

## Deteksi Gen *Latent Membrane Protein-1 Epstein-Barr Virus* Sebagai Biomarka Diagnosis Pada Karsinoma Nasofaring

Uli Nurjanah\*, P. Maria Hendrati\*, Anton Budi Dharmawan\*\*, Nur Signa Aini Gumilas\*\*

\*)Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

\*\*)Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

Korespondensi : Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Jl. Dr. Soeparno No. 63,

Telp. (0281) 638794, Grendeng Purwokerto 53112

E-mail : ulinurjanah@gmail.com

### **Abstract**

This research aimed to identify LMP-1 EBV gene as a biomarker in NPC diagnosis. Cross-sectional study with consecutive sampling technique was applied. Samples were the whole blood of NPC WHO-3 patients collected from those untreated since 2014 in the Department of Otorhinolaryngologica, Prof. dr. Margono Soekarjo Hospital, Purwokerto. A total of 22 research subjects for NPC WHO-3 patients were completed with informed consent. The samples were subjected to DNA isolation by using Purelink® DNA/RNA viral (Invitrogen) kit protocols to obtain 100µL DNA solution, which were then stored for a long period of time at -80°C. Conventional PCR technique was performed to detect LMP1 gene to amplify the DNA of LMP1 gene resulting in a DNA amplicon of 142 bp. Analysis of the PCR method sensitivity and the results of LMP-1 gene identification were carried out descriptively by comparing the detection results obtained in this study with the results of previous ones related. The sensitivity of LMP1 gene is 77.27%, indicating a high sensitivity. The results show that LMP-1 gene as a biomarker in the diagnosis of NPC can be detected using conventional PCR technique. Conventional PCR sensitivity in the detection of LMP-1 gene shows higher sensitivity in compare to LMP-1 EBV gene deletion of 30 bp and LMP2A.

**Keywords:** *Epstein-Barr Virus, LMP-1 gene, Diagnosis, Nasopharyngeal Carcinoma*

### **Abstrak**

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen LMP-1 EBV sebagai biomarka diagnosis KNF. Desain penelitian ini adalah studi *cross-sectional* dengan teknik *consecutive sampling*. Sampel adalah darah total pasien KNF WHO-3 yang dikumpulkan dari pasien yang belum menjalani terapi dari tahun 2014 pada Departemen Telinga Hidung Tenggorok - Kepala Leher, Rumah Sakit Prof. dr. Margono Soekarjo, Purwokerto. Total subyek penelitian adalah 22 orang untuk NPC WHO-3 pasien dengan *informed consent*. Sampel diisolasi dengan protokol kit *Purelink® DNA / RNA* (Invitrogen) untuk mendapatkan larutan DNA 100µL dan disimpan dalam waktu lama pada suhu -80 ° C. Teknik PCR konvensional dilakukan untuk mendeteksi gen LMP1 dengan mengamplifikasi DNA gen EBV LMP1 yang menghasilkan amplikon DNA berukuran 142 bp. Analisis sensitivitas metode PCR dan hasil identifikasi gen LMP-1 dilakukan menggunakan metode deskriptif dengan membandingkan hasil deteksi yang diperoleh pada penelitian ini dengan hasil penelitian terdahulu yang terkait. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen LMP-1 EBV sebagai biomarka diagnosis KNF dapat dideteksi menggunakan teknik PCR konvensional yang menghasilkan amplikon DNA berukuran 142 bp. Sensitivitas gen LMP1 adalah 77,27%, yang menunjukkan sensitivitas tinggi. Sensitivitas PCR konvensional dalam mendeteksi gen EBMP LMP-1 lebih tinggi bila dibandingkan dengan gen EBMP LMP-1 30 bp dan LMP2A EBV.

**Kata kunci :** *Epstein-Barr Virus, gen LMP-1, Diagnosis, Karsinoma Nasofaring*

### **Pendahuluan**

Karsinoma nasofaring (KNF) adalah tumor ganas sel epitel nasofaring yang berlokasi pada daerah cekungan Rosenmuelleri dan tempat bermuaranya saluran *eustachii* (Roezin & Adham, 2007). Insidensi KNF di wilayah Indonesia sebesar 6,2 per 100.000 penduduk per tahun (Steven et al., 2006). Insidensi KNF di wilayah Kabupaten Banyumas pada tahun 2009 menunjukkan peningkatan 3,3 kali dibandingkan tahun 2008 dengan jumlah pasien baru KNF pada

tahun 2009 sebanyak 119 orang (Hafiiidhaturrahmah, 2010). Berdasarkan rekam medis RSUD Prof. Dr. Margono Soekarjo jumlah kunjungan pasien KNF pada tahun 2013 sebesar 371 pasien, sedangkan pada tahun 2014 sebanyak 332 pasien (Dinas Kesehatan Banyumas, 2014).

KNF merupakan penyakit yang bersifat multifaktor dengan infeksi virus Epstein-Barr (EBV) sebagai faktor penyebab utama selain faktor genetik dan faktor lingkungan. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa infeksi EBV

konsisten dengan timbulnya KNF. Pada infeksi laten, EBV tidak memproduksi virion baru. Infeksi laten dapat membuat sel normal menjadi sel tumor, karena EBV menginfeksi sel tanpa membunuhnya tetapi merangsang sel untuk terus tumbuh tanpa terkendali dan dapat terlindungi dari proses apoptosis sel. Infeksi EBV pada KNF menunjukkan pola infeksi fase laten II yang mengekspresikan EBNA-1 dan LMP-1, sehingga ekspresi kedua gen ini sering digunakan sebagai petanda biologi infeksi EBV pada KNF (Barnes et al., 2005).

