

**PENGARUH *POLYPHENOLS* TEH HIJAU
TERHADAP KAPASITAS PRODUKSI TNF- α
OLEH SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI
PADA PENDERITA KARSINOMA NASOFARING
YANG MENDAPAT RADIOTERAPI**

***THE EFFECT OF GREEN TEA POLYPHENOLS
TO THE TNF- α PRODUCTION CAPACITY
BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS
ON NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS
WITH RADIOTHERAPY MANAGEMENT***



TESIS

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat sarjana S-2
dan memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu Kesehatan THT-KL**

Yunarti

**PROGRAM PASCA SARJANA
MAGISTER ILMU BIOMEDIK
DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
ILMU KESEHATAN THT-KL
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2007**

LEMBAR PENGESAHAN

T E S I S

**PENGARUH *POLYPHENOLS* TEH HIJAU TERHADAP KAPASITAS PRODUKSI
TNF- α OLEH SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI PADA PENDERITA
KARSINOMA NASOFARING YANG MENDAPAT RADIOTERAPI**

***THE EFFECT OF GREEN TEA POLYPHENOLS TO THE TNF- α PRODUCTION
CAPACITY BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS TO THE
NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS WITH RADIOTHERAPY
MANAGEMENT***

Telah disetujui,

Pembimbing Pertama

Pembimbing Kedua

dr. H. Wiratno, SpTHT-KL (K)
NIP : 130 350 523

Prof. dr. Noor Pramono, MMedSc, SpOG(K)
NIP : 130 345 800

Mengetahui

Ketua Program Studi
Ilmu Kesehatan THT-KL
Universitas Diponegoro

Ketua Program Studi Magister Ilmu
Biomedik Program Pasca Sarjana
Universitas Diponegoro

dr. Hj. Amriyatun, Sp.THT-KL (K)
NIP : 130 539 456

Prof. dr. H. Soebowo, SpPA (K)
NIP : 130 352 549

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri, didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu perguruan tinggi lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penelitian maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan didalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, September 2007

YUNARTI

RIWAYAT HIDUP SINGKAT

A. Identitas

Nama : Yunarti
Jenis kelamin : Wanita
Tempat/tanggal lahir : Bangil-Pasuruan, 26 Juni 1967
Agama : Katholik
NIM PPDS I IK THT-KL : G3L003079
NIM Magister Biomedik : G4A002121

B. Riwayat pendidikan

1. SDN Ketindan 01 Lawang, Malang Lulus tahun 1980
2. SMP Katholik Lawang, Malang Lulus tahun 1983
3. SMAN Lawang, Malang Lulus tahun 1986
4. FK Unissula, Semarang Lulus tahun 1994
5. PPDS-1 IK THT-KL FK Undip, Semarang Lulus tahun 2007
6. Program Magister Ilmu Biomedik Undip, Semarang Lulus tahun 2007

C. Riwayat Pekerjaan

1. Dokter PMI – UTDC Cabang Kodya Semarang : 1994 – 1995
2. Dokter PTT Puskesmas Brangsong I, Kendal : 1995 – 1998
3. Dokter PT. Texmaco Perkasa Engineering, Kendal : 1995 – 2000
4. Dokter PNS RSUD dr Agoesdjam, Ketapang – Kal Bar : 2000 – 2003

D. Riwayat keluarga

1. Nama orang tua Ayah : Soedjono, SH
Ibu : Soemarmi (Alm.)
2. Nama suami : dr. FX. Nanang Heru Prabowo, SpB
3. Nama anak : Antonina Ayuning Budi
Yohanita Ayuning Budi

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, atas kasih serta berkat penyertaanNya sehingga dapat menyelesaikan tesis ini dengan baik. Tesis ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok – Bedah Kepala dan Leher pada Rumah Sakit Pusat Dokter Kariadi serta Program Magister Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

Penelitian ini adalah bagian dari penelitian utama tentang Karsinoma Nasofaring yang dipimpin oleh guru sekaligus pembimbing saya dr. H. Wiratno, SpTHT-KL (K) dimana peneliti mengamati pengaruh pemberian polifenol teh hijau terhadap kapasitas produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi akibat radioterapi. Penelitian ini diharapkan menjadi sumbangan pengetahuan dalam mencari alternatif pencegahan terhadap peningkatan TNF- α sebagai efek samping radioterapi.

Dalam penelitian ini banyak kendala yang dihadapi, namun berkat ketekunan, kerjasama dan bimbingan dari para guru serta pembimbing penelitian sehingga pada akhirnya penelitian ini dapat diselesaikan. Saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Yth. dr. H. Wiratno, SpTHT-KL (K) dan Prof. dr. H.Noor Pramono,MMedSc,SpOG(K) yang telah membimbing dengan penuh dedikasi dan kesabaran.

Pada kesempatan ini saya ingin mengucapkan terimakasih dan penghargaan atas kesempatan, fasilitas, bimbingan, bantuan, dorongan, dukungan, masukan, kerjasama, partisipasi serta pengorbanan yang telah diberikan kepada saya selama menempuh pendidikan maupun pembuatan tesis ini, kepada yang terhormat :

1. Rektor Universitas Diponegoro Semarang.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
3. Direktur Utama dan jajaran Direksi RS Dr. Kariadi Semarang.
4. Ketua TKP PPDS I FK Universitas Diponegoro Semarang.
5. DR. Dr. Suprihati, SpTHT KL(K), MSc selaku Ketua Bagian IK THT-KL FK Undip / SMF K THT-KL RS Dr. Kariadi Semarang.
6. Dr. Amriyatun, SpTHT KL(K) selaku Ketua Program Studi IK THT-KL PPDS I FK Undip Semarang.
7. Dr. Wiratno, SpTHT KL(K) selaku pembimbing I, terima kasih atas dedikasi, dorongan, pengorbanan tanpa pamrih yang telah diberikan baik selama menjalani pendidikan hingga selesainya tesis ini.
8. Prof. Dr. Noor Pramono, MmedSc, SpOG(K) selaku pembimbing II, terima kasih atas bimbingan tentang metodologi penelitian serta cara penulisan tesis yang baik dan benar.
9. Prof. Dr. Herry Soepardjo, SpTHT KL(K) dan Prof. Dr. Bambang SS, SpTHT KL(K) selaku Guru Besar IK THT-KL FK UNDIP atas ilmu dan didikan yang diberikan.
10. Prof. Dr. Subowo SpPA(K), Prof. DR. Dr. Tjahjono, SpPA(K), FIAC, Prof. Dr. Edi Darmana, SpPar. PhD selaku Guru Besar dan seluruh staf pengajar Program Magister Ilmu Biomedik pada Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang.
11. Para staf pengajar bagian IK THT-KL PPDS I FK UNDIP. Terima kasih atas kesempatan belajar, didikan, bimbingan serta pengalaman operasi yang diberikan kepada saya :
 - i. Dr. Pandji Utomo, SpTHT KL(K) (Sub Bag. Laringologi)
 - ii. Dr. Yogyahartono, SpTHT KL(K) (Sub Bag. Otologi)
 - iii. Dr. Slamet Suyitno, SpTHT KL(K) (Sub Bag. Faringologi)
 - iv. Dr. Samsudin, SpTHT KL(K) (Sub Bag. Bedah Rekonstruksi)
 - v. Dr. Yuslam Samihardja, PAK, SpTHT KL(K) (Sub Bag. Neurotologi)
 - vi. Dr. Riece Hariyati, SpTHT KL(K) (Sub Bag. Rhinologi)

- vii. Dr. Dwi Antono, SpTHT KL (Sub Bag. Bronko-Esofagologi)
 - viii. Dr. Pujo Widodo SpTHT KL (Sub Bag. Otologi)
 - ix. Dr. Farokah, SpTHT KL (Sub Bag. Faringologi)
 - x. Dr. Muyasaroh, SpTHT KL (Sub Bag. Bronko-Esofagologi)
 - xi. Dr. Retno P, SpTHT KL (Sub Bag. Alergi-Imunologi)
12. Ketua SMF / Kepala Instalasi Radiologi dan Anestesi RS Dr. Kariadi Semarang.
 13. Kepala Laboratorium Patologi Anatomi RS Dr. Kariadi Semarang.
 14. Kepala Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP Semarang.
 15. Kepala Laboratorium Patologi Klinik RS Dr. Kariadi Semarang.
 16. Karyawan karyawan Bagian IK THT-KL FK UNDIP / SMF K THT-KL RS Dr. Kariadi (Pak Tauchid, Mbak Narti, Mbak Titin, Pak Ali) dan Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Undip Semarang (Ibu Hartini, Mas Doel, Mbak Nata).
 17. Seluruh residen IK THT-KL FK UNDIP / SMF K THT-KL RS Dr. Kariadi Semarang, terima kasih atas pengertian, kerjasama, masukan dan kebersamaan selama pendidikan dan penelitian.
 18. Karyawan karyawan Instalasi Radiologi (Pak Maskuri, Bu Nur, tim radiografer), Laboratorium Patologi Klinik (Pak Solichin dan timnya), Laboratorium Bioteknologi (Dr. Neni Susilaningsih, Bu Wati dan tim), terima kasih atas bantuannya selama penelitian.
 19. Seluruh pasien karsinoma nasofaring baik yang terpilih sebagai sampel atau pun tidak, penghargaan setinggi-tingginya atas kesediaan, partisipasi, kesabaran dan semangatnya dalam mengikuti penelitian sampai selesai.
 20. Seluruh paramedis bangsal THT (Bu Nindya, Bu Teti, Bu Ninik, Bu Jum, Mas Agus, Mas Jono, Mas Is, Mas Slamet, Mas Lulut, Mbak Yuni, Mbak Ul, Mbak Anis), petugas administrasi (Bu Mur), bagian rumah tangga (Bu Nanik, Bu Mar, Bu Gin, Pak Giyo, Pak Pardi) dan seluruh paramedis bagian radioterapi.

21. Kedua orang tua serta mertua, kakak-kakakku, suami tercinta (Dr. FX. Nanang HP, SpB) dan kedua puteriku (Mbak Nina dan Dik Nita) atas dukungan, pengertian, kesabaran serta doanya sehingga pendidikan ini bisa selesai.
22. Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Saya menyadari sepenuhnya tulisan ini masih jauh dari sempurna, untuk itu kritik dan masukan sangat saya harapkan demi kesempurnaan penulisan ini.

Semarang, September 2007

Hormat saya

Yunarti

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN PENELITIAN	ii
PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP SINGKAT	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi, xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan umum	3
1.3.2 Tujuan khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Keaslian Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Karsinoma Nasofaring	5
2.1.1 Radioterapi KNF	8
2.1.2 Respons radioterapi KNF	10
2.1.3 Faktor - faktor yang mempengaruhi respons sel terhadap radiasi	12

2.2	Radiobiologi	13
2.2.1	Efek radiasi pada molekul air	14
2.2.2	Efek radiasi pada DNA	17
2.2.3	Efek radiasi pada sel imun	20
2.2.4	Efek radiasi pada TNF- α	22
2.3	Respons imun terhadap kanker	25
2.4	Peranan komponen seluler yang memproduksi TNF- α terhadap tumor	26
2.5	Peranan sitokin pada sistem imun seluler	32
2.6	Sel imun darah tepi penderita kanker	36
2.7	<i>Polyphenols</i> Teh Hijau (PTH)	37
2.7.1	Struktur kimia EGCG	38
2.7.2	Farmakokinetik-farmakodinamik PTH	39
2.7.3	Efek biologi PTH	40
2.8	Patofisiologi	45
2.9	Kerangka Teori	47
2.10	Kerangka Konsep	48
2.11	Hipotesis	48
BAB 3	METODE PENELITIAN	49
3.1	Desain Penelitian	49
3.2	Tempat Penelitian	49
3.3	Populasi dan Sampel	50
3.3.1	Populasi	50
3.3.2	Sampel	50
3.4	Variabel Penelitian	52
3.4.1	Klasifikasi variabel	52
3.4.2	Definisi operasional variabel	52

3.5	Bahan Penelitian	53
3.6	Instrumen Penelitian	53
3.7	Cara Kerja	54
3.8	Sampel yang tidak diikuti dalam analisis	56
3.9	Alur Penelitian	55
3.10	Cara Analisis Data	57
BAB 4	HASIL PENELITIAN	58
4.1	Distribusi Frekuensi Penderita	58
4.1.1	Distribusi kelompok umur dan jenis kelamin (karakteristik penderita)	58
4.1.2	Distribusi kadar hemoglobin, skor Karnofsky, jenis patologi anatomi dan stadium tumor	59
4.2.	Uji Masing-masing Kelompok	59
4.2.1	Uji beda antara sebelum dan sesudah radioterapi pada kelompok perlakuan	60
4.2.2	Uji beda antara sebelum dan sesudah radioterapi pada kelompok kontrol	60
4.3.	Uji Beda Antar Kelompok	62
4.3.1	Uji beda rerata komponen imun antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol sesudah radioterapi	62
4.3.2	Perbedaan selisih rerata hitung limfosit, monosit dan kadar TNF- α antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol	63
4.3.3	Perbedaan persentase penurunan hitung limfosit, monosit dan kadar TNF- α antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol	65

BAB 5	PEMBAHASAN	66
5.1	Metode Penelitian	66
5.2	Analisis Univariat terhadap Distribusi Frekuensi Penderita	67
5.2.1	Berdasarkan umur	67
5.2.2	Berdasarkan jenis kelamin	68
5.2.3	Berdasarkan jenis histopatologi	69
5.2.4	Berdasarkan stadium tumor	69
5.3	Analisis Bivariat terhadap Komponen Imun	70
5.3.1	Perubahan respons imun post test pada kelompok kontrol	70
5.3.2	Perubahan respons imun post test pada kelompok perlakuan	73
5.3.3	Perbedaan hitung sel imun dan kadar TNF- α sesudah radioterapi antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol	75
5.4	Keterbatasan dan Kendala Selama Penelitian	76
BAB 6	SIMPULAN DAN SARAN	77
6.1	Simpulan	77
6.2	Saran	77
BAB 7	RINGKASAN	78
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN-LAMPIRAN		

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Stadium KNF	8
Tabel 2.2	Komposisi teh hijau dan teh hitam	37
Tabel 4.1	Distribusi penderita menurut kelompok umur	58
Tabel 4.2	Perbedaan rerata hitung limfosit, monosit, dan kadar TNF- α antara sebelum dan sesudah radioterapi pada kelompok perlakuan	60
Tabel 4.3	Perbedaan rerata hitung limfosit, monosit, dan kadar TNF- α antara sebelum dan sesudah radioterapi pada kelompok kontrol	61
Tabel 4.4	Hasil uji beda rerata hitung limfosit, monosit, dan kadar TNF- α sesudah radioterapi antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol	62
Tabel 4.5	Perbedaan rerata perubahan (selisih) hitung limfosit, monosit, dan kadar TNF- α antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol	63
Tabel 4.6	Perbedaan Persentase Penurunan Hitung Limfosit, Monosit, dan kadar TNF- α antara Kelompok Perlakuan dan Kelompok Kontrol	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur kimia EGCG	38
Gambar 4.1	Diagram bar perbedaan selisih hitung limfosit, monosit, dan kadar TNF- α antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol	64

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Ethical Clearence	87
Lampiran 2	Informed Consent	88
Lampiran 3	Pemeriksaan TNF- α	89
Lampiran 4	Data Variabel-Variabel Penelitian	94
Lampiran 5	Farmakokinetik Catechin	96
Lampiran 6	Uji Normalitas Data	97
Lampiran 7	Uji Homogenitas Data	98
Lampiran 8	Output SPSS	99

**PENGARUH *POLYPHENOLS* TEH HIJAU TERHADAP
KAPASITAS PRODUKSI TNF- α OLEH SEL MONONUKLEAR
DARAH TEPI PADA PENDERITA KARSINOMA NASOFARING
YANG MENDAPAT RADIOTERAPI**

ABSTRAK

Latar belakang: *Polyphenols* teh hijau (PTH) merupakan antioksidan kuat dan mampu mencegah peningkatan produksi sitokin inflamasi (IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α) oleh sel makrofag dan limfosit yang teraktivasi oleh radikal bebas. Radioterapi pada penderita Karsinoma Nasofaring (KNF) menimbulkan kerusakan sel imunologis yang berefek pada penurunan respons imun seluler.

Tujuan: Membuktikan bahwa PTH mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi akibat radioterapi pada penderita karsinoma nasofaring.

Metode: Penelitian *randomized controlled trial pre-post test design* menggunakan 50 penderita KNF dengan radioterapi sebagai sampel, dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel dibagi secara randomisasi blok menjadi dua kelompok; kelompok kontrol (KNF radioterapi + plasebo), dan kelompok perlakuan (KNF radioterapi + PTH). Pengukuran kadar TNF- α secara buta ganda dengan metode *ELISA* di laboratorium Bioteknologi FK UNDIP Semarang. Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas dan homogenitas, dilanjutkan dengan uji beda dengan program *SPSS for Windows 11,5 version*.

Hasil: Selama penelitian didapatkan 5 sampel di tiap kelompok yang *drop out*, sehingga hanya 40 sampel diperiksa kadar TNF- α . Rerata kadar TNF- α kelompok kontrol sebesar 1.764,6 \pm 1.897,65, sedangkan kelompok perlakuan adalah 1.461,8 \pm 832,25. Uji *Mann-Whitney* terhadap kadar TNF- α membuktikan tidak terdapat perbedaan bermakna pada kedua kelompok ($p=0,640$).

Simpulan: Pemberian PTH pada penderita KNF yang dilakukan radioterapi tidak bermakna dalam mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi.

Kata Kunci: *Polyphenols* teh hijau, TNF- α , sel mononuklear, KNF, radioterapi

**THE EFFECT OF GREEN TEA POLYPHENOLS TO THE TNF- α
PRODUCTION CAPACITY BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR
CELLS TO THE NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS
WITH RADIOTHERAPY MANAGEMENT**

ABSTRACT

Backgrounds: *The green tea polyphenols (GTP) is a strong antioxidant that has a potential effect on inhibiting the overproduction of cytokine inflammation (IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α) by macrophages and free radicals-activated lymphocytes. The radiotherapy of nasopharyngeal cancer (NPC) induce the immune-cell damages that effect on decreasing of cellular immune responses.*

Objective: *To prove the effect of PTH in inhibiting the TNF- α production capacity by peripheral blood mononuclear cells caused by radiotherapy to the nasopharyngeal carcinoma patients.*

Methods: *This was a randomized controlled trial pre-post test design using 50 NPC-radiotherapy induced patients as sample, that fulfilled the inclusion and exclusion criteria. The sample was divided into two groups randomly; NPC-radiotherapy induced patients plus placebo as control group, and NPC-radiotherapy induced patients plus GTP as treatment group. The TNF- α level was double blind-measured using ELISA at Biotechnology of Medical Faculty of Diponegoro University Semarang. The data was analyzed using normality and homogeneity tests, followed by test for differentiation by SPSS for Windows 11,5 version.*

Result: *The 5 sample were drop out in each group, so there were only 40 TNF- α level's data. The mean of TNF- α level in control group was 1764.6 \pm 1897.65, besides the treatment group was 1461.8 \pm 832.25. The Mann-Whitney test for TNF- α level was not significantly different in that two groups ($p=0,640$).*

Conclusion: *The GTP dietary on NPC-radiotherapy induced patients was not significantly inhibit the overproduction of TNF- α by peripheral blood mononuclear cells.*

Key Words: *The green tea polyphenols, TNF- α , mononuclear cells, asopharyngeal cancer, radiotherapy*

DAFTAR SINGKATAN

<i>APC</i>	: antigen presenting cell
<i>ATP</i>	: adenosine triphosphate
<i>BEGF</i>	: B cell maturation growth factor
<i>BEMF</i>	: B cell maturation factor
<i>CMI</i>	: cel mediated immunity
<i>CSF</i>	: colony stimulating factor
<i>CTL / sel T CD 8 / Tc</i>	: cytotoxic T lymphocyte / <i>sel T</i> cluster differentiation 8 / <i>Sel T</i> sitotoksik
<i>DNA</i>	: deoxyribo nucleic acid
<i>DSB</i>	: double strand breaks
<i>EBV</i>	: epstein barr virus
<i>EC</i>	: epicathecin
<i>ECG</i>	: epicathecin gallate
<i>EGG</i>	: epigallocatechin
<i>EGCG</i>	: epigallocatechin gallate
<i>H⁺</i>	: <i>radikal bebas hidrogen</i>
<i>HLA</i>	: histocompatibility locus antigen
<i>IFN-γ</i>	: interferon gamma
<i>IgG</i>	: immunoglobulin G
<i>IL-12</i>	: interleukin 12
<i>IL-2R</i>	: interleukin 2 reseptor
<i>INOS</i>	: inducible nitric oxide synthase
<i>KNF</i>	: <i>karsinoma nasofaring</i>
<i>LAK</i>	: lymphokine activated killer
<i>MAP</i>	: migration activation factor
<i>MCP-1</i>	: monocyte chemotactic protein -1
<i>MHC</i>	: major histocompatibility complex
<i>MIF</i>	: migration inhibition factor
<i>MDA</i>	: malon dialdehyde
<i>MOR</i>	: metabolic oxygen reactive
<i>MAF</i>	: macrophage activating factor
<i>MFF</i>	: macrophage fusion factor
<i>NF-κB</i>	: nucleus factor kappa beta
<i>NKCF</i>	: natural killer cell cytotoxic factor
<i>O₂⁻</i>	: <i>radikal bebas superoksid</i>
<i>OH⁻</i>	: <i>radikal bebas hidroksil</i>
<i>OOH</i>	: <i>radikal bebas peroksil</i>
<i>PGE2</i>	: <i>prostaglandin E2</i>
<i>PHA</i>	: phytohaemagglutinin
<i>PLA2</i>	: phospolipase A2
<i>PUFA</i>	: polyunsaturated fatty acid
<i>ROS / SOR</i>	: reactive oxygen species / <i>spesies oksigen reaktif</i>
<i>Sel NK</i>	: <i>sel</i> natural killer
<i>SMAF</i>	: specific macrophage arming factor
<i>SSB</i>	: single strand breaks
<i>T CD4</i>	: <i>sel T</i> cluster differentiation 4
<i>TCR</i>	: T cell receptor
<i>TNF-α / γ</i>	: tumor necroting factor alfa / gamma
<i>UICC</i>	: union international centre cancer
<i>VEGF</i>	: vascular endothelial growth factor
<i>WHO</i>	: World Health Organization

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Angka kejadian karsinoma nasofaring (KNF) menempati urutan kelima tumor ganas yang dijumpai di Indonesia. Namun, di bagian THT Kepala dan Leher menduduki urutan pertama, jauh di atas tumor ganas yang lainnya. KNF dapat mengenai semua golongan umur dan mempunyai potensi menyebar secara cepat ke kelenjar limfe regional atau metastasis jauh ke paru-paru, hati dan tulang.^{1,2} Di SMF K THT-KL RSUP Dr. Kariadi Semarang dilaporkan 127 kasus KNF dari tahun 2000 - 2002.³

Sampai saat ini, radioterapi merupakan terapi utama untuk memberantas KNF dan metastasisnya pada kelenjar getah bening leher. Akan tetapi, sinar pengion radioterapi bersifat non selektif, karena menyebabkan kematian biologis sel tumor dan sel normal disekitarnya, baik secara langsung maupun tidak langsung. Efek langsung sinar pengion adalah merusak struktur rantai DNA, sehingga mengganggu replikasi sel yang berakibat terjadinya kematian sel. Efek tidak langsung sinar pengion menimbulkan ionisasi molekul (terutama H₂O), sehingga terbentuk radikal bebas hidroksil (OH⁻) yang sangat reaktif dalam menyebabkan stres metabolik, stres oksidatif dan kerusakan struktur vital sel.⁴⁻⁶

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa radioterapi yang diberikan pada penderita KNF sering menimbulkan kerusakan sel imun yang berefek pada penurunan respons imun seluler. Respons imun seluler yang tinggi dan berfungsi dengan baik, sangat diperlukan dalam menghambat pertumbuhan sel tumor.^{7,8} Berbagai cara telah dilakukan untuk mencegah atau mengurangi pengaruh radioterapi terhadap sistem imun pada penderita KNF termasuk upaya meningkatkan respons tumor terhadap radiasi, antara lain dengan modifikasi teknik radioterapi, pemberian substansi yang bersifat *radiosensitizer*, penggunaan pesawat berenergi tinggi, memperbesar lapangan radiasi serta pembuatan CT-scan dalam perencanaan lapangan radiasi. Namun upaya di atas sampai sekarang masih

belum memberikan hasil yang diharapkan. Selain komplikasi radioterapi terhadap sistem imun masih tetap saja terjadi, kegagalan radioterapi yang dinyatakan dalam *low response* atau KNF respons rendah masih sering ditemukan.^{9, 10}

Efek radiasi terhadap sel imun akan menurunkan kualitas *immune surveillance* kanker yang terutama dikerjakan oleh sel T CD8⁺ atau *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL), *Natural Killer Cell* (sel NK), makrofag aktif dan sel *Lymphokine Activated Killer* (LAK). Penurunan kualitas *immune surveillance* akan sangat merugikan karena pertumbuhan tumor dapat makin progresif, meningkatkan metastasis serta memudahkan infeksi mikroba. Penurunan fungsi imunitas tubuh akibat radioterapi menyebabkan stres oksidatif, peningkatan konsentrasi metabolik oksigen reaktif (MOR) dan radikal bebas pada sel imun yang akan menyebabkan peningkatan produksi sitokin inflamasi (IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF- α). *Tumour Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) merupakan sitokin inflamasi yang paling berperan pada proses inflamasi dan dipakai sebagai indikator untuk sel yang mengalami stres oksidatif, apoptosis atau nekrosis. Kadar TNF- α yang dikeluarkan oleh makrofag atau limfosit yang mengalami inflamasi akan meningkat.^{8,11}

Beberapa peneliti melakukan penelitian tentang efek *polyphenols* teh hijau (PTH) terhadap sel imun yang menjadi target utama kerusakan akibat stres oksidatif. PTH merupakan antioksidan kuat dan dapat melindungi sel imun dari kerusakan biologis akibat radikal bebas. PTH terbukti mampu mencegah peningkatan produksi sitokin inflamasi (IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α) oleh sel makrofag dan limfosit yang teraktivasi oleh radikal bebas. Penelitian pada tikus membuktikan bahwa PTH menekan produksi TNF- α oleh sel mononuklear yang mendapat radiasi sinar ultra violet B.¹²

Atas dasar latar belakang di atas, maka upaya untuk mencegah penurunan respons imun seluler perlu dilakukan. PTH diasumsikan dapat mencegah inflamasi akibat radioterapi pada penderita KNF.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut :

Apakah PTH yang diberikan bersama radioterapi pada penderita KNF dapat mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Membuktikan bahwa PTH dapat mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi akibat radioterapi pada penderita KNF.

