



Karsinoma Nasopharynx dan infeksi EBV di Indonesia; analisis aspek klinis, Patologi dan Biomolekular

Nasopharynx Carcinoma and EBV infection in Indonesia; analysis on the Clinical, Pathology and Biomolecular aspects

Harianto Notopuro¹, Widodo A Kentjono², Retno Handajani¹, Paulus B Notopuro³

¹Department of Biochemistry, School of Medicine and Tropical Disease Centre Airlangga University, Surabaya.

²Department of Ear, Nose and Throat, School of Medicine, Airlangga University and Dr Soetomo Hospital, Surabaya.

³Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Airlangga University and Dr Soetomo Hospital, Surabaya.

KEYWORDS *EBV; HPV; LMP-1 DNA; PCR; Nasopharynx Carcinoma*

ABSTRACT *Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a unique epithelial malignancy that occurs at a high frequency in certain regions of Southeast Asia. Previous study revealed the association between Epstein Barr Virus (EBV) and to a lesser extent, Human Papilloma Virus (HPV) with NPC. The role of the EBV in the pathogenesis of NPC was further supported by the recovery response of the tumor cells after being treated with EBV-specific T lymphocytes. The present study aims to determine the frequency distribution of EBV infection among the pathologically confirmed NPC patients and healthy control in Surabaya, Indonesia. The presence of Human Papilloma Virus infection (HPV) was also analysed.*

The results indicated that EBV DNA existed in the 88% of the nasopharyngeal tissue biopsies of 25 NPC patients and none in the 10 healthy controls, and the difference was statistically significant. Analysis of the mononuclear cells of peripheral blood revealed that 60% of the 25 NPC patients carried EBV DNA whereas in control group 20% was found to be positive and the difference was statistically significant. Although a high positive rate EBV-DNA was detected in NPC patients, additional environmental and genetic factors must still be considered. Nevertheless, no HPV-DNA was detected from mononuclear cells of peripheral blood and nasopharyngeal tissue of the two groups. By this study there was no coexistence between the infection of EBV and HPV which promote carcinogenesis in NPC. Analysis using LMP1-DNA in tumor cell biopsies indicated that 72% of the NPC patients yielded PCR products and none of the healthy control, the difference was statistically significant.

In conclusion the findings confirm the tight association between the EBV and NPC in Indonesia and that the specific presence of LMP1-DNAs in the tumor cells strongly indicates the important role of EBV in the pathogenesis of NPC. Coexistence of EBV and HPV infections was not found in NPC cases in Indonesia.

Sel kanker berproliferasi dengan tidak terkendali dan mampu menginvasi dan bermetastasis ke jaringan sekitarnya dan organ-organ vital lain. Sel normal setelah mengalami sejumlah mutasi somatik yang dipengaruhi oleh beberapa faktor a.l: faktor predisposisi genetik, faktor lingkungan misalnya kontak dengan bahan-bahan karsinogen, sehingga terjadi perubahan menjadi ganas. Proses ini dipicu dengan melibatkan agen kimia, fisik dan virus yang dapat mempengaruhi aktivitas onkogen dan anti-onkogen.

Nasopharynx Ca(NPC) merupakan salah satu tumor ganas pada laki-laki yang paling sering di Cina Selatan, Eskimo dan beberapa tempat di Afrika. NPC terjadi pada sel epitel saluran pernafasan atas, dimana etiopatologi penyakit ini dicurigai disebabkan oleh infeksi virus Ebstein Barr.

Correspondence:

Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr. MS., Department of Biochemistry, School of Medicine and Tropical Disease Centre Airlangga University Surabaya, Jalan Klampis Anom III/14, Surabaya 60117

Virus Epstein Barr (EBV) pertama kali di ketemukan pada 1964 oleh Epstein dan Barr pada biakan sel Lymfoma Burkitt dan diklasifikasikan sebagai anggota famili virus Herpes (Gaffey *et al.*, 1992). EBV dapat ber-replikasi pada sel epithel oropharynx dan kelenjar Parotis, kemudian menyebar lewat ludah dan menular melalui berciuman. Melalui tempat replikasinya di oropharynx, EBV dapat menginfeksi limfosit B yang im-mortal, sebagai virus latent pada sel ini, menetap pada penderita yang terinfeksi tanpa menyebabkan suatu penyakit yang berarti. Virus Epstein Barr (EBV) merupakan salah satu virus DNA yang onkogenik, sering berhubungan dengan Nasopharynx Ca (NPC), Limfoma Burkitt, penyakit Hodgkin dan infectious mononucleosa (Kieff, 1996). Penyebaran, NPC dipengaruhi oleh geografi, diketemukan dengan angka insidens rendah di Eropah, Amerika Utara, Jepang dan India. NPC diketemukan dengan angka insidens yang tinggi di Cina Selatan, Hongkong, Alaska dan Greenland (Muir, 1971; Lanier *et al.*, 1980), dengan angka insidens yang sedang di Cina Utara, Afrika Utara dan Asia Tenggara (Muir *et al.*, 1987). Di Indonesia, NPC merupakan kanker ke 5 dari 10 jenis kanker yang paling sering pada laki-laki dan wanita (1999) dan merupakan 5,78% dari semua jenis kanker.