LMP-1 adalah gen yang paling berperan dalam transformasi sel normal menjadi sel tumor, karena gen LMP1 ini menjadi perantara untuk sinyal TNF (*tumor necrosis factor*), meningkatkan regulasi sitokin IL-10 yang memproliferasi sel B, dan menghambat respon imun lokal. Oleh karena itu, gen LMP-1 merupakan gen yang berperan penting dalam proses onkogenesis dan transformasi limfosit B (Middledorp et al., 2003). Hasil penelitian terdahulu menunjukkan positivitas ekspresi LMP-1 EBV cukup tinggi, terutama positivitas ekspresi LMP-1 EBV dengan teknik RT-PCR pada penderita KNF WHO-3 sebesar 91,3 % (Wahyono, 2012).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan tersebut di atas, maka permasalahan yang perlu dikaji adalah apakah pada penderita KNF dapat diidentifikasi gen LMP1 EBV dengan teknik PCR (Polimerase Chain Reaction) konvensional dan apakah metode PCR konvensional sensitive untuk mendeteksi gen LMP1 EBV. Penelitian bertujuan untuk melakukan identifikasi gen LMP-1 EBV sebagai petanda molekuler penapisan awal infeksi Epstein-Barr virus pada penderita Karsinoma Nasofaring dengan teknik PCR konvensional dan mengetahui sensitivitas metode PCR konvensional dalam mendeteksi gen laten LMP-1 EBV sebagai petanda biologi molekuler yang potensial untuk diagnosis KNF. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang metode berbasis biologi molekuler untuk mendeteksi eksistensi gen laten LMP-1 EBV sebagai pemeriksaan penunjang dalam diagnosis KNF, terutama penapisan awal infeksi Epstein-Barr Virus pada KNF.

## Materi dan Metode

### Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler Fakultas Biologi Unsoed, sedangkan pengambilan sampel darah vena dilakukan di Poli THT RSUD Prof.dr. Margono Soekarjo Purwokerto. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan April sampai Agustus 2015.

### Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian belah lintang (*cross sectional*). Dalam hal ini, variabel bebas dan variabel tergantung diukur pada waktu yang bersamaan. Pengambilan sampel dilakukan secara *consecutive sampling* dari penderita KNF yang terdiagnosis pasti dari hasil biopsi oleh unit Patologi Anatomi yang diambil di Poli THT RSUD Prof. dr. Margono Soekarjo, Purwokerto. Penelitian ini menggunakan data nominal. Berdasarkan atas proporsi jumlah pasien KNF dibandingkan dengan kanker lain adalah 5,46 persen (*Incidence Primary Cancer in Indonesia Pathology Base*, 1990), maka besar sampel minimal yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 22 orang.

### Variabel penelitian

Variabel yang digunakan adalah variabel bebas dan tergantung. Variabel bebas yang diamati dalam penelitian ini adalah ukuran amplikon DNA fragmen gen LMP-1, sedangkan variabel tergantung dalam penelitian ini adalah eksistensi gen LMP-1 EBV.

### Pengambilan sampel

Pengambilan sampel darah pasien KNF dilakukan di Poli THT RSUD Prof. dr. Margono Soekarjo – Purwokerto. Sampel sebanyak 3 cc diambil berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologi jaringan biopsi. Plasma darah diambil dari darah vena pada lengan tangan dan disimpan pada tabung *vacutainer* yang telah terdapat antikoagulan (EDTA).

### Karakterisasi sampel penelitian

Sampel penelitian dikarakterisasi berdasarkan faktor risiko yang diderita pasien dari hasil wawancara dan data diri serta kuisioner.

### Isolasi DNA virus

Sampel darah vena (tepi) sebanyak 3 cc pada tabung *vaccutainer* diisolasi sesuai dengan protokol kit Purelink® DNA/RNA viral (Invitrogen) hingga diperoleh 50  $\mu$ l DNA virus. DNA yang diperoleh kemudian disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C dan selanjutnya dilakukan pengukuran kuantitas DNA.

### Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA

Kemurnian dan konsentrasi DNA diukur menggunakan metode spektrofotometri nanodrop dengan cara sebanyak 2  $\mu$ L DNA dibaca nilai *optical density* (OD)nya. Nilai kemurnian DNA diketahui dari pembacaan pada  $\lambda$ 260 nm dibagi dengan pembacaan pada  $\lambda$ 280 nm dan pembacaan pada  $\lambda$ 260 nm dibagi dengan pembacaan pada  $\lambda$ 230 nm. Apabila pada hasil  $\lambda$ 260/ $\lambda$ 280 didapatkan angka 1,8-2,0, maka DNA dinyatakan murni. Rasio OD akan lebih besar atau lebih kecil dari nilai 1,8-2,0 jika ditemukan kontaminasi dari protein atau RNA. Konsentrasi DNA dapat diketahui dari pembacaan pada  $\lambda$ 260 nm.

### **Amplifikasi gen LMP-1 menggunakan teknik PCR konvensional (Wahyono, 2010)**

Teknik PCR dua tahap digunakan untuk mendeteksi gen LMP-1 EBV. Primer yang digunakan pada PCR tahap I dan II untuk gen LMP-1 EBV akan menghasilkan amplikon DNA berukuran 142 pb. Primer sisi kiri (*left/forward primer*) adalah 5'-GGAGATTCTCTGGCGACTTG-3' dan primer sisi kanan (*right/reverse primer*) adalah 5'-GAGCCAAAGGAGATCAACCA-3'.

