-Ekso dan memegang peranan penting pada tumorigenesis. Faktanya, level EBV-DNA telah direkomendasikan sebagai faktor baru dalam prognosis KNF.

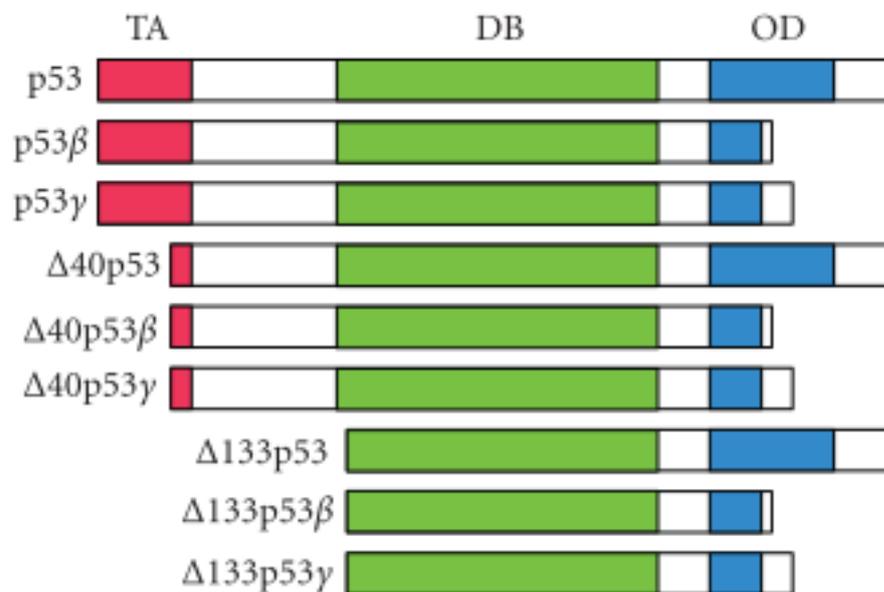
Dalam perkembangan KNF, sel tumor secara konstan melepaskan eksosom ke lingkungan sekitarnya. Pada penderita KNF, konsentrasi serum eksosom berhubungan positif dengan metabolisme sel KNF. Konsentrasi eksosom yang lebih tinggi pada metabolisme yang lebih aktif dan aktivitas fisiologis, menunjukkan adanya malignansi yang berat. Dengan demikian, konsentrasi eksosom pada serum penderita KNF berhubungan dengan metastasis limfonodi dan prognosis yang lebih jelek. Sebaliknya eksosom KNF yang mengandung tinggi kadar HLA-II, palectin-9 dan miR-24-3p merupakan indikator bagi prognosis KNF yang lebih baik.

II.6 Protein 53 (p53)

Protein 53 (*wild type*) adalah protein yang dikode oleh gen p53 (*tumor suppressor gen*), merupakan faktor transkripsi yang melekat pada sekuen DNA yang spesifik. Dalam keadaan normal p53 (*wild type*) mempunyai peran sentral dalam mengatur proses penting seperti

penghentian siklus sel (*cell cycle arrest*), perbaikan DNA, apoptosis dan penuaan sel (*senescence*). (Juan Liu *et al.*, 2019)

Protein 53 berlokasi pada lengan pendek kromosom 17p13 yang mengandung 11 ekson. Awalnya dianggap sebagai sebuah onkogen, tetapi belakangan diketahui bahwa p53 memiliki peran sentral pada supresi pertumbuhan kanker dengan mengatur program kematian sel. Ekspresi p53 endogen dipertahankan dalam kadar yang rendah agar dapat menyeimbangkan produksi dan degradasi protein. Telah diketahui pula bahwa p53 dapat diinduksi dengan cepat oleh adanya stresor seluler seperti kerusakan DNA. Terdapat berbagai bentuk varian p53, antara lain *wild type* p53 dan p53/47 seperti terlihat pada gambar di bawah ini. (Nakagawara and Ozaki, 2011)



Gambar II.8. Diagram skematik varian p53, TA: domain transaktivasi; DB: domain potongan spesifik *DNA-binding*; OD: domain oligomerisasi (Nakagawara and Ozaki, 2011)