1.3.2 Tujuan khusus

Mengukur perbedaan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi pada penderita KNF antara kelompok radioterapi + PTH dengan kelompok radioterapi + plasebo.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai pengembangan dasar ilmu, khususnya alternatif terapi dalam mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi akibat radioterapi pada penderita KNF.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya, khususnya tentang potensi PTH didalam mencegah peningkatan kapasitas produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi akibat radioterapi pada penderita karsinoma yang lain.

1.5 Keaslian Penelitian

Belum pernah dilakukan penelitian *in vivo* tentang pengaruh PTH terhadap kapasitas produksi TNF- α pada pasien KNF yang mendapat radioterapi.

Penelitian-penelitian yang pernah dilakukan adalah :

1. Penelitian oleh Derek S. Wheeler, et. All (2004).
Membuktikan bahwa pemberian PTH sebesar 30 dan 100 mmol/L menyebabkan inhibisi transduksi sinyal proinflamasi dependen IL-1 β pada kultur sel Adenokarsinoma paru.
2. Penelitian oleh Tracy D'Alessandro, et. All (2003).
Membuktikan bahwa pemberian PTH sebesar 10mmol/L menyebabkan penurunan respons inflamasi dan pencegahan kanker pada netrofil manusia yang diisolasi.
3. Penelitian oleh Gary W. Varilek, et. All (2001).
Membuktikan bahwa pemberian PTH sebesar 5 gr/L selama 6 minggu pada tikus dengan defisiensi IL-2, dijumpai penurunan respons inflamasi ditandai dengan penurunan produksi TNF- α .
4. Penelitian oleh Guang Yu Yang, et. all (1998).
Membuktikan bahwa pemberian PTH sebesar 30 mmol/L pada sel kanker manusia menyebabkan inhibisi pertumbuhan sel kanker dan induksi apoptosis.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinoma Nasofaring (Epidemiologi, Faktor Risiko dan Diagnosis)

KNF adalah keganasan dari epitel atau mukosa dan kripta pada permukaan nasofaring. Hampir 60% keganasan di bagian THT, Kepala dan Leher adalah KNF, diikuti oleh tumor ganas hidung dan sinus paranasal (18%), laring (16%), tumor ganas rongga mulut, tonsil dan hipofaring prosentasenya rendah.¹³⁻¹⁵

Faktor rasial (etnik) adalah faktor risiko yang sangat menonjol pada KNF. Penyakit ini terutama ditemukan pada ras Mongoloid mulai dari Cina Selatan, Hongkong, Vietnam, Thailand, Malaysia, Singapura dan Indonesia. Penduduk Indonesia yang termasuk ras Mongoloid sub etnik Malayo-Polynesia adalah penderita KNF non Cina yang terbanyak dibandingkan dengan pribumi negara lain. Jumlah kasus di Indonesia mencapai 9.000 per tahun, sedang di RRC sebesar 20.000 kasus baru per tahun.¹⁴ Di Indonesia, frekuensi penyakit ini hampir merata di setiap daerah. Di RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta lebih 100 kasus per tahun, RS. Hasan Sadikin Bandung 60 kasus, Ujung Pandang 25 kasus, Palembang 25 kasus, Denpasar 15 kasus dan 11 kasus di Padang. Di RSUP Dr. Kariadi Semarang ditemukan 127 kasus dari tahun 2000 - 2002.¹⁴⁻¹⁶

WHO pada tahun 1997 merekomendasikan klasifikasi gambaran histopatologi KNF terdiri atas 3 bagian yaitu WHO1, WHO2 dan WHO3. WHO1 (tipe 1) adalah Karsinoma sel skuamosa berkeratinisasi, dimana terdapat jembatan interseluler dan keratin pada sebagian besar sel tumor. Pada tipe ini dibagi menjadi diferensiasi baik, sedang dan buruk. WHO2 (tipe2) adalah Karsinoma non keratinisasi, dijumpai diferensiasi sel skuamosa tanpa jembatan intersel. Pada tipe ini sebagian sel berdiferensiasi sedang dan sebagian lainnya berdiferensiasi baik. WHO 3 (tipe 3) adalah Karsinoma tidak berdiferensiasi. Sebuah penelitian di Jepang menemukan kasus KNF WHO1 sebesar 12%, WHO2 54% dan WHO3

sebesar 34%. Di bagian THT-KL RS. Dr. Kariadi Semarang ditemukan 112 kasus dengan WHO2 dan WHO3 dari 127 kasus KNF.^{3,16,17}

Terdapat 3 faktor yang berperan penting pada kejadian KNF, yaitu faktor infeksi *Epstein - Barr virus* (EBV), genetik (ras dan keturunan, dimana ada peningkatan titer *Histocompatibility Locus Antigen - A² dan B2-Sin²* (HLA) serta faktor lingkungan (makanan dan non makanan : ikan yang diasinkan, asap rokok dan kayu bakar, asap dupa, uap zat kimia, debu, alkohol, infeksi kronis hidung).¹⁸⁻²⁰

Sudah hampir dapat dipastikan bahwa penyebab KNF adalah virus EB, karena pada semua pasien didapatkan titer anti virus EB yang cukup tinggi. Titer ini lebih tinggi dari titer orang sehat, pasien tumor ganas kepala leher yang lainnya, tumor pada organ tubuh lain, bahkan pada kelainan nasofaring yang lain sekalipun.

Beberapa penelitian lain membuktikan bahwa virus EB selalu ditemukan pada spesimen biopsi pasien KNF dalam bentuk onkogen virus yang menghasilkan produk protein *Epstein Barr Virus Latent Membrane Protein 1* (EBV - LMP 1).⁷

Diagnosis KNF ditegakkan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik THT, endoskopi, patologi anatomi dan CT-Scan atau MRI nasofaring. Diagnosis histopatologis spesimen biopsi nasofaring dengan mikroskop cahaya / elektron merupakan standard baku emas untuk menegakkan diagnosis. Diagnosis dini sulit dilakukan sebab letak nasofaring yang tersembunyi di belakang tabir langit-langit dan dibawah dasar tengkorak serta sangat jarang menimbulkan keluhan, sehingga sebagian besar penderita (hampir 80%) datang pada stadium lanjut (stadium III & IV), bahkan sebagian lagi datang dengan keadaan umum yang jelek. Gejala klinik meliputi gejala hidung (epistaksis, ingus campur darah berulang, sengau, sumbatan hidung), gejala telinga (tinitus, tak nyaman/rasa penuh, nyeri, kurang pendengaran), gejala penyebaran tumor ke kelenjar limfe servikal, gejala mata (paresis syaraf cranial III, IV, VI) dan gejala cranial (paresis nervus V cabang II & III, nervus IX, X, XI, XII).^{20,21}

Stadium KNF berdasarkan sistem TNM menurut *Union Internationale Centre Cancer* (UICC) edisi V tahun 1997 adalah sebagai berikut :²⁰

T : Keadaan tumor primer, besar dan perluasannya

- T1 : Tumor terbatas pada nasofaring
- T2 : Tumor meluas ke orofaring dan atau fosa nasalis
- T2a : Tanpa perluasan ke parafaring
- T2b : Dengan perluasan ke parafaring
- T3 : Invasi ke struktur tulang atau sinus paranasal
- T4 : Tumor meluas ke intrakranial dan atau mengenai saraf otak, fosa infra temporal, hipofaring atau orbita

N : Keadaan kelenjar limfe regional

- N0 : Tidak ada pembesaran kelenjar
- N1 : Terdapat pembesaran kelenjar ipsilateral < 3 cm
- N2 : Terdapat pembesaran kelenjar bilateral < 6 cm
- N3 : Terdapat pembesaran kelenjar < 6 cm atau ekspansi ke supraklavikular

M : Metastasis jauh

- M0 : Tidak ada metastasis jauh
- M1 : Terdapat metastasis jauh

Berdasar TNM tersebut, stadium penyakit ditentukan sebagai berikut :

Tabel 2.1 Stadium KNF

Stadium	T	N	M
I	T1	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0
IIB	T1	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0 - 1	M0
III	T1 – 2	N2	M0
	T3	N0-2	M0
IVA	T4	N0-2	M0
IVB	Tiap T	N3	M0
IVC	Tiap T	Tiap N	M1

2.1.1 Radioterapi pada KNF

Radioterapi adalah terapi dengan menggunakan sinar pengion yang berupa gelombang elektromagnetik atau partikel yang akan menimbulkan proses ionisasi bila melewati materi organik. Sinar ini bersifat non selektif, menyebabkan kerusakan dan kematian biologis sel tumor dan sel normal baik secara langsung atau tidak langsung.^{22,23}

Radioterapi KNF terutama ditujukan untuk mengeradikasi seluruh sel kanker baik yang ada di nasofaring maupun metastasisnya pada kelenjar getah bening leher. Sinar pengion yang mengenai DNA sel kanker dapat mengakibatkan kematian sel kanker secara langsung (*lethal damage*). Selain efek langsung, radiasi dapat menyebabkan kematian sel kanker serta kerusakan sel normal di sekitarnya sebagai dampak dari ionisasi molekul air. Kematian sel kanker dan efek biologis yang terjadi disebabkan oleh karena efek radikal bebas yang sangat reaktif. Ion radikal dan radikal bebas (terutama radikal hidroksil) yang terbentuk dari proses

ionisasi air dapat merusak struktur vital sel kanker yaitu DNA, protein serta membran sel.²²

Kematian sel kanker akibat efek tidak langsung dari radiasi lebih sering terjadi daripada efek langsung. Hal ini disebabkan karena air merupakan komponen terbesar tubuh (sekitar 80%). Radikal bebas yang terbentuk akibat proses ionisasi air akan menyebabkan stres pada sel imunokompeten terutama makrofag yang menyebabkan hambatan atau penurunan aktivitas sel imunologis yang berperan dalam respons sel Th1. Selain menyebabkan siklus sel berhenti pada fase G1, radiasi menghasilkan gelombang yang berefek sensitisasi p53 (tumor supresor gen) yang memicu kematian sel kanker atau apoptosis.^{24,25}

Sampai saat ini radioterapi masih merupakan pengobatan utama pada KNF dan ditekankan pada penggunaan megavoltase (6 & 10 megavolt, dilengkapi dengan *multileaf collimator*) dengan pengaturan komputer. Ada 2 hal yang menjadi dasar pertimbangan; pertama bahwa secara histopatologis sebagian besar KNF (75% - 95%) adalah jenis karsinoma *undifferentiated* (WHO3) dan karsinoma non keratinisasi (WHO2) yang tergolong sangat radiosensitif apalagi pada stadium awal serta penyebaran limfatiknya yang sangat radioresponsif; kedua karena letak KNF yang sulit dicapai dengan pembedahan. KNF juga cenderung menginfiltrasi jaringan sekitar sehingga operasi yang bersih dengan prinsip operasi luas (*wide excision*) sulit dilaksanakan.^{20,22,23} Operasi diindikasikan pada kasus residif berupa operasi penyelamatan (*salvage operation*) dengan membersihkan kelenjar limfe leher.²⁰

Radioterapi pada KNF bisa diberikan dengan cara radiasi eksternal (*teleterapi*) atau radiasi internal (*brakiterapi*). Radiasi eksternal diberikan secara homogen pada daerah nasofaring dan sekitarnya yang meliputi fosa serebri media, dasar tengkorak, koana dan parafaring sepertiga leher bagian atas. Radiasi diberikan dari arah lateral kanan dan kiri dan ditambah dari arah depan bila ada perluasan tumor ke hidung dan

sekitarnya.²⁶ Radiasi internal adalah metode penyinaran langsung ke daerah nasofaring dengan memasukkan alat berupa implan intersisial atau insersi intra kavitas secara temporal pada ruang nasofaring dengan tujuan memberikan dosis tinggi pada regio nasofaring saja (tidak pada jaringan sekitar atau kelenjar). Biasanya radiasi internal ini dikombinasikan dengan radiasi eksternal sebagai booster bila masih terdapat residu tumor atau kasus rekuren, dengan dosis 1000 - 1500 cGy.^{27,28}

Radioterapi pada KNF menggunakan sinar x yang dipancarkan oleh pesawat Cobalt 60 atau Linac 4,6 dan 10 MV, diberikan secara dosis terbagi (fraksinasi), yaitu radiasi dengan dosis 200 cGy setiap fraksi, pemberian 5 kali seminggu selama 6-7,5 minggu. Dosis yang dibutuhkan untuk eradikasi tumor tergantung dari banyaknya sel kanker (besarnya tumor). Tumor yang masih dini (T1 dan T2) dapat diberikan radiasi menggunakan Cobalt 60 dengan dosis 200-220 cGy per fraksi, 5 kali seminggu tanpa istirahat mencapai dosis total 6000 - 6600 cGy dalam 6 minggu. Sedangkan untuk KNF dengan ukuran tumor yang lebih besar (T3 dan T4) dianjurkan diberikan dosis total radiasi pada tumor primer di nasofaring yang lebih tinggi yaitu 7000 - 7500 cGy.^{26,29}

2.1.2 Respons radioterapi KNF

Penilaian respons tumor terhadap radioterapi yang diberikan dianjurkan untuk dilakukan minimal 4-6 minggu pasca terapi. Penilaian respons KNF terhadap radiasi berdasar atas (1) hasil pemeriksaan CT-scan dan perbedaan volume tumor nasofaring pada sebelum dan setelah radioterapi, (2) hasil pemeriksaan nasofaringoskopi, (3) hasil biopsi setelah radioterapi. Sebagai patokan dalam menentukan tingkat respons KNF terhadap radiasi digunakan kriteria penentuan respons tumor terhadap terapi menurut WHO (respons lengkap, sebagian, tak ada respons dan progresif).²⁶

Meskipun sering didapatkan regresi tumor yang cepat sebagai respons radioterapi, namun dilaporkan sering juga terjadi kekambuhan. Respons

tumor KNF pada radioterapi bervariasi, rata-rata respons keseluruhan berkisar antara 25% - 65%. Kegagalan kontrol lokal (*local failure*) pada radioterapi KNF stadium lanjut sangat tinggi sekitar 50% - 80%. Dengan radioterapi kemampuan hidup keseluruhan (*overall survival*) pasien KNF berkisar 50%. Angka kemampuan hidup 5 tahun (*5-years survival rate*) pada stadium awal berkisar antara 50-90%, sedangkan untuk stadium lanjut (stadium III dan IV) angka kemampuan hidup 5 tahun berkisar 17-60%.²⁷

Faktor-faktor yang mempengaruhi respons KNF terhadap radioterapi antara lain keadaan umum, kadar Hb, sistem imun, biologi tumor, derajat diferensiasi, jenis histopatologi dan dosis. Kadar hemoglobin yang rendah mempengaruhi oksigenasi sel kanker. Sel kanker yang hipoksik menjadi lebih radioresisten sehingga menurunkan prognosis penderita. Status imunologi *cell mediated immunity* (CMI) dilaporkan mempengaruhi respons KNF terhadap radioterapi. Penderita dengan respons imun seluler rendah sebelum radioterapi dan tetap rendah pasca terapi mempunyai prognosis jelek.^{26,27}

Biopsi pasca radioterapi untuk memastikan residu tumor secara histopatologis dapat meningkatkan risiko radionekrosis pada re-radiasi. Atas dasar pertimbangan ini maka tindakan biopsi nasofaring pasca radioterapi dengan indeks mitosis tinggi (tumbuh progresif) sebaiknya hanya dilakukan bila tampak nyata masa tumor di nasofaring. Sedangkan untuk KNF dengan pertumbuhan yang lambat, bila tidak dijumpai tumor residif atau gejala klinis yang nyata, biopsi dianjurkan setelah 10-12 minggu.²⁶

Residu tumor sebagai manifestasi klinik KNF respons rendah sebenarnya sangat tidak diharapkan karena biasanya berkembang menjadi tumor kambuh (*residif*) yang mempunyai prognosis buruk. Fakta di klinik menunjukkan bahwa penderita KNF respons rendah sering disertai dengan gejala defisiensi imun sekunder seperti kondisi tubuh yang kurus dan

lemah (*cachexia*), pucat disertai infeksi bakteri (otitis media, rinosinusitis) dan kandidiasis rongga mulut. Penelitian yang dilakukan pasca radioterapi KNF sering menemukan imunitas seluler (CMI) yang menurun. Padahal respons imun seluler yang berfungsi baik (tinggi) sangat diperlukan dalam menghambat pertumbuhan kanker.^{26,30}

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa jaringan tumor nasofaring yang mengandung banyak limfosit atau stroma limfoid padat biasanya memberi respons terhadap radiasi lebih baik. Terdapat hubungan antara derajat diferensiasi tumor dengan kecepatan proliferasi sel kanker. Kanker dengan diferensiasi makin buruk atau anaplastik (misalnya WHO3), indeks mitosisnya tinggi sehingga makin radiosensitif. Dalam populasi sel tumor terdapat perbedaan kelompok sel yang sedang aktif mitosis dan bervariasi antara 1 - 100%. Adanya perbedaan fase siklus sel merupakan salah satu faktor kepekaan sel tumor terhadap radiasi yang tidak sama dan menentukan prognosis.³⁰⁻³²

2.1.3 Faktor - faktor yang mempengaruhi respons sel terhadap radiasi

Setiap jaringan normal mempunyai dosis toleransi agar tidak mengalami nekrosis oleh radiasi. Jaringan dengan indeks mitosis tinggi (sumsum tulang, mukosa saluran cerna, lapisan basal epidermis, leukosit terutama limfosit, timus, folikel rambut, lensa mata, spermatozoa dan ovum) sangat peka terhadap radiasi. Sedangkan jaringan dengan indeks mitosis lambat (sel saraf dan otot) bersifat radioresisten. Radiosensitivitas tumor dipengaruhi oleh aktivitas proliferasi saat terkena radiasi, biologi tumor, derajat diferensiasi, jenis histopatologi dan oksigenasi sel.^{32,33}

Adanya perbedaan fase siklus sel merupakan salah satu faktor penyebab kepekaan sel tumor terhadap radiasi menjadi tidak sama. Siklus proliferasi sel sangat penting sebab berkaitan dengan teori kerusakan DNA yang merupakan target utama radiasi. Kerusakan sel oleh radiasi terutama terjadi pada sel yang sedang aktif berproliferasi.³⁴

Repopulasi sel kanker dapat terjadi bila radiasi diberikan secara *split course radiotherapy* (teknik terpilah) dengan waktu istirahat yang terlalu lama. Hal ini disebabkan karena pertumbuhan sel kanker pada saat tidak mendapat radiasi adalah lebih besar dibandingkan dengan efek tumorisidal dari radiasi. Kekambuhan dan progresivitas kanker pasca radiasi disebabkan karena kecepatan kematian sel kanker lebih kecil dibandingkan dengan pertumbuhannya.^{34, 35}

Kanker dengan diferensiasi sel yang makin buruk atau anaplastik pada umumnya didapatkan indeks mitosis yang tinggi sehingga bersifat radiosensitif. Kadar oksigen jaringan juga berperan penting dalam mempengaruhi respons sel kanker terhadap radiasi. Kadar hemoglobin berhubungan dengan oksigenasi jaringan. Sel kanker yang terletak di tepi dan dekat dengan pembuluh darah biasanya mempunyai kadar oksigen lebih tinggi dibandingkan dengan bagian sentral sehingga lebih radiosensitif.³⁴⁻³⁶

2.2 Radiobiologi

Radiobiologi adalah ilmu yang mempelajari berbagai aspek radiasi dan efek biologis yang ditimbulkan oleh radiasi. Radiasi menimbulkan serangkaian proses yang dapat dibagi menjadi 3 fase :³¹

a. Fase fisika

Adalah fase dimana terjadi interaksi antara partikel yang berkecepatan tinggi dengan atom penyusun jaringan, sehingga menyebabkan satu atau lebih elektron di lintasan orbit luar dari atom terlepas (*ionisasi*) dan menurunkan atom atau molekul berenergi besar (*excitation*). Apabila elektron masih mempunyai cukup energi akan mengionisasi dan mengeksitasi atom yang ada di dekatnya dan di lintasannya. Rantai interaksi berlangsung seperti di atas sampai energi elektron lemah dan interaksi berhenti.

b. Fase kimia

Pada fase ini atom atau molekul yang rusak bereaksi dengan komponen seluler lain. Ionisasi dan eksitasi menimbulkan kerusakan ikatan kimia dan menghasilkan molekul radikal bebas. Radikal bebas ini sangat reaktif untuk menimbulkan reaksi berkelanjutan dan berhenti setelah terjadi keseimbangan elektronik. Ciri-ciri penting dalam fase ini adalah adanya kompetisi antara *scavenging reactions*, misalnya dengan senyawa *sulphydryl* menginaktifkan radikal bebas dan *fixtion reactions* atau reaksi yang menurunkan perubahan stabil di bagian penting molekul biologis.

c. Fase biologis

Fase ini mencakup semua proses kelanjutan yaitu perbaikan struktur yang rusak atau mati. Proses dimulai dengan reaksi enzimatik untuk memperbaiki kerusakan struktur kimia yang masih bisa diperbaiki, misalnya reparasi kerusakan DNA.

