

# Ekspresi Protein Cox-2 pada Karsinoma Nasofaring Respons Tinggi dan Respons Rendah Pasca-Radioterapi

## (Protein Expression of Cox-2 in High and Low Response in Nasopharynx Carcinoma After Radiotherapy)

Widiastuti \*, Trijono Karmawan Soekarna Prija\*\*, Juliati Hood Alsagaff\*\*, Widodo Ario Kentjono\*\*

### ABSTRACT

*The morbidity and mortality of nasopharynx carcinoma (NPC) are still high up until now in our country. Radiotherapy (RT) is the primary choice of therapy, but the results of RT for NPC are not satisfactory. Several studies reported a close relationship between the progression of the cancer cells growth and abnormalities at the molecular level. The aim of this study was to find out the differences of protein expression of COX-2 in high and low response in NPC after radiotherapy. The design was an observational Cross Sectional Analytic study. Specimens were obtained from biopsy of 18 NPC patients on pre- and post- RT with  $\gamma$ -ray, 200 cgy dose radiation per fraction, 5 times/week with no interval to reach a total dose of 6600 cgy during 6–7 weeks, targeted on primary tumor in the nasopharynx and cervical lymph nodes, stated with haematoxylin-Eosin staining and immunohistochemistry examination. Protein expression was semi-quantitatively value, in which positive expression was noted if a brownish-red colour was found on the tumor cell and expressed as percent per field of view. Tumor response was analyzed based on nasopharynx tumor volume (NTV) changes in cc, as calculated from the result of head CT scan using a D-Com program. Data was analyzed with independent t-test and discriminant analysis. There was no significant difference of mean protein expression of COX-2 in NPC high response compared to low response pre-RT. Before RT there was no difference in the response level of variable, as confirmed with statistical analysis of COX-2 ( $p = 0.883$ ). Mean protein expression of COX-2 between high and low response groups after RT was different significantly ( $p = 0.007$ ). The discriminant analysis showed that protein expression of COX-2 after RT was distinct variables and those variable was capable of discriminating NPC patients into high or low response group with cut off -1,3 and its accuracy value of 88.9%. The conclusion, there was no difference between protein expression of COX-2 in NPC patient with high and low response before RT. There was a difference in protein expression of COX-2 in NPC patient with high and low response after RT. Protein expression of COX-2 in high response of NPC patient was lower than those in the low response after RT. Thus, the high response mechanism in NPC patient after RT, indicated a decreased protein expression of COX-2. Protein expression of COX-2 was able to differentiated high and low response group in NPC patient after RT with cut off -1.3 and accuracy value of 88.9%. Protein expression of COX-2 low response after RT, could differentiate partly and no response groups in NPC patient after RT with cut off value of - 0.268 and different significant of accuracy value of 60%. Protein expression of COX-2 low response after RT could differentiate no response and progressive group in NPC patient after RT with cut off value of 0.184 and different significant of accuracy value of 60%.*

**Key words:** radiotherapy, nasopharyngeal carcinoma, COX-2, tumor response

### PENDAHULUAN

Karsinoma Nasofaring (KNF) merupakan penyakit keganasan dengan angka kejadian tertinggi dan menjadi salah satu penyebab kematian utama di bidang Ilmu Kesehatan Telinga, Hidung, Tenggorok, Bedah Kepala dan Leher (THT-KL) baik di Indonesia maupun di Asia Tenggara.. Hampir 60% tumor ganas kepala dan leher

adalah KNF, kemudian diikuti oleh tumor ganas hidung dan sinus paranasal (18%), laring (16%), tumor ganas rongga mulut, tonsil, tiroid dan hipofaring dalam prosentase yang lebih rendah. Perbandingan penderita laki laki dan perempuan di Indonesia berkisar antara 2–3 berbanding 1, dengan frekuensi terbanyak pada umur 40–60 tahun. Hasil penelitian di dalam maupun luar negeri melaporkan

\* Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret

\*\* Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

bahwa sebagian besar penderita (65–95%) datang berobat ke Rumah Sakit sudah dalam keadaan stadium lanjut atau stadium III dan IV (Kentjono, 2003; Mulyarjo, 2003; Susworo, 2004; Roezin dan Syafril, 2006).