Pada proses karsinogenesis, terjadi peningkatan aktivitas onkogen dan penurunan fungsi dari gen supresor tumor. Salah satu kunci gen supresor tumor adalah p53 yang dapat menginduksi terjadinya penghentian

pertumbuhan sementara dan perbaikan DNA, penghentian pertumbuhan yang ireversibel, penghentian diferensiasi, atau apoptosis sebagai respon terhadap stres seluler yang berpotensi onkogenik seperti akibat kerusakan DNA. (Sigal and Rotter, 2000)

Terdapat berbagai gen yang diidentifikasi sebagai p53-target gen, yaitu gen-gen yang berkaitan dengan proses penghentian siklus sel dan program kematian sel seperti p21^{WAF1} yang memiliki kemampuan untuk menekan pertumbuhan sel, p21^{CIP1} sebagai Cdk2- (cyclin-dependent kinase 2-) yang dapat menghambat fosforilasi pRB. Target gen lainnya adalah p21^{SD1} yang dapat menghambat sintesis DNA dan mempertahankan fenotif penuaan. P53R2 diinduksi sebagai respon terhadap kerusakan DNA dan menginduksi penghentian G2/M serta berkaitan langsung dengan perbaikan DNA yang rusak. MDM2 (*murine double minute 2*) mengontrol ekspresi p53 dalam keadaan rendah sehingga MDM2 berperan dalam sistem umpan balik negatif autoregulasi p53. BAX (Bcl2-associated X protein) merupakan gen responsif p53 menunjukkan efek negatif yang dominan terhadap prosurvival bcl2 melalui disregulasi permeabilitas membran luar mitokondria sehingga menginduksi pelepasan sitokrom c dari ruang antar membran mitokondria menuju ke sitosol. Gen lainnya yang mempengaruhi mitokondria adalah p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1), NOXA dan PUMA. (Nakagawara and Ozaki, 2011)

Sayangnya, sekitar 50% dari p53 mengalami mutasi pada penderita kanker. Sebagian besar dari mutasi ini merupakan *missense* akibat dari adanya mutan protein dengan panjang yang utuh. Salah satu tanda penting dari aktivitas onkogenik mutan p53 adalah kemampuan mereka dalam mengganggu apoptosis yang bergantung p53 maupun yang tidak bergantung apoptosis dengan cara mendominasi mekanisme negatif yang melibatkan transaktivasi. Mekanisme yang paling umum diterima dibalik mutan p53 yang mengakibatkan supresi trans-dominan adalah *shutdown* fungsi *wild type* p53 akibat heteromerisasi dengan mutan p53. *Wild type* p53 membentuk tetramer yang mengakibatkan aktivitas supresi tumor

sedangkan oligomerisasi yang di mediasi oleh region oligomerisasi merupakan domain utama mutan p53. (Sigal and Rotter, 2000)

Pada penderita kanker nasofaring berdasarkan penelitian di Indonesia pada tahun 2000 menemukan terjadinya overekspresi p53 dengan pemeriksaan imunohistokimia, yaitu sebesar 79% (38 dari 48 kasus).(Kurniawan and Leong, 2000) Pada penelitian yang dilakukan oleh Effert dkk (1992), menemukan berbagai macam mutasi dari p53 pada kanker nasofaring. Data lengkapnya terlihat pada gambar di bawah ini. (Effert *et al.*, 1992)

Tabel II.1. Mutasi p53 pada kanker nasofaring (Effert *et al.*, 1992)

KNF	Karakteristik
C17	Delesi untuk 2,9 kb
C18	Delesi kodon 154, duplikasi kodon 149 sampai 154
C19	Delesi sekuen 5' ke ekson 5
NM19	Kodon 210 sampai 216, mutasi pada beberapa titik; kodon 234, TAC ke TGC (Tyr ke Cys)
CNE-1	Kodon 280, AGA ke ACA (Arg ke Thr)
CNE-2	Kodon 280, AGA ke ACA (Arg ke Thr)
AIL	Kodon 196, CGA ke TGA (Arg ke terminasi)
N18	Kodon 138, GCC ke GC (<i>frame</i> pergeseran delesi)