2.2.1 Efek radiasi pada molekul air

Interaksi sinar X (foton) atau sinar γ (elektron) dengan sel menyebabkan pembelahan hemolitik pada molekul air (*hemolytic cleavage*). Atom H molekul air mengalami pembelahan heterolitik (ionisasi) sehingga terbentuk ion hidrogen (H^+) dan ion hidroksil (OH^-) yang sangat reaktif. Radikal hidrogen (H^+) dan hidroksil (OH^-) akan menyebabkan berbagai macam efek pada molekul lain pada sistem biologik sehingga mengganggu integritas sel. Pada pemberian radiasi, yang paling banyak terbentuk adalah radikal OH^- . Reaksi utama dari radikal OH^- berupa oksidasi, yaitu menghilangkan sebuah elektron dari molekul lainnya menjadi berpasangan.³¹

Radikal bebas adalah atom atau molekul (kumpulan atom) yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (*unpaired electron*) pada orbit paling luar.^{31,37} Elektron yang tidak berpasangan ini cenderung membentuk pasangan dengan cara menarik elektron dari senyawa lain sehingga terbentuk radikal baru. Mekanisme pemindahan energi dengan cara ionisasi dan eksitasi ini dimulai pada saat elektron yang terletak di

lintasan kulit luar (*orbital electron*) dipentalkan keluar sehingga timbul reaksi berantai sampai enersinya habis. Sifat inilah yang membuat radikal bebas mirip dengan oksidan, yaitu senyawa-senyawa yang cenderung menarik elektron. Radikal bebas lebih berbahaya dari pada oksidan biasa, karena sangat reaktif dan cenderung membentuk radikal baru, dan bila bertemu dengan molekul lain akan membentuk radikal baru lagi, demikian seterusnya sehingga terjadi reaksi berantai.³¹

Ionisasi sel akibat radiasi akan menyebabkan perubahan pada struktur kimia, konstruksi dan fungsi sel. Radiasi menyebabkan kerusakan biologik sel (somatik maupun genetik), diawali dengan interaksi elektron dengan molekul air (H₂O) yang terdapat dalam plasma sel, sehingga terjadi ionisasi H₂O dan terbentuk radikal H⁺ dan OH⁻. Di dalam sel, radiasi menyebabkan pemecahan kovalen antara hidrogen dan oksigen. Ada dua teori tentang kerusakan sel, baik sel kanker maupun sel normal akibat radiasi sinar pengion, yaitu; 1) teori target, dimana elektron langsung merusak DNA (*direct action*), dan 2) teori racun air, dimana elektron menimbulkan terbentuknya ion radikal yang dapat merusak DNA dan struktur vital sel lainnya (*indirect action*). Gambaran peristiwa radiolisis pada molekul H₂O sebagai berikut :³¹

1. H₂O → H⁺ + OH⁻
2. H₂O → H₂O + e⁻ (pelepasan 1 elektron)
3. e⁻ + H₂O → H₂O⁻ (pengambilan 1 elektron oleh molekul H₂O)

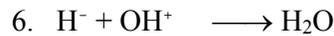
Dalam hal ini terbentuk ion positif H₂O⁺ dan ion negatif H₂O⁻.

Selanjutnya masing-masing ion positif dan ion negatif akan bereaksi dengan H₂O dan membentuk radikal bebas H⁺ dan OH⁻

4. H₂O $\xrightarrow{+H_2O}$ H⁺ + OH⁻
5. H₂O $\xrightarrow{+H_2O}$ OH⁺ + H⁻

Ion H⁺ maupun OH⁻ yang tidak memiliki energi berlebih, akan bergabung kembali dan membentuk molekul H₂O, radikal-radikal bebas OH⁻ dan H⁺ yang sangat reaktif.

Dalam larutan yang encer, banyak radikal bebas bereaksi satu sama lain membentuk H₂O, H₂ dan H₂O₂ sebagai berikut :



H₂O₂ merupakan oksidan kuat, dapat mengoksidasi berbagai senyawa dalam sel (misalnya *glutathion*), dan akan mengawali terbentuknya radikal bebas yang merusak enzim (katalase dan peroksidase). Dalam konsentrasi rendah, H₂O₂ berperan efektif sebagai antimikroba, tetapi bila kadarnya terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan sel dan protein. Selain sebagai oksidan, H₂O₂ dapat menghasilkan radikal OH⁻ bila bereaksi dengan logam transisi (mis. Fe⁺⁺, Cu⁺⁺), dan oksidan kuat yang lain yaitu ion hipoklorit (ClO⁻). Rangkaian reaksi ini menunjukkan bahwa radiasi sinar pengion yang melewati materi biologik akan menghasilkan bermacam-macam radikal bebas yang kompleks terutama radikal H⁺, OH⁻ dan elektron, yang siap berinteraksi dengan biomolekul lain yang berdekatan. O₂ di dalam sel merupakan pereaksi radikal bebas yang selektif. Reduksi oksigen menjadi H₂O memerlukan empat elektron. Bila pengalihan elektron tersebut berjalan kurang sempurna akan terjadi senyawa-senyawa oksigen reaktif yang sangat berbahaya karena dapat merusak sel dan menyebabkan stres oksidatif. Radiasi yang mengenai O₂ dalam sel akan menyebabkan O₂ diubah menjadi *reactive oxygen species* (ROS). Sebagian diantaranya berbentuk radikal OH⁻, peroksil (OOH⁻) dan ion superoksida (O₂⁻), sedangkan sebagian yang lain adalah radikal H₂O₂ dan ClO⁻.^{31,32}

Sinar radiasi dapat mengaktifkan enzim *lipxygenase* dan *cyclooxygenase* yang akan merangsang pembentukan ROS. Diantara senyawa ROS, radikal OH⁻ merupakan senyawa yang paling berbahaya karena reaktivitasnya yang sangat tinggi. Radikal ini mudah bereaksi dengan membran sel dan membentuk peroksida lipid yang akan terputus rantai

asam lemaknya dan terbentuk beberapa aldehida terutama *malondialdehid* (MDA) yang sangat toksik terhadap sel.^{31,37}

ROS secara biologis selalu terbentuk di dalam tubuh dan menghasilkan radikal bebas. Kelebihan radikal bebas dapat diredam oleh anti radikal bebas (anti oksidan). Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan anti radikal bebas akan menimbulkan *oxidative stress*. Oksidan dapat merusak protein karena mengadakan reaksi dengan asam amino penyusun protein, terutama sistein. Jaringan atau organ tubuh yang sensitif terhadap radikal bebas oksigen terutama adalah sel darah (eritrosit, leukosit, limfosit), fibroblast, endotel, liposom dan mitokondria.^{31,37}

Senyawa yang dapat meredam radikal bebas antara lain Trio -BEC (beta karoten, vitamin E dan vitamin C) dan anti oksidan eksogen lainnya seperti Alopurinol, Captopril, Ca-blocker, Cu, Se, Fe dan Zn.^{38,39}

2.2.2. Efek radiasi pada DNA

Lesi DNA oleh radiasi dapat menghasilkan berbagai akibat biologis, tergantung pada densitas radiasi atau *Linear Energy Transfer* (LET), dosis radiasi, interaksi radiasi dengan molekul sasaran, sensitivitas sel atau jaringan yang terkena radiasi dan lain-lain.⁷

Radikal bebas, terutama OH⁻ dapat merusak tiga jenis zat (senyawa) yang penting dalam mempertahankan integritas sel yaitu 1) DNA (perangkat genetik penyusun gen dan kromosom), berfungsi vital dalam mengendalikan metabolisme sel, 2) asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel, dan 3) protein (enzim, reseptor dan antibodi) yang berperan dalam metabolisme sel maupun respons terhadap sinyal. Struktur sel yang paling peka terhadap radiasi adalah DNA. Gangguan DNA akan menyebabkan kelainan atau perubahan pengaturan aktivitas sel. Radiasi sinar pengion yang mengenai DNA dapat menyebabkan berbagai kerusakan antara lain hidroksilasi (pecahnya basa timin dan sitosin), pembukaan inti purin dan pirimidin serta putusya gugus fosfat dari struktur siklisnya (rantai fosfodiester

DNA) yang berakibat perubahan kimia. Kerusakan DNA akan menyebabkan penyimpangan pengaturan aktivitas seluler. Radikal OH^- bertanggung jawab atas sebagian besar kerusakan yang terjadi pada DNA dan membran sel. Kerusakan yang sangat penting adalah putus (pecahnya) berkas ganda dari DNA *single / double strand break* (SSB/DSB), *cross-linkage* dalam rantai DNA dan perubahan basa-basa pembentuk DNA. Kerusakan DNA ringan, masih bisa diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA (*DNA repair system*). Namun bila kerusakan DNA terlalu berat, proses perbaikan (*nucleotide excision repair*) tidak dapat dilakukan secara sempurna sehingga replikasi sel terganggu bahkan terjadi kematian sel. Rusaknya DNA secara aktif memicu kematian sel terprogram (*programmed cell death*) yang disebut sebagai apoptosis. Mekanisme kematian sel melalui apoptosis berbeda dengan nekrosis yang biasanya terjadi pada fase akut setelah terkena radiasi dosis tinggi (sel langsung mati).³¹

Komponen membran sel yang terpenting ialah fosfolipid dan glikolipid yang mengandung beberapa asam lemak tak jenuh (asam-asam linoleat, linolenat dan arakidonat), sangat peka terhadap serangan radikal bebas terutama OH^- . Peroksidasi asam lemak tak jenuh pada membran sel menyebabkan penurunan fluiditas dan permeabilitas membran sel sehingga integritasnya menurun. Keadaan ini menyebabkan cairan ekstra seluler memasuki ruang intraseluler (*intracellular fluid droplet*) dan terjadi perubahan konsentrasi ion Na, K, dan Ca yang penting untuk mempertahankan fungsi sel. Hasil akhir peroksidasi lipid adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi senyawa toksik terhadap sel, antara lain MDA, Etana dan Pentana. Ketiga senyawa ini (terutama MDA) dapat dipakai sebagai petunjuk terjadinya peristiwa peroksidasi lemak membran sel. Senyawa toksik ini menimbulkan kerusakan membran yang semakin parah (terjadi lisis). Proses kematian sel dengan cara ini melalui 5 fase yaitu pre kondensasi, kondensasi, fragmentasi, fagositosis dan degradasi. Apoptosis diawali oleh ekspresi gen yang berefek peningkatan kadar

kalsium intra sel yang menimbulkan aktivasi enzim endonuklease sehingga terjadi kondensasi kromatin pada inti sel.^{31,32}

Radiasi menyebabkan fosforilasi dan penurunan produksi *adenosine triphosphate* (ATP) yang mengakibatkan penurunan sintesis DNA.

Hilangnya fosforilasi, kelainan atau gangguan susunan nukleotida DNA dan oksidasi merupakan efek primer radiasi yang menginduksi apoptosis.

Radiasi ionisasi juga menyebabkan hambatan proses reproduktif dan berhentinya siklus proliferasi sel pada fase G1 (*G1 arrest or block*).

Kerusakan membran sel dan DNA akan mengaktifkan *signal transduction pathways* yang mengakibatkan siklus sel berhenti (*cell cycle arrest*).

Proses ini diawali dengan peningkatan ekspresi *Ataxia-Teleangiectasia gene* (AT) yang kemudian memicu peningkatan ekspresi gen p53 melalui transkripsi p21 yang merupakan inhibitor cdk dan menyebabkan siklus sel berhenti pada fase G1. Keadaan ini menguntungkan karena sel kanker yang berada dalam siklus pertumbuhan (*cell cycle*) lebih radiosensitif dibandingkan sel kanker yang berada pada fase istirahat (G0).^{37,40}

Radiasi juga menghasilkan gelombang yang berefek sensitisasi p53 (*tumor suppressor gene*) yang memicu apoptosis. Kematian sel melalui mekanisme apoptosis ini diawali dengan kelainan genetik pada gen bcl2 yang berfungsi sebagai regulator dalam proses apoptosis. Apoptosis akibat radiasi disebabkan karena kerusakan atau kelainan susunan nukleotida DNA yang tidak dapat diperbaiki oleh sistem reparasi DNA. Radiasi dapat mengenai semua sel, baik sel kanker maupun sel normal. Sel yang terkena radiasi akan mengalami penurunan sintesis DNA sehingga kegiatan mitosis tertunda.^{37,41}

2.2.3 Efek radiasi pada sel imun

Radioterapi pada KNF meliputi daerah yang cukup luas sehingga dapat mengenai sel efektor imunologik baik yang beredar di sirkulasi (sistemik) maupun di jaringan limfoid mukosa hidung, nasofaring dan tenggorok (*ring of Waldeyer's*), yang termasuk dalam sistem imun mukosal. Efek

radiasi pada sel imun dapat menurunkan prognosis penderita. Sel limfosit (*white blood cells*) adalah sel yang paling radiosensitif dan pertama kali menghilang dari sirkulasi, kemudian diikuti granulosit. Radioterapi dapat menyebabkan penurunan jumlah total limfosit serta kualitasnya. Setelah radioterapi, terjadi penurunan jumlah total limfosit sebesar 50-60% dibandingkan dengan sebelum radioterapi. Disamping limfosit T, radioterapi juga menyebabkan penurunan hitung limfosit B dan sel NK darah tepi. Sel-sel imun ini akan kembali normal pada 13 minggu setelah radioterapi dan yang paling lambat adalah sel T. Selain itu, sistem imun seluler lokal (sel Tc, NK dan makrofag) pada jaringan tumor KNF juga mengalami penurunan.³²

Radikal bebas yang terbentuk akibat proses ionisasi air akan menyebabkan stres (*exhaustion stage*) pada sel imunokompeten (*stress immunocompetent cell*) terutama makrofag yang menyebabkan hambatan atau penurunan aktivitas sel imunologis yang berperan dalam respons Th1. Penurunan fungsi imunitas seluler oleh radiasi, dibuktikan dengan tes respons transformasi sel limfosit terhadap *phytohemagglutinin* (PHA). Proses penurunan transformasi terjadi sejak radiasi 0,5 Gy sampai titik optimal pada minggu ke 4. Penurunan transformasi sel limfosit masih terjadi sampai 4 - 6 minggu pasca radioterapi. Setelah penyinaran berlangsung 6 minggu ternyata tubuh penderita dapat mengadakan perbaikan, sehingga indeks transformasi dan hitung limfosit mengalami kenaikan. 2 minggu setelah selesai penyinaran indeks transformasi masih terus meningkat. Indeks transformasi terendah pada minggu ke empat penyinaran dapat sampai dibawah normal yaitu 30,7 (normalnya 37,18 - 45,26).^{32,36}

Radioterapi mengakibatkan penurunan fungsi sistem imun lokal pada jaringan tumor dan juga penurunan respons imun sel makrofag, NK, T CD4, sel T pemroduksi IL-4, dan IFN- γ (respons Th1). Jadi radiasi mempunyai efek *imunopresor*. Penurunan respons imun (khususnya respons Th1) penderita KNF pasca radioterapi akan sangat merugikan.

Selain meningkatnya risiko terkena infeksi mikroba (lebih dari 90% penderita meninggal akibat infeksi), penurunan respons Th1 sebagai cerminan kualitas *immune surveillance* yang rendah (buruk) dapat menyebabkan pertumbuhan KNF makin progresif, residif dan metastasis (imunitas berperan mengeliminir residu sel KNF pasca radiasi). Beberapa penelitian yang dilakukan pasca radioterapi pada keganasan jenis karsinoma sel skuamosa kepala leher (termasuk KNF) menemukan peningkatan yang tinggi kadar *prostaglandin E2* (PGE2) yang berefek immunosupresi (penurunan respons imun seluler). Selain diproduksi oleh sel kanker, PGE2 juga diproduksi oleh makrofag yang tersupresi oleh radiasi.⁴²⁻⁴⁴

Sebuah penelitian melakukan pengukuran dosis radiasi yang mengenai kelenjar timus pada pasien KNF yang mendapat radioterapi. Hasil penelitian membuktikan bahwa kelenjar timus tetap terkena radiasi walaupun dosisnya kecil. Radioterapi menyebabkan penurunan imunitas seluler pada penderita KNF karena: (1) besarnya volume darah yang terpapar radiasi, (2) kelenjar timus masih tetap menerima radiasi sekalipun radiasi yang dipakai hanya 390 rads dan (3) malnutrisi dan menurunnya berat badan karena mukositis.^{42,43}

2.2.4 Efek radiasi pada TNF- α

Semua sel kanker yang mati oleh radiasi menunjukkan reaksi positif terhadap TNF- α , sedangkan untuk TNF- γ dijumpai pada setengahnya. Peran radiasi pada kematian sel kanker adalah membuat sel menjadi sensitif terhadap efek sitolisis dari TNF- α . Jadi radiasi meningkatkan potensi sitolitik TNF- α , sedangkan TNF- γ intensitas sitolitiknya lebih rendah. Proses apoptosis terjadi melalui 3 fase (fase inisiasi / induksi heterogen, fase efektor dan fase degradasi / eksekusi). Pada fase degradasi terjadi peningkatan berbagai aktivitas, termasuk peningkatan aktivasi enzim-enzim katabolik dan produksi MOR.⁴⁵

Sitokin ini diproduksi oleh monosit, makrofage, limfosit T dan B serta sel NK yang terangsang oleh *Lipo Polysacarida* (LPS), endotoksin, produk-produk bakteri atau mikro organisme, beberapa tipe tumor dan radiasi. Faktor transkripsi baru berupa *LPS-Induced TNF- α Factor* (LITAF) memainkan peranan penting dalam mengatur ekspresi gen TNF. Elemen fungsional dependen LITAF telah diidentifikasi dalam promoter TNF, dengan memblok sintesis LITAF dalam makrofag akan terjadi supresi terhadap ekspresi gen TNF yang diinduksi oleh LPS. Sebuah penelitian telah membuktikan adanya rangkaian gen yang diekspresikan sebesar 98% homolog dengan LITAF yang transkripsinya diinduksi oleh gen p53. Faktor transkripsi LITAF merupakan gen target untuk p53. Penelitian ini menyimpulkan adanya hubungan langsung yang unik antara rangsangan LPS dengan aktivitas LITAF dalam inflamasi serta peranan potensial yang penting dari p53 dalam regulasi inflamasi. Makrofag yang teraktifasi oleh radiasi sinar x menyebabkan peningkatan produksi TNF- α , sehingga konsentrasi TNF- α dalam sirkulasi darah akan meningkat drastis dalam waktu singkat.⁴⁶

Penelitian secara imunohistokimia dan mikroskop elektron menjelaskan bahwa spesimen sebelum radiasi tidak ada yang menunjukkan reaksi positif terhadap tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), tumor necrosis factor-receptor (TNF- γ) atau Fas (CD 95). Sedangkan untuk c-fos, p53 dan Bcl-2 (*onkoprotein*) ada yang menunjukkan reaksi positif. Semua sel yang tereradikasi menunjukkan reaksi positif untuk TNF- α , tetapi untuk TNF- γ , Fas, p53, c-fos dan Bcl-2 reaksi positifnya bervariasi. Hasil ini menunjukkan bahwa TNF- α , TNF- γ , dan c-fos yang bertanggung jawab atas kematian sel kanker karena induksi radiasi.⁴⁶

Sebuah penelitian terhadap kultur sel karsinoma skuamosa pada kepala dan leher membuktikan bahwa sel tumor mampu memproduksi TNF- α , dan menyebabkan nekrosis tumor. Penelitian lain membuktikan bahwa

TNF- α bisa memacu pertumbuhan tumor dan mempengaruhi status klinis penderita. TNF- α telah terbukti meningkat pada serum pasien yang menderita kanker dan telah diimplikasikan sebagai penyebab kakeksia tumor dan anemia. Produksi TNF- α secara lokal memacu pertumbuhan tumor dengan merangsang angiogenesis yang memacu pertumbuhan pembuluh darah sebagai pembawa nutrisi dari perifer. TNF- α bisa memacu invasi tumor dengan merangsang produksi koagulasi sehingga terjadi destruksi jaringan ikat dan tulang. TNF- α juga mampu menyebabkan resorpsi tulang secara langsung dengan merangsang produksi osteoklas. Penelitian pada tikus murine menunjukkan bahwa sel-sel tumor yang dikenakan gen TNF- α menunjukkan metastasis yang meningkat, sehingga disimpulkan bahwa metastasis tersebut berhubungan dengan angiogenesis terlokalisir dan sifat adesif yang meningkat pada sel tumor. Jadi sel tumor pemroduksi TNF- α memiliki peningkatan potensi untuk bersifat invasif. Penelitian tersebut juga membuktikan bahwa sel tumor yang mampu memproduksi TNF- α , menjadi resisten terhadap efek sitolitik biasa terhadap TNF- α .^{45,47}

Penelitian biomolekuler menjelaskan bahwa radiasi menyebabkan terbentuknya radikal bebas oksidatif intra maupun ekstra seluler. Radikal bebas menyebabkan aktivasi gen *Nuklear Faktor kappa B* (NF- κ B) yang akan menyebabkan stimulasi gen-gen yang memproduksi sitokin inflamasi (IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α). Selanjutnya akan terjadi inflamasi pada sel dan peningkatan konsentrasi enzim *phospholipase A2* (PLA2) yang menyebabkan peningkatan metabolisme asam arakidonat. Produk metabolisme tersebut (melalui jalur siklooksigenase) adalah PGE2. PGE2 sudah dibuktikan menghambat multifungsi sistem imun, diantaranya aktivasi dan proliferasi limfosit-T dan sitotoksik sel NK. Prostaglandin menghambat fungsi limfosit karena meningkatkan jalur *3,5 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)*, yang efeknya menghambat produksi

IL-2. Di dalam sel mononuklear, PGE2 menghambat produk gen MHC II, menghambat ekspresi transferin dan menghambat reseptor khusus IL-2 (IL-2R) pada limfosit NK (CD56⁺) yang aktif. Dengan meningkatnya konsentrasi PGE2 akan menurunkan IL-2R pada sel efektor NK CD56⁺.⁴⁶ Sel makrofag yang terpapar radioterapi juga akan mengalami penekanan fungsi, ditandai dengan menurunnya produksi sitokin (IL-2 dan INF γ) akan tetapi produksi PGE2 dan IL-10 meningkat. Peran IL-10 menghambat sel Th1. Radioterapi menekan komponen sistem pertahanan (sel NK, Tc dan makrofag) yang mengakibatkan sistem pertahanan tubuh terutama jalur Th1 untuk eradikasi sel tumor menurun (penurunan fagositosis terhadap sel kanker).^{43,48}

NF- κ B adalah sebuah faktor transkripsi yang sensitif terhadap stres oksidatif (*oxidatif stress sensitive transcription factor*) dan berperan mengatur ekspresi gen-gen aktif dalam proses inflamasi yang melibatkan sitokin (misalnya IL-1, IL-8, TNF- α), enzim-enzim (inducible Nitric Oxyde Syntase/iNOS), molekul adesi dan molekul fase akut.³⁷ Proses inflamasi yang terjadi serta peningkatan TNF- α akan menghambat aktivitas Th0.^{49,50} Sebuah penelitian terhadap agen-agen anti inflamasi menyimpulkan bahwa NF- κ B merupakan sasaran yang tepat untuk mencegah atau mengurangi respons inflamasi.³⁷

2.3 Respons Imun terhadap Kanker

Beberapa bukti mendukung bahwa terdapat peran sistem imun dalam melawan tumor ganas diantaranya adalah : 1) banyak tumor mengandung infiltrasi sel-sel mononuklear yang terdiri atas sel T, sel NK dan makrofag; 2) tumor dapat mengalami regresi secara spontan; 3) tumor lebih sering berkembang pada individu dengan imunodefisiensi (fungsi sistem imun tidak efektif bahkan immunosupresi), 4) tumor seringkali menyebabkan immunosupresi pada penderita. Bukti lain yang juga mendukung bahwa tumor dapat merangsang sistem imun

adalah ditemukannya limfosit yang berproliferasi dalam kelenjar getah bening yang merupakan *draining sites* pertumbuhan tumor disertai peningkatan ekspresi MHC dan *intercellular adhesion molecule* (ICAM) yang mengindikasikan sistem imun yang aktif.⁴⁰ Respons imun non spesifik atau spesifik (seluler maupun humoral) berperan penting dalam perlawanan terhadap kanker (*tumour rejection*) dan terbukti bahwa pengendalian pertumbuhan kanker terutama dilakukan oleh sel (*cell mediated immune response*).^{51,52}

Penurunan ketahanan tubuh terhadap kanker menyebabkan pertumbuhan kanker terus berjalan tanpa hambatan (progresif). Selain oleh kankernya sendiri, penurunan respons imun dapat disebabkan oleh terapi radiasi yang diberikan. Respons imun terhadap kanker diperankan oleh komponen seluler, antibodi dan sitokin.⁵¹

2.4. Peranan Komponen Seluler yang Memproduksi TNF- α terhadap Tumor

Efektor sistem imun seluler yang berperan penting dalam eradikasi sel tumor yang memproduksi TNF- α adalah sel fagosit mononuklear (monosit-makrofag, limfosit-T dan sel NK).^{51,52}

1) Monosit-makrofag

Makrofag merupakan salah satu komponen sel pada respons imun alamiah yang bertindak sebagai fagosit profesional utama. Sel ini diproduksi di sumsum tulang, masuk sirkulasi darah sebagai monosit yang selanjutnya berada di jaringan. Makrofag dapat mengekspresikan MHC kelas I maupun kelas II pada permukaannya, dan dapat membunuh sel tumor apabila telah diaktifkan terutama oleh IFN- γ . Sel kanker dapat dihancurkan secara langsung (*direct cytotoxicity*) oleh bahan sitotoksik yang dihasilkan makrofag yang aktif dan CD8 yang di stimuli IL-2. Penghancuran sel kanker oleh makrofag (*macrophage cell mediated killing*) bersifat non spesifik.