Campuran PCR (PCR mix) pada amplifikasi tahap I dibuat dalam volume 15  $\mu$ L yang komposisinya terdiri dari 7,5  $\mu$ L Dream Taq PCR MasterMix-Thermo Scientific (Dream Taq DNA Polymerase, 2X Dream Taq Buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dGTP, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dTTP), 1  $\mu$ L 15  $\mu$ M primer forward dan reverse, 1-2  $\mu$ L (50-100 ng/ $\mu$ L) cetakan DNA, dan 3,5-4,5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O (PCR grade). Campuran PCR diamplifikasi pada mesin PCR (*thermocycler*) pada kondisi PCR sebagai berikut: denaturasi awal 95°C selama 5 menit, diikuti dengan 35 siklus denaturasi 95°C selama 30 detik, penempelan 55°C selama 30 detik, dan pemanjangan 72°C selama 30 detik. Selanjutnya, tahap pemanjangan akhir dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit.

Campuran PCR (PCR mix) pada amplifikasi tahap II dibuat dalam volume 15  $\mu$ L yang komposisinya terdiri atas 7,5  $\mu$ L Dream Taq PCR Master Mix-Thermo Scientific (Dream Taq DNA Polymerase, 2X Dream Taq Buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dGTP, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dTTP), 1  $\mu$ L 15  $\mu$ M primer forward dan reverse, 0,5  $\mu$ L cetakan DNA (amplikon DNA PCR tahap I), dan 5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O (PCR grade). Amplifikasi dilakukan pada mesin PCR (*thermocycler*) dengan kondisi PCR sama seperti pada amplifikasi tahap I.

### **Visualisasi hasil deteksi gen LMP-1 menggunakan elektroforesis gel agarosa**

Hasil amplifikasi gen divisualisasikan menggunakan metode elektroforesis gel agarosa 2%. *Running* dilakukan selama 60 menit dengan voltase 90 V dan kuat arus 500 mA. Hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan Gel-Doc 1000 yang dapat dilihat pada layar komputer.

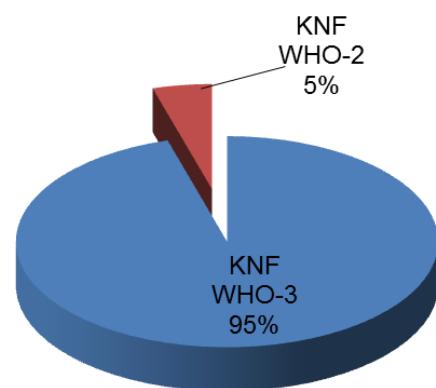
### **Analisis data**

Hasil identifikasi gen LMP-1 dan sensitivitas metode PCR konvensional yang didapatkan dianalisis dengan metode deskriptif dengan cara membandingkan hasil deteksi yang didapatkan dengan hasil penelitian-penelitian sebelumnya yang berkaitan.

## **Hasil dan Pembahasan**

### **Karakteristik sampel penelitian**

Dari 22 sampel yang didapatkan, sebanyak 21 sampel merupakan KNF tipe WHO-III, sedangkan 1 sampel merupakan KNF tipe WHO-II seperti pada Gambar 1. yang menunjukkan distribusi tipe KNF berdasarkan atas histopatologinya.



Gambar 1. Distribusi tipe KNF berdasarkan atas histopatologinya (Sumber data primer: catatan medis RSUD Prof. dr. Margono Soekarjo yang diolah oleh peneliti).

Gambar 1. menunjukkan proporsi sampel penelitian pasien KNF WHO-III lebih dominan daripada KNF WHO-II, sedangkan pasien KNF WHO-I tidak ditemukan pada Poli THT - RSUD Prof. dr. Margono Soekarjo. Menurut Marks et al. (1998) KNF WHO-II dan WHO-III mempunyai keterkaitan yang lebih tinggi dengan infeksi EBV daripada KNF WHO-I, terutama pada daerah nonendemik. Penelitian yang lebih terbaru menunjukkan bahwa hampir semua kasus KNF di daerah endemik memiliki komorbiditas dengan infeksi EBV, yang membuktikan bahwa EBV merupakan etiologi dari KNF. Menurut Adham (2014), gambaran histopatologi KNF WHO-III adalah tipe KNF yang paling sering ditemukan pada daerah dengan prevalensi KNF yang tinggi. Negara-negara di Asia Tenggara, termasuk Indonesia, termasuk daerah endemik KNF. KNF WHO-III merupakan tumor yang paling banyak ditemukan dengan insidensi 6,2 per 100.000 per tahun pada kelompok laki-laki dan 4,6 per 100.000 per tahun pada kelompok perempuan dengan rerata insidensi adalah 3,9 per 100.000 per tahun (Fachiroh et al., 2004).

