

BAB 6

PEMBAHASAN

Variabel usia, jenis kelamin, tipe histopatologi, klasifikasi TNM dan stadium tumor dari subyek penelitian ini adalah data yang valid dan realibel, karena berasal dari data catatan medis pasien di RSUP dr Kariadi, Semarang. Variabel kualitas hidup pasien menggunakan formulir SF-36 yang merupakan kuisisioner yang umum dipakai untuk mengevaluasi kualitas hidup jangka panjang pasien dengan validitas dan realibilitas yang sudah teruji. Semua variabel yang diuji pada penelitian ini valid dan realibel sehingga dapat dilanjutkan uji hipotesis.

Salah satu kendala pada penelitian ini adalah peneliti tidak dapat menghubungi beberapa pasien ataupun keluarga pasien untuk pengisian kuisisioner sehingga beberapa data untuk kualitas hidup pasien tidak dapat dilengkapi.

6.1 Karakteristik subyek penelitian

Berdasarkan variabel jenis kelamin dalam penelitian ini didapatkan kasus KNF terbanyak pada laki-laki sebesar 62,3% (38/61) dan perempuan sebesar 37,7% (23/61) sesuai dengan teori bahwa insiden KNF sering pada laki-laki dibanding perempuan. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya, Trimonika *et al* melaporkan bahwa jenis kelamin laki-laki sebanyak 71,7% (33/46) dan perempuan sebanyak 28,3% (13/46). International Agency for Research on Cancer (IARC) juga melaporkan bahwa laki-laki lebih mungkin

mengalami KNF, yaitu sekitar 72,73% dan GLOBOCAN menyatakan bahwa pria memiliki risiko 1,38 kali lebih tinggi terkena kanker nasofaring dibandingkan wanita.¹ Perbedaan antara pria dan wanita ini disebutkan karena kemungkinan adanya kebiasaan gaya hidup yang berbeda (misalnya, konsumsi alkohol dan merokok) serta perbedaan biologis dari keduanya.²⁹

Berdasarkan variabel usia, penelitian menunjukkan kasus terbanyak pada kelompok usia > 46 tahun sebesar 62,3% (38/61). Jumlah subyek dengan usia termuda adalah 19 tahun dan tertua 85 tahun. Hal ini sesuai dengan teori bahwa insiden KNF lebih sering pada kelompok usia > 45 tahun. Distribusi umur yang sama juga dilaporkan oleh Trimonika *et al* yang melaporkan rerata usia adalah 45,6 tahun (berkisar dari 18-67 tahun).⁷⁷ Serupa dengan Adham *et al* yang melaporkan bahwa insiden puncak KNF pada kelompok usia 30-50 tahun.³ Sedangkan, pada kelompok berisiko tinggi, insiden meningkat pada kelompok usia 50 hingga 59 tahun, dan kemudian menurun. Ini disebabkan oleh fakta bahwa kelompok-kelompok ini terpapar agen karsinogenik pada tahap awal kehidupan. Kanker naso faring mungkin membutuhkan beberapa dekade untuk berkembang sel-sel ganas, dan kemudian tanda-tanda muncul. Oleh karena itu, paparan karsinogen di awal kehidupan mungkin memiliki efek yang signifikan terhadap kejadian kanker ini.²⁹

Berdasarkan variabel tipe histopatologi, pada penelitian ini tipe yang paling dominan adalah *undifferentiated non-keratinizing squamous cell carcinoma* sebanyak 80,3% (49/61), diikuti *keratinizing-squamous cell carcinoma* sebanyak 11,5% (7/61), dan *differentiated non keratinizing squamous cell*

carcinoma sebanyak 8,2% (5/61). Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Trimonika *et al*, yang juga dilakukan di RSUP dr Kariadi dimana didapatkan tipe *undifferentiated non-keratinizing squamous cell carcinoma* sebanyak 93,5% (43/46). *Undifferentiated non-keratinizing squamous cell carcinoma* adalah subtipe histologis KNF yang paling umum ditemukan di Asia Tenggara dan Indonesia, serta wilayah dengan insiden tinggi lainnya, dan paling erat hubungannya dengan infeksi EBV. Penelitian lain melaporkan bahwa terdapat korelasi signifikan ($p < 0,001$) antara penderita KNF etnis Asia Timur dengan tipe histopatologi WHO tipe 3. Hal tersebut menguatkan hubungan antara KNF dengan etnis dan tipe histopatologi tertentu.²⁰