Makrofag yang telah diaktifkan dapat menghancurkan atau menghambat pertumbuhan sel kanker melalui beberapa cara, yaitu :

1. Sitolisis, yaitu hancurnya sel tumor oleh bahan sitotoksik ($\text{TNF-}\alpha$, *nitric oxide*, *reactive oxygen metabolites*) yang dikeluarkan oleh makrofag.
2. Sitostatik, yaitu penghambatan proliferasi sel tumor.
3. Lisosomal, cara ini terdiri atas beberapa tahap yaitu :
 - a. Pengenalan komplemen F3b dan IgG oleh reseptor spesifik makrofag
 - b. Pembentukan fagosom. Makrofag membentuk pseudopodi, yang selanjutnya membuat fagosom. Pembentukan fagosom menyebabkan stimulasi sitokrom B yang membantu pengolahan O_2 menjadi H_2O_2 dan radikal hidroksil (OH^\cdot) dan O^\cdot .
 - c. Pembebasan enzim lisosom. Dengan adanya peroksidase terbentuk senyawa toksik.

Makrofag berperan sebagai sel efektor dalam menghancurkan sel kanker dan juga sebagai sel penyaji (APC). Mekanismenya diawali dengan pengikatan dan pemrosesan antigen tumor. Selanjutnya antigen tumor yang dipresentasikan bersama MHC kelas II pada permukaan membran makrofag akan dikenal oleh CD4^+ , sedangkan antigen tumor yang dipresentasikan bersama dengan MHC kelas I akan dikenal oleh CD8^+ . Proses berikutnya merupakan efek dari rangkaian reaksi imunologik berupa hancurnya sel kanker (*target cell*). Dalam hal ini, MHC kelas I dan II berfungsi sebagai pengatur jalur respons imun yang diaktifkan, apakah melalui penghancuran oleh limfosit T sitotoksik (*cytotoxic T lymphocyte cell mediated killing*) atau oleh makrofag (*macrophage cell mediated killing*). Dengan perantaraan MHC kelas II ini maka antigen tumor dapat dikenali oleh CD4^+ . CD4^+ dapat mengenal antigen tumor karena mempunyai banyak reseptor (TCR) antara lain reseptor untuk antigen tumor, reseptor MHC kelas II, reseptor untuk menerima antibodi (opsonisasi) dan komplemen. Makrofag yang telah diaktifkan oleh antigen tumor akan menghasilkan IL-12. Aktivasi dan proliferasi limfosit T terjadi bila CD4^+ dirangsang oleh IL-12, atau IL-2 melalui reseptor IL-2 di permukaannya (otokrin). Selanjutnya CD4^+ yang aktif akan melepaskan IL-2, IFN- γ , TNF- β , IL-4 dan mediator lainnya untuk meningkatkan fungsi

makrofag, antara lain yaitu *chemotactic factor* (CF), *migration inhibitory factor* (MIF), *macrophage activating factor* (MAF) dan *specific macrophage arming factor* (SMAF) dan *macrophage fusion factor* (MFF).

Interferon (IFN) dapat meningkatkan ekspresi reseptor IL-2 dan proliferasi progenitor sel NK, sedangkan IL-2 akan mengaktifkan subpopulasi limfosit T, makrofag maupun sel NK. Selanjutnya makrofag yang diaktifkan ini akan mensintesis IL-12 lagi, demikian seterusnya sehingga terjadi pengaruh timbal balik yang saling menguatkan. Untuk dapat menghancurkan kanker secara langsung, makrofag perlu bantuan CD4⁺ melalui stimulasi IL-4 dan IFN- γ sehingga menjadi *activated macrophage*.

Aktivitas makrofag dapat dihambat oleh limfosit *T suppressor* (Ts) yang di stimulasi oleh mediator yang dikeluarkan oleh sel mastosit. Makrofag yang dihambat oleh limfosit Ts akan mengeluarkan IL-10 dan PGE2 yang berefek menghambat aktivitas sel NK dan limfosit. Penghambatan pada aktivitas makrofag dapat menyebabkan berkurangnya daya perlawanan terhadap kanker karena menurunnya kualitas *immune surveillance*.

2) Limfosit T sitotoksik (CD 8⁺)

CD8⁺ terutama yang telah diaktifkan menjadi *cytotoxic T lymphocytes* (CTLs) merupakan sel yang paling berperan pada imunitas seluler kanker karena mampu menghancurkan (sitotoksitas) apabila berjumpa dengan antigen yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I. Pembunuhan oleh CTL ini terjadi dengan bantuan molekul MHC. Banyak percobaan telah dilakukan untuk mengetahui mekanisme sitotoksitas oleh CTL. Pengikatan antigen melalui reseptor pada limfosit CTL, merupakan sinyal atau rangsangan untuk dikeluarkannya berbagai sitokin yang teraktivasi menjadi CTL. Mekanisme sitotoksitas CTL sangat mirip dengan sel NK. CTL membunuh sel kanker melalui 2 cara; pertama melalui pelepasan granula sitoplasmik yang merusak sel sasaran, kedua mengekspresikan Fas ligan yang berinteraksi dengan Fas reseptor yang terdapat pada sel sasaran.

Setelah CTL berikatan dengan sel sasaran (tumor), CTL melepaskan perforin yang dapat merusak membran sel tumor dengan cara membuat lobang (pori). Dalam granula CTL didapatkan granzyme, yaitu enzim yang menyerupai protease, berfungsi membunuh sel tumor. Seperti pada sel NK, granzyme ini menggunakan jalur perforin untuk sampai ke dalam sitoplasma sel tumor. Efektivitas kerja perforin dan granzyme memerlukan bantuan ion kalsium. Hal ini menunjukkan bahwa untuk dapat membunuh sel sasaran maka CTL harus melakukan kontak langsung (*cell to cell*), atau berada dekat sekali dengan sel sasaran. Kontak antara CTL dengan sel tumor ini demikian erat (membran kedua sel saling berhimpit) sehingga berbagai substansi seperti granzyme, serine protease dan sitotoksik faktor lainnya dapat dipindahkan ke dalam sitoplasma sel tumor. Rusaknya membran sel tumor akibat faktor sitotoksik serta disintegrasi osmotik menyebabkan sel mati melalui proses nekrosis.

Interaksi Fas ligan CTL dengan Fas ligan sel tumor akan memicu aktivasi gen apoptosis sehingga terjadi pengrusakan sel secara terorganisasi berupa degradasi kromatin, fragmentasi DNA dan disintegrasi sel menjadi fragmen-fragmen yang dikenal sebagai apoptosis (*programmed to death*). Fragmentasi DNA merupakan akibat aktivitas endonuklease dalam nukleus sel sasaran. Setelah sel tumor mati, CTL melepaskan diri dan mencari sel tumor lainnya untuk melakukan pembunuhan berikutnya. CTL hanya dapat membunuh sel tumor yang menampilkan MHC kelas I yang sesuai atau sel yang pernah terinfeksi oleh virus yang mengaktifkannya. Berbeda dengan CTL, limfosit T helper ($CD4^+$) tidak mempunyai efek sitolitik pada sel kanker secara langsung. Namun, $CD4^+$ menghasilkan beberapa sitokin antara lain IL-2 yang dapat menstimuli $CD8^+$, sel NK dan makrofag. $CD8^+$ yang diaktifkan oleh IL-2 berubah menjadi CTL yang dapat menghancurkan sel kanker secara langsung, baik pada tumor yang padat maupun yang dalam bentuk larutan. $CD4^+$ juga menghasilkan *B cell maturation growth factor* (BEGF) dan *B cell maturation factor* (BEMF) yang berpengaruh terhadap limfosit B. T_s merupakan subpopulasi limfosit T, berfungsi mengatur proliferasi limfosit T dan

menghambat limfosit B dalam membuat antibodi. Aktivitas limfosit T sangat diperlukan untuk mengatur respons imun. Aktivitas limfosit Th akan terhambat apabila terjadi hambatan pada makrofag.

3) Sel NK

Sel NK memegang peranan utama pada pertahanan alamiah terhadap pertumbuhan sejumlah sel kanker tanpa membedakan asal dan jenis jaringan serta agen penyebab perubahan maligna tersebut (*transforming agents*). Sel NK berperan sebagai pertahanan alamiah lini terdepan terhadap kanker karena mempunyai kemampuan membunuh berbagai sel kanker secara signifikan dengan rentang yang besar. Aktivitas sel NK tidak spesifik ditujukan pada antigen tertentu. Kematian sel kanker oleh sel NK dapat terjadi secara langsung tanpa sensitisasi terlebih dahulu, dan tanpa presentasi antigen melalui molekul MHC (*MHC unrestricted*). Mekanisme pengenalan sel target oleh sel NK masih belum diketahui dengan jelas. Sel NK menyerang dan menghancurkan sel tumor bila sel tersebut tidak dapat mengekspresikan molekul yang biasanya terdapat pada permukaan membran sel normal. Apabila terjadi perubahan pada molekul permukaan atau adanya *missing peptide*, sel NK tidak dapat mengenali sel ini (*non self*) sehingga akan dirusak (dihancurkan). Diduga, adanya modifikasi dari produk gen HLA-C oleh virus atau *tumour associated molecules* (misalnya produk onkogen) juga dapat mencegah pengenalan sel ini oleh sel NK.

Mekanisme penghancuran sel tumor oleh NK melalui 3 tahap :

1. Tahap konyugasi. Pengenalan yang dilanjutkan dengan adesi atau ikatan sel NK dengan sel tumor yang merupakan proses kunci dari aktivitas sitolitik.
2. *Programming for lysis (lethal hit)*. Sel NK melepaskan faktor sitotoksik yang terdapat pada granula yaitu molekul perforin, granzymes dan sitolisin seperti TNF- α dan β (limfotoksin), *serine protease* (fragmentin) dan proteoglikan kedalam sel tumor. Sel NK juga memproduksi bahan sitotoksik yaitu NKCF (*Natural Killer Cell Cytotoxic Factor*) yang merusak sel tumor. Masuknya bahan-bahan ini melalui pori atau kanal pada membran sel tumor karena efek perforin (*pore forming enzymes*). Ion Ca^{2+} masuk kedalam sel melalui pori dan menyebabkan kematian sel

karena terganggunya berbagai proses yang sensitif terhadap ion Ca^{2++} . Natrium dan air yang masuk ke dalam sel tumor dapat mengakibatkan lisis karena perubahan tekanan osmotik (*colloid osmosis*). Enzim serine hidrolase juga berperan dalam proses ini. Fragmentin dan $\text{TNF-}\alpha/\beta$ yang dimasukkan ke dalam sel kanker akan menimbulkan fragmentasi DNA yang menginduksi sinyal kematian sel tumor yang berakhir dengan apoptosis.

3. Proses dekonjugasi. Sel NK meninggalkan sel tumor yang sedang mengalami lisis.

Mekanisme pembunuhan sel kanker oleh sel NK ini sangat mirip dengan CTL. Cara lain dari sel NK dalam membunuh sel tumor yaitu secara tidak langsung dengan bantuan antibodi (IgG). Antibodi yang terikat oleh antigen pada permukaan sel tumor dapat dikenal oleh sel NK melalui reseptor Fc yang terdapat pada permukaannya, menyebabkan lisis (kematian) sel tumor.

Mekanisme sitolisis ekstraseluler ini sangat penting bila sel sasaran terlalu besar untuk difagositosis, misalnya sel tumor atau parasit yang besar. Sel NK mensekresi $\text{IFN-}\gamma$ yang menginduksi makrofag untuk aktif menghasilkan sitokin (IL-1, IL-12). Selanjutnya, IL-12 akan menginduksi limfosit Th (CD4^+) untuk menghasilkan sitokin, diantaranya adalah IL-2 dan IL-3. IL-1 akan memicu sel Th1 yang memproduksi berbagai sitokin (*Th1 cytokine profile*). Adanya rangsangan dari IL-2 menyebabkan sel NK lebih aktif dalam menghancurkan sel tumor (*target cell*), sedangkan IL-3 dapat merangsang sel NK untuk memproduksi $\text{IFN-}\gamma$ yang akan meningkatkan aktivitas sel NK.

Sel NK dapat lebih diaktifkan atau ditingkatkan kemampuan sitolitiknya oleh IL-12 (*NK cell stimulating factor*). IL-2 dan $\text{IFN-}\gamma$ juga dapat secara nyata (poten) meningkatkan aktivitas sel NK. Pemberian IL-2 dalam konsentrasi yang sesuai akan menginduksi sel NK untuk berdiferensiasi menjadi sel LAK (*Lymphokine Activated Killer*) yaitu populasi lain dari sel limfoid yang mampu membunuh sel yang mengalami transformasi maligna. Dalam keadaan normal, sel LAK tidak memperlihatkan aktivitas terhadap sel tumor kecuali diaktifkan oleh sitokin seperti IL-2.

Aktivitas sel NK dihambat oleh PGE2 yang dihasilkan oleh makrofag yang di supresi oleh limfosit T supressor, atau akibat radiasi. PGE2 menghambat aktivitas sel NK melalui peningkatan *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) yang berefek hambatan metabolisme phosphoinositide. PGE2 ini juga dihasilkan oleh sel kanker, terutama karsinoma di daerah kepala dan leher. Meningkatnya PGE2 di sirkulasi dapat berakibat supresi imun.

2.5. Peranan Sitokin pada Sistem Imun Seluler

Sejak terjadinya perubahan sel normal menjadi kanker manifes, reaksi sitokin non spesifik maupun spesifik telah berlangsung sebagai akibat terpaparnya berbagai sel imunokompeten oleh antigen kanker. Sel yang termasuk dalam ketahanan tubuh alami (*innate immunity*) dan mempunyai peran penting pada produksi sitokin non spesifik oleh antigen kanker adalah monosit (makrofag) dan sel NK. Sel lain yang juga menghasilkan sitokin secara non spesifik adalah neutrofil, eosinofil, fibroblas, sel stroma dan sel endotelial. Sedang sel yang termasuk dalam ketahanan tubuh adaptif (*adaptive immunity*) dan menghasilkan sitokin secara spesifik ialah limfosit T dan B. Peranan sitokin sebagai komunikator antar sel (sinyal inter seluler), khususnya limfosit sangat diperlukan agar rangkaian reaksi imunologik berjalan semestinya. Berubahnya sel normal menjadi kanker menimbulkan reaksi sitokin kompleks. Hampir semua sitokin terlibat pada respons imun terhadap kanker, terutama sitokin yang berperan pada aktivasi makrofag, sel NK dan limfosit T antara lain IL-1, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, limfotoksin (TNF- β), TNF- α , IFN- γ , MIF, MAF dan bahan kemotaktik. Jenis dan jumlah sitokin yang dihasilkan akan menentukan efek lokal maupun sistemik yang tampak pada penderita kanker. Efek berbagai sitokin yang dihasilkan oleh bermacam sel yang berbeda ini saling mempengaruhi melalui mekanisme yang kompleks.

1. IL-1

Fungsi IL-1 menyerupai TNF yaitu sebagai mediator respons inflamasi dalam imunitas natural pejamu. IL-1 dihasilkan oleh sel fagosit mononuklear. Pada kadar rendah efek utamanya sebagai imunoregulator dengan meningkatkan

proliferasi sel T CD4⁺. IL-1 menstimulasi berbagai jenis sel yang berfungsi sebagai efektor pada respons imun dan respons inflamasi. Pada kadar tinggi IL-1 masuk ke dalam aliran darah dan berefek endokrin antara lain menginduksi demam dan protein fase akut.

2. IL-2

IL-2 adalah *growth factor* untuk sel T, berfungsi sebagai faktor pertumbuhan yang bekerja secara otokrin maupun parakrin. Kerja utama IL-2 adalah pada limfosit. IL-2 yang disintesa oleh sel T akan mengaktifkan sel limfosit Tc, makrofag, sel NK dan sel LAK dalam membunuh sel tumor.

3. IL-8

IL-8 dihasilkan oleh beberapa sel seperti sel T yang teraktivasi oleh antigen, fagosit mononuklear yang teraktivasi oleh LPS atau sitokin, sel endotel, sel fibroblast, sel epitel dan platelet. IL-8 merupakan aktivator dan faktor kemotaktik untuk netrofil dan hanya sedikit pengaruhnya untuk eosinofil, basofil dan limfosit. IL-8 berfungsi *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) untuk fagosit mononuklear. IL-8 juga berfungsi sebagai mediator sekunder pada reaksi inflamasi.

4. IL-10

IL-10 berfungsi sebagai regulasi negatif ekspresi molekul MHC kelas II. IL-10 menghambat sitokin yang diproduksi oleh makrofag, misalnya TNF, IL-1 dan IL-12. IL-10 juga menghambat fungsi makrofag dalam mengaktivasi sel T.

5. IL-12

IL-12 bekerja sinergis dengan IL-2. IL-12 merupakan satu-satunya sitokin yang secara fungsional tidak diproduksi oleh sel T. Produksi IL-12 oleh makrofag dihambat oleh IL-4 dan IL-10. Sitokin ini sebenarnya juga merupakan regulator respons imun seluler, karena efeknya pada sel sel NK dan sel T. IL-12 merupakan activator paling poten untuk sel NK. Efek IL-12

menginduksi peningkatan produksi IFN- γ oleh limfosit Th1 dan sel NK. IL-12 menstimulasi diferensiasi sel Th naive menjadi sel Th1. IL-12 bersama IFN- γ cenderung mengarahkan sel Th untuk berdeferensiasi menjadi Th1. IL-12 juga menstimulasi diferensiasi sel T CD8⁺ menjadi matur dan berfungsi secara aktif sebagai Tc. IL-12 juga merupakan regulator untuk fase efektor respons imun seluler, karena IL-12 secara langsung mengaktifkan dan mengatur sel efektor.

6. IFN- γ

IFN- γ dihasilkan oleh sel limfosit T yang distimulasi oleh antigen atau mitogen, sel NK dan sel makrofag.

Interferon terdiri atas 2 tipe yaitu Interferon tipe I yang terdiri dari interferon α dan β serta Interferon tipe II atau interferon gamma (IFN- γ). IFN- γ dihasilkan oleh sel-sel limfosit T yang distimulasi oleh antigen atau mitogen, bersifat tidak tahan asam. Sekresi IFN- γ merupakan *hallmark* limfosit Th1, sitokin ini sebagian besar dihasilkan oleh sel T CD8⁺ / Tc dan sebagian kecil oleh Th0 dan sel NK. IFN- γ juga dihasilkan oleh sel makrofag. Aktivitas sel-sel tersebut merupakan bagian dari respons imun khususnya terhadap IL-2 dan IL-12. Produksi IFN- γ dapat dihambat oleh IL-4, IL-10, TGF- β , glucocorticoid, cyclosporin A.

Produksi IFN- γ melalui ekspresi permukaan MHC klas I, dimana antigen endogen dipresentasikan oleh *antigen presenting cell* (APC) ke sel Tc, tapi juga antigen endogen dapat dipresentasikan melalui MHC klas II, dimana antigen dipresentasikan melalui aktivasi Th0-CD4⁺ yang akan mengaktifkan Th1-CD4⁺ yang akan memproduksi IFN- γ dan juga mempengaruhi sel NK dalam menghasilkan IFN- γ . Sitokin ini meningkatkan sitolisis dari sel Tc dan sel NK serta ekspresi reseptor IL-2 dan mampu menginhibisi replikasi virus. IFN- γ juga merupakan aktivator poten terhadap makrofag. Sekresi IFN- γ yang tinggi akan memperbesar kemampuan aktivitas mikrobisidal makrofag dan

memacu terbentuknya nitrit-oksida dan monokin seperti IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α . IFN- γ mengaktifkan netrofil, sel NK, sel vaskuler endotelial, memperbesar efek sitotoksik dari TNF- α . Juga memacu diferensiasi sel B dan sel Tc sebagai efektor aktif terhadap kanker. IFN- γ tidak memacu proliferasi limfosit tetapi memperbesar aktivasi sel Th1 dan menghambat produksi Th2. IFN- γ menurunkan produksi IL-4 oleh sel Th2 juga berpotensi memblokir efek IL-4 pada sel B yang memacu IgG dan produksi IgE. Regulasi terhadap TNF dirangsang terutama oleh IFN- γ . Hal ini menjelaskan adanya sinergisme antara TNF dan IFN- γ .^{45,46}

7. TNF- α

TNF pertama kali diidentifikasi sebagai faktor nekrosis hemoragik yang diproduksi sel tumor yang dirangsang oleh LPS bakteri. Gen TNF terletak pada kromosom 6 dalam MHC khususnya 6 p21.3 zona HLA klas III. Pada kedua sisinya, pada posisi 3' dan 5' merupakan gen yang mengkode limfotoksin α dan β (TNF- α dan β).^{45,51,52}

TNF- α disebut juga *cachectin* adalah *sitokin pleiotropik* (mempunyai aktivitas pada berbagai sel), berupa polipeptida (rangkain 157 asam amino) dengan berat 17 KD, terletak pada permukaan ekstra seluler (pada sitoplasma).

