

TENTANG PENULIS



Tirta Wardana, S.Si., M. Biotech. Lahir di Bengkulu, 19 Agustus 1990. Beliau mendapatkan gelar Sarjana di FMIPA, Universitas Bengkulu pada tahun 2018, dan Gelar M. Biotech dalam bidang Biologi Molekuler dari Program Pasca Sarjana Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta tahun 2015. Beliau merupakan salah satu peneliti muda Tim GenomiR di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Beliau aktif melakukan penelitian *non-coding RNA* (ncRNAs), sebagai anggota Pokja Genetik di FKMKM UGM hingga tahun 2018. Saat ini beliau merupakan staf Pengajar di Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman. Saat ini penulis telah banyak melakukan penelitian dalam pengembangan biomarker dan terapi menggunakan nanopartikel pada kanker berbasis ncRNAs seperti *breast kanker*, *nasopharynx cancer*, *ovarian kanker*, *hepatocellular cancer*. Disamping itu, Peneliti saat ini juga telah melakukan pengembangan biomarker pada kanker prostate

dengan metode non invasif menggunakan urine dan target therapy berbasis nanomedicine untuk mengatasi permasalahan kanker di Indonesia dengan melalui pendekatan *individualized therapy*.



Prof. dr. Sofia Mubarika Haryana, M.Med.Sc., Ph.D. Lahir di Yogyakarta, 7 Agustus 1948. Beliau mendapatkan gelar Dokter di Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta tahun 1973. Gelar Master (M. Med.Sc) beliau dapatkan dari Department of Immunology, Auckland University, New Zealand tahun 1985. Beliau mendapatkan gelar Ph.D di Departement of Immunology Molecular Biology, Kobe University, Jepang tahun 1994. Saat ini beliau merupakan staf pengajar pada Departemen Histologi dan Biologi Sel, FKMKM UGM. Beliau juga pernah menjabat sebagai Ketua Laboratorium Rekayasa Genetika PAU Bioteknologi UGM (tahun 1997-2004), Ketua Program Doktor FK UGM (2010-2015), menjadi peninjau penelitian LPPM UGM (tahun 2010–sekarang), LITBANGKES (tahun 2006–sekarang), Riset Incentive Ristik (tahun 2012, 2014), Juni The Best and Young Scientist-Ristik Kalbe Science Award/RKSA (tahun 2010–sekarang), anggota Dewan Riset Nasional Komisi

Kesehatan dan Obat (tahun 2006-2012), anggota AIPI Komisi Kedokteran (tahun 2010-sekarang). Saat ini beliau mengembangkan kelompok penelitian kanker di *microRNA* yaitu *GenomiRs*, sebagai ketua yang fokus dengan visinya dalam mengembangkan penelitian *miRNA*. Beliau dan tim mengerjakan beberapa proyek di berbagai kanker. Mereka bertujuan untuk mengeksplorasi *miRNA* hingga menemukan biomarker invasif minimal yang potensial dan kandidat untuk terapi yang ditargetkan.



Dr. dr. Cita Herawati, Sp.THT-KL (K). Lahir di Yogyakarta, 15 Maret 1960. Beliau mendapatkan gelar Dokter dan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang tahun 1985, dan gelar Spesialis Penyakit THT dari Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta tahun 1999. Gelar Doktor beliau dapatkan dari Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta tahun 2015. Saat ini beliau merupakan Staf Medik Fungsional THT RS Kanker Dharmas, Jakarta. Beliau juga pernah menjabat sebagai Kepala SMF-THT Kanker Dharmas (tahun 2010-sekarang), Wakil Tim Kerja THT RS Kanker Dharmas (tahun 2000-sekarang). Beliau aktif sebagai peneliti di RS Kanker Dharmas yang mengembangkan penelitian terkait pemanfaatan *Non-coding RNA* pada kanker nasofaring. Beberapa karya ilmiah baik Nasional dan Internasional yang beliau hasilkan untuk pengembangan biomarker karsinoma nasofaring yang bersifat minimal invasif berbasis *microRNA*.



Risky Oktriani, S.Si., M. Biotech., M.Sc. Lahir di Semarang, 6 Oktober 1986. Beliau mendapatkan gelar sarjana bidang Mikrobiologi di SITH-ITB, Bandung tahun 2008. Program Master Bioteknologi beliau didapatkan dari Program studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada pada tahun 2011 dan University College London (UCL), Inggris pada tahun 2015. Beliau sedang menempuh program doktor di Institut kanker Jerman, DKFZ, Heidelberg fokus penelitian pada penemuan target terapi untuk kanker pankreas. Saat ini beliau merupakan staf pengajar di Departemen Biokimia FKMKM UGM, serta aktif sebagai peneliti di GenomiR yang fokus pemanfaatan CRISPR/Cas9 untuk pengembangan biomarker dan terapi pada kanker.



UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Gd. L'NSOED Press

Jalan Prof. Dr. H.R. Boenyamin 706 Parwotekerto
Kode Pos 53122 Kotak Pos 115
Telepon (0281) 626070
Email: unssoedpress@unssoed.ac.id

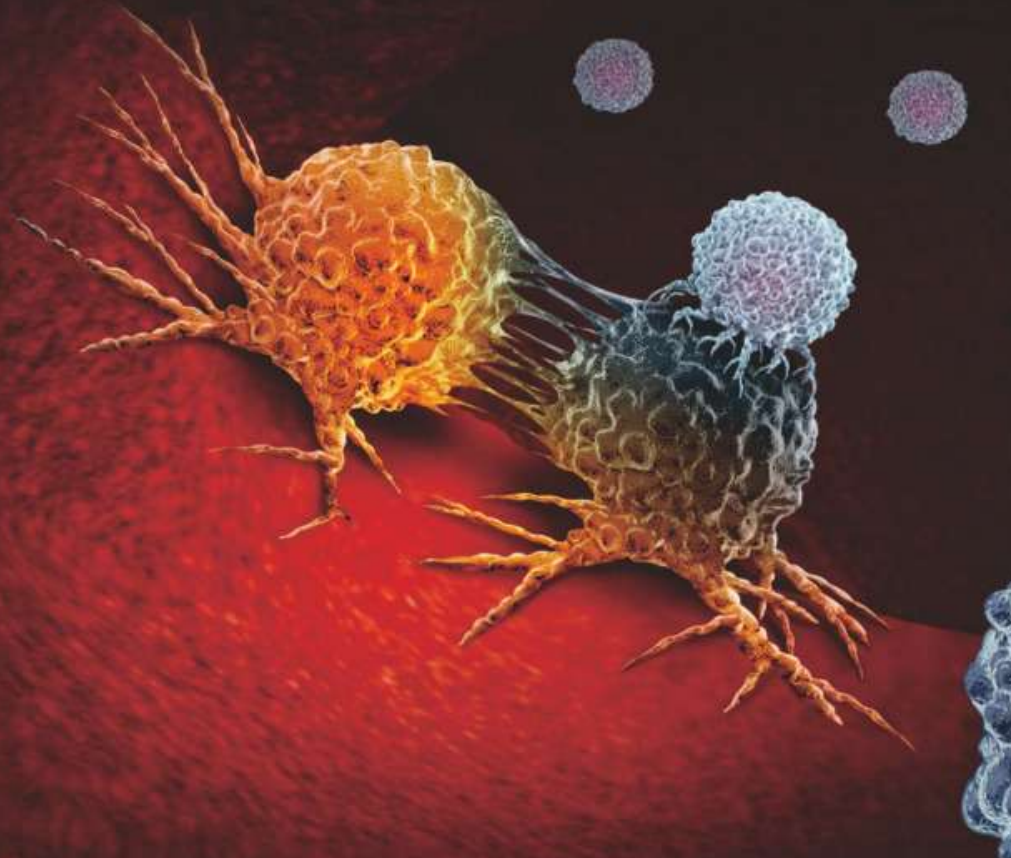


Tirta Wardana, dkk. BIOMARKER MINIMAL INVASIFE SEBAGAI PENDEKATAN DIAGNOSIS NASOPHARYNGEAL CARCINOMA BERBASIS MICRORNA

BUKU MONOGRAF

BIOMARKER MINIMAL INVASIFE SEBAGAI PENDEKATAN DIAGNOSIS NASOPHARYNGEAL CARCINOMA BERBASIS MICRORNA

TIRTA WARDANA
SOFIA MUBARIKA
CITA HERAWATI
RISKY OKTRIANI



Monograf

Biomarker Minimal Invasif Sebagai Pendekatan Diagnosis Nasopharyngeal Carcinoma Berbasis Microrna

Penulis:

TIRTA WARDANA

SOFIA MUBARIKA

CITA HERAWATI

RISKY OKTRIANI



Penerbit
Universitas Jenderal Soedirman
2021

Monograf

**Biomarker Minimal Invasif
Sebagai Pendekatan Diagnosis Nasopharyngeal Carcinoma
Berbasis Microrna**

© 2021 Universitas Jenderal Soedirman

Cetakan Kesatu, November 2021

Hak Cipta dilindungi Undang-undang
All Right Reserved

Penulis:

Tirta Wardana, S.Si, M.Biotech
Prof. dr. Sofia Mubarika, M.Med.Sc., Ph.D
Dr. dr. Cita Herawati Murjantyo, Sp.THT-KL (K)
Risky Oktriani, S.Si, M.Biotech., M.Sc

Editor Isi:

Dr. Sumadi Lukman Anwar, M.Sc., Ph.D, SpB (Onk)

Editor Bahasa:

Lalita Melasarianti, S.Pd., M.Pd.

Diterbitkan oleh:

UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Gd. BPU Percetakan dan Penerbitan (UNSOED Press)
Telp. (0281) 626070
Email: unsoedpresspwt@gmail.com



Anggota

Afiliasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia

Nomor : 003.027.1.03.2018

x + 75 hal., 15 x 23 cm

ISBN: 978-623-6783-79-5

*Dilarang mengutip dan memperbanyak tanpa izin tertulis dari penerbit,
sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apapun, baik cetak,
photoprint, microfilm dan sebagainya.*

PRAKATA

Penulis ucapkan puji syukur kehadiran Allah Swt atas karunia dan rahmatNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan buku monograf yang berjudul “Biomarker Minimal Invasif Sebagai Pendekatan Diagnosis Nasopharyngeal Carcinoma Berbasis Microrna”. Buku ini merupakan hasil penelitian yang telah dilakukan sejak tahun 2013 sampai dengan tahun 2019, bersama-sama dengan tim Genomir MicroRNA Cancer Research. Beberapa artikel yang telah dipublikasikan dengan beberapa judul yaitu sebagai berikut:

1. *Expression of microRNA-21 and 29c in Blood Plasma of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma.*
2. *The Expression of miR-21 and miR-29c in Blood Plasma of Nasopharyngeal Carcinoma Patient Post-Chemo radiotherapy.*
3. *Over- and down-expression mir-29c and mir-21 after chemotherapy and radio-therapy in nasopharyngeal carcinomas and the down-regulating proteins encoding Epstein Barr virus and c-Myc.*
4. *Circulation EBV Mir-Bart-7 Relating to Clinical Manifestation in Nasopharyngeal Carcinoma.*
5. *Circulation microRNAs as a diagnostic marker in Nasopharyngeal Carcinoma: A Panel Screening and Validation Study (proses review).*

Penulisan buku ini dilakukan sebagai upaya dari penulis dalam mengembangkan ilmu pengetahuan dibidang biologi molekuler terutama kesehatan, dan juga sebagai upaya pemecahan masalah karsinoma nasofaring di Indonesia. Harapan kami, buku ini nantinya dapat dijadikan sebagai salah satu sumber rujukan atau acuan dalam upaya pengembangan metode diagnosis dan prediksi terapi yang bersifat minimal invasif berbasis microRNA pada Karsinoma Nasofaring di Indonesia.

Indonesia merupakan negara yang terdiri dari ribuan pulau, yang memiliki dampak besar terhadap tingkat kesehatan penduduknya. Hal itu, dikarenakan banyak faktor mulai dari fasilitas kesehatan, jumlah tenaga medis, serta kesadaran akan pentingnya kesehatan disetiap daerah yang berbeda-beda.

Tingginya insidensi, mortalitas, serta pasien yang datang ke fasilitas kesehatan dalam keadaan stadium lanjut, menjadi permasalahan keganasan. Permasalahan keganasan, terutama Karsinoma Nasofaring dianggap menjadi salah satu penyebab dari tingginya mortalitas, bahkan menjadikan negara Indonesia sebagai penyumbang kematian tertinggi di dunia.

Hal itu, ditengarai akibat dari keterbatasan fasilitas, kurang meratanya pelayanan kesehatan di daerah-daerah, dan kesadaran masyarakat yang masih rendah terhadap kesehatan. Oleh karena itu, penulis mencoba menjadikan buku ini sebagai salah satu upaya awal dalam mengembangkan suatu metode deteksi dan prediktif terapi bersifat invasif yang mudah untuk dilakukan, serta fasilitas yang bisa dikembangkan pada setiap unit pelayanan kesehatan di daerah-daerah.

Penulis ucapkan terima kasih kepada Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (RISBIN IPTEKDOK) dan Kemenristek Dikti (PPUPT dan PKLN) yang telah mendanai penelitian. Kemudian, penulis juga ucapkan terima kasih kepada seluruh TIM Penelitian yaitu: Prof. dr. Sofia Mubarika, M. Med.Sc., Ph.D, Prof. Dr. Teguh Aryandhono, Sp. B, Onk (K)., Dr. Med. dr. Indwiani Astuti, Dr. dr. Cita Herawati, Sp. THT (K)., dr. Sumadi Lukman Anwar, M.Sc., Ph.D., Sp. B dan Risky Oktriani, S.Si., M.Biotech., M.Sc., serta seluruh pihak yang telah membantu berlangsungnya penelitian dan penulisan buku ini hingga selesai.

Akhir kata, penulis berharap supaya buku ini bermanfaat oleh mahasiswa, praktisi, klinis, peneliti, serta yang terkait dalam upaya update ilmu pengetahuan dan pengembangan metode deteksi dan prediksi sebagai upaya pemecahan permasalahan kesehatan, terutama Karsinoma Nasofaring di Indonesia.

Purwokerto, April 2021

Penulis

DAFTAR ISI

PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan	4
1.4. Metode pemecahan masalah.....	4
1.5. Temuan Keterbaruan	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Karsinoma Nasofaring.....	7
2.2. Perkembangan Karsinoma Nasofaring	8
2.3. Hubungan infeksi EBV terhadap kejadian NPC	9
2.4. Penegakan diagnosis NPC.....	11
2.5. Ekspresi miRNA pada sirkulasi	12
BAB III. METODE QUANTIFIKASI DAN ANALISIS	
EKSPRESI.....	19
3.1. Pengkoleksian Sampel.....	19
3.2. Isolasi Plasma.....	21
3.3. Isolasi RNA miRCURY RNA Isolation Kit- Biofluid	22
3.4. Sintesis cDNA	23
3.5. <i>Quantitave</i> PCR	23
3.6. Analisis Data	24
BAB IV. MEKANISME KEJADIAN NPC	25
4.1. Gambaran distribusi dan Faktor Resiko NPC	25
4.2. Karsinogenik	30
4.3. Kesehatan mulut.....	31
4.4. Gejala dan Tanda.....	31
BAB V. PERUBAHAN EKSPRESI SIRKULASI MIRNA	
KARSINOMA NASOFARING	33
5.1. Profiling mikroRNA.....	33
5.2. Profiling Biomarker Deteksi NPC.....	37
5.3. miR-29 Kandidat Ekspresi Biomarker Deteksi dan Implikasinya Pada Klinikopatologi	45

5.4. miR-BART-7 Kandidat Biomarker miRNA yang Dikode Virus EBV	50
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	55
6.1. Kesimpulan	55
6.2. Saran	55
DAFTAR PUSTAKA.....	57
GLOSSARIUM.....	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Genome dari Eipstein barr virus yang merupakan salah satu faktor penyebab karsinoma nasofaring (Price & Luftig, 2014).	10
Gambar 2.	Mekanisme sirkulasi miRNA melalui mekanisme komunikasi sel. miRNA disekresikan melalui beberapa mekanisme seperti enkapsulasi protein kompleks atau disebut juga eksosom (Foessl et al., 2019).	14
Gambar 3.	Biogenesis microRNA (Ohlsson Teague et al., 2009).	17
Gambar 4.	Distribusi dan gejala awal penderita karsinoma Nasofaring yang teridentifikasi. a. berdasarkan umur, b. berdasarkan stadium dan c. gejala awal penderita NPC (Herawati, 2019; wardana et al., 2016).	26
Gambar 5.	Tingkatan mortalitas kejadian Karsinoma Nasofaring di seluruh Dunia. Kuantifikasi dilakukan pada ASR Worl per 100.000 dimana perbedaan intensitas warna merah menunjukkan semakin tingginya tingkat mortalitas pada suatu wilayah atau Negara. Indonesia termasuk kedalam Negara yang memiliki tingkatan mortalitas ertinggi di dunia pada kejadian karsinoma nasofaring dengan tingkatan rate ≥ 0.73 (Barnes et al., 2005; IARC & WHO, 2015; World Health Organization, 2019).	27
Gambar 6.	Ekspresi protein EBV yang ditemukan terekspresi pada pasien-parsien penderita karsinomana nasofaring, a. distribusi penderita NPC dengan ekspresi EBV-EA, b. distribusi penderita NPC dengan ekspresi EBV-EBNA, c. distribusi penderita NPC dengan ekspresi EBV-VCA (Herawati, 2019; wardana et al., 2016).	28
Gambar 7.	Kurva kuantifikasi microRNA dengan menggunakan qRT-PCR dengan menggunakan software CFX-96 Biorad C1000. a. kurva amplifikasi, b. kurva leleh, c. kurva titik leleh.	36

Gambar 8.	Profil ekspresi miRNA pada kontrol dan NPC, dengan 2 miRNA yang paling signifikan miR-29c-3p dan 195-5p, (a) Heat map ekspresi 196 miRNA target, ekspresi miRNA: kenaikan ekspresi (merah), penurunan ekspresi (hijau). Metode analisis menggunakan kuantifikasi relatif standar dengan gen referensi. Analisis kuantifikasi menggunakan software MultiD. (b) Has-miR-195-5p secara signifikan meningkatkan NPC sebesar 1.157 (p-value 0.05). (c) ekspresi bawah miR-29c dengan perubahan lipat 1,16 dan ** nilai-p <0,05. ...	41
Gambar 9.	Perubahan ekspresi hsa-miR-29c-3p yang bersirkulasi NPC terhadap status klinis, (a) Distribusi miR-29c berdasarkan cq dari qPCR menggunakan CFX Manager 96 Biorad (b) penurunan ekspresi miR-29c dengan kelipatan sebesar -4,45. (c) Perubahan ekspresi miR-29c lebih rendah pada N2 dan N3 dibandingkan N1 pada lipatan 1,17. (d) Perubahan ekspresi miR-29c lebih rendah dari T1 dan T2, kelipatan 2,14. (e) Berdasarkan stadium miR-29c lebih rendah dibandingkan stadium awal dengan perubahan ekspresi sebesar 1, 99.	46
Gambar 10.	Peran saran miR-29c pada kanker sebagai regulator penting untuk penghambatan melalui COL4A, PI3K, VEGFA, JUN, dan CDK6. Peningkatan kemampuan sel kanker untuk menghindari mekanisme eliminasi kegagalan sel seperti apoptosis, proliferasi, dan angiogenesis melalui perubahan mekanisme seluler. Penurunan ekspresi miR-29c mempengaruhi peningkatan ekspresi mRNA target, mengubah jalur pensinyalan, dengan demikian mengganggu mekanisme normal sel (E. Savitri et al. 2017; Eka Savitri et al. 2019; wardana et al. 2016; Wardana et al. 2021).	49
Gambar 11.	Cycle quantification miR-BART-7 pada sirkulasi penderita NPC (karsinoma nasofaring) dengan nilai mean 34 dan HC (kontrol) dengan nilai mean 36 (Wardana et al., 2020).	51

Gambar 12. Relatif ekspresi berdasarkan FC (fold change) miR-BART-7 pada plasma karsinoma nasofaring dengan perbandingan TNM staging system, (a) berdasarkan status N (FC:4.61), (b) perbandingan NPC dan control (FC:2.15), (c) perbandingan berdasarkan status T (FC:1.84), (d) perbandingan berdasarkan status stadium (FC:1.22) (Wardana et al., 2020)..... 52

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Karakteristik klinikal patologi yang terlibat dalam penelitian	20
Tabel 2.	Kelebihan dan kekurangan dari beberapa metode yang populer digunakan untuk mengkuantifikasi miRNA.....	34
Tabel 3.	Profil ekspresi miRNA yang mengalami perubahan signifikan pada plasma pasien NPC	38
Tabel 4.	Hubungan perubahan ekspresi miRNA terhadap kegagalan fungsi.....	42

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Karsinoma atau kanker, merupakan keganasan yang ditandai dengan tumbuhnya jaringan baru. Tumbuhnya jaringan baru yang disebabkan karena ketidakmampuan sel dalam mengontrol proses pembelahan diri (proliferasi). Ketidakmampuan sel dalam meregulasi dirinya untuk melakukan proses proliferasi diakibatkan oleh banyak faktor, seperti kelainan genetik, paparan karsinogenik, infeksi virus, dan penyebab lingkungan (Wardana et al., 2020). Di dunia ini, kanker merupakan salah satu jenis penyakit yang menjadi perhatian khusus, dengan menyumbang jumlah kematian terbesar di negara berkembang dan juga di negara maju.

Tipe kanker yang menjadi perhatian khusus disebabkan tingginya mortalitas di Indonesia yaitu Karsinoma Nasofaring (NPC). Karakteristik yang unik berhubungan dengan endemik dan terdistribusi hanya di daerah tertentu, seperti Asia terutama Cina, Asia Tenggara termasuk Indonesia, India, dan beberapa bagian dari belahan benua lainya seperti Afrika Utara dan Eskimo (Avisar et al., 2009; Sengupta et al., 2008). Di Indonesia ditemukan, bahwa NPC lebih banyak menyerang laki-laki daripada perempuan dengan tingkatan mortalitas tertinggi di Dunia (IARC & WHO, 2015). Insidensi tinggi ditemukan pada beberapa pulau sumatera, jawa, Kalimantan, dan Sulawesi (Wildeman et al., 2013).

Data terakhir dari Kementerian Kesehatan Republik (Kemenkes RI), menyatakan, bahwa mortalitas dari NPC mencapai 12.000 kasus per tahun dengan tingkatan mortalitas tertinggi bersamaan dengan keganasan lainya seperti payudara, kulit, dan rahim (Kemenkes RI, 2018). Tingginya kompleksivitas penyebab terjadinya NPC mengakibatkan masih belum jelas penyebab utama pembentukan NPC. Beberapa peneliti menyatakan, terdapat beberapa faktor terindikasi memicu perkembangan dan pembentukan NPC yaitu kelainan genetik, infeksi virus terutama Eipstein barr virus (EBV), dan paparan karsinogenesis secara terus menerus. Ditambah lagi, pada beberapa kasus berhubungan erat dengan konsumsi garam yang tinggi dan ikan yang diolah dengan pengasapan (Okepa et al., 2019; Yong et al., 2017).

Klinisi banyak mengungkapkan, bahwa NPC merupakan keganasan yang dapat ditangani dengan tingkat kesembuhan yang cukup tinggi berdasarkan beberapa faktor yang harus dipenuhi. Salah

satu faktor yang menjadi perhatian khusus dalam menyelesaikan kasus NPC melalui deteksi secara dini (Chan et al., 2002; A. W. M. Lee et al., 2012). Keterlambatan deteksi dini dan penanganan medis yang dilakukan belum maksimal pada keganasan NPC, melalui pemberian kemoterapi dan radioterapi menjadi perhatian dalam upaya pemecahan masalah tersebut.