Telah lama terbukti bahwa infeksi EBV mempunyai hubungan erat dan kuat dengan NPC dan beberapa petanda serologis menambah informasi tentang hubungan EBV dengan NPC, tetapi bagaimana patogenesis molekuler yang langsung diantara mereka tidak dapat dijelaskan tanpa pemeriksaan analisis DNA EBV. Untuk menjawab ini diperlukan pemeriksaan PCR EBV pada jaringan tumor NPC dan darah tepi penderita, dihubungkan dengan *staging* tumor, *staging* kelenjar getah bening dan petanda serologis IgG dan IgA EBV. Primer yang dipakai untuk mengamplifikasi (PCR) daerah conserved yang menyandi protein capsid (gp 220), daerah L Bam HI (Telenti *et al.*, 1990; Bahnassy *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2004). Latent membran protein 1 (LMP1) adalah suatu membran protein integral tipe III pada EBV, yang terdiri dari 23 asam amino dengan ujung amino kearah sisi sitoplasma, dan 6 asam amino bagian transmembran dan 200 asam amino ujung karboksil. LMP1 dapat dideteksi pada 65% biopsi jaringan NPC dan dilaporkan berhubungan dengan NPC. LMP1 disandi oleh gen BNLF1. Infeksi EBV akan memicu transformasi limfosit B dan fibroblast tikus dan menghambat proses apoptosis (Yong *et al.*, 1988; Liebowitz *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1990). Perhatian khusus pada varian delesi LMP1,

yang mula-mula diketemukan pada penderita undifferentiated NPC di Cina, dimana didapatkan delesi 30 bp pada kodon 343-352 B95-8 LMP1, bersamaan dengan mutasi titik pada daerah hot spot (Chen *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1991; Knecht *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1993; Macdiarmid *et al.*, 2003; Ping *et al.*, 2004). Pada penelitian kami akan diteliti insidens EBV, karakterisasi sekwens LMP1, ada /tidaknya delesi 30 bp dan bila tidak ada delesi LMP1, apakah ada mutasi lain disekwens ini.

Virus human papilloma (HPV) merupakan anggota dari famili papovirus, sampai saat ini lebih dari 85 type HPV telah diidentifikasi berdasarkan urutan DNA yang berasal dari biopsi jaringan. HPV yang menginfeksi daerah anogenital dapat dibagi menjadi 3 golongan berdasarkan sifat klinis mereka, golongan resiko rendah dan resiko sedang yaitu HPV 6/11 dan HPV 31/33, pada umumnya berhubungan dengan kutil jinak pada anogenital atau papilloma laryngeal, yang jarang berkembang menjadi kanker (Turazza *et al.*, 1997). Sebaliknya, kelompok resiko tinggi yaitu HPV 16 dan 18 berhubungan dengan kelainan yang mempunyai resiko tinggi untuk menjadi ganas, a.l Cervix Ca. Sampai dengan 90% Cervix Ca invasif berhubungan erat dengan DNA-HPV, sampai saat ini hanya beberapa laporan yang menghubungkan HPV dengan carcinoma non anogenital, khususnya Ca pada kepala dan leher (Gismann *et al.*, 1983). Pada larynx, infeksi HPV (biasanya HPV 6 dan 11) diketahui menyebabkan juvenile papillomatosis dan pada beberapa kasus adult papillomatosis (Mount & Kashima, 1982; Tsutsumi *et al.*, 1989). Akhir-akhir ini beberapa laporan menunjukkan bahwa HPV 16 dan HPV 18 diketemukan pada penderita dengan Ca telinga bagian tengah, Ca Larynx. Meskipun demikian bagaimana patogenesis HPV sebagai penyebab tumor ganas pada daerah kepala dan leher masih belum jelas.

Yang menarik, ada beberapa kesamaan antara infeksi EBV dan HPV, dimana keduanya merupakan agen infeksi virus DNA yang umumnya menetap (dormant) setelah infeksi primer dan keduanya pada saat tertentu akan melepaskan partikel virus pada fase latent, yang terpenting keduanya EBV dan HPV dapat memicu proses karsinogenesis pada beberapa carcinoma epithel (Raab *et al.*, 1989; Rassekh *et al.*, 1998). NPC berkembang dari fokus-primer khususnya bagian nasopharynx yang kaya infiltrasi sel-sel limfosit dan diketemukannya EBV DNA atau kompleks EBNA pada sel epithel NPC. World Health Organization (WHO) mengklasifikasikan NPC berdasarkan derajat diferensiasinya menjadi: WHO-1: Keratinizing squamous cell

carcinoma (10%) adalah terdiferensiasi tinggi dengan gambaran per-tumbuhan epitel dan filamen keratin; WHO-2: Non keratinizing carcinoma (5%) yang masih menunjuk-kan gambaran pertumbuhan sel epitel dan WHO-3 (85%): Undifferentiated carcinoma (UNPC) dimana tidak terlihat lagi keratin dan pertumbuhan sel epitel yg tidak teratur. Penderita dengan Ca WHO-2 dan WHO-3 disertai dengan peningkatan kadar IgG dan IgA terhadap VCA dan EA sedangkan pada pen-derita Ca WHO-1 menunjukkan kadar igG dan IgA terhadap EBV hampir sama dengan kontrol normal.

Yang menarik insidens NPC diantara populasi India dan Cina yang tinggal di Singapura, dimana kedua populasi ini bersama-sama terpapar dengan infeksi EBV pada umur sekitar 6-9 tahun. Walaupun kedua populasi ini tinggal ditempat yang hampir sama di Singapura, tetapi insidens NPC tetap tinggi pada populasi Cina, sampai pada generasi kedua yang tinggal di daerah lain yang non endemis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa adanya pengaruh lingkungan sebagai ko-faktor selain faktor genetik yaitu kebudayaan/kebiasaan dan diet pada proses perkembangan NPC ini.