Sebagai sitokin pleiotropik, TNF- α mempunyai efek menguntungkan dan merugikan terhadap host atau pejamu. Sitokin ini mempunyai efek biologis sebagai protein imuno modulator (memodulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel B dalam produksi antibodi), mengaktifkan netrofil dan makrofag, merangsang hematopoiesis, sitotoksik dan sitostatik langsung terhadap berbagai tahap pertumbuhan sel tumor. TNF- α juga memiliki kemampuan untuk menginduksi ekspresi sitokin-sitokin lain (IL-1, IL-6, IL-8, IFN- β dan GM-CSF) dan sebagai mediator yang mempromosikan inflamasi sehingga disebut sitokin proinflamasi. Sitokin proinflamasi memainkan peranan fundamental dalam pertahanan imun. Diantara sitokin proinflamasi yang paling berperan

adalah TNF- α dan dapat dipakai sebagai indikator bahwa sel mengalami stres oksidatif, apoptosis atau nekrosis.^{45,51,52}

2.6 Sel Imun Darah Tepi Penderita Kanker

Perubahan fungsi imun sering kali dijumpai pada penderita kanker termasuk kanker pada kepala leher. Bahan mitogen dan sitokin akan menyebabkan perubahan aktivitas sel imun. Penderita kanker dengan metastasis, respons imun seluler (limfosit dan monosit) dalam sirkulasi darah menurun. Terjadi peningkatan progresif angka rerata ratio *helper / cytotoxic* (T4/T8) dengan meningkatnya stadium tumor. Rerata ratio T4/T8 yang tinggi dijumpai pada penderita dengan kanker lanjut (stadium III dan IV) dan menunjukkan perbedaan yang signifikan bila dibandingkan dengan orang normal. Penderita dengan ratio T4/T8 yang tinggi menunjukkan jumlah sel limfosit T8 makin rendah, maka makin jelek hasil terapi dan prognosisnya. Tc dapat dipakai sebagai prediksi survival. Etiologi perubahan T8 masih belum jelas tetapi salah satu faktor penyebabnya adalah progresivitas penyakit.^{11,42}

Penurunan fungsi imunitas sel mononuklear pada penderita kanker karena terjadi gangguan pada mekanisme maturasi dan proliferasi oleh karena monosit memproduksi PGE2 berlebihan, sehingga terjadi hambatan produksi IL-2 dan ekspresi IL-2R pada sel efektor NK/CD56, dan terjadilah penurunan aktivitas sel NK dan LAK.^{11,42}

2.7. *Polyphenols* Teh Hijau (PTH)

Senyawa *polyphenols* dapat dijumpai pada daun teh (*Camellia sinensis*), sayur-sayuran (misalnya : brokoli) dan buah (misalnya : apel), mempunyai khasiat untuk kesehatan. Brokoli dan apel mengandung senyawa *polyphenols* dalam konsentrasi rendah. Menurut penelitian epidemiologi, minum ekstrak daun teh atau *polyphenols* dapat menurunkan kemungkinan terserang penyakit kanker lambung, esofagus, usus besar, payudara dan liver. Khasiat *polyphenols* karena kapasitasnya sebagai pengais radikal bebas (anti oksidan yang kuat).⁵³

Teh mengandung beberapa macam unsur kimia yang mudah larut dalam air, diantaranya adalah senyawa *polyphenols* (kira-kira 40 %) sebagai unsur terbesar yaitu *catechins* (30-42 %), *theaflavins* (0 %), *phenolic acids and depsides* (2 %), *Flavanols* (2 %), *other polyphenols* (6 %).^{54,55}

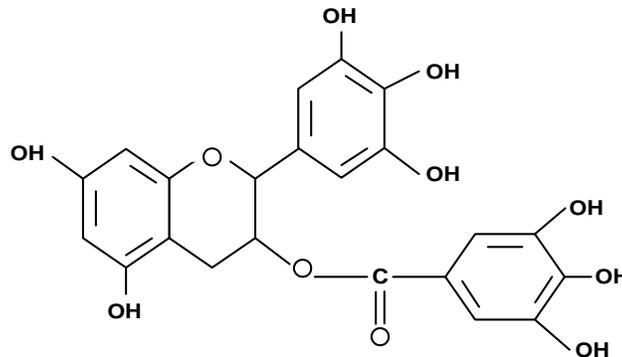
Tabel 2.2 Komposisi teh hijau dan teh hitam

Komponen	Senyawa	Teh Hijau	Teh Hitam
1.	<i>Catechins</i>	30 - 42%	3 - 10%
2.	<i>Theaflavins</i>	0%	2 - 3%
3.	<i>Phenolic acids and depsides</i>	2%	3%
4.	<i>Flavanols</i>	2%	1%
5.	<i>Other polyphenols</i>	6%	23%
6.	<i>Methyl xanthines</i>	3 - 6%	3 - 6%
7.	<i>Amino acids</i>	6%	6%
8.	<i>Peptides / protein</i>	6%	6%
9.	<i>Organic acids</i>	2%	2%
10.	<i>Carbohydrate</i>	11%	11%
11.	<i>Mineral / ash</i>	10 - 13%	10 - 13%

Komponen no 1-5 adalah *polyphenolic based compounds*. Semua unsur *polyphenols* mempunyai efek antioksidan namun kapasitasnya berbeda. Mekanisme utama antioksidan dalam mencegah penyakit adalah menetralkan dan menghancurkan radikal bebas melalui delokalisasi elektron, pemebntukan ikatan hidrogen intra molekuler maupun penataan kembali struktur molekulnya sebab radikal bebas akan merusak biomolekul (DNA, protein dan lipoprotein). *Catechins* adalah salah satu unsur *polyphenols* terbesar dalam daun teh hijau, antara 30 - 42% dari semua *polyphenols*. *Catechins* mempunyai 5 derivat utama yaitu *epicatechin* (EC), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin gallate* (ECG), dan *epigallocatechin gallate* (EGCG). *Gallocatechingallate* dan *Catechin gallate* merupakan produk reaksi *racemization* dan *epimerization* ketika proses pengeringan. Komposisi *catechin* berubah signifikan dengan pertambahan umur daun teh ketika dipanen. Daun teh yang lebih muda memiliki kandungan *catechin* yang lebih banyak. *Catechin* ini yang menimbulkan rasa enak. Semua derivat tersebut mempunyai kapasitas sebagai antioksidan tetapi EGCG adalah yang paling kuat. EGCG bentuk ester *catechins* paling poten sebagai antioksidan

terhadap *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) sehingga disimpulkan bahwa efek antioksi dan semua komponen *catechins* diwakili oleh EGCG.^{54,55}

2.7.1. Struktur kimia EGCG



Gambar 2.1 Struktur kimia EGCG

Catechins berperan sebagai antioksidan karena mempunyai struktur kimia *ortho-dihydroxy catechol* (3,4-OH) yang terikat pada cincin B dari *flavan-3-ols* dan grup *hydroxypyranone* serta gugus *ester-galate* pada cincin C.⁵³

Efek antioksidan ditentukan oleh kemampuan *polyphenols* dalam mendonorkan elektron dari struktur *ortho-dihidroxy* serta gugus *ester-galate*.^{53,56}

2.7.2. Farmakokinetik-farmakodinamik PTH

Catechins sangat mudah diserap oleh mukosa saluran makanan, diekskresi terutama melalui urine dan empedu dalam bentuk konjugat asam glukoronik/sulfat dan dalam 24 jam sudah tidak dijumpai lagi semua derivatnya dalam plasma darah. Farmakokinetik *polyphenols* menunjukkan bahwa setelah diserap oleh usus, *catechins* di dalam plasma berkonjugasi dengan *glucoronide sulfat* sebesar > 80%. Bentuk konjugat ini bersifat lebih hidrofilik dan distribusinya dalam tubuh lebih terbatas daripada bentuk *catechins* aslinya. Walaupun aktivitas antioksidan dalam bentuk konjugat belum diketahui tetapi kapasitas antioksidannya masih tetap seperti aslinya.⁵⁵

Setelah mengkonsumsi ekstrak murni 1,5 mmol EGCG, EGC dan ECG, konsentrasi masing-masing *catechins* berbeda didalam darah. ECG paling lambat (4 jam) mencapai kadar puncak, EGCG mencapai kadar puncak setelah 2,9 jam sedangkan EGC paling cepat mencapai kadar puncak setelah 1,4 jam. Waktu paruh masing-masing jenis *catechins* juga berbeda, ECG hampir 7 jam, EGCG hampir 4 jam dan EGC 1,7 jam. Disimpulkan konsentrasi puncak catechins didalam plasma antara 12-3 jam setelah konsumsi *catechins*.^{55,56}

Individu yang mengkonsumsi teh hijau berulang dapat meningkatkan konsentrasi dan mempertahankan *polyphenols* jaringan tetap tinggi. Minum teh hijau di atas 1 Liter (5 cups/hari) dapat melindungi tubuh dari timbulnya kanker. Diperkirakan minum teh hijau 3 cups (300 ml) tiap hari, sama dengan mengkonsumsi 240-320 mg *polyphenols*. Dalam 100 ml teh hijau mengandung antara 50 - 100 mg *polyphenols*. Mengkonsumsi satu tablet EGCG (400 mg) dapat menaikkan konsentrasi EGCG plasma darah sebesar 2 $\mu\text{mol/L}$.^{55,56}

Penelitian di Milan Italia menilai efek pencegahan *oxidative damage* oleh EGCG pada *Jurkat cells* yang mendapat suplemen EGCG. Dengan konsentrasi EGCG 15 $\mu\text{mol/L}$ secara signifikan dapat meningkatkan pertahanan sel terhadap peroksidasi lemak dan kerusakan DNA. Penelitian ini mendukung efek *catechins* ekstrak teh hijau 10 $\mu\text{mol/L}$ dapat mencegah kerusakan oksidatif sel limfosit. Dinyatakan bahwa derivat *catechins* lainnya (EGC dan EC) dapat meningkatkan efek EGCG.⁵⁷

Sampai sekarang belum dijumpai literatur yang melaporkan efek samping karena minum teh hijau, ekstrak teh hijau atau salah satu derivatnya seperti EGCG. Dengan mengkonsumsi kapsul *polyphenols* ekstrak teh hijau 800 mg dan EGCG 800 mg selama seminggu pada orang sehat, tidak dijumpai efek samping.⁵⁸

2.7.3. Efek biologi PTH

Sebuah penelitian membuktikan bahwa *polyphenols* mempunyai manfaat yang signifikan sebagai kemopreventif kanker, anti-imunosupresi dan anti-inflamasi. Hal ini karena kapasitas *polyphenols* dalam : (1) mencegah mutagenositas dan genotoksisitas, (2) inhibisi marker biokimia inisiasi dan promosi tumor, (3) efek pada detoksifikasi enzim, (4) menangkap bahan metabolik aktif karsinogen (5) aktifitas antioksidan dan pengais radikal bebas. Mekanisme molekuler efek PTH dijelaskan seperti dibawah ini :

1. PTH menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel kanker

Apoptosis (kematian sel terprogram) adalah proses fisiologi untuk mempertahankan sistem kehidupan tetap dalam keadaan homeostasis. Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa PTH atau derivatnya EGCG, EGC dan ECG menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa EGCG menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel pada karsinoma epidermoid sel A 431, human karsinoma keratinosit HaCaT, human sel karsinoma prostat DU 145, dan limfoma LY-R tikus, tetapi apoptosis tidak terjadi pada sel normal. Respons apoptosis makin besar dengan meningkatnya dosis *polyphenols* atau dengan macam-macam derivatnya (EGCG, EGC dan ECG). Perbedaan mekanisme respons apoptosis antara sel terinfeksi virus dengan sel normal adalah *polyphenols* meningkatkan ekspresi gen *c-fos* dan *c-myc* di sel yang mengalami transformasi oleh virus sedangkan pada sel normal tidak.⁵⁸⁻⁶⁰

PTH dapat mencegah pertumbuhan sel kanker dengan menghentikan siklus sel pada fase G0/G1. Efek tersebut terjadi karena *polyphenols* menghambat aktivitas beberapa enzim seperti protein kinase C, urokinase, induksi terbentuknya H₂O₂ dan gen TNF- α dan makin tinggi dosis *polyphenols* makin kuat efeknya.⁶⁰

2. PTH mencegah kerusakan sel imun akibat stres oksidatif

Polyphenols merupakan antioksidan yang kuat. EGCG dilaporkan memiliki efek antioksidan 25-100 kali dibandingkan dengan vitamin C dan E. Efek antioksidan yang tinggi ini sangat diperlukan oleh sel-sel yang mengalami stres oksidatif akibat paparan radikal bebas.^{58,61}

Telah dilakukan penelitian (*invitro* dan *invivo*) terhadap efek antioksidan *polyphenols* dalam mencegah kerusakan struktur biologis sel oleh radikal bebas maupun kemampuan *polyphenols* dalam mengaktifkan metabolisme kaskade asam arakidonat. Penelitian lain mengamati efek *polyphenols* pada tikus yang mengalami inflamasi. Didapatkan bukti bahwa kaskade asam arakidonat meningkat karena

terjadi peningkatan aktifitas enzim *Phospholipase A2* (PLA2) yang akan menghidrolisis ikatan *sn-2 fatty acid ester* diantaranya *glycero-3-phospholipid* dan akan menghasilkan asam lemak bebas. Proses metabolisme tersebut menghasilkan grup-grup radikal bebas yang memacu peningkatan aktivitas PLA2 untuk menstimulasi produksi radikal bebas selanjutnya. Radikal bebas oksigen (*lipid peroxide*) mengaktifkan PLA2. Antioksidan *catechin* mencegah radikal bebas oksigen mengaktifkan PLA2 dan kekuatannya sebanding dengan besarnya dosis *catechin*. *Catechin* dosis 0,5% dapat menurunkan aktivitas PLA2 sampai tidak berbeda dengan aktivitas normal.⁴⁸

Stres oksidatif pada sel limfosit dan makrofag menyebabkan produksi MOR meningkat sehingga menimbulkan sejumlah perubahan pada molekul komponen seluler (produksi sitokin inflamasi meningkat), perubahan morfologi dan ketahanan hidup sel (lesi DNA dan peroksidasi LDL). Sel mempunyai sistem perlindungan terhadap MOR yang terdiri dari antioksidan enzimatik dan non enzimatik, namun kadang-kadang tidak cukup untuk mencegah efek MOR secara sempurna. *Polyphenols* dapat membantu meningkatkan sistem pertahanan antioksidan untuk mencegah efek MOR. *Polyphenols* mencegah peroksidasi LDL dari fosfolipid sel membran dengan mekanisme mengikat radikal bebas hidroksil, sehingga aktifitas PLA2 menurun, dan pemecahan LDL menjadi asam arakidonat menurun pula. Selanjutnya PGE2 (yang dihasilkan dari jalur siklooksigenase) serta leukotrien (yang dihasilkan dari jalur lipooksigenase) akan menurun. PGE2 adalah hormon lokal yang menimbulkan inflamasi dan leukotrien adalah kemotaktik sel radang. Penurunan PGE2 ini menyebabkan produksi IFN γ dan IL2 meningkat dengan akibat terjadi peningkatan aktivitas sel NK dan makrofag dalam melakukan fagositosis terhadap sel kanker.^{48,62}

Pada inflamasi akut atau kronik produksi IL-1, TNF- α , IL-6 dan IL-8 meningkat. Di antara mediator tersebut, TNF- α adalah sitokin yang memegang peran penting pada proses inflamasi. Produksi TNF- α

dikendalikan oleh aktifitas gen TNF- α di bawah kontrol NF- κ B. PTH menurunkan produksi sitokin inflamasi dengan melemahkan aktifitas nuclear factor - κ B (NF- κ B), sehingga gen-gen yang memproduksi mediator inflamasi (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α), enzim misalnya *inducible nitric oxide syntase* (iNOS) molekul adesi dan protein fase akut menurun. Jadi PTH dapat mengikat radikal bebas yang menstimulasi aktifitas NF- κ B, dengan akibat tidak adanya faktor yang menstimuli gen TNF- α sehingga produksi TNF- α menurun.^{47,49} Telah dilakukan penelitian tentang efek PTH terhadap produksi TNF- α pada tikus murine. Dibuktikan bahwa PTH menyebabkan penurunan signifikan terhadap protein TNF- α melalui penurunan ekspresi mRNA TNF- α yang distimulir (diperantarai) LPS dengan menghambat aktivasi NF- κ B. PTH dengan dosis 0,5 gram/kgBB terbukti bisa menurunkan serum TNF- α sebesar 80% sehingga proses inflamasi bisa ditekan.⁴⁷ Penelitian lain membuktikan bahwa PTH memiliki fungsi sebagai terapi nutrien baru dalam proses inflamasi.⁴⁹

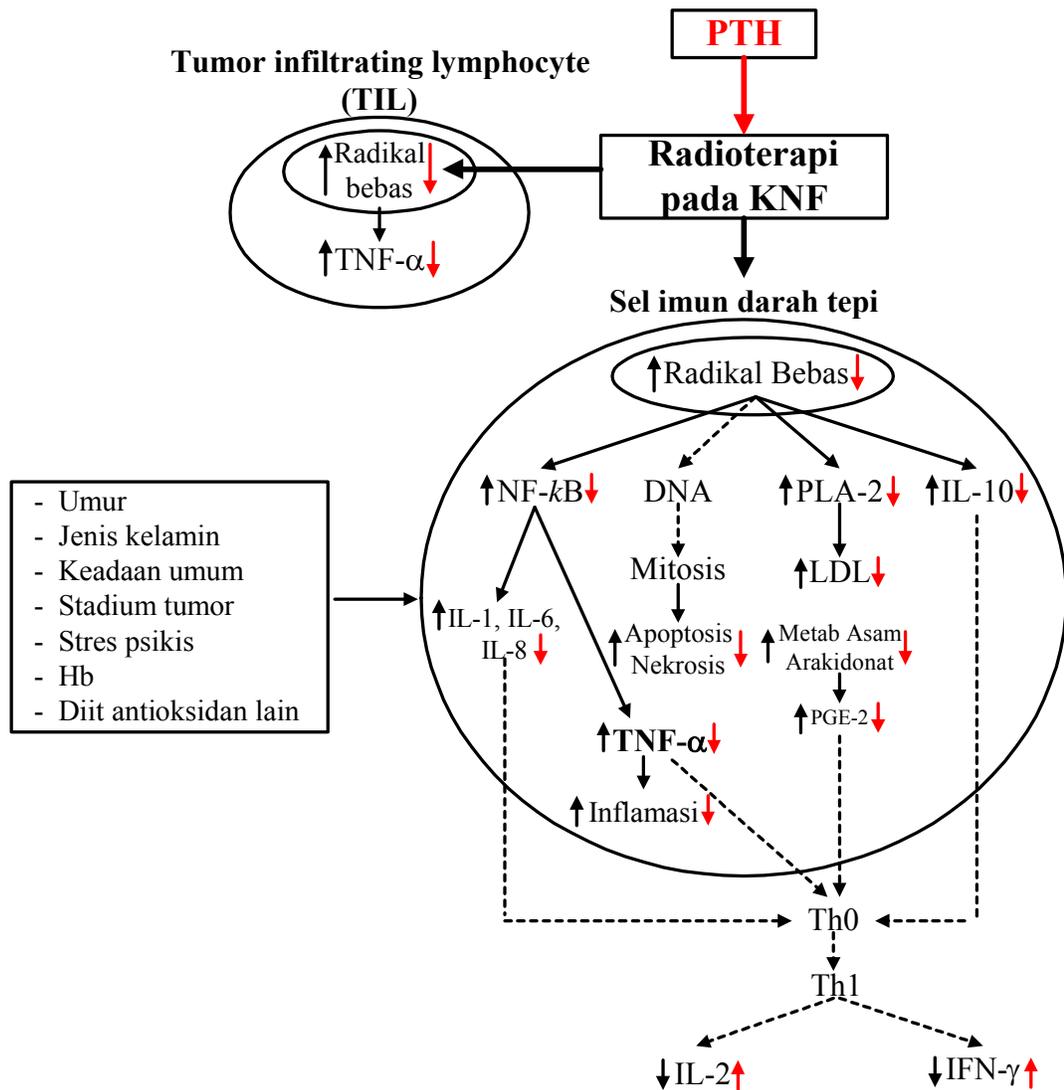
3. PTH mencegah penyebaran tumor

Polyphenols selain dapat mencegah radikal bebas menimbulkan immunosupresi, juga dapat mencegah perkembangan tumor dengan mencegah angiogenesis. Perkembangan semua tipe tumor ditentukan angiogenesis, penyebaran dan metastasis akan mengalami gangguan apabila angiogenesis dirusak atau disupresi.⁵³

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah sitokin yang berikatan dengan *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFRs), memainkan peranan penting dalam angiogenesis tumor. Penelitian *in vitro* pada hewan juga pada sel karsinoma kolon manusia menunjukkan bahwa VEGF dapat dicegah oleh EGCG dalam menimbulkan angiogenesis, sehingga tidak terjadi perkembangan sel endotel kapiler. Hal ini karena fungsi VEGF yang menyebabkan fosforilasi tirosin pada VEGFR-2 dicegah oleh *polyphenols*. Pencegahan ini khusus dilakukan oleh ECG dan EGCG, karena tes

dengan *catechins* lain tidak berefek. Dilaporkan *catechins* teh hijau merupakan penghambat yang baik sekali dalam aktivitas fosforilasi tirosin VEGFR-2. Konsentrasi antara 0,01 - 1 μm dari *epigallocatechin-3 gallate*, *catechin-3 gallate* dan *epicatechin-3 gallate* merupakan inhibitor yang poten aktivitas VEGFR-2.^{53,63}

2.8. Patofisiologi



Keterangan :

→ : Memacu

---→ : Menghambat

➔ : Efek Radioterapi

○ : Nukleus Sel

➔ : Efek PTH

↑↓ : Kadar TNF-α dan radikal bebas akibat pengaruh radioterapi

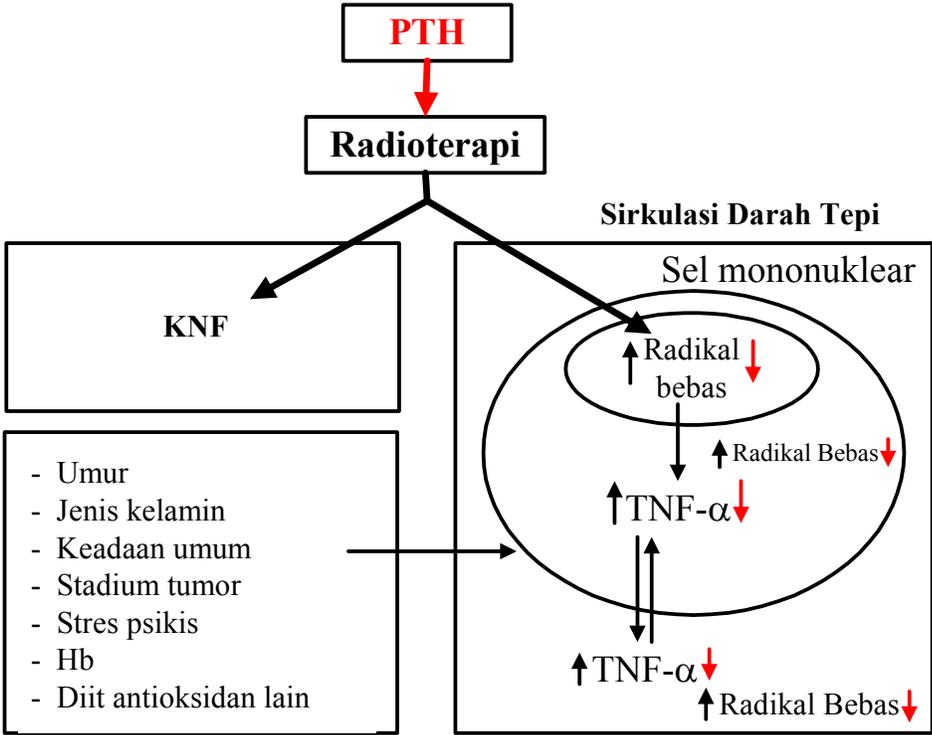
↑↓ : Kadar TNF-α dan radikal bebas akibat pengaruh PTH

Penjelasan Patofisiologi :

Radioterapi (sinar pengion) bertujuan mengeradikasi sel KNF. Sinar ini dapat mengenai sel normal. Terhadap sel imun, sinar ini bersifat immunosupresor. Sinar pengion akan menyebabkan ionisasi H₂O didalam nukleus serta sitoplasma dan menghasilkan radikal bebas oksidatif (terutama OH[•]) yang sangat reaktif dan menimbulkan beberapa efek sebagai berikut :

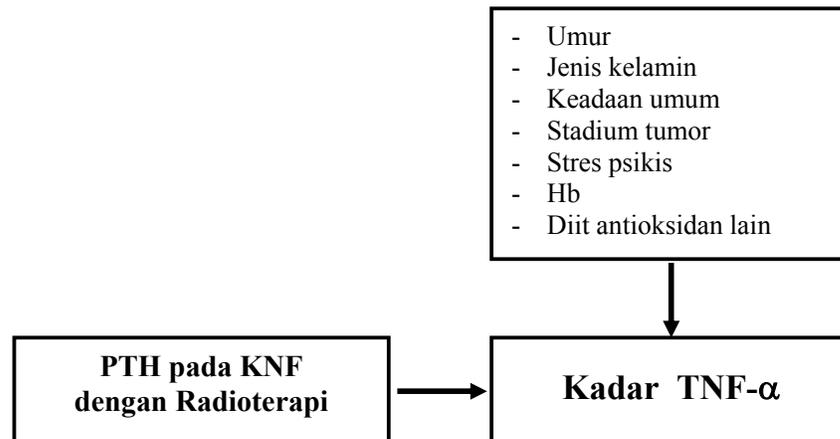
1. Terhadap TIL akan memacu pembentukan TNF- α .
2. Terhadap sel imun darah tepi :
 - a. Meningkatkan aktifasi gen NF- κ B sehingga produksi NF- κ B meningkat, diikuti peningkatan produksi sitokin proinflamasi IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α sehingga sel mengalami inflamasi.
 - b. DNA sel imun terhambat mitosisnya sehingga terjadi apoptosis dan nekrosis.
 - c. Meningkatkan PLA-2 yang memacu pemecahan LDL dan metabolisme asam arakidonat sehingga produksi PGE2 meningkat.
 - d. Meningkatkan produksi IL-10.
- Peningkatan IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, PGE2 dan TNF- α akan menghambat aktifitas proliferasi limfosit Th0 menjadi Th1 sehingga aktifitas makrofag dan sel NK menurun.
- Peningkatan TNF- α secara khusus akan menyebabkan inflamasi.
- Inflamasi sel imun dan penurunan aktifitas sel makrofag serta sel NK akan menyebabkan penurunan kapasitas fagositosis sehingga tumor akan tumbuh progresif, residif serta meningkatkan metastasis.
- PTH sebagai anti oksidan mengais radikal bebas (terutama OH[•]), untuk mencegah efek radioterapi terhadap sel imun darah tepi sehingga inflamasi pada sel imun, penurunan aktifitas makrofag serta sel NK bisa ditekan.