Keterlambatan diagnosis pada penderita NPC, diindikasikan merupakan penyebab utama tinggi nya mortalitas di Indonesia. Hal tersebut dikarenakan, sulitnya mendeteksi letak anatomi dan gejala NPC yang tidak spesifik. Disamping itu, biopsi yang masih menjadi *gold standart* penentuan status pasien masih memiliki banyak kekurangan. Salah satu kekurangan yang menjadi *issue* cukup hangat yaitu bersifat invasif sehingga memberikan kesakitan terhadap pasien. Belum adanya metode diagnosis deteksi dini serta rendahnya kesembuhan, diiringi tingginya tingkat *reccurance*, harus menjadi fokus utama dalam penyelesaian kasus NPC di Indonesia.

Perkembangan teknologi biologi molekuler yang cukup masif menjadi salah satu pintu gerbang yang sangat potensial dalam mengembangkan, pencarian biomarker, target terapi yang tepat, specific, dan sensitif. Pendekatan dengan konsep yang murah, mudah dilakukan, dan tidak menyebabkan penderitaan bagi pasien, merupakan upaya pendekatan di era *precision medicine* dan *individualized therapy*.

Pendekatan pada bidang teknologi dalam mencari solusi pemecahan metode diagnosis, terutama mencari alternative metode pada kejadian NPC dilakukan melalui banyak pendekatan. Diawali dengan pendekatan *high-throughput* teknologi, mulai dikembangkan dari yang sederhana untuk mendapatkan kandidat yang tepat. Kebutuhan sebuah metode yang sederhana, cepat, dan biaya rendah dalam mengungkap status pasien, merupakan sebuah pendekatan yang menjadi syarat utama untuk biomarker yang baik. Salah satu molekul yang dianggap sangat potensial dalam menjawab pertanyaan, sehingga dapat digunakan pula sebagai penanda kejadian NPC, yaitu microRNA (miRNA).

miRNA merupakan RNA pendek (18-24 nukleotida) yang tidak mengkode protein (untranslated RNA), berperan sebagai regulator pada tahapan post transkripsi dalam meregulasi pembentukan protein (Cortez et al., 2011). miRNA berperan dalam menghambat atau mendeგრdasi mRNA (*messenger RNA*), sehingga menyebabkan proses translasi RNA menjadi protein terganggu. Perubahan ekspresi miRNA sangat dinamis, hal tersebut disebabkan karena pengaruh patofisiologi tertentu. Ditambah lagi, peran miRNA sebagai regulator dalam semua aspek perkembangan dan mekanisme sel seperti differensiasi, proliferasi, migrasi, metabolisme, dan

apoptosis termasuk kejadian kanker. Oleh karena itu, sedikit saja perubahan ekspresi miRNA pada mekanisme seluler akan sangat mempengaruhi kestabilan fungsi dari sel.

Perubahan ekspresi yang kecil pada miRNA dapat menyebabkan ketidakstabilan dalam proses molekuler di dalam sel, sehingga menyebabkan semua aktivitas sel terganggu. Kandungan *single* nukleotida miRNA yang telah matang/dewasa, berfungsi melakukan pengikatan terhadap mRNA dan mengakibatkan proses translasi terganggu. Penghambatan melalui degradasi atau penempelan pada sekuense mRNA sehingga berimplikasi terhadap kestabilan proses seluler di dalam sel, terutama perubahan mekanisme *signaling pathway* dan komunikasi antar sel.

Biomarker deteksi dini bersifat minimal invasif atau bahkan non invasif menjadi salah satu urgenitas tersendiri, sebagai upaya mengurangi dampak dan penyelesaian kasus keganasan NPC. Biomarker berbasis sirkulasi miRNA, menjanjikan untuk dikembangkan dan digunakan sebagai kandidat biomarker deteksi terutama NPC. Perubahan ekspresi miRNA menggunakan salah satu metode kuantifikasi sebagai salah satu solusi yang tepat untuk mencari maker spesifik dan sensitif. Lebih dari itu, metode ini dapat mengurangi kesakitan dan memberikan sedikit kenyamanan terhadap pasien pada saat penentuan status keganasan.

Tantangan yang harus dihadapi agar dapat menyelesaikan kasus NPC, sebagai upaya mengurangi insidensi serta mortalitas di Indonesia haruslah melalui pendekatan yang komprehensif. Pendekatan yang dimaksudkan terutama dalam mengetahui penyebab, pola perkembangan, faktor resiko, dan molekul-molekul yang menjadi penyebab utama dari keganasan. Pendekatan tersebut nantinya merupakan kunci dalam penyelesaian masalah untuk mengungkap metode diagnosis, prognosis, respon terapi, bahkan dapat digunakan sebagai pencegahan mengurangi tingkatan insidensi terhadap keganasan NPC (A. W. M. Lee et al., 2012).

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka permasalahan yang diangkat pada penyusunan buku monograf ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah profil ekspresi miRNA yang mengalami kegagalan fungsi pada sirkulasi kasus karsinoma nasofaring?
2. Bagaimanakah peran dan mekanisme miRNA pada perkembangan karsinoma nasofaring?
3. Apakah kandidat biomarker deteksi dan prediksi terapi karsinoma nasofaring yang bersifat minimal invasif?

1.3. Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penyusunan buku monograf ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk menggambarkan profil ekspresi miRNA yang mengalami kegagalan fungsi pada kejadian Karsinoma Nasofaring.
2. Untuk mengidentifikasi peran dan regulasi miRNA pada perkembangan Karsinoma Nasofaring.
3. Untuk menemukan kandidat biomarker yang bersifat minimal invasif berbasis miRNA yang dapat digunakan untuk deteksi dini pada keganasan Karsinoma Nasofaring.

1.4. Metode Pemecahan Masalah

Buku monograf ini disusun berdasarkan tahapan untuk mendapatkan kandidat biomarker deteksi yang bersifat minimal invasif pada Karsinoma Nasofaring. Pendekatan yang dilakukan untuk pemecahan masalah, dimulai dari metode yang dijelaskan secara rinci mengenai deteksi miRNA pada sirkulasi dengan menggunakan qPCR (Bab II). Bab III lebih dijelaskan mengenai peran dari miRNA serta sebaran kejadian NPC di Indonesia. Profiling dan validasi untuk mengetahui bahwa miRNA dapat dideteksi pada sirkulasi NPC (Bab IV). Bab V diungkapkan bagaimana profile ekspresi miRNA yang mengalami kegagalan fungsi pada kejadian NPC sehingga nantinya dapat dianalisis secara statistik berdasarkan faktor klinis. Alur dari Bab tersebut, diharapkan dapat memberikan pemahaman mengenai peran dan mekanisme miRNA sebagai kandidat biomarker deteksi dini kejadian NPC melalui pendekatan dan penelitian laboratorium dengan melakukan kuantifikasi profile ekspresi miRNA antara plasma pasien NPC dan sampel kontrol.

1.5. Temuan Keterbaruan

Seluruh ilmuan dunia, termasuk Indonesia memiliki kewajiban untuk membentuk dan membangun sistem kesehatan yang berdasarkan *personalized medicine* dan *precision medicine* untuk perawatan kanker yang lebih baik. Keterbatasan metode deteksi dini yang sensitif dan spesifik untuk populasi Indonesia menjadi salah satu tantangan untuk mendapatkan biomarker yang tepat. Ketersediaan biomarker ini haruslah meliputi beberapa hal, seperti: sensitifitas, spesifikitas, mudah digunakan, real-time, murah, dan minimal invasif.

Terdapat beberapa temuan dari hasil penelitian ini yang berdampak terhadap keilmuan serta pemanfaatan untuk pelayanan kesehatan. Implikasi keilmuan dan pelayanan kesehatan dari penelitian ini yaitu:

1. Kami mengidentifikasi dan menemukan terdapat beberapa microRNA yang mengalami perubahan ekspresi pada sirkulasi pasien karsinoma nasofaring.
2. miR-29c yang diekspresikan oleh host (penderita) mengalami penurunan ekspresi yang signifikan pada sirkulasi.
3. miR-BART-7 yang dikode oleh virus Eipstein Barr Virus, yang telah menginfeksi manusia diketahui mengalami kenaikan ekspresi yang signifikan dan representative terhadap perubahan kondisi keganasan penderita berdasarkan status TNM.
4. Kami menemukan miR-29c dan miR-BART-7 merupakan tiga kandidat biomarker spesifik dan sensitif untuk mengidentifikasi kejadian Karsinoma Nasofaring yang bersifat minimal invasif.

Pemanfaatan metode deteksi berbasis miRNA yang bersifat minimal invasif, sangat potensial untuk dapat dikembangkan sebagai sebuah metode yang dapat diaplikasikan di klinik untuk pelayanan masyarakat, sehingga hasil dari temuan ini sangat besar harapannya bermanfaat dalam penyelesaian kasus kanker di Indonesia.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karsinoma Nasofaring

NPC merupakan tipe kanker dihubungkan dengan etnis dan bangsa tertentu di Asia Tenggara. Hubungan erat antara NPC dengan infeksi virus Eipstein Barr Virus (EBV), konsumsi makanan yang diasinkan seperti ikan asin dan makanan yang diasap, serta genetik dianggap menjadi faktor yang berperan sebagai faktor resiko terjadinya NPC. Namun, pertanyaan yang muncul ketika hal tersebut dijadikan sebagai landasan adalah seberapa besar kondisi tersebut mengindikasikan terbentuknya NPC, misalnya infeksi EBV yang dinyatakan oleh WHO telah menginfeksi >95% populasi dunia (Adham et al., 2012a; Herawati, 2019; Rowe et al., 2014; Salehiniya et al., 2018; Tang et al., 2016). Pola persebaran hanya terjadi pada beberapa daerah saja dan berhubungan dengan etnis, walaupun pada saat ini banyak kejadian NPC tidak memiliki pola kejadian yang berbeda sehingga telah menjadikan NPC menjadi tipe kanker yang unik.

NPC diketahui banyak tersebar di beberapa daerah seperti China, Asia tenggara, dan Eskimo (Chan et al., 2002; A. W. M. Lee et al., 2012) dan sangat erat kaitanya dengan etnis China. Ditambah lagi, banyak yang telah melaporkan bahwa sumber dari kejadian NPC berasal dari Negara China yang sangat erat kaitanya dengan faktor genetik etnis dan paparan karsinogenesis seperti, merokok ikan asap, konsumsi alkohol dan konsumsi garam tinggi (Okekp et al., 2019; Yong et al., 2017). Secara umum, kejadian tertinggi NPC ditemukan di Asia dan dan lebih banyak ditemukan pada pria dibandingkan wanita. Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan jumlah insidensi NPC pada beberapa Negara di Asia seperti China (33.198), Indonesia (13.084), Vietnam (4.931), India (3.947), dan Malaysia (2.030)16. Pada populasi canton (China) merupakan prevalensi tertinggi terjadinya NPC, dengan tingkatan insidensi mencapai mencapai >20/100.000 di area endemik (L. F. Zhang et al., 2015) .

Negara China merupakan Negara yang diindikasikan sebagai Negara dengan tingkatan kasus NPC tertinggi di dunia berdasarkan data dari Globogan 2008 (IARC & WHO, 2015). Namun, beberapa dekade terakhir, pemerintah China berhasil menekan angka insidensi dan mortalitas di Negara tersebut melalui perubahan gaya hidup sehat. Hal tersebut berbanding terbalik saat ini yang sedang dihadapi

oleh Indonesia. Data Globogan 2012 Indonesia dinyatakan sebagai salah satu Negara dengan tingkatan kematian tertinggi di dunia akibat NPC (World Health Organization, 2019), bahkan pola persebaran dari penderita pun tidak lagi hanya berkaitan dengan ras, etnik, atau umur tertentu untuk dapat menjadi penderita NPC (Adham et al., 2012a, 2012b; Herawati, 2019; Hutajulu et al., 2011).

2.2. Perkembangan Karsinoma Nasofaring

Karsinoma disebabkan oleh pertumbuhan sel yang tidak terkontrol akibat kehilangan regulasi dan sifat aslinya disebabkan oleh multifaktor. Penyebab utama dikarenakan kesalahan genetik yang diakibatkan oleh banyak faktor, seperti karsinogenik lingkungan dan gaya hidup, sehingga berimplikasi terhadap pembentukan sifat yang berbeda dengan sel normal. Salah satu tipe dari kanker kepala leher dengan multiple faktor yaitu NPC (Kanda et al., 2015).

NPC merupakan salah satu keganasan yang terjadi daerah nasofaring yang berbentuk kubus yang terletak dibelakang hidung dengan ukuran 4-5 cm (Herawati, 2019). NPC termasuk kedalam salah satu tumor solid neoplasma dari sel epitel pada dinding lateral nasofaring yang melibatkan Fossa Rosenmuller. Virus EBV bersifat pathogenesis menjadi perhatian utama di dunia karena sudah menginfeksi >90% populasi di Dunia dan sangat berkaitan erat dengan kejadian NPC (Kung & Raab-Traub, 2008; Wei et al., 2011; Wu et al., 2018; Xia et al., 2015).

NPC menjadi kanker yang unik karena tidak ditemukan di daerah Eropa dan Amerika kecuali imigran. Namun, banyak ditemukan di daerah Asia dan beberapa di Afrika dan Eskimo. Menurut data WHO, NPC dibagi menjadi beberapa tipe yaitu (Wei et al., 2011):

1. Tipe 1 keratinizing cell carcinoma cell squamosa
2. Tipe 2 non keratinizing carcinoma cell squamosa
3. Tipe 3 lymphoepitheloma & varian anaplasive yang berhubungan dengan onkogenesis bukan hanya konsekuensi dari virus EBV yang menyerang daerah diatas faring (tenggorokan) dibelakang hidung (Adham et al., 2012a, 2013).

Kelainan genetik sebagai salah satu penyebab proses pembentukan tumor terutama NPC melalui beberapa mekanisme. Salah satunya melalui pembentukan tumor dengan perubahan mekanisme protoonkogen melalui 4 tahapan yaitu mutasi, amplifikasi gen, pengaturan kembali kromosom dan insersi virus genome. Adapun mekanismenya yaitu sebagai berikut:

1. Mutasi: mutasi yang terjadi pada level kromosom dengan tiga tipe mutasi yaitu point mutation, delesi, insersi dan substitusi. Perubahan yang terjadi berakibat pada perubahan rangkaian asam amino sebagai produk dari proses translasi sehingga mempengaruhi fenotipe maupun kegagalan mekanisme.
2. Amplifikasi gen: rangkaian proses ekspresi gen dalam menterjemahkan informasi akhir produk genetik berupa protein. Kejadian karsinoma nasofaring terdapat perubahan pada ekspresi p21 yang mempengaruhi kontrol terhadap stabilitas sel.
3. Pengaturan kembali kromosom: proses yang terjadi yaitu terjadi translokasi pada level gen maupun kromosom menyebabkan adanya lompatan posisi normal sehingga saling berjauhan. Translokasi berimplikasi terhadap perpindahan proto onkogen ke tempat kromosom yang merangsang fungsinya.
4. Insersi genome virus: insersi genome virus terhadap host melalui mekanisme yang kompleks dengan melibatkan induksi peradangan kronis, gangguan genetik host, dan integritas epigenetik dan homeostatis. Hal tersebut, berakibat terhadap ketidakstabilan genome dan regulasi siklus sel terutama dapat menyebabkan kekacauan struktur kromosom normal dan disregulasi genetik.

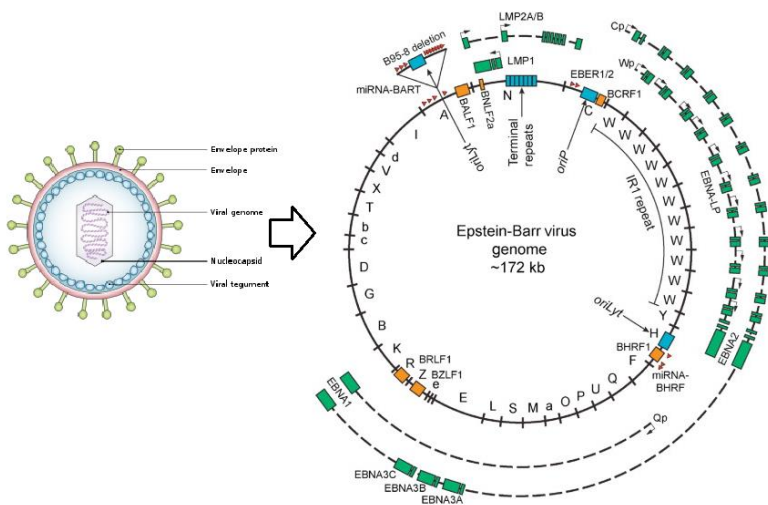
Karsinoma erat kaitanya dengan pengaruh dan kegagalan fungsi dengan perubahan ekspresi yang rendah hasil translasi berupa protein p53 yang disebabkan adanya mutasi. Namun, kejadian yang terjadi pada NPC cukup berbeda dengan adanya peningkatan ekspresi protein p53 yang merupakan implikasi produk akhir dari insersi genome virus EBV (Lung et al., 1998; Y. Sun et al., 1992; Van Tornout et al., 1997; Vogan et al., 1993).

Kasus NPC, gen p53 mengalami perubahan ekspresi yang berbeda dengan karsinoma pada umumnya. Gen p53 pada kasus NPC jarang terjadinya mutasi, tetapi gagal berfungsi dengan baik untuk menginduksi apoptosis yang disebabkan akibat kehilangan mekanisme p14 dalam menjaga kerja p53 untuk menghambat proteolisis (Tulalamba & Janvilisri, 2012). Kegagalan fungsi p53 dalam melakukan proses induksi terhadap proses apoptosis yang berkaitan dengan adanya mutasi pendek pada kromosom 3 dan 9. Hal tersebut berimplikasi terhadap inaktivasi tumor suppressor gene seperti p14, p15 dan p168.

2.3. Hubungan infeksi EBV terhadap kejadian NPC

Virus Epstein-Barr (EBV) merupakan virus herpes yang diketahui menginfeksi mayoritas populasi dunia. EBV juga dikenal sebagai human herpes virus 4 sebagai virus gamma-herpes yang

bermanifestasi dengan berbagai patologi mulai dari mononucleosis menular hingga kanker (Price & Luftig, 2014; Young & Rickinson, 2004). EBV yang merupakan virus DNA tidak memiliki kemampuan reverse transcriptase seperti pada virus RNA sehingga menyebabkan virus ini harus melakukan transformasi untuk melakukan replikasi. Replikasi litik akut pada epitel, EBV menginfeksi sel B di mana seperangkat gen yang terkait dengan latensi dan transkrip diekspresikan (Price & Luftig, 2014). Infeksi EBV terkait dengan sejumlah keganasan yang berbeda yang berasal dari limfoid dan epitel dengan menyumbang lebih dari 1,8% kematian diseluruh dunia terkait dengan kanker. Pada kejadian NPC, genome EBV mengalami insersi kedalam genome host. Urutan genome EBV dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Genome dari Epstein barr virus yang merupakan salah satu faktor penyebab karsinoma nasofaring (Price & Luftig, 2014).

Lawrance dan tim pada tahun 2014 menyatakan, bahwa NPC merupakan jenis karsinoma kepala dan leher yang sangat erat kaitannya dengan infeksi EBV (Young & Dawson, 2014). Pemeriksaan serologi DNA EBV sering dilakukan pada populasi endemik sebagai salah satu protokol standar pemeriksaan NPC. Analisis metilasi pada promotor tumor suppressor genes juga dilakukan sebagai marker komplementari pada awal kasus. Infeksi EBV bukan merupakan satu-satunya faktor onkogenesis NPC, keganasan yang timbul dimungkinkan karena transformasi infeksi EBV yang mengalami reaktivasi dan berkombinasi dengan gen-gen

tertentu atau pada sisi epigenetik. Sebagaimana hasil penelitian Hutajulu pada tahun 2011 yang menunjukkan adanya metilasi pada promotor dari 10 tumor suppressor genes pada penderita NPC (Hutajulu et al., 2011).

Eksresi EBV berkontribusi sebagai onkogenik yaitu latent membrane protein (LMP 1 dan LMP 2). LMP 1 memiliki kekhususan dalam menyerupai TNFR family, dan CD40 berperan dalam menginduksi *signaling pathway* untuk menimbulkan efek pada morfologi dan fenotipe sel epitel. LMP 1 mengandung tiga reseptor persinyalan utama yaitu CTAR1, CTAR2, CTAR3 akan merekrut TNFR-associated signaling adapter protein JAK-3. Mekanisme perekrutan tersebut mengaktifkan melalui beberapa jalur persinyalan NF- κ B, JNK/SAPK, PI3-K/Akt, ERK-MAPK, PLC/PKC dan JAK/STAT yang berperan besar pada prose proliferasi, survival, motilitas dan invasi sel.

LMP2 merupakan produk yang bersifat onkogenik berperan penting dalam latensi EBV pada sel B. Amino terminus dari LMP2A mengandung motif yang sesuai untuk penempelan tirosin kinase Lyn34, Syk dan ubiquitin ligases Nedd4/Itchy35. Mekanisme tersebut mengaktifkan sinyal PI3-K/ Akt, JNK/SAPK, ERK-MAPK, dan Wnt/-katekin yang berperan pada pertumbuhan sel, penghambatan apoptosis dan angiogenesis (Ikeda et al., 2003; Miller et al., 1994; Portis & Longnecker, 2004).

2.4. Penegakan diagnosis NPC

NPC termasuk kedalam tipe kanker yang sangat sensitif terhadap pemberian kemoterapi dan radioterapi. Namun, termasuk kedalam tipe karsinoma yang sangat agresif dalam melakukan proses metastasis dan invasi. Di Indonesia, kejadian keganasan terutama NPC ditemukan banyak terjadi pada tahapan stadium lanjut. Hal tersebut diindikasikan akibat keterlambatan diagnosis dikarenakan letak anatomi, ukuran, dan tidak ada gejala spesifik (Adham et al., 2012b; Wildeman et al., 2013)^{14,5}. Berikutnya juga berimplikasi terhadap prognosis buruk pada pasien yang mengalami keterlambatan penanganan sehingga sebagian besar hanya dapat bertahan selama 5 tahun setelah diagnosis. Perkembangan teknologi molekuler saat ini, memberikan salah satu pemahaman untuk pemecahan permasalahan untuk menemukan metode biomarker yang tepat, specific dan sensitif. Salah satu molekul yang dianggap potensial untuk dikembangkan untuk biomarker yaitu microRNA.

2.5. Ekspresi miRNA pada sirkulasi

a. Biogenesis miRNA

microRNA (miRNA) yang merupakan molekul yang tidak mengkode protein dengan panjang 18-24 nukleotida yang berfungsi sebagai regulator paska transkripsi dengan mentargetkan ratusan hingga ribuan mRNA (Cortez et al., 2011; Gilad et al., 2008; Schwarzenbach et al., 2014). MiRNA menghambat ekspresi protein melalui mekanisme penempelan dengan menghambat atau mendegradasi sekuense mRNA. Penempelan miRNA terhadap sekuense mRNA dapat mempersulit proses penempelan beberapa material yang mendukung proses translasi. Kemampuan lainnya miRNA yang dapat melakukan penempelan sehingga terjadinya proses degradasi sekuense mRNA (Schwarzenbach et al., 2014).