Pada KNF terjadi inaktivasi gen p53 (*wild type*) yang menyebabkan terbentuknya p53 mutan. Gen p53 mutan menyebabkan peningkatan gen penghambat apoptosis yang berakibat sel menjadi lebih resisten terhadap radioterapi. (Yusuf *et al.*, 2018)

Tumor suppression-activated pathway 6 (TSAP 6) yang merupakan salah satu gen target p53, secara genetik pertama kali dibuktikan oleh Lespagnol A dkk (2008), bahwa sekresi eksosom dikendalikan oleh TSAP 6 akibat respon terhadap adanya kerusakan DNA (seperti oleh akibat radiasi) dan aktivasi p53. Pada laporan tersebut juga menemukan aktivasi p53 oleh kerusakan DNA akan menimbulkan peningkatan sekresi

eksosom.(Lespagnol *et al.*, 2008)

Penelitian yang dilakukan oleh Burdakov dkk (2018) menemukan bahwa di dalam eksosom yang diperoleh dari plasma manusia ditemukan *wild type* p53. Eksosom yang mengandung WTP53 ini dapat ditransfer ke sel lainnya termasuk ke sel yang mengandung sedikit p53 (galur sel tumor). Pada penelitian ini juga dibuktikan bahwa p53 endogen ini dapat menekan pertumbuhan dan proliferasi sel tumor. (Burdakov *et al.*, 2018)

Penelitian pada kanker kolon menemukan bahwa p53 mutan yang singgah di sel kanker tersebut secara selektif melepaskan eksosom yang mengandung miRNA-1246. *Uptake* eksosom ini oleh sel makrofag yang berada di dekat sel kanker akan memicu pemerograman ulang miRNA-1246 menjadi keadaan yang mempromosikan kanker.(Cooks *et al.*, 2018)

II.7 Diagnosis KNF

Diagnosis KNF ditegakkan berdasarkan keluhan yang dirasakan penderita, gejala klinis yang khas, ditambah pemeriksaan penunjang seperti CT scan atau MRI dan pemeriksaan histopatologi dari hasil biopsi pada nasofaring dan beberapa pemeriksaan serologis lainnya sebagai penanda adanya virus Epstein Barr. Panduan dalam penegakan diagnosis dapat berpatokan pada komite penanggulangan kanker nasional tahun 2017 (dapat dilihat pada gambar 8 tentang pedoman alur penegakan diagnosis di bawah) atau dapat juga menggunakan pedoman *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) versi tahun 2018. (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2017), (NCCN, 2018)

II.7.1. Keluhan penderita dan gejala klinis

Keluhan dan gejala klinis menurut Wei dan Sham (2005) yang dikutip

Adham (2018) dibagi menjadi 4 kategori, 1) gejala yang timbul akibat adanya massa di nasofaring seperti epistaksis, hidung tersumbat dan pilek; 2) gejala yang ditimbulkan oleh terganggunya fungsi tuba eustachius seperti adanya gangguan pendengaran; 3) gejala yang timbul akibat ekstensi tumor ke arah superior seperti sakit kepala, diplopia, nyeri dan rasa kebas pada wajah; dan 4) adanya massa pada leher. (Adham, 2018)

Pada stadium awal (1 dan 2), massa pada leher mungkin tidak terlihat sedangkan pada stadium lanjut (3 dan 4) pasti sudah ditemukan adanya pembesaran pada kelenjar leher. Hal ini sesuai dengan sistem staging pada AJCC tahun 2017 yang diperbaharui pada tahun 2018. (AJCC, 2018)

II.7.2. Pemeriksaan radiologis dan pemeriksaan endoskopi

Pemeriksaan radiologis penting dilakukan untuk menentukan lokasi tumor primer dan menentukan keterlibatan kelenjar regional serta untuk menentukan perluasan tumor ke daerah sekitarnya. Pemeriksaan radiologis yang dianjurkan adalah dengan menggunakan CT Scan atau MRI. Penggunaan kontras akan lebih memperjelas gambaran tumor terutama pada stadium awal atau untuk melihat adanya metastasis ke organ lain seperti otak. Berdasarkan hal tersebut, pemeriksaan radiologis sangat menentukan dalam penentuan stadium KNF. (Adham, 2018)

