



**PROFIL IMUNOPOSITIVITAS PROTEIN EBV PADA PENDERITA
KARSINOMA NASOFARING DAN INDIVIDU SEHAT BERISIKO**

JURNAL MEDIA MEDIKA MUDA

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan
Guna mencapai derajat sarjana strata-1 kedokteran umum**

**IRWAN NURYADIN
G2A008099**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
2012**

LEMBAR PENGESAHAN JURNAL MEDIA MEDIKA MUDA KTI

**PROFIL IMUNOPOSITIVITAS PROTEIN EBV PADA PENDERITA
KARSINOMA NASOFARING DAN INDIVIDU SEHAT BERISIKO**

Disusun oleh:

IRWAN NURYADIN

G2A 008 099

Telah disetujui:

Semarang, Agustus 2012

Penguji

Pembimbing

Prof. Dr. dr. Suprihati, M.Sc, Sp. THT-KL (K)
19500621 197703 2 001

dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL
19671002 199702 1 001

Ketua penguji

dr. Fanti Saktini, M.Si.Med
19810324 201012 2 001

PROFIL IMUNOPOSITIVITAS PROTEIN EBV PADA PENDERITA KARSINOMA NASOFARING DAN INDIVIDU SEHAT BERISIKO

Irwan Nuryadin¹, Awal Prasetyo², Dewi Kartikawati Paramita³

ABSTRAK

Latar Belakang: Analisis *immunoblot* digunakan untuk mendeteksi protein Epstein –Barr pada serum darah penderita karsinoma nasofaring dan individu sehat berisiko.

Tujuan: Mengetahui perbedaan imunopositivitas protein Epstein-Barr Virus antara penderita karsinoma nasofaring dengan individu sehat berisiko.

Metode: Penelitian observasional dengan *case-control design*, menggunakan sampel darah 20 penderita karsinoma nasofaring dan kontrol yang terdiri dari 20 individu sehat berisiko. Imunopositivitas Protein Epstein-Barr dianalisis dengan *immunoblot*.

Hasil: Uji Mann-Whitney menghasilkan imunopositivitas protein-protein yang memberikan perbedaan bermakna secara statistik, yaitu : VCA-p18 ($p=0.041$), VCA-p40 ($p=0.035$) dan EA-p47/54 ($p=0.009$) dan tidak bermakna secara statistik yaitu :

ZEBRA(0.140) , EBNA1 (0.540), TK(0.713), dan DNase (0.740)

Kesimpulan: Terdapat perbedaan imunopositivitas protein VCA-p18, VCA-p40 dan EA-p47/54 Epstein-Barr Virus dan tidak terdapat perbedaan imunopositivitas protein ZEBRA, EBNA1, TK, dan DNase Epstein-Barr Virus antara penderita karsinoma nasofaring dengan individu sehat berisiko.

Kata kunci: Protein Epstein-Barr Virus, karsinoma nasofaring, *immunoblot*

¹ Mahasiswa program pendidikan S-1 kedokteran umum FK Undip

² Staf pengajar Bagian Patologi Anatomi FK Undip

³ Staf pengajar Bagian Histologi dan Biologi Sel FK UGM

**PROFIL OF EPSTEIN-BARR VIRUS-ENCODED PROTEINS
IMMUNOPOSITIVITY IN THE SERUM SAMPELS FROM PATIENTS
WITH NASOPHARYNGEAL CARCINOMA (NPC) AND CONTROL
SUBJECT**

Irwan Nuryadin¹, Awal Prasetyo², Dewi Kartikawati Paramita³

ABSTRACT

Background: Epstein-Barr virus (EBV)-specific immunoblot analysis was used to reveal antibody responses against Epstein-Barr virus-encoded proteins in serum samples from patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) and control subject.

Aim: To investigate the difference of Epstein-Barr virus-encoded proteins immunopositivity in the serum sampels from patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) and control subject.

Methods: Observational analytic case-control. The sample was a group of 20 patients with nasopharyngeal carcinoma and the control group consisted of 20 persons who had no history of the cancer. Epstein-Barr virus-encoded proteins immunopositivity was determined by immunoblot analysis.