Proses biogenesis miRNA dimulai dengan inisiasi oleh enzim RNA Polymerase II di dalam nukleus yang membentuk primary miRNA (pri-miRNA) yang memiliki struktur cap dan ekor poly A. selanjutnya, RNase III Drosha kompleks membentuk suatu ikatan dengan protein DGCRB8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8). Di dalam nukleus ikatan kompleks protein melakukan proses pemotongan dan pembentukan struktur pri-miRNA sehingga menghasilkan miRNA dalam bentuk pre-miRNA dengan ukuran 60-70 basa nukleotida. Pre-miRNA yang dihasilkan dibawa menuju ke sitoplasma dengan bantuan protein Exportin-5 dan RanGTP (S. L. S. L. Anwar et al., 2019; Schwarzenbach et al., 2014).

miRNA yang telah matang berukuran 18-25 nukleotida telah dilakukan pemotong melalui proses pemotongan pre-miRNA duplex di sitoplasma yang melibatkan RNase III DICER 1 dan TRBP. Terdapat beberapa teori yang membahas fungsional miRNA yang telah matang sebagai regulator post transkripsi yaitu (Schwarzenbach et al., 2014):

1. Hasil pemotongan duplex miRNA akan menghasilkan 2 untai miRNA pada sequence 5' dan 3'. Salah satu sekuense tersebut akan mengalami degradasi sedangkan salah satunya akan berfungsi sebagai miRNA yang matang.
2. Kedua untai miRNA dapat menjadi miRNA yang matang dan menjalankan fungsinya sebagai regulator. Beberapa contoh miRNA fungsional dengan untai 3' atau 5'.

Mekanisme penempelan miRNA terhadap messenger RNA (mRNA) melalui beberapa tahapan dan mekanisme yang melibatkan komponen molekul dalam pembentukan protein kompleks. miRNA yang telah matang akan melakukan proses

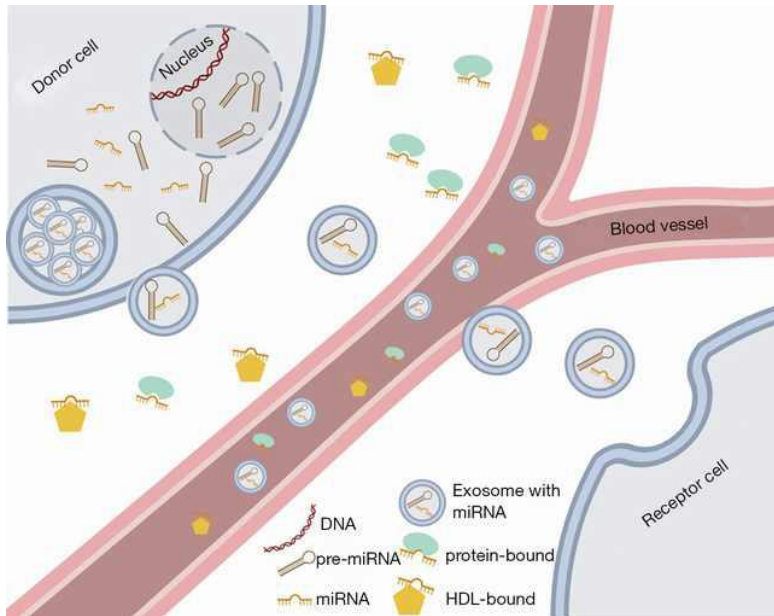
pengikatan dengan kompleks protein Arganoute (AGO) dan GW182 yang dikenal dengan sebutan RNA Induced Silencing complex (RISC). Kompleks RISC memiliki kemampuan dalam melakukan proses pengikatan dengan untai mRNA pada posisi 3'UTR.

Sekuense miRNA tidak akan menempel secara penuh atau disebut komplementer terhadap sekuense mRNA. Sekuense miRNA yang akan berikatan dengan Sekuense mRNA memiliki jumlah sekitar 7-9 basa yang disebut dengan daerah “*seed region*” atau daerah penempelan dengan kplementasi sekuense yang memiliki daerah pada posisi 5' dari miRNA (Peter, 2010; Xu et al., 2014). Hal tersebut telah dikemukakan oleh Watson-crick yang menunjukan daerah yang conserve pada daerah 3' tidak mengkode protein (3'UTR) gen target dan ditemukan secara sporadic pada daerah 5' dan ORF (*Open Reading Frame*).

b. Sirkulasi miRNA

miRNA merupakan salah satu molekul yang ditemukan didalam sirkulasi bersamaan dengan material genetik lainnya (Schwarzenbach et al., 2014). miRNA tidak hanya ditemukan di dalam sel, tetapi juga ditemukan pada cairan tubuh dan berada pada sirkulasi. Beberapa peneliti telah banyak melaporkan bahwa miRNA bisa ditemukan dan dilakukan proses kuantifikasi pada cairan tubuh seperti pada saliva, plasma, serum, urine, air susu, asites, semen, cairan serebrospinal dan air mata (Baranwal & Alahari, 2010; Chen et al., 2008; Gurtan & Sharp, 2013; Jiang et al., 2010; Mo et al., 2012; Schwarzenbach et al., 2014; H. Z. Sun et al., 2019). Terdapat beberapa tahapan dan mekanisme miRNA yang berada dalam cairan tubuh ataupun yang ditemukan pada sirkulasi seperti:

1. Pelepasan miRNA oleh sel melalui mekanisme apoptosis dan nekrosis dari sel sehingga material genetik yang terdapat didalam sel dilepaskan kedalam sirkulasi (Schwarzenbach et al., 2014).
2. miRNA yang berada di sirkulasi disekresikan oleh sel dalam berbagai mekanisme seperti komunikasi sel. Terdapat beberapa material genetik yang bersama-sama disekresikan didalam sel seperti protein, DNA, dan RNA yang dikemas dalam mekanisme mikrovesikel misalnya eksosom (Nedaeinia et al., 2017; Saini, 2016). Mekanisme eksresi miRNA melalui mekanisme komunikasi sel dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Mekanisme sirkulasi miRNA melalui mekanisme komunikasi sel. miRNA disekresikan melalui beberapa mekanisme seperti enkapsulasi protein kompleks atau disebut juga eksosom (Foessl et al., 2019).

Sirkulasi miRNA pada umumnya cukup stabil berada di luar sel, hal tersebut dikarenakan miRNA terlindungi melalui ikatan pada kompleks ribonucleoprotein atau lipoprotein densitas tinggi atau dilepaskan dari sel dalam vesikel lipid, mikrovesikel, eksosom, badan apoptosis, mikrovesikel, atau eksosom (S. L. Anwar et al. 2019; Ji and Guo 2019; Nedaeinia et al. 2017). Hal tersebut yang menyebabkan miRNA dapat terlindungi pada plasma dan serum walaupun terdapat ribonuklease. Terdapat beberapa teori yang menyebabkan miRNA tetap stabil yang telah disampaikan mengenai mekanisme perlindungan didalam sirkulasi:

1. miRNA dilindungi oleh partikel didalam mikro vesikel seperti eksosome.
2. miRNA berasosiasi dengan protein lain seperti RNA-induced silencing complex (RISC)
3. miRNA mengalami modifikasi seperti metilasi, adenilasi, atau uridilasi.

Kestabilan miRNA pada sirkulasi telah banyak dibuktikan oleh banyak peneliti, bahkan telah disimpan dalam bentuk serum secara konsisten tetap stabil walaupun mengalami kondisi fisiko-kimia ekstrim yang dapat menurunkan konsentrasi RNA seperti suhu tinggi, tingkatan pH yang rendah-tinggi, masa penyimpanan yang panjang dan *freeze-thawing*. Ditambah lagi, hal tersebut telah dibuktikan pada miRNA yang telah diisolasi dari urine kemudian disimpan pada -80°C dan -20°C dalam keadaan freeze thawing (Glinge et al., 2017; Grasedieck et al., 2012).

c. Deteksi miRNA pada cairan tubuh

Metode deteksi miRNA dengan tingkat akurasi berupa sensitivitas dan spesifitas yang masih menjadi tantangan. Terutama dikarenakan jumlah yang rendah tergantung dengan sampel yang digunakan dan ukuran yang kecil. Perkembangan teknologi hingga hari ini, memberikan kemudahan dalam melakukan pemilihan metode dalam mengkuantifikasi miRNA. Namun, terdapat hal-hal yang masih harus menjadi pertimbangan terutama tujuan disaat memilih metode tertentu mengingat setiap metode memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Beberapa metode yang paling umum digunakan untuk mempelajari miRNA yaitu Next Generation Sequencing (NGS), Microarray, Nanostring dan *quantitative* PCR (qPCR).

Metode yang paling potensial untuk dapat digunakan dalam pemeriksaan klinis pasien yaitu qPCR. Metode Qpcr merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk melakukan proses kuantifikasi aplikasi klinis, disebabkan beberapa kelebihan metode tersebut. Beberapa kelebihan qPCR untuk dapat digunakan diaplikasi klinisi yaitu

1. Jumlah sampel yang kecil: pemeriksaan miRNA dari sampel plasma / serum tidak membutuhkan sampel yang besar dalam melakukan pemeriksaan. Sejumlah 200 ul sampel plasma telah dapat menarik kesimpulan dari hasil pemeriksaan. Dibandingkan dengan metode lainya yang membutuhkan jumlah sampel yang lebih besar.
2. Murah: biaya yang murah menyebabkan metode ini potensial untuk dapat digunakan untuk pemeriksaan. Pemeriksaan yang sangat terjangkau dibandingkan metode pemeriksaan lainya, sehingga dapat memberikan kemudahan bagi para pasien untuk melakukan pemeriksaan bahkan untuk melaksanakan screening awal pemeriksaan rutin.
3. Tidak memerlukan teknisi khusus: beberapa teknologi lainya untuk dapat melakukan proses pemeriksaan dan interpretasi

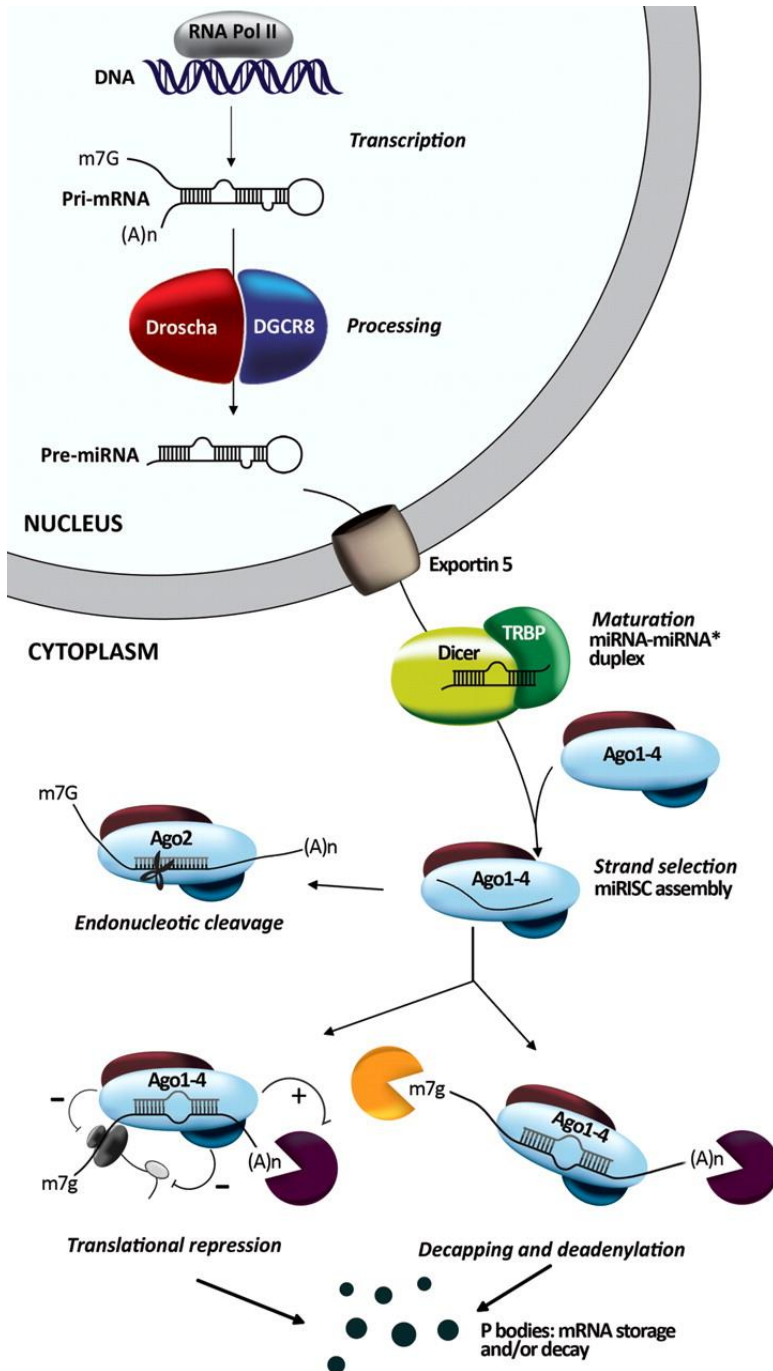
hasilnya membutuhkan teknisi khusus, sehingga siapapun tenaga teknis di klinik dapat melakukannya. Namun, sebaliknya misalnya pada penggunaan NGS yang membutuhkan bioinformatika untuk interpretasi hasilnya.

4. Sensitifitas dan specifitas tinggi: qPCR merupakan generasi kedua PCR sangat sensitif dan spesifik untuk mengkuantifikasi RNA, walaupun, hanya membutuhkan input RNA dalam jumlah yang kecil.

d. Peran mikroRNA pada perkembangan NPC

miRNA yang merupakan untranslated region non coding nukleotida RNA pendek 18-24 yang mengatur ekspresi gen pada urutan basa tertentu pada mRNA, hasilnya mRNA didegradasi atau terjadi penghambatan translasi. Ekspresi miRNA berperan penting dalam mengatur proliferasi sel, apoptosis, dan differensiasi (Esteller, 2008). Gen kehilangan aktivitasnya sebagai akibat dari pengikatan miRNA pada mRNA target. Beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk mengetahui regulasi miRNA terhadap karsinoma menunjukan adanya perbedaan profil miRNA antara jaringan normal dan jaringan tumor yang berbeda. miRNA tidak hanya berperan terhadap terjadinya karsinoma tetapi terhadap penyakit lainnya. Beberapa penelitian telah mempelajari bahwa miRNA merupakan multiple target yang terlibat pada beberapa penyakit yang berhubungan dengan multiple proses seluler, dan berperan pada tumorigenesis dan perkembangan karsinoma (Kapinas et al., 2009; Xiong et al., 2010; J. J. Zhao et al., 2010).

Terdapat beberapa mekanisme regulasi dari miRNA untuk menargetkan mRNA diekspresikan dapat dilihat pada Gambar 3. miRNA ditemukan di semua kromosom pada manusia, kecuali pada kromosom Y, yang disintesis oleh RNA Polymerase II ke dalam struktur Hairpin yang disebut Pri-miRNAs yang ditranskripsi pada daerah intron61. Pri-miRNAs yang terbentuk dipotong oleh RNase III yaitu type Drosha dan protein lainnya (Drosha kompleks) di dalam nukleus membentuk Pre-miRNA. Pre-miRNA dibawa dari Nukleus ke dalam sitoplasma menggunakan Exportin-5 dan RanGTP. Pre-miRNA berbentuk duplex dilakukan pemotongan oleh RNase III endonuklease Dicer menjadi single strand miRNA yang mature. Single strand miRNA akan berikatan dengan mRNA target. miRNA yang berikatan dapat memengaruhi jalur translasi yang memungkinkan mRNA ditranslasikan atau didegradasi, sehingga miRNA dapat mempengaruhi banyak jalur signaling dalam aktivitas sehingga perubahan sehingga mempengaruhi perkembangan karsinoma.



Gambar 3. Biogenesis microRNA (Ohlsson Teague et al., 2009).

NPC, diperkirakan miRNA ditranskripsi oleh genom virus, sehingga memblokir ekspresi seluler proapoptosis yang mengaktifkan beberapa jalur proliferasi dan diduga menjadi penyebab terjadinya karsinoma. miRNA sendiri dapat bersifat onkogenik maupun gen supresor tergantung sifat dari gen yang menjadi targetnya (Ferracin et al., 2011; Leivonen et al., 2011).

miRNA tidak hanya terdapat di dalam sel, tetapi juga terdapat pada sirkulasi yang reliabel untuk digunakan sebagai suatu biomarker dan respon terapi yang bersifat minimal invasif sehingga dapat mengurangi kesakitan terhadap pasien. Penelitian sebelumnya, miRNA dapat ditemukan pada cairan tubuh pada untuk mengetahui perbedaan tingkatan ekspresi miR-629 dan miR-660 pada darah dengan tingkat sensitivitas dan spesifitas 100% (Leivonen et al., 2011). Beberapa penelitian lainya juga telah melaporkan beberapa miRNA yang dapat diketahui mengalami peningkatan ekspresi, seperti miR-141 pada sampel serum pasien NPC dan kanker prostat (Tan et al., 2016; Zedan et al., 2020).

Secara umum, penelitian mengenai miRNA berbasis minimal invasif menggunakan sampel plasma dan serum, tetapi baru-baru ini banyak penelitian yang menyatakan dapat mendeteksi miRNA dengan menggunakan sampel cairan tubuh lainya seperti air mata, air susu, cairan bronchial, kolostrum, dan seminal, amniotik, pleural, peritoneal, dan cairan cerebro spinal.

miRNA yang dieksresikan kedalam sirkulasi bersifat sangat stabil. Kestabilan miRNA pada cairan tubuh karena dipengaruhi pembungkusan oleh lipoprotein kompleks termasuk membran kecil vesicle yang disebut eksosome. Kestabilan miRNA termasuk dalam keadaan yang tidak normal seperti pengaruh suhu, pH, penyimpanan dan freeze-thaw (Grasedieck et al., 2012). Keberadaan miRNA dalam sirkulasi darah terjadi akibat dari mekanisme apoptosis dan nekrosis. Sel yang mengalami nekrosis maupun apoptosis melepaskan material genetiknya yang selanjutnya miRNA akan berikatan dengan AGO2 dengan endosomal sistem eksosom.

BAB III. METODE QUANTIFIKASI DAN ANALISIS EKSPRESI

3.1. Pengkoleksian Sampel

a. Etika Penelitian

Penelitian yang dilakukan harus mendapatkan izin etik dari komisi etik yang terkait serta informed consent yang menyatakan kesiapan dari participant dalam mengikuti jalannya penelitian. Informed consent dan ethical clearance penting untuk didapatkan guna melindungi semua subjek yang mengikuti penelitian serta menguji apakah penelitian ini layak atau tidak untuk dilakukan dalam prespektif pendekatan keamanan serta resiko yang kemungkinan didapatkan oleh peserta.

Etika penelitian telah didapatkan dari 2 institusi tempat pengkoleksian sampel yaitu Komisi Etik Fakultas Kedokteran UGM – RSUP Dr. Sardjito dan Komisi Etik RS Nasional Kanker Dharmais.

b. Subjek penelitian

Sampel penelitian yang diikutkan dalam penelitian ini yaitu pasien yang telah tegak diagnosis secara biopsi, klinikopatologis, dan histopatologis sebagai penderita Karsinoma Nasofaring (NPC). Darah tepi dikoleksi dari peserta yang terlibat dalam penelitian ini sebanyak 3 cc dengan menggunakan tabung EDTA.

Sampel yang telah dikoleksi kemudian dipisahkan antara plasma dan serum dengan menggunakan sentrifuge pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Sampel serum dan plasma yang telah didapatkan disimpan di kulkas -80° hingga tahapan pekerjaan selanjutnya dilakukan. Karakteristik sampel yang digunakan dapat dilihat pada penelitian sebelumnya (Wardana et al., 2020).

Adapun kriteria inklusi subjek yang diikutkan dalam kegiatan penelitian sebagai berikut:

- Kriteria Inklusi

1. Pasien NPC yang diikutkan dalam penelitian merupakan pasien yang belum pernah mendapatkan terapi, baik kemoterapi neoajuvan dan radioterapi.

2. Pasien NPC bukan merupakan pasien yang telah mengalami metastasis.
 3. Pasien NPC sebagai subjek bersedia untuk mengikuti jalanya penelitian.
- Kriteria Eksklusi
1. Subjek pernah/ memiliki riwayat keganasan selain NPC.
 2. Subjek sebelumnya pernah mendapatkan pengobatan baik kemoterapi neoadjuvan dan radioterapi.
 3. Subjek NPC yang telah mengalami metastasis.

Sedangkan kontrol yang diikuti dalam kegiatan ini yaitu subjek yang diketahui dari RM (Rekam Medis) dan data laboratoirum yang belum pernah memiliki riwayat keganasan ataupun gejala keganasan. Subjek kontrol diambil dari RSK Dharmais, RSUP Sardjito dan FKMK UGM yang kontrol kesehatan dan dinyatakan sehat. Adapun karakteristik sampel yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Karakteristik klinikal patologi yang terlibat dalam penelitian (*E. Savitri et al., 2017; Eka Savitri et al., 2019; Setiasari et al., 2020; Wardana et al., 2020*).

Karakteristik	N=240	Per cent (%)
Kontrol	160	33%
Karsinoma Nasofaring	80	67%
Umur		
Median		47
Range		14-68
Kelamin		
Pria	34	66%
Wanita	18	34%
Histologi		
WHO I	0	0%
WHO II	24	15%
WHO III	49	31%
WHO IV	87	54%
N Lymph Node		
N0	10	6%
N1	43	27%
N2	58	36%
N3	49	31%
T Classification		
T1	6	4%
T2	71	44%
T3	37	23%
T4	46	29%

Tabel 3.2. Karakteristik klinikal patologi yang terlibat dalam penelitian (*E. Savitri et al., 2017; Eka Savitri et al., 2019; Setiasari et al., 2020; Wardana et al., 2020*). (lanjutan)

Karakteristik	N=240	Per cent (%)
Klinikal stadium		
I	0	0%
II	25	16%
III	49	31%
IV	86	54%
Patologi Anatomi		
Undifferentiated	31	19%
Non-Keratin, Undif Sub Type	117	73%
Non-Keratin, Differentiated	9	6%
Keratin	3	2%
EBV - EA		
Postif	132	83%
Negatif	28	18%
EBV - EBNA		
Positif	111	69%
Negatif	49	31%
EBV - VCA		
Positif	145	91%
Negatif	15	9%

c. Teknik Pengambilan Sampel

Sampel yang dikoleksi dilakukan pengambilan dengan pendekatan konsektif yang artinya semua subjek yang memenuhi kriteria dilakukan pengkoleksian sampel sehingga diharapkan dapat memenuhi jumlah minimal sampel.

3.2. Isolasi Plasma

Sampel darah untuk penelitian diambil dari pasien baru yang terdiagnosis NPC. Darah yang diambil sebanyak ± 3 cc. Isolasi plasma dilakukan beberapa saat setelah proses pengambilan darah guna menjaga kualitas pemeriksaan miRNA di dalamnya. Proses ini dilakukan dengan memasukkan darah ke dalam vacutainer EDTA kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dengan menggunakan pipet filter untuk dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml. Plasma yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu -80°C .

3.3. Isolasi RNA miRCURY RNA Isolation Kit-Biofluid

Isolasi ini menggunakan miRCURY RNA Isolation Kit-Biofluid (Cat No. 300112, Exiqon). Sampel plasma yang dicairkan kemudia sentrifuga dengan kecepatan 3000g, selama 5 menit. Pindahkan 200 μ L sampel ke dalam tabung baru, dan tambahkan 60 μ L Lysis Solution BF, lalu vortex selama 5 detik. Tambahkan juga 20 μ L Protein Precipitation Solution BF, vortex selama 5 detik. Inkubasi dalam suhu ruang selama 1 menit. Sentrifuga 11.000 g, selama 3 menit.