Radioterapi (RT) sebagai terapi tunggal hingga saat ini masih merupakan pilihan utama untuk KNF yang belum metastasis jauh, diharapkan dapat memperbaiki kualitas hidup dan memperpanjang kelangsungan hidup penderita, oleh karena KNF termasuk keganasan yang dapat disembuhkan dengan RT. Kenyataan klinis sampai saat ini hasil RT belum memuaskan. Kegagalan RT dalam memberantas KNF ditunjukkan oleh jumlah KNF respons rendah yang masih tinggi, sekitar 35–57%. Hasil RT untuk KNF stadium dini sebenarnya cukup baik, respons lengkap di atas 80%, sedangkan untuk stadium lanjut, respons RT menurun tajam (25–65%). Angka rekurensi tumor setelah 5 tahun mendapat RT dilaporkan masih cukup tinggi yaitu sekitar 19–56%. Seringnya ditemukan kekambuhan dan residu tumor (*loco-regional failure*) menunjukkan kegagalan RT pada penderita KNF masih tinggi, dengan angka ketahanan hidup 5 tahun kurang dari 40%. Respons tumor terhadap RT secara keseluruhan sebesar 25–65% (Prasad, 2000; Kentjono, 2003). Residu tumor sebagai bentuk manifestasi klinis dari KNF respons rendah biasanya akan berkembang menjadi tumor residif yang menunjukkan suatu prognosis buruk. Menurut penelitian Wolden, *et al.*, (2001) kematian penderita KNF terutama disebabkan oleh metastasis jauh yaitu sebesar 70%. Insidensi metastasis jauh mempunyai korelasi bermakna dengan besarnya tumor primer di nasofaring dan tumor metastasis di leher. Metastasis jauh merupakan petanda atau indikator progresifitas sel kanker, dengan angka ketahanan hidup 1 tahun hanya sekitar 0–25% (Bryan dan Mark, 2001; Chan *et al.*, 2002; Chew, 2003; Lung, 2003). Pada kasus yang telah mengalami metastasis jauh maka pemberian radioterapi dikombinasikan dengan sitostatika (Perez dan Cao, 1997; Prasad, 2000; Wolden *et al.*, 2001). RT yang diberikan diharapkan dapat memperbaiki kualitas hidup dan memperpanjang kelangsungan hidup penderita, oleh karena KNF digolongkan dalam penyakit keganasan yang dapat disembuhkan dengan terapi penyinaran (Susworo, 1990; Rhochowdury *et al.*, 1996; Perez dan Cao, 1997; Suhartati, 1998).

Berbagai penelitian menunjukkan terdapat hubungan yang erat antara progresivitas pertumbuhan sel kanker dengan kelainan tingkat molekuler, yang merupakan akumulasi dari lesi genetik yang sangat kompleks (Zingide, 2001; Cho, 2007). Akumulasi lesi genetik tersebut antara lain berupa aktivitas gen pemicu pertumbuhan tumor (proto

onkogen), tidak adanya aktivitas gen penghambat tumor dan gen pengendali apoptosis (*programmed cell death*), yang menyebabkan proto onkogen menjadi dominan sehingga akan memicu aktivitas proliferasi sel kanker secara berlebihan (Lodish, 2000; Yip dan Kenneth, 2006; Abbas *et al.*, 2007; Baert, 2008).