Tabel 1. Distribusi sampel penelitian pasien KNF berdasarkan usia (Sumber data primer: catatan medis RSUD Prof. dr. Margono Soekarjo yang diolah oleh peneliti)

Kelompok Usia Pasien	Jumlah (n)	Persentase (%)
< 30 tahun	3	13,64
30-40 tahun	1	4,55
40-50 tahun	7	31,82
50-60 tahun	8	36,36
>60 tahun	3	13,64
Jumlah	22	100,00
Usia (rerata±SD)	49,67±14,79	

Tabel 1. menunjukkan bahwa pasien KNF memiliki distribusi umur yang berbeda. Dari 22 sampel penelitian, kelompok usia penderita KNF yang dominan adalah 50-60 tahun, yaitu sebanyak 8 pasien (36,36%) dan kelompok usia 40-50 tahun, yaitu sebanyak 7 pasien (31,82%). selanjutnya, kelompok usia <30 tahun dan >60 tahun adalah masing-masing sebanyak 3 pasien (13,64%) dan kelompok usia 30-40 tahun hanya 1 pasien (4,55%). Data tersebut menunjukkan bahwa 18 pasien (81,82%) berusia >40 tahun dan merupakan kelompok usia berisiko terkena KNF, sedangkan 4 pasien (18,18%) berusia <40 tahun yang merupakan kelompok usia tidak berisiko terkena KNF. Kecenderungan penderita KNF pada usia diatas 40 tahun berhubungan dengan sistem imunitas yang menurun pada umur

tersebut sehingga antigen EBV penyebab tumor tidak dapat dieliminasi secara baik oleh sistem imun tubuh. Usia rerata sampel penelitian ini adalah 50 tahun. Penelitian Ondrey & Wright (2003) menunjukkan usia rerata penderita KNF adalah 50 tahun. Penelitian Adham (2014), menunjukkan bahwa proporsi usia penderita KNF adalah > 40 tahun. Kajian literatur menggambarkan distribusi usia bimodal di negara-negara Barat dan Amerika, dengan angka kejadian tertinggi pada usia 10 hingga 20 tahun, kemudian 40 hingga 60 tahun. Namun, pola distribusi tersebut tidak dijumpai di daerah endemik. Henny (2006), menyatakan bahwa insiden KNF tertinggi pada kelompok usia 41-50 tahun,yaitu 30,4% dari 79 kasus.

Tabel 2. Distribusi sampel penelitian pasien KNF berdasarkan jenis kelamin(Sumber data primer: catatan medis RSUD Prof. dr. Margono Soekarjo yang diolah oleh peneliti)

Kelompok Jenis Kelamin	Jumlah (n)	Persentase (%)
Laki-laki	18	81.82
Perempuan	4	18.18
Total	22	100.0

Tabel 2. menunjukkan bahwa sebanyak 18 pasien KNF (81,82%) berjenis kelamin laki-laki, sedangkan 4 pasien KNF (18,18%) berjenis kelamin perempuan. Oleh karena itu, rasio antara kelompok pasien laki-laki dan perempuan sebesar 4,5:1. Rasio tersebut memberikan gambaran bahwa jumlah pasien laki-laki lebih dominan dibandingkan dengan perempuan. Hal ini disebabkan pasien laki-laki memiliki pola hidup yang lebih berisiko terkena KNF seperti kebiasaan merokok, paparan debu, dan paparan asap dibandingkan dengan pasien perempuan.

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa KNF lebih sering ditemukan pada laki-laki dibandingkan dengan perempuan dengan perbandingan 2-3:1 (Steven et al., 2006). Hasil studi di Tiongkok dan Pakistan yang menunjukkan proporsi pasien KNF laki-laki 1,8 lebih banyak dibandingkan dengan perempuan. Demikian pula, hasil penelitian proporsi pasien KNF di Brunei Darussalam pada etnis populasi Cina, India, dan Melayu juga menunjukkan hasil yang sama dengan proporsi di Tiongkok dan Pakistan (Chang & Adami, 2006).

Tabel 3. Distribusi sampel penelitian pasien KNF berdasarkan faktor risiko (Sumber data primer: catatan medis RSUD Prof. dr. Margono Soekarjo yang diolah oleh peneliti)

Kebiasaan hidup	Jumlah Laki-laki(%)	Jumlah Perempuan (%)
Merokok	9 (40,91%)	1 (4,55%)
Terpajan asap	10 (45,45%)	2 (9,09%)
Terpajan debu	11 (50%)	0 (0%)
Terpajan bahan kimia	1 (4,55%)	1 (4,55%)
Riwayat keluarga	3 (13,64%)	1 (4,55%)

Tabel 3. menunjukkan faktor risiko pasien KNF sebagai berikut. dari jumlah keseluruhan sampel penelitian, yaitu 22 pasien, sebanyak 11 pasien (50%) laki-laki terpajan debu, 10 pasien (45,45%) terpajan asap, 9 pasien (40,91%) merokok, 3 pasien (13,64%) memiliki riwayat keluarga penderita KNF, dan 1 pasien (4,55%) terpajan bahan kimia. Kebiasaan hidup pada pasien perempuan lebih sehat, yaitu yang merokok, terpajan bahan kimia, dan riwayat keluarga penderita KNF hanya terdapat 1 pasien (4,55%), sedangkan yang terpajan asap hanya 2 pasien (9,09%). Friborg et al. (2007) menyatakan bahwa orang yang merokok jauh lebih berisiko terkena KNF daripada orang yang tidak merokok. Sejak tahun 1950 sudah dinyatakan bahwa merokok menyebabkan kanker dan kematian sekitar 4 sampai 5 juta orang per tahunnya.. Kanker akibat merokok diperkirakan mengalami peningkatan menjadi 10 juta orang per tahunnya pada 2030. Rokok mengandung >4000 bahan karsinogenik, termasuk nitrosamin yang meningkatkan risiko terkena KNF. Penelitian Chang & Adami (2006) menunjukkan merokok meningkatkan risiko KNF sebesar 2 sampai 6 kali. Demikian pula, 60% KNF WHO-I berhubungan dengan kebiasaan merokok, sedangkan risiko KNF WHO-II dan KNF WHO-III tidak berhubungan dengan kebiasaan merokok. Perokok dengan tingkat konsumsi >30 bungkus per tahun mempunyai risiko tinggi terkena KNF. Umumnya, penderita KNF memiliki kebiasaan merokok selama minimal 15 tahun (51%) dan mengkonsumsi tembakau dalam bentuk lain (47%). Kebiasaan merokok >25 tahun meningkatkan risiko terkena KNF dan >40 tahun meningkatkan 2 kali lipat risiko terkena KNF (Friborg et al., 2007).