Pemeriksaan endoskopi penting dilakukan karena dapat melihat adanya perubahan struktur pada nasofaring secara langsung. Teknologi endoskopi semakin berkembang akhir-akhir ini, pada awalnya hanya endoskopi kaku dengan berbagai sudut yang tersedia tetapi saat ini endoskopi fleksibel sudah banyak digunakan di sentra pelayanan kesehatan di Indonesia. Hal ini dapat memudahkan dokter dalam melakukan pemeriksaan karena penderita merasa lebih nyaman dengan endoskopi fleksibel. Penggunaan teknologi endoskopi dengan *narrow band imaging* ditemukan secara signifikan membantu membedakan daerah

tumor yang akan dibiopsi dengan daerah sekitarnya yang tidak mengandung sel tumor sehingga ketepatan diagnosis menjadi lebih tinggi dengan metode tersebut. (Herdini, 2018) Suwondo dkk (2018) menemukan sensitivitas dan spesifisitas *narrow band imaging* pada diagnosis KNF berturut-turut sebesar 95,7% dan 42,9%, sedangkan positive predictive value dan negative predictive value nya masing-masing sebesar 64,7% dan 90% serta akurasi sebesar 70%. (Suwondo, Surarso and Kristyono, 2018)

II.7.3. Pemeriksaan histopatologi

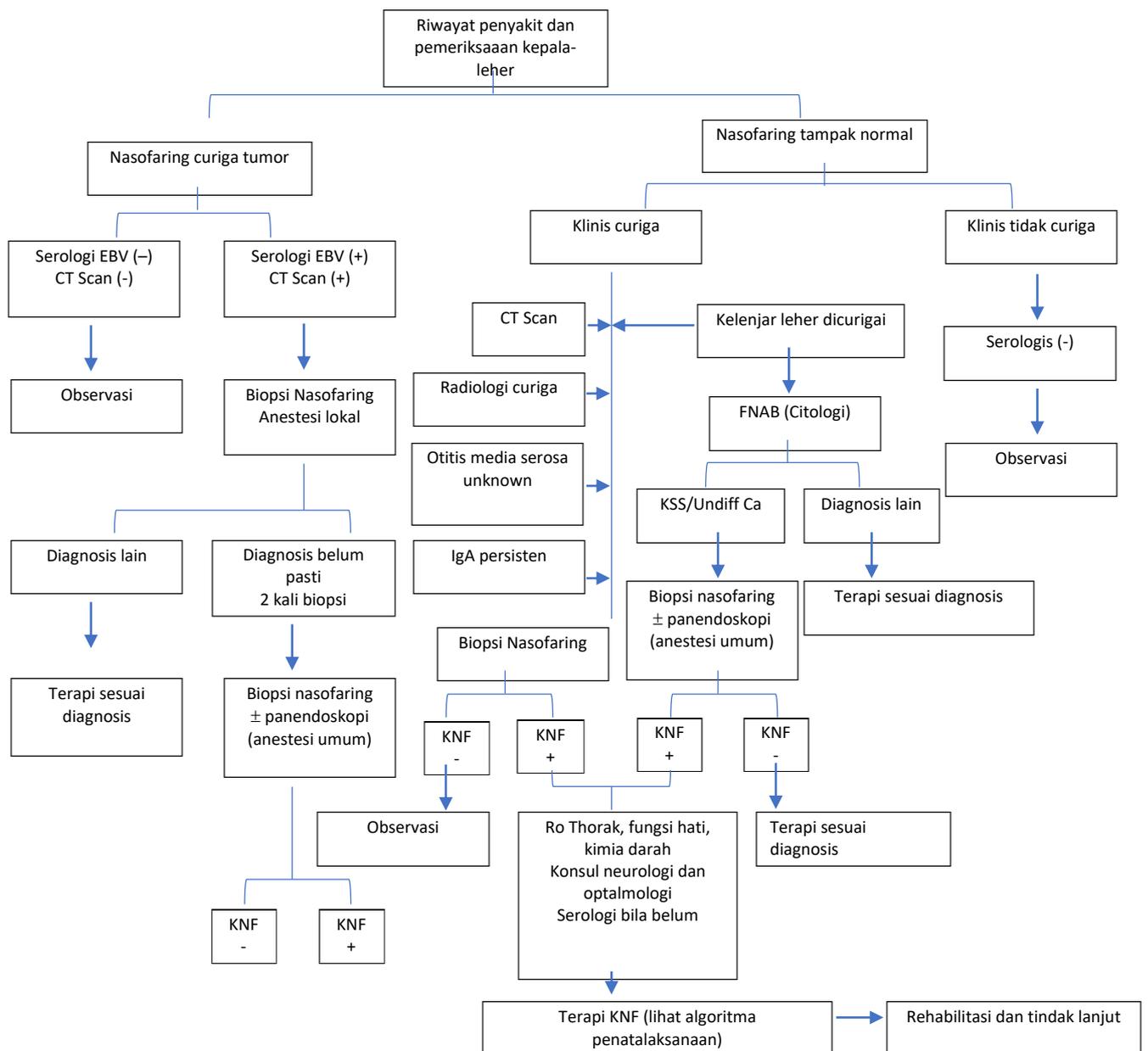
Pemeriksaan histopatologi merupakan pemeriksaan standar baku dalam penegakan diagnosis KNF. Sediaan histopatologi sedapat mungkin diambil dari dalam nasofaring. Biopsi dapat dilakukan di ruang rawat jalan dengan anestesi lokal atau dapat juga di ruang operasi dengan anestesi umum. Biopsi sebaiknya dilakukan dengan panduan endoskopi baik yang kaku maupun fleksibel. Biopsi pada kelenjar leher sebaiknya dihindari karena berpotensi menimbulkan mikro metastasis. (Kadriyan, 2018)