Berdasarkan variabel klasifikasi ukuran tumor (pT), pada penelitian ini diperoleh pT1 sebanyak 8,2% (5/61), pT2 sebanyak 19,7% (12/61), pT3 sebanyak 24,6% (15/61) dan pT4 sebanyak 47,5% (29/61). Sebagian besar kasus ditemukan dengan pT4, hasil ini serupa dengan penelitian yang dilakukan Farhat *et al* yang melaporkan overekspresi LMP1 sebagian besar ditemukan pada stadium T akhir termasuk T3 dan T4.⁷⁸ Sesuai juga dengan penelitian oleh Jiang *et al* dengan pT4 sebanyak 49% (42/86); dan penelitian oleh Qu *et al* pT4 sebanyak 29% (28/96).^{77,19} Gejala dan tanda yang dialami pasien KNF yang kurang spesifik menyebabkan seringkali penderita berobat ke dokter dalam kondisi stadium lanjut, seperti adanya gejala klinis berupa nyeri kepala dan keluhan lain yang berkaitan dengan keterlibatan saraf intrakranial merupakan tanda jika tumor sudah melibatkan nervus cranial (T4).⁷⁹ Penemuan awal dari penyakit ini dapat mempengaruhi distribusi ukuran tumor (T) pada pasien karsinoma nasofaring.

Berdasarkan variabel klasifikasi keterlibatan kelenjar getah bening (pN), pada penelitian ini didapatkan pN0 sebanyak 9,8% (6/61), pN1 sebanyak 23% (14/61), pN2 sebanyak 60,7% (37/61) dan pN3 sebanyak 6,6% (4/61). Hasil ini serupa dengan penelitian sebelumnya, yaitu keterlibatan kelenjar getah bening paling banyak pada pN1 dan pN2. Francis *et al* juga mengatakan bahwa KNF memiliki kecenderungan tinggi untuk bermetastasis ke kelenjar getah bening leher. Massa atau benjolan di leher sering menjadi alasan pasien KNF melakukan pemeriksaan.⁸⁰

Berdasarkan variabel klasifikasi metastasis tumor (pM), pada penelitian ini diperoleh pM0 sebanyak 95,1% (58/61) dan M1 sebanyak 4,9% (3/61). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian besar pasien tidak mengalami metastasis, berbeda dengan penelitian lain yang dilakukan oleh Zhang *et al.* yang menjelaskan bahwa kejadian metastasis jauh lebih tinggi pada KNF tingkat lanjut dan lokalisasi yang paling sering adalah tulang, paru-paru, dan hepar.⁸¹ Namun, hal ini sama dengan penelitian Perez *et al* yang melaporkan pM0 sebanyak 93.1% (27/29) dan Qu *et al* diperoleh pM0 sebanyak 100% (96/96).^{24,77}

Berdasarkan variabel klasifikasi stadium tumor (S), pada penelitian ini diperoleh yang terbanyak adalah pasien dengan S-IVa sebanyak 39,3% (24/61), sedangkan S-I sebanyak 4,9% (3/61), S-II sebanyak 4,9% (3/61), S-III sebanyak 37,7% (23/61), S-IV b sebanyak 6,6% (4/61) dan S-IVc sebanyak 6,6% (4/61). Pada penelitian yang dilakukan Qu *et al* dengan S-III sebanyak 50% (48/96) dan S-IV sebanyak 38,7% (37/96); dan penelitian Perez *et al* melaporkan S-III sebanyak 10.3% (3/29) dan S-IV sebanyak 62.1% (18/29).^{77,24} Penelitian

sebelumnya juga menyebutkan bahwa gejala dan tanda KNF yang kurang spesifik menyebabkan penderita mengalami salah diagnosis, atau berkonsultasi dengan dokter pada kondisi stadium lanjut.⁷⁹ Pada tahap awal penyakit, gejala yang signifikan jarang muncul, tetapi ketika tumor tumbuh, gejala yang ditimbulkan pada tubuh pasien menjadi lebih jelas sehingga mempengaruhi kualitas hidup pasien.³

Berdasarkan variabel kualitas hidup (QoL), diperoleh kualitas hidup pasien yang tergolong baik sebanyak 21,3% (13/61) dan buruk sebanyak 23% (14/61). Subjek penelitian yang tidak dapat dihubungi sebanyak 27,8% (17/61) dan subjek penelitian yang telah meninggal dunia sebanyak 27,9% (17/61).