COX-2 adalah enzim yang dapat diinduksi dalam makrofag, bertanggung jawab untuk pengeluaran produksi prostaglandin (PG) yang tinggi selama inflamasi dan respons imun. COX-2 adalah enzim yang dapat meningkatkan respons untuk merangsang faktor pertumbuhan, peningkatan kadarnya banyak ditemukan dalam beberapa *progressivity human carcinoma* (Hill dan Tannock, 1998; Gallo *et al.*, 2002; Kirkpatrick dan Ogunkolade, 2002). Mekanisme peningkatan angiogenesis adalah melalui peningkatan siklus proliferasi sel. Proliferasi sel yang berlebihan akan memicu peningkatan proses desak antar sel. Proses desak antar sel yang meningkat akan memicu pengeluaran phospholipase A2 dan memacu pengeluaran *arachidonic acid*. Asam arakhidonat ini dipengaruhi oleh COX-2 (Cyclooxygenase-2) akan diubah menjadi prostaglandin yang akan menyebabkan sekresi angiopoitin 2. Hal ini akan menyebabkan aktivasi yang menyebabkan terjadinya angiogenesis dan progresivitas sel kanker (Chao dan Korsmeyer, 1998; Cho, 2007).

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengungkap mekanisme respons tinggi dan respons rendah pada penderita KNF pasca RT, hal ini ditunjukkan melalui perubahan ekspresi protein COX-2 yang hingga saat ini mekanismenya belum jelas. Masalah penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut: Apakah terdapat perbedaan ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT?

Tujuan penelitian ini yaitu mendapatkan perbedaan ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini dengan jenis Observasional (eksplanatorik), rancangan *Cross Sectional Analytic Study*. Populasinya adalah penderita KNF yang berobat ke Unit Rawat Jalan Poliklinik Onkologi THT-KL RSUD Dr. Moewardi Surakarta, usia 40-60 tahun, histopatologis KNF *undifferentiated* stadium III dan IV tanpa metastasis jauh, setuju ikut sebagai sampel penelitian dengan menanda-tangani *informed consent*. Kriteria penolakan yaitu menderita penyakit DM, Infark jantung, Sepsis, TBC dan penyakit berat lainnya, pernah mendapat pengobatan

definitif untuk KNF baik radioterapi maupun kemoterapi sebelumnya.

Sebanyak 18 penderita KNF mendapatkan Radioterapi dengan sinar gamma dari pesawat **Cobalt<sup>60</sup>**, dosis 200 cgy per fraksi, 5 kali per minggu tanpa selang waktu (teknik konvensional), mencapai dosis total 6.600 cgy selama 6–7 minggu untuk tumor primer di nasofaring dan kelenjar getah bening di leher. Spesimen berasal dari jaringan biopsi penderita KNF pra dan pascaradioterapi, dilakukan pewarnaan hematoksilin-eosin dan pemeriksaan imunohistokimia. Ekspresi protein dinilai secara semi kuantitatif oleh dua orang yaitu peneliti dan Dokter Spesialis Patologi Anatomi senior tanpa mengetahui keadaan kliniko-patologis, 10 lapang pandang di bawah mikroskop cahaya (pembesaran 400×). Hasil positif bila didapatkan warna merah kecoklatan pada sel tumor dan dinyatakan persen perlapang pandang.

Respons tumor dianalisis berdasarkan perubahan Volume Tumor Nasofaring (VTN), dalam satuan cc, dihitung secara komputersasi dari hasil CTScan kepala, penghitungan VTN oleh seorang Dokter Spesialis Radioterapi didampingi oleh seorang ahli fisika medis.

Menurut *WHO Offset Publications* No. 48 tahun 1979 respons terapi dibagi menjadi 4 tingkat respons yaitu Respons Lengkap (RL) apabila tidak didapatkan sel kanker lagi atau pengecilan tumor 100%. Respons Sebagian (RS) apabila massa tumor berkurang 50% atau lebih. Tidak ada Respons (TR) apabila tidak ada perubahan pada ukuran tumor atau pengecilan tumor kurang dari 50%. Progresif (P) apabila volume tumor atau salah satu tumor justru membesar lebih dari 25% dari ukuran awal atau timbul tumor baru. RL di kategorikan dalam respons tinggi, sedangkan RS, TR dan P di kategorikan sebagai respons rendah.