Supernatant bening yang didapatkan, dipindahkan ke dalam tabung koleksi baru (2 mL dengan tutup). Tambahkan 270 μ L isopropanol, vortex selama 5 detik. Pasangkan microRNA Mini Spin Column BF pada tabung koleksi. Masukkan 300 μ L sampel dalam kolom. Inkubasi 2 menit pada suhu ruang, kemudian sentrifuga 11.000 g, selama 30 detik. Cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi dibuang, kemudian pasang kembali tabung koleksi. Masukkan sisa sampel ke dalam kolom. Inkubasi 2 menit pada suhu ruang, kemudian sentrifuga 11.000 g, selama 30 detik. Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi, kemudian pasang kembali tabung koleksi. Tambahkan 700 μ L Wash Solution 2 BF ke dalam kolom. Sentrifuga 11.000 g, selama 30 detik. Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi, kemudian pasang kembali tabung koleksi. Tambahkan 250 μ L Wash Solution 2 BF ke dalam kolom.

Sentrifuga 11.000 g, selama 2 menit. Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi, kemudian pasang kembali tabung koleksi. Tambahkan 50 μ L rDNase langsung ke dalam membrane kolom. Inkubasi pada suhu ruang, selama 15 menit. Tambahkan 100 μ L Wash Solution 1 BF ke dalam kolom. Sentrifuga 11.000 g, selama 30 detik. Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi, kemudian pasang kembali tabung koleksi. Tambahkan 700 μ L Wash Solution 2 BF ke dalam kolom. Sentrifuga 11.000 g, selama 30 detik. Buang cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi, kemudian pasang kembali tabung koleksi. Tambahkan 250 μ L Wash Solution 2 BF ke dalam kolom. Sentrifuga 11.000 g, selama 2 menit. Buang tabung koleksi, ganti dengan tabung 1,5 mL untuk menampung RNA. Tambahkan 25 μ L RNase free water. Inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian sentrifuga 11.000 g selama 1 menit. Tambahkan kembali 25 μ L RNase free water. Inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian sentrifuga 11.000 g selama 1 menit. RNA terlarut dalam RNase free water di dalam tabung koleksi 1,5 mL. Buang kolom, kemudian tutup tabung koleksi. Simpan RNA dalam lemari

pendingin -20°C untuk penyimpanan beberapa hari, akan tetapi jika akan disimpan dalam waktu lama RNA disimpan di lemari pendingin -70°C.

3.3.1. Sintesis cDNA

Pembuatan cDNA dilakukan dengan kit Universal cDNA Synthesis kit II, 8-64 rxns (Cat No.203301, Exiqon). Keluarkan RNA yang telah diisolasi dari lemari pendingin -20°C. Letakkan pada wadah tabung yang telah dialasi dengan ice pack. Biarkan mencair secara perlahan kemudian homogenisasi dengan vortex dan spin down. Ambil 5x reaction buffer, nuclease free water, dan spike in (sp6) dari lemari pendingin -20°C. Cairkan 5x reaction buffer, nuclease free water, dan spike in (sp6) dalam suhu ruang. Homogenisasi dengan vortex kemudian spin down. Simpan dalam wadah tabung yang telah dialasi dengan ice pack. Ambil enzyme mix dari dalam lemari pendingin -20°C. Homogenisasi dengan mengetuk tabung secara pelan kemudian spin down.

Pembuatan dan pembagian master mix dilakukan dengan mencampur bahan-bahan dengan metode pipeting berupa 5x reaction buffer dengan volum 4 µL, Nuclease Free water 9 µL, Enzyme mix 2 µL, dan spike in (sp6) 1 µL sehingga total dari master mix tersebut berjumlah 16 µL. Kemudian, Homogenisasi dengan vortex kemudian spin down. Bagi ke dalam masing-masing tabung sebanyak 16 µL per reaksi. Masukkan 4 µL sampel RNA ke dalam tabung, kemudian spin down. Tabung dimasukkan ke dalam alat thermal cycler Biorad C1000 dan dijalankan sesuai dengan program yang menggunakan tiga siklus, yang pertama dengan temperatur 42° C selama 60 menit, lalu 95°C selama 5 menit dan 4°C. Penyimpanan hasil sintesis cDNA dilakukan dalam lemari pendingin -20°C untuk penyimpanan beberapa hari, jika akan disimpan dalam waktu yang lama diletakkan pada lemari pendingin -80°C.

3.4. Quantitative PCR

Bahan untuk real time qPCR adalah ExiLent SYBR Green master mix, 2.5 mL (Cat No. 203402, Exiqon), primer set (forward dan reverse) miRNA, cDNA yang telah dibuat sebelumnya. Keluarkan RNA yang telah diisolasi dari lemari pendingin -20°C. Letakkan pada wadah tabung yang telah dialasi dengan ice pack. Biarkan mencair secara perlahan. Homogenisasi dengan vortex kemudian spin down. Encerkan cDNA dengan RNase free water dengan perbandingan 1:80, yaitu 5 µL cDNA dengan 395 µL RNase free water.

Homogenisasi dengan vortex kemudian spin down. Simpan dalam wadah tabung yang telah dialasi dengan ice pack. Ambil SYBR Green master mix dan primer set miRNA dan primer kontrol u6 snRNA dari lemari pendingin -20°C. Cairkan dalam suhu ruang. Homogenisasi SYBR Green Master Mix dengan mengetuk tabung pelan kemudian vortex dan spin down. Homogenisasi primer dengan vortex kemudian spin down. Buat campuran master mix sebanyak 3 buah: kontrol spike in u6, kontrol u6 snRNA, dan miRNA yang menjadi target. Campurkan 5 µl SYBR Green master mix, dan 1 µl PCR primer mix (untuk masing-masing campuran dibedakan). Homogenisasi dengan vortex kemudian spin down. Kemudian bagikan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 6 µl master mix. Masukkan 4 µl sampel cDNA yang telah diencerkan sebelumnya. Set program real time qPCR pada mesin Biorad CFX 96. Adapun beberapa siklus yang digunakan pada qRT-PCR yaitu tahapan denaturasi dengan suhu 95°C selama 10 menit, lalu amplifikasi selama 40 siklus. Suhu 95°C selama 10 detik dan 60 °C, 1 menit ramp-rate 1,6 °C/s. Tahapan terakhir optical read dan analisis kurva leleh dan pilih ya.

3.5. Analisis Data

Data analisis menggunakan beberapa software offline dan online. Pertama, qPCR data dianalisis dengan menggunakan software Biorad CFX Manager™ Software untuk memperoleh nilai *cycle quantification* (Cq), quantification curve dan melting curve. Data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan software GenEX 5 untuk melihat tingkatan profile ekspresi miRNA pada pasien dibandingkan dengan kontrol. Analisis statistik yang dianalisis menggunakan metode relatif kuantifikasi yang membandingkan ekspresi dengan reference gene dan kelompok target dengan menggunakan metode Livak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yang digunakan untuk menghitung tingkatan ekspresi gen (Livak & Schmittgen, 2001). Analisis menggunakan student T-test. Untuk mengetahui signifikansi perbandingan ekspresi.

Analisis data berupa *survival rate* serta *cox regression* menggunakan beberapa online dan offline software untuk menganalisis data hasil ekspresi. Beberapa software yang digunakan yaitu Graphpad Prism 6, R2: Genomic Analysis and visualization platform, dan sigmaplot.

BAB IV. MEKANISME KEJADIAN NPC

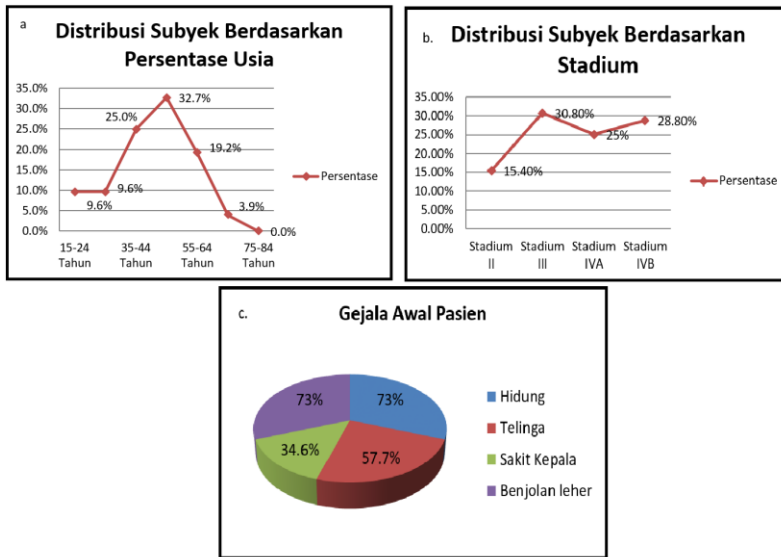
4.1. Gambaran distribusi dan Faktor Resiko NPC

a. Distribusi Penderita NPC.

NPC merupakan keganasan yang pada saat ini menjadi perhatian khusus di dunia, dengan tingkat persebaran, mortalitas dan insidensi yang tinggi (gambar 2.1). Tahun 2012, penderita NPC diseluruh dunia berjumlah 86.691 kasus yang terdiri dari 60.896 pada laki-laki dan 25.795 pada perempuan (Adham et al., 2012a; Kemenkes RI, 2018; Salehiniya et al., 2018). Di Indonesia distribusi NPC tersebar hampir terjadi diseluruh kepulauan di Indonesia. Beberapa dekade terakhir terdapat perubahan distribusi dan gejala pada kejadian karsinoma NPC (gambar 4 huruf c). Perubahan yang terjadi tidak hanya terlihat pada tingkatan insidensi dan mortalitas. Namun, terdapat juga pada perubahan pola pada distribusi umur, serta kebanyakan dari penderita datang untuk melakukan pengecekan secara klinis pada saat tahapan stadium lanjut (gambar 4 huruf a).

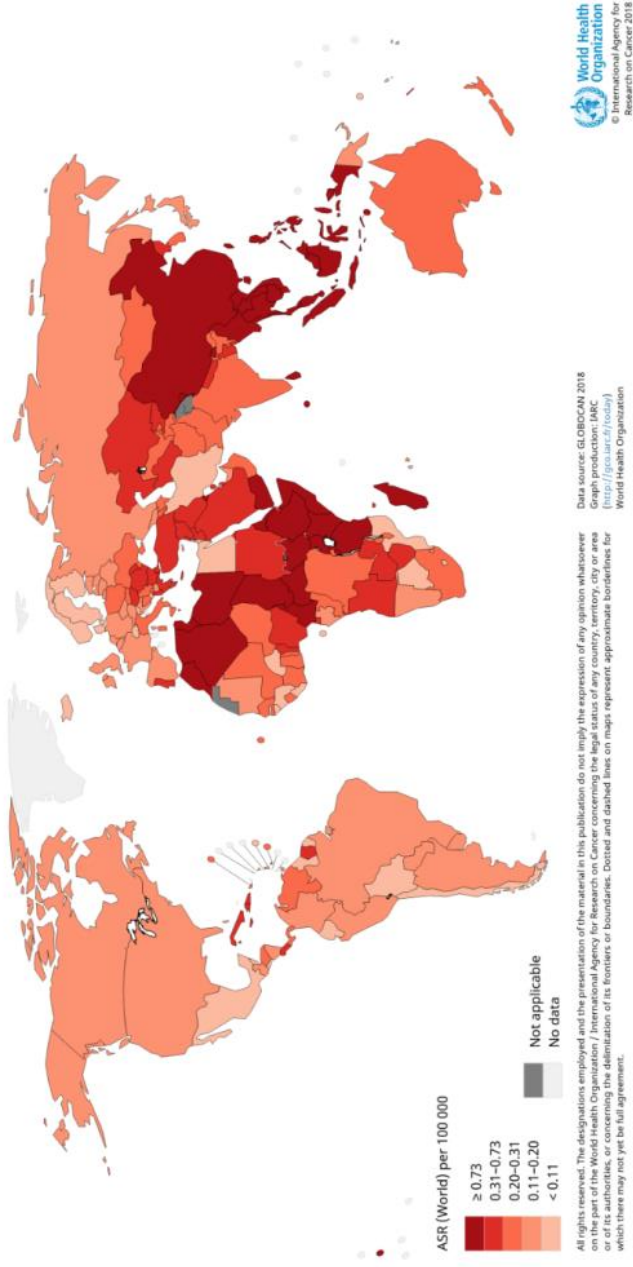
Kebanyakan dari pasien yang datang dengan berbagai keluhan seperti gangguan pada daerah hidung, telinga, nyeri kepala dan terdapat benjolan di leher (gambar 4. huruf c). Hal tersebut, mengindikasikan terjadi gejala awal diagnostik secara klinis pada kejadian NPC. Perubahan distribusi terlihat jelas pada persebaran kejadian berdasarkan umur dan stadium pasien yang terdiagnosis secara klinikal-histopatologi. Penderita NPC saat ini diketahui tidak hanya menyerang penderita dengan rentang usia ≥ 35 tahun tetapi banyak ditemukan pada penderita dengan rentan usia 15-24 tahun (9.6%) dan $>85\%$, dengan diagnosis berada pada stadium lanjut.

Rendahnya kesadaran masyarakat mengenai kesehatan dengan tidak rutinya kesadaran melakukan pengecekan pada fasilitas kesehatan, tidak ada gejala klinis yang spesifik, letak anatomi serta ukuran yang kecil menambah sulitnya penyakit ini teridentifikasi. Keluhan yang paling sering ditemui yaitu terdapat pada bagian hidung, telinga, sakit kepala, dan pada beberapa kasus ditemukanya benjolan pada daerah leher.



Gambar 4. Distribusi dan gejala awal penderita karsinoma Nasofaring yang teridentifikasi. a. berdasarkan umur, b. berdasarkan stadium dan c. gejala awal penderita NPC (Herawati, 2019; wardana et al., 2016).

Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2018, nasopharynx, both sexes, all ages

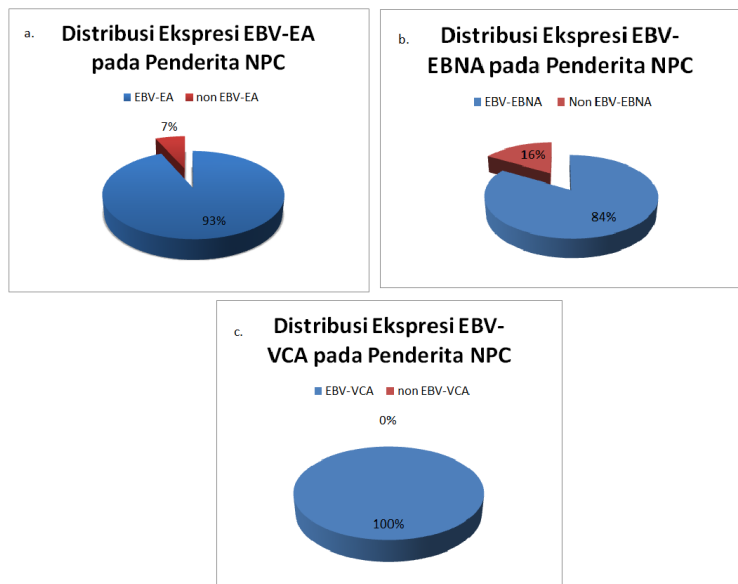


Gambar 5. Tingkatan mortalitas kejadian Karsinoma Nasofaring di seluruh Dunia. Kuantifikasi dilakukan pada ASR Worl per 100.000 dimana perbedaan intensitas warna merah menunjukkan semakin tingginya tingkat mortalitas pada suatu wilayah atau Negara. Indonesia termasuk kedalam Negara yang memiliki tingkatan mortalitas ertinggi di dunia pada kejadian karsinoma nasofaring dengan tingkatan rate ≥ 0.73 (Barnes et al., 2005; IARC & WHO, 2015; World Health Organization, 2019)

b. Infeksi EBV terhadap kejadian NPC

EBV sangat erat kaitanya sebagai salah satu penyebab pada NPC WHO type III yang diindikasikan telah menginfeksi hampir keseluruhan populasi dunia (Kang et al., 2015; wardana et al., 2016). EBV diketahui banyak menjadi penyebab dari karsinoma tidak hanya pada kasus NPC tetapi juga ditemukan pada kasus African burkit lymphoma (Rowe et al., 2014), Hodgskin disease (Lander et al., 2001; Muñoz et al., 1978), Gastric karsinoma (Gulley, 2015; Liang et al., 2014). Salah satu metode deteksi infeksi EBV pada saat ini berdasarkan protein yang diekspresikan dan representative terhadap kejadian karsinoma. Protein-protein yang standart dilakukan untuk pemeriksaan EBV yang berhubungan dengan kejadian NPC yaitu EBV-EA, EBV-EBNA, dan EBV-VCA.

Data yang teregistrasi menyatakan bahwa EBV sangat erat kaitanya pada keganasan tersebut dapat dilihat pada distribusi ekspresi EBV (gambar 6).



Gambar 6. Ekspresi protein EBV yang ditemukan terekspresi pada pasien-parsien penderita karsinomana nasofaring, a. distribusi penderita NPC dengan ekspresi EBV-EA, b. distribusi penderita NPC dengan ekspresi EBV-EBNA, c. distribusi penderita NPC dengan ekspresi EBV-VCA (Herawati, 2019; wardana et al., 2016).

Diagnosis secara klinis berdasarkan pemeriksaan viral protein yang berhubungan dengan NPC, EBV- EA (early antigen), EBV-VCA (viral capsid), dan EBV-EBNA (EBV nuclear antigen). Screening yang tepat sejak dini berhubungan dengan pendekatan klinis yang dilakukan terhadap penderita. Pemeriksaan protein EBV pada serum memiliki tingkatan sensitivitas dan spesifitas cukup rendah dikarenakan banyak faktor patofisiologis yang terkait dengan infeksi EBV.

Infeksi Epstein Barr melalui dua mekanisme yaitu litik dan latensi, replikasi dari virus didalam sel menghasilkan beberapa produk yang dikode oleh EBV. Beberapa penelitian melaporkan bahwa ada enam nuclear yang dikode EBV (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C, -LP), 3 latensi membran protein (LMP1, 2A, dan 2B), dua nuclear RNA yang mengkode EBV (EBER 1, EBER 2) dan diketahui memiliki sifat sebagai onkoprotein (Fernandez et al., 2009; Lo et al., 2006; Tao & Chan, 2007). Gen yang dikode oleh EBV yang diketahui memiliki peran besar dalam perkembangan karsinoma nasofaring yaitu LMP 1. LMP 1 diketahui mengaktifkan beberapa jalur signaling seperti NFkB, JNK, JAK, STAT, dan jalur PI-3K. LMP 1 juga diketahui dapat mengaktifkan beberapa gen antiapoptosis (Eliopoulos & Young, 2001).

Terjadinya perubahan dan proses yang kompleks pada sel terkait infeksi dari latensi EBV yang biasanya memengaruhi tumor supresor p53 tetapi tidak pada kasus karsinoma nasofaring. Ekspresi p53 yang diketahui normal namun terdapat perubahan ekspresi pada p14, p15, dan p16 yang berperan besar sebagai stabilisasi serta dapat memblokir fungsi dari p53 yang berperan sebagai faktor transkripsi sehingga menyebabkan terjadinya overekspresi pada beberapa gene terkait perkembangan karsinoma (Kwong et al., 2002).

miRNA akan dilepaskan ke dalam sirkulasi dengan mekanisme apoptosis dan nekrosis termasuk RNA dan DNA pendek dengan pengikatan protein spesifik AGO2 dan eksosome yang menggambarkan proses yang terjadi di dalam sel (Schwarzenbach et al., 2014). Hasil dari apoptosis dan nekrosis sel disekresikan kedalam darah dengan penggabungan mikrovesikel seperti eksosom dan bagian sel apoptosis, terjadinya pembentukan RNA binding protein yang melindungi dari aktivitas RNase.

Penempelan dan pengenalan dari miRNA dipengaruhi oleh komplemen basa nukleotida yang terletak pada bagian lipatan tengah dari RISC dan cleaving mRNA oleh protein AGO yang menghalangi proses translasi⁸³. Ada tiga

mekanisme yang dapat dilakukan oleh mikroRNA dalam proses penghambatan maupun aktivasi dari ekspresi gen, yaitu penempelan pada 3'UTR dan 5'UTR, serta penempelan pada posisi OPR.

4.2. Karsinogenik

Beberapa peneliti telah banyak melaporkan seperti pada penderita NPC pada etnik India dan cina di singapura (Cao et al., 2011). Hal tersebut berimplikasi terhadap eratnya kaitan antara kejadian NPC terhadap faktor genetik dan ko-faktor lainnya yang mempengaruhi stabilitas genetik. Namun, terdapat material lainnya yang diketahui berperan besar sebagai karsinogenik yang berasal dari makan dan berhubungan erat pada kejadian NPC yaitu Nitrosamin.

Nitrosamine merupakan gugus nitroso dari alkil bebas yang berbentuk nitrit yang kemudian berikatan dengan asam amino dan dapat menyebabkan alkilasi pada DNA. Hal tersebut, dapat berdampak terhadap perubahan kestabilan DNA sehingga dapat berakibat terjadinya kanker (Martelli et al., 2007; Stepanov & Hatsukami, 2020). Kejadian NPC nitrosamine berfungsi sebagai senyawa intermedia yang menghasilkan molekul bersifat menyerang DNA dan mengakibatkan mutasi. Beberapa enzim yang dihasilkan seperti CYP2E1, GSTM1, dan GSTT.

Beberapa karsinogen lainnya seperti rokok juga dapat mempengaruhi enzim GSTM1 dan GSTT yang sangat diperuka pada proses detoksifikasi karsinogen hidrokarbon aromatic polisiklik (Abdel-Shafy & Mansour, 2016; Dasari et al., 2018). Perubahan dari GSTM1 dan GSTT1 sangat erat kaitanya dengan kejadian beberaa kanker seperti kanker mulut, paru, kemih dan kanker payudara (Viallard & Larrivé, 2017; S. Wang et al., 2020; Z. J. Zhang et al., 2011). Rokok merupakan penyebab utama keganasan seperti kanker laring, rongga mulut dan faring, paru, esophagus, serta kandung kemih. Nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) merupakan salah satu agen yang bersifat genotoksi dan karsinogen dari ratusan senyawa penyebab terjadinya kanker.

Hubungan rokok dan polimorfisme hampir semua karsinogen menyebabkan terjadinya perubahan urutan materi genetik seperti terjadinya mutasi, peningkatan defisiensi enzim yang menyebabkan proses preparasi DNA terganggu, perubahan ekspresi gen, dan protein yang berakibat terhadap terjadinya perubahan mekanisme seluler.

4.3. Kesehatan mulut

Kesehatan mulut yang buruk dianggap sebagai salah satu fakto resiko yang berkaitan erat pada terjadinya keganasan terutama pada pancreas, kepada dan leher, tenggorokan dan perut (Abnet et al., 2001; Griffin et al., 2012; Noble et al., 2013). Banyak kejadian NPC, kejadian periodontitis disebabkan meningkatkan respon inflamasi yang dapat meningkatkan promosi karsinogenesis (Abnet et al., 2001). Tingginya peningkatan jumlah bakteri menyebabkan semakin tingginya jumlah gigi yang hilang sehingga menghasilkan nitrosamine dalam jumlah tinggi berkaitan erat sebagai karsinogen pada kejadian NPC. Kasus lain, buruknya tingkat kualitas kesehatan gigi meningkatkan kemampuan dari replikasi EBV ditunjukkan dari hasil pengukuran viral load (Meurman & Uttamo, 2008; Wu et al., 2018).