6.2 Ekspresi LMP-1

LMP1 adalah onkoprotein paling penting yang diekspresikan oleh EBV dalam sel KNF dan penting untuk pertumbuhan dan transformasi sel terinfeksi yang dimediasi EBV, yang berperan penting dalam terjadinya pengembangan, metastasi dan invasi pada KNF.¹⁶ Hampir semua penderita *undifferentiated nasopharyngeal carcinoma* dewasa di seluruh dunia positif EBV secara serologis. Studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa ekspresi gen EBV laten yaitu Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA), latent membrane protein-1 (LMP1), LMP2, dan EBV encoded small RNAs (EBER) dalam sel tumor KNF dapat dilakukan untuk mengkonfirmasi adanya infeksi EBV. LMP-1 mengkodekan protein membran laten yang menginduksi perubahan morfologi dan fenotip pada sel epitel. Pada tahap laten, ekspresi LMP-1, yang diekspresikan dalam latensi

EBV tipe II, dicontohkan oleh KNF, berkontribusi pada kelangsungan hidup sel.⁷ Pewarnaan imunohistokimia protein membran laten 1 (LMP 1) adalah metode deteksi EBV yang dikenal dengan baik, cepat, dan efektif. Imunohistokimia LMP 1 tidak seefektif EBER ISH dalam mendeteksi EBV pada KNF karena LMP 1 seringkali tidak dapat dideteksi bahkan pada sel yang jelas-jelas positif EBER. Namun, pewarnaan imunohistokimia LMP 1 adalah metode deteksi EBV yang cepat, lebih murah, dan efektif.³⁶

Pada penelitian ini kami memilih area tumor yang paling representatif untuk menilai ekspresi LMP-1. Dihitung pada maksimal lima lapang pandang dengan menggunakan pembesaran 400x. Ekspresi dinyatakan positif bila membran dan/ sitoplasma sel tumor tercat coklat lalu dilakukan penilaian skor semi kuantitatif dan semi kualitatif. Apabila ditemukan dua atau lebih area dengan gambaran tingkat ekspresi yang berbeda, maka area dengan skor intensitas/ semi kualitatif paling kuat yang akan digunakan. Hasil akhir didapatkan dari penjumlahan kedua skor tersebut kemudian dikategorikan menjadi tanpa ekspresi (negatif), ekspresi lemah dan ekspresi kuat.

Di penelitian ini didapatkan 61 kasus KNF dengan ekspresi LMP-1 positif pada sel tumor sebesar 88,6% (54/61) dengan 36,1% (22/61) menunjukkan ekspresi yang kuat dan 52,5% (32/61) menunjukkan ekspresi yang lemah. Hal tersebut konsisten dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sannom *et al* dengan ekspresi LMP-1 positif sebesar 77,3% (51/66) dan Poida *et al* sebesar 82,4% (28/34).^{16,7,82} Prasetyo *et al* juga menyebutkan bahwa LMP-1 positif pada kasus KNF lebih besar dari individu sehat, dimana LMP-1 positif berhubungan

positif ($X_2 = 24,95$, $P=0,00$) dengan KNF.⁸³ Kebanyakan KNF mengekspresikan LMP11, diduga memiliki peranan penting dalam patogenesis dan perkembangan KNF. Berdasarkan beberapa penelitian terdahulu sekitar 50%-60% biopsi KNF, LMP-1 dapat divisualisasikan pada sebagian besar sel tumor menggunakan teknik imunohistokimia. Ekspresi LMP-1 dianggap berperan tidak hanya dalam onkogenesis tapi juga dalam mempertahankan latensi virus.⁸⁴

Perbedaan ekspresi ini kemungkinan dikarenakan perbedaan dalam prosedur pengecatan imunohistokimia, perbedaan cara pembacaan dan nilai cut-off, jenis antibodi yang digunakan serta perbedaan jumlah sampel. Pada penelitian ini menggunakan nilai cut-off sebesar 10%, sama seperti yang digunakan pada penelitian Rosales *et al*, sedangkan pada penelitian Sannom *et al* menggunakan penilaian positif bila pulasan berwarna kecoklatan bergranular pada sitoplasma dan membran sedangkan negatif pada pulasan berwarna kebiruan dan Qi ying *et al* menggunakan nilai cut-off 5%.^{82,24,85} Antibodi yang digunakan pada penelitian ini menggunakan *mouse monoclonal EBV LMP-1 antibody* (3H2104,a,b,c) produksi Santa Cruz, sedangkan pada penelitian Qi ying *et al* dan Rosales *et al* menggunakan antibodi *mouse anti-LMP1 monoclonal* (M0897) produksi DAKO.^{24,85}

6.3 Hubungan antara ekspresi LMP-1 dengan ukuran tumor (T), keterlibatan kelenjar getah bening (N), metastasis (M), stadium, tipe histopatologi dan kualitas hidup.

LMP1 berasosiasi dengan EGFR untuk pertumbuhan tumor dalam fase proliferasi. Aktivasi EGFR dengan perubahan siklus sel melalui aktivasi cyclin D1,

cyclin E, dan E2F1 mempercepat transisi fase G1 ke S. LMP1 juga dapat menginduksi survivin sehingga mengakibatkan penghambatan apoptosis. Penelitian lain juga menunjukkan efektivitas vaksin LMP1 dalam menekan pertumbuhan tumor.⁷⁸ Hal ini mendukung hasil penelitian kami yang menunjukkan ekspresi tinggi LMP1 tertinggi pada T3 dan T4 (65,5%) dibandingkan dengan kelompok T1 dan T2 (22,9%) . Kelompok T4 lebih banyak mengekspresikan LMP-1 daripada kelompok yang lain yaitu sebanyak 36%. Namun, hasil uji statistik menunjukkan hubungan tingkat ekspresi LMP-1 tidak mempunyai hubungan yang bermakna secara statistik dengan ukuran tumor/ pT (nilai $p=0,388$).