2.9 Kerangka Teori



- ➔ : Efek Radioterapi
- : Nukleus Sel
- ➔ (red) : Efek PTH
- ↑↓ (black) : Kadar TNF-α dan radikal bebas akibat pengaruh radioterapi
- ↑↓ (red) : Kadar TNF-α dan radikal bebas akibat pengaruh PTH

2.10 Kerangka Konsep



2.11 Hipotesis

2.11.1 Hipotesis mayor

PTH yang diberikan bersama dengan radioterapi pada penderita KNF dapat mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi.

2.11.2 Hipotesis minor

Kadar TNF- α setelah radioterapi pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *randomized controlled trial* (RCT) *pre-post test design*. Dengan rancangan ini akan dapat diketahui perubahan yang terjadi akibat perlakuan. Untuk menjamin objektivitas, penelitian dilakukan dengan tehnik tersamar ganda. Perubahan yang terjadi pada kelompok perlakuan (radioterapi + PTH) akan dibandingkan dengan kelompok kontrol (radioterapi + plasebo). Selanjutnya akan dianalisis pengaruh PTH yang diberikan bersama radioterapi terhadap variabel yang akan diteliti.

Penelitian yang akan dilakukan adalah mengukur kapasitas PTH dalam mengikat radikal bebas yang dihasilkan oleh radiasi dengan mengidentifikasi perbedaan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat Penelitian :

1. Klinik THT FK UNDIP/RSUP Dr. Kariadi Semarang, untuk pemeriksaan dan penjelasan-penjelasan kepada subyek penelitian.
2. Klinik Radioterapi FK UNDIP/RSUP Dr Kariadi Semarang, untuk pemberian radioterapi.
3. Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP/RSUP Dr Kariadi Semarang, untuk pengambilan darah dan pemeriksaan TNF- α .

Waktu Penelitian :

Penelitian dilakukan sejak bulan Mei 2005 sampai dengan Januari 2007.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi target dari penelitian ini adalah semua penderita KNF. Populasi terjangkau adalah semua penderita KNF yang datang berobat di poliklinik THT RSUP Dr. Kariadi Semarang. Sedangkan populasi sampel adalah semua penderita KNF yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

3.3.2 Sampel

a) Kriteria inklusi

1. KNF, T1-T4 tanpa ada metastasis jauh.
2. Pada foto thorax dan USG abdomen tidak ditemukan metastasis.
3. Jenis histopatologi (PA) adalah karsinoma nasofaring WHO tipe 2 dan WHO tipe 3, sebab tipe ini paling sering ditemukan (sekitar 82%) dan mempunyai kepekaan terhadap radiasi yang relatif sama.
4. Umur 15 - 60 tahun, sebab angka kejadian KNF terbanyak (80%) adalah pada kelompok tersebut dan sistem imun sudah melewati masa perkembangan sehingga relatif stabil.
5. Kadar HB \geq 10 gr%, jumlah lekosit 4-11 ribu/mm³, kadar albumin serum dalam batas normal (di atas 3,5 gr%) dengan metode elektroforesis.
6. Skala *Karnofsky* \geq 60%
7. Bersedia ikut dalam penelitian sampai selesai dengan menandatangani *informed consent*.

b) Kriteria eksklusi

1. Pernah mendapat terapi radiasi, atau sedang mendapat terapi yang dapat mempengaruhi fungsi imunitas seluler, misalnya hormon, sitostatika dan kortikosteroid.

2. Menderita penyakit yang dapat mempengaruhi respons ketahanan tubuh misalnya : kelainan sistem imun, infark jantung dan otak, TBC paru, DM, sepsis dan infeksi atau kelainan berat yang lain.
3. Mendapatkan transfusi darah satu bulan sebelum dan selama radioterapi.

c) Besar sampel

Besar sampel untuk uji klinis 2 kelompok independen (tidak berpasangan) pada data numerik adalah

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(Z\alpha + Z\beta)S}{(X_1 - X_2)} \right]^2$$

Keterangan:

- n : besar sampel
- α : Tingkat kemaknaan = 0,05
- $Z\alpha$: 1,960
- $Z\beta$: 0,842
- S : Simpang baku respons terapi terhadap kedua kelompok
- $X_1 - X_2$: *Clinical judgment* (beda respons terapi)

Berdasarkan studi pendahuluan :

Simpang baku (S) 537,97, perbedaan kadar TNF- α sebesar 500 pg/mL dianggap berarti, maka dengan $\alpha = 0,05$ dan *power* = 80% didapat $Z\alpha = 1,960$, $Z\beta = 0,842$, $X_1 - X_2 = 500$.

Didapatkan jumlah sampel satu kelompok (n) sebesar 18. Dengan perhitungan drop out 10%, maka jumlah sampel masing-masing kelompok sebesar 20.

d) Teknik pengambilan sampel

Penderita KNF yang memenuhi kriteria penelitian akan diikutkan sebagai sampel. Selanjutnya akan dibagi secara randomisasi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi variabel

- a) Variabel bebas : PTH
- b) Variabel tergantung : kadar TNF- α yang diproduksi sel mononuklear darah tepi
- c) Variabel pengganggu : umur, jenis kelamin, keadaan umum, kadar Hb, asupan antioksidan yang lain, dan stadium tumor.

3.4.2 Definisi operasional variabel

- a. PTH yang dipakai adalah kapsul "Decaffeinated" MEGA GREEN TEA EXTRACT 95%. Polyphenols green tea supplement, di produksi oleh Life Extension Foundation Bayers Club Inc. Ft Lauderdale, Florida

Isi tiap kapsul :

- » Green tea decaffeinated extract : 725 mg
 - » Epigallocatechin gallate : 246,5 mg
 - » Others polyphenols : 427,75 mg
 - » Waters and gelatins
- b. Kadar TNF- α adalah kadar TNF- α yang diproduksi secara langsung oleh sel mononuklear darah tepi, diukur dengan cara ELISA (TNF- α ELISA kit dari ANOGEN, Canada) dengan satuan pg/mL.

3.5 Bahan Penelitian

Bahan yang akan diteliti diambil dari vena Mediana Cubiti sebanyak 5 ml pada saat sebelum minum PTH atau plasebo (sebelum mulai radioterapi) dan pada hari terakhir pasca radioterapi.

Bahan diambil dari vena Mediana Cubiti dengan pertimbangan :

1. Sel mononuklear darah tepi yang menerima paparan radioterapi mengalami penurunan aktivitas imunologis tetapi masih dapat kembali normal.
2. PTH mudah sekali diabsorpsi oleh mukosa usus.
3. Pemberian PTH dalam 1,5 – 3 jam sudah bisa mencapai kadar tinggi PTH dalam darah, dengan waktu paruh antara 3 – 5 jam kemudian menurun terus dan dalam 24 jam sudah hilang dari tubuh.
4. PTH dalam waktu 1 jam sudah menimbulkan efek pada sel limfosit dan monosit.

3.6 Instrumen Penelitian

Penelitian ini membutuhkan reagen dan peralatan sebagai berikut :

1. Alat untuk mengambil sampel jaringan
Lampu kepala, kaca faring, spekulum hidung, pinset bayonet, pembuka mulut (*mouth gag*), kateter nelaton, spatula, forcep Blakesey, xylocaine spray 10%, alkohol 70%, larutan efedrin 2%, formalin buffer 10% dan botol kecil untuk tempat jaringan biopsi.
2. Alat untuk mengambil sampel darah
Semprit yang diisi heparin 50 unit/ml.
3. CO₂ inkubator, 37,5% CO₂, kelembaban 100%, dengan panci gelas untuk air dengan 0,1% SDS atau deterjen lain pada bagian dasar untuk meminimalkan kontaminasi.
4. Pipet ukuran 10 – 100 cc dan 100 – 1000 cc.
5. *Laminar flow hood* atau *clean work bench*.
6. Freezer – 7°C
7. LPS (E.Coli 026 : b6) : Sigma, catalog number L 2654

8. Medium (RPMI 1640 medium)
9. Pen / Strep / *L-glutamine solution*
10. *TNF- α ELISA Kit*, dibeli dari ANOGEN, 2355 Derry Road East, Unit 23 Mississauga, Ontario, Canada L5S 4V6

3.7 Cara Kerja

Untuk memperoleh data yang diperlukan, setiap penderita KNF yang menjadi sampel akan menjalani pemeriksaan :

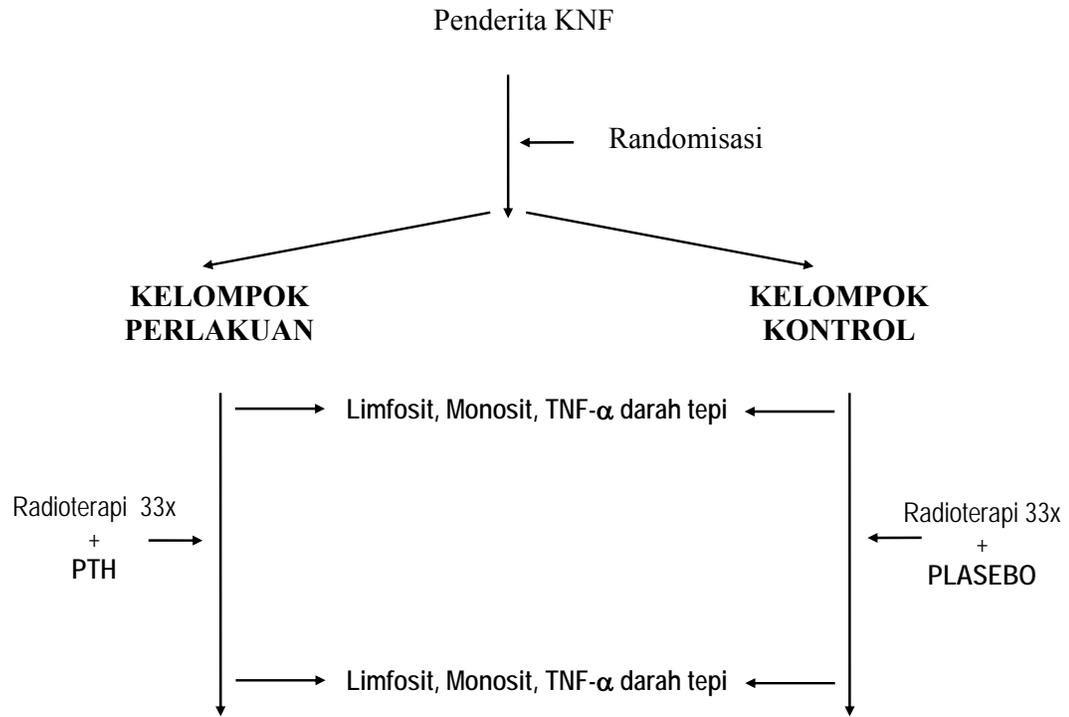
1. Pemeriksaan rutin THT-Kepala Leher, pemeriksaan nasofaring dengan nasofaringoskopi + biopsi
2. Pasien yang masuk dalam kriteria inklusi menandatangani *informed consent*, dan di data sesuai form penelitian.
3. Pemeriksaan darah : Hb, leukosit, eritrosit, trombosit, hitung jenis, albumin, dan TNF- α dilakukan sebelum radiasi.
4. Pemeriksaan CT scan nasofaring dengan atau tanpa kontras untuk menentukan lokasi dan luas tumor (keperluan perhitungan dosis radiasi), X-foto thorax dan USG abdomen untuk menilai metastasis.
5. Konsul ke bagian mata, gigi dan neurologi untuk memastikan ada / tidaknya kelainan di bagian tersebut yang bisa berpengaruh terhadap radioterapi.
6. Penderita dikirim ke bagian radioterapi untuk mendapat terapi radiasi.
7. Pasien yang memenuhi kriteria inklusi dilakukan randomisasi untuk menentukan masuk dalam kelompok perlakuan atau kontrol.
8. Setiap penderita diambil 5 cc darahnya dengan semprit steril untuk pemeriksaan jumlah leukosit, hitung jenis dan TNF- α .
9. Kelompok perlakuan mendapat kapsul PTH tiap pagi dan sore. Dosis pagi sebanyak 4 tablet diminum 1,5 – 3 jam sebelum radioterapi dan sebelum makan. Dosis sore sebanyak 4 tablet diminum 10 jam setelah radioterapi dan sebelum makan. Kapsul PTH diberikan setiap hari sebelum radiasi (sejak hari pertama sampai hari terakhir radiasi). Dosis total EGCG setiap hari adalah 1972 mg.

10. Kelompok kontrol mendapat 4 kapsul plasebo (sakarum laktis) pagi dan sore, dengan cara dan prosedur yang sama seperti pada kelompok perlakuan.
11. Setiap minggu (setelah 5 kali radiasi), dilakukan pemeriksaan Hb, lekosit, eritrosit, trombosit dan albumin (protap bagian Radioterapi).
12. Mengevaluasi efek samping radioterapi. Penderita dievaluasi di klinik minimal 1 kali dalam seminggu, atau setiap saat apabila ada keluhan hebat atau gejala yang mengganggu. Penderita dan keluarganya diberi penjelasan supaya tidak memberi vitamin atau makanan yang bisa mempengaruhi efek *polyphenols* misalnya : vitamin A, C, E atau minuman yang mengandung *polyphenols* seperti teh hijau, teh hitam dan lainnya.
13. Setelah radiasi 6600 cGy, dilakukan pemeriksaan Hb, lekosit, eritrosit, trombosit, hitung jenis, albumin dan TNF- α .
14. Perhitungan jumlah sel leukosit, limfosit dan monosit dilakukan secara *autoanalyzer* menggunakan alat *Coulter HMX hematology analyzer* dan albumin menggunakan alat *Dimension RXL* di laboratorium Patologi Klinik RS. dr Kariadi Semarang.
15. Setelah jumlah sampel terkumpul, dilakukan pemeriksaan kadar TNF- α dengan metode *ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)*. Pemeriksaan dilakukan di laboratorium Bioteknologi FK UNDIP Semarang (lampiran 3)

3.8 Sampel yang tidak diikuti dalam analisis :

1. Keadaan umum yang makin buruk (skala Karnofsky < 60).
2. Didapatkan komplikasi berat akibat radioterapi. Tidak menjalani radioterapi sesuai dengan jadwal (5 kali tidak datang berturut-turut atau 7 kali secara tidak berurutan) atau dosis radiasi total kurang dari 6000 cGy.
3. Tidak patuh minum PTH sampai 7 hari berturut-turut.

3.9 Alur Penelitian



3.10 Uji Hipotesis

Uji hipotesis yang dilakukan untuk membuktikan bahwa kadar TNF- α sesudah radioterapi pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah :

1. Uji beda masing-masing kelompok
 - a. Uji beda antara sebelum dan sesudah radioterapi pada kelompok perlakuan dengan uji *Wilcoxon signed rank test* dan uji-*t* (berpasangan).
 - b. Uji beda antara sebelum dan sesudah radioterapi pada kelompok kontrol dengan uji *Wilcoxon signed rank test* dan uji-*t* (berpasangan).
2. Uji beda antar kelompok
 - a. Uji beda rerata komponen imun (limfosit, monosit, TNF- α) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol sesudah radioterapi dengan uji-*t* (tidak berpasangan) dan uji *Mann Whitney U test*.
 - b. Uji *Mann Whitney U test* untuk melihat perbedaan selisih rerata jumlah limfosit, monosit dan kadar TNF- α antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.
 - c. Penghitungan perbedaan persentase penurunan jumlah limfosit, monosit dan kadar TNF- α antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

BAB 4

HASIL PENELITIAN

Selama penelitian didapatkan 68 penderita KNF terdiri dari 9 penderita (13,2%) WHO tipe 1, 30 penderita (44,1%) WHO tipe 2 dan 29 penderita (42,6%) WHO tipe 3, tetapi yang memenuhi kriteria penelitian hanya 50 penderita (73,5%). Dari 50 penderita KNF (WHO tipe 2 dan WHO tipe 3) dibagi secara randomisasi blok menjadi kelompok radioterapi + plasebo (kelompok kontrol) dan kelompok radioterapi + PTH (kelompok perlakuan). Tidak semua penderita dapat mengikuti penelitian sampai selesai karena sebagian dari mereka dikeluarkan (*drop-out*). 2 penderita (4,7%) dari kelompok kontrol dikeluarkan karena tidak mau datang. 2 penderita dari kelompok perlakuan dikeluarkan karena 1 penderita tidak mau minum obat dan 1 penderita lainnya tidak pernah datang. Dengan demikian penderita KNF yang dapat mengikuti penelitian sampai selesai pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan masing-masing sebanyak 23 penderita. Tidak semua penderita dapat diperiksa kadar TNF- α nya. Dari 46 penderita, hanya 20 penderita dari masing-masing kelompok yang dapat diperiksa TNF- α nya.

4.1 Distribusi Frekuensi Penderita

4.1.1 Distribusi kelompok umur dan jenis kelamin (karakteristik penderita)

Dari 40 penderita, didapatkan rerata umur adalah 40,8 tahun dengan simpangbaku 13,49. Usia termuda 15 tahun dan tertua 60 tahun. Bila dikelompokkan menjadi beberapa golongan umur, maka proporsi terbesar adalah pada kelompok umur 50-60 tahun (32,5%) dan terkecil adalah pada kelompok umur 10-19 tahun (7,5%), (tabel 4.1).

Tabel 4.1 Distribusi penderita menurut kelompok umur

Kelompok Umur (th)	N	%
10 – 19	3	7,5
20 – 29	6	15,0
30 – 39	6	15,0
40 – 49	12	30,0
50 - 60	13	32,5

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.

4.1.2 Distribusi kadar hemoglobin, skor Karnofsky, jenis histopatologi dan stadium tumor

Rerata (SB) kadar Hb penderita adalah 12,90 (1,369) gr%, kadar minimum 10,3 g% dan kadar maksimum 16,0 g%. Skor Karnofsky didapatkan rerata 86,2 (5,86) %, nilai minimum 70%, maksimum 90%.

Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan bahwa sebagian besar WHO tipe 2 sebanyak 26 penderita (65,0%), dan WHO tipe 3 sebanyak 14 penderita (35,0%). Menurut stadium, sebagian besar adalah stadium 4 sebanyak 24 penderita (60,0%), stadium 3 sebanyak 14 penderita (35,0%) dan stadium 2 sebanyak 2 penderita (5,0%).

4.2 Uji Beda Masing-Masing Kelompok

Berdasarkan hasil uji normalitas data variabel didapatkan bahwa jumlah limfosit dan kadar TNF- α berdistribusi tidak normal sedangkan jumlah monosit berdistribusi normal.

Uji beda antara sebelum dan sesudah radioterapi pada kelompok perlakuan

Uji hipotesis menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan, rerata jumlah limfosit dan monosit sebelum dan sesudah radioterapi adalah berbeda bermakna ($p = 0,0001$). Limfosit dan monosit sebelum radioterapi lebih tinggi dibandingkan sesudah radioterapi. Kadar TNF- α sebelum radioterapi lebih besar dibandingkan sesudah radioterapi, namun perbedaan rerata kadar TNF- α sebelum dan sesudah radioterapi tidak bermakna ($p = 0,9360$). (tabel 4.2).

Tabel 4.2 Perbedaan rerata jumlah limfosit, monosit, dan kadar TNF- α antara sebelum dan sesudah radioterapi pada kelompok perlakuan

Variabel	Rerata (SB)				<i>p</i>
	Sebelum radioterapi		Sesudah radioterapi		
Limfosit (sel/ml)	1.016,7	(862,73)	652,3	(374,92)	0,0001 ¹⁾
Monosit (sel/ml)	667,2	(342,98)	529,0	(338,95)	0,0001 ²⁾
TNF- α (pg/mL)	2.018,9	(2.064,00)	1.461,8	(832,25)	0,9360 ¹⁾

Keterangan: ¹⁾ Uji *Wilcoxon Signed Ranks Test* ²⁾ Uji-*t* (berpasangan)

Uji beda antara sebelum dan sesudah radioterapi pada kelompok kontrol

Uji hipotesis pada kelompok kontrol menunjukkan bahwa perbedaan rerata jumlah limfosit dan monosit sebelum dan sesudah radioterapi adalah bermakna ($p = 0,0001$), sedangkan perbedaan rerata kadar TNF- α sebelum dan sesudah radioterapi tidak bermakna ($p = 0,7780$). Jumlah limfosit, monosit dan TNF- α sebelum radioterapi lebih tinggi dibandingkan sesudah radioterapi. (tabel 4.3).

Tabel 4.3 Perbedaan rerata jumlah limfosit, monosit, dan kadar TNF- α antara sebelum dan sesudah radioterapi pada kelompok kontrol

Variabel	Rerata (SB)				<i>p</i>
	Sebelum Radioterapi		Sesudah Radioterapi		
Limfosit (sel/ml)	1.088,7	(801,66)	408,3	(147,55)	0,0001 ¹⁾
Monosit (sel/ml)	668,8	(295,39)	421,0	(145,01)	0,0001 ²⁾
TNF- α (pg/mL)	1.912,7	(2.106,63)	1.764,6	(1.897,65)	0,7780 ¹⁾

Keterangan: ¹⁾ Uji *Wilcoxon Signed Ranks Test* ²⁾ Uji-*t* (berpasangan)

4.3 Uji Beda Antar Kelompok

4.3.1 Uji beda rerata komponen imun antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol sesudah radioterapi

Uji hipotesis membuktikan ada perbedaan bermakna rerata limfosit antara kedua kelompok ($p = 0,023$), limfosit pada kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Rerata monosit tidak berbeda bermakna ($p = 0,202$), tetapi monosit pada kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol. TNF- α pada kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol, tetapi tidak berbeda bermakna ($p = 0,640$) (tabel 4.4).