4.4. Gejala dan Tanda

Kejadian NPC terdapat beberapa gejala dan tanda yang dapat memberikan representasi yang melibatkan daerah anatomi. Beberapa tanda dan gejala yang ditunjukkan pada pasien yang memiliki beberapa karakteristik gejala dan tanda pada daerah anatomi sebagai gejala awal seperti pada telinga, kepala, hidung, dan leher.

Penelitian sebelumnya (Herawati, 2019; wardana et al., 2016; Wardana et al., 2020), pemeriksaan awal menunjukkan pasien NPC sebanyak 36,5% memiliki gejala pada sumbatan hidung dengan rasa sakit dan tersumbat. Gejala pada telinga menunjukkan rasa berdenging, sulit mendengar, sakit dengan jumlah sebesar 57.7%. Sebanyak 36.5% penderita mengalami mimisan selama durasi $\pm$ 3 bulan – 1 tahun diikuti dengan sakit kepala sebanyak 25% dari penderita. Pasien lainnya, juga menunjukkan penambahan masa pada bagian leher pada bagian kiri, kanan atau keduanya selama berbulan hingga tahunan sebanyak 73% ditambah sebagian kecil penderita juga menunjukkan tanda diplopia atau yang disebut gangguan penglihatan ganda.

BAB V. PERUBAHAN EKSPRESI SIRKULASI MIRNA KARSINOMA NASOFARING

5.1. Profiling mikroRNA

Deteksi level ekspresi miRNA sebagai pengembangan metode biomarker deteksi keganasan mulai banyak dikembangkan di awal tahun 2010 an. Di samping itu, pemilihan sampel yang bervariasi untuk mendapatkan suatu gambaran dan kondisi pada tubuh terus dilakukan. Metode yang semakin banyak menambah pemahaman yang lebih dalam untuk menjeaskan sebab dan akibat yang terjadi pada tingkatan molekuler pada kejadian keganasan.

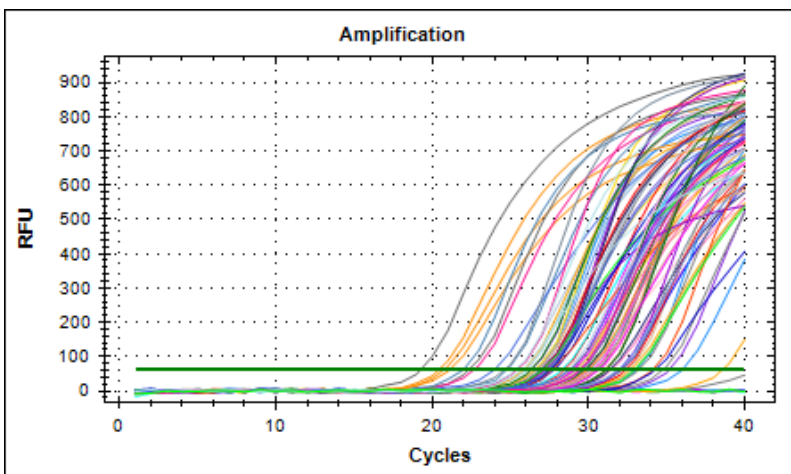
Penggunaan metode kuantifikasi sangat erat kaitanya dengan poduk akhir yang diinginkan. Saat ini, metode yang paling masif berkembang digunakan untuk deteksi miRNA yaitu Next generation sequencing (NGS), microarray, dan quantitative PCR (qPCR). Pemilihan metode yang digunakan harus disesuaikan dengan kemampuan dari metode dan tipe sampel yang digunakan. Kuantifikasi miRNA dengan menggunakan qPCR ini dapat menghitung profile ekspresi miRNA dengan menggunakan specifik primer teknologi LNA, memiliki specifitas, dan sensitivitas yang tinggi (Schwarzenbach et al., 2014). Lebih dari itu, qPCR merupakan salah satu metode yang cukup menjanjikan untuk dapat digunakan di klinik sebagai aplikasi deteksi kanker mengingat Indonesia merupakan negara kepulauan yang tidak semua daerah memiliki fasilitas dan sumber daya manusia dengan kualifikasi yang cukup baik dalam menganalisis hasil dari instrument pemeriksaan molekuler.

Selanjutnya, qPCR termasuk metode yang murah dan cepat dengan tingkat sensitivitas dan specifitas tinggi dalam mendeteksi miRNA. Hal tersebut menjadikan qPCR menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk tahapan validasi dan aplikasi klinis. Hasil kuantifikasi dengan menggunakan metode qPCR didapatkan hasil berupa 3 grafik kuantifikasi dapat dilihat pada gambar 7. Umumnya pada instrument qPCR 3 grafik yang akan dianalisis berupa Cycle Quantification (cq), Melt Peak dan Melt Curve yang menjadi indikator keberhasilan deteksi, sensitivitas dan specifitas dari alat dalam melakukan proses kuantifikasi. Kelebihan dan kekurangan dari beberapa metode yang paling sering digunakan untuk pemeriksaan miRNA dapat dilihat pada tabel 2.

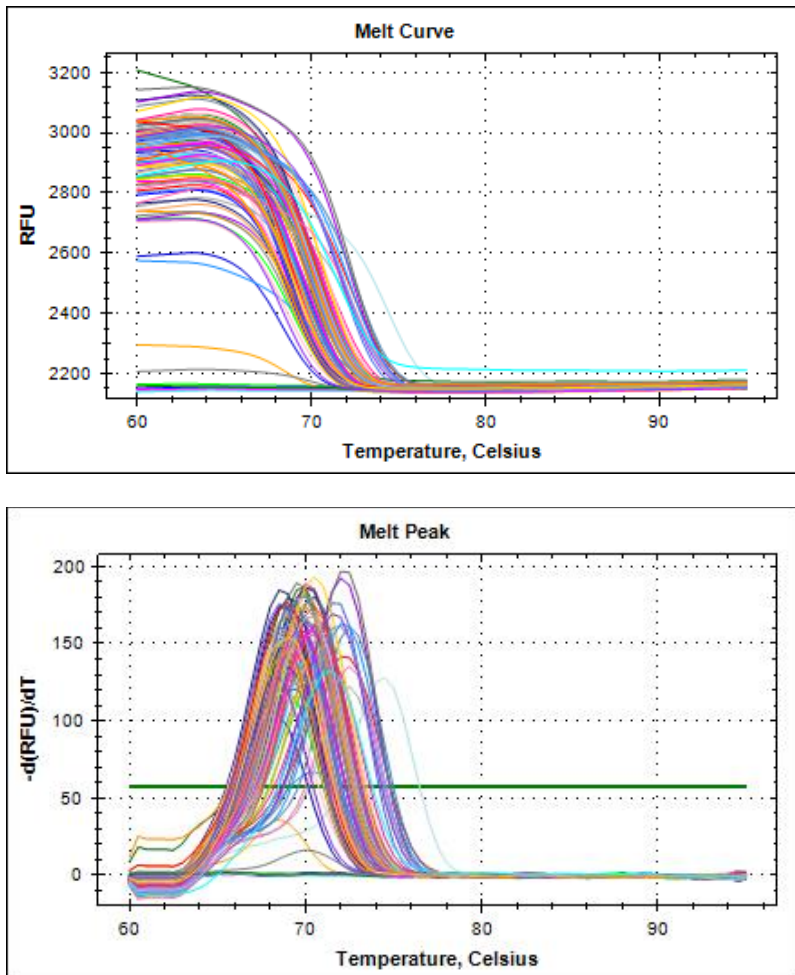
Tabel 3. Kelebihan dan kekurangan dari beberapa metode yang populer digunakan untuk mengkuantifikasi miRNA

No	Metode	Kelebihan	Kekurangan
1	q-PCR	- Memiliki tingkat sensitivitas dan spesifitas yang tinggi - Dapat mengkuantifikasi jumlah molekul yang sedikit - Cocok untuk melakukan kuantifikasi - Tidak membutuhkan peralatan ataupun keahlian khusus - Biaya murah untuk dilakukan sekali pemeriksaan	- Data yang dihasilkan sedikit
2	Microarray	- Hasil berupa data yang cukup besar - Biaya yang dibutuhkan tidak terlalu mahal	- Tidak cukup baik untuk digunakan sebagai metode dengan tingkat akurasi yang tinggi dan sulit untuk mengkuantifikasi dengan jumlah miRNA yang sedikit - Membutuhkan jumlah sampel yang cukup banyak untuk melakukan proses kuantifikasi
3	Sequencing	- Mendeteksi novel miRNA - Spesifitas dan sensitivitas yang tinggi - Sensitivitas dan spesifitas tinggi - Dapat mendeteksi dan membedakan miRNA hingga 1 basa	- Biaya mahal - Membutuhkan instrument dan peralatan khusus - Membutuhkan teknisi bioinformatik khusus - Membutuhkan jumlah sampel yang sangat besar dalam melakukan proses kuantifikasi

Analisis grafik kuantifikasi menunjukkan tingkatan ekspresi dari miRNA target yang berbentuk kurva sigmoid merupakan data utama untuk menganalisis level dari ekspresi gen target. Di mana angka CQ didapatkan dari hasil perpotongan antara grafik amplifikasi dengan garis threshold. Prinsip dasar kerja dari qPCR melalui pengikatan primer dan gene target yang telah diberikan fluorescense sehingga terjadinya pembacaan dalam proses kuantifikasi. Prinsip kerja dari alat ini sebenarnya memiliki kelebihan dari tingkatan kespecifican terhadap target dengan memodifikasi primer sebaik mungkin. Namun, keterbatasan yang paling mendasar dari metode amplifikasi terkait dengan jumlah dari primer serta jumlah gen target yang terdapat pada sampel.



Proses amplifikasi jumlah ampikon pada gambar 7a mengalami tiga fase pembentukan yaitu fase eksponensial (proses awal reaksi dengan pengikatan ampikon dengan kuantitas dalam mengawali amplifikasi template dengan kondisi ideal, lalu terdapat fase linear yang meruakan fase peningkatan jumlah produk sampain terbatasnya jumlah produk, dan fase plateu yang merupakan akhir dari proses amplifikasi yang disebabkan karena terbatasnya jumlah reaksi.



Gambar 7. Kurva kuantifikasi microRNA dengan menggunakan qRT-PCR dengan menggunakan software CFX-96 Biorad C1000. a. kurva amplifikasi, b. kurva leleh, c. kurva titik leleh.

Kemampuan dari spesifitas hasil qPCR yang dapat diketahui melalui grafik melt curve yang merupakan pemanasan double strand DNA (dsDNA) dengan peningkatan intensitas absorbansi yang diikuti peningkatan RFU yang merupakan pendaraan fluorescense sesuai dengan amplifikasi target. Proses qPCR dapat diketahui spesifitas maupun kontaminasi melalui analisis grafik *melt curve* dan *melt peak*, kenaikan suhu dengan primer dan target membentuk pola garis lurus secara horizontal pada proses amplifikasi.

Pengembangan biomarker prediksi deteksi NPC bersifat minimal invasif melalui beberapa tahapan yang dilakukan yaitu:

1. Profiling microRNA dengan menggunakan 192 primer target dan analisis data statistik.
2. Analisis bioinformatics mekanisme dan target pada kejadian NPC.
3. Validasi ekspresi miRNA kandidat dan analisis data.
4. Analisis ekspresi berdasarkan data klinis.

Proses profiling dilakukan dengan menggunakan exiqon profiling plate *biofluids* yang merupakan rekomendasi dari database dengan pemilihan 192 miRNA target yang banyak diprediksi mengalami perubahan ekspresi yang signifikan pada sirkulasi. Analisis data menggunakan GenEx 7 MultiD software yang merupakan software yang specific untuk menganalisis level ekspresi menggunakan metode qPCR.

Kuantifikasi yang dilakukan dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok control dan pasien NPC. Adapun definisi dari setiap kelompok yang dilakukan pemeriksaan yaitu sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol merupakan kelompok yang dianggap sebagai pembatas dari kondisi keganasan. Dimana subjek yang mengikuti kegiatan ini dianggap bukan sebagai penderita kanker ataupun pernah memiliki riwayat sebagai penderita kanker.
2. Kelompok pasien NPC merupakan kelompok subjek penelitian yang merupakan pasien yang telah tegak diagnosis secara histopatologi sebagai penderita NPC dan belum mendapatkan rejimen terapi dalam bentuk apapun baik kemoterapi ataupun radioterapi

Secara garis besar hasil dari kegiatan ini yaitu biomarker diagnosis minimal invasif berbasis miRNA.

5.2. Profiling Biomarker Deteksi NPC.

Metode analisis ekspresi dilakukan dengan menggunakan metode livak dan schmittgen tahun 2001 untuk mengetahui perubahan ekspresi dengan rumus $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yang dikenal dengan metode relative kuantifikasi untuk mengetahui kelipatan perubahan ekspresi Antara sampel kasus terhadap kontrol (Livak & Schmittgen, 2001). Analisis profile dilakukan dengan melihat kualitas dan kuantitas ekspresi miRNA menggunakan tingkat kepercayaan 95% dari nilai CQ semua target. Analisis signifikansi perubahan ekspresi dilakukan menggunakan student t-test, hasil analisis menunjukkan perubahan dengan fold change (FC) log2. Hasil analisis ekspresi, menunjukkan gambaran perubahan mekanisme yang terjadi melalui kegagalan fungsi dari miRNA.

Hasil dari analisis yang didapatkan berupa perubahan ekspresi berupa kenaikan (*over expression*) dan penurunan ekspresi (*down expression*). Hasil analisis perubahan ekspresi dengan signifikan dapat dilihat pada Tabel 3 dan gambar 8. Hasil statistik diketahui ada 83 miRNA yang mengalami perubahan ekspresi yang signifikan.

Tabel 4. Profil ekspresi miRNA yang mengalami perubahan signifikan pada plasma pasien NPC

Kontrol vs NPC	Kelipatan	Perbedaan (A-B log scale)	P-Value
Hsa-miR-221-3p	-1.315709798	-0.395841314	1.00E-08
Hsa-miR-27B-3p	-1.907877269	-0.931968368	1.00E-08
Hsa-miR-374B-5p	2.037107105	1.026521835	1.00E-08
Hsa-miR-93-5p	1.157952882	0.21157655	1.00E-08
Hsa-miR-484	-1.872875215	-0.905254779	1.00E-08
Hsa-miR-106A-5p	-1.444364683	-0.53043505	1.00E-08
Hsa-miR-486-5p	1.400906087	0.486360245	1.00E-08
Hsa-miR-30A-5p	-1.095433831	-0.131502342	1.00E-08
Hsa-miR-185-5p	-1.249339065	-0.321165071	1.00E-08
Hsa-miR-128-3p	2.032610627	1.023333875	1.00E-08
Hsa-miR-485-3p	-2.0961094	-1.067714016	1.00E-08
Hsa-miR-25-3p	1.400041767	0.485469867	1.00E-08
Hsa-miR-33A-5p	-1.239446743	-0.309696283	1.00E-08
Hsa-miR-16-5p	1.115847668	0.158140088	1.00E-08
Hsa-Let-7B-5p	3.468611878	1.794358419	1.00E-08
Hsa-miR-30E-5p	-1.371598193	-0.455857908	1.00E-08
Hsa-miR-146A-5p	1.088843125	0.122796112	1.00E-08
Hsa-miR-424-5p	-1.477321509	-0.562983833	1.00E-08
Hsa-miR-107	2.183478276	1.126628178	1.00E-08
Hsa-miR-148B-3p	-1.332158946	-0.413766227	1.00E-08
Hsa-miR-20A-5p	1.264442805	0.33850178	1.00E-08
Hsa-miR-186-5p	1.312424138	0.392234033	1.00E-08
Hsa-miR-191-5p	-1.152401061	-0.204642894	1.00E-08
Hsa-miR-301A-3p	1.559460799	0.641047287	1.00E-08
Hsa-miR-151A-5p	1.831914719	0.873352344	1.00E-08
Hsa-miR-423-5p	3.147380504	1.654151604	1.00E-08
Hsa-miR-23A-3p	-1.318202129	-0.398571606	1.00E-08
Hsa-miR-320A	-1.3041684	-0.383130168	1.00E-08
Hsa-miR-223-3p	5.403038517	2.433770967	1.00E-08
Hsa-miR-103A-3p	1.462017737	0.547960814	1.00E-08
Hsa-miR-331-3p	1.01748175	0.025002918	1.00E-08
Hsa-Let-7D-3p	-2.187385656	-1.129207603	1.00E-08
Hsa-miR-126-5p	1.21956022	0.286360998	1.00E-08
Hsa-miR-125B-5p	-1.273041374	-0.348279308	1.00E-08
Hsa-miR-335-5p	-1.622785926	-0.698472695	1.00E-08
Hsa-Let-7G-5p	6.604750948	2.723504161	1.00E-08
Hsa-miR-22-3p	-1.474230029	-0.55996165	1.00E-08
Hsa-miR-19B-3p	-1.844456927	-0.883196099	1.00E-08

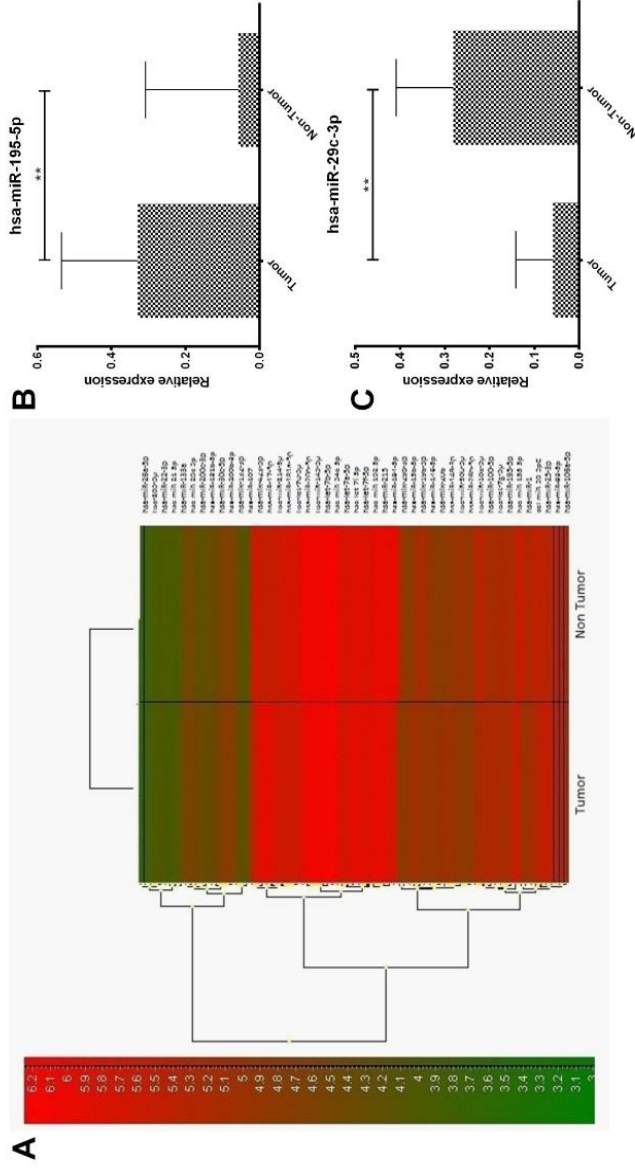
Tabel 5. Profil ekspresi miRNA yang mengalami perubahan signifikan pada plasma pasien NPC (lanjutan)

Kontrol vs NPC	Kelipatan	Perbedaan (A-B log scale)	P-Value
Hsa-miR-24-3p	-1.420954136	-0.50685999	1.00E-08
hsa-miR-502-3p	-3.410202136	-1.769857256	1.00E-08
hsa-miR-339-3p	-2.630265223	-1.395208281	1.00E-08
hsa-miR-409-3p	1.005127938	0.007379147	1.00E-08
hsa-miR-140-3p	-1.78639382	-0.837050166	1.00E-08
hsa-miR-92b-3p	-4.666545809	-2.222355058	1.00E-08
hsa-miR-505-3p	1.031595144	0.044876887	1.00E-08
hsa-miR-141-3p	-1.129030932	-0.175085012	1.00E-08
hsa-miR-361-5p	-1.441408346	-0.527479104	1.00E-08
hsa-miR-27a-3p	-1.71809694	-0.78081144	1.00E-08
hsa-miR-32-5p	-1.20635399	-0.270653311	1.00E-08
hsa-miR-106b-5p	-1.381640045	-0.466381803	1.00E-08
hsa-miR-328-3p	-1.862585536	-0.897306681	1.00E-08
hsa-miR-532-3p	-3.204591755	-1.680140578	1.00E-08
hsa-miR-15a-5p	1.017596948	0.025166248	1.00E-08
hsa-miR-574-3p	1.291574927	0.36913134	1.00E-08
hsa-miR-320c	-1474.167342	-10.52568459	1.00E-08
hsa-miR-28-5p	2.982977933	1.576753305	1.00E-08
hsa-miR-425-3p	-1.213250732	-0.278877731	1.00E-08
hsa-let-7c-5p	4.051085199	2.018308427	1.00E-08
hsa-miR-18a-5p	-1.672958012	-0.742401237	1.00E-08
hsa-miR-1260a	-1.120855478	-0.164600271	1.00E-08
hsa-miR-100-5p	-4.73445755	-2.243199138	1.00E-08
hsa-miR-421	-1.70937004	-0.773464742	1.00E-08
hsa-miR-205-5p	-17.67648792	-4.143759754	1.00E-08
hsa-miR-339-5p	-1.18959918	-0.250475557	1.00E-08
hsa-miR-425-5p	-1.271036105	-0.346005012	1.00E-08
hsa-miR-885-5p	-3.589696981	-1.843862066	1.00E-08
hsa-miR-423-3p	1.239637312	0.309918084	1.00E-08
hsa-miR-376a-3p	-2.768901198	-1.469313575	1.00E-08
hsa-miR-22-5p	-1.59689785	-0.67527203	1.00E-08
hsa-miR-376c-3p	-2.094333693	-1.066491327	1.00E-08
hsa-miR-144-5p	3.666524704	1.87441326	1.00E-08
hsa-miR-210-3p	-10.94844144	-3.452653605	1.00E-08
hsa-miR-584-5p	-1.398393759	-0.483770651	1.00E-08
hsa-miR-363-3p	1.034379987	0.048766267	1.00E-08
hsa-miR-374a-5p	1.306333247	0.385522977	1.00E-08
hsa-miR-7-1-3p	-2.914895845	-1.543444334	1.00E-08
hsa-miR-151a-3p	1.24747196	0.319007388	1.00E-08
hsa-miR-28-3p	-1.229241074	-0.297767879	1.00E-08
hsa-miR-15b-5p	-1.250153833	-0.322105631	1.00E-08
hsa-miR-29c-3p	-1.84882676	-0.886610047	1.00E-08
hsa-miR-335-3p	1.240252055	0.310633348	1.00E-08
hsa-miR-21-5p	1.024211246	0.034513305	1.00E-08
hsa-miR-7-5p	7.720051895	2.948610546	1.00E-08

miRNA yang mengalami kegagalan fungsi dianalisis secara bioinformatika untuk mengetahui regulasinya dalam proses pembentukan tumor sehingga menjadi kandidat biomarker yang sensitif dan spesifik pada kejadian NPC. Hasil analisis *profiling* serta analisis bioinformatika mengenai regulasi *signaling pathways* pada perkembangan inisiasi dan perkembangan tumor ditemukan bahwa miR-29c, 195 merupakan miRNA yang mengalami perubahan ekspresi paling signifikan pada sirkulasi penderita NPC (Gambar 8 a-c). MiR-29c dengan mengalami penurunan ekspresi sebesar -1.84882676 dengan P value <0.05, menurunnya ekspresi yang diikuti oleh kegagalan fungsi dari miR-29c-3p akan berimplikasi terhadap kenaikan ekspresi matriks ekstraselular sehingga akan meningkatkan invasi, migrasi dan metastasis (Zeng et al., 2012).