Hasil ini serupa dengan penelitian pada 70 buah kasus yang dilakukan di Rumah Sakit Umum Adam Malik Medan, Indonesia. LMP1 dinilai dengan pewarnaan imunohistokimia berdasarkan IRS (immunoreactive score) kemudian menganalisa hubungan antara overekspresi LMP-1 dengan klasifikasi T, penelitian tersebut menjelaskan bahwa tidak terdapat hubungan antara LMP-1 dengan klasifikasi T pasien karsinoma nasofaring.⁷⁸ Sedangkan Peng *et al* dalam penelitian mereka mengungkapkan hubungan yang signifikan dari pasien dengan karsinoma nasofaring positif-EBV dengan klasifikasi T ($p=0.001$), tidak menggunakan ekspresi LMP-1 tapi menggunakan kadar DNA EBV plasma pada pasien.⁸¹ Perbedaan ini dapat dimungkinkan bahwa kadar DNA EBV diduga cukup berguna untuk mendeteksi EBV seperti pada penelitian Kalpoe *et al* yang melaporkan bahwa semua pasien KNF dengan positif EBER menunjukkan DNA EBV positif dalam plasma dan negatif EBER tidak memiliki DNA EBV yang

terdeteksi dalam plasma sedangkan, immunohistokimia LMP 1 adalah metode deteksi EBV yang cepat dan lebih murah tapi, tidak seefektif EBER-ISH dalam mendeteksi EBV pada KNF. LMP 1 seringkali tidak dapat dideteksi bahkan pada sel yang jelas-jelas positif EBER.^{81,86}

Deteksi ekspresi LMP1 pada diagnosis KNF diperkirakan dapat membantu untuk menentukan invasi tumor dan metastasis. Ekspresi LMP1 pada kanker terkait EBV dikaitkan dengan regulasi proliferasi, immortal, invasi, dan angiogenesis sel tumor.⁵ Beberapa penelitian juga menemukan bahwa KNF yang EBV positif tumbuh lebih cepat dan cenderung lebih banyak yang bermetastasis daripada yang tidak mengandung EBV. Sebuah penelitian Zhao *et al* melaporkan bahwa ekspresi LMP1 mempromosikan invasi dan metastasis KNF, dihambat ketika ekspresi LMP1 dihancurkan oleh penggunaan smallRNA hairpin yang menargetkan gen LMP1 in vitro dan tikus, sehingga disimpulkan bahwa LMP1 mungkin berperan dalam perkembangan KNF dan berperan penting dalam proses invasi dan metastasis.⁴⁸ LMP1 juga mendorong invasi dan metastasis dengan mengganggu interaksi sel-matriks melalui induksi matriks metaloproteinase (MMPs), dan regulasi yang dimodulasi oleh berbagai penekan metastasis.⁸⁵

Pada penelitian ini didapatkan tidak adanya ketelibatan getang bening dengan LMP-1. Terdapat 48 kasus dari 55 kasus dengan keterlibatan kelenjar getah bening (N1-3) dengan LMP-1 positif dan hanya 7 dengan LMP-1 negatif (12,7%). Hasil ini sesuai penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa tumor EBV sedikit berkorelasi dengan kasus dengan keterlibatan kelenjar getah bening.⁸⁰ Namun, hasil uji statistik menunjukkan tidak ada hubungan yang bermakna antara

ekspresi LMP-1 pada jaringan karsinoma nasofaring dengan keterlibatan getah bening atau N (nilai $p=0,491$). Hasil ini selaras dengan penelitian Jeon *et al* yang mengevaluasi ekspresi LMP-1, MMP-9 dan E-cadherin dan hubungannya dengan tipe histologi, TNM dan Stadium tumor pada 66 kasus karsinoma nasofaring. Penelitian tersebut menjelaskan bahwa tidak terdapat hubungan antara LMP1 dengan keterlibatan getah bening dan metastasis.⁸⁷ Studi lain oleh Adham *et al* tidak menemukan hubungan yang signifikan antara ekspresi LMP-1 dan kelenjar getah bening (N) $p= 0,553$ maupun dengan metastasis (M) $p= 0.706$.³ Peng *et al.* menunjukkan dalam penelitian mereka bahwa hubungan yang signifikan antara ekspresi LMP1 dengan stadium klinis/TNM, tetapi tidak menganalisis hubungan dengan keterlibatan getah bening dan metastasis.⁸¹

Pada penelitian ini didapatkan bahwa sebagian besar subyek tidak ada metastasis jauh (58/61) dan hanya 3 yang memiliki metastasis jauh. Hasil uji statistik menunjukkan tidak ada hubungan yang bermakna antara ekspresi LMP-1 jaringan karsinoma nasofaring dengan metastasis tumor/ pM (nilai $p=0,254$). Hal tersebut dapat disebabkan karena kasus metastasis yang rendah pada penelitian ini.

