



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

**LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN  
KARYA TULIS ILMIAH**

**Diajukan sebagai syarat untuk memenuhi sebagian persyaratan guna  
mencapai  
Strata-1 Kedokteran Umum**

**IRWAN NURYADIN  
G2A008099**

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

**LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN HASIL KTI**

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

Disusun oleh:

**IRWAN NURYADIN  
G2A008099**

Telah disetujui

Semarang, 1 Agustus 2012

Penguji

Pembimbing

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

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

Ketua penguji

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

## **PERNYATAAN KEASLIAN**

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Irwan Nuryadin

NIM : G2A008099

Program Studi : Program Pendidikan Sarjana Program Studi Pendidikan  
Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Judul KTI : Profil Imunopositivitas Protein EBV pada Pasien Karsinoma  
Nasofaring dan Individu Sehat Berisiko

Dengan ini menyatakan:

- 1) KTI ini ditulis sendiri tulisan asli saya sendiri tanpa bantuan orang lain selain pembimbing dan narasumber yang diketahui oleh pembimbing
- 2) KTI ini sebagian atau seluruhnya belum pernah dipublikasikan dalam bentuk artikel ataupun tugas ilmiah lain di Universitas Diponegoro maupun di perguruan tinggi lain
- 3) Dalam KTI ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis orang lain kecuali secara tertulis dicantumkan sebagai rujukan dalam naskah dan tercantum pada daftar kepustakaan.

Semarang, 1 Agustus 2012

Yang membuat pernyataan,

Irwan Nuryadin

## **KATA PENGANTAR**

Puji syukur kehadiran Allah Subhanahu wa Ta'ala, karena atas karuniaNya, Karya Tulis Ilmiah ini dapat selesai tepat waktu. Penulisan karya tulis ilmiah ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penulis menyadari sangatlah sulit untuk dapat menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini tanpa bimbingan dari berbagai pihak sejak penyusunan proposal hingga laporan hasil Karya Tulis Ilmiah ini selesai.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan kepada:

1. Rektor Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk belajar, meningkatkan ilmu pengetahuan dan keahlian.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan keahlian.
3. dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL, dosen pembimbing karya tulis ilmiah yang sangat membantu dan membimbing penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini.
4. Orang tua beserta keluarga kami yang senantiasa memberikan dukungan moral dan material.
5. Para sahabat yang selalu memberikan dukungan dalam menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini.
6. Semua pihak yang telah berjasa selama penelitian ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Akhirnya, semoga Tuhan Yang Maha Esa senantiasa memberikan berkat yang berlimpah bagi kita semua. Semoga Karya Tulis Ilmiah ini bermanfaat.

Semarang, 1 Agustus 2012

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR SINGKATAN .....	xi
ABSTRAK .....	xii
<i>ABSTRACT</i> .....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar belakang.....	1
1.2. Permasalahan penelitian.....	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.....	7
2.1. Definisi karsinoma nasofaring.....	7
2.2. Faktor risiko karsinoma nasofaring .....	8
2.2.1 Genetik .....	8
2.2.1 Infeksi EBV .....	9
2.2.1 Diet.....	9
2.2.1 Lingkungan.....	10
2.3. Gambaran infeksi EBV .....	10
2.3.1 Infeksi Laten.....	11
2.3.2 Infeksi Litik.....	13

2.3.3 Protein yang diuji dengan <i>immunoblot</i> .....	15
BAB 3. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS....	17
3.1. Kerangka teori .....	17
3.2. Kerangka konsep .....	18
3.3. Hipotesis.....	18
BAB 4. METODE PENELITIAN .....	19
4.1. Ruang lingkup penelitian .....	19
4.2. Tempat dan waktu penelitian .....	19
4.3. Jenis dan rancangan penelitian.....	19
4.4. Populasi dan sampel .....	19
4.4.1 Populasi target.....	19
4.4.2 Populasi terjangkau.....	19
4.4.3 Sampel.....	19
4.4.3.1 Kriteria inklusi .....	19
4.4.3.2 Kriteria eksklusi.....	20
4.4.4 Cara sampling.....	20
4.4.5 Besar sampel .....	20
4.5. Variabel penelitian.....	21
4.5.1 Variabel bebas .....	21
4.5.2 Variabel tergantung .....	21
4.6. Definisi operasional variabel.....	22
4.7. Cara pengumpulan data.....	23
4.7.1 Bahan .....	23
4.7.2 Alat .....	23
4.7.3 Jenis data.....	24
4.7.4 Cara kerja .....	24
4.8. Alur penelitian.....	27
4.9. Analisis data.....	28
4.10. Etika penelitian.....	28
4.11. Jadwal penelitian .....	29
BAB 5. HASIL PENELITIAN.....	30

5.1	Distribusi frekuensi subyek penelitian.....	30
5.2	Uji hipotesis penelitian .....	32
BAB 6. PEMBAHASAN.....		34
BAB 7. SIMPULAN DAN SARAN.....		38
7.1	Simpulan .....	38
7.2	Saran .....	38
DAFTAR PUSTAKA.....		39
LAMPIRAN.....		44

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Keaslian penelitian .....	4
Tabel 2. Contoh protein fase laten infeksi EBV .....	11
Tabel 3. Contoh protein fase litik infeksi EBV .....	14
Tabel 4. Definisi operasional variabel .....	22
Tabel 5. Jadwal Penelitian.....	29
Tabel 6. Distribusi penderita menurut kelompok umur .....	31
Tabel 7. Distribusi faktor risiko.....	31
Tabel 8. Perbedaan imunopositivitas protein EBV .....	33

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka Teori.....	17
Gambar 2. Kerangka Konsep .....	18
Gambar 3. Alur Penelitian.....	27

## DAFTAR SINGKATAN

EBV	: <i>Epstein Barr Virus</i>
KNF	: Karsinoma Nasofaring
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EBNA	: <i>Epstein-Barr Nuclear Antigen</i>
VCA	: <i>Viral Capsid Antigen</i>
EA	: <i>Early Antigen</i>
IgA	: <i>Imunoglobulin A</i>
IgG	: <i>Imunoglobulin G</i>
DNA	: <i>Deoxy nucleic acid</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
OR	: <i>Odd Ratio</i>
LMP	: <i>Latent Membrane Protein</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
ZEBRA	: <i>Z Epstein-Barr replication activator</i>
TK	: <i>Thymidine kinase</i>

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

Irwan Nuryadin<sup>1</sup>, Awal Prasetyo<sup>2</sup>, Dewi Kartikawati Paramita<sup>3</sup>

**ABSTRAK**

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

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

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

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

ZEBRA( $p=0.140$ ) , EBNA1 ( $p=0.540$ ), TK( $p=0.713$ ), dan DNAse ( $p=0.740$ )

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

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

<sup>1</sup> Mahasiswa program pendidikan S-1 kedokteran umum FK Undip

<sup>2</sup> Staf pengajar Bagian Patologi Anatomi FK Undip

<sup>3</sup> Staf pengajar Bagian Histologi dan Biologi Sel FK UGM

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

*Irwan Nuryadin<sup>1</sup>, Awal Prasetyo<sup>2</sup>, Dewi Kartikawati Paramita<sup>3</sup>*

**ABSTRACT**

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

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

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

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

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

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

- <sup>1.</sup> Student of faculty of medicine Diponegoro University
- <sup>2.</sup> Teaching staff of Pathological Anatomy Department of faculty of medicine Diponegoro University
- <sup>3.</sup> Teaching staff of Histology and Cell Biology Department of faculty of medicine Gajah Mada University

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang Masalah**

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

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

Dewasa ini diketahui bahwa KNF tipe III WHO 100 % berhubungan dengan infeksi EBV. Dibandingkan dengan orang normal, pembawa, dan pasien keganasan kepala leher lain, pasien KNF memiliki antibodi anti-EBV spektrum lebar dalam kadar lebih tinggi. Penelitian di Cina dan Taiwan menunjukkan serologi IgA dapat diaplikasikan untuk skrining dalam suatu populasi. Meski penelitian ini masih menggunakan teknik serologi yang kurang terstandarisasi, penelitian ini berhasil menunjukkan abnormalitas serologi berupa respon positif IgA EBV 2-3 tahun sejak awitan KNF.<sup>4</sup> Hal ini bisa diaplikasikan untuk skrining pada populasi berisiko tinggi seperti keluarga pasien KNF dan pasien yang memiliki keluhan di sekitar kepala leher.

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

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

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

## **1.2 Permasalahan Penelitian**

Apakah terdapat perbedaan imunopositivitas protein EBV antara penderita KNF dengan individu sehat berisiko ?

## **1.3 Tujuan**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan imunopositivitas protein EBV antara penderita KNF dengan individu sehat berisiko.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Mengetahui perbedaan imunopositivitas protein VCA-p18, ZEBRA, VCA-p40, EA-p47/54, DNase, TK, dan EBNA1 EBV pada penderita KNF dan individu sehat berisiko.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan;

- 1) Bagi ilmu pengetahuan, sebagai sumbangan untuk memperkaya pengetahuan tentang KNF, khususnya dalam kaitannya dengan faktor risiko.
- 2) Bagi dunia kedokteran, dapat menjadi salah satu metode skrining dini KNF.
- 3) Bagi masyarakat khususnya keluarga pasien KNF, agar dapat memahami dan mewaspadai faktor risiko KNF.