Analisis yang digunakan dalam penelitian adalah *independent-t test* dan analisis diskriminan, untuk mendapatkan perbedaan ekspresi protein COX-2 pada KNF respons tinggi dan respons rendah pasca-RT, serta kekuatan pembedanya.

### Teknik Imunohistokimia

Imunohistokimia adalah teknik untuk mendeteksi adanya antigen pada jaringan dengan menggunakan antibodi yang terikat enzim sehingga presipitat terwarnai dan lokasi antigen dapat dilihat di bawah mikroskop. Pemeriksaan imunohistokimia vimentin dilaksanakan dengan cara blok parafin dipotong setebal 4–6  $\mu$ , dan sediaan dipanaskan di atas *slide warmer* selama 60 menit dengan suhu 60 derajat Celsius. Sediaan dideparafinisasi dengan xilol I selama 5 menit, xilol II selama 5 menit, alkohol absolut selama 5

menit, alkohol 95% selama 5 menit, alkohol 80% selama 5 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 3 menit. Setelah itu dilanjutkan *blocking* peroksidase endogen (0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam metanol) selama 30 menit, dilanjutkan dengan pencucian air mengalir selama 3 menit. Kemudian sediaan dimasukkan dalam *antigen retrieval solution* dan dipanaskan dengan *microwave* menggunakan *target retrieval solution* (TRS):Lalu didinginkan selama kurang lebih 45 menit dalam TRS.

Selanjutnya dilakukan pencucian sediaan dengan *phosphat buffer saline* (PBS) dengan pH 7,4 sebanyak dua kali, masing-masing selama 3 menit. Lingkari dengan PAP PEN. Dilakukan *blocking* aktivitas nonspesifik dengan serum normal selama 20 menit. Dilakukan inkubasi antibodi primer vimentin (*mouse*) dalam serum normal semalam dalam suhu ruangan, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 2 kali masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya antibodi *biotinilated rabbit antimouse* (BRAM) sekunder diinkubasi dalam serum normal selama 30 menit dan dilakukan pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 2 kali masing-masing 3 menit. Setelah itu dilakukan inkubasi streptavidin dalam serum normal dengan pengenceran 1:1000 selama 60 menit. Pada langkah selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 2 kali masing-masing selama 3 menit, dengan *chromogen di amino benzidine* (DAB) selama lebih kurang 10 menit (50 ml Tris HCl 330 ul DAB + 50 ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%). Setelah itu dilakukan pencucian dengan PBS pH 7,4, kemudian dengan air mengalir. *Counterstain* dilakukan dengan hematoxilin Lilie mayer pada air jernih, kemudian dicelupkan ke larutan karbonat 2 kali celupan. Sediaan dicuci dengan air mengalir, dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat (alkohol 95% selama 5 menit, alkohol absolut I selama 5 menit), Xilol II selama 5 menit, dan terakhir ditutup dengan enthelan.

Imunohistokimia dilakukan menggunakan antibodi primer COX-2 (code M3617, clones CX-294, *monoclonal*; DAKO Jepang, dilusi 1:1000). Untuk antibodi sekunder digunakan *streptavidin horse radish peroxidase-conjugated goat anti-mouse* DAKO Jepang, dilusi 1:10000. Pewarnaan dilakukan menggunakan chromogen.

Batasan operasional dari variabel penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Radioterapi** adalah metode pengobatan penyakit keganasan dengan menggunakan sinar pengion, bertujuan untuk mematikan sel tumor sebanyak mungkin dan memelihara jaringan sehat di sekitar tumor agar tidak menderita kerusakan terlalu berat. Pada penelitian ini jaringan KNF *undifferentiated* sesuai klasifikasi

WHO 2002, stadium III dan IV. Radioterapi dilakukan oleh seorang Dokter Spesialis Radioterapi dengan memakai sinar gamma yang berasal dari pesawat Cobalt<sup>60</sup>, dosis radiasi 200 cGy per fraksi, diberikan 5 kali per minggu tanpa selang waktu (teknik konvensional) sampai mencapai dosis total 6600 cGy, dalam waktu 6–7 minggu ditujukan pada tumor primer di nasofaring dan kelenjar getah bening di leher.