Beberapa peneliti menyatakan bahwa insidensi KNF yang tinggi di wilayah Tiongkok Selatan dan Afrika Utara disebabkan oleh asap dari pembakaran kayu bakar (Chang & Adami, 2006). Sebanyak 93% penderita KNF tinggal di rumah dengan ventilasi buruk dan mempunyai riwayat terkena asap hasil bakaran kayu bakar. Pajanan asap hasil kayu bakar >10 tahun akan meningkatkan 6 kali lipat risiko terkena KNF (Ondrey & Wright, 2003). Riwayat infeksi kronik telinga, hidung, tenggorok dan saluran napas

bawah meningkatkan risiko KNF sebanyak dua kali lipat. Bakteri yang menginfeksi saluran nafas dapat mengurai nitrat menjadi nitrit, kemudian dapat membentuk bahan N-nitroso yang karsinogenik. Kebiasaan mengunyah betel nut (*Areca catechu*) di Taiwan selama lebih dari 20 tahun berhubungan dengan peningkatan 70% risiko KNF. Sebuah penelitian ekologi di Tiongkok Selatan menemukan 2 sampai 3 kali lipat kadar nikel pada nasi, air minum, dan rambut penduduk yang tinggal di wilayah yang tinggi insiden KNFnya. Penelitian lain menyatakan bahwa kandungan nikel, zink dan cadmium pada air minum lebih tinggi di wilayah dengan angka insidensi KNF tinggi. Risiko KNF juga meningkat berkaitan dengan makanan yang mengandung bahan pengawet lain seperti daging dan telur terutama di Tingkok Asia Tenggara, Afrika Utara/Timur Tengah dan penduduk asli Artik (Chang & Adami, 2006).

Kerabat pertama, kedua, ketiga pasien KNF lebih berisiko terkena KNF (Ondrey & Wright, 2003). Orang yang mempunyai hubungan kekerabatan tingkat pertama KNF mempunyai risiko terkena KNF sebesar 4-10 kali dibandingkan dengan yang tidak berhubungan kekerabatan. Risiko kanker kelenjar air liur dan serviks uterus juga meningkat pada keluarga dengan kasus KNF. Faktor risiko lingkungan seperti mengkonsumsi ikan asin, kebiasaan merokok, dan paparan pada produk kayu meningkatkan level antibodi anti-EBV dan beberapa polimorfasi genetik. Kasus KNF WHO-II dan KNF WHO-III biasanya berkaitan dengan kekerabatan dalam keluarga (familial), sedangkan KNF WHO-I berisifat nonfamilial (Chang & Adami, 2006).

### Isolasi DNA virus

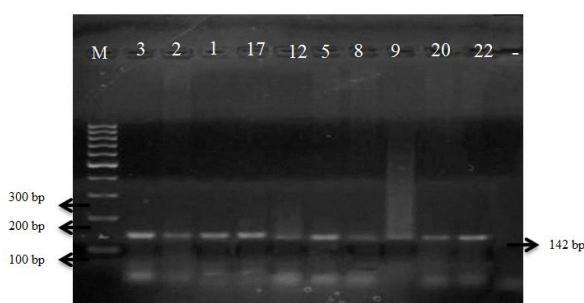
Hasil pengukuran konsentrasi DNA berkisar antara 5-286 ng/ $\mu$ l. Kemurnian DNA diukur berdasarkan atas rasio  $\lambda$ 260/280 berkisar antara 1,3 (nilai minimum)-2,3 (nilai maksimum) dan pada nilai absorbansi  $\lambda$ 260/230 berkisar antara 0,13 (nilai minimum)-0,9 (nilai maksimum). Pada beberapa sampel, kemurnian DNA tidak terdeteksi walaupun nilai konsentrasi DNanya diketahui. Metode isolasi DNA virus sudah cukup baik karena menghasilkan konsentrasi DNA yang

tinggi. Namun, berdasarkan atas nilai kemurnian sampel terindikasi bahwa beberapa sampel penelitian masih terkontaminasi, baik oleh protein maupun bahan organik lain. Sambrook & Russel (2001) menyatakan bahwa DNA dengan rasio  $\lambda$ 260 nm/280 nm pada kisaran 1,8-2,0 memiliki kemurnian sesuai dengan persyaratan kemurnian dalam analisis molekuler. Menurut Tenriulo et al. (2001), kontaminasi protein dan bahan organik lainnya pada larutan DNA ditunjukkan dengan nilai rasio  $\lambda$ 260 nm/280 nm  $<1,8$ . Sebaliknya, kontaminasi fenol ditunjukkan oleh nilai  $\lambda$ 260 nm/280 nm  $>2,0$ .