Penelitian terdahulu membuktikan bahwa ada hubungan yang kuat antara penderita NPC dengan riwayat sering mengalami gangguan hidung, pemakaian obat-obatan tradisional Cina, pemakaian obat nyamuk bakar koil, minyak gosok hidung. Adanya kandungan senyawa ester phorbol mungkin dapat mengaktivasi virus EBV atau memicu proliferasi virus didalam sel epitel pernafasan. Di Malaysia, Hongkong dan provinsi Guangxi (Cina) konsumsi ikan asin sejak mulai masa anak-anak, mempunyai potensi memicu perkembangan NPC. Adanya senyawa nitrosamine dan prazatnya (NDMA=N-nitrosodimethylamine) merupakan yang dapat merangsang mutasi DNA pada jaringan nasopharynx (Ho., 1972; Zheng *et al.*, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk (i) mengetahui insidens infeksi EBV dan HPV masing-masing atau secara bersamaan (koeksistensi) sebagai penyebab NPC, (ii) mengetahui karakterisasi EBV, tipe delesi segmen LMP1, adanya mutasi lain pada segmen ini dan (iii) mengetahui karakterisasi HPV strain 16 dan 18. Manfaat penelitian ini untuk memahami dasar etiopatologi molekular infeksi EBV dan HPV masing-masing atau bersama-sama (koeksistensi) sebagai penyebab NPC dan upaya pengurangan insidens NPC, yang hanya dapat dilakukan dengan deteksi dini infeksi EBV dan HPV, karakterisasi masing-masing virus untuk persiapan bentuk vaksin dalam

usaha pencegahan infeksi EBV dan HPV yang potensial karsinogenik.

BAHAN DAN CARA KERJA

- a. Sampel: sampel diambil dari penderita yang datang berobat di Poli THT RS Dr Sutomo-Surabaya, meliputi penderita NPC dengan berbagai stadium (kriteria WHO 1987), sebanyak 25 orang dan penderita normal sebanyak 10 orang, pada kedua kelompok tsb dilakukan pengambilan darah vena sebanyak 10 ml (untuk PCR) dan biopsi jaringan NPC (untuk analisis DNA). Ditanyakan juga jenis ras dan suku bangsa pada kedua kelompok sample Kedua kelompok sampel dimintakan persetujuan inform consent dan panitya ethical clearance.

Kriteria inklusi:

Penderita NPC: semua penderita NPC yang datang berobat di Poli THT RS Dr Sutomo, berumur 20-60 tahun, tidak ada tumor lain selain NPC.

Normal: semua penderita yang datang berobat di Poli THT RS Dr Sutomo dan, berumur 20-60 th, sehat, dan tidak ada tumor di jaringan lain.

- b. **Prosedur pelaksanaan:**

- c.1. Ekstraksi DNA EBV & HPV dari jaringan NPC penderita dan jaringan nasopharynx normal di garis tengah (midline). Jaringan biopsi nasopharynx (dalam tabung eppendorf), dicernakan dengan 300 ul buffer lisis (0,01 M Tris HCl, 0,1 M NaCl, 0,001 M EDTA, 1% SDS dan 200 ug Proteinase-K) inkubasikan selama 3 jam pada 65oC.

DNA di ekstraksi dengan metoda fenol-kloroform-amonium oksalat-etanol absolut dingin (Tung *et al.*, 1999).

- c.2. Ekstraksi DNA EBV & HPV dari darah tepi penderita NPC dan normal. Pada 7 ml darah vena (dengan antikoagulan EDTA) di sentrifuge, pisahkan plasma. Diambil lapisan atas endapan sel darah (buffy coat) yang mengandung sel lekosit PMN dan mononuclear sel. Pada sediaan sel ini di tambahkan buffer lisis dan proteinase K, inkubasikan pada 45oC selama 3 jam. Dilakukan ekstraksi DNA dengan prosedur fenol-kloroform-amonium oksalat-etanol dingin (Tung *et al.*, 1999).

- c.3. PCR untuk EBV:

Pada genomik DNA 0,25 ug dtambahkan campuran PCR (12,5 pmol primer 1 dan 2 ; 200 uM masing-masing dNTP; 1uI Taq DNA

polymerase (Promega); 10x buffer PCR; 10 uM Tris HCl dan 50 uM KCl).

Primer yang dipergunakan sesuai dengan daerah conserved genoma EBV yang menjadi protein capsid gp 220 (Bam HI L region).

P1= 5'-GGC- TGG- TGT- CAC- CTG- TGT- TA- 3' (20 mer).

P2= 5'-CCT- TAG- GAG- GAA- CAA- GTC- CC- 3' (20 mer).

Prosedur PCR: 94oC- 5 menit; dilanjutkan dengan 94oC- 1 menit; 52oC-1 menit; 72oC- 1 menit, sebanyak 35 siklus, akan menghasilkan fragmen DNA sepanjang 239 bp. Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis pada agarose 2% dengan pengecatan ethidium bromide dibawah sinar U.V (Kuo *et al.*, 1996).

c.4. Nested PCR untuk LMP1 delesi dari EBV:

Pada 0,25 ug DNA EBV, tambahkan 23 ul campuran PCR (12,5 pmol masing-masing primer LMP1A, LMP1B, LMP1C dan LMP1 D(regio ujung C).

LMP1-A: 5'-GGA- AAT- GAT- GGA- GGC- CCT- CC -3' (20 mer)

LMP1-B: 5'-GTA- GCT- TAG- CTG- AAC- TGG- GC-3' (20 mer).

LMP1-C: 5'-CGG- AAG- AGG- TGG- AAA- ACA- AA- 3' (20 mer).

LMP1-D: 5'-GTG- GGG- GTC- GTC- ATC- ATC- TC- 3' (20 mer).