- b. **Respons tumor (KNF) terhadap radioterapi** adalah tanggapan jaringan tumor (KNF) terhadap terapi radiasi yang diberikan. Variasi respons KNF terhadap radioterapi adalah macam atau besarnya tanggapan KNF terhadap radioterapi. Menurut WHO (*WHO Offset Publications* No. 48 tahun 1979) respons terapi dibagi menjadi 4 tingkat respons yaitu: Respons Lengkap (RL) apabila tidak didapatkan sel kanker lagi atau pengecilan volume tumor 100%. Respons Sebagian (RS) apabila volume tumor berkurang 50% atau lebih. Tidak ada Respons (TR) apabila tidak ada perubahan pada ukuran volume tumor atau pengecilan volume tumor kurang dari 50%. Progresif (P) apabila volume tumor atau salah satu tumor justru membesar lebih dari 25 % dari ukuran awal atau timbul tumor baru. Respons lengkap di kategorikan dalam respons tinggi, sedangkan respons sebagian, tidak ada respons dan progresif di kategorikan sebagai respons rendah.

Pada penelitian ini respons tumor dianalisis berdasarkan perubahan **Volume Tumor Nasofaring (VTN)**. VTN adalah volume tumor dalam satuan cc, yang dihitung secara komputersasi dari hasil *CTScan* kepala potongan koronal dan axial menggunakan program D.Com. Penghitungan VTN dilakukan oleh seorang Dokter Spesialis Radioterapi didampingi oleh ahli fisika medis.

- c. **Ekspresi protein COX-2** adalah spesimen yang didapat dari jaringan biopsi penderita KNF pra dan pasca radioterapi. Irisan serial dengan ketebalan 5 µm didapatkan dari tiap spesimen untuk pewarnaan hematoxil-in-eosin dan imunohistokimia. Hasil pewarnaan dievaluasi dan dinilai secara kuantitatif oleh 2 orang yaitu peneliti dan Dokter Spesialis Patologi Anatomi (senior) tanpa mengetahui keadaan kliniko-patologisnya.

Dinyatakan:

1. Ekspresi protein COX-2 meningkat dan selanjutnya disebut sebagai positif bila didapatkan warna merah

kecoklatan pada sel tumor dalam satu lapangan pandang mikroskop binokuler dengan pembesaran 400 kali. Selanjutnya ekspresi protein

COX-2 dinyatakan persen per lapang pandang.

2. Ekspresi protein COX-2 tidak meningkat dan selanjutnya disebut negatif apabila didapatkan warna kebiruan pada sel tumor dalam satu lapang pandang mikroskop binokuler dengan pembesaran 400 kali.

## HASIL DAN DISKUSI

Hasil penelitian didapatkan penderita laki-laki 12 dan perempuan 6, dengan ratio laki laki dibandingkan perempuan adalah 66,67:33,33% atau 2:1. Umur antara 40–60 tahun dengan nilai mean:  $49,5 \pm SD 7,333$ . Stadium III 8 (44,40%), stadium IVA 8 (44,40%) dan stadium IVB 2 (11,20%). VTN (Volume Tumor Nasofaring) pra RT dengan mean:  $39,9156 \pm SD 18,36474$ , pasca RT mean:  $15,7256 \pm SD 11,65385$ . **Pascaradioterapi didapatkan: respons tinggi (RTG) 3 (16,70%) dan respons rendah (RR) 15 (83,30%), terinci menjadi respons sebagian (RS) 9 (44,40%), tidak ada respons (TR) 4 (22,20%) dan progresif (P) 2 (16,70%).**