## 1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1. Keaslian penelitian

No.	Peneliti	Judul	Metode	Hasil
1	Margi Yati Soewito dkk, 2011 <sup>1</sup>	Respons Antibodi IgA terhadap EBV pada Keluarga KNF	Penelitian <i>cross sectional</i> dengan subjek keluarga penderita KNF. Variabel : Kadar IgA (VCA-p18+EBNA1)	Kadar antibodi terhadap EBV pada populasi keluarga penderita KNF lebih tinggi daripada populasi kontrol .
2	Dewi K. Paramita, dkk, 2009 <sup>7</sup>	<i>Two-Step Epstein-Barr Virus Immunoglobulin A Enzyme-Linked Immunosorbent Assay System for Serological Screening and Confirmation of Nasopharyngeal Carcinoma</i>	Penelitian <i>cross sectional</i> pada penderita KNF. Variabel: kadar IgA (VCA-p18+EBNA1) dan IgA <i>early antigen</i> (EA)	Pemeriksaan ELISA EBV dua tahap dapat memberikan nilai dignostik yang handal untuk KNF di daerah dengan prevalensi EBV tinggi.

Tabel 1. Keaslian penelitian (Lanjutan)

No.	Peneliti	Judul	Metode	Hasil
3	Wan-Lun Hsu,dkk 2010 <sup>4</sup>	<i>Familial Tendency and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma in Taiwan: Effects of Covariates on Risk</i>	Penelitian cohort dengan subjek keluarga penderita KNF. Variabel tergantung <i>seromarkers</i> anti-Epstein-Barr virus (EBV) Variabel bebas : riwayat keluarga	Riwayat keluarga dan seropositivitas anti-EBV merupakan determinasi penting untuk menentukan risiko KNF.
4	Fachiroh dkk, 2004 <sup>6</sup>	<i>Molecular Diversity of Epstein-Barr Virus IgG and IgA Antibody Responses in Nasopharyngeal Carcinoma: A Comparison of Indonesian, Chinese, and European Subjects</i>	Penelitian <i>cross sectional</i> pada penderita KNF. Variabel bebas : EBNA-1, VCA, EA. Variabel tergantung : respon IgG dan IgA	Perbedaan gambaran <i>immunoblot</i> EBV mempunyai nilai yang signifikan untuk membedakan KNF dan non- KNF

Tabel 1. Keaslian penelitian (Lanjutan)

No.	Peneliti	Judul	Metode	Hasil
5	Nikakhlagh, 2010 <sup>7</sup>	<i>The Association Between Epstein-Barr Virus with Nasopharyngeal Carcinoma in Patients from Southwestern Region of Iran</i>	Penelitian <i>case control</i> pada penderita KNF dan kontrol. Variabel bebas: Riwayat keluarga Variabel tergantung: antibodi EBV.	Tidak ada perbedaan antibodi EBV yang signifikan antara pasien dengan kontrol

Penelitian mengenai perbedaan profil imunopositivitas protein EBV sudah pernah dilakukan sebelumnya. Perbedaan penelitian ini dengan penelitian-penelitian sebelumnya adalah protein-protein EBV yang diteliti pada penelitian-penelitian sebelumnya lebih banyak meneliti tentang respon imun penderita KNF terhadap protein EBNA1 dan VCA-p18, sedangkan pada penelitian ini protein yang diteliti yaitu VCA-p18, VCA-p40, EA-p47/54, ZEBRA, EBNA1, TK, dan DNAse. Penelitian ini adalah penelitian observasional laboratorik yang menggunakan sampel darah penderita KNF dan individu sehat berisiko.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Definisi Karsinoma Nasofaring**

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan tumor ganas yang berasal dari epitel nasofaring. Lesi awal keganasannya terletak pada fossa Rosenmuller. Tumor juga dapat dijumpai pada dinding lateral di depan tuba Eustachius, di atap nasofaring dan di daerah tuba Eustachius sendiri. *World Health Organization* (WHO) membagi KNF atas tiga tipe. Tipe 1 WHO yaitu karsinoma sel skuamosa dengan keratinisasi, tipe 2 WHO yaitu KNF tanpa keratinisasi dan tipe 3 WHO yaitu KNF tanpa diferensiasi. KNF merupakan penyakit multifaktorial. Penelitian yang baru-baru ini dilakukan menunjukkan KNF tipe 3 WHO 100 % berhubungan dengan infeksi EBV.<sup>4</sup>

KNF jarang terjadi di beberapa daerah tertentu, sebagai contoh di Eropa atau Amerika Utara dimana prevalensi KNF hanya 1 per 100.000 penduduk tetapi di beberapa negara lain KNF memiliki perbedaan prevalensi yang cukup mencolok. Sebagai contoh di propinsi Guang Dong, China Selatan ditemukan kasus KNF tertinggi yaitu 2.500 kasus baru per tahun atau dengan prevalensi 39,84/100.000 penduduk. Di Indonesia sendiri angka kejadiannya sekitar 4,7 kasus baru/100.000 penduduk per tahun.<sup>2</sup> Keunikan prevalensi inilah yang melatarbelakangi pemikiran adanya keterkaitan KNF dengan faktor risiko tertentu. Dewasa ini etiologi dan faktor risiko KNF masih terus diteliti. Penelitian dewasa ini

menunjukkan bahwa KNF berhubungan erat dengan EBV yang merupakan salah satu jenis herpes virus yang menyebabkan infeksi asimtomatis pada lebih dari 90% populasi dunia.<sup>3</sup>

## **2.2 Faktor Risiko KNF**

KNF merupakan penyakit multifaktorial dan belum diketahui secara pasti penyebabnya. Beberapa faktor risiko yang kini masih diteliti di antaranya: faktor genetik, infeksi Epstein-Barr virus, diet, dan lingkungan.<sup>3</sup>

### **2.2.1 Genetik**

KNF tercatat sebagai keganasan yang jarang terjadi di sebagian besar populasi dunia. Namun, keganasan ini tercatat sering terjadi di Cina selatan, Asia Tenggara, Kutub Utara, dan Timur Tengah / Afrika Utara. Distribusi ras / etnis dan geografis khas pada KNF di seluruh dunia menunjukkan bahwa faktor lingkungan dan sifat-sifat genetik berkontribusi untuk perkembangan keganasan ini.<sup>9</sup> KNF cenderung teragregasi dalam suatu keluarga pada penelitian di Canton, Provinsi Guangdong, Cina, dengan tidak ada peningkatan pada keganasan lain.<sup>10</sup> Pada penelitian lain di China KNF HLA (*human leukocyte antigen*) dikaitkan dengan KNF. Keberadaan gen Cina Selatan yang spesifik terkait erat dengan daerah HLA sebagai penentu utama risiko Cina untuk penyakit ini.<sup>11</sup> Risiko relatif KNF pada generasi pertama dari penderita KNF adalah 8.0 pada 766 subyek penelitian yang dilakukan di Taiwan. Tendensi familial KNF bisa disebabkan karena faktor genetik dan/atau faktor risiko lingkungan.<sup>4</sup>

### 2.2.2 Infeksi EBV

EBV merupakan virus dsDNA yang memiliki kapsid icosahedral dan termasuk dalam famili Herpesviridae. Infeksi EBV dapat berasosiasi dengan beberapa penyakit seperti limfoma Burkitt, limfoma sel T, mononukleosis dan KNF.<sup>12</sup> KNF tidak berdiferensiasi atau WHO tipe III 100% terkait dengan EBV.<sup>7</sup> Hal ini didukung oleh temuan bahwa reseptor EBV terdapat pada sel epitel di faring, dan bahwa virus mampu menginfeksi sel epitel nasofaring *in vivo*.<sup>13</sup> KNF adalah penyakit yang konsisten dengan infeksi EBV sehingga eksistensi DNA-EBV di dalam cairan tubuh dapat dipakai sebagai penanda status patologi KNF dan/atau progresivitas tumor.<sup>14</sup> Dalam penelitian ini penulis akan mengaitkan serologi EBV yang ditunjukkan dengan ekspresi protein EBV dengan faktor risiko lain yang terdapat pada individu berisiko.