Berdasarkan klasifikasi WHO, KNF secara histologi dibagi menjadi 3 tipe yaitu tipe 1 atau karsinoma sel skuamosa berkeratin, tipe 2 atau karsinoma sel skuamosa tidak berkeratin dan tipe 3 atau karsinoma sel skuamosa tidak berdiferensiasi. Tipe histopatologi ini berkaitan dengan respon terapi, WHO tipe 3 memiliki prognosis paling baik dengan kemoradiasi dibandingkan tipe lainnya yang ditunjukkan oleh tingginya angka kontrol lokal tumor pada tipe tersebut. (Adham, 2018), (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2017)

II.7.4. Pemeriksaan serologis

Pemeriksaan serologis terhadap adanya EBV merupakan hal yang mendukung diagnosis pada penderita kanker nasofaring, dengan demikian, diagnosis KNF tidak dapat ditegakkan hanya dengan pemeriksaan serologis terhadap EBV. Terdapat beberapa pemeriksaan serologis yang

mendukung diagnosis KNF seperti LMP-1, IgA anti VCA, IgA anti EA dan EBNA1. Penggunaan pemeriksaan serologis penting untuk diagnosis dini kanker nasofaring. Penelitian di Cina menunjukkan bahwa penggunaan tes serologis dapat memperkirakan penderita tersebut menderita kanker nasofaring dengan adanya titer IgA anti VCA yang tinggi. (Adham, 2018)



Gambar II.9. Pedoman alur penegakan diagnosis KNF (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2017)

Penentuan stadium KNF berdasarkan klasifikasi TNM oleh AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) edisi VII (2018) adalah :

T menggambarkan keadaan tumor primer, besar dan perluasannya

T1 : Tumor pada nasofaring, orofarings, atau kavum nasi

T2 : Tumor meluas ke parafarings

T3 : Invasi ke struktur tulang atau sinus paranasal

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

N menggambarkan keadaan kelenjar limfe regional

N0 : Tidak ada pembesaran kelenjar

N1 : Terdapat pembesaran kelenjar limfe leher unilateral atau uni/bilateral retrofaringeal, ≤ 6 cm, di atas tepi bawah kartilago krikoid

N2 : Terdapat pembesaran kelenjar limfe leher bilateral, ≤ 6 cm, di atas tepi bawah kartilago krikoid