Pada penelitian ini didapatkan status stadium lanjut (III dan IV) paling banyak yaitu sebanyak 90,1%. Ekspresi LMP-1 positif pada stadium III dan IV lebih besar daripada LMP-1 negatif (10,9%). Uji klinis tingkat ekspresi LMP-1 tidak mempunyai hubungan yang bermakna secara statistik dengan staging (nilai $p=0,325$). Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Kitagawa *et al* dengan nilai $p=0.11$ namun, berbeda dengan penelitian Ying *et al* yang melaporkan hubungan antara ekspresi LMP-1 dan staging tumor dengan nilai $p=<0.024$.^{25,85} Perbedaan hasil

penelitian ini dengan penelitian sebelumnya dapat disebabkan terkait dengan perbedaan cara pengelompokan klasifikasi staging TNM.

Pada penelitian ini 54 kasus dari 61 karsinoma menunjukkan LMP-1 positif. Ekspresi LMP-1 positif paling besar terdapat pada *non keratinizing squamous cell carcinoma*, undifferentiated sekitar 42 kasus (68,8%), yang konsisten dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan infeksi EBV adalah penyebab paling sering dari karsinoma nasofaring tipe undifferentiated carcinoma²². EBV memang telah diakui sebagai agen etiologi utama dalam KNF tipe non keratin (WHO tipe II/III). Sebaliknya, karsinoma keratinisasi (WHO tipe I) tidak memiliki hubungan yang konsisten dengan EBV, yang menunjukkan perbedaan dalam patogenesis KNF. Menariknya, kasus kami yang memiliki 11,4% tumor KNF tipe I WHO semuanya menunjukkan LMP-1 positif .

Pada penelitian ini didapatkan tingkat ekspresi LMP-1 tidak mempunyai hubungan yang bermakna secara statistik dengan tipe histopatologi (nilai $p=0,108$). Hal ini selaras dengan penelitian yang dilakukan Prasetyo *et al* dengan nilai $p=0,641$ dan Qi Ying *et al* ($p=0,410$) yang menunjukkan tidak ada korelasi antara ekspresi LMP-1 dengan tipe histopatologi KNF. Penelitian sebelumnya yang dilakukan Prasetyo *et al* memberikan informasi hubungan antara EBV dengan tipe histopatologi KNF ($p<0,05$) dengan koefisien korelasi Lambda 0,667, $P=0,034$ atau terdapat korelasi positif kuat antara tipe histopatologi KNF dengan ekspresi dari EBER.^{18,50}

Pada penelitian ini didapatkan tingkat ekspresi LMP-1 tidak memiliki hubungan yang bermakna secara statistik dengan kualitas hidup ($p=0,308$).

Sepengetahuan penulis, belum ada penelitian sebelumnya yang menghubungkan ekspresi LMP-1 dan kualitas hidup pada pasien karsinoma nasofaring. Hubungan tidak bermakna antara ekspresi LMP-1 dan kualitas hidup pada penelitian ini kemungkinan dikarenakan terdapat perbedaan terapi yang telah diterima oleh subjek, subjek penelitian yang tidak dapat dihubungi (27,8%) dan subjek penelitian yang telah meninggal dunia (27,9%), sehingga tidak bisa mencerminkan kualitas hidup subjek penelitian secara keseluruhan.

Hasil penelitian melaporkan bahwa tidak didapatkan variabel yang mempunyai hubungan signifikan terhadap LMP-1, hal tersebut mungkin dapat disebabkan karena kurangnya jumlah sample penelitian, khususnya hanya didapatkan 7 kasus tipe keratinizing. Kami juga menduga selain itu mungkin, keterlibatan LMP-1 dengan faktor prognostik tersebut adalah peran tidak langsung dan mungkin memerlukan gen lain yang cukup kuat mempengaruhi tingkat ketahanan hidup pasien.