### 2.2.3 Diet

Beberapa penelitian menyajikan hubungan antara diet tertentu dengan risiko KNF. Analisis sampel makanan yang menunjukkan adanya nitrosamin dan prekursor nitrosamine dalam ikan asin, menunjukkan hubungan antara konsumsi ikan asin dengan KNF. Konsumsi banyak makanan olahan dan diawetkan pada usia muda dikaitkan dengan KNF.<sup>15</sup> Konsumsi ikan asin yang dicampurkan di bubur beras sebelum usia 2 tahun memiliki OR = 3,8 p (nilai kemaknaan) = 0,005, konsumsi teh herbal memiliki OR = 4,2, p (nilai kemaknaan) = 0,02 ditemukan secara independen terkait dengan risiko KNF.<sup>16</sup> Penelitian lain menunjukkan bahwa konsumsi mentega tengik, lemak dan daging domba tengik yang diawetkan (quaddid) di Afrika, dikaitkan dengan peningkatan risiko KNF yang signifikan,

sementara konsumsi sayuran matang dan ikan yang diawetkan secara industri dikaitkan dengan penurunan risiko. Dalam analisis multivariat, hanya mentega tengik, sayuran lemak domba tengik yang secara signifikan terkait dengan KNF. Dalam kaitan dengan zat penyebab yang mungkin, dinyatakan bahwa terdapat keterlibatan asam butirat, yang merupakan aktivator potensial EBV.<sup>17</sup>

#### 2.2.4 Lingkungan

Konsumsi alkohol, merokok, penggunaan tembakau, paparan zat kimia memiliki keterkaitan dengan risiko KNF. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa alkohol atau shisha (pipa air) dikaitkan dengan risiko. Tembakau, ganja dan asap kayu bakar adalah faktor risiko untuk KNF di barat Afrika Utara.<sup>18</sup> Penelitian lainnya menyatakan keterkaitan antara merokok dan KNF, semakin lama dan lebih berat kebiasaan merokok, semakin tinggi adalah risiko KNF.<sup>19</sup>

### 2.3 Gambaran Infeksi EBV

Terdapat dua fase infeksi EBV yaitu litik dan laten. EBV menginfeksi sel epitel di orofaring dan *rest* sel limfosit B. Infeksi yang terjadi di sel epitel dalam fase litik menghasilkan replikasi virus dan pelepasan virion dari sel. Sebaliknya infeksi primer sel B biasanya menghasilkan infeksi laten dengan ekspresi 8 protein tanpa produksi virion. Latensi dari sel B terinfeksi ini dinamakan sel limfoblastoid yang bertransformasi atau immortal dan bereplikasi tanpa batas.<sup>20</sup>

#### 2.3.1 Infeksi Laten

Infeksi primer sel B biasanya menghasilkan infeksi laten dengan ekspresi 8 protein tanpa produksi virion. Pada infeksi laten, hanya sedikit dari hampir 100

gen EBV yang diekspresikan. Gen-gen laten tersebut yakni 6 EBNA, 2 LMP, 2 Eber, dan transkrip dari BamHI A region dari genom. Hanya EBNA-1 dan LMP1 yang juga terekspresi pada fase litik. Penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa 5 dari gen-gen di atas penting untuk transformasi sel B.<sup>20</sup>

Tabel 2. Contoh Protein fase laten infeksi EBV<sup>20</sup>

Protein	Dibutuhkan untuk transformasi	Fungsi
EBNA-1	Ya	<i>Maintenance episomal</i> , Upregulasi gen virus
EBNA-2	Ya	Upregulasi gen virus dan seluler
EBNA-3	A,C ya, B tidak	Menghambat aktivitas EBNA-2, upregulasi gen seluler
EBNA-LP	Mungkin	Augmentasi aktivitas EBNA-2
LMP1	Ya	Signaling CD40, c-jun terminase kinase, upregulasi multiple gen seluler, onkogen
LMP2	Tidak	Mencegah reaktivasi EBV dari latensi

Singkatan : EBNA (*Epstein-Barr nuclear antigen*); EBNA-LP, (*Epstein-Barr nuclear antigen leader protein*); LMP, (*latent membrane protein*).

#### 2.3.1.1 EBNA-1

EBNA-1 diekspresikan selama infeksi laten dan litik dan selalu terlibat dalam semua infeksi EBV terkait keganasan. EBNA-1 sangat penting untuk

transformasi sel-B oleh infeksi EBV. EBNA-1 berisi glisin-alanin *repeat region* yang berperan sebagai *cis* yang menghambat degradasi protein jalur *ubiquitin-proteosomal*. Jalur ini penting dalam proses pembelahan protein menjadi peptida kecil untuk mempresentasikan molekul MHC (*major histocompatibility complex*) kelas I pada T-sel sitotoksik. Kemampuan EBNA-1 untuk menghambat degradasi inilah yang menjadi dasar pemikiran kemungkinan sel mengekspresikan protein untuk menghindari perusakan oleh T-sel sitotoksik terbatas kelas I. Transfer glisin-alanin yang terulang untuk protein lain memungkinkan protein lain menghindari degradasi di proteosom.<sup>20</sup>

#### 2.3.1.2 EBNA2

EBNA-2 diperlukan untuk transformasi sel B oleh EBV. EBNA-2 berperan sebagai upregulator ekspresi protein virus dan seluler. EBNA-2 juga merangsang ekspresi LMP1 dan LMP2. EBNA-2 meregulasi ekspresi CD21 (*cluster of differentiation*), CD23, c-FGR, dan c-myc. CD21 adalah reseptor dan CD23 akan diekspresikan pada permukaan sel B yang telah bertransformasi karena EBV. Bentuk terlarut dari CD23 berperan sebagai faktor pertumbuhan pada sel yang terinfeksi EBV dan CD23 akan berperan sebagai stimulator autokrin pertumbuhan sel, c-FGR yang merupakan tirosin kinase penting untuk pertumbuhan sel B dan disregulasi c-myc berhubungan dengan proliferasi sel B yang tidak terkendali.<sup>20</sup>

#### 2.3.1.3 EBNA-3A,3B,3C

Ada 3 jenis protein EBNA-3 : EBNA-3A, EBNA-3B, dan EBNA-3C yang hadir bersama-sama dalam genus virus. Protein EBNA-3 meng-upregulasikan

ekspresi gen seluler dan virus. EBNA-3C meningkatkan ekspresi CD21 dan LMP-1, dan EBNA-3B meregulasi ekspresi CD40 dan bcl-2( *B-cell lymphoma 2*)<sup>20</sup>

#### 2.3.1.4 LMP-1

LMP-1 terekspresi dalam fase laten maupun litik dari sel-B yang terinfeksi. LMP-1 diperlukan untuk transformasi sel-B yang terinfeksi EBV. LMP-1 berfungsi sebagai onkogen. Pada percobaan tikus transgenik yang mengekspresikan LMP-1 dalam sel-B berkembang menjadi limfoma sel-B. Tikus transgenik yang mengekspresikan LMP-1 di kulit berkembang menjadi hiperplasi epitel dengan meningkatnya ekspresi dari keratin. LMP-1 merupakan analog fungsional dari CD40 yang merupakan anggota reseptor TNF (tumor necrosis factor). LMP-1 memiliki efek antiapoptotik pada sel.<sup>20</sup>

#### 2.3.1.5 LMP-2A, 2B

Fungsi LMP-2 yaitu untuk mencegah reaktivasi EBV dari fase laten sel B yang terinfeksi. Ekspresi LMP-2 pada sel B dari seekor tikus transgenik memberikan kemungkinan bagi sel untuk hidup dalam keadaan absennya sinyal receptor sel B yang normal. Ekspresi LMP-2 di sel epitel menyebabkan transformasi sel tersebut.<sup>20</sup>

### 2.3.2 Infeksi Litik

EBV mengkodekan sekitar 90 protein yang diekspresikan selama replikasi pada fase litik. Infeksi yang terjadi di sel epitel dalam fase litik menghasilkan replikasi virus dan pelepasan virion dari sel. Seperti virus herpes lain protein ini diklasifikasikan menjadi *immediate-early*, *early*, dan *late proteins*. *Immediate-*

*early protein*, yang ditranskripsikan segera paska infeksi dengan adanya penghambat sintesis protein. *Early protein* diekspresikan dengan adanya penghambat sintesis DNA virus, sedangkan *late protein* tidak ditranskripsikan. Secara umum gen *Immediate-early* penting untuk mengatur ekspresi gen dalam virus, *Early protein* mengkodekan enzim yang penting untuk replikasi DNA virus, dan *late protein* mengkodekan protein struktural dari virion.<sup>20</sup>

Tabel 3. Contoh Protein Fase Litik pada Infeksi EBV<sup>20</sup>

Protein	Kelas Ekspresi	Fungsi
BZLF1	IE	Transkripsional aktivator
BRLF1	IE	Transkripsional aktivator
BALF5	E	DNA polymerase
BXLF1	E	Thymidine kinase
BCLF1	L	Viral capsid antigen
gp350	L	Glikoprotein mayor virus
gp85	L	Fusi virus ke limfosit B
gp42	L	Terikat pada molekul MHC kelas II limfosit B

### 2.3.3 Protein yang diuji dengan *immunoblot*

#### 2.2.3.1 VCA-p18

VCA-p18 merupakan *late protein* pada fase litik infeksi EBV. VCA-p18 sering dikombinasikan bersama EBNA1 untuk mendapatkan sensitifitas dan spesifisitas lebih tinggi dalam mendeteksi KNF.<sup>6, 20</sup>

#### 2.2.3.2 ZEBRA

Protein EBV *immediate-early* dikode oleh BZLF1 and BRLF1. BZLF1 juga dinamakan *Z Epstein-Barr replication activator (ZEBRA)*. Pada penelitian terdahulu diketahui bahwa titer antibodi IgG-ZEBRA meningkat seiring dengan perkembangan limfonodi pada kelompok pasien usia muda, yang menunjukkan bahwa hal ini dapat dipakai sebagai alat prognostik pada kelompok usia ini.<sup>6, 20</sup>

#### 2.2.3.3 VCA-p40

VCA-p40 atau BdRF1 merupakan *packaging protein*. Pada penelitian Fachiroh reaktivitas IgA-EBV absen dalam semua sampel kecuali pada kontrol yang bukan pasien KNF, yang menunjukkan reaksi lemah pada rekognisi IgG dan IgA dari Protein EA-p47/54 (BMRF1) and VCA-p40 (BdRF1).<sup>6, 20</sup>