Result: The Mann-Whitney test for Epstein-Barr virus-encoded proteins immunopositivity count between patients with nasopharyngeal carcinoma vs control group : VCA-p18 ($p=0.041$), VCA-p40 ($p=0.035$) and EA-p47/54 ($p=0.009$) were significant, but ZEBRA(0.140) , EBNA1 (0.540), TK(0.713), and DNase (0.740) were not significantly different.

Conclusion: Statistical analysis showed significant difference in VCA-p18, VCA-p40 and EA-p47/54 between the two groups.

Keywords: Epstein-Barr virus-encoded proteins, nasopharyngeal carcinoma, immunoblot

- ^{1.} Student of faculty of medicine Diponegoro University
- ^{2.} Teaching staff of Pathological Anatomy Department of faculty of medicine Diponegoro University
- ^{3.} Teaching staff of Histology and Cell Biology Department of faculty of medicine Gajah Mada University

PENDAHULUAN

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan keganasan pada epitel nasofaring yang sulit dideteksi secara dini karena letak keganasan awalnya yang tersembunyi. Hal ini menjadi masalah besar karena prognosis penderita KNF sangat bergantung pada stadium klinis saat dilakukan diagnosis, dimana lebih dari 80% keberhasilan terapi terjadi pada stadium awal (stadium I–II) dan bila penderita didiagnosis pada stadium lanjut (stadium III–IV), angka keberhasilan kurang dari 40%.¹

KNF memiliki prevalensi yang unik, keganasan ini jarang terjadi di beberapa daerah tertentu, sebagai contoh di Eropa atau Amerika Utara, prevalensi KNF hanya 1 per 100.000 penduduk. Namun, di beberapa negara lain KNF memiliki perbedaan prevalensi yang cukup mencolok. Sebagai contoh di propinsi Guang Dong, China Selatan ditemukan kasus KNF tertinggi yaitu 2.500 kasus baru per tahun atau dengan prevalensi 39,84/100.000 penduduk. Di Indonesia sendiri angka kejadiannya sekitar 4,7 kasus baru/100.000 penduduk per tahun.² Keunikan prevalensi inilah yang melatarbelakangi pemikiran adanya keterkaitan KNF dengan faktor risiko tertentu. Dewasa ini etiologi dan faktor risiko KNF masih terus diteliti. Penelitian dewasa ini menunjukkan bahwa KNF berhubungan erat Epstein-Barr virus (EBV) salah satu jenis herpes virus yang menyebabkan infeksi asimtomatis pada >90% populasi dunia.³

Dewasa ini diketahui bahwa KNF tipe III WHO 100 % berhubungan dengan infeksi EBV. Dibandingkan dengan orang normal, pembawa, dan pasien keganasan kepala leher lain, pasien KNF memiliki antibodi anti-EBV spektrum

lebar dalam kadar lebih tinggi. Penelitian di Cina dan Taiwan menunjukkan serologi IgA dapat diaplikasikan untuk skrining dalam suatu populasi. Meski penelitian ini masih menggunakan teknik serologi yang kurang terstandarisasi, penelitian ini berhasil menunjukkan abnormalitas serologi berupa respon positif IgA EBV 2-3 tahun sejak awitan KNF.⁴ Hal ini bisa diaplikasikan untuk skrining pada populasi berisiko tinggi seperti keluarga pasien KNF dan pasien yang memiliki keluhan di sekitar kepala leher.

Penelitian di Taiwan melaporkan bahwa riwayat KNF dalam suatu keluarga dan anti-EBV seropositivity merupakan suatu determinasi penting dalam penentuan faktor risiko KNF.⁴ Dewasa ini di Indonesia dikembangkan uji diagnosis EBV IgA ELISA yang digunakan dalam pemeriksaan rutin KNF di Rumah Sakit Sardjito, Yogyakarta yang menghasilkan sensitifitas 85,4% dan spesifisitas 90,1%.⁵

Protein EBV dapat dideteksi dalam serum darah manusia menggunakan teknik *immunoblot* atau dikenal dengan *western blot*. Teknik ini untuk tes konfirmasi positif dan negatif palsu dari uji IgA kombinasi yang dikembangkan sebagai sarana deteksi KNF.⁶

Penulis menggunakan teknik immunoblot untuk mengetahui perbedaan imunopositivitas protein EBV pada penderita KNF dan individu sehat berisiko.