Pra-RT, rerata ekspresi protein COX-2 pada KNF respons tinggi adalah  $31,33 \pm 15,31$ , respons rendah adalah  $33,67 \pm 25,62$ . Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan ( $p = 0,883$ ), berarti ekspresi protein COX-2 antara respons tinggi dan respons rendah pra-RT didapatkan perbedaan tidak bermakna ( $p > 0,05$ ). Pasca RT rerata ekspresi protein COX-2 pada KNF respons tinggi adalah  $2,00 \pm 1,00$ , respons rendah adalah  $52,47 \pm 30,69$ . Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan ( $p = 0,007$ ), berarti ekspresi protein COX-2 antara respons tinggi dan respons rendah pasca RT didapatkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ). Jadi terbukti terdapat perbedaan ekspresi protein COX-2 pada KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT.

Hasil analisis diskriminan didapatkan ekspresi protein COX-2 pada KNF pra-RT antara respons tinggi dan respons rendah terdapat perbedaan tidak bermakna ( $p > 0,05$ ). Artinya pada pra-RT, ekspresi protein COX-2 pada KNF tidak ada perbedaan tingkat respons. Berdasarkan hasil uji statistik ekspresi protein COX-2 pasca-RT didapatkan nilai ( $p = 0,007$ ), berarti ekspresi protein COX-2 pada KNF respons tinggi dan respons rendah pasca-RT terlihat berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ). Berdasarkan analisis diskriminan didapatkan skor diskriminan dengan nilai tengah atau *Cut-off* untuk memisahkan kelompok respons tinggi dan respons rendah =  $-1,3$ . Apabila  $D < -1,3$  maka termasuk respons tinggi atau kelompok dengan prognosis lebih baik

sedangkan apabila didapatkan  $D > -1,3$  maka termasuk respons rendah atau kelompok dengan prognosis buruk. Dilihat dari hasil validasi (*Cross-Validated*) maka tampak angka kekuatan pembeda sebesar 88,9% sama dengan angka sebelumnya (*Original*) 88,9%. Semakin besar harga kekuatan pembeda tersebut, maka model diskriminan semakin *significant* digunakan untuk mengklasifikasikan kelompok yang diamati.

Dengan rancangan penelitian ini, terbukti bahwa perbedaan ekspresi protein COX-2 pasca radioterapi pasca RT pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca radioterapi, dapat digunakan sebagai pembeda tingkat respons tumor, dengan kekuatan pembeda sebesar 88,9%.

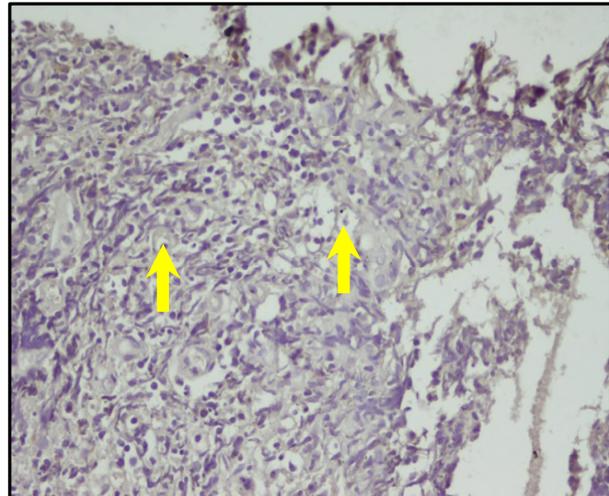
Kesimpulan: Tidak terdapat perbedaan ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pra RT. Terdapat perbedaan ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca-RT

Jadi mekanisme respons tinggi pada KNF pasca RT ditunjukkan oleh penurunan ekspresi protein COX-2. Ekspresi protein COX-2 pasca-RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok respons tinggi dan respons rendah, didapatkan nilai *cut off* - 1,3 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 88,9%. Ekspresi protein COX-2 respons rendah pasca-RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok respons sebagian dan tidak ada respons, didapatkan nilai *cut off* - 0,268 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 60%. Ekspresi COX-2 respons rendah pasca RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok tidak ada respons dan kelompok progresif, didapatkan nilai *cut off* 0,184 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 60%.