Prosedur PCR: 94oC- 5 menit; 94oC-1 menit; 58oC- 1 menit; 72oC-1 menit, pada PCR ronde I dan ke II sebanyak 30 siklus. Hasil PCR LMP1 berupa fragmen DNA sepanjang 210 bp(bila tidak ada delesi 30 bp) dan 180 bp(bila ada delesi 30 bp), dilanjutkan dengan elektroforesis pada agarose 3% dengan pengecatan ethidium bromide (Chen, 1992).

c.6. PCR untuk HPV:

Pada DNA genoma HPV 0,25 ug ditambahkan 24 ul campuran PCR (meliputi 12,5 pmol primer Gp5 & Gp6; 250 uM masing-masing dNTP; 10 mM Tris HCl; 1,5 mM MgCl₂; 1 unit Taq DNA polimerase (Promega).

Primer HPV 16& HPV 18 sesuai dengan daerah conserved regio E6/E7 HPV.

Primer HPV 16.I = 5'- GCA- AGC- AAC- AGT- TAC- TGC- GA- 3' (20 mer)

Primer HPV 16.II = 3'- CGT- GTT- CTT- GAT- GAT- CTG- CA -5' (20 mer).

Primer HPV 18.I = 5'- ACC- TGA- TCT- GTG- CAC- GGA- AC- 3' (20 mer).

Primer HPV 18.II = 3'- GTG- ACA- TAG- AAG- GTC- AAC- CG- 5' (20 mer)

Kondisi masing-masing PCR: 94oC - 4 menit; 94oC-1 menit; 55oC-1 menit; 72oC- 1 menit, sebanyak 35 siklus, akan menghasilkan fragmen sepanjang 340 bp untuk HPV 16 dan 527 bp untuk HPV 18, dilanjutkan dengan elektroforesis agarose gel 2% dengan pengecatan ethidium bromide dan sinar U.V (Tung *et al.*, 1999)

HASIL

Telah berhasil dikumpulkan 25 orang penderita Nasopharynx karsinoma dengan berbagai stadium (menurut kriteria WHO 1987) dan 10 orang penderita normal (kontrol) dengan kisaran umur 20-60 tahun. Dari mereka dapat dikumpulkan sample darah dan biopsy jaringan nasopharynx untuk pemeriksaan analisis molekular DNA. Analisis DNA digunakan untuk mendeteksi virus Epstein Barr (EBV), virus Human Papilloma (HPV), fragmen LMP1 dihubungkan dengan kelainan histopatologi jaringan nasopharynx karsinoma.

1. Nasopharynx karsinoma dan EBV didalam darah

Dari 25 penderita nasopharynx karsinoma dengan kisaran umur 20-60 tahun, 7 orang diantaranya perempuan dan 18 orang lainnya laki-laki dan 10 penderita kontrol, 2 diantaranya perempuan dan 8 orang lainnya laki-laki. Semuanya penderita NPC dan kontrol adalah suku Jawa (Tabel 1 dan Tabel 2). Pada 15 orang (15/25=60%) kelompok penderita Nasopharynx karsinoma (12 laki-laki dan 3 perempuan) didapatkan EBV didalam darahnya sedangkan pada kelompok kontrol hanya 2 orang laki-laki (2/10=20%) didapatkan EBV didalam darahnya (berbeda secara bermakna pada p<0,05) (lihat Tabel 3).

Tabel 1. EBV, HPV, LMP1, Status kelompok NPC

No	Nama	Sex/Umur	PA	EBV(D)	EBV(NS)	HPV(D)	HPV(NS)	LMP1	Status
1	Jm	L/34	III	+	+	-	-	+	T4N1Mx
2	Ydh	L/38	III	+	+	-	-	+	T4N3Mx
3	Cp	L/43	II	-	+	-	-	+	T3N2Mx
4	Sw	P/29	III	+	+	-	-	+	T2N3Mx
5	MS	L/37	III	-	-	-	-	-	T3N2Mo
6	Wk	P/45	III	-	-	-	-	-	T2N0Mx
7	Wp	L/48	III	-	+	-	-	-	T2N3Mo
8	G	L/34	III	+	+	-	-	+	T4N2Mx
9	Py	P/47	III	-	-	-	-	-	T4NoMo
10	AG	L/42	III	+	+	-	-	+	T4N1Mx
11	St	L/45	III	-	+	-	-	-	T4N2Mo
12	Sd	P/38	III	-	+	-	-	+	T3N3Mo
13	Sy	L/50	III	+	+	-	-	+	T2N3Mx
14	DW	L/32	III	+	+	-	-	+	T4N3Mx
15	JS	L/45	III	+	+	-	-	+(del 30 bp)	T3N3Mx
16	My	L/46	III	+	+	-	-	+	T3N1Mx
17	Is	L/47	III	-	+	-	-	-	T4N3Mo
18	SU	P/50	III	+	+	-	-	+	T4N3Mx
19	NS	P/31	III	+	+	-	-	+	T2N3Mx
20	SS	P/37	III	-	+	-	-	-	T1N1Mx
21	Zh	L/51	III	+	+	-	-	+	T4N3Mx
22	St	L/49	III	+	+	-	-	+	T2N3Mx
23	Rk	L/42	III	+	+	-	-	+	T3N2Mx
24	Kur	L/39	III	+	+	-	-	+(del 30 bp)	T4N3Mx
25	Sk	L/40	III	-	+	-	-	+	T4NoMx
				+=15/25 60%	+=22/25 88%	-=25 0%	-=25 0%	+=18/25 72%	

Semua nya suku Jawa

L=Laki P= perempuan PA= histopatologi anatomi(WHO I,II,III) D= darah NS= biopsi NS

Tabel 2. EBV, HPV, LMP1, Kelompok non NPC (kontrol)

No	Nama	Sex/umur	PA	EBV(D)	EBV(NS)	HPV(D)	HPV(NS)	LMP1	Status
1	Jh	L/32		-	-	-	-	-	
2	Kn	P/28		-	-	-	-	-	
3	Ag	L/41		+	-	-	-	-	
4	Hs	L/45		-	-	-	-	-	
5	WS	L/50		-	-	-	-	-	
6	Ks	L/29		-	-	-	-	-	
7	Wd	L/38		-	-	-	-	-	
8	Sy	L/43		+	-	-	-	-	
9	Hk	L/39		-	-	-	-	-	
10	Sb	P/34		-	-	-	-	-	
				2/10=2%	0%	0%	0%	0%	

Semuanya suku Jawa.