Tabel 4.4 Hasil uji beda rerata jumlah limfosit, monosit, dan kadar TNF- α sesudah radioterapi antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol

Variabel	Kelompok Perlakuan (n = 20)	Kelompok Kontrol (n = 20)	<i>p</i>
	Rerata (SB)	Rerata (SB)	
Limfosit	652,3 (374,91)	408,3 (147,54)	0,023 ²⁾
Monosit	529,0 (338,95)	421,0 (145,01)	0,202 ¹⁾
TNF- α	1.461,8 (832,25)	1.764,6 (1.897,65)	0,640 ²⁾

Keterangan: ¹⁾ Uji-*t* (tidak berpasangan)

²⁾ Uji *Mann-Whitney*

4.3.2 Perbedaan selisih rerata jumlah limfosit, monosit dan kadar TNF- α antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Hasil Uji *Mann-Whitney* membuktikan bahwa perbedaan rerata perubahan (selisih sebelum dan sesudah radioterapi) terhadap jumlah limfosit, monosit dan kadar TNF- α antara kedua kelompok adalah tidak bermakna (semua $p > 0,05$).

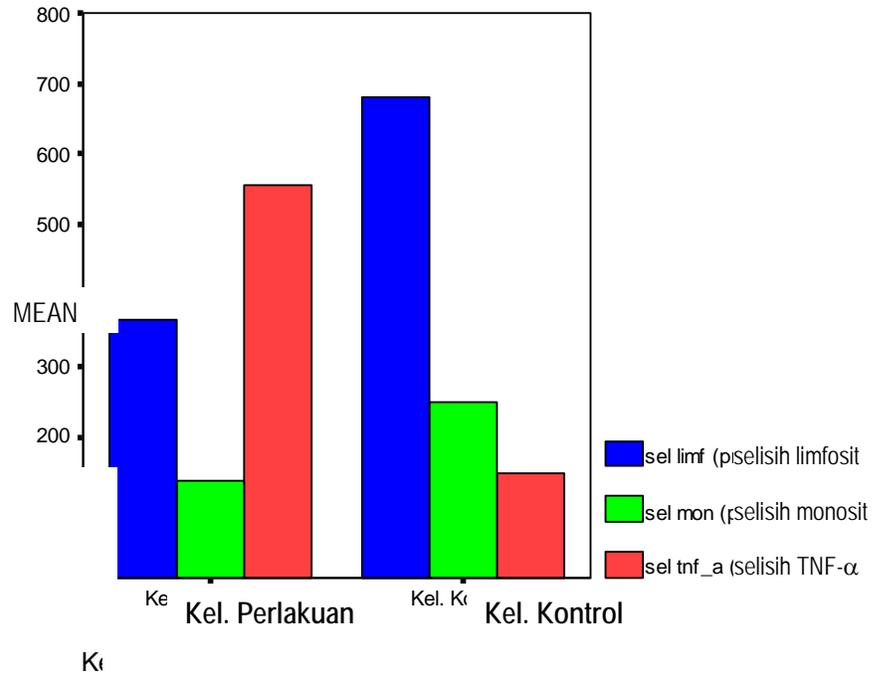
Angka absolut membuktikan bahwa selisih jumlah limfosit dan monosit pada kelompok perlakuan lebih sedikit, sedangkan selisih TNF- α lebih banyak dibandingkan pada kelompok kontrol (tabel 4.5).

Tabel 4.5 Perbedaan rerata perubahan (selisih) jumlah limfosit, monosit, dan kadar TNF- α antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Variabel	Rerata (SB)				<i>P</i>
	Kel. Perlakuan (n=20)		Kel. Kontrol (n=20)		
Selisih Limfosit	364,4	(634,65)	680,4	(828,91)	0,056 ¹⁾
Selisih Monosit	138,2	(99,73)	247,8	(209,87)	0,091 ¹⁾
Selisih TNF- α	557,1	(2.306,47)	148,1	(1.861,26)	0,968 ¹⁾

Keterangan: ¹⁾ Uji *Mann-Whitney*

Gambar diagram bar menunjukkan bahwa selisih limfosit dan monosit pada kelompok perlakuan lebih kecil dibandingkan dengan kelompok kontrol, sedangkan selisih TNF- α pada kelompok perlakuan lebih besar daripada kelompok kontrol (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Diagram bar perbedaan selisih jumlah limfosit, monosit, dan kadar TNF- α antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol

4.3.3 Perbedaan persentase penurunan jumlah limfosit, monosit dan kadar TNF- α antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Tabel 4.6 membuktikan bahwa persentase penurunan jumlah limfosit dan monosit pada kelompok perlakuan lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan persentase penurunan kadar TNF- α pada kelompok perlakuan lebih besar dibandingkan kelompok kontrol.

Tabel 4.6 Perbedaan Persentase Penurunan Jumlah Limfosit, Monosit, dan kadar TNF- α antara Kelompok Perlakuan dan Kelompok Kontrol

Variabel	Kelompok Perlakuan	Kelompok Kontrol
Persentase Penurunan Jumlah Limfosit	35,8 %	62,5 %
Persentase Penurunan Jumlah Monosit	20,7 %	37,1 %
Persentase Penurunan kadar TNF- α	27,6 %	7,8 %

BAB 5

PEMBAHASAN

5.1 Metode Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkapkan pengaruh PTH dalam mencegah penurunan vitalitas sel mononuklear darah tepi akibat radioterapi pada penderita KNF. Untuk mencapai tujuan tersebut dilakukan penelitian eksperimental. Intervensi berupa pemberian kapsul PTH. Penelitian eksperimental menggunakan obat dengan obyek manusia yang dikerjakan di klinik dapat digolongkan sebagai *clinical trial* (uji klinis). Pemilihan rancangan *randomized pre-post test control group design* mempunyai konsekuensi derajat kesulitan yang lebih tinggi dibandingkan dengan rancangan jenis lainnya, terutama aspek etika dan feasibilitas penelitian. Namun rancangan ini sangat baik untuk melihat efek perlakuan karena mempunyai kapasitas tinggi dalam memperlihatkan hubungan sebab akibat.

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah semua penderita KNF yang berobat di poliklinik THT-KL RSUP Dr. Kariadi Semarang dan populasi untuk penerapan hasil penelitian adalah semua penderita KNF.

Randomisasi telah dilakukan dengan tujuan untuk membuat 2 kelompok menjadi seimbang baik dalam jumlah maupun karakteristik penderita sehingga faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil atau mengganggu proses penghitungan dan analisis data bisa dikendalikan. Pada penelitian ini dipilih teknik randomisasi blok dengan tujuan agar jumlah sampel pada tiap kelompok dalam suatu waktu selalu dalam keadaan sebanding atau hampir sama. Berdasarkan uji *Chi square*, *Mann whitney* dan uji-*t* tidak berpasangan terbukti bahwa tidak ada perbedaan karakteristik penderita maupun parameter imunologi diantara 2 kelompok pada awal penelitian (p untuk semua variabel $> 0,05$), sehingga disimpulkan bahwa sampel pada dua kelompok memang berasal dari populasi yang memiliki kondisi sama (homogen).

Uji normalitas data terhadap variabel-variabel penelitian dilakukan untuk menentukan jenis uji statistik yang akan dipakai dalam analisis hasil. Uji statistik pada masing-masing kelompok memakai uji-*t* berpasangan jika distribusi data

normal sedangkan uji *Wilcoxon sign rank test* jika distribusi data tidak normal (salah satu atau kedua variabel). Uji statistik antara kedua kelompok memakai uji-*t* tidak berpasangan jika distribusi data normal, sedang uji *Mann whitney* jika distribusi data tidak normal.

Hitung limfosit dan monosit dilakukan secara *autoanalyzer* menggunakan alat *Coulter HMX hematology analyzer* sedangkan albumin menggunakan alat *Dimension RXL* di laboratorium patologi klinik RS Dr. Kariadi-Semarang. Dengan tehnik pemeriksaan ini didapat hasil yang obyektif karena darah dianalisa dengan sistem komputer. Darah yang diambil untuk pemeriksaan TNF- α dilakukan dengan tehnik *venipuncture*, plasma dipisahkan dari sel darah secepat mungkin. Kemudian sel darah dimasukkan inkubator. Setelah jumlah sampel terkumpul, dilakukan pemeriksaan kadar TNF- α dengan metoda *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang menggunakan ELISA kit dari Anogen dengan *catalogue number* EL 10024. Pemeriksaan dengan tehnik ELISA ini merupakan pemeriksaan standart dan banyak dilakukan untuk mengukur kadar sitokin.

5.2 Analisis Univariat terhadap Distribusi Frekuensi Penderita

5.2.1 Berdasarkan umur

Distribusi umur pada penelitian ini berkisar antara 15 sampai 60 tahun dengan frekuensi tersering ditemukan terutama pada usia 50-60 tahun sebanyak 13 penderita (32,5%) (tabel 4.1), dengan rerata umur 40,8 tahun. Hasil ini hampir sama dengan penelitian di Surabaya, Jakarta, Taiwan dan Alaska. Hal ini menunjukkan bahwa etiologi KNF adalah multi faktor. Paparan zat-zat karsinogenik dan infeksi virus *Epstein-Barr* dapat menyebabkan akumulasi kelainan beberapa gen yang berinteraksi satu dengan lainnya sehingga mengakibatkan terjadinya transformasi ke arah sel kanker. Proses ini membutuhkan waktu berpuluh tahun antara paparan

pertama terhadap bahan karsinogenik dengan timbulnya sel kanker dan frekuensi terbanyak mengenai kelompok usia 40-60 tahun.¹³

Penelitian di Surabaya didapatkan 623 penderita KNF, penderita dengan rentang usia tersering 41-50 tahun sebanyak 26,0%.²⁰ Penelitian di Jakarta terhadap 659 penderita KNF, rentang usia tersering terjadi pada kelompok 40-49 tahun sebanyak 176 penderita (25,92%) dan nomor 2 tersering pada kelompok 50-59 tahun sebesar 145 penderita (22,00%).⁶⁴ Penelitian di Taiwan didapatkan 497 penderita KNF dengan rentang usia 17 sampai 77 tahun dan rerata 45,7 tahun.⁶⁵ Penelitian di Alaska didapatkan 31 penderita KNF dengan rentang usia 32 sampai 80 tahun, yang tersering pada kelompok usia 45-54 tahun dengan rerata 54 tahun untuk laki-laki dan 56 tahun untuk wanita.⁵⁹

5.2.2 Berdasarkan jenis kelamin

Penderita laki-laki pada penelitian ini adalah 27 penderita (67,5%) sedangkan wanita 13 penderita (32,5%). Rasio laki-laki-wanita 2,1:1. Penelitian di Surabaya ditemukan 623 penderita KNF terdiri dari 433 penderita laki-laki (69,5%) dan 190 penderita wanita (30,5%) dengan rasio 2,26:1.²⁰ Penelitian di Jakarta didapatkan 181 penderita KNF terdiri dari 152 penderita laki-laki (64,2%) dan 29 penderita wanita (35,8%) dengan rasio laki-laki : wanita adalah 1,79:1.⁶⁴ Penelitian di Taiwan didapatkan 494 penderita KNF terdiri dari 367 penderita laki-laki (74,3%) dan 127 penderita wanita (25,7%), rasio laki-laki : wanita adalah 2,9:1.⁶⁵ Penelitian di Alaska didapatkan 31 penderita KNF terdiri dari 25 penderita laki-laki (80,6%) dan 6 penderita wanita (19,4%), dengan rasio 4,1:1.⁶⁶ Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian di Jakarta, Surabaya, Taiwan dan Alaska. Disimpulkan bahwa penderita KNF lebih banyak pada laki-laki karena mereka pada umumnya bekerja diluar dan berada pada lingkungan kerja yang potensial terpapar bahan karsinogenik.¹⁴

5.2.3 Berdasarkan jenis histopatologi

Pada pemeriksaan histopatologi, penelitian ini menunjukkan KNF WHO tipe 2 sebanyak 26 penderita (65,0%) dan WHO tipe 3 sebanyak 14 penderita (35,0%). Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian di Surabaya dan Jakarta. Baik di Surabaya dan Jakarta tipe KNF yang sering dijumpai adalah WHO tipe 3. Hasil penelitian sebelumnya di Semarang ditemukan bahwa WHO tipe 3 sebanyak 202 penderita (43,78%) dari 462 penderita KNF, WHO tipe 2 sebesar 124 penderita (26,84%) dan WHO tipe 1 sebesar 136 penderita (29,48%).⁶⁷

Penelitian di Surabaya ditemukan angka terbanyak pada jenis WHO tipe 3 sebesar 101 penderita (78,2%).²⁰ Penelitian di Jakarta terhadap 559 penderita KNF ditemukan WHO tipe 3 sebesar 501 (89,63%), WHO tipe 2 sebanyak 14 penderita (2,50%) dan WHO tipe 3 sebesar 44 penderita (7,87%).¹⁴ Persentase KNF di kota-kota Indonesia yang bervariasi ini menunjukkan bahwa tipe histopatologi dapat dipengaruhi oleh lingkungan dan kebiasaan / budaya.¹⁶

5.2.4 Berdasarkan stadium tumor

Pada penelitian ini ditemukan stadium II sebesar 2 penderita (5%), stadium III sebesar 14 penderita (35%) dan stadium IV sebesar 24 penderita (60%). Penelitian di Bandung terhadap 623 penderita KNF, sebagian besar datang sudah pada stadium lanjut yaitu stadium III sebesar 63 penderita (20,7%) dan stadium IV sebesar 238 penderita (78%). Penderita yang datang pada stadium dini terdiri dari stadium I hanya 1 penderita (0,3%), stadium II sebanyak 2 penderita (0,7%). Penelitian di Jakarta didapatkan 81 penderita KNF terdiri dari stadium II sebesar 2,47%, stadium III sebesar 17,28% dan stadium IV 80,25%.¹⁸

Disimpulkan penderita yang datang berobat sebagian besar pada stadium lanjut, dengan tumor sudah meluas ke jaringan sekitar atau ke kelenjar limfe leher. Hal ini disebabkan karena kurangnya pengetahuan masyarakat terhadap penyakit ini terutama mengenai gejala dini (pada stadium awal tidak ada keluhan yang berarti), keadaan sosial ekonomi yang rendah.²

5.3 Analisis Bivariat terhadap Komponen Imun

5.3.1 Perubahan respons imun sesudah radioterapi pada kelompok kontrol

Jumlah limfosit, monosit dan TNF- α sesudah radioterapi pada kelompok kontrol lebih rendah dibandingkan sebelum radioterapi. (tabel 4.3).

Radioterapi mempunyai efek immunosupresor sebab radiasi pengion menyebabkan sindrom hemopoetik yang ditandai penurunan jumlah dan kualitas sel darah tepi terutama limfosit. Sinar pengion yang dihasilkan radioterapi menyebabkan pemecahan kovalen antara hydrogen dan oksigen. Radikal bebas OH⁻ mengoksidasi DNA sehingga rantai DNA pecah dan menyebabkan kerusakan kromosom sehingga terjadi perubahan metabolisme dan efek biologi sel pada tingkat mitosis (kerusakan struktur sel yang memicu apoptosis sel imun).⁸

Reaktivitas radikal bebas sangat tinggi dengan waktu paruh sangat pendek (10^{-9} detik) sehingga dengan cepat merusak molekul didekatnya. Sebuah molekul OH⁻ dapat merusak ratusan rantai PUFA menjadi lipid hidroperoksida yang akan berubah menjadi aldehid. Aldehid akan berikatan dengan protein, menghancurkan integritas membran sel, merusak aktifitas transport protein, membuat kolaps ion gradien dan akhirnya memicu kematian sel. Sebuah penelitian membuktikan adanya hubungan negatif antara dosis dan lamanya radiasi dengan imunitas seluler penderita KNF. Semakin besar dosis dan semakin lama paparan radiasi akan semakin menurunkan sistem imun seluler.⁸

Sebuah penelitian melaporkan bahwa sekitar 75% penderita KNF mengalami penurunan CMI setelah radioterapi sebab radioterapi pada KNF meliputi daerah yang cukup luas sehingga dapat mengenai sel efektor imunologis, baik yang beredar di sirkulasi (sistemik), jaringan limfoid mukosa hidung dan nasofaring serta tenggorok (*ring of waldeyer's*).⁴²

Sebuah penelitian membuktikan bahwa setelah radioterapi terjadi penurunan jumlah total limfosit sebesar 50-60% dibandingkan dengan sebelum radioterapi. Penurunan sel-sel darah tepi ini karena terhambatnya

produksi sel darah dalam sistem hemopoetik (hambatan mitosis pada sel induk).⁸ Sel limfosit yang terpapar sinar pengion akan mengalami aberasi pada kromosomnya sehingga terjadi perubahan metabolisme dan efek biologis sel pada tingkat mitosis. Aberasi kromosom dapat terjadi pada sel induk sumsum tulang maupun sel limfosit matur pada nodus limfatikus dan pembuluh darah tepi. Sel-sel prekursor di sumsum tulang lebih radiosensitif dibandingkan sel limfosit matur. Aberasi kromosom ini menyebabkan penurunan jumlah limfosit, walaupun limfosit mempunyai kemampuan untuk memperbaiki kerusakan melalui reparasi DNA. Apabila sistem ini gagal maka akan terjadi penurunan imunitas seluler dalam melawan kanker.⁷⁰

Efek radiasi pada dosis 200 cGy yang diberikan 5 kali dalam seminggu pada daerah nasofaring akan menurunkan jumlah dan indeks transformasi limfosit dimana hitung limfosit terendah terjadi 4 minggu setelah penyinaran. 2 minggu setelah penyinaran, indeks transformasi dan hitung limfosit akan mulai meningkat.⁸

Monosit juga merupakan sel yang radiosensitif tetapi radiosensitifitasnya lebih rendah dibandingkan dengan limfosit. Pada dosis radioterapi yang sama, monosit turun lebih lambat tetapi reparasi lebih cepat dibandingkan dengan limfosit. Reparasi limfosit terjadi 20 – 30 hari sedangkan monosit 6 hari setelah radioterapi.^{7,8}

Radikal bebas (terutama OH) yang dihasilkan radioterapi merusak struktur vital sel melalui mekanisme; a. peningkatan konsentrasi enzim PLA2. Aktivitas PLA2 akan membentuk PGE2 dari asam arakidonat sel kanker maupun sel makrofag. PGE2 akan menghambat aktivitas dan proliferasi limfosit T dan sitotoksik sel NK, b. terjadi peningkatan IL-10 dan penurunan IL-12 oleh sel makrofag. c. aktivasi gen NF- κ B yang akan menyebabkan pelepasan IL-1, IL-8 dan TNF- α .^{43,46} Kadar TNF- α dalam sirkulasi darah segera meningkat setelah dirangsang oleh radiasi pengion. Kadar TNF- α yang tinggi dipakai sebagai indikator bahwa sel mengalami

stres oksidatif.⁷ Studi *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa IL-1, IL-6 dan TNF- α meningkat akibat paparan radiasi. TNF- α naik signifikan setelah 10 – 15 kali paparan radiasi.⁷²

Pada kelompok kontrol kadar TNF- α sesudah radioterapi lebih rendah dibandingkan sebelum radioterapi, sehingga disimpulkan bahwa efek radioterapi terhadap TNF- α pada kelompok ini belum terlihat jelas.

Kemampuan sel mononuklear dalam memproduksi TNF- α berbeda antara individu satu dengan lainnya sebab adanya pengaruh faktor intrinsik, tipe dan umur sel, jenis kelamin dan keadaan psikis. Pasien kanker pada umumnya mengalami rasa takut dan cemas yang cukup besar, sehingga merangsang SSP mengirim sinyal imunoregulator kepada sistem imun dan mempengaruhi pelepasan ACTH dari hipofise yang menyebabkan terlepasnya glukokortikoid yang bersifat immunosupresif. Kondisi depresi dan tekanan batin akan menghambat pelepasan endorphin oleh sel otak sehingga menyebabkan penurunan sistem imun.⁷³

Pada penelitian ini faktor jenis kelamin sudah terbagi rata antara kedua kelompok. Faktor intrinsik sel, tipe dan umur sel serta kondisi psikis pasien selama menjalani radioterapi merupakan faktor yang tidak bisa dikendalikan.

5.3.2 Perubahan respons imun sesudah radioterapi pada kelompok perlakuan

Hitung limfosit, monosit dan TNF- α sesudah radioterapi pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan sebelum radioterapi (tabel 4.2).

Radioterapi pada KNF menghasilkan radikal bebas yang banyak. Tubuh memiliki mekanisme pertahanan melalui *scavenger internal* terhadap radikal bebas, misalnya : *superoxide dismutase* (SOD), ion Cu²⁺, *glutation peroksidase*, *katalase* dan sitokrom C, tetapi jika jumlah radikal bebas berlebihan dan terjadi gangguan keseimbangan antara oksidan dan antioksidan maka terjadilah stres oksidatif.^{48,62}

Efek antioksidan yang sangat tinggi diperlukan oleh sel-sel imun yang mengalami stres oksidatif akibat paparan radikal bebas.^{58,61} Sebagai pengais radikal bebas yang kuat, PTH (melalui gugus *orthodihydroxy catechol* dan *ester galate*) secara aktif mentransfer elektron berupa atom H sehingga reaktifitas radikal bebas bisa dicegah.⁵⁶

PTH bersifat anti immunosupresor dengan menetralkan efek radikal bebas sehingga stres oksidatif, stres metabolik dan kerusakan struktur vital sel imunologis bisa ditekan agar fungsi sistem imun (jumlah dan kualitas sel mononuklear serta sitokin yang dihasilkan) bisa berjalan baik.

Sebuah penelitian membuktikan bahwa PTH mempunyai manfaat signifikan sebagai kemopreventif kanker, anti-immunosupresi dan anti-inflamasi, karena PTH memiliki beberapa kapasitas; (1) mencegah mutagenositas dan genotoksisitas, (2) inhibisi marker biokimia inisiasi dan promosi tumor, (3) detoksifikasi enzim, (4) menangkap bahan metabolik aktif karsinogen (5) antioksidan dan pengais radikal bebas.^{58,59}

PTH yang diberikan pada penelitian ini sebesar 4 kapsul pagi hari dan 4 kapsul sore hari, mempunyai kadar EGCG sebesar 1972 mg. Kadar EGCG mencapai puncak didalam darah 1½ – 3 jam setelah diminum. EGCG akan menetralkan radikal bebas yang terbentuk akibat radiasi. Pemberian kedua bertujuan menetralkan radikal bebas yang masih terdapat didalam darah penderita karena 10 jam sesudah radiasi kadar EGCG telah turun dan yang tersisa hanya sebesar 20%. (lampiran 5)

PTH menghambat aktivasi gen *NF-kB* sehingga peningkatan kadar $\text{TNF-}\alpha$ dapat dicegah. PTH memiliki efek proteksi terhadap sel imun dengan mencegah penurunan jumlah dan fungsi limfosit dan monosit serta mencegah peningkatan $\text{TNF-}\alpha$.¹²

PTH yang diberikan pada kelompok perlakuan ternyata belum jelas terbukti dalam mencegah peningkatan kadar $\text{TNF-}\alpha$, karena kadar $\text{TNF-}\alpha$ sebelum

dan sesudah radioterapi perbedaannya tidak bermakna walaupun angka absolut berbeda.