Terjadinya penurunan ekspresi pada mir-29c pada pasien NPC konsisten dengan beberapa penelitian mengenai miR-29c yang telah dilaporkan. Hal tersebut, telah membuktikan bahwa miR-29c mengalami penurunan yang konsisten pada serum dan jaringan karsinoma nasofaring dengan tingkatan sensitivitas dan spesifitas yang tinggi (Sengupta et al., 2008; Zeng et al., 2012). Pendekatan secara bioinformatika untuk mengetahui target dari miR-29c yang berperan pada jalur apoptosis dan metastasis yang kemudian dianalisis pada tingkatan mRNA yang diregulasi.

Multiple proses yang terjadi akibat dari perubahan ekspresi miRNA menyebabkan ketidakstabilan mekanisme seluler begitu juga yang terjadi pada NPC. Efek perubahan mekanisme yang terjadi pada sirkulasi NPC dapat dilihat pada table 4.



Gambar 8. Profil ekspresi miRNA pada kontrol dan NPC, dengan 2 miRNA yang paling signifikan miR-29c-3p dan 195-5p, (a) Heat map ekspresi 196 miRNA target, ekspresi miRNA: kenaikan ekspresi (merah), penurunan ekspresi (hijau). Metode analisis menggunakan kuantifikasi relatif standar dengan gen referensi. Analisis kuantifikasi menggunakan software MultiD. (b) Hsa-miR-195-5p secara signifikan meningkatkan NPC sebesar 1.157 (p-value 0.05). (c) ekspresi bawah miR-29c dengan perubahan lipat 1,16 dan ** nilai-p <0,05.

Tabel 6. Hubungan perubahan ekspresi miRNA terhadap kegagalan fungsi.

Categories	Diseases or Functions Annotation	p-value	Predicted Activation State	Activation z-score	Molecules	# Molecules
Cell Death and Survival	Apoptosis of tumor cell lines	0.000114	Increased	2.048	miR-29c-3p,let-7a-5p,miR-10a-5p,miR-122-5p,miR-132-3p,miR-145-5p,miR-146a-5p,miR-148a-3p,miR-155-5p,miR-16-5p, miR-17-5p,miR-181a-5p ,miR-21-5p ,miR-221-3p,miR-223-3p,miR-451a,miR-7a-5p	17
	Cell death of carcinoma cell lines	0.000194		1.801	miR-29c-3p, let-7a-5p,miR-145-5p,miR-146a-5p,miR-181a-5p,miR-21-5p,miR-221-3p,miR-223-3p	8
	Cell death of lung cancer cell lines	0.000286		1.564	miR-29c-3p, miR-145-5p,miR-146a-5p,miR-181a-5p,miR-21-5p,miR-221-3p,miR-223-3p	7
	Apoptosis of carcinoma cell lines	0.000409		1.575	miR-29c-3p, let-7a-5p,miR-145-5p,miR-181a-5p,miR-21-5p,miR-221-3p,miR-223-3p	7
	Apoptosis of lung cancer cell lines	0.00073		1.312	miR-29c-3p, miR-145-5p,miR-181a-5p,miR-21-5p,miR-221-3p,miR-223-3p	6
	Necrosis	0.0019		1.808	miR-29c-3p,let-7a-5p,miR-103-3p,miR-10a-5p,miR-122-5p,miR-132-3p,miR-142-3p,miR-145-5p,miR-146a-5p,miR-148a-3p,miR-150-5p,miR-155-5p,miR-16-5p,miR-17-5p,miR-181a-5p,miR-21-5p,miR-221-3p,miR-223-3p,miR-24-3p,miR-30c-5p,miR-320b,miR-378a-3p,miR-451a,miR-7a-5p	24
	Apoptosis of hepatoma cell lines	0.00461		-0.119	miR-29c-3p, let-7a-5p,miR-122-5p,miR-16-5p	4

Tabel 7. Hubungan perubahan ekspresi miRNA terhadap kegagalan fungsi (lanjutan).

Categories	Diseases or Functions Annotation	p-value	Predicted Activation State	Activation z-score	Molecules	# Molecules
	Apoptosis	0.00914	Increased	2.208	miR-29c-3p,let-7a-5p,miR-103-3p,miR-10a-5p,miR-122-5p,miR-132-3p ,miR-145-5p,miR-146a-5p,miR-148a-3p,miR-150-5p,miR-155-5p,miR-16-5p,miR-17-5p,miR-181a-5p,miR-21-5p,miR-221-3p,miR-223-3p,miR-30c-5p,miR-320b,miR-378a-3p,miR-451a,miR-7a-5p	22
	Apoptosis of lung cell lines	0.0128			miR-29c-3p , miR-17-5p	2
	Apoptosis of leukaemia cell lines	0.0335		-0.605	miR-29c-3p, miR-146a-5p,miR-16-5p,miR-21-5p,	4
Cell Death and Survival, Cellular Development, Cellular Function and Maintenance	Self-renewal of breast cancer cell lines	0.0186			miR-29c-3p	1
Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance	Quantity of filopodia-like projection	0.0217			miR-29c-3p	1
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation	Cell proliferation of tumour cell lines	1.5E-12		-1.417	miR-29c-3p, let-7a-5p,miR-100-5p,miR-101-3p,miR-10a-5p,miR-122-5p ,miR-128-3p,miR-130a-3p,miR-132-3p,miR-133a-3p,miR-145-5p,miR-146a-5p,miR-148a-3p,miR-155-5p,miR-16-5p,miR-17-5p,miR-181a-5p,miR-18a-5p,miR-192-5p,miR-199a-5p,miR-19b-3p,miR-21-5p,miR-221-3p,miR-223-3p,miR-23a-3p,miR-24-3p,miR-27a-3p, miR-330-5p,miR-378a-3p,miR-451a,miR-708-5p,miR-7a-5p,miR-92a-3p	33

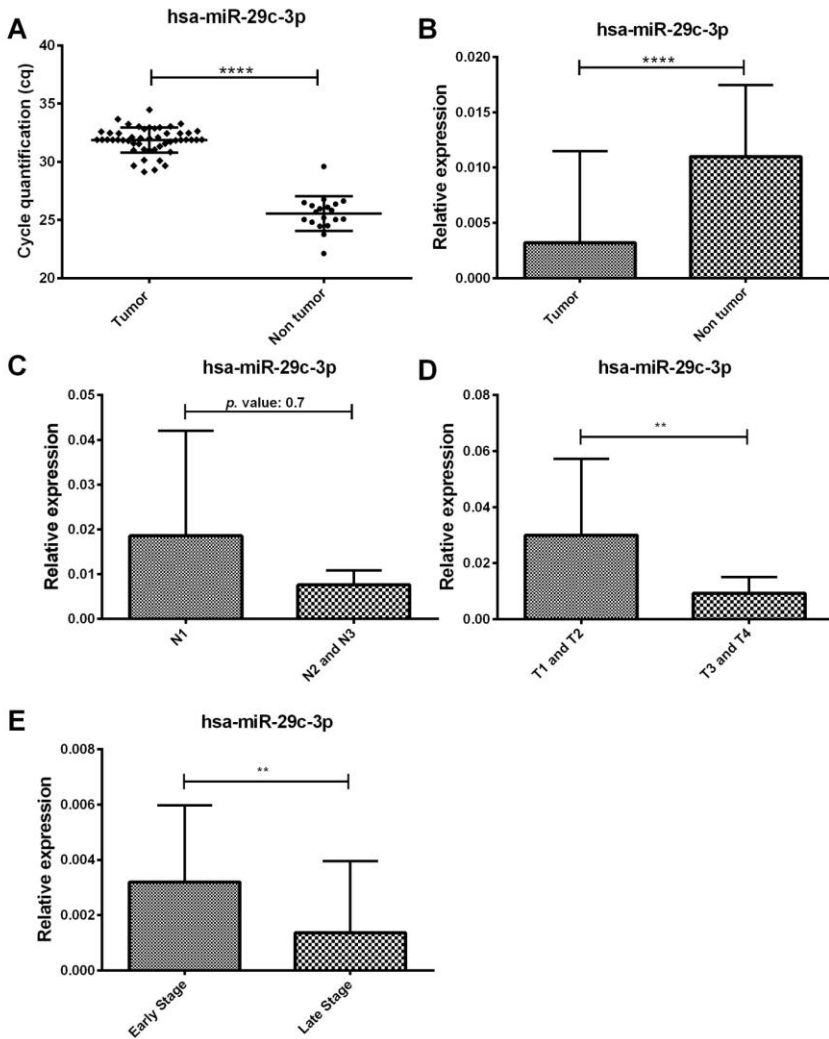
Tabel 8. Hubungan perubahan ekspresi miRNA terhadap kegagalan fungsi (lanjutan).

Categories	Diseases or Functions Annotation	p-value	Predicted Activation State	Activation z-score	Molecules	# Molecules
	Cell proliferation of carcinoma cell lines	9.71E-06		-1.097	miR-29c-3p, let-7a-5p,miR-100-5p,miR-145-5p,miR-155-5p,miR-17-5p,miR-18a-5p,miR-19b-3p,miR-21-5p,miR-24-3p,miR-378a-3p	11
	Cell proliferation of hepatoma cell lines	5.48E-05		-0.19	miR-29c-3p, let-7a-5p,miR-100-5p,miR-122-5p,miR-155-5p,miR-16-5p,miR-223-3p	7
	Cell proliferation of breast cancer cell lines	0.000108		-1.387	miR-29c-3p, miR-101-3p,miR-128-3p,miR-155-5p,miR-17-5p,miR-181a-5p,miR-19b-3p,miR-21-5p,miR-27a-3p,miR-7a-5p	10
	Expansion of breast cancer cell lines	0.0155			miR-29c-3p	1
Cellular Movement	Invasion of tumour cell lines	1.86E-06		-1.465	miR-29c-3p, miR-10a-5p,miR-122-5p,miR-145-5p ,miR-146a-5p ,miR-151-5p ,miR-155-5p,miR-17-5p,miR-181a-5p,miR-21-5p,miR-221-3p,miR-223-3p, miR-451a,miR-483-5p,miR-7a-5p,miR-92a-3p	16
	Invasion of breast cancer cell lines	0.000088		-1.505	miR-29c-3p, miR-145-5p,miR-155-5p,miR-17-5p,miR-181a-5p,miR-21-5p, miR-7a-5p,miR-92a-3p	8
Inflammatory Response	Inflammation of absolute anatomical region	5.23E-16			miR-29c-3p, let-7a-5p,miR-100-5p,miR-101-3p,miR-103-3p,miR-130a-3p,miR-133a-3p,miR-140-3p,miR-140-5p,miR-142-5p,miR-150-5p,miR-16-5p,miR-17-5p,miR-181a-5p,miR-199a-5p,miR-19b-3p,miR-210-3p,miR-22-3p,miR-223-3p,miR-223-3p,miR-23a-3p,miR-27a-3p, miR-30c-5p,miR-320b,miR-328-3p,miR-338-3p,miR-344a-5p,miR-365-3p,miR-376a-3p,miR-629-5p,miR-92a-3p	31
	The cytotoxic reaction of cells	0.0495			miR-29c-3p , miR-221-3p	2

5.3. miR-29 Kandidat Ekspresi Biomarker Deteksi dan Implikasinya Pada Klinikopatologi

Pencarian kandidat miRNA yang berperan sebagai suatu penanda dan dapat merepresnetasikan tingkat keganasan melalui clinical outcome menjadi sangat penting untuk dapat menilai derajat keparahan dari penderi keganasan. Pencarian miRNA pada sirkulasi dengan menggunakan metode qPCR menjadikan salah satu alternative yang menjanjikan. Perubahan ekspresi miRNA memberikan gambaran perubahan ekspresi dengan standard CQ. Kejadian NPC perubahan ekspresi miR-29c mengalami perubahan yang signifikan dengan kenaikan ekspresi sebesar 4.45 ($p < 0.0005$).

Analisis berdasarkan tingkatan secara histologi diharapkan menjadi salah satu pendekatan yang dapat memberikan salah satu pemahaman mengenai mekanisme tingkat keparahan pasien melalui ekspresi dari miR-29c. Pembagian kelompok berdasarkan status T, N, M dan stadium dilakukan untuk mengetahui peran serta miRNA dalam merepresentasikan kejadian NPC yang buruk. Perubahan penurunan ekspresi miR-29c pada kejadian NPC memberikan gambaran status klinis yang buruk ditunjukan dengan penurunan ekspresi, miR-29c mengalami penurunan ekspresi yang signifikan pada penderita dengan stadium lanjut dibandingkan dengan stadium awal, penurunan signifikan pada status T3 dan T4 dibandingkan T1 dan T2, dan N3 dan N4 yang signifikan dibandingkan N1 dan N2. Perubahan signifikan ekspresi miR-29c dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 9. Perubahan ekspresi hsa-miR-29c-3p yang bersirkulasi NPC terhadap status klinis, (a) Distribusi miR-29c berdasarkan cq dari qPCR menggunakan CFX Manager 96 Biorad (b) penurunan ekspresi miR-29c dengan kelipatan sebesar -4,45. (c) Perubahan ekspresi miR-29c lebih rendah pada N2 dan N3 dibandingkan N1 pada lipatan 1,17. (d) Perubahan ekspresi miR-29c lebih rendah dari T1 dan T2, kelipatan 2,14. (e) Berdasarkan stadium miR-29c lebih rendah dibandingkan stadium awal dengan perubahan ekspresi sebesar 1, 99.

Analisis bioinformatika perlu untuk dilakukan dalam memahami lebih komprehensif mengenai dampak yang ditimbulkan dari ketidak normalan ekspresi miRNA. Salah satu analisis software yang dapat digunakan untuk mengetahui sebab akibat dari perubahan mekanisme molekuler yaitu Inequnity Pathways Analysis (IPA) software. Analisis yang dilakukan dengan mengidentifikasi Z-Score dan nilai signifikansi P-value. Kegagalan mekanisme dari ekspresi miR-29c berpengaruh besar terhadap modifikasi yang melibatkan proses kematian dan keberlangsungan sel, pengembangan dan perawatan sel, penyusunan dan pengorganisasian sel, proses pertumbuhan dan proliferasi, respon inflamasi dan jalur pergerakan dari sel (table 4).

Status TNM dan staging merupakan sistem yang dibangun secara klinik untuk menggambarkan derajat keparahan. Menurut Asosiasi Medis Amerika (AJCC), pada kejadian NPC status TNM diperlukan untuk meningkatkan status keberhasilan pengobatan. Status TNM ditentukan menggunakan kriteria klinis dan patologis untuk T (ukuran dari jaringan utama tumor), N klinis (kelenjar getah bening), dan M (status metastasis). Beberapa penelitian telah mempelajari profil ekspresi miRNA untuk mempelajari hubungannya terhadap perkembangan keganasan dan keberhasilan terapi (S. L. S. L. Anwar et al., 2019; Brierley et al., 2017; E. Savitri et al., 2017; Eka Savitri et al., 2019; wardana et al., 2016).

Salah satu miRNA yang ditemukan secara signifikan berkorelasi dengan status klinis pada kejadian NPC yaitu miR-29 (S. L. Anwar et al., 2020; E. Savitri et al., 2017; Eka Savitri et al., 2019; Wardana et al., 2020). miR-29c yang bersifat sebagai tumor suppressor miR merupakan salah satu kandidat biomarker sirkulasi yang spesifik pada NPC. Namun, dapat memberikan gambaran terkait dengan prognosis buruk yang ditunjukkan dengan hubungan terhadap status klinis berupa TNM dan *staging*.

Keluarga dari miR-29c memiliki peran yang penting terhadap beberapa tipe kanker seperti NPC, kanker paru dengan mentargetkan DNMT3A, DNMT3B yang berhubungan dengan metastasis, dan invasi. miR-29c diketahui merupakan salah satu miRNA yang ditemukan mengalami perubahan ekspresi yang signifikan pada sirkulasi. miR-29c bersifat sebagai miR tumor suppresor yang dapat mentargetkan mRNA onkogen, dapat dikatakan sebagai tumor suppresor apabila terjadi kegagalan fungsi dan berkontribusi terhadap pembentukan malignan dari sel normal (Garzon et al., 2009). Peran dari miR-29c sebagai salah satu regulator yang berperan dalam menekan ekspresi dari onkogen memberikan dampak yang besar ketika mengalami perubahan

ekspresi. miR-29c memiliki beberapa peran dalam beberapa perkembangan tumor invasi, metastasis dan migrasi. Sangupta telah melaporkan penelitiannya menyatakan bahwa miR-29c menargetkan 15 gen matriks ekstraseluler yang terlibat pada proses metastasis dan invasi pada karsinoma nasofaring (Sengupta et al., 2008).

Kestabilan mekanisme selular pada kejadian NPC berkaitan oleh ekspresi miR-29c dalam mentargetkan COL4A, PI3K, VEGFA, JUN (Gambar 10). miR-29c akan memberikan pengaruh terhadap sel kanker untuk menghindari dari apoptosis melalui perubahan regulasi pada mekanisme jalur signaling PI3K-Akt. miR-29c mentargetkan COL4A1 dan PI3K sehingga mempengaruhi jalur dari Akt untuk kestabilan dari sel. Kemampuan perkembangan yang unik dari jaringan NPC, dimana NPC lebih cenderung untuk melakukan invasi dengan ukuran anatomi jaringan yang kecil. Hal tersebut dipengaruhi oleh kemampuan dari sel kanker untuk mengubah mekanisme jalur signaling VEGF.

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Faktor*) merupakan protein yang berperan sentral pada terjadinya angiogenesis. Penurunan ekspresi miR-29c tidak dapat menekan laju ekspresi VEGF sehingga terjadinya pembentukan vascular baru yang massif dan berimplikasi sebagai supply darah terhadap perkembangan karsinoma. Pembentukan pembuluh darah baru sangat penting bagi sel kanker dikarenakan peranya untuk memberikan sumber oksigen, nutrisi, *signaling* molekul, karbon dioksida, dan produk akhir metabolisme sel, jaringan maupun organ (Roskoski, 2007). Proses angiogenesis sangat mempengaruhi invasi dan metastasis dari sel kanker sehingga regulasi dari miR-29c terhadap VEGF menjanjikan marker progresivitas dari karsinoma sebagai indikator prognosis. Terdapat beberapa miR lainnya yang diketahui berhubungan terhadap ekspresi dari VEGF yaitu miR-20a, miR-20b, let-7b, miR-17-5p, miR-27a, miR-106a, miR-106b, miR-107, miR-193a, miR-210, miR-320, miR-361, dan miR-15b (J. J. Zhao et al., 2010).

miR-29c diketahui juga terlibat pada banyak kanker dengan mentargetkan mRNA penyusun extracellular matrik seperti (COL4A12) dan PI3K melalui jalur persinyalan PI3K/Akt (Zhan et al., 2018). Persinyalan PI3K/AKT menunjukkan peran krusial pada beberapa regulasi proses psikologikal dan patologikal, yang mempengaruhi multipel proses pada sel seperti proliferasi, migrasi dan metastasis (D. M. Sun et al., 2018). Banyak tipe sel kanker.

Mekanisme persinyalan Jak-STAT dan siklus sel pada kejadian kanker, miR-29c berperan dalam memtargetkan mRNA CDK6 dan JUN secara langsung mempengaruhi proses proliferasi dari sel. Penurunan ekspresi dari miR-29c akan mempengaruhi kenaikan ekspresi dari mRNA CDK6, sehingga CDK6 yang merupakan kelompok dari serine threonine kinases dan berfungsi sebagai regulator pada fase G1/S transisi di siklus sel (X. Zhao et al., 2015). Kenaikan ekspresi dari CDK6 akan mempengaruhi meningkatkan proses proliferasi, hal tersebut ditunjukkan prognosis buruk terhadap kanker pancreas (K. H. Lee et al., 2009), glioma (Costello et al., 1997), kandung kemih (X. Zhao et al., 2015), dan medulloblastoma (Mendrzyk et al., 2005).

5.4. miR-BART-7 Kandidat Biomarker miRNA yang Dikode Virus EBV

Epstein Barr Virus (EBV) merupakan double stranded DNA virus yang termasuk kedalam kelompok herpes manusia 4 (HHV-4). Kelompok keluarga herpes merupakan tipe virus yang paling umum menyerang manusia, dan diketahui lebih dari 95% telah menginfeksi populasi dunia. EBV juga dikenal sebagai penyebab mononucleosis (demam kelenjar), yang sangat erat kaitannya dengan terjadinya kanker seperti NPC, burkitt lymphoma, Hodgkin's lymphoma, dan kanker lambung serta memiliki hubungan erat dengan infeksi sekunder human immunodeficiency virus (HIV) sehingga meningkatkan resiko penyakit autoimun.

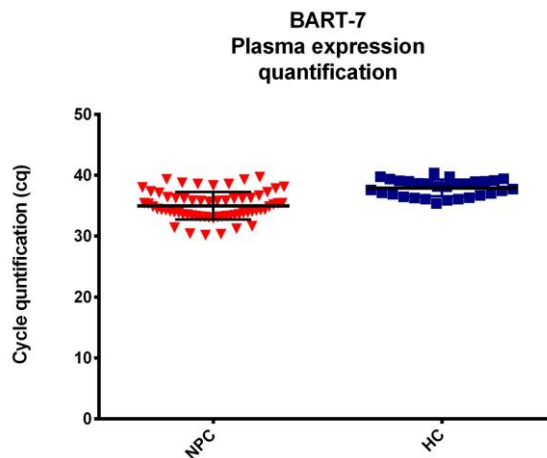
EBV bersifat latent dan mempengaruhi proses jalur signaling dengan mengekspresikan produk dari viral protein, RNA dan miRNA. EBNA-1 dan protein yang dikode oleh EBV mempromosikan kerusakan DNA pada kejadian NPC dengan mempengaruhi fungsi dari p53 sehingga menginduksi reactive oxygen species (ROS). Beberapa produk lainya dari EBV viral protein yang diketahui berperan pada pembentukan NPC yaitu LMP1, LMP2B, EBNA yang memengaruhi mekanisme dari proliferasi, apoptosis, invasi, dan mekanisme vaskularisasi¹¹². Namun, menariknya pathogenesis dan progresivitas dari NPC tidak hanya dipengaruhi dari viral produk yang dihasilkan oleh EBV, akan tetapi baru-baru ini diketahui bahwa miRNA yang dikode oleh EBV berperan terhadap perkembangan NPC. Beberapa miRNA yang dikode oleh EBV telah dilaporkan dan berperan penting terhadap manifestasi pembentukan NPC. miRNA yang bersifat konservatif memiliki fungsi sebagai regulator post transkripsi, miRNA yang dikode oleh EBV diketahui tidak hanya mempengaruhi dengan memtargetkan mRNA host, akan tetapi juga

mentargetkan miRNA host dan mRNA EBV latent (Ramayanti et al., 2019; Wardana et al., 2020; G. Zhang et al., 2015). Beberapa studi diketahui beberapa miRNA yang berpera besar pada kejadian NPC seperti keluarga miR-BART 1-10, -16,- 19, -22 (Y. Wang et al., 2017).

EBV yang bersifat virus oncogenic, diketahui mengekspresikan miR-BART-7 yang berperan penting pada perkembangan NPC. Lebih dari itu, BART-7 diketahui mempercepat laju proliferasi pada sel lini CNE-1 dan 5-8F sebagai model dari NPC. Perubahan ekspresi dari BART-7 menyebabkan kegagalan fungsi dalam mentargetkan mRNA PTEN yang bersifat sebagai tumor suppressor gene yang mempengaruhi jalur PI3K/AKT/GSK-3 β sehingga menyebabkan akumulasi perubahan terhadap snail dan β -catenin yang menyebabkan terbentuknya NPC.