#### 2.2.3.4 EA-p47/54

Disebut juga BMRF1 yang berfungsi dalam replikasi DNA. Pada penelitian Fachiroh reaktivitas IgA-EBV absen dalam semua sampel kecuali pada kontrol yang bukan pasien KNF, yang menunjukkan reaksi lemah pada rekognisi IgG dan IgA dari Protein EA-p47/54 (BMRF1) and VCA-p40 (BdRF1).<sup>6, 20</sup>

#### 2.2.3.5 DNase

p55-DNase atau BGLF5 merupakan enzim Alkaline exonuclease. Pada penelitian Paramita D DNase memberikan sensitifitas 90.4% dan spesifisitas 95.5% untuk diagnosis KNF pada IgG maupun IgA ELISA.<sup>6,20</sup>

#### 2.2.3.6 TK

p65-TK atau BXL1F1 merupakan suatu Thymidine kinase. Pada penelitian Paramita D DNase memberikan sensitifitas 90.4% dan spesifisitas 95.5% untuk diagnosis KNF pada IgG maupun IgA ELISA.<sup>6,20</sup>

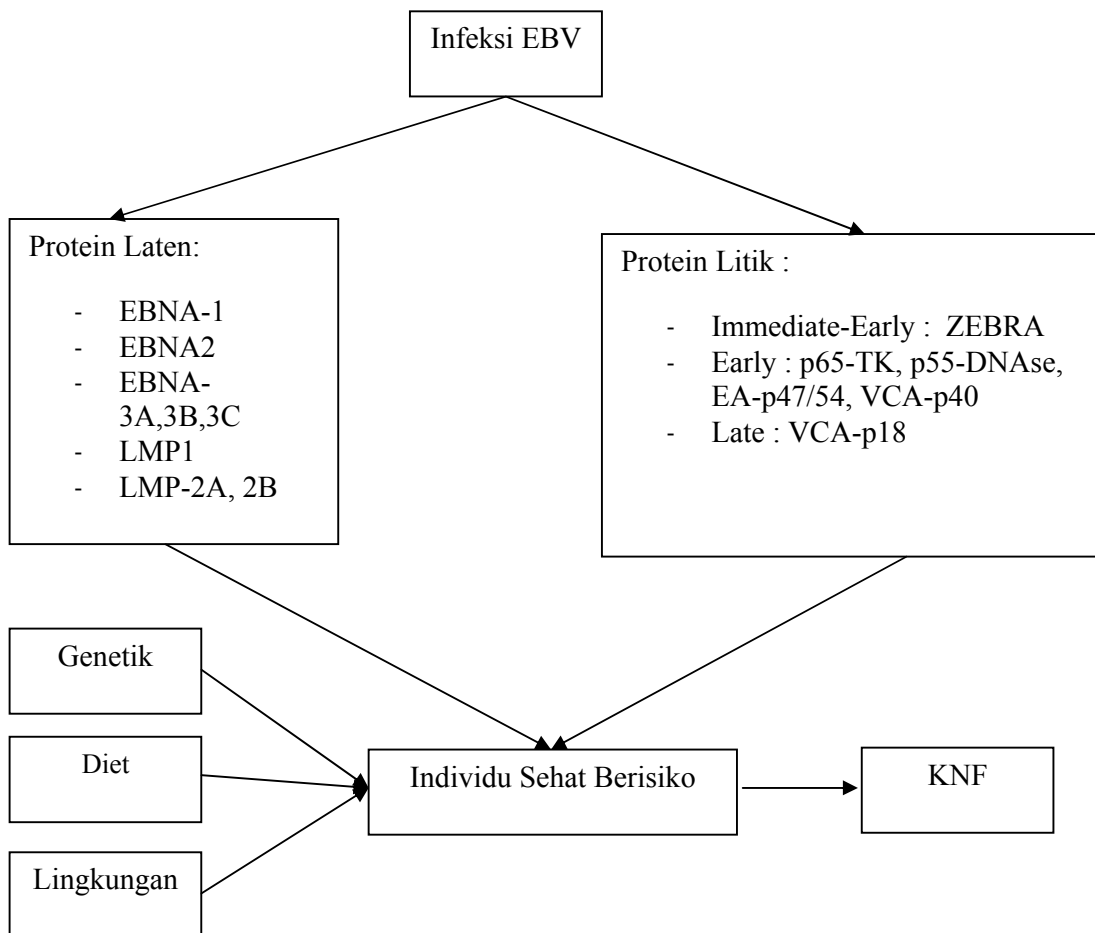
#### 2.2.3.7 EBNA1

EBNA1 adalah protein diekspresikan pada KNF secara konsisten. Pada beberapa penelitian EBNA1 sering dikombinasikan bersama VCA-p18 untuk memperoleh sensitifitas dan spesifisitas lebih tinggi dalam mendeteksi KNF secara dini.<sup>6,20</sup>

### BAB III

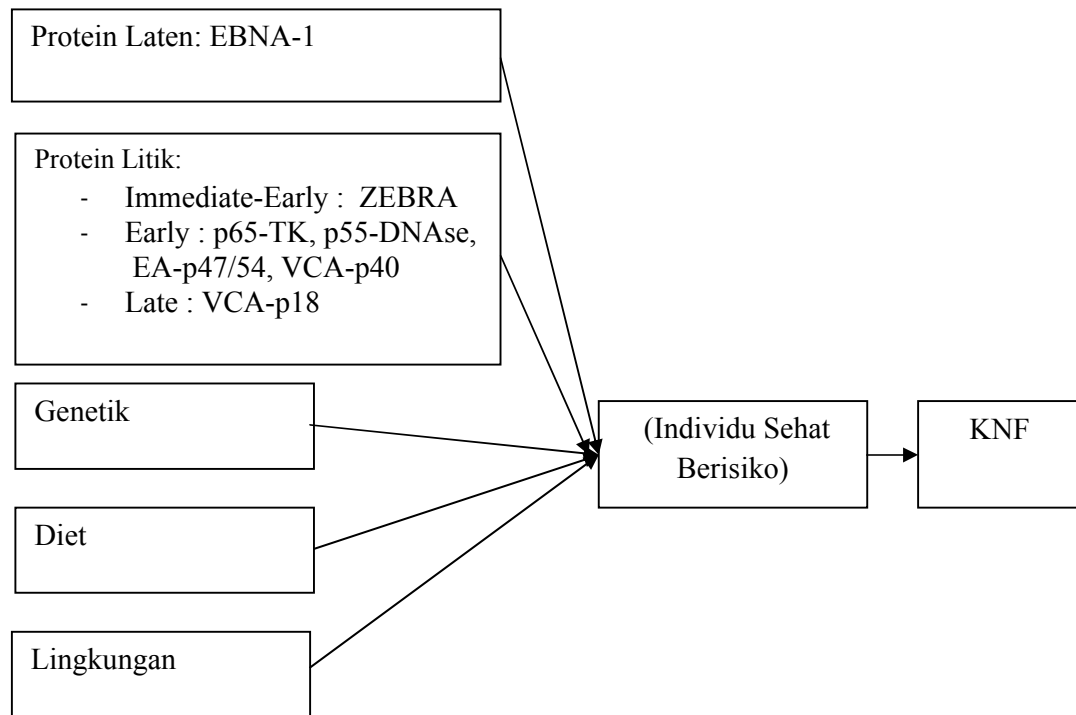
## KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

### 1.1 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka teori

## 1.2 Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka konsep

## 1.3 Hipotesis

Terdapat perbedaan imunopositivitas protein EBV antara penderita KNF dengan individu sehat berisiko.

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Ruang Lingkup Penelitian**

Ruang lingkup disiplin ilmu penelitian ini meliputi bidang ilmu kesehatan THT-KL dan Patologi Anatomi.

#### **4.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Instalasi Rekam Medik Rumah Sakit Umum Pusat Dokter Kariadi, Semarang dan Laboratorium Biologi Molekular FK UGM selama 10 bulan dimulai dari bulan September 2011 sampai Juni 2012.

#### **4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian studi observasional analitik secara *case-control*.

#### **4.4 Populasi dan sampel**

##### 4.4.1 Populasi target

Penderita KNF dan individu sehat berisiko di Semarang dan sekitarnya.

##### 4.4.2 Populasi terjangkau

Penderita KNF dan individu sehat berisiko yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

##### 4.4.3 Sampel

###### 4.4.3.1 Kriteria Inklusi

- 1) Terdiagnosis KNF menurut PA

- 2) Individu sehat berisiko baik keluarga, tetangga penderita KNF tinggal di lingkungan sekitar penderita KNF dan orang normal yang tidak menderita KNF.

#### 4.4.3.2 Kriteria eksklusi

- 1) Penderita KNF dan individu sehat berisiko tidak kooperatif.
- 2) Penderita KNF dan individu sehat berisiko meninggal dunia.

#### 4.4.4 Cara sampling

Cara Pengambilan sampel dilakukan secara *non-random* dengan metode *consecutive*, yaitu mencari sampel yang memenuhi kriteria inklusi sampai jumlah sampel minimal terpenuhi.