METODE

Penelitian ini adalah penelitian observasional secara *case-control* yang menggunakan penderita KNF dan individu sehat berisiko sebagai subyek penelitian. Penelitian ini dilaksanakan di Instalasi Rekam Medik Rumah Sakit

Umum Pusat Dokter Kariadi, Semarang dan Laboratorium Biologi Molekular FK UGM pada bulan September 2011 sampai Juni 2012. Jumlah subyek penelitian adalah 40 subyek yang terdiri dari 20 penderita KNF dan 20 individu sehat berisiko. Syarat responden diterima sebagai subyek penelitian bagi penderita KNF : terdiagnosis KNF menurut PA dan bagi individu sehat berisiko: Keluarga, tetangga penderita KNF tinggal di lingkungan sekitar penderita KNF dan orang normal yang tidak menderita KNF. dan bersedia ikut dalam penelitian ini.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah protein VCA-p18, ZEBRA, VCA-p40, EA-p47/54, DNase, TK, dan EBNA1, riwayat kanker dalam keluarga, konsumsi ikan asin dan merokok. Variabel terikatnya adalah karsinoma nasofaring.

Faktor risiko KNF diketahui dengan wawancara langsung dengan responden dan menggunakan alat bantu berupa kuesioner. Imunopositivitas protein EBV diketahui dengan menggunakan metode *immunoblot*.⁷ Uji normalitas pengetahuan tentang diare dianalisis dengan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah responden kurang dari 50 subyek, didapatkan distribusi data tidak normal. Kemudian dilakukan transformasi data, akan tetapi sebaran data tetap tidak normal, sehingga analisis dilakukan dengan uji non parametrik yaitu dengan uji *Mann-Whitney*. Analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS. Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN

Karakteristik Responden

Penderita KNF dan individu sehat berisiko diundang untuk mengikuti seminar kecil dan penelitian sebanyak 226 melalui surat undangan, peserta yang hadir sebanyak 22 orang kemudian dimintakan *informed consent*, mengisi kuesioner dan diambil sampel darahnya, kemudian untuk mencari calon subyek lain penulis menghubungi nomor telepon penderita KNF untuk dimintakan kesediaannya mengikuti penelitian, dengan cara ini berhasil didapatkan 2 subyek

penelitian kemudian untuk menambah jumlah sampel penelitian penulis menggunakan sampel darah yang sebelumnya telah dikumpulkan oleh dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL sebanyak 16 sampel. Total subyek penelitian yang berhasil dikumpulkan sebanyak 40 subyek yang terdiri dari 20 penderita KNF dan 20 individu sehat berisiko.

Responden terbanyak adalah usia 11 tahun dengan rerata usia $42,08 \pm 13,12$ tahun. Distribusi penderita menurut jenis kelamin adalah laki-laki sebanyak 27 orang (67,5%) dan wanita 13 orang (32,5%). Perbandingan laki-laki dan wanita adalah 2,1 : 1. Distribusi faktor risiko Berdasar konsumsi ikan asin, sebagian besar penderita KNF sudah pernah mengkonsumsi, yakni sebanyak 18 subyek (90.00%) dan 20 subyek (100.00%) untuk kelompok individu sehat berisiko. Hasil analisis dengan menggunakan uji *fisher exact* menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara penderita KNF dan individu sehat berisiko ($p=0.487$). Sedangkan berdasar riwayat merokok, sebagian besar penderita KNF memiliki riwayat merokok yaitu sebanyak 12 subyek (60.00%) dan 12 subyek (60.00%) untuk kelompok individu sehat berisiko. Hasil analisis dengan menggunakan uji *chi-square* menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok penderita KNF dan individu sehat berisiko ($p=1.000$)

Berdasar riwayat kanker dalam keluarga, sebagian besar subyek tidak memiliki riwayat kanker dalam keluarga, yaitu sebanyak 16 subyek (80.00%) untuk kelompok penderita karsinoma nasofaring dan 18 subyek (90.00%) untuk kelompok individu sehat berisiko. Hasil analisis dengan menggunakan uji *fisher exact* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara antara kelompok penderita KNF dan individu sehat berisiko ($p= 0.661$).

Imunopositivitas protein EBV

Data mengenai perbedaan imunopositivitas protein EBV antara penderita KNF dengan individu sehat berisiko ditunjukkan dalam tabel 1.