N3 : Terdapat pembesaran kelenjar leher uni/bilateral > 6 cm, atau pembesaran kelenjar dengan pembesaran melewati tepi bawah krikoid

M menggambarkan metastasis jauh

M0 : Tidak ada metastasis jauh

M1 : Terdapat metastasis jauh

Pembagian stadium untuk KNF adalah: stadium 0 (Tis N0 M0), stadium I (T1 N0 M0), stadium II (T0,T1 N1 M0, T2 N0,N1 M0), stadium III (T0,T1,T2 N2 M0, T3 N0,N1,N2 M0), Stadium IVA (T4 N0,N1,N2 M0, semua T N3 M0), stadium IVB (semua T, semua N M1). (AJCC, 2018)

II.8 Penatalaksanaan KNF

Penatalaksanaan utama pada KNF adalah dengan menggunakan radioterapi. Berdasarkan pedoman penatalaksanaan kanker nasofaring yang dikeluarkan oleh Komite Nasional Penganggulangan Kanker tahun 2017, bahwa semua stadium kanker nasofaring dilakukan radioterapi, tetapi

untuk stadium lanjut harus dikombinasi dengan kemoterapi seperti terlihat pada gambar II.9. (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2017), (NCCN, 2018)

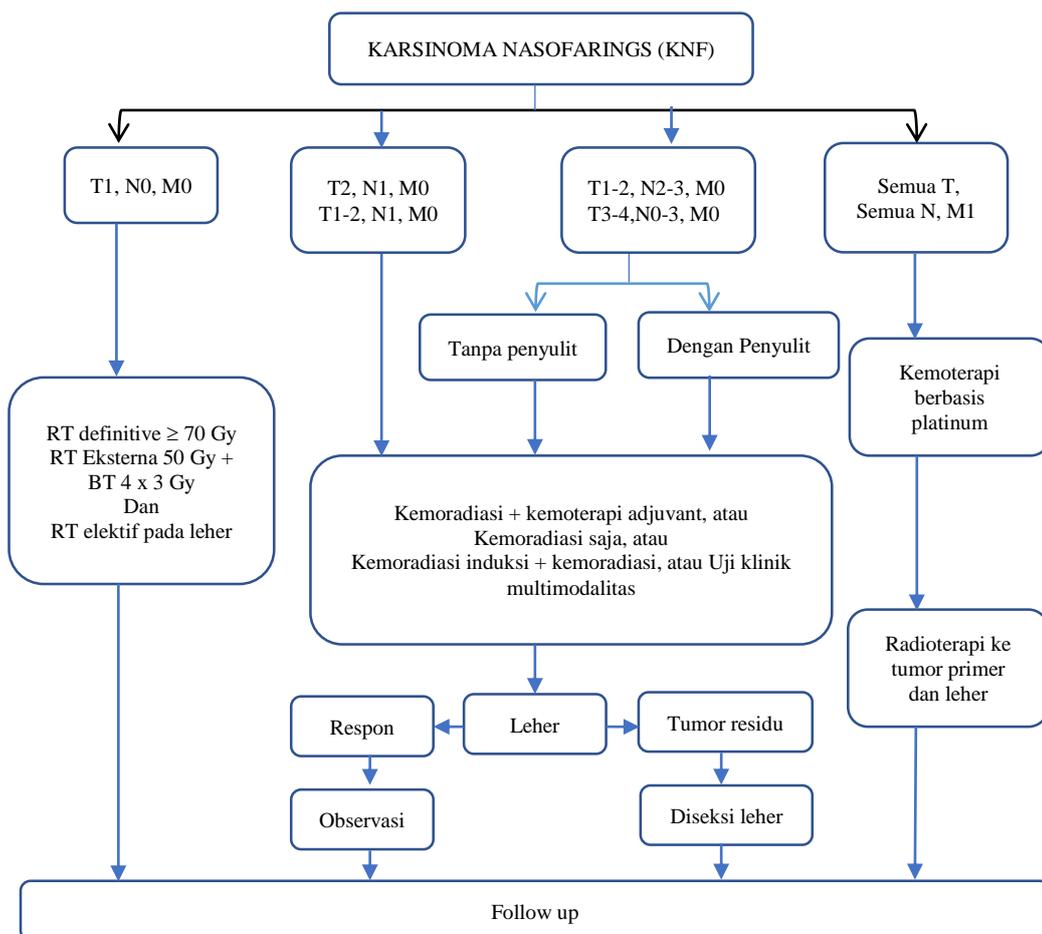
Saat ini radioterapi dengan *intensity modulated radiotherapy* (IMRT) merupakan pilihan utama dalam penatalaksanaan KNF. Hal ini disebabkan oleh terdapatnya berbagai keuntungan dibandingkan radioterapi konvensional. Berdasarkan studi acak tersamar, IMRT tampak secara signifikan mengurangi resiko xerostomia permanen, peningkatan kontrol lokal dengan penurunan komplikasi pengobatan pada stadium awal. (Lee *et al.*, 2015) Di Indonesia, alat radioterapi masih menjadi permasalahan, sebagai contoh di Jogjakarta, alat radioterapi jumlahnya terbatas dan sering mengalami masalah teknis sehingga mengakibatkan waktu tunggu yang cukup panjang (3-4 bulan) dari awal diagnosis sampai dimulainya radioterapi. Hal ini akan berakibat pada angka keberhasilan terapi yang salah satunya dapat dilihat dari angka harapan hidup penderita. (Stoker *et al.*, 2014)