L= laki P= perempuan PA= histopatologi anatomi D= darah NS= biopsi nasopharynx

Tabel 3. Nasopharynx karsinoma dan EBV didalam darah

NPC	PCR EBV		Jumlah
	Positip	Negatip	
Positip	15	10	25
Negatip	2	8	10
Jumlah	17	18	35

Dari hasil perhitungan Chi-Square didapatkan $\chi^2 = 6,32$ (bermakna untuk $p < 0,05$).

2. Nasopharynx karsinoma dan EBV pada jaringan biopsy nasopharynx

Pada Tabel 4 ternyata dari 25 orang kelompok penderita NPC, 22 orang (22/25=88%), yaitu 18 laki-laki dan 6 perempuan didapatkan EBV

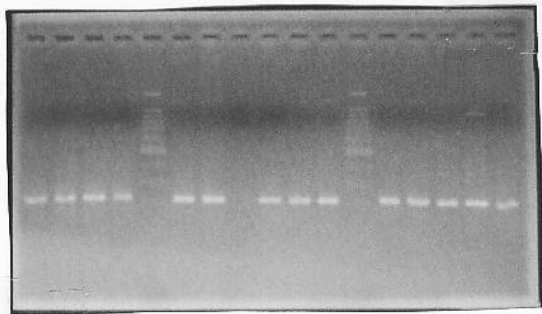
pada jaringan biopsi nasopharynx, sedangkan pada 10 orang kelompok kontrol tidak didapatkan EBV (0%) pada jaringan biopsy nasopharynx. (berbeda sangat bermakna $p < 0,01$).

Tabel 4. Nasopharynx karsinoma dan EBV pada jaringan biopsi nasopharynx

NPC	PCR EBV		Jumlah
	Positip	Negatip	
Positip	22	3	25
Negatip	0	10	10
Jumlah	22	13	35

Dari perhitungan Xi-square didapatkan $\chi^2 = 27,61$ (sangat bermakna untuk $p < 0,01$).

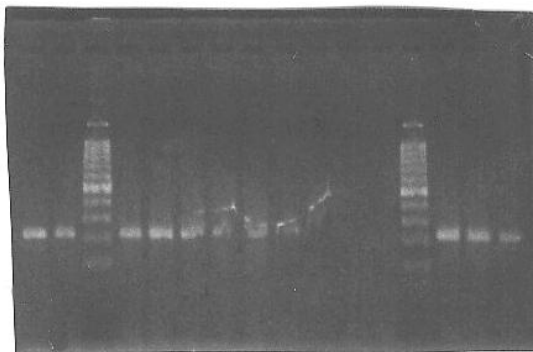
1 2 3 4 L 5 6 K 7 8 9 L 10 11 12 13 14



100 bp DNA ladder(Promega)
Cat: G2101
1500 bp
1000
900
800
700
600
500
400 ← 239 bp
300
200
100

Gambar 1. Hasil PCR EBV didalam darah dengan primer EBV-1 dan EBV-2 menghasilkan fragmen 239 bp. L= 100 bp ladder K= kontrol negatip

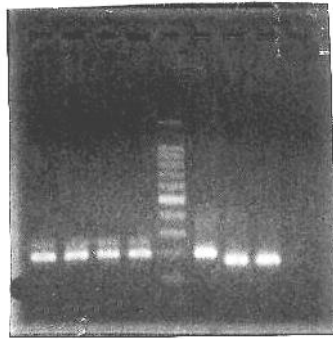
1 2 L 3 4 5 6 7 8 9 10 11 K L 12 13 14



100 bp DNA Ladder(Promega)
Cat: G2101
1500 bp
1000
900
800
700
600
500
400 ← 239 bp
300
200
100

Gambar 2. Hasil PCR EBV pada jaringan biopsy nasopharynx dengan primer EBV-1 dan EBV-2 menghasilkan fragmen 239 bp L= 100 bp DNA ladder K= kontrol negatip

1 2 3 4 L 5 6 7 K

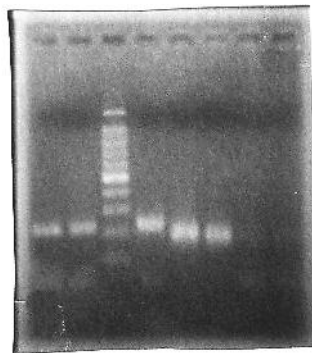


← 210 bp
← 180 bp

100 bp DNA ladder(Promega)
Cat : G2101
1500 bp
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100

Gambar 3. Hasil Nested PCR LMP1 pada jaringan biopsi nasopharynx dengan primer LMP1 -I,II,III dan IV menghasilkan fragmen 210 bp dan 180 bp (delesi 30 bp). L= 100 bp ladder K= kontrol negatif

1 2 L 3 4 5 6 7 K

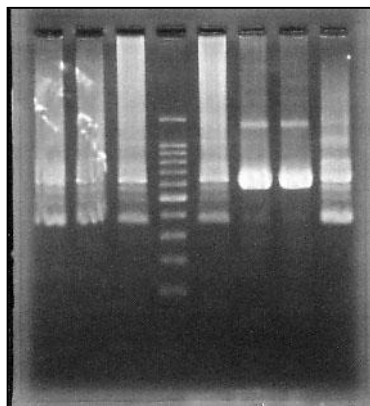


← 210 bp
← 180 bp

100 bp DNA ladder(Promega)
Cat: G2101
1500 bp
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100