#### Hasil deteksi gen LMP-1 menggunakan teknik PCR konvensional

Amplifikasi atau perbanyak DNA target dimaksudkan untuk meningkatkan jumlah DNA gen target dengan teknik PCR konvensional sehingga DNA dapat dideteksi menggunakan teknik elektroforesis. Metode PCR konvensional dua tahap bertujuan untuk memperoleh hasil amplikon DNA yang positif lebih optimal jumlahnya karena konsentrasi DNA virus yang relatif rendah pada larutan darah (Haryanto & Sofia, 2012). Hasil primer-blast menunjukkan bahwa primer yang digunakan dalam penelitian ini merupakan primer spesifik untuk mengamplifikasi fragmen gen LMP-1.

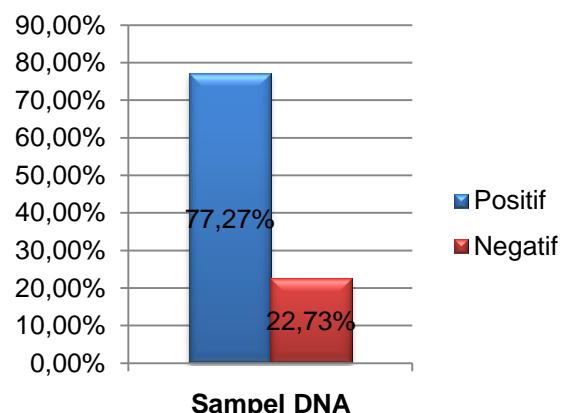
Hasil analisis PCR dua tahap divisualisasikan dengan menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarosa 2% dengan Gel-Doc 1000. Pita DNA yang terbentuk dibandingkan ukurannya dengan *DNA ladder* 100 bp. Gambar 2. menunjukkan hasil positif fragmen DNA gen LMP-1 EBV setelah PCR dua tahap menggunakan primer spesifik dengan produk PCR (amplikon) berukuran 142 bp dan menunjukkan bahwa gen LMP-1 telah berhasil diamplifikasi.



Gambar 2. Visualisasi produk PCR gen LMP-1 EBV (M = DNA Marka 100 bp; Sampel no 3, 2, 1, 17, 12, 5, 8, 9, 20, 22; - = Kontrol Negatif)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 22 sampel DNA pasien KNF, sebanyak 17 sampel

(77,27%) menunjukkan hasil positif atau terdeteksi gen LMP-1 EBV, sedangkan 5 sampel (22,73%) menunjukkan hasil negatif atau tidak terdeteksi gen LMP-1 EBV. Infeksi EBV pada KNF menunjukkan pola infeksi fase laten II yang akan mengekspresikan LMP-1 sehingga ekspresi gen ini sering digunakan untuk petanda biologi infeksi EBV pada KNF (Barnes et al., 2005). Gambar 3. menunjukkan grafik persentase hasil deteksi gen LMP-1 EBV pada penderita KNF menggunakan metode PCR konvensional.



Gambar 3. Persentase sensitivitas deteksi gen LMP-1 dengan metode PCR konvensional

Teknik PCR konvensional yang dilakukan merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi DNA genom EBV secara kualitatif. Teknik PCR konvensional yang digunakan dalam penelitian dapat mendeteksi 17 sampel (77,27%) dari 22 sampel. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Hsu et al. (2009) menunjukkan positivitas deteksi gen LMP-1 yang terdelesi 30 bp pada penderita KNF tipe WHO-III sebesar 56%. Hasil penelitian ini menunjukkan positivitas gen LMP-1 EBV yang lebih tinggi daripada gen LMP-1 EBV terdelesi 30 bp. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Azizah (2015) menunjukkan positivitas deteksi gen LMP-2A pada penderita KNF sebesar 72,73%. Hasil penelitian ini menunjukkan positivitas gen LMP-1 yang lebih tinggi daripada gen LMP-2A EBV. Oleh karena itu, gen LMP-1 dapat digunakan sebagai petanda biologi molekul dalam penapisan (*screening*) awal infeksi EBV pada penderita KNF.

Gen LMP-1 tidak dapat terdeteksi pada 5 sampel penelitian (22,73%) KNF yang diambil menggunakan metode PCR konvensional dengan kondisi PCR yang sama. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa hal sebagai berikut.

1. Konsentrasi dan kemurnian DNA EBV rendah

Salah satu penyebab tidak terdeteksinya amplikon fragmen DNA genom EBV dengan teknik PCR konvensional adalah konsentrasi DNA virus yang rendah pada sampel penelitian yang digunakan, karena konsentrasi DNA yang tepat akan menghasilkan amplifikasi yang baik. Besarnya volume DNA yang digunakan dalam PCR disesuaikan dengan masing-masing konsentrasi DNA yang telah diketahui pada tahap spektrofotometri. Gray et al. (2002), dalam penelitiannya menggunakan DNA *template* dengan konsentrasi 150 ng/ $\mu$ L. Konsentrasi DNA *template* yang tepat akan menghasilkan produk amplifikasi yang baik. Menurut Wilkerson et al. (1993), konsentrasi yang baik untuk PCR berkisar dari 0,5 sampai 6,5  $\mu$ g/mL. Sampel DNA yang memiliki konsentrasi yang tinggi diencerkan sampai konsentrasi tertentu agar dapat digunakan untuk proses PCR, sedangkan sampel DNA yang memiliki konsentrasi yang rendah ditambah volumenya dalam PCR sampai konsentrasi memenuhi.