Pada stadium lanjut (stadium III dan IV), kemo-radioterapi merupakan pilihan terbaik, sebab berdasarkan beberapa penelitian menunjukkan bahwa kombinasi kemoterapi dan radioterapi memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan hanya radioterapi saja. Regimen kemoterapi pilihan untuk KNF adalah dengan menggunakan cisplatin, yang dapat saja dikombinasi dengan 5FU atau golongan taxane. Kombinasi kemoterapi dan radioterapi menghasilkan peningkatan overall survival rate sebesar 6% untuk angka ketahanan hidup 5 tahun dan 8% untuk angka ketahanan hidup 10 tahun. (Lee *et al.*, 2015)

Beberapa tahun terakhir ini penggunaan obat-obat terapi target mulai banyak di ujicoba seperti anti EGFR dan anti VEGF yang dapat diberikan sebagai adjuvant bagi kemo-radiasi. Beberapa regimen terapi target yang tersedia saat ini seperti setuksimab dan nemutuzinab. Peng dkk (2018) pada pasien KNF stadium lanjut mendapatkan hasil yang berbeda bermakna antara penderita yang diberikan setuksimab atau nemutuzinab

dan tanpa obat tersebut, untuk *free survival rate*, *overall survival* dan *distance metastase free survival* dengan perbandingan berturut-turut sebagai berikut 84,3% berbanding 74,3% (p:0,027), 94,0% berbanding 92,1% (p:0,67) dan 88% berbanding 81% (p:0,147). (Peng *et al.*, 2018)

Fotodinamik terapi telah diaplikasikan di Jogjakarta, Indonesia baik untuk kasus-kasus yang residif maupun rekuren. Hasilnya menunjukkan angka harapan hidup selama 5 tahun meningkat menjadi 65,7% dibandingkan yang tidak mendapat fotodinamik terapi yang hanya 22,9%. Pada penelitian tersebut juga ditemukan peningkatan IL-2, IL-12 dan IL-18 sedangkan IFN γ mengalami penurunan. Hal ini sejalan dengan perbaikan klinis yang dialami oleh penderita. (Indrasari *et al.*, 2016)



Gambar II.10. Pedoman alur penatalaksanaan KNF (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2017)

Brakiterapi dapat juga dilakukan untuk kasus kanker nasofaring yang rekuren. Brakiterapi merupakan radioterapi internal atau intrakaviter sedangkan radioterapi konvensional dan IMRT merupakan radioterapi eksternal. Yan dkk (2017) membandingkan hasil brakiterapi dan IMRT pada pasien KNF yang mengalami rekurensi, hasilnya menunjukkan hasil terapi yang hampir sama, tetapi kualitas hidup penderita yang dilakukan brakiterapi lebih baik secara signifikan dibandingkan penderita yang mendapat IMRT. (Yan *et al.*, 2017)