Gambar 4. Hasil Nested PCR LMP1 pada jaringan biopsi nasopharynx dengan primer LMP1 -I,II,III dan IV, menghasilkan fragmen 210 bp dan 180 bp (delesi 30 bp). L= 100 bp DNA ladder K= kontrol negatif

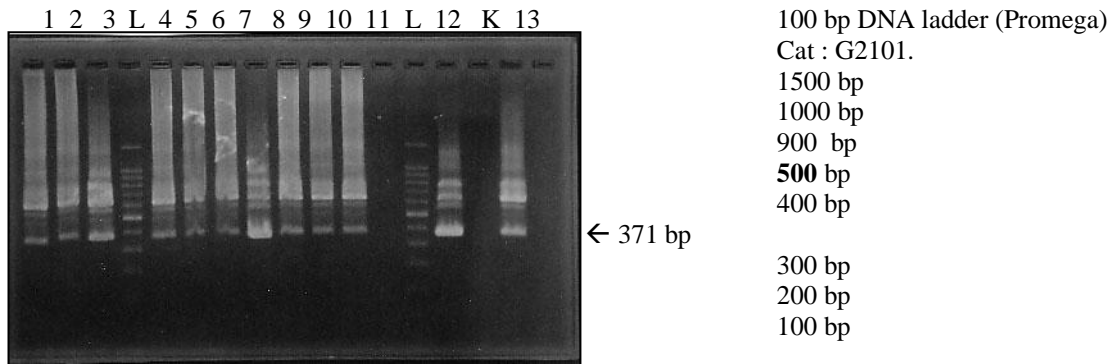
1 2 3 L 4 5 6 7



← 371 bp

100 bp DNA ladder (Promega)
Cat: G2101.
1500 bp
1000 bp
900 bp
800 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

Gambar 5. Hasil RT-nested PCR mRNA Ck 19 didalam darah tepi dengan primer Ck 19-3 dan Ck 19-4 menghasilkan fragmen 371 bp. L= 100 bp DNA ladder.



Gambar 6. Hasil RT- nested PCR mRNA Ck 19 didalam darah tepi dengan primer Ck 19-3 dan Ck 19-4, menghasilkan fragmen sepanjang 371 bp. K= kontrol negatif L= 100 bp DNA ladder.

3. Nasopharynx karsinoma dan HPV pada darah dan jaringan biopsi nasopharynx

Pada Tabel 1 dan Tabel 2 ternyata dari 25 orang kelompok penderita NPC maupun 10 orang kelompok kontrol, tidak didapatkan HPV didalam darah maupun pada biopsi nasopharynxnya.

4. Nasopharynx karsinoma dan EBV dengan LMP1 tipe delesi 30 bp.

Pada Tabel 5.1.dan Tabel 5.2 ternyata dari 25 orang kelompok penderita NPC, 18 orang (18/25=72%), yaitu 14 laki-laki dan 4 perempuan didapatkan LMP1 pada jaringan biopsi nasopharynx (2 kasus dengan LMP1 delesi 30 bp), sedangkan pada 10 orang kelompok kontrol tidak didapatkan LMP1 (0%) pada jaringan biopsi nasopharynxnya. Pada Tabel 5 ternyata dari 22 orang kelompok penderita NPC dengan PCR EBV-NS nya positif hanya 18 orang dengan PCR LMP1-NS nya positif (berbeda sangat bermakna $p < 0,01$).

Tabel 5. PCR EBV-NS dan PCR LMP1-NS

PCR EBV-NS	PCR	LMP1-NS	
	Positif	Negatif	Jumlah
Positif	18	4	22
Negatif	0	3	3
Jumlah	18	7	25

Dari perhitungan Xi square didapatkan $X^2 = 13,29$ (sangat bermakna untuk $p < 0,01$).

PEMBAHASAN

1. Hubungan EBV dan karsinoma nasopharynx

Pada penelitian ini dikumpulkan 25 orang penderita karsinoma Nasopharynx dengan berbagai stadium (menurut kriteria WHO 1987) dan 10 orang penderita normal (kontrol) dengan kisaran umur 20-60 tahun. Dari mereka dapat dikumpulkan sample

darah dan biopsi jaringan nasopharynx untuk analisis molekular DNA. Semua penderita baik karsinoma nasopharynx maupun kontrol berasal dari suku Jawa. Kelompok penderita NPC dari hasil histopatologinya 24 orang (96%) dengan Dx: undifferentiated NPC (WHO 3) dan 1 orang (4%) dengan Dx: non keratinizing NPC (WHO 2) (Tabel 1 dan 2). Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang melaporkan hasil histopatologis penderita NPC sebagai berikut: Keratinizing squamous cell NPC (WHO1) sebanyak 10%, Non keratinizing NPC (WHO2) sebanyak 5% dan Undifferentiated NPC (WHO3) sebanyak 85% (Hu *et al.*, 1996). Walter *et al.*, 1992 menemukan pada 18 penderita NPC, ternyata 78% undifferentiated NPC, 11% keratinizing squamous cell NPC dan 11% non keratinizing NPC.