#### 4.4.5 Besar sampel

Penentuan besar sampel menggunakan rumus besar sampel untuk penelitian *case control*.

$$n_1 = n_2 = n = \frac{(Z\alpha\sqrt{2PQ} + Z\beta\sqrt{P_1Q_2})^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

Keterangan:

$Z\alpha$  : deviat baku alpha

$Z\beta$  : deviat baku beta

$P_2$  : proporsi pada kelompok standar, tidak berisiko, tidak terpajan atau kontrol

$Q_2$  :  $1 - P_2$

$P_1$  : proporsi pada kelompok uji, berisiko, terpajan atau kasus

$Q_1$  :  $1 - P_1$

$P_1 - P_2$  : selisih proporsi minimal yang dianggap bermakna

$P$  : proporsi total =  $\frac{P_1 + P_2}{2}$

$Q$  :  $1 - P$

Nilai  $Z_{\alpha} = 1,96$  dengan taraf kepercayaan 95%, dan untuk power tes 80% ( $Z_{\beta} = 0,84$ ), dengan  $P_2$  yang didapatkan dari penelitian Nikakhlagh<sup>7</sup> sebesar 0,475 dan penulis mengambil nilai  $P_1 - P_2$  sebesar 20% maka jumlah sampel minimal yang diperoleh adalah 88 orang pada tiap kelompok.

#### **4.5 Variabel penelitian**

##### 4.5.1 Variabel bebas

- Protein Laten: EBNA-1
- Protein Litik:
  - Immediate-Early : ZEBRA
  - Early : EA-p47/54, p65-TK , p55-DNAse , VCA-p40
  - Late : VCA-p18
- Riwayat kanker dalam keluarga
- Konsumsi ikan asin
- Merokok

##### 4.5.2 Variabel tergantung

Karsinoma Nasofaring

#### 4.6 Definisi operasional

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi	Skala
1	Protein Laten: EBNA-1	Protein fase laten yang muncul setelah infeksi EBV diukur dengan teknik <i>immunoblot</i> , imunopositivitasnya dinyatakan dengan negatif, positif lemah, positif dan positif kuat	Ordinal
2	Protein Litik : Immediate-Early : ZEBRA Early : EA-p47/54, p65-TK , p55-DNAse , VCA-p40 Late : VCA-p18	Protein fase litik yang muncul setelah infeksi EBV diukur dengan teknik <i>immunoblot</i> , imunopositivitasnya dinyatakan dengan negatif, positif lemah, positif dan positif kuat	Ordinal
3	Riwayat kanker dalam keluarga	Subyek penelitian ang memiliki hubungan darah dengan penderita kanker	Nominal
4	Konsumsi ikan asin	Konsumsi ikan asin	Nominal

Tabel 4. Definisi Operasional Variabel (Lanjutan)

No.	Variabel	Definisi	Skala
5	Kebiasaan merokok	Mengkonsumsi rokok	Nominal
6	Karsinoma nasofaring	Keganasan pada nasofaring yang didiagnosis berdasarkan biopsi patologi anatomi	Nominal

#### 4.7 Cara pengumpulan data

##### 4.7.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini :

Pengumpulan sampel darah dan *immunoblotting*

- 1) Persiapan sampel : Serum penderita KNF dan keluarga, PBST (*Phosphate-buffered saline with Tween*), PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride*), *etanol absolute* 1:1, larutan buffer.
- 2) Western Blot: membran nitroselulosa, kertas Whatman, BSA (*Bovine Serum Albumin*) 3%, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, Abpo-PAG, PBS *tween*, BSA 1%, antibodi sekunder (Anti Rabbit Anti Ig G *Alkaline Phospatase Conjugated*, pengenceran 1:2500), pewarna *Western Blue*.

##### 4.7.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini:

###### 4.7.2.1 Kuisisioner (terlampir)

#### 4.7.2.2 Alat *Western Blot*

- 1) SDS Page dan *Western Blot* : *Plate gel*, alat elektroforesis, penangas air, *Shaker* (alat penggoyang otomatis), selotip, label, membran nitroselulose (PVDF), *trans blotter Semi Dry Transfer Cell*.
- 2) Isolasi protein EBV : bak penampung, gelas ukur, pipet pasteur, micropipet, sentrifuse, tabung sentrifus, stopwatch, sonikator, tabung Erlenmeyer, pengaduk kaca.

#### 4.7.3 Jenis data

- 1) Data Primer : hasil pemeriksaan *immunoblot* protein EBV penderita KNF dan individu sehat berisiko dan hasil kuesioner.
- 2) Data Sekunder : berupa rekam medik penderita KNF untuk kemudian dicari identitas, nomor telepon, dan hasil biopsi patologi anatominya.

#### 4.7.4 Cara kerja

Dengan data sekunder berupa identitas dan hasil biopsi patologi anatomi penderita KNF diundang dengan surat resmi untuk mengikuti seminar kecil tentang KNF, dalam acara tersebut individu sehat berisiko juga turut diundang, setelah selesai acara peserta yang hadir diminta persetujuannya untuk mengikuti penelitian. Peserta yang bersedia, mengisi *informed consent* dan selanjutnya mengisi kuisisioner serta diambil sampel darahnya.

#### 1) Isolasi Protein

Pengambilan sampel serum dilakukan pada penderita KNF yang telah didiagnosis patologi anatomi dan individu sehat berisiko yang memenuhi kriteria inklusi. Sampel sebanyak 200  $\mu$ l ditambah dengan PBST PMSF sebanyak lima

kali volume sampel (1000  $\mu$ l) dan disonikasi selama 10 menit. Kemudian disentrifuse 6000 rpm selama 15 menit. Endapan yang terjadi dibuang dan supernatannya disonikasi selama 10 menit, setelah itu disentrifus 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan ditambah dengan etanol absolut 1:1 dan dibiarkan sampai terbentuk endapan. Setelah terbentuk endapan, dikeringkan dan hasilnya ditambahkan buffer sesuai dengan pH yang diinginkan.<sup>21</sup>

## 2) Identifikasi protein dengan teknik SDS-PAGE

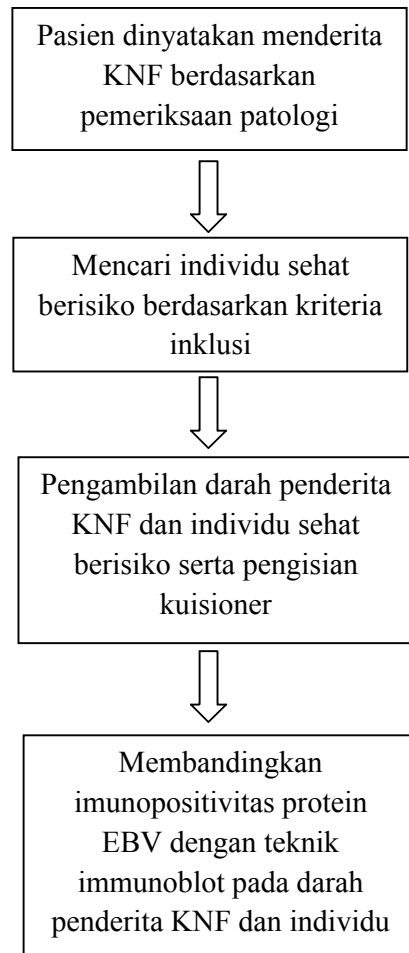
Identifikasi protein dengan teknik SDS-PAGE bertujuan untuk mengetahui gambaran protein PAG yang ditunjukkan dengan terbentuknya *area* (pita-pita dari protein). Tahapan-tahapan yang harus dilakukan adalah mencetak *running gel* dan membuat *separating gel*. Bahan-bahan untuk membuat *running gel* dimasukkan ke dalam gelas *plate* sampai bawah batas atas. Selanjutnya permukaan bagian atas *running gel* diratakan dengan menambahkan aquades. Langkah ini dilanjutkan dengan menambahkan *stacking gel* dalam cetakan *running gel* sampai penuh. *Comb* dimasukkan dalam *stacking gel*, dan di inkubasi selama 25 menit pada suhu kamar sampai memadat. Lalu *comb* dilepas dan dibersihkan dari sisa-sisa gel. Cetakan gel yang telah siap dimasukkan kedalam *chamber* (bak elektroforesis) kemudian direndam dalam *running buffer*. Sampel darah dimasukkan ke dalam lubang sumuran cetakan sebanyak 10 $\mu$ l, selanjutnya Elektrofloresis dialiri arus listrik 600 volt dan kuat arus 30 mA selama 2-3 jam hingga reaksi mencapai dasar *chamber*. Alat di matikan, *plate* dibuka dan dipisahkan. Lembaran gel hasil running diwarnai dengan *commasie blue*, digoyang 30 menit, lalu diangkat dan ditambahkan cairan *Destaining*, lalu

digoyang 30 menit, jika cairan sudah terlihat berwarna biru diganti dengan cairan *destaining* yang baru, begitu seterusnya sampai cairan berwarna putih dan hasil yang berupa *band-band* (pita-pita) Berat Molekul akan dapat terlihat pada cetakan gel SDS-PAGE.<sup>21</sup>

### 3) Identifikasi Protein EBV dari serum dengan Teknik *Western Blot*

Gel hasil elektroforesis dicuci dengan aquades kemudian direndam pada transfer buffer. Selanjutnya disusun sandwich dengan urutan: kertas saring membrane PVDF-gel hasil elektroforesis-kertas saring dan dilakukan transfer dengan *Transbolt Semi Dry Cell* (Bio Rad) selama 1 jam pada 1 Amp pada 4<sup>0</sup>C. *Western blot* dilakukan dengan menggunakan fragmen pita yang telah dirunning dalam SDS-PAGE dalam kondisi tereduksi dan ditransferkan pada membran Nitroselulosa. Membran diblok dengan 3% BSA dalam 20 mM Tris-HCL selama satu jam, selanjutnya diinkubasi dalam Tris NaCl yang mengandung 1% BSA, dengan IgG sebagai antibodi primer. Kemudian dicuci dengan Tris-Cl yang mengandung 0,05% Tween 20. Membran diinkubasi dengan antibodi sekunder (Anti Rabbit Anti Ig G *Alkaline Phospatase Conjugated*, pengenceran 1:2500) dan ditambah substrat *western blue* (dalam ruangan gelap) sampai terlihat warna band atau selama semalaman. Selanjutnya dicuci dengan aquades (stop reaksi). Berdasarkan hasil karakterisasi, pita-pita protein EBV yang muncul dari pemeriksaan dengan metode SDS-PAGE akan dibandingkan dengan marker untuk menilai protein protein apa yang dinilai positif.<sup>21</sup>

#### 4.8 Alur penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian

#### **4.9 Analisis data**

Data dikelompokkan berdasarkan variabelnya dalam skala ordinal dan nominal. Uji hipotesis menggunakan Uji Mann-Whitney. Data diolah dengan menggunakan perangkat lunak komputer SPSS.