## 2. Jumlah EBV dalam darah rendah

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah darah vena pasien KNF. Menurut Adham (2014), kandungan virus yang diisolasi dari sikat nasofaring menunjukkan nilai spesifik tinggi dan merupakan alat diagnostik primer untuk KNF yang minimal invasif, dengan sensitivitas yang hampir sama dengan serologi IgA EBV dan lebih baik dari pengukuran kadar DNA EBV di darah. Kandungan DNA EBV darah mencerminkan fragmen DNA mengalami apoptosis, yang akan dibersihkan dengan cepat dari sirkulasi. Kadar DNA EBV darah yang tinggi mencerminkan proses apoptosis dan nekrosis tumor yang masih berlangsung dan bukan massa tumor yang membesar.

## 3. Tipe KNF

Hubungan antara KNF dan infeksi EBV telah banyak dinyatakan oleh berbagai peneliti. KNF

WHO-II dan WHO-III telah terbukti konsisten dengan infeksi EBV, bahkan KNF tipe WHO-III dianggap 100% berasosiasi dengan infeksi EBV (Barnes et al., 2005). Penelitian yang dilakukan Ariwibowo (2013) menunjukkan bahwa KNF WHO-I dianggap tidak konsisten dengan infeksi EBV dan sekitar 60% berhubungan dengan kebiasaan merokok.

## 4. Variasi genetik

Salah satu variasi genetik adalah mutasi basa nukleotida pada ujung 3' di lokasi penempelan primer. Hal ini menyebabkan gen LMP-1 EBV tidak terdeteksi saat visualisasi karena amplifikasi fragmen gen ini tidak dapat berlangsung akibat gangguan pada tahap penempelan primer. Ketidaksesuaian satu basa pada ujung 3' akan menghambat penempelan primer pada DNA *template* karena primer hanya akan menempel pada fragmen DNA yang benar-benar spesifik sehingga terjadi proses amplifikasi (Welsh & Bunce, 1999).

## Simpulan

Teknik PCR konvensional dapat digunakan untuk mendeteksi gen LMP-1 EBV, sehingga gen LMP-1 EBV dapat digunakan sebagai biomarka diagnosis KNF. Sensitivitas teknik PCR konvensional dalam mendeteksi gen LMP-1 EBV menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi daripada LMP-1 EBV delesi 30 pb dan LMP-2A EBV.

## Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Penelitian & Pengabdian Masyarakat-Kemenristekdikti atas pendanaan penelitian ini melalui Hibah Penelitian Fundamental Tahun 2014 dan LPPM Unsoed sebagai pengelola pendanaan penelitian ini.

## Daftar Referensi

- Adham, M., 2014. *The Role of EBV Markers in Diagnosis, Treatment and Monitoring of Nasopharyngeal Carcinoma in Jakarta, Indonesia*. Laporan Penelitian. Amsterdam : Vrije Universiteit.
- Alex, T. & Hal, B. J., 2006. *Epstein-Barr Virus*. New York : Taylor & Francis Group.
- Ariwibowo, H., 2013. Faktor Risiko Karsinoma Nasofaring. *CDK-204*, 40(5), pp. 348-251.
- Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., & Sidransky, D., 2005. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. France : IARC Press.
- Cacais, A.O.G., 2008. *Immunological consequences of Epstein- Barr virus replication*. Laporan Penelitian. Sweden: Department of Microbiology Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm.
- Carter, J.B. & Saunders, V.A., 2007. *Virology: Principle and Applications*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.