Dengan melihat Tabel 3 dengan diketemukannya EBV didalam darah kelompok NPC sebanyak 60% sedangkan pada kelompok kontrol hanya 20% (berbeda bermakna $p < 0,05$) dan melihat Tabel 4 dengan diketemukannya EBV pada jaringan biopsi nasopharynx kelompok NPC sebanyak 88% sedangkan pada kelompok kontrol tidak diketemukan (0%) (berbeda bermakna $p < 0,01$), maka temuan ini memperkuat hipotesis bahwa infeksi laten EBV merupakan salah satu faktor penting sebagai etiopatogenesis proses karsinoma NPC, dimana EBV mempunyai potensi karsinogenik pada jaringan epithel (virus epitheliotropik onkogenik). Mai *et al.*, 2002, menemukan EBV-DNA didalam darah (serum atau plasma) 66 penderita NPC sebanyak 85% dan 10% pada orang normal. Yin *et al.*, 2004 menemukan pada plasma kelompok NPC 96% PCR EBV-DNANYa positif dan pada kelompok kontrol hanya 7% EBV-DNANYa positif. Dikatakan juga sensitivitas esai EBV-DNA jauh lebih baik dibandingkan esai Eliza serologis IgA-VCA, walaupun kedua esai ini mempunyai spesifisitas yang sama. Kemudian Walter *et al.*, 1992

menemukan EBV pada jaringan biopsi nasopharynx penderita NPC sebanyak 83%.

2. Hubungan HPV dan karsinoma nasopharynx

Pada penelitian kami, dilihat pada Tabel 1 dan 2 ternyata tidak diketemukannya HPV pada semua kelompok baik pada kelompok NPC maupun kelompok kontrol (0%) (pada PCR HPV sampel darah maupun biopsi jaringan nasopharynx). Berbeda dengan Tung *et al.*, 1999 melaporkan bahwa pada 88 biopsi jaringan nasopharynx penderita NPC didapatkan EBV-DNA pada 83%, HPV-DNA pada 51% (ko-infeksi antara EBV dan HPV sebanyak 42%), sedangkan Giannoudis *et al.*, 1995 menemukan prevalensi infeksi HPV pada NPC berkisar 0-12%, tergantung dengan faktor geografis.

3. Hubungan ko-infeksi EBV dan HPV dengan etiopatogenesis karsinoma nasopharynx

Dengan melihat Tabel 1 dan 2 ternyata tidak terbukti adanya ko-infeksi EBV dan HPV pada kelompok NPC, sehingga dapat disimpulkan bahwa HPV bukan sebagai faktor ko-etiotogenesis bersama-sama dengan infeksi laten EBV untuk proses karsinogenesis NPC.

4. Hubungan EBV pada jaringan biopsi nasopharynx NPC dan LMP1-DNA

Pada Tabel 5 terlihat pada 25 orang kelompok NPC didapatkan 88% (22/25) EBV-DNAnya positif dan hanya 72% (18/25) dari mereka juga ditemukan LMP1-DNA positif dan tidak ditemukan pada mereka 28%(7/25) yang EBV-DNAnya negatif. Sesuai dengan temuan Tsang *et al.*, 2003 yang mengumpulkan penderita berbagai kanker kepala dan leher a.l: karsinoma oropharynx, NPC, karsinoma rongga mulut, karsinoma laryngopharynx ternyata PCR-LMP1-DNA hanya ditemukan 1-2% positif dan pada NPC o.k EBV didapatkan PCR LMP1-DNAnya 95,6% (43/45) positif. Kesimpulan yang didapatkan bahwa pada mereka dengan PCR EBV-DNA yang positif disertai dengan PCR LMP1-DNA yang positif, memperkuat dugaan diagnosis karsinoma nasopharynx.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Infeksi laten dengan EBV sebagai salah satu faktor etiopatogenesis yang penting untuk proses karsinogenesis karsinoma Nasopharynx.
2. HPV bukan sebagai salah satu faktor yang ikut berperan untuk proses karsinogenesis karsinoma

Nasopharynx secara sendiri atau bersama dengan infeksi EBV (ko-infeksi).

3. EBV-DNA bersama dengan LMP1-DNA yang positif memperkuat diagnosis karsinoma nasopharynx.
4. Dalam upaya pengurangan insidens karsinoma nasopharynx, hanya dapat dengan deteksi dini infeksi EBV, karakterisasi EBV untuk persiapan bentuk vaksin dalam usaha pencegahan infeksi EBV yang potensial karsinogenik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Dirjen Pendidikan Tinggi, Rektor UNAIR dan Ketua Lembaga Penelitian UNAIR yang telah memberikan dukungan dana (Penelitian Hibah Bersaing 2004/2005) dan kesempatan pada peneliti untuk melaksanakan penelitian ini. Kepada Direktur RSU Dr Soetomo, peneliti juga menyampaikan terima kasih atas pemberian ijin untuk melaksanakan penelitian ini. Peneliti juga menyampaikan terima kasih yang tiada terhingga kepada para pasien RSU Dr Soetomo yang telah bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

- Bahnassy AA, Zekri AR, Houssini SE, Khalid HM 2003. Epstein Barr Virus in Head and Neck Carcinoma in Egypt. *J of the Egyptian Nat Cancer Inst*, Vol 15, No 4, 349-362.
- Chen ML, Tsai CN, Liang CL, Shu Ch, Huang CR, Sulitzeanu E 1992. Cloning and characterization of the latent membrane protein (LMP) of a specific Epstein Barr virus variant derived from the nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese population. *Oncogene* 7:2131-3140.
- Dickens P, Srivastava G, Liu YT 1992. Human papilloma virus 16/18 and nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Pathol* 74:390-393.
- Gissmann L, Wolink L, Ikenberg H 1983. Human papilloma virus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 560-563.
- Ho JHC 1972. Current knowledge of the epidemiology of nasopharyngeal carcinoma, in oncogenesis and Herpes viruses. IARC, Lyon: 357-365.
- Hu LF, Zubarovsky ER, Chen F, Cao SL, Enberg I, Kein G 1991. Isolation and sequencing of the Epstein Barr virus BNLF1 gene (LMP1) from a chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 72: 2399-2409.
- Hu Lf, Chen F, Zheng X, Ernberg I Cao SL, Christensson B 1993. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. *Oncogene* 8:1575-1583.
- Jin CL, Wen YW, Kuang YC, Yau HW 2004. Quantification of Plasma Epstein Barr Virus DNA in Patients with Advanced Nasopharyngeal Carcinoma. *N Eng J Med* 350; 24: 2461-2470.
- Kieff E 1996. Epstein Barr virus and its replication. *Virology* 3rd Ed Lippincot Raven Publisher Philadelphia: 2343-2396.