#### **4.10 Etika penelitian**

Penelitian telah dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr Kariadi Semarang. Persetujuan subyek penelitian dalam bentuk *informed consent* tertulis. Seluruh pasien calon subyek penelitian diberi penjelasan tentang tujuan, manfaat, dan prosedur penelitian. Pasien berhak menolak untuk diikutsertakan dalam penelitian. Identitas subyek penelitian dirahasiakan dan tidak dipublikasikan tanpa seijin subyek penelitian. Seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian ditanggung oleh peneliti. Subyek penelitian diberi imbalan sesuai dengan kemampuan peneliti.



## **BAB V**

### **HASIL PENELITIAN**

Penderita KNF dan individu sehat berisiko diundang untuk mengikuti seminar kecil dan penelitian sebanyak 226 melalui surat undangan, peserta yang hadir sebanyak 22 orang kemudian dimintakan *informed consent*, mengisi kuesioner dan diambil sampel darahnya, kemudian untuk mencari calon subyek lain penulis menghubungi nomor telepon penderita KNF untuk dimintakan kesediaannya mengikuti penelitian, dengan cara ini berhasil didapatkan 2 subyek penelitian kemudian untuk menambah jumlah sampel penelitian penulis menggunakan sampel darah yang sebelumnya telah dikumpulkan oleh dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL sebanyak 16 sampel. Total subyek penelitian yang berhasil dikumpulkan sebanyak 40 subyek yang terdiri dari 20 penderita KNF dan 20 individu sehat berisiko.

#### **5.1 Distribusi frekuensi subyek penelitian**

##### **5.1.1 Distribusi kelompok umur dan jenis kelamin (karakteristik penderita)**

Dari 40 subyek, didapatkan rerata umur adalah 42,08 tahun dengan simpangbaku 13,12. Usia termuda 18 tahun dan tertua 66 tahun. Bila dikelompokkan menjadi beberapa golongan umur, maka proporsi terbesar adalah pada kelompok umur 40-49 tahun (37,5%) dan terkecil adalah pada kelompok umur 10-19 tahun (5%).

Tabel 6. Distribusi penderita menurut kelompok umur

Kelompok Umur (tahun)	n (%)	Laki-laki (%)	Perempuan (%)
10-19	2 (5)	2 (5)	0 (0)
20-29	5 (12,5)	3 (7,5)	2 (5)
30-39	8 (20)	7 (17,5)	2 (5)
40-49	15 (37,5)	8 (20)	7 (17,5)
50-59	6 (15)	3 (7,5)	2 (5)
60-69	4 (10)	4 (10)	0 (0)
Total	40 (100)	27 (67,5)	13 (32,50)

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.

#### 5.1.2 Distribusi faktor risiko

Tabel 7. Distribusi faktor risiko

Karakteristik	Penderita KNF (n=20)		Individu Sehat Berisiko (n=20)		p	RR	95% CI
	N	%	n	%			
<b>Diet Ikan Asin</b>					0.487*	2.11 1	1.510- 2.952
Mengonsumsi	18	90	20	100			
Tidak Mengonsumsi	2	10	0	0			
<b>Merokok</b>					1.000	1.00 0	0.282- 3.544
Ya	12	60	12	60			
Tidak	8	40	8	40			
<b>Riwayat Kanker dalam keluarga</b>					0.661*	0.44 4	0.072- 2.760
Ya	4	20	2	10			
Tidak	16	80	18	90			

\*uji yang digunakan adalah *fisher exact test*

Berdasar konsumsi ikan asin, sebagian besar penderita KNF sudah pernah mengkonsumsi, yakni sebanyak 18 subyek (90.00%) dan 20 subyek (100.00%) untuk kelompok individu sehat berisiko. Hasil analisis dengan menggunakan uji *fisher exact* menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara penderita KNF dan individu sehat berisiko ( $p=0.487$ ). Sedangkan berdasar riwayat merokok, sebagian besar penderita KNF memiliki riwayat merokok yaitu sebanyak 12 subyek (60.00%) dan 12 subyek (60.00%) untuk kelompok individu sehat berisiko. Hasil analisis dengan menggunakan uji *chi-square* menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok penderita KNF dan individu sehat berisiko ( $p=1.000$ )

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

## **5.2 Uji hipotesis penelitian**

Berdasarkan hasil uji normalitas data variabel didapatkan bahwa variabel VCA-p18, ZEBRA, VCA-p40, EA-p47/54, DNase, TK, dan EBNA1 berdistribusi tidak normal setelah ditransformasi, maka digunakan uji non-parametrik *Mann-Whitney*.

Tabel 8. Perbedaan imunopositivitas protein EBV

Imunopositivitas Protein EBV		Penderita KNF	Individu Sehat Berisiko	p*
VCA-p18	Negatif	3	6	0.041
	positif lemah	4	7	
	Positif	8	6	
	positif kuat	5	1	
ZEBRA	Negatif	9	12	0.140
	positif lemah	1	3	
	Positif	3	3	
	positif kuat	7	2	
VCA-p40	Negatif	5	12	0.035
	positif lemah	6	3	
	Positif	5	4	
	positif kuat	4	1	
EA-p47/54	Negatif	7	15	0.009
	positif lemah	2	2	
	Positif	4	1	
	positif kuat	7	2	
DNase	Negatif	13	18	0.713
	positif lemah	2	0	
	Positif	5	2	
	positif kuat	0	0	
TK	Negatif	16	17	0.074
	positif lemah	2	1	
	Positif	2	2	
	positif kuat	0	0	
EBNA1	Negatif	13	18	0.054
	positif lemah	2	1	
	Positif	4	1	
	positif kuat	1	0	

\* uji *Mann-Whitney*

Dari data perbedaan imunopositivitas protein EBV antara penderita KNF dengan individu sehat berisiko di atas setelah diuji dengan uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa imunopositivitas protein EBV yang berbeda bermakna adalah VCA-p18 ( $p=0.041$ ), VCA-p40 ( $p=0.035$ ) dan EA-p47/54 ( $p=0.009$ )

## **BAB VI**

### **PEMBAHASAN**

KNF merupakan keganasan pada epitel nasofaring yang angka kesembuhannya lebih tinggi apabila didiagnosis lebih dini.<sup>1</sup> KNF WHO tipe 3 100% berhubungan dengan EBV. Metode skrining KNF dapat dilakukan dengan cara mengetahui respon imun tubuh terhadap protein EBV. *Immunoblot* dapat digunakan untuk mengetahui respon imun terhadap Protein EBV. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan imunopositivitas protein EBV antara penderita KNF dengan individu sehat berisiko dengan adanya riwayat keluarga yang menderita kanker serta masyarakat yang memiliki risiko lain seperti konsumsi ikan asin dan merokok. Berdasarkan karakteristik subyek usia rerata subyek adalah  $42,08 \pm 13,0$  tahun, temuda usia 18 tahun dan tertua 66 tahun. Laki-laki 27 orang (67,25%) dan perempuan 13 orang (32,5%) dengan rasio 2,01:1.

Pada penelitian ini, diambil sejumlah karakteristik berupa konsumsi ikan asin, riwayat merokok, dan riwayat keganasan (pada keluarga). Hasil analisis menunjukkan bahwa walau karakteristik riwayat mengkonsumsi ikan asin, merokok dan riwayat genetik tidak memiliki hubungan bermakna dengan status responden.