6.4 Ekspresi p16

Gen p16 adalah gen supresor tumor penting yang sering tidak aktif dalam biopsi kanker nasofaring. Inaktivasi protein p16 ini mendorong transisi dari kanker nasofaring tingkat rendah ke lesi tingkat tinggi dan mempengaruhi stabilitas RNA virus. Protein p16 juga menghambat aktivasi cyclin dependent kinase 4 dan fosforilasi pRb yang menghambat siklus sel. Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekspresi protein p16 yang menurun merupakan faktor risiko yang meningkatkan kejadian kanker nasofaring.²¹

Pada penelitian ini kami memilih area tumor yang paling representatif untuk menilai ekspresi p16. Dihitung pada maksimal lima lapang pandang dengan menggunakan pembesaran 400x. Ekspresi dinyatakan positif bila membran dan/ sitoplasma sel tumor tercat coklat lalu dilakukan penilaian skor semi kuantitatif dan semi kualitatif. Apabila ditemukan dua atau lebih area dengan gambaran tingkat ekspresi yang berbeda, maka area dengan skor intensitas/ semi kualitatif paling kuat yang akan digunakan. Hasil akhir didapatkan dari penjumlahan kedua skor tersebut kemudian dikategorikan menjadi tanpa ekspresi (negatif), ekspresi lemah dan ekspresi kuat.

Di penelitian ini didapatkan 61 kasus KNF dengan ekspresi p16 negatif pada sel tumor sebesar 68,8% (42/61) positif pada sel tumor sebesar 31,2% (19/61). Hal ini konsisten dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sun *et al* dengan ekspresi p16 sebesar 63,78% pada jaringan karsinoma nasofaring yang dibandingkan dengan kelompok kontrol Jiang *et al* tingkat p16 negatif adalah sebesar 51,1% (44/86) dan Rosales *et al* sebesar 56% (14/25). Sedangkan pada penelitian Saito *et al* yang melaporkan hasil dari 37 pasien hanya 7 (19%) pasien memiliki p16 positif.^{21,19,24,20} Mutasi gen p16 menyebabkan inaktivasi gen, sehingga ekspresi p16 berkurang atau tidak ada. Namun, mungkin juga mutase akan terjadi tanpa diikuti penurunan ekspresi p16. Hal ini menunjukkan adanya faktor lain (pRb dan cyclin D1) yang dapat menyebabkan proliferasi sel tidak terkendali.²² Beberapa penelitian menunjukkan bahwa mutasi pada gen p16 jarang terjadi dan banyak ditemukan pada KNF tipe non keratinizing, terutama *undifferentiated carcinoma*. Hal ini dikarenakan KNF WHO tipe 3 memiliki

hubungan yang sangat erat dengan EBV. Infeksi EBV yang terjadi pada masa anak memicu kejadian mutasi yang sering dan berulang pada beberapa gen sehingga dapat menyebabkan inaktivasi gen, salah satunya adalah gen p16.⁷⁵

Perbedaan ekspresi ini dengan penelitian yang lain kemungkinan dikarenakan perbedaan dalam prosedur pengecatan imunohistokimia, perbedaan nilai cut-off, jenis antibodi yang digunakan dan perbedaan jumlah sampel. Pada penelitian ini menggunakan nilai cut-off sebesar 10%, sama seperti yang digunakan pada penelitian Rosales *et al*, sedangkan pada penelitian Jiang *et al* menggunakan nilai cut-off 60% dengan ekspresi positif dan negatif saja, dan pada penelitian Saito *et al* menggunakan nilai cut-off 70%.^{19,24,20}

6.5 Hubungan antara ekspresi p16 dengan ukuran tumor (T), keterlibatan kelenjar getah bening (N), metastasis (M), stadium, tipe histopatologi dan kualitas hidup.

Hubungan ekspresi protein p16 dengan risiko, gambaran klinis, dan prognosis kanker nasofaring, pada penelitian sebelumnya telah dilakukan evaluasi yang menunjukkan bahwa ekspresi protein p16 yang mengalami penurunan regulasi merupakan faktor risiko yang meningkat terhadap kanker nasofaring. Inaktivasi gen p16 dapat diakibatkan oleh faktor-faktor meliputi delesi, mutasi, dan hipermetilasi. p16, juga dikenal sebagai cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, protein penekan tumor yang menghambat perkembangan siklus sel dengan menghambat pembentukan kompleks kinase yang bergantung pada cyclin. Perannya dalam patogenesis kanker nasofaring masih belum sepenuhnya

dipahami meskipun, beberapa penelitian melaporkan inaktivasi gen p16 oleh mutasi gen p16 dapat digunakan sebagai indikator prognosis dan sebagai strategi terapi yang lebih baik pada KNF.