Faktor-faktor yang bisa menyebabkan perbedaan TNF- α tidak bermakna :

1. Infeksi bakteri / mikro organisme

LPS pada membran terluar bakteri merangsang ekspresi gen NF- κ B yang mengontrol ekspresi bermacam-macam gen yang memproduksi sitokin pro inflamasi (IL-1, IL-6, TNF- α).⁴⁹

2. Ukuran tumor yang mendapat radioterapi berbeda.

Tumor berukuran kecil biasanya memiliki vaskularisasi baik, relatif homogen, oksigenasi baik dan jumlah sel kurang lebih sama. Tumor besar vaskularisasinya kurang baik, heterogen dengan variasi jumlah sel dan keadaan oksigenasi cukup luas. Radioterapi pada kanker kepala leher menggunakan teknik penyusutan lapangan dengan mempertimbangkan ukuran tumor. Disimpulkan efek radiasi terhadap sel imun pada tumor kecil berbeda dengan tumor besar, hal ini mempengaruhi kadar TNF- α yang diproduksi oleh sel imun.

3. Keadaan limfosit, monosit serta makrofag

Kemampuan produksi TNF- α tergantung keadaan limfosit, monosit serta makrofag.⁴⁵

4. Nutrisi penderita

Penelitian membuktikan bahwa restriksi kalori menyebabkan penurunan produksi sitokin inflamasi (IL-6 dan TNF- α).⁷⁵

5.3.3 Perbedaan jumlah sel imun dan kadar TNF- α sesudah radioterapi antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Jumlah limfosit dan monosit sesudah radioterapi pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol sedangkan kadar TNF- α kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol (tabel 4.4).

Selisih limfosit dan monosit pada kelompok perlakuan lebih rendah sedangkan selisih TNF- α lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol (tabel 4.5).

Tabel 4.6 membuktikan bahwa persentase penurunan jumlah limfosit dan monosit pada kelompok perlakuan lebih rendah sedangkan persentase penurunan kadar TNF- α lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol.

Karakteristik penderita dan parameter imunologi pada kedua kelompok sudah terbagi secara seimbang, sehingga disimpulkan bahwa faktor yang menyebabkan perbedaan selisih limfosit, monosit dan TNF- α antara kedua kelompok adalah PTH, walaupun secara statistik perbedaan tidak bermakna. Disimpulkan bahwa PTH tidak bermakna dalam mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi akibat radioterapi.

5.4 Keterbatasan dan Kendala Selama Penelitian

1. Stres psikologis pada penderita KNF (oleh karena kanker, lama dan efek samping radioterapi) tidak dapat dikontrol selama penelitian.
2. Infeksi yang mungkin terjadi tidak diamati.
3. Asupan antioksidan lainnya yang tidak dapat dikontrol selama penelitian.

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

PTH yang diberikan bersama dengan radioterapi pada penderita KNF tidak bermakna dalam mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian terhadap antioksidan lain dalam mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi pada penderita Karsinoma Nasofaring yang mendapat radioterapi.
2. Perlu dilakukan penelitian kadar SOD (*superoxide dismutase*) yang dapat digunakan sebagai indikator penurunan antioksidan enzimatik yang berfungsi untuk mengikat radikal bebas.

BAB 7

RINGKASAN

Karsinoma nasofaring merupakan keganasan terbanyak di bagian THT, Kepala dan Leher.¹⁻² Radioterapi merupakan terapi utama untuk memberantas KNF dan metastasisnya pada kelenjar getah bening leher. Akan tetapi, radioterapi bersifat non selektif (menyebabkan kematian biologis sel tumor dan sel normal disekitarnya) secara langsung maupun tidak langsung (merusak struktur rantai DNA dan menimbulkan ionisasi molekul terutama H₂O). Sinar pengion radioterapi menyebabkan terbentuknya radikal bebas hidroksil (OH⁻) yang sangat reaktif dalam menyebabkan stres metabolik, stres oksidatif dan kerusakan struktur vital sel.⁴⁻⁶

Radioterapi yang diberikan pada penderita KNF sering menimbulkan kerusakan sel imun yang berefek pada penurunan respons imun seluler.⁷⁻⁸ Penurunan kualitas *immune surveillance* menyebabkan pertumbuhan tumor makin progresif, meningkatkan metastasis serta memudahkan infeksi mikroba. Penurunan fungsi imunitas tubuh akibat radioterapi menyebabkan stres oksidatif, peningkatan konsentrasi metabolik oksigen reaktif (MOR) dan radikal bebas pada sel imun yang akan menyebabkan peningkatan produksi sitokin inflamasi (IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF- α). *Tumour Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) merupakan sitokin inflamasi yang paling berperan pada proses inflamasi dan dipakai sebagai indikator bahwa sel mengalami stres oksidatif, apoptosis atau nekrosis.^{8,11}

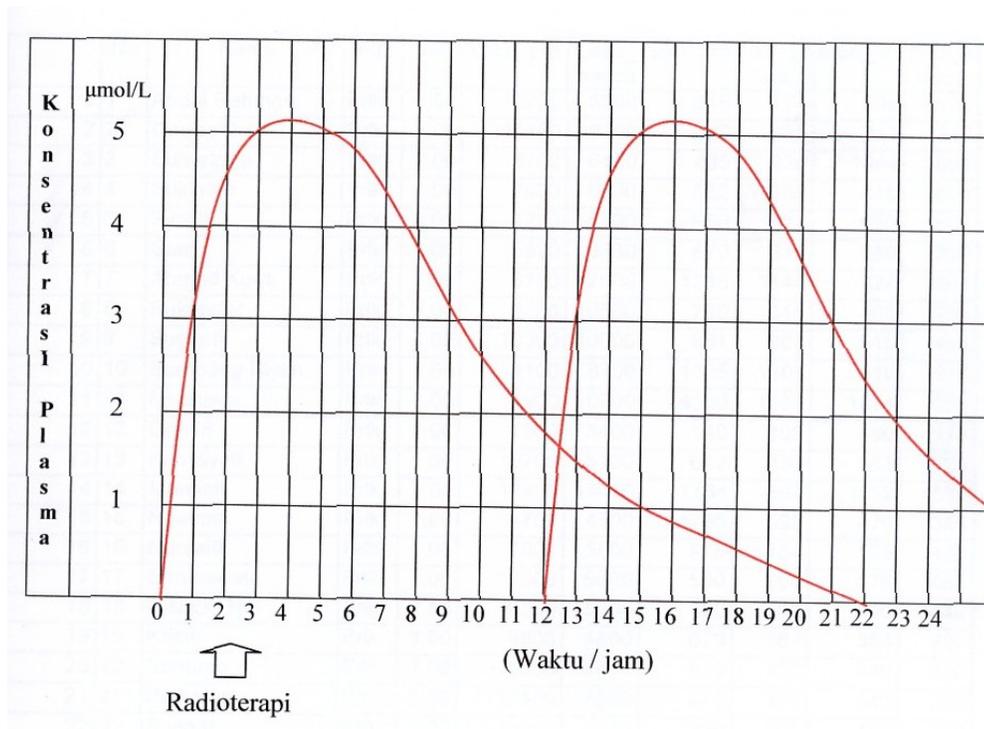
PTH merupakan antioksidan kuat dan dapat melindungi sel imun dari kerusakan biologis akibat radikal bebas. PTH terbukti mampu mencegah peningkatan produksi sitokin inflamasi (IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α) oleh sel makrofag dan limfosit yang teraktivasi oleh radikal bebas. Penelitian pada tikus membuktikan bahwa PTH menekan produksi TNF- α oleh sel mononuklear yang mendapat radiasi sinar ultra violet B.¹² Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa

PTH dapat mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi akibat radioterapi pada penderita KNF.

Penelitian *randomized controlled trial (RCT) pre-post test design* terhadap 40 penderita KNF yang memenuhi kriteria inklusi, dibagi dalam 2 kelompok. Kelompok kontrol mendapatkan radioterapi dan plasebo (sakarum laktis) sedangkan kelompok perlakuan mendapatkan radioterapi dan PTH. Plasebo dan PTH diberikan 1 jam sebelum dan 10 jam setelah radioterapi selama 33 kali penyinaran (6600 cGy). Pemeriksaan laboratorium (jumlah limfosit, monosit dan kadar TNF- α) dilakukan sebelum radioterapi pertama dan setelah radioterapi yang ke-33. Penghitungan jumlah sel leukosit, limfosit dan monosit dilakukan secara *autoanalyzer* menggunakan alat *Coulter HMX hematology analyzer* di laboratorium Patologi Klinik RS. Dr. Kariadi Semarang. Pemeriksaan kadar TNF- α dengan metode *ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)* dilakukan di laboratorium Bioteknologi FK UNDIP Semarang.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa rerata kadar TNF- α pada kelompok kontrol sebesar $1.764,6 \pm 1.897,65$, sedangkan pada kelompok perlakuan sebesar $1.461,8 \pm 832,25$. Hasil uji *Mann-Whitney* terhadap kadar TNF- α membuktikan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna pada kedua kelompok ($p=0,640$), sehingga disimpulkan bahwa pemberian PTH pada penderita KNF yang mendapat radioterapi tidak bermakna dalam mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel mononuklear darah tepi.

Lampiran 5



Gambar Farmako Kinetik Catechin (EGCG)

Pada penelitian ini, sampel pada kelompok perlakuan diberi 4 kapsul PTH (setara dengan 986 mg EGCG atau 5 µmol/L dalam darah) 1½ - 3 jam sebelum radiasi. Puncak kurva pertama menunjukkan kadar EGCG yang dikonsumsi sebelum radiasi. Konsentrasi EGCG menurun terus dengan waktu paruh sekitar 4 jam. 10 jam setelah radiasi tampak kadar EGCG yang masih ada di dalam darah sekitar 25%. EGCG dosis kedua (sore hari) diberikan 10 jam sesudah radiasi. Tampak EGCG konsentrasi kembali tinggi dan dapat berfungsi sebagai *scavenging* radikal bebas sampai menjelang radiasi hari berikutnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Munir M. Perkembangan terapi bedah pada keganasan di bidang telinga, hidung, dan tenggorok. Pidato pada upacara pengukuhan sebagai guru besar tetap. Jakarta. 31 Juli 2002.
2. Roezin A., Anida S. Karsinoma nasofaring. Dalam : Eviaty Arsyad, Nurbaiti Iskandar, editor. Buku ajar ilmu kesehatan telinga, hidung, tenggorok - kepala leher. Edisi kelima. Jakarta. FKUI. 2001; hal:146-55.
3. Adinolodewo, Samsudin. Respon klinik pasca radioterapi pada karsinoma nasofaring WHO3. Konas Perhati Bali. 2003.
4. Fu KK. Treatment of tumors of the nasopharynx, radiation therapy. In : Stites DP, Terr AI, Parslow TG, eds. Basic and clinical immunology. New Jersey. A Lange medical book. 1991; 649-61.
5. Supriana N, Gondhowiardjo S. Radioterapi sebagai modalitas pengobatan penyakit kanker. MKI. 1996. 46.
6. Geara FB, Sanguineti G, Tucker SL, Garden AS. Carcinoma nasopharynx treated by radiotherapy alone : determinants of distant metastasis and survival. Radiotherapy Oncology. 1997. 43.
7. Early PJ, Sodee DB. Biologic effect of ionizing. In : Principles and Practice of nuclear medicine. Kasper R, editor. St Louis, The C.V. Mosby Company. 1985; 179-89.
8. Syahrin MH, Suhana N, Sudarmo S, Tjokronegoro A. Pengaruh radiasi terhadap sistem pertahanan tubuh seluler pada penderita kanker nasofaring. MKI. 1984. 34.
9. Hussey DH. Principles of radiation oncology. In : Bailey BAJA. Head and Neck Surgery-Otolaryngology. Philadelphia. JB Lippincott Co. 1993; p:1040-60.

10. Bailet JW, Mark Rj, Abemayor E. Nasopharyngeal carcinoma : treatment result with primary radiation therapy. In : Laryngoscope. 1992. 102.
11. Heimdall JH, Aarstad HJ, Olofsson J. Peripheral blood - lymphocyte and monocyte function and survival in patients with head and neck carcinoma. Laryngoscope. 2000. 110.
12. Yang F, De Villiers W J S, McClain C J, Varilek G W. Green tea polyphenols block endotoxin - induced tumor necrosis factor - production and lethality in a murine model. Journal Nutrition. 1998. 126.
13. Shanmugaratnam K. Nasopharyngeal carcinoma : epidemiology and aetiology. In : Bambang SS, Hoedijono R, Sugonda T., eds. Kumpulan naskah seminar kanker nasofaring. Semarang. Wonodri offset. 1988.
14. Roezin A. Factor resiko pada KNF. PIT-PERHATI. Seminar kanker NF. Medan. 2001.
15. Ramsi L, Yan Utama N. Karsinoma nasofaring. Dalam : PIT - Seminar Karsinoma nasofaring. Medan. 2001.
16. Tejawinata S. Kanker nasofaring di beberapa sentra di Indonesia. Media IDI Cabang Surabaya. 1996.
17. Gustafson RO, et al. Cancer of nasopharynx. In : Myers EN, Suen JY. Cancer of the head and neck. 2nd ed. New York. Churcill livingstone. 1995; p:495-508.
18. Furukawa M. Epidemiological analysis of nasopharynx carcinoma in Japan and the concurrent chemoradiotherapy using super selective intra arterial infusion chemotherapy. Kursus pra PIT Perhati Palembang. 2001.
19. Moorhead JC. Nasopharyngeal carcinoma. 1994. [Http://www.brand.rounds/arch/baylor.htm](http://www.brand.rounds/arch/baylor.htm).

20. Mulyarjo. Diagnosis dan penatalaksanaan karsinoma nasofaring. Pendidikan kedokteran berkelanjutan III Ilmu penyakit telinga hidung, tenggorok - kepala leher. SMF Ilmu Kesehatan THT-KL FK Unair/RSUD Dr. Sutomo. Surabaya. 2002.
21. Ballenger JJ. Tumor ganas nasofaring. Dalam : Penyakit telinga, hidung, tenggorok - kepala dan leher. Edisi 13. Jilid 1. Alih bahasa staf ahli bag THT RSCM FKUI. Jakarta. Binarupa Aksara. 1997; hal:391-6.
22. Nana S, Soeharti G. Radioterapi sebagai modalitas pengobatan penyakit kanker. Majalah Kedokteran Indonesia.1996. 46.
23. Suhartati G. Terapi Radiasi dalam penanganan penyakit keganasan. Kursus Penyegaran ke-V & lokakarya Pencegahan dan deteksi dini penyakit keganasan. FKUI Jakarta. 1999.
24. Mc. Milan TJ, Steel GG. DNA damage and cell killing. In : Basic clinical radiobiology ed. Steel GG. second edition. Oxford University Press Inc. 1997; p:58-69.
25. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd edition. Oxford. Clarendon Press. 1987. p;20-64
26. Susworo. Kombinasi radiasi eksterna dan intrakaviter (alternatif pengobatan karsinoma nasofaring yang responsif terhadap radiasi). Disertasi. FKUI Jakarta. 1990.
27. Nana S. Radioterapi KNF. PIT-PERHATI. Seminar kanker NF. Medan. 2001.
28. Prasad U, Wahid MIA, Jalaludin MA, et al. Long-term survival of nasopharyngeal carcinoma patient treated with adjuvant chemotherapy subsequent to conventional radical radiotherapy. Int J. Radiol Oncol Biol Phys. 2002. 52.
29. Hunt MA, Michael MS, Zelefsky J, Wolden S, et al. Treatment planning and delivery of intensity - modulated radiation therapy for primary nasopharynx cancer. Int. J. Radiation oncology biology. 2001. 49.

30. Tsukuda M, Sawaki S, Yanoma S, Supressed Cellular Immunity in patients with nasopharyngeal carcinoma. *J. Cancer clinical oncology*. 1993. 120.
31. Boag. The time scale of effect in radiation biology. In : Steel GG. *Basic clinical radiobiology*. 2nd edition. London. Oxford university press. 1975; p:3-4.
32. Maity A, McKenna G, Muschel RJ. The molecular basic for cell cycle delays following ionizing radiation : a review. *Radiotherapy and oncology*. 1994. 31.
33. Richtsmesmeir WJ, Scher RL. Immunology of head and neck cancer. In : Bailey BJ. ed. *Head and neck surgery - otolaryngology*. Philadelphia. Lippincott company. 1993; p:1050-60.
34. Feldmann HJ, Jund R. Wollenberg BW, Stadler P, Molls M. Changes in head and neck tumor hypoxic fraction during split course radiochemotherapy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1999. 108.
35. Wei WI, Sham JST. Cancer of the nasopharynx. In : Mayes EN, Suen JY eds. *Cancer of the head and neck*. Third edition. WB Saunders company. Philadelphia-London- Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo. 1996; p:277-293.
36. Kentjono WA. Pengaruh vaksinasi BCG dalam meningkatkan respon T Helper 1 (Th 1) dan respons tumor terhadap radiasi pada Karsinoma nasofaring. Disertasi Universitas Airlangga Surabaya. 2001.
37. Coleman CN. Beneficial liesions : radiobiology meets cellular and molecular biology. *Radiotherapy and oncology*. 1993. 28.
38. Pillai SP, Mitscher LA, Menon SR, et.al. Antimutagenik / antioxidant activity of green tea components and related compounds. *J. Environ Pathol Toxicology Oncology*. 1999. 18.
39. Muchtar H, Wang HY, Katiyar SK, Agarwala R. Tea Components : antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Previous Medical*. 1992. 21.

40. Joiner MC. Models of radiation cell killing. In : Basic clinical radiobiology. Oxford University Press, INC. Second edition. 1997; p:52-7.
41. Chang EH, Yang YL, Hao Z, Murphy G. Restoration of the G1 checkpoint and the apoptotic pathway mediated by wild type p53 sensitizes squamous cell carcinoma of head and neck radiotherapy. Arch otolaryngol head and neck surg. 1997. 123.
42. Wolf GT, Schmaltz S, Hudson J, Robson H. Alterations in T-lymphocyte subpopulations in patients with head and neck cancer. Arch otolaryngol. Head and neck surg. 1987. 113.
43. Rabben M, Walach N, Galili U, Schlesinger M. The effect radiation therapy on lymphocyte subpopulation in cancer patients. Cancer. 1976.
44. Baxevanis CN, Reclos GJ, Gritzapis AD, Dedoudid GVZ. Elevated Prostaglandin E2 Production by Monocytes Is Responsible for the Depressed Levels of Natural Killer and Lymphokine-Activated Killer Cell Function in Patients with Breast Cancer. Cancer. 1993. 72.
45. Parks R, Shi Du Yan, Cheng - Chun Huang. Tumor Necrosis Factor alpha production in human head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope. 1994. 104.
46. Agroyannis B, Kouvaris J, Tzanatos H, et al. Influence of radiation treatment on serum transferrin and tumor necrosis factor α . Anticancer Res. 1992.
47. Fajun Y, Willem J.S, et al. Green tea polyphenol block endotoxin - induced TNF production and lethality in a murine model. American society for Nutritional sciences. 1998.
48. Choi JH, Chang HW, Rhee SJ. Effect of green tea catechin on arachidonic acid cascade in chronic cadmium-poisoned rats. Asia Pasific J. Clinic Nutrition. 1994. 1.

49. Grana ML, Gomez JJ. Tumour necrosis factor : genetics, cell action mekanism and involvement in inflammation. *Alergol Immunol Clinic*. 2001. 16.
50. Wang ZY, Huang MT, Lou YR, et al. Inhibitory effect of black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin cardinogenesis in 7, 12- dimethylbenz(a) anthracene - initiated SKH-1 mice. *Cancer*. 1994. 54.
51. Abbas AK, Lichtman AH. Immunity to tumours. In : *Cellular and Molecular Immunology*. WB Saunders Co, ed. 5th edition. Philadelphia. 2003; p:391-410.
52. Roitt IM. Imunologi tumor. In : *Imunologi Essential Immunology*. Widya Medika. Jakarta. 8th edition. 1994; p:342-61.
53. Moyers SB, Kumar NB. Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiples mechanisms and endpoints for phase II trials. *Nutrition Review*. 2004. 62.
54. Kawai K, Tsuno N H, Kitayama J, Okaji Y. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, bind to CD4 and interferes with gp 120 binding. *J. Allergy Clin Immunol*. 2003. 112.
55. Robb CS, Brown PR. Catechin in Tea : Chemistry and Analysis. In : Brown PR, Grushka E. ed. *Advances in Chromatography*. Marcel Deker. 2001. p;379-90.
56. Higdon JV, Frei B. Tea cathechins and polyphenols: Health effects, metabolism and antioxidant functions. In: *Critical reviews in food science and nutrition*. Corvalis. CRC Press LLC. 2003. 43.
57. Erba D, Riso P, Colombo A, Testolin G. Supplementation of Jurkat T Cells with Green Tea Extract Decreases Oidative Damage Due o Iron Treatment. 1999. 129.
58. Silalahi J. Senyawa polifenol sebagai komponen aktif yang berkhasiat dalam teh. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 2002. 52.

59. Chow HHS, Cai Y, Alberts DS, Hakim I. Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2001. 53-8
60. Ahmad N, Feyes D K, Nieminen AL, Agarwal R. Green Tea Constituent Epigallocatechin-3-gallate and Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Carcinoma cells. *J. Natl Cancer Ins*. 1997. 89.
61. Uchida S, Ozaki M, Suzuki K. Radioprotective effects of epigallocatechin 3-O-gallate (green tea tanin) in mice. *Life Science*. 1992. 50.
62. Steel VE, Kellof GJ, Balentine D, Boone CW. Comparative chemopreventive mechanism of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. 2000.
63. Lill G, Voit S, Schror K, Waber AA. Complex effects of green tea catechins on human platelets. *FEBS Lett*. 2003. 546.
64. Soetjpto D. Karsinoma Nasofaring. In : *Tumor telinga hidung tenggorok, diagnosis dan penatalaksanaan*. Jakarta. FKUI. 2003; hal:71-84.
65. Hsu HC, Chen CL, Hsu MM. In : *Pathology of nasopharyngeal carcinoma, proposal of a new histologic classification correlated with prognosis*. *Cancer* 1987. 59.
66. Lanier A, Bender T, Talbot M. Nasopharyngeal carcinoma in Alaskan Eskimos, Indian and Aleuts: A review of cases and study of Epstein-Barr virus, HLA and environmental risk factor. *Cancer* 1980. 46.
67. Bambang SS. WHO classification of the nasopharyngeal carcinoma in north central java. *Asean otolaryngology head and neck surgery journal*. 1997.
68. Afandi Y. Evaluasi hasil radioterapi pada karsinoma nasofaring di lab/UPF THT FK UNPAD/RS Hasan Sadikin Bandung periode 1 Januari 1986 sampai 31 Desember 1989. *Oto Rhino Laringologica Indonesiana* 1992. 22.
69. Brittenden J, Heys SD, Ross J. Natural killer cells and cancer. *Cancer*. 1996.

70. Wang ZY, Huang MT, Lou YR. Inhibitory effects of black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer*. 1994. 54.
71. Wara WM, Philips TL, Wara DW. Immunosuppression following radiation therapy for carcinoma of the nasopharynx. *Cancer*. 1975. 123.
72. Geinitz H, Zimmermann FB, Stoll P. Fatigue, serum cytokine levels and blood cell counts during radiotherapy of patients with breast cancer. *Int J. Radiation Oncology Biol. Phys* 2001. 51.
73. Schmitz A, Bayer J, Dechamps N. Intrinsic susceptibility to radiation-Induced apoptosis of human lymphocyte subpopulation. *Int. J. Radiation Oncology Biol*. 2003. 57.
74. Bratawidjaja KG. Immunologi neuro endokrin kanker. In : *Imunologi dasar*. 6th ed. Jakarta. FKUI. 2004. p.249-70.
75. Mizutami H, Engleman RW, Kurata Y, et al. *J Nutrition*. 1994. 124.