Hasil pemeriksaan *immunoblot* protein EBV pada 20 penderita KNF dan 20 kontrol, didapatkan imunopositivitas protein VCA-p18 pada penderita KNF

sebagai berikut: negatif 3 orang, positif lemah 4 orang, positif 8 orang, dan positif kuat 5 orang, sedangkan pada individu sehat berisiko: negatif 6 orang, positif lemah 7 orang, positif 6 orang, dan positif kuat 1 orang. Imunopositivitas protein ZEBRA pada penderita KNF sebagai berikut: negatif 9 orang, positif lemah 1 orang, positif 3 orang, dan positif kuat 7 orang, sedangkan pada individu sehat berisiko: negatif 12 orang, positif lemah 3 orang, positif 3 orang, dan positif kuat 2 orang. Imunopositivitas protein VCA-p40 pada penderita KNF sebagai berikut: negatif 5 orang, positif lemah 6 orang, positif 5 orang, dan positif kuat 4 orang, sedangkan pada individu sehat berisiko: negatif 12 orang, positif lemah 3 orang, positif 4 orang, dan positif kuat 1 orang. Imunopositivitas protein EA-p47/54 pada penderita KNF sebagai berikut: negatif 7 orang, positif lemah 2 orang, positif 4 orang, dan positif kuat 7 orang, sedangkan pada individu sehat berisiko: negatif 15 orang, positif lemah 2 orang, positif 1 orang, dan positif kuat 2 orang. Imunopositivitas protein DNase pada penderita KNF sebagai berikut: negatif 13 orang, positif lemah 2 orang, positif 5 orang, dan positif kuat 0 orang, sedangkan pada individu sehat berisiko: negatif 18 orang, positif lemah 0 orang, positif 2 orang, dan positif kuat 0 orang. Imunopositivitas protein TK pada penderita KNF sebagai berikut: negatif 16 orang, positif lemah 2 orang, positif 2 orang, dan positif kuat 0 orang, sedangkan pada individu sehat berisiko: negatif 17 orang, positif lemah 1 orang, positif 2 orang, dan positif kuat 0 orang. Imunopositivitas protein EBNA1 pada penderita KNF sebagai berikut: negatif 13 orang, positif lemah 2 orang, positif 4 orang, dan positif kuat 1 orang, sedangkan pada individu

sehat berisiko: negatif 18 orang, positif lemah 1 orang, positif 1 orang, dan positif kuat 1 orang.

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

VCA-p18 merupakan *late protein* EBV pada fase litik. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa antigen ini bersama VCA-p40 mempunyai nilai diagnostik untuk penyakit yang berhubungan dengan EBV. EA-p47/54 juga merupakan protein yang direspon oleh antibodi pada KNF dengan stadium 2- 4. Hal ini dapat menjadi dasar pertimbangan dalam upaya skrining dini KNF pada individu sehat berisiko.<sup>6</sup>

Imunopositivitas protein lain seperti ZEBRA, DNase, TK, dan EBNA1 secara statistik tidak bermakna. Pada penelitian sebelumnya imunopositivitas EBNA1 memiliki perbedaan yang bermakna antara penderita KNF dengan kontrol, perbedaan ini mungkin disebabkan perbedaan jumlah sampel.<sup>6</sup>

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

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

## **BAB VII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1 Kesimpulan**

Terdapat perbedaan imunopositivitas protein VCA-p18, VCA-p40 dan EA-p47/54 EBV antara penderita KNF dengan individu sehat berisiko.

#### **7.2 Saran**

- 1) Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai perbedaan imunopositivitas protein EBV dengan jumlah sampel penelitian yang lebih besar.
- 2) Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai perbedaan imunopositivitas protein EBV -p18, VCA-p40 dan EA-p47/54 dengan metode ELISA.
- 3) Diperlukan penelitian lebih lanjut yang menggambarkan protein-protein EBV lain yang belum diteliti.

## DAFTAR PUSTAKA

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

- 2011 December 13]; 173(3):292-9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148719>
5. Fachiroh J, Paramita DK, Hariwiyanto B, Harijadi A, Dahlia HL, Indrasari SR, et al. Single-assay combination of Epstein-Barr virus (EBV) EBNA1 and viral capsid antigen-p18-derived syntethic peptides for measuring anti-EBV Immunoglobulin G (IgG) and IgA Antibody Levels in Sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening. *J Clin Microbiol.* [Internet] 2006 [cited 2011 December 12]; 44(4):1459-67. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/16597877/?tool=pubmed>
  6. Jajah Fachiroh, Tabitha Schouten, Bambang Hariwiyanto, Dewi K. Paramita, Ahmad Harijadi, Sofia M. Haryana, et al. Molecular Diversity of Epstein-Barr Virus IgG and IgA Antibody Responses in Nasopharyngeal Carcinoma: A Comparison of Indonesian, Chinese, and European Subjects. *J Infect Dis.* [Internet] 2004 [cited 2012 February 14] ;190(1):53-62. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15195243>
  7. Paramita DK, Fachiroh J, Haryana SM, Middeldorp JM. Two-step Epstein-Barr virus immunoglobulin A enzyme-linked immunosorbent assay system for serological screening and confirmation of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Vaccine Immunol.* [Internet] 2009[cited 2011 December 2];16(5):706-11.  
 Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/19321695/?tool=pubmed>
  8. S. Nikakhlagh, F. Rahim, A. Khodadadi ,N. Saki. The Association Between Epstein-Barr Virus with Nasopharyngeal Carcinoma in Patients from

- Southwestern Region of Iran. *IJCR* [Internet] 2010 [ cited 2012 February 5]; 2(6):89-94. Available from: <http://scialert.net/qredirect.php?doi=ijcr.2010.89.94&linkid=pdf>
9. Chang ET, Adami HO. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* [Internet] 2006 [ cited 2012 January 30] ;15(10):1765-77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17035381>
  10. Wei-Hua Jia, Bing-Jian Feng, Zong-Li Xu, Xiao-Shi Zhang, Ping Huang, Li-Xi Huang, et al. Familial Risk and Clustering of Nasopharyngeal Carcinoma in Guangdong, China. *Cancer* [Internet] 2004 [ cited 2011 December 3] ;101:363–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15540234>
  11. S P Hu, N E Day, D R Li, R N Luben, K L Cai, T Ou-Yang, et al. Further evidence for an HLA-related recessive mutation in nasopharyngeal carcinoma among the Chinese. *Br J Cancer.* [Internet] 2005 [ cited 2012 January 30]; 92(5): 967–970. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/15726104/?tool=pubmed>
  12. Brennan B. Carcinoma Nasopharyngeal. *Orphanet journal of Rare Diseases,* 2006;1(23);1-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/16800883/?tool=pubmed>
  13. Moghaddam A, Rosenzweig M, Lee-Parritz D, Annis B, Johnson RP, Wang F. An animal model for acute and persistent Epstein-Barr virus infection. *Science.* [Internet] 1997 [ cited 2011 December 3];276(5321):2030-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197263>

14. Soeharso P , Yurnadi, Suryandari DA. Eksistensi DNA-EBV di dalam serum dan saliva sebagai penanda untuk memantau terapi KNF. Kongres Nasional PBI XIV dan Seminar Nasional Biologi XX. Malang: UIN; 2009.
15. Hildesheim A, Levine PH. Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review. *Epidemiol Rev.* [Internet] 1993 [ cited 2011 December 3];15(2):466-85. Available from: <http://epirev.oxfordjournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=8174667>
16. Zheng YM, Tuppin P, Hubert A, Jeannel D, Pan YJ, Zeng Y, de Thé G. Environmental and dietary risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Zangwu County, Guangxi, China. *Br J Cancer.* [Internet] 1994 [ cited 2012 January 13];69(3):508-14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/8123482/?tool=pubmed>
17. Feng BJ, Jalbout M, Ayoub WB, Khyatti M, Dahmoul S, Ayad M, et al. Dietary risk factors for nasopharyngeal carcinoma in Maghrebian countries. *Int J Cancer.* [Internet] 2007 [ cited 2011 December 14] ;121(7):1550-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.22813>
18. Feng BJ, Khyatti M, Ben-Ayoub W, Dahmoul S, Ayad M, Maachi F, et al. Cannabis, tobacco and domestic fumes intake are associated with nasopharyngeal carcinoma in North Africa. *Br J Cancer.* [Internet] 2009 [ cited 2011 December 14];101(7):1207-12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/19724280/?tool=pubmed>
19. Hsu WL, Chen JY, Chien YC, Liu MY, You SL, Hsu MM, et al. Independent effect of EBV and cigarette smoking on nasopharyngeal carcinoma: a 20-year

follow-up study on 9,622 males without family history in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* [Internet] 2009 cited 2011;18(4):1218-26. Epub 2009 Mar 31. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=19336547>

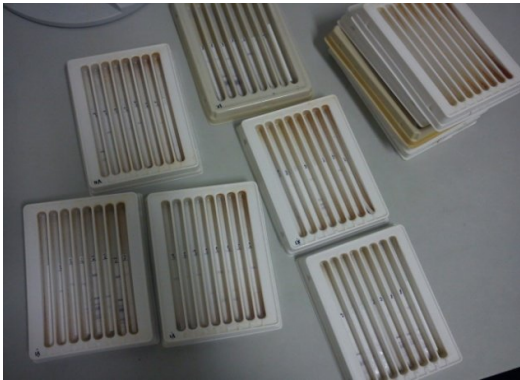
20. Alex Tselis and Hal B. Jenson. *Epstein-Barr Virus*. New York : Taylor & Francis Group ; 2006.
21. Lindi, Ellen. Identifikasi protein pregnancy associated glycoprotein (PAG) dalam air susu sapi perah peranakan Friesian Holstein. [Artikel Ilmiah]. Surabaya: Universitas Airlangga; 2011 [cited: 2012 February 12]. Available from: [www.fkh.unair.ac.id/artikel1/ellen.pdf](http://www.fkh.unair.ac.id/artikel1/ellen.pdf)

**Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian**

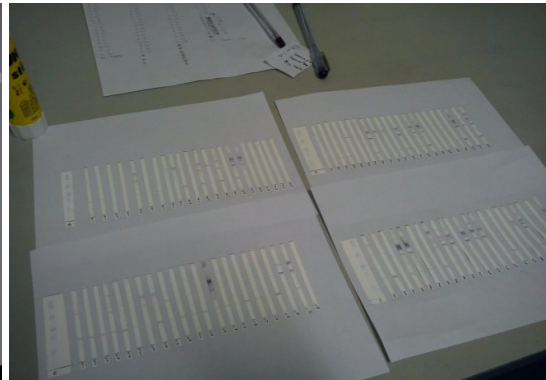
Proses blotting



Inkubasi western blotting



Tempat sample western blot



Hasil western blotting ditempel pada kertas

**Lampiran 2. INFORMED CONSENT**

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

**INSTANSI PELAKSANA : THT-KL DAN PATOLOGI  
ANATOMI**

**Persetujuan Setelah Penjelasan  
( *INFORMED CONSENT* )**

Berikut ini naskah yang akan dibacakan pada Responden / Ibu Responden  
Penelitian :

(a1. Berisi penjelasan apa yang akan dialami oleh responden mis:diambil darah & diwawancarai )

Bapak/Ibu Yth :

**Tujuan Penelitian :**

Kami akan meneliti perbedaan imunopositivitas protein Epstein-Barr Virus antara penderita karsinoma nasofaring dengan individu sehat berisiko

**Tindakan yang akan dialami :**

Bapak/Ibu nanti akan kami lakukan pengecekan darah di laboratorium, untuk mengetahui Imunopositivitas tubuh terhadap Epstein-Barr Virus Cara pengambilan darahnya adalah dengan diambil darah vena dengan spuit 5 ml. Apabila dalam perjalanan nantinya bapak/ibu menghendaki untuk mengundurkan diri, kami akan menghormati keinginan tersebut.

Terima kasih atas kerjasama Bpk/Ibu/Sdr.

Setelah mendengar dan memahami penjelasan Penelitian, dengan ini saya Menyatakan

**SETUJU / TAK SETUJU**

Untuk ikut sebagai responden / sample penelitian.

Semarang,

Saksi :

Nama Terang :

Alamat :

Nama terang :

Alamat :

**Lampiran 3. Output SPSS****Statistics**

umur

N	Valid	40
	Missing	0
Mean		42.08
Std. Error of Mean		2.074
Std. Deviation		13.118
Minimum		18
Maximum		66

**jenis kelamin**

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	laki-laki	27	67.5	67.5	67.5
	perempuan	13	32.5	32.5	100.0
	Total	40	100.0	100.0	

Crosstab

			status		Total
			pasien	individu sehat	
konsumsi_ikan _asin	Negatif	Count	2	0	2
		Expected Count	1.0	1.0	2.0
		% within konsumsi_ikan _asin	100.0%	.0%	100.0%
		% within status	10.0%	.0%	5.0%
		% of Total	5.0%	.0%	5.0%
	Positif	Count	18	20	38
		Expected Count	19.0	19.0	38.0
		% within konsumsi_ikan _asin	47.4%	52.6%	100.0%
		% within status	90.0%	100.0%	95.0%
		% of Total	45.0%	50.0%	95.0%
Total	Count	20	20	40	
	Expected Count	20.0	20.0	40.0	
	% within konsumsi_ikan _asin	50.0%	50.0%	100.0%	
	% within status	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	50.0%	50.0%	100.0%	

## Ikan asin

## Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2.105 <sup>a</sup>	1	.147		
Continuity Correction <sup>b</sup>	.526	1	.468		
Likelihood Ratio	2.878	1	.090		
Fisher's Exact Test				.487	.244
Linear-by-Linear Association	2.053	1	.152		
N of Valid Cases	40				

a. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.00.

b. Computed only for a 2x2 table

## RR Ikan Asin

## Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
For cohort status = pasien	2.111	1.510	2.952
N of Valid Cases	40		

Crosstab

			status		Total
			pasien	individu sehat	
Merokok	Negatif	Count	8	8	16
		Expected Count	8.0	8.0	16.0
		% within Merokok	50.0%	50.0%	100.0%
		% within status	40.0%	40.0%	40.0%
		% of Total	20.0%	20.0%	40.0%
	Positif	Count	12	12	24
		Expected Count	12.0	12.0	24.0
		% within Merokok	50.0%	50.0%	100.0%
		% within status	60.0%	60.0%	60.0%
		% of Total	30.0%	30.0%	60.0%
Total		Count	20	20	40
		Expected Count	20.0	20.0	40.0
		% within Merokok	50.0%	50.0%	100.0%
		% within status	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	50.0%	50.0%	100.0%

Merokok

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	.000 <sup>a</sup>	1	1.000		
Continuity Correction <sup>b</sup>	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.000	1	1.000		
Fisher's Exact Test				1.000	.626

Linear-by-Linear Association	.000	1	1.000		
N of Valid Cases	40				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8.00.

b. Computed only for a 2x2 table

### RR Merokok

#### Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Merokok (Negatif / Positif)	1.000	.282	3.544
For cohort status = pasien	1.000	.531	1.882
For cohort status = individu sehat	1.000	.531	1.882
N of Valid Cases	40		

#### Crosstab

			status		Total
			pasien	individu sehat	
Riwayat_kanker	Negatif	Count	16	18	34
		Expected Count	17.0	17.0	34.0
		% within Riwayat_kanker	47.1%	52.9%	100.0%
		% within status	80.0%	90.0%	85.0%
		% of Total	40.0%	45.0%	85.0%
	Positif	Count	4	2	6
		Expected Count	3.0	3.0	6.0
		% within Riwayat_kanker	66.7%	33.3%	100.0%
		% within status	20.0%	10.0%	15.0%
		% of Total	10.0%	5.0%	15.0%
Total		Count	20	20	40
		Expected Count	20.0	20.0	40.0
		% within Riwayat_kanker	50.0%	50.0%	100.0%
		% within status	100.0%	100.0%	100.0%

% of Total	50.0%	50.0%	100.0%
------------	-------	-------	--------

### Riwayat Kanker dalam Keluarga

#### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.784 <sup>a</sup>	1	.376		
Continuity Correction <sup>b</sup>	.196	1	.658		
Likelihood Ratio	.797	1	.372		
Fisher's Exact Test				.661	.331
Linear-by-Linear Association	.765	1	.382		
N of Valid Cases	40				

a. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.00.

b. Computed only for a 2x2 table

### RR Riwayat Kanker dalam Keluarga

#### Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Riwayat_kanker (Negatif / Positif)	.444	.072	2.760
For cohort status = pasien	.706	.362	1.378
For cohort status = individu sehat	1.588	.490	5.144
N of Valid Cases	40		

## Uji Normalitas

Tests of Normality							
status	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
VCA-p18	pasien	.247	20	.002	.868	20	.011
	individu sehat	.194	20	.048	.865	20	.010
ZEBRA	pasien	.293	20	.000	.743	20	.000
	individu sehat	.358	20	.000	.720	20	.000
EBNA1	pasien	.395	20	.000	.685	20	.000
	individu sehat	.520	20	.000	.354	20	.000
TK	pasien	.476	20	.000	.515	20	.000
	individu sehat	.502	20	.000	.440	20	.000
Dnase	pasien	.402	20	.000	.645	20	.000
	individu sehat	.527	20	.000	.351	20	.000
EA-p47/54	pasien	.230	20	.007	.790	20	.001
	individu sehat	.441	20	.000	.564	20	.000
VCA-p40	pasien	.192	20	.050	.874	20	.014
	individu sehat	.363	20	.000	.726	20	.000

a. Lilliefors Significance Correction

## Imunopositivitas Protein EBV

		status	
		pasien	individu sehat
		Count	Count
VCA-p18	negatif	3	6
	positif lemah	4	7
	positif	8	6
	positif kuat	5	1
ZEBRA	negatif	9	12
	positif lemah	1	3
	positif	3	3
	positif kuat	7	2
VCA-p40	negatif	5	12
	positif lemah	6	3
	positif	5	4
	positif kuat	4	1
EA-p47/54	negatif	7	15
	positif lemah	2	2
	positif	4	1
	positif kuat	7	2
Dnase	negatif	13	18
	positif lemah	2	0
	positif	5	2
	positif kuat	0	0
TK	negatif	16	17
	positif lemah	2	1
	positif	2	2
	positif kuat	0	0
EBNA1	negatif	13	18
	positif lemah	2	1
	positif	4	1
	positif kuat	1	0

## Uji Statistik

Test Statistics<sup>b</sup>

	VCA-p18	ZEBRA	VCA-p40	EA-p47/54	TK	Dnase	EBNA1
Mann-Whitney U	127.500	150.000	126.000	112.500	191.000	152.000	148.000
Wilcoxon W	337.500	360.000	336.000	322.500	401.000	362.000	358.000
Z	-2.042	-1.476	-2.111	-2.614	-.368	-1.785	-1.928
Asymp. Sig. (2-tailed)	.041	.140	.035	.009	.713	.074	.054
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.049 <sup>a</sup>	.183 <sup>a</sup>	.046 <sup>a</sup>	.017 <sup>a</sup>	.820 <sup>a</sup>	.201 <sup>a</sup>	.165 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: status