Pada penelitian ini didapatkan tingkat ekspresi p16 memiliki hubungan dengan keterlibatan getah bening atau N yang bermakna secara statistik baik pada uji bivariat ($p=0,026$) maupun multivariat ($p=0,012$). Hasil tersebut konsisten dengan penelitian yang dilakukan Sun *et al* (nilai $P= 0.004$) dan Jiang *et al* ($p<0.01$) tapi, berbeda dengan penelitian Saito *et al* yang menunjukkan hasil dengan nilai $p=0.798$.^{21,20,19} Pada penelitian sebelumnya menunjukkan p16 mengatur penyebaran ke kelenjar getah bening dengan memediasi pembentukan pembuluh limfatik melalui upregulasi integrin. Nuyts *et al* melaporkan bahwa kepadatan pembuluh limfatik lebih rendah pada xenograft dengan positif HPV/p16, sedangkan peningkatan kepadatan pembuluh limfatik pada tumor dikaitkan dengan peningkatan metastasis ke kelenjar getah bening.⁸⁸ Sebagian besar pasien dengan KNF menunjukkan metastasis kelenjar getah bening leher pada saat diagnosis, dan frekuensinya dilaporkan sekitar 90%. Metastasis ke KGB pada pasien KNF telah dikaitkan dengan prognosis yang buruk, terutama untuk kasus dengan node yang besar (>6 cm), nekrosis, atau KGB di leher bagian bawah.⁸⁹ Ekstensi ekstranodal selalu dikaitkan dengan insiden tinggi metastasis jauh, dan oleh karena itu dianggap sebagai parameter penting dalam meningkatkan klasifikasi N dalam sistem stadium TNM AJCC baru.⁹⁰

Pada penelitian ini didapatkan tingkat ekspresi p16 memiliki hubungan yang bermakna secara statistik pada uji multivariat regresi linier dengan stadium tumor/

S (nilai $p=0,028$). Hasil ini selaras dengan penelitian Jiang *et al* yang menunjukkan nilai $p=0.01$ tetapi, berbeda dengan penelitian Sun *et al* dengan nilai $p=0.06$ dan Stenmark *et al* dengan nilai $p=0.24$.^{80,21,19} Hwang *et al*⁷⁵ dan Mäkitie *et al*²³ juga melaporkan bahwa ekspresi p16 yang menurun merupakan akibat dari inaktivasi gen p16 dan mempunyai hubungan signifikan dengan stadium awal dan lanjut. Hal tersebut dapat dijelaskan dari penelitian sebelumnya yang dilakukan Nuyts *et al* yang menyelidiki hubungan antara angiogenesis dan p16 dengan xenografts in vivo yang disuntikkan dengan sel positif HPV SCC154 yang dimanipulasi dengan shp16 atau shluc, hasilnya menunjukkan bahwa jumlah pembuluh darah yang lebih tinggi terdeteksi pada tumor tikus dengan ekspresi p16 rendah dibandingkan dengan tumor kontrol. Selain itu, peningkatan vaskularisasi menghasilkan nekrosis yang lebih rendah, jumlah sel mitosis yang lebih tinggi, dan peningkatan pertumbuhan tumor. Peningkatan pertumbuhan dan vaskularisasi yang terlihat pada tumor tikus shp16 ini dapat menjelaskan seringnya terjadinya stadium lanjut pada pasien HNSCC yang negatif p16/HPV.⁸⁸

Pada penelitian kami didapatkan tingkat ekspresi p16 tidak memiliki hubungan yang bermakna secara statistik dengan ukuran tumor/ pT (nilai $p=0,253$). Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Jiang *et al*. yang menunjukkan bahwa pasien dengan p16-positif dikaitkan dengan peningkatan prognostik dan angka harapan hidup tapi, tidak ada hubungan antara p16 dengan ukuran tumor. Hasil ini juga selaras dengan penelitian yang dilakukan Sun *et al* dengan nilai $p=0.49$, Saito *et al* dengan nilai $p=0.249$.^{21,20} Meskipun hubungan antara status p16 dan ukuran tumor (T) tidak signifikan, kecenderungan ukuran

yang lebih tinggi dan ekspresi p16 yang rendah terlihat. 93,4% pasien p16 negatif dan lemah menunjukkan tumor T3/T4, sedangkan ini hanya 6,5% pada kelompok p16 positif kuat.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan tingkat ekspresi p16 tidak mempunyai hubungan yang bermakna secara statistik dengan metastasis tumor/pM (nilai $p=0,226$). Hasil ini serupa dengan penelitian yang dilakukan Sun *et al* dengan nilai $p=0.49$ namun berbeda dengan Stenmark *et al* yang mempunyai hubungan yang bermakna ($p=0.03$).^{21,80} Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa ekspresi p16 secara signifikan terkait dengan risiko metastasis jauh, bahwa p16 mengatur invasi dan potensi metastasis sel dengan merusak angiogenesis. Telah diketahui dengan baik bahwa angiogenesis, yang secara aktif dipertahankan dalam sel kanker oleh faktor pro-angiogenik seperti faktor pertumbuhan endotel vaskular A (VEGFA), adalah saluran untuk penyebaran dan metastasis sel kanker dan mendorong perkembangan tumor yang agresif. Nuyst *et al* mendapatkan hasil bahwa pasien HPV positif menunjukkan ekspresi VEGFA yang lebih rendah secara signifikan dibandingkan pada kelompok HPV negatif. Meskipun korelasi negatif antara VEGFA dan p16 kurang jelas, kecenderungan signifikan terlihat.⁸⁸ Kita menemukan bahwa kemungkinan ekspresi p16 tidak mempengaruhi metastasis jauh pada penelitian ini kemungkinan adalah karena jumlah pasien dengan metastasis sangat sedikit (3 dari 61 pasien).