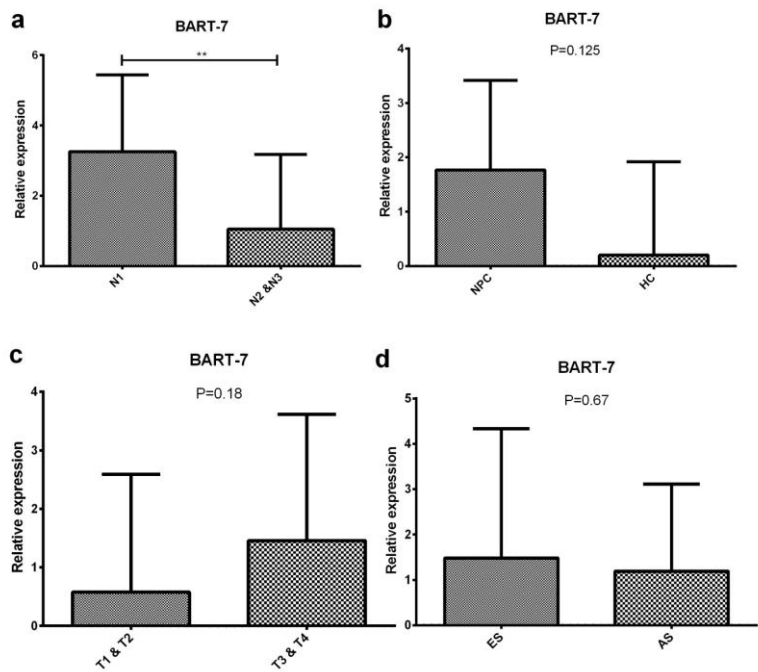
BART-7 diketahui tidak hanya merepresentasikan manifestasi klinis, namun juga merepresentasikan prognosis yang buruk pada kejadian NPC (Wardana et al., 2020). Kemampuan untuk mendeteksi BART-7 pada sirkulasi seperti darah dan plasma menjadikanya potensial untuk dapat digunakan sebagai biomarker NPC sebagai salah satu pendekatan teknologi liquid biopsy.

Pemeriksaan menggunakan qPCR dapat menunjukan profile ekspresi Bart-7 melalui nilai CQ. Perbedaan nilai mean dari penderita NPC dan control sehat dapat dilihat pada gambar 11. Kuantifikasi ekspresi dari 82 sampel menunjukan bahwa ekspresi rerata BART-7 pada NPC sebesar ± 34.97 (± 2.26) dan kontrol sebesar ± 36.01 (± 3.9).



Gambar 11. Cycle quantification miR-BART-7 pada sirkulasi penderita NPC (karsinoma nasofaring) dengan nilai mean 34 dan HC (kontrol) dengan nilai mean 36 (Wardana et al., 2020).

Pendekatan BART-7 sebagai kandidat biomarker menjadi salah satu pendekatan strategi yang dapat dilakukan mengingat ukuran anatomi dan tidak adanya gejala specific menjadi permasalahan deteksi dini NPC. Salah satu indicator yang dijadikan sebagai penilaian progresivitas NPC melalui pengklasifikasian stadium yang telah disusun oleh The International Union Against Cancer (UICC) dan American Joint Committee on Cancer (AJCC) berdasarkan status TNM staging system. Pengklasifikasian stadium dianggap sangat penting untuk menentukan progresivitas serta pemilihan pendekatan terapi yang digunakan.



Gambar 12. Relatif ekspresi berdasarkan FC (fold change) miR-BART-7 pada plasma karsinoma nasofaring dengan perbandingan TNM staging system, (a) berdasarkan status N (FC:4.61), (b) perbandingan NPC dan control (FC:2.15), (c) perbandingan berdasarkan status T (FC:1.84), (d) perbandingan berdasarkan status stadium (FC:1.22) (Wardana et al., 2020).

Signifikansinya hubungan Antara ekspresi dari BART-7 terhadap status n (lymph node) berhubungan erat dengan peran dari BART-7 terhadap progresivitas dari sel kanker NPC. Proses vaskularisasi dan pembentukan pembuluh darah baru melalui

mekanisme angiogenesis sangat mempengaruhi perkembangan dari NPC. Agresivitas yang tinggi dari NPC terutama melalui proses metastases dan invasi yang disebabkan BART-7 yang memengaruhi ekspresi dari mRNA yang mengkode extracellular matrix. Ditambah lagi, beberapa penelitian sebelumnya melaporkan bahwa BART-7 dapat mentargetkan SMAD7 melalui promosi stem melalui jalur persinyalan untuk mengaktifasi Pi3K/AKT yang mempromosikan metastasis dan EMT115,(Cai et al., 2019).

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan permasalahan yang telah dibahas secara keseluruhan, maka kesimpulanya sebagai berikut:

1. Terdapat perubahan profil ekspresi miRNA yang mengalami kegagalan fungsi pada sampel plasma pasien dibandingkan dengan kontrol. Terdapat ± 85 miRNA yang mengalami kegagalan fungsi dengan hasil kuantifikasi dengan hasil yang signifikan
2. Ekspresi miRNA host dan virus dapat dideteksi dan dikuantifikasi menggunakan qPCR pada plasma penderita NPC.
3. miR-29c merupakan kandidat biomarker yang bersifat minimal invasif untuk mendeteksi kejadian NPC, perubahan ekspresi miR-29c mempengaruhi beberapa target mekanisme jalur persinyalan dengan mentargetkan COL4A1, PI3K, VEGF, dan CDK6.
4. miR-BART-7 yang dikode oleh virus EBV memiliki korelasi yang signifikan terhadap pembentukan lymphnode, dan potensial untuk dapat dikembangkan menjadi kandidat biomarker evaluasi penderita NPC.

6.2. Saran

Terdapat beberapa hal dalam mempelajari hubungan dari miRNA terhadap kejadian NPC, agar hasil yang didapatkan lebih komprehensif.

1. Butuhnya *high-throughput technology* dalam mengevaluasi keseluruhan perubahan ekspresi dari keseluruhan miRNA baik yang dikode host ataupun virus sehingga dapat memberikan pemahaman mengenai kejadian NPC dengan lebih komprehensif.
2. Perlunya dilakukan analisis dalam jumlah sampel yang lebih besar untuk memahami seberapa besar peran dan signifikansi dari kandidat biomarker sehingga dapat digunakan untuk aplikasi klinis.
3. Perlunya dilakukan analisis dengan menggunakan metode invitro sehingga dapat dipastikan peran dari kandidat miRNA terhadap perkembangan NPC melalui teknologi gene silencing.

4. Perlu dikembangkan lebih jauh lagi untuk menjadi miR-29c dan BART-7 sebagai salah satu target dari kandidat terapi pada kejadian NPC.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. In *Egyptian Journal of Petroleum* (Vol. 25, Issue 1, pp. 107–123). <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Abnet, C. C., Qiao, Y. L., Mark, S. D., Dong, Z. W., Taylor, P. R., & Dawsey, S. M. (2001). Prospective study of tooth loss and incident esophageal and gastric cancers in China. *Cancer Causes and Control*, 12(9), 847–854. <https://doi.org/10.1023/A:1012290009545>
- Adham, M., Greijer, A. E., Verkuijlen, S. A. W. M., Juwana, H., Fleig, S., Rachmadi, L., Malik, O., Kurniawan, A. N., Roezin, A., Gondhowiardjo, S., Atmakusumah, D., Stevens, S. J. C., Hermani, B., Bing Tan, I., & Middeldorp, J. M. (2013). Epstein-barr virus DNA load in nasopharyngeal brushings and whole blood in nasopharyngeal carcinoma patients before and after treatment. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 2175–2186. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2897>
- Adham, M., Kurniawan, A. N., Muhtadi, A. I., Roezin, A., Hermani, B., Gondhowiardjo, S., Bing Tan, I., & Middeldorp, J. M. (2012a). Nasopharyngeal carcinoma in indonesia: Epidemiology, incidence, signs, and symptoms at presentation. *Chinese Journal of Cancer*, 32(4), 185–196. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10328>
- Adham, M., Kurniawan, A. N., Muhtadi, A. I., Roezin, A., Hermani, B., Gondhowiardjo, S., Bing Tan, I., & Middeldorp, J. M. (2012b). Nasopharyngeal carcinoma in indonesia: Epidemiology, incidence, signs, and symptoms at presentation. *Chinese Journal of Cancer*, 32(4), 185–196.
- Anwar, S. L. S. L., Sari, D. N. I. D. N. I., Kartika, A. I. A. I., Fitria, M. S. M. S., Tanjung, D. S. D. S., Rakhmina, D., Wardana, T., Astuti, I., Haryana, S. M. S. M., & Aryandono, T. (2019). Upregulation of circulating MiR-21 expression as a potential biomarker for therapeutic monitoring and clinical outcome in breast cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(4), 1223–1228. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.4.1223>

- Anwar, S. L., Tanjung, D. S., Fitria, M. S., Kartika, A. I., Sari, D. N. I., Rakhmina, D., Wardana, T., Astuti, I., Haryana, S. M., & Aryandono, T. (2020). Dynamic Changes of Circulating Mir-155 Expression and the Potential Application as a Non-Invasif Biomarker in Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 21(2), 491–497. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.2.491>
- Avisar, M., McClean, M. D., Kelsey, K. T., & Marsit, C. J. (2009). MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival. *Carcinogenesis*, 30(12), 2059–2063. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp277>
- Baranwal, S., & Alahari, S. K. (2010). miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *International Journal of Cancer*, 126(6), 1283–1290. <https://doi.org/10.1002/ijc.25014>
- Barnes, L., Eveson, J. W., Reichart, P., & Sidransky, D. (2005). World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours. *WHO Classification of Tumour*.
- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2017). TNM classification of malignant tumours - 8th edition. In M. K. C. W. Gospodarowicz (Ed.), *Wiley-Blackwell* (Eight Edit). <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200111>
- Cai, L., Long, Y., Chong, T., Cai, W., Tsang, C. M., Zhou, X., Lin, Y., Ding, T., Zhou, W., Zhao, H., Chen, Y., Wang, J., Lyu, X., Cho, W. C., & Li, X. (2019). Ebv-mir-bart7-3p imposes stemness in nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing smad7. *Frontiers in Genetics*, 10(OCT), 939. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00939>
- Cao, S. M., Simons, M. J., & Qian, C. N. (2011). The prevalence and prevention of nasopharyngeal carcinoma in China. *Chinese Journal of Cancer*, 30(2), 114–119. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10377>
- Chan, A. T. C., Teo, P. M. L., & Johnson, P. J. (2002). Nasopharyngeal carcinoma. In *Annals of Oncology* (Vol. 13, Issue 7, pp. 1007–1015). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf179>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., ... Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10), 997–1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>

- Cortez, M. A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K., & Calin, G. A. (2011). MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(8), 467–477. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.76>
- Costello, J. F., Plass, C., Arap, W., Chapman, V. M., Held, W. A., Berger, M. S., Su Huang, H. J., & Cavennee, W. K. (1997). Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Research*, 57(7), 1250–1254.
- Dasari, S., Ganjavi, M. S., Yellannurkonda, P., Basha, S., & Meriga, B. (2018). Role of glutathione S-transferases in detoxification of a polycyclic aromatic hydrocarbon, methylcholanthrene. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 294, pp. 81–90). <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.023>
- Eliopoulos, A. G., & Young, L. S. (2001). LMP1 structure and signal transduction. *Seminars in Cancer Biology*, 11(6), 435–444. <https://doi.org/10.1006/scbi.2001.0410>
- Esteller, M. (2008). Molecular origins of cancer: Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148–1159. <https://doi.org/10.1056/NEJMr072067>
- Fernandez, A. F., Rosales, C., Lopez-Nieva, P., Graña, O., Ballestar, E., Roperio, S., Espada, J., Melo, S. A., Lujambio, A., Fraga, M. F., Pino, I., Javierre, B., Carmona, F. J., Acquadro, F., Steenbergen, R. D. M., Snijders, P. J. F., Meijer, C. J., Pineau, P., Dejean, A., ... Esteller, M. (2009). The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Research*, 19(3), 438–451. <https://doi.org/10.1101/gr.083550.108>
- Ferracin, M., Pedriali, M., Veronese, A., Zagatti, B., Gafà, R., Magri, E., Lunardi, M., Munerato, G., Querzoli, G., Maestri, I., Ulazzi, L., Nenci, I., Croce, C. M., Lanza, G., Querzoli, P., & Negrini, M. (2011). MicroRNA profiling for the identification of cancers with unknown primary tissue-of-origin. *Journal of Pathology*, 225(1), 43–53. <https://doi.org/10.1002/path.2915>
- Foessel, I., Kotzbeck, P., & Obermayer-Pietsch, B. (2019). miRNAs as novel biomarkers for bone related diseases. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, 4(2). <https://doi.org/10.21037/jlpm.2018.12.06>
- Garzon, R., Liu, S., Fabbri, M., Liu, Z., Heaphy, C. E. A., Callegari, E., Schwind, S., Pang, J., Yu, J., Muthusamy, N., Havelange, V., Volinia, S., Blum, W., Rush, L. J., Perrotti, D., Andreeff, M., Bloomfield, C. D., Byrd, J. C., Chan, K., ... Marcucci, G. (2009).

- MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*, 113(25), 6411–6418. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170589>
- Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholak, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y., & Chajut, A. (2008). Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE*, 3(9), e3148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003148>
- Glinge, C., Clauss, S., Boddum, K., Jabbari, R., Jabbari, J., Risgaard, B., Tomsits, P., Hildebrand, B., Kaàèb, S., Wakili, R., Jespersen, T., & Tfelt-Hansen, J. (2017). Stability of circulating blood-based microRNAs-Pre-Analytic methodological considerations. *PLoS ONE*, 12(2), e0167969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167969>
- Grasedieck, S., Schöler, N., Bommer, M., Niess, J. H., Tumani, H., Rouhi, A., Bloehdorn, J., Liebisch, P., Mertens, D., Döhner, H., Buske, C., Langer, C., & Kuchenbauer, F. (2012). Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia*, 26(11), 2414–2416. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.106>
- Griffin, S. O., Jones, J. A., Brunson, D., Griffin, P. M., & Bailey, W. D. (2012). Burden of oral disease among older adults and implications for public health priorities. *American Journal of Public Health*, 102(3), 411–418. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2011.300362>
- Gulley, M. L. (2015). Genomic assays for Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. *Experimental and Molecular Medicine*, 47(1), e134–e134. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.93>
- Gurtan, A. M., & Sharp, P. A. (2013). The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *Journal of Molecular Biology*, 425(19), 3582–3600. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.007>
- Herawati, C. (2019). *CLINICAL SIGNIFICANCE OF PLASMA MIR-21 , MIR-141 , MIR-29C , AND MIR-BART7 IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED NASOPHARYNGEAL CANCER AND THEIR ALTERATIONS AFTER CHEMORADIATION THERAPY*. 01(02), 45–49. <https://doi.org/10.32734/ijnpc.v1i2.1136>
- Hutajulu, S. H., Indrasari, S. R., Indrawati, L. P. L., Harijadi, A., Duin, S., Haryana, S. M., Steenbergen, R. D. M., Greijer, A. E., & Middeldorp, J. M. (2011). Epigenetic markers for early detection of nasopharyngeal carcinoma in a high risk population. *Molecular Cancer*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-48>

- IARC, & WHO. (2015). *World Cancer Report 2014*. <https://Gco.Iarc.Fr/Today/Home>. <https://gco.iarc.fr/today/home>
- Ikeda, A., Caldwell, R. G., Longnecker, R., & Ikeda, M. (2003). Itchy, a Nedd4 Ubiquitin Ligase, Downregulates Latent Membrane Protein 2A Activity in B-Cell Signaling. *Journal of Virology*, 77(9), 5529–5534. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.9.5529-5534.2003>
- Ji, C., & Guo, X. (2019). The clinical potential of circulating microRNAs in obesity. In *Nature Reviews Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0260-0>
- Jiang, S., Zhang, H. W., Lu, M. H., He, X. H., Li, Y., Gu, H., Liu, M. F., & Wang, E. D. (2010). MicroRNA-155 functions as an oncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Research*, 70(8), 3119–3127. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4250>
- Kanda, T., Miyata, M., Kano, M., Kondo, S., Yoshizaki, T., & Iizasa, H. (2015). Clustered MicroRNAs of the Epstein-Barr Virus Cooperatively Downregulate an Epithelial Cell-Specific Metastasis Suppressor. *Journal of Virology*, 89(5), 2684–2697. <https://doi.org/10.1128/jvi.03189-14>
- Kang, H., Kiess, A., & Chung, C. H. (2015). Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(1), 11–26. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.192>
- Kapinas, K., Kessler, C. B., & Delany, A. M. (2009). miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: Regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(1), 216–224. <https://doi.org/10.1002/jcb.22243>
- Kemenkes RI. (2018). Laporan Nasional Risesdas 2018. *Balitbang Kemenkes RI*.
- Kung, C.-P., & Raab-Traub, N. (2008). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor through Effects on Bcl-3 and STAT3. *Journal of Virology*, 82(11), 5486–5493. <https://doi.org/10.1128/jvi.00125-08>
- Kwong, J., Lo, K. W., To, K. F., Teo, P. M. L., Johnson, P. J., & Poon Huang, D. (2002). Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 8(1), 131–137.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., Fitzhugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann,

- L., Lehoczky, J., Levine, R., McEwan, P., ... Morgan, M. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- Lee, A. W. M., Lin, J. C., & Ng, W. T. (2012). Current Management of Nasopharyngeal Cancer. *Seminars in Radiation Oncology*, 22(3), 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2012.03.008>
- Lee, K. H., Lotterman, C., Karikari, C., Omura, N., Feldmann, G., Habbe, N., Goggins, M. G., Mendell, J. T., & Maitra, A. (2009). Epigenetic silencing of microRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. *Pancreatology*, 9(3), 293–301. <https://doi.org/10.1159/000186051>
- Leivonen, S. K., Rokka, A., Östling, P., Kohonen, P., Corthals, G. L., Kallioniemi, O., & Perälä, M. (2011). Identification of miR-193b targets in breast cancer cells and systems biological analysis of their functional impact. *Molecular and Cellular Proteomics*, 10(7). <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.005322>
- Liang, Q., Yao, X., Tang, S., Zhang, J., Yau, T. O., Li, X., Tang, C. M., Kang, W., Lung, R. W. M., Li, J. W., Chan, T. F., Xing, R., Lu, Y., Lo, K. W., Wong, N., To, K. F., Yu, C., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Yu, J. (2014). Integrative identification of Epstein-Barr virus-associated mutations and epigenetic alterations in gastric cancer. *Gastroenterology*, 147(6), 1350–1362. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.08.036>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lo, A. K. F., Kwok, W. Lo, Sai, W. T., Hing, L. W., Hui, J. W. Y., Ka, F. T., Hayward, S. D., Yiu, L. C., Yu, L. L., Takada, K., & Huang, D. P. (2006). Epstein-Barr virus infection alters cellular signal cascades in human nasopharyngeal epithelial cells. *Neoplasia*, 8(3), 173–180. <https://doi.org/10.1593/neo.05625>
- Lung, M. L., Hu, Y., Cheng, Y., Li, M. F., Tang, C. M. C., O, S. ki, & Iggo, R. D. (1998). p53 inactivating mutations in Chinese nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Letters*, 133(1), 89–94. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(98\)00209-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(98)00209-2)
- Martelli, A., Robbiano, L., Grossi, S., Mattioli, F., & Brambilla, G. (2007). Formation of DNA-damaging N-nitroso compounds from the interaction of calcium-channel blockers with nitrite. *Toxicology*, 238(2–3), 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.06.001>

- Mendrzyk, F., Radlwimmer, B., Joos, S., Kokocinski, F., Benner, A., Stange, D. E., Neben, K., Fiegler, H., Carter, N. P., Reifemberger, G., Korshunov, A., & Lichter, P. (2005). Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(34), 8853–8862. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.8589>
- Meurman, J. H., & Uttamo, J. (2008). Oral micro-organisms in the etiology of cancer. In *Acta Odontologica Scandinavica* (Vol. 66, Issue 6, pp. 321–326). <https://doi.org/10.1080/00016350802446527>
- Miller, C. L., Lee, J. H., Kieff, E., Burkhardt, A. L., Bolen, J. B., & Longnecker, R. (1994). Epstein-Barr virus protein LMP2A regulates reactivation from latency by negatively regulating tyrosine kinases involved in sIg-mediated signal transduction. *Infectious Agents and Disease*, 3(2–3), 128–136.
- Mo, M. H., Chen, L., Fu, Y., Wang, W., & Fu, S. W. (2012). Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *Journal of Cancer*, 3, 432–448. <https://doi.org/10.7150/jca.4919>
- Muñoz, N., Davidson, R. J. L., Witthoff, B., Ericsson, J. E., & De- Thé, G. (1978). Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease. *International Journal of Cancer*, 22(1), 10–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910220104>
- Nedaeinia, R., Manian, M., Jazayeri, M. H., Ranjbar, M., Salehi, R., Sharifi, M., Mohaghegh, F., Goli, M., Jahednia, S. H., Avan, A., & Ghayour-Mobarhan, M. (2017). Circulating exosomes and exosomal microRNAs as biomarkers in gastrointestinal cancer. *Cancer Gene Therapy*, 24(2), 48–56. <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.77>
- Noble, J. M., Scarmeas, N., & Papapanou, P. N. (2013). Poor oral health as a chronic, potentially modifiable dementia risk factor: Review of the literature topical collection on dementia. In *Current Neurology and Neuroscience Reports* (Vol. 13, Issue 10, p. 384). <https://doi.org/10.1007/s11910-013-0384-x>
- Ohlsson Teague, E. M. C., Print, C. G., & Hull, M. L. (2009). The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Human Reproduction Update*, 16(2), 142–165. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp034>
- Okekpa, S. I., S M N Mydin, R. B., Mangantig, E., Azmi, N. S. A., Zahari, S. N. S., Kaur, G., & Musa, Y. (2019). Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) Risk Factors: A Systematic Review and Meta-

- Analysis of the Association with Lifestyle, Diets, Socioeconomic and Sociodemographic in Asian Region. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(11), 3505–3514. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.11.3505>
- Peter, M. E. (2010). Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: The next step. *Oncogene*, 29(15), 2161–2164. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.59>
- Portis, T., & Longnecker, R. (2004). Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene*, 23(53), 8619–8628. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207905>
- Price, A. M., & Luftig, M. A. (2014). Dynamic epstein-barr virus gene expression on the path to B-cell transformation. *Advances in Virus Research*, 88, 279–313. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00006-4>
- Ramayanti, O., Verkuijlen, S. A. W. M., Novianti, P., Scheepbouwer, C., Misovic, B., Koppers-Lalic, D., van Weering, J., Beckers, L., Adham, M., Martorelli, D., Middeldorp, J. M., & Pegtel, D. M. (2019). Vesicle-bound EBV-BART13-3p miRNA in circulation distinguishes nasopharyngeal from other head and neck cancer and asymptomatic EBV-infections. *International Journal of Cancer*, 144(10), 2555–2566. <https://doi.org/10.1002/ijc.31967>
- Roskoski, R. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 62, Issue 3, pp. 179–213). <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.01.006>
- Rowe, M., Fitzsimmons, L., & Bell, A. I. (2014). Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Chinese Journal of Cancer*, 33(12), 609. <https://doi.org/10.5732/cjc.014.10190>
- Saini, S. (2016). PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. In *Cellular Oncology* (Vol. 39, Issue 2, pp. 97–106). <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0268-6>
- Salehiniya, H., Mohammadian, M., Mohammadian-Hafshejani, A., & Mahdavifar, N. (2018). Nasopharyngeal cancer in the world: epidemiology, incidence, mortality and risk factors. *World Cancer Research Journal*, 5(1), e1046.
- Savitri, E., Safri, J. S., Djamin, R., Punagi, A. Q., Kadir, A., Mubarika, S., & Wardana, T. (2017). Expression of micro RNA-21 and 29c in blood plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Medical Sciences (Faisalabad)*, 17(4), 148–155. <https://doi.org/10.3923/jms.2017.148.155>