- Knecht H, Bachmann E, Brousset P, Rothernberger S, Einsele H, Lestou VS 1995. Mutational hot spots within carboxyl terminal region of the LMP1 oncogene of Epstein Barr virus are frequent in lymphoproliferative disorders. *Oncogene* 10:523-528
- Kuo WR, Chang CS, Lee CP, Lee KW, Tsai SM 1996. Detection of EBV in tumor tissue and peripheral blood by polymerase chain reaction in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Kaoshiung J Med Sci* 12:613-618.
- Kuo TT, Tsang NM 2001. Salivary gland type Nasopharyngeal Carcinoma: A Histologic, Immunohistochemical and Epstein Barr Virus study of 15 cases including a Psammomatous Mucoepidermoid Carcinoma. *Am J of Surgical Path*, Vol 25 No: 1: 80-86.
- Lanier A, Bender T, Talbot M 1980. Nasopharyngeal carcinoma in Alaskan Eskimos, Indians and Aleuts: a review of cases and study of Epstein Barr virus, HLA and environmental risk factor. *Cancer* 46: 2100-2106
- Liebowitz D 1994. Nasopharyngeal carcinoma: the Epstein Barr virus association. *Semin Oncol* 21:376-381.
- Li SN, Chang YS, Liu ST 1996. Effect of a 10 amino acid deletion on the oncogenic activity of latent membrane protein 1 of Epstein Barr virus. *Oncogene* 12: 3129-2133.
- Lin JC, Chen KY, Wang WY, Jan JS 2001. Detection of Epstein Barr Virus DNA in the peripheral Blood Cells of patients with Nasopharyngeal Ca relationship with distant metastasis and survival. *J of Clin Oncology*, Vol 19, NO 10: 2607-2615.
- Macdiarmid J, Stevenson D, Campbell DH, Wilson JB 2003. The latent membrane protein 1 of Epstein Barr virus and loss of the INK 4a locus: paradoxes resolve to cooperation I carcinogenesis in vivo. *Carcinogenesis* Vol 24, No 7: 1209-1218.
- Mounts PSK, Kashima H 1982. Viral etiology of juvenile and adult onset squamous papilloma of the larynx. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:5425-5429.
- Muir CS 1971. Nasopharyngeal carcinoma in non chinese populations with special reference to Southeast Asia and Africa. *Int J Cancer*: 8: 351-363.
- Muir CS, Waterhouse J, Mack T, Powell J, Whelan S 1987. Cancer incidence in five continents. *IARC Sci Publ* 88: 1-97.
- Ping CP, Ngan MT, Chen KT, Sheng PH 2004. Prevalence of LMP-1 gene in tonsils and non-neoplastic nasopharyng by nest polymerase chain reaction in Taiwan. *Head & Neck*, Vol 26 No: 7: 619-624.
- Raab-Traub N 1989. The human DNA tumor viruses : Human papilloma virus and Epstein Barr virus. *Cancer Treat Res* 47: 285-302.
- Rassekh CH, Rady PL, Arany I, Tying SK, Knudsen S, Calhoun KH, Seikaly H 1998. Combined Epstein Barr virus and human papilloma virus infection in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 108:362-367.
- Telenti A, Marshall WF, Smith TF 1990. Detection of Epstein Barr virus by polymerase chain reaction. *J of Clin Micro*, Oct 1990: 2187-2190.
- Tsang NM, Chang KP, Lin SY, Hao SP, Tseng CK 2003. Detection of Epstein Barr Virus- derived Latent Membran Protein 1 Gene in various Head and Neck Cancers: Is it specific for Nasopharyngeal Carcinoma?. *The Laryngoscope* Vol 113, No 6: 1050-1054.
- Tsutsumi K, Nakajima T, Gotoh M 1989. In situ Hybridization and immunohistochemical study of human papillomas. *Laryngoscope* 99:80-85.
- Tung YC, Lin KH, Chu PY, Hsu CC 1999. Detection of human papilloma virus and Epstein Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma by polymerase chain reaction. *Kaoshiung J Med Sci* 15: 256-262.
- Turazza E, Lapena A, Spovieri O, Torres CP, Gurncharri C, Maciel A, Luna B 1997. Low risk human papillomavirus type 6 and 11 associated with carcinoma of the genital and upper aero digestive tract. *Acta Obstet Gynecol Scan* 76: 271-276.
- Walter M, Palance JM, Peiper SC 1992. Epstein Barr virus detection in neck metastases by polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 102, May: 481-485.
- Wilson JB, Weinberg R, Johnson R, Yuspa S, Levine AJ 1990. Expression of the BNLFI oncogene of Epstein Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell* 61:1315-1327.
- Zheng N, Yuan L, Hu F, Chen G, Christensson 1994. Effect of B lymphocyte and NPC derived EBV-LMP1, gene expression on in vitro growth and differentiation of human epithelial cells. *Int J Cancer* 57: 747-753.