Pada penelitian ini didapatkan tingkat ekspresi p16 tidak memiliki hubungan yang bermakna secara statistik dengan tipe histopatologi (nilai $p=0,292$). Ekspresi p16 negatif pada terdapat paling besar pada *non keratinizing*

squamous cell carcinoma yaitu sebanyak 35 kasus (57,3%). Hal ini pernah dilaporkan pada penelitian Peng *et al* bahwa penurunan ekspresi p16 sering pada KNF tipe non keratinizing yang mempunyai hubungan dengan EBV, melalui metilasi promotor p16 dari produksi EBV.⁸¹ Hal ini serupa dengan penelitian yang dilaporkan Yusuf *et al* dengan nilai $p > 0.05$, Jiang *et al* dengan nilai $p = 0.16$ yang menyatakan tidak ada hubungan antara ekspresi p16 dengan tipe histopatologi^{19,22}. Hal ini dapat diakibatkan karena insidens KNF tipe keratinizing pada penelitian ini rendah (11,4%) dan karena faktor etnis.

Pada penelitian ini didapatkan tingkat ekspresi p16 tidak berhubungan secara statistik dengan kualitas hidup ($p = 0,505$). Sepengetahuan penulis, belum ada penelitian sebelumnya yang menghubungkan ekspresi p16 dan kualitas hidup pada pasien karsinoma nasofaring. Hubungan tidak bermakna antara ekspresi p16 dan kualitas hidup pada penelitian ini kemungkinan dikarenakan terdapat perbedaan terapi yang telah diterima oleh subjek, subjek penelitian yang tidak dapat dihubungi (27,8%) dan subjek penelitian yang telah meninggal dunia (27,9%), sehingga tidak bisa mencerminkan kualitas hidup subjek penelitian secara keseluruhan.

Perbedaan hasil penelitian ini dengan penelitian sebelumnya dapat disebabkan terkait dengan ukuran sampel kita yang kecil; faktor etnis; perbedaan cara pengelompokan usia, klasifikasi TNM, stadium tumor dan tipe histopatologi; dan perbedaan dalam protokol pewarnaan imunohistokimia serta jenis marker yang digunakan.

6.5 Hubungan ekspresi p16 dan LMP-1

Hasil penelitian menunjukkan terdapat 38 kasus LMP-1 positif menunjukkan ekspresi p16 yang negatif (62,2%) dibandingkan dengan kelompok negatif LMP-1. Analisis yang dilakukan dengan menggunakan uji korelasi spearman's LMP-1 terhadap p16 pada penelitian ini menunjukkan korelasi negatif ($r = -0,194$) dan tidak bermakna ($P = 0,134$).

Ini sebagian didasarkan pada hipotesis bahwa Kasus KNF dengan positif EBV memiliki kemungkinan ekspresi p16 negatif dan dapat digunakan sebagai penanda bahwa tumor memiliki fenotip agresif melalui cara menekan tumor suppressor. EBV mengganggu proses pensinyalan intraseluler yang berkaitan dengan regulasi siklus sel dan LMP-1, sehingga dapat menghambat ekspresi p16 dan meningkatkan proliferasi sel. LMP-1 juga telah dilaporkan dapat menghilangkan promoter dari p16 melalui metilasi kemudian, inaktivasi p16 tersebut dapat menghasilkan peningkatan proliferasi sel tumor.¹⁹ Virus Epstein-Barr dan produknya semakin meningkatkan pengaruh mutasi gen p16 pada proses diferensiasi dan proliferasi sel. Transformasi menjadi sel kanker semakin cepat dan proliferasi sel semakin meningkat, sehingga stadiumnya meningkat.²²

6.6 Keterbatasan penelitian

Dalam penelitian ini terdapat keterbatasan yaitu: Pertama, ini adalah tinjauan retrospektif dan hanya dilakukan pada satu institusi dengan jumlah sampel penelitian minimal dan terbatas. Kedua, keterbatasan dalam menghubungkan subjek penelitian dikarenakan data nomor telepon yang tidak akurat.