Tabel 1. Perbedaan imunopositivitas protein EBV

| Imunopositivitas Protein EBV | Penderita KNF | Individu Sehat Berisiko | p* |
|------------------------------|---------------|-------------------------|-------|
| VCA-p18 | Negatif | 3 | 0.041 |
| | positif lemah | 4 | |
| | Positif | 8 | |
| | positif kuat | 5 | |
| ZEBRA | Negatif | 9 | 0.140 |
| | positif lemah | 1 | |
| | Positif | 3 | |
| | positif kuat | 7 | |
| VCA-p40 | Negatif | 5 | 0.035 |
| | positif lemah | 6 | |
| | Positif | 5 | |
| | positif kuat | 4 | |
| EA-p47/54 | Negatif | 7 | 0.009 |
| | positif lemah | 2 | |
| | Positif | 4 | |
| | positif kuat | 7 | |
| DNAse | Negatif | 13 | 0.713 |
| | positif lemah | 2 | |
| | Positif | 5 | |
| | positif kuat | 0 | |
| TK | Negatif | 16 | 0.074 |
| | positif lemah | 2 | |
| | Positif | 2 | |
| | positif kuat | 0 | |
| EBNA1 | Negatif | 13 | 0.054 |
| | positif lemah | 2 | |
| | Positif | 4 | |
| | positif kuat | 1 | |

Dari data perbedaan imunopositivitas protein EBV antara penderita KNF dengan individu sehat berisiko di atas setelah diuji dengan uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa respon antibodi protein EBV yang berbeda bermakna adalah VCA-p18 ($p=0.041$), VCA-p40 ($p=0.035$) dan EA-p47/54 ($p=0.009$) sedangkan protein EBV yang tidak bermakna adalah ZEBRA(0.140), EBNA1 (0.540), TK(0.713), dan DNase (0.740).

PEMBAHASAN

Secara statistik terdapat perbedaan imunopositivitas protein VCA-p18, VCA-p40 dan EA-p47/54 yang bermakna antara kelompok penderita KNF dan individu sehat berisiko. Artinya, kelompok penderita KNF semakin berpeluang mendapatkan hasil imunopositivitas protein EBV yang lebih tinggi pada ketiga protein tersebut.

VCA-p18 (Viral Capsid Antigen) –p18 merupakan late protein EBV pada fase litik. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa antigen ini bersama VCA-p40 mempunyai nilai diagnostik untuk penyakit yang berhubungan dengan EBV. EA-p47/54 juga merupakan protein yang direspon oleh antibodi pada karsinoma nasofaring dengan stadium 2- 4.⁶ Hal ini dapat menjadi dasar pertimbangan dalam upaya skrining dini KNF pada individu sehat berisiko.

Imunopositivitas protein lain seperti ZEBRA, DNase, TK, dan EBNA1 secara statistik tidak bermakna. Pada penelitian sebelumnya imunopositivitas EBNA1 memiliki perbedaan yang bermakna antara penderita KNF dengan kontrol, perbedaan ini mungkin disebabkan perbedaan jumlah sampel.^{5,6,8}

Penelitian ini memiliki kelebihan, yaitu jumlah variabel yang diteliti cukup banyak sehingga cukup merepresentasikan protein-protein yang terkait dengan EBV dan KNF. Sampel penelitian yang merupakan serum darah penderita KNF dan individu sehat berisiko juga dianggap mampu merepresentasikan sebagian besar kondisi penderita KNF dan individu sehat berisiko.

Penelitian ini masih memiliki kekurangan, yaitu besar sampel yang belum memenuhi besar sampel minimal sebanyak 176 subyek yang dibagi menjadi 88 penderita KNF dan 88 individu sehat berisiko. Penulis hanya berhasil meneliti 40 subyek yang terdiri dari 20 penderita KNF dan 20 individu sehat berisiko. Dalam proses pengambilan sampel penelitian didapatkan berbagai kendala yaitu, minimnya jumlah responden yang bersedia diambil darahnya pada saat periode pengambilan sampel, surat undangan untuk mengikuti penelitian yang tidak sampai ke tangan responden karena ketidaklengkapan alamat yang tercantum di rekam medik. Kekurangan yang lain adalah masih ada variabel dan protein yang berhubungan dengan EBV dan KNF yang belum diteliti.

SIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan imunopositivitas protein VCA-p18, VCA-p40 dan EA-p47/54 Epstein-Barr Virus antara penderita karsinoma nasofaring dengan individu sehat berisiko.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai perbedaan imunopositivitas protein EBV dengan jumlah sampel penelitian yang lebih besar dan perbedaan imunopositivitas protein EBV -p18, VCA-p40 dan EA-p47/54 dengan metode kuantitatif dan lebih banyak menggambarkan protein-protein lain yang belum diteliti.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL selaku dosen pembimbing penelitian ini. Ibu Dewi Kartikawati Paramita, M.Si,Ph.D yang membimbing penulis melakukan proses *immunobloting* di Laboratorium Biologi Molekuler FK UGM. Tidak lupa pula ucapan terima kasih kepada Prof. Dr. dr. Suprihati, M.Sc, Sp. THT-KL (K) selaku dosen penguji dan dr. Fanti Saktini, M.Si.Med selaku Ketua Penguji KTI yang banyak memberikan masukan kepada penulis serta pihak-pihak lain yang telah membantu hingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Soewito MY, Kadir A, Savitri E, Bahar B. Respons antibodi IgA terhadap Epstein-Barr virus (EBV) pada keluarga penderita kanker nasofaring. Perhati. 2011 [cited 2011 November 26]. Available from: <http://www.perhati.org/wp-content/uploads/2011/11/Respons-antibodi-IgA-dr.pdf>
2. Suryandari DA, Asih SM, Soeharso P, Yurnadi. Delesi 30 pb gen laten membrane protein (LMP-1) virus Epstein-Barr pada penderita kanker Nasofaring (KNF) di Indonesia. Kongres Nasional PBI XIV dan Seminar Nasional Biologi XX. Malang: UIN; 2009.
3. Servi J. C. Stevens, Sandra A. W. M. Verkuijlen¹, Bambang Hariwiyanto, Harijadi, Jajah Fachiroh, Dewi K. Paramita, et al. Diagnostic Value of Measuring Epstein-Barr Virus (EBV) DNA Load and Carcinoma-Specific Viral mRNA in Relation to Anti-EBV Immunoglobulin A (IgA) and IgG Antibody Levels in Blood of Nasopharyngeal Carcinoma Patients from Indonesia. *J Clin Microbiol.* [Internet] 2005 [cited 2012 February 1]; 43(7): 3066–3073. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16002393/?tool=pubmed>
4. Wan-Lun Hsu, Kelly J. Yu, Yin-Chu Chien, Chun-Ju Chiang, Yu-Juen Cheng, Jen-Yang Chen, et al. Familial Tendency and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma in Taiwan: Effects of Covariates on Risk. *Am J Epidemiol.* [Internet] 2011 [cited 2011 December 13]; 173(3):292-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148719>
5. Fachiroh J, Paramita DK, Hariwiyanto B, Harijadi A, Dahlia HL, Indrasari SR, et al. Single-assay combination of Epstein-Barr virus (EBV) EBNA1 and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV Immunoglobulin G (IgG) and IgA Antibody Levels in Sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening. *J Clin Microbiol.* [Internet] 2006 [cited 2011 December 12]; 44(4):1459-67.

Available

from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/16597877/?tool=pubmed>

6. Jajah Fachiroh, Tabitha Schouten, Bambang Hariwiyanto, Dewi K. Paramita, Ahmad Harijadi, Sofia M. Haryana, et al. Molecular Diversity of Epstein-Barr Virus IgG and IgA Antibody Responses in Nasopharyngeal Carcinoma: A Comparison of Indonesian, Chinese, and European Subjects. *J Infect Dis.* [Internet] 2004 [cited 2012 February 14] ;190(1):53-62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15195243>
7. Lindi, Ellen. Identifikasi protein pregnancy associated glycoprotein (PAG) dalam air susu sapi perah peranakan Friesian Holstein. [Artikel Ilmiah]. Surabaya: Universitas Airlangga; 2011 [cited: 2012 February 12]. Available from: www.fkh.unair.ac.id/artikel1/ellen.pdf
8. Paramita DK, Fachiroh J, Haryana SM, Middeldorp JM. Two-step Epstein-Barr virus immunoglobulin A enzyme-linked immunosorbent assay system for serological screening and confirmation of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Vaccine Immunol.* [Internet] 2009[cited 2011 December 2];16(5):706-11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/19321695/?tool=pubmed>