- Chang, E.T., & Adami, H.O., 2006. The Enigmatic Epidemiology of Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(1), pp.65-77.
- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W., & Young, L.S., 1999. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *Journal Biology Chemistry*, 274(1), pp.85-96.
- Fachiroh, J., Schouten, T., Hariyanto, B., Paramita, D.K., Harijadi, A., Haryana, S.M., Ng.Mun, H., & Middeldorp, J.M., 2004. Molecular Diversity of Epstein-Barr Virus IgG and IgA antibody Responses in Nasopharyngeal Carcinoma : A Comparison of Indonesia, Chinese, and European Subjects. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(1), pp.53-62.
- Friborg, J.T., Yuan, J.M., Wang, R., Koh, W.P., Lee, H.P., & Yu, M.C., 2007. A Prospective Study of Tobacco and Alcohol Use as Risk Factors for Pharyngeal Carcinomas in Singapore Chinese. *Cancer*, 109(6), pp.1183-91.
- Hafidhaturrahmah, D.A.B., 2010. Distribusi Data Kanker Nasofaring Di RSUD Margono Soekarjo Purwokerto Tahun 2009. *Referat*. Purwokerto : SMF Telinga Hidung dan Tenggorokan (THT) Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman.
- Haryanto, A., & Sofia M., 2012. Isolasi dan Amplifikasi Gen Penyandi Domain C-Terminus Latent Membrane Protein (LMP-I) Epstein-barr Virus (EBV) dari Penderita Karsinoma Nasofaring (KNF). *J Sain Vet*, 18(2), pp. 1-7.
- Henny, F., 2006. Ekspresi Protein Mutan p53 pada Karsinoma Nasofaring. *Tesis*, Medan:FK USU .[Accessed 23 Juni 2015].
- Setiawan, H., T. Prasetyorini, & H. Djajaningrat., 2010. Polimorfisme Gen Tcr $\beta$  : Hubungan dengan suseptibilitas individu terhadap Karsinoma Nasofaring (KNF) pada beberapa suku/etnis di Indoonesia. *Jurnal Madya*, 8 (1), pp.39-49.
- Hsu, W.L., Chen, J.Y., & Chien, Y.C., 2009. Independent Effect of EBV and Cigarette Smoking on Nasopharyngeal Carcinoma: A 20-Year Follow-Up Study on 9,622 Males without Family History in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(1), pp. 18-26.
- Iwatsuki, K., Yamamoto, T., Tsuji, K., Suzuki, D., Fujii, K., Mazsuura, H., et al., 2005. A spectrum of clinical caused by immune responses againts Epstein-Barr virus infection. *Acta Med Okayama*, 58(1), pp.69-80.
- Jia-Ping, N., Mimi, C.Y., Qing-Sheng, W. & Brian, E., 1990. Consumtion of Salted Fish and Other Risk Factor for Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) in Tianjin, a Low Risk Region for NPC in the People's Republic of China. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(4), pp. 291-6.
- Tenriulo, A., Suryati, E., Parenrengi, A. & Rosmiat, 2001. *Ekstraksi DNA Rumput Laut Kappaphycus alvarezii dengan Metode Fenol Kloroform*. Laporan Penelitian. Makassar: Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
- Marks, J.E., Phillips, J.L., & Menck, H.R., 1998. The National Cancer Data Base Report on The Relationship of Race and National Origin to The Histology of Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer*, 83(3), pp.582-588.
- Masrin, I., 2006. Proporsi hasil pemeriksaan serologi virus Epstein-Barr pada pasien karsinoma nasofaring menggunakan reagen NPC REAAD INFLECTION dengan metode ELISA. PPDS Bidang Studi Ilmu Penyakit THT FKUI Jakarta, pp.4.
- Middeldorp, J.M., Brink, A.A.T.P., van den Brule, A.J.C., & Meijer, C.J.L.M., 2003. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol*, 45(1), pp.1-36.
- Murray, P.G. & Young, L.S., 2001. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expt Rev Mol Med*, 3(1), pp.1-20.
- Mutirangura, A., 2000. Molecular mechanism of nasopharyngeal carcinoma development.

- Res Advance Res Updated Med*, 1(1), pp.18-27.
- Ondrey, F.G. & Wright, S.K., 2003. Neoplasms of the Nasopharynx. Ballenger's Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. 16th ed. pp 1407-22.
- Pahala, H.M., 2009. Expresi Vascular Endothelial Growth Factor Pada Karsinoma Nasofaring. Available from: <http://repository.usu.ac.id/handle/123456789/6425> [Accessed 24 Desember 2014].
- Perkins, R.S., Sahm, K., Marando, C., Witmer, D.D., Pahnke, G.R., Mitchell, M., et al., 2006. Analysis of Epstein-Barr virus reservoirs in paired blood and breast cancer primary biopsy specimens by real time PCR. *Breast Cancer Research*, 8(6), pp.1-8.
- Roezin, A. & Adham, M., 2007. Karsinoma Nasofaring. In Soepardi E.A., Iskandar, N., Bashiruddin, J., & Restuti, R.D., editor. *Buku Ajar Ilmu Kesehatan: Telinga Hidung Tenggorok Kepala dan Leher Edisi ke 6*. Jakarta : Balai Penerbit FKUI.
- Sambrook J., & Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition). New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sastroasmoro, S. & Ismael, S., 2002. Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis. Edisi ke-2. Jakarta: CV Sagung Seto.
- Shotelersuk, K., Khorprasert, C., Sakdikul, S., Pornthanakasem, W., Voravud, N. & Mutirangura, A., 2000. Epstein-Barr virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(1), pp. 46-51.
- Steven, S.J.C., Verkuijen, S.A.W.M., Hariwiyanto, B., Harijadi, Paramita, D.K. & Fachiroh, J., 2006. Noninvasive diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: nasopharyngeal brushing reveal high Epstein-Barr virus (EBV) DNA load and carcinoma-specific viral BARF1 mRNA. *International Journal Cancer*, 119(6), pp.8-14.
- Stevens, C.R. & Rassekh, C., 1998. *Nasopharyngeal Carcinoma*. Department of Otolaryngology-UTMB: Galveston-TX.
- Thompson, M.P. & Kurzrock, R., 2004. Epstein-Barr Virus and Cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(1), pp.803-821.
- Wahyono, D.J. 2012. Ekspresi Relatif Gen BRLF1 Epstein-Barr Virus (EBV) sebagai Petanda Progresivitas Tumor Karsinoma Nasofaring (KNF) : Hubungannya dengan Polimorfisme Gen Reseptor Sel  $T\beta$  ( $TCR\beta$ ) dan Gen Reseptor Sel  $T\gamma$  ( $TCR\gamma$ ) Penjamu (Disertasi). Program Doktor Ilmu Biomedik, FKUI, Jakarta (*Unpublished*).
- Wahyono, D.J., 2010. Ekspresi Gen Litik EBV : Manfaatnya untuk Penegakan Diagnosa KNF. *Oto Rhino Laryngologica Indonesiana*, 40(2), pp. 1-8.
- Welsh, K. I. & Bunce, M., 1999. Molecular Typing for the MHC with PCR-SSP. *Immunogenetics*, 1(1), pp. 156–176.
- Wilkerson, R.C., Parsons, T.J. & Klern, T.A., 1993. Diagnosis by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction of Four Cryptic Species Related to *Anopheles nyssorhynchus albitalis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina. *Journal Medical Entomology*, 32(5), pp. 6531-6534.