- Savitri, Eka, Maharis, I., Kadir, A., Djamin, R., Mubarikaand, S., Wardana, T., Safri, J. S., Djamin, R., Punagi, A. Q., Kadir, A., Mubarika, S., Wardana, T., Maharis, I., Kadir, A., Djamin, R., Mubarikaand, S., & Wardana, T. (2019). The expression of mir-21 and mir-29c in blood plasma of nasopharyngeal carcinoma patient post-chemoradiotherapy. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 10(10), 1523–1529. <https://doi.org/10.5958/0976-5506.2019.03054.7>
- Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G. A., & Pantel, K. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11, 145–156. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.5>
- Sengupta, S., Den Boon, J. A., Chen, I. H., Newton, M. A., Stanhope, S. A., Cheng, Y. J., Chen, C. J., Hildesheim, A., Sugden, B., & Ahlquist, P. (2008). MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5874–5878. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801130105>
- Setiasari, D. W., Rahmawati, G., Sudigyo, D., Poluan, R. H., Sesotiyosari, S. L., Wardana, T., Indrasari, S. R., Herawati, C., Heriyanto, D. S., Astuti, I., Afiahayati, & Haryana, S. M. (2020). Transcriptome profile of next-generation sequencing data relate to proliferation aberration of nasopharyngeal carcinoma patients in Indonesia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(9), 2585–2591. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.9.2585>
- Stepanov, I., & Hatsukami, D. K. (2020). Chemical characterization of smokeless tobacco products and relevant exposures in users. In *Smokeless Tobacco Products: Characteristics, Usage, Health Effects, and Regulatory Implications* (pp. 121–150). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818158-4.00006-6>
- Sun, D. M., Tang, B. F., Li, Z. X., Guo, H. B., Cheng, J. L., Song, P. P., & Zhao, X. (2018). MiR-29c reduces the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells by negatively regulating the PI3K/Akt pathway. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26381-w>
- Sun, H. Z., Chen, Y., & Guan, L. L. (2019). MicroRNA expression profiles across blood and different tissues in cattle. *Scientific Data*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.13>
- Sun, Y., Hegamyer, G., Cheng, Y. J., Hildesheim, A., Chen, J. Y., Chen, I. H., Cao, Y., Yao, K. T., & Colburn, N. H. (1992). An infrequent

- point mutation of the p53 gene in human nasopharyngeal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(14), 6516–6520. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6516>
- Tan, I., Chang, E. T., Chen, C.-J., Hsu, W.-L., Chien, Y.-C., Hildesheim, A., McKay, J. D., Gaborieau, V., Kaderi, M. A. Bin, Purnomosari, D., Voegelé, C., LeCalvez-Kelm, F., Byrnes, G., Brennan, P., Devi, B., Li, L., Zhang, Y., Fan, Y., Sun, K., ... Haryana, S. M. (2016). Proceedings of the 7th Biannual International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma 2015. *BMC Proceedings*, 10(S1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12919-016-0001-5>
- Tang, L. L., Chen, W. Q., Xue, W. Q., He, Y. Q., Zheng, R. S., Zeng, Y. X., & Jia, W. H. (2016). Global trends in incidence and mortality of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Letters*, 374(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.040>
- Tao, Q., & Chan, A. T. C. (2007). Nasopharyngeal carcinoma: Molecular pathogenesis and therapeutic developments. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 9(12), 1–24. <https://doi.org/10.1017/S1462399407000312>
- Tulalamba, W., & Janvilisri, T. (2012). Nasopharyngeal carcinoma signaling pathway: An update on molecular biomarkers. *International Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1155/2012/594681>
- Van Tornout, J. M., Spruck, C. H., Shibata, A., Schmutte, C., Gonzalez-Zulueta, M., Nichols, P. W., Chandrasoma, P. T., Yu, M. C., & Jones, P. A. (1997). Presence of p53 mutations in primary nasopharyngeal carcinoma (NPC) in non-Asians of Los Angeles, California, a low-risk population for NPC. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 6(7), 493–497.
- Viallard, C., & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. In *Angiogenesis* (Vol. 20, Issue 4, pp. 409–426). <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>
- Vogan, K., Bernstein, M., Leclerc, J. M., Brisson, L., Brossard, J., Brodeur, G. M., Pelletier, J., & Gros, P. (1993). Absence of p53 Gene Mutations in Primary Neuroblastomas. *Cancer Research*, 53(21), 5269–5273.
- Wang, S., Yang, J., You, L., Dai, M., & Zhao, Y. (2020). Gstm3 function and polymorphism in cancer: Emerging but promising. In *Cancer Management and Research* (Vol. 12, pp. 10377–10388). <https://doi.org/10.2147/CMAR.S272467>

- Wang, Y., Guo, Z., Shu, Y., Zhou, H., Wang, H., & Zhang, W. (2017). BART miRNAs: An unimaginable force in the development of nasopharyngeal carcinoma. In *European Journal of Cancer Prevention* (Vol. 26, Issue 2, pp. 144–150). <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000221>
- Wardana, T., Gunawan, L., Herawati, C., Oktriani, R., Anwar, S. L., Astuti, I., Aryandhono, T., & Mubarika, S. (2020). Circulation EBV mir-bart-7 relating to clinical manifestation in nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(9), 2777–2782. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.9.2777>
- wardana, T., Herawati, C., Oktriani, R., Anwar, S. L., Astuti, I., Aryandono, T., & Haryana, S. M. (2016). Over- and down-expression mir-29c and mir-21 after chemotherapy and radiotherapy in nasopharyngeal carcinomas and the down-regulating proteins encoding eipstein barr virus and c-Myc. *Journal of Thee Medical Sciences (Berkala Ilmu Kedokteran)*, 48(04 (Suplement)), 24–25. <https://doi.org/10.19106/jmedsciesup004804201622>
- Wardana Tirta , Risky Oktriani, Cita Herawati Murjayanto, D. U. P., & Sumadi Lukman Anwar, Teguh Aryandono, S. M. H. (2021). A microRNA gene signature predicts mechanism in Nasopharyngeal Carcinoma: potential application circulating biomarker prognosis. *Unpublished Data*.
- Wei, K. rong, Xu, Y., Liu, J., Zhang, W. J., & Liang, Z. H. (2011). Histopathological classification of nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12(5), 1141–1147.
- Wildeman, M. A., Fles, R., Herdini, C., Indrasari, R. S., Vincent, A. D., Tjokronagoro, M., Stoker, S., Kurnianda, J., Karakullukcu, B., Taroen-Hariadi, K. W., Hamming-Vrieze, O., Middeldorp, J. M., Hariwiyanto, B., Haryana, S. M., & Tan, I. B. (2013). Primary Treatment Results of Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) in Yogyakarta, Indonesia. *PLoS ONE*, 8(5), e63706. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063706>
- World Health Organization. (2019). Indonesia Source GLOBOCAN 2018. *International Agency for Research on Cancer*, 256, 1–2. <http://gco.iarc.fr/>
- Wu, L., Li, C., & Pan, L. (2018). Nasopharyngeal carcinoma: A review of current updates. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4), 3687–3692. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5878>
- Xia, C., Zhu, K., & Zheng, G. (2015). Expression of EBV antibody EA-IgA, Rta-IgG and VCA-IgA and SA in serum and the implication

- of combined assay in nasopharyngeal carcinoma diagnosis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(12), 16104.
- Xiong, Y., Fang, J. H., Yun, J. P., Yang, J., Zhang, Y., Jia, W. H., & Zhuang, S. M. (2010). Effects of microrna-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 51(3), 836–845. <https://doi.org/10.1002/hep.23380>
- Xu, W., Wang, Z., & Liu, Y. (2014). The characterization of microrna-Mediated gene regulation as impacted by both target site location and seed match type. *PLoS ONE*, 9(9), e108260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108260>
- Yong, S. K., Ha, T. C., Yeo, M. C. R., Gaborieau, V., McKay, J. D., & Wee, J. (2017). Associations of lifestyle and diet with the risk of nasopharyngeal carcinoma in Singapore: A case–control study. *Chinese Journal of Cancer*, 36(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0174-3>
- Young, L. S., & Dawson, C. W. (2014). Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *Chinese Journal of Cancer*, 33(12), 581–590. <https://doi.org/10.5732/cjc.014.10197>
- Young, L. S., & Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 Years on. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 757–768. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>
- Zedan, A. H., Osther, P. J. S., Assenholt, J., Madsen, J. S., & Hansen, T. F. (2020). Circulating miR-141 and miR-375 are associated with treatment outcome in metastatic castration resistant prostate cancer. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57101-7>
- Zeng, X., Xiang, J., Wu, M., Xiong, W., Tang, H., Deng, M., Li, X., Liao, Q., Su, B., Luo, Z., Zhou, Y., Zhou, M., Zeng, Z., Li, X., Shen, S., Shuai, C., Li, G., Fang, J., & Peng, S. (2012). Circulating miR-17, miR-20a, miR-29c, and miR-223 Combined as Non-Invasif Biomarkers in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS ONE*, 7(10), e46367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046367>
- Zhan, S., Wang, C., & Yin, F. (2018). MicroRNA-29c inhibits proliferation and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells by targeting VEGFA. *Molecular Medicine Reports*, 17(5), 6705–6710. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8678>
- Zhang, G., Zong, J., Lin, S., Verhoeven, R. J. A., Tong, S., Chen, Y., Ji, M., Cheng, W., Tsao, S. W., Lung, M., Pan, J., & Chen, H. (2015). Circulating Epstein-Barr virus microRNAs miR-BART7 and miR-

BART13 as biomarkers for nasopharyngeal carcinoma diagnosis and treatment. *International Journal of Cancer*, 136(5), E301-12. <https://doi.org/10.1002/ijc.29206>

- Zhang, L. F., Li, Y. H., Xie, S. H., Ling, W., Chen, S. H., Liu, Q., Huang, Q. H., & Cao, S. M. (2015). Incidence trend of nasopharyngeal carcinoma from 1987 to 2011 in sihui county, guangdong province, south china: An age-period-cohort analysis. *Chinese Journal of Cancer*, 34(8), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0018-6>
- Zhang, Z. J., Hao, K., Shi, R., Zhao, G., Jiang, G. X., Song, Y., Xu, X., & Ma, J. (2011). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and glutathione S-transferase T1 (GSTT1) null polymorphisms, smoking, and their interaction in oral cancer: A HuGE review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 173(8), 847–857. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq480>
- Zhao, J. J., Lin, J., Lwin, T., Yang, H., Guo, J., Kong, W., Dessureault, S., Moscinski, L. C., Rezanian, D., Dalton, W. S., Sotomayor, E., Tao, J., & Cheng, J. Q. (2010). MicroRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood*, 115(13), 2630–2639. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-243147>
- Zhao, X., Li, J., Huang, S., Wan, X., Luo, H., & Wu, D. (2015). MiRNA-29c regulates cell growth and invasion by targeting CDK6 in bladder cancer. *American Journal of Translational Research*, 7(8), 1382–1389.

GLOSSARIUM

Angiogenesis: Proses terbentuknya saluran pembuluh darah baru yang berfungsi untuk memenuhi kebutuhan nutrisi sel kanker.

Apoptosis: Proses kematian sel yang terprogram.

Nekrosis: Kondisi cedera sel akibat adanya proses stress sel yang memaksakan kematian sel.

Biogenesis: Proses kehidupan organisme, atau organel baru, atau sel baru.

Bioinformatika: Bidang ilmu yang mempelajari dan menganalisis informasi hayati melalui pendekatan komputasi.

Biologi molekuler: Bidang ilmu yang mempelajari atau pengkajian mengenai kehidupan pada tingkatan molekuler.

Biomarker: Semua tipe dari molekul yang dengan kehadirannya dapat merepresentasikan kejadian atau penyakit pada tubuh organisme.

Detoksifikasi: Proses alamiah yang dilakukan oleh tubuh untuk membuang atau menetralkan racun.

Diagnosis: Penentuan jenis penyakit melalui pemeriksaan gejala ataupun tanda-tanda yang ditunjukkan melalui pemeriksaan medis.

Diplopia: Gangguan penglihatan yang menyebabkan adanya persepsi bayangan ganda pada saat melihat objek.

DNA: Asam deoksiribonukleat sebagai material genetik pembawa sifat.

Eksosome: Vesicle extraselular berfungsi sebagai cargo yang membawa material genetik pada sirkulasi.

Enzim: Senyawa protein yang berfungsi sebagai biokatalisator untuk membantu proses metabolisme.

Epstein Barr virus: Human gammaherpes virus 4 yang paling umum menginfeksi manusia yang tersusun oleh DNA untai ganda.

Gen: Material genetik yang menjadi salah satu penyusun DNA.

Genetik: Unit pewarisan sifat.

Individualized therapy: Konsep pengobatan yang didasarkan terhadap profile genetik masing-masing individu yang berbeda.

Infeksi: Adanya serangan dan perkembangan mikroorganisme seperti bakteri, virus dan parasite.

Inflamasi: Mekanisme tubuh dalam melindungi diri dari infeksi mikroorganisme asing.

Insidensi: Gambaran frekuensi penderita baru.

Invasi: Proses menyerang sel kanker ke jaringan normal.

Invasif: Perlakuan yang memberikan rasa sakit misalnya biopsy.

Karsinogenesis: Proses transformasi sel dari normal menjadi kanker.

Karsinogenik: Zat yang dapat menyebabkan terjadinya sel kanker.

Karsinoma nasofaring: Tipe kanker yang menyerang bagian laporan luar nasofaring.

Kanker: Pembentukan jaringan baru akibat proses pembelahan sel yang tidak terkendali.

Kemoterapi: Jenis pengobatan yang dilakukan untuk membunuh sel kanker dengan menggunakan bahan kimia kuat atau bersifat toksit terhadap sel kanker.

Kromosom: Kumpulan DNA panjang yang merupakan bagian dari material genetik terletak di dalam nucleus atau inti sel.

Metastasis: Proses berpindahnya sel kanker dari satu organ ke organ lainya.

microRNAs: RNA pendek yang tidak mengkode protein (18-24 nukleotida) yang berperan sebagai regulator pasca transkripsi.

Minimal invasif: Perlakuan terhadap penderita yang mengurangi dampak/ meminimalkan luka sayatan dan ras nyeri terhadap pasien.

miR-BART-7: Salah satu tipe microRNA dari virus EBV.

Mortalitas. Frekuensi kematian dari satu kelompok penyakit tertentu.

Nekrosis: Cidera pada sel yang menyebabkan kematian tanpa terprogram.

Non invasif: Perlakuan terhadap penderita dengan menghilangkan dampak kesakitan dari perlakuan terhadap pasien.

Nukleotida: Molekul yang tersusun dari gugus basa heterosiklik, gula dan gugus fosfat.

Onkogen: Gen yang termodifikasi sehingga memberikan dampak meningkatnya keganasan sel tumor.

Plasma: Cairan dalam darah yang berwarna kuning bertugas membawa sel darah.

Precision medicine: Sebuah model pengobatan yang disesuaikan dengan perawatan kesehatan, keputusan medis, perawatan, praktik yang disesuaikan dengan subkelompok pasien bukan model satu obat untuk semuanya.

Proliferasi: Fase sel yang mengalami pengulangan siklus dan berimplikasi terhadap proses memperbanyak sel.

Protein: Biomolekul berukuran besar yang tersusun dari satu rantai panjang asam amino.

Radioterapi: Pendekatan pengobatan untuk membunuh sel kanker dengan menggunakan terapi radiasi.

Sirkulasi: Peredaran darah keseluruhan tubuh.

Tumor suppressor gene: Gen seluler yang berfungsi untuk menekan perkembangan tumor.

INDEX

A

AJCC, 47, 52
American Joint Committee on Cancer,
52
amplifikasi, 8, 24, 35, 36
amplikon, 35
anatomi, 2, 11, 25, 31, 48, 52
Angiogenesis, 66, 70
apoptosis, 3, 9, 11, 14, 16, 18, 29, 40,
48, 49, 50, 68
Apoptosis, 42, 43, 70
apoptosis, 13

B

BART-7, 51, 52, 56
biofluids, 37
Biogenesis, 12, 17, 70
bioinformatika, 16, 40, 47
Bioinformatika, 70
biologi molekuler, iii, 2
biomarker, 2, 3, 4, 5, 11, 18, 33, 36, 37,
40, 47, 51, 52, 55, 57, 67
Biomarker, i, 3, 37, 45, 50, 58, 70
biopsi, 2, 19

C

cairan tubuh, 13, 15, 18

D

degradasi, 3, 12
deteksi, iv, 2, 3, 4, 5, 15, 28, 33, 36, 52
deteksi dini, 2, 3, 4, 52
Detoksifikasi, 70
diagnosis, iii, 2, 3, 11, 19, 25, 37, 58, 68,
69
Diagnosis, i, 29, 70
Diplopia, 70
DNA, 10, 13, 29, 30, 36, 50, 57, 59, 60,
62, 70, 71

E

EBV, iii, 1, 7, 8, 9, 10, 11, 21, 28, 29, 31,
50, 51, 55, 64, 67, 71
EBV-EA, 28
EBV-EBNA,, 28
EBV-VCA, 28, 29
Eipstein barr virus, 1, 10
eksosom, 13, 14, 29
eksosome, 14, 18, 29
Eksosome, 70
ekspresi, x, 2, 3, 4, 5, 9, 12, 16, 18, 24,
28, 29, 33, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42,
43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52,
55
enzim, 12, 30
Enzim, 70
Epstein Barr virus, iii, 70
etnis, 7

G

gejala, 2, 11, 20, 25, 26, 31, 52, 70
gen, 8, 9, 10, 13, 16, 18, 24, 29, 30, 35,
41, 48
Gen, 9, 16, 29, 70, 72
genetik, 1, 7, 8, 9, 13, 30, 70, 71
Genetik, 71
genome, 8, 9, 10, 62
gold standart, 2

H

high-throughput teknologi, 2
histologi, 45
Homogenisasi, 23, 24

I

individualized therapy, 2
Individualized therapy, 71
Infeksi, 10, 28, 29, 71
infeksi virus, 1, 7

Inflamasi, 71
Inseri, 9
insidensi, iii, 3, 7, 25
Insidensi, 1, 71
invasi, 11, 40, 47, 48, 50, 53
Invasi, 71
invasife, iii, 2, 3, 4, 5, 36, 37, 55, 72
Invasife, 71

K

kandidat, 2, 3, 4, 5, 37, 40, 45, 47, 52, 55, 56
kanker, 1, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 18, 30, 33, 37, 47, 48, 49, 50, 52, 70, 71, 72
Kanker, 19, 71
Karsinogenesis, 71
karsinogenik, 1, 8, 30
Karsinogenik, 30, 71
karsinoma, iii, 3, 5, 9, 10, 11, 16, 18, 25, 26, 27, 28, 29, 40, 48, 51, 52
Karsinoma, iii, iv, 1, 4, 5, 7, 8, 9, 19, 20, 27, 71
keganasan, iii, 1, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 20, 25, 28, 30, 33, 37, 45, 47, 72
kemoterapi, 2, 11, 19, 20, 37
Kemoterapi, 71
kesembuhan, 1, 2
komunikasi sel, 13
kromosom, 8, 9, 16
Kromosom, 71

L

latensi, 10, 11, 29
lipoprotein, 14, 18
liquid biopsy, 51

M

manifestasi klinis, 51
mendegradasi, 2
meregulasi, 1, 2
metabolism, 2, 48, 70
metastasis, 11, 20, 40, 47, 48, 53, 58
Metastasis, 61, 71
metilasi, 10, 14

microRNA, iii, 2, 5, 11, 12, 17, 22, 36, 37, 60, 62, 67, 71
microRNAs, iii, 58, 60, 61, 63, 65, 68, 71
migrasi, 2, 40, 48
mikrovesikel, 13, 14, 29
Minimal invasive, 71
miR-21, iii, 39, 42, 43, 44
miR-29c, iii, 5, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 68
miR-BART-7, 5, 50, 51, 52, 55, 71
miRNA, x, 2, 3, 4, 5, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 23, 24, 29, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 50, 55, 58, 63, 64
molekuler, 3, 11, 33, 47, 70
mononucleosis, 10, 50, 63
mortalitas, iii, 1, 2, 3, 7, 25, 27
Mortalitas, 72
mRNA, 2, 3, 12, 13, 16, 29, 40, 47, 48, 49, 50, 51, 53
mutasi, 8, 9, 30

N

Nasofaring, iii, iv, 1, 4, 5, 7, 8, 19, 20, 26, 27
nekrosis, 13, 18, 29
Nekrosis, 70, 72
neoadjuvan, 20
NPC, x, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 16, 18, 19, 20, 21, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 55, 56, 63, 66, 67
nukleotida, 2, 3, 12, 16, 29, 71
Nukleotida, 72

O

Onkogen, 72
onkogenik, 11, 18

P

pasien, iii, x, 2, 3, 4, 5, 11, 15, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 28, 31, 37, 38, 39, 40, 45, 55, 71, 72
patofisiologi, 2
patologi, x, 10, 20, 21

penanganan medis, 2
personalized medicine, 4
Plasma, iii, 21, 72
 polimorfisme, 30
 post transkripsi, 2, 12, 50
precision medicine, 2, 4
 Precision medicine, 72
 prediksi, iii, iv, 3, 36
 profiling, 37, 40, 59, 63
 prognosis, 3, 11, 47, 48, 50, 51, 67, 68
 progresivitas, 48, 50, 52
 proliferasi, 1, 2, 11, 47, 48, 49, 50, 51
 Proliferasi, 72
 promotor, 10
 protein, 2, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 28, 29,
 30, 48, 50, 63, 70, 71
 Protein, 22, 28, 61, 72
 proteolisis, 9
 protoonkogen, 8, 9

Q

qPCR, 4, 15, 16, 23, 24, 33, 35, 36, 37,
 45, 46, 51, 55

R

radioterapi, 2, 11, 19, 20, 37
 Radioterapi, 72
 real-time, 4, 62
 recurrence, 2
 regulator, 2, 12, 47, 49, 50, 71
 replikasi, 10, 29, 31
 ribonucleoprotein, 14
RNA, iii, 2, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23,
 29, 50, 64, 71

S

sampel, 4, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,
 33, 34, 35, 37, 51, 55
 sekuense, 3, 12, 13
 sel, 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 18,
 29, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 70, 71, 72
 sensitif, 2, 3, 16, 40
 sensitifitas, 4
signaling pathways, 40
 Sirkulasi, 13, 14, 72
 spesifik, 3, 11, 16, 25, 29, 33, 40
 specifitas, 4, 15, 16, 33, 34, 36
 stadium, iii, 11, 21, 25, 26, 45, 46, 52
 survival, 11, 24, 58, 64

T

The International Union Against
 Cancer, 52
 transformasi, 10, 71
 translasi, 2, 3, 9, 12, 16
 tumor, 8, 9, 10, 16, 29, 40, 42, 47, 51,
 58, 60, 64, 72
 Tumor suppressor gene, 72
 tumor suppressor genes, 10
 tumorigenesis, 16

U

UICC, 52

V

Virus Epstein-Barr, 9

W

WHO, 1, 7, 8, 20, 27, 28, 58, 61