Hasil pengecatan imunohistokimia tampak sel dengan sitoplasma berwarna merah kecoklatan adalah ekspresi positif yang berarti menyerap antibodi. Sel yang tidak mengandung ikatan antigen-antibodi akan tampak sitoplasma berwarna kebiruan (ekspresi negatif) (Lihat *Gambar 1*).

### **Ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF pra-RT dan pasca-RT kelompok respons tinggi dan respons rendah**

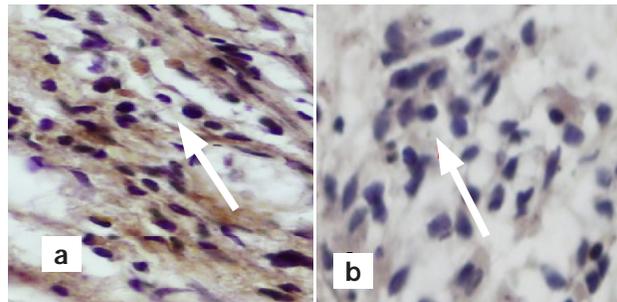
Kelompok respons tinggi, ekspresi protein COX-2 pra-RT (a) memperlihatkan ekspresi protein COX-2 positif pada sitoplasma banyak yang berwarna merah kecoklatan, sedangkan kelompok pasca-RT (b) memperlihatkan ekspresi protein COX-2 negatif terlihat sitoplasma berwarna kebiruan. Sesuai dengan kriteria WHO No. 48 tahun



**Gambar 1.** Ekspresi Protein negatif (protein COX-2) dengan Pewarnaan IHC pada sel tumor KNF; pembesaran 400x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel.

1979, disebut respons tinggi atau respons lengkap apabila massa tumor menghilang 100%, seperti yang disajikan pada *Gambar 2a* dan *b*.

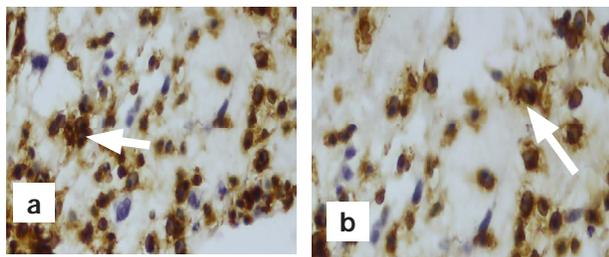
Kelompok respons rendah (respons sebagian), ekspresi protein COX-2 pra-RT (a) memperlihatkan ekspresi protein COX-2 positif pada sitoplasma banyak berwarna merah



**Gambar 2.** a) Ekspresi Protein COX-2 pada penderita KNF pra dan pasca-RT dengan Pewarnaan IHC, pada kelompok respons tinggi (respons lengkap). b) Pembesaran 400x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel.

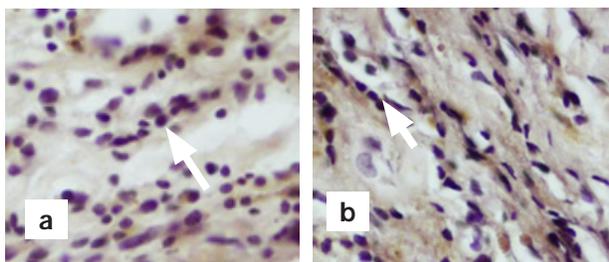
kecoklatan, sedangkan pasca-RT (b) memperlihatkan ekspresi protein COX-2 positif merah kecoklatan pada sitoplasmanya tinggal sedikit dibandingkan pra-RT. Sesuai dengan kriteria WHO No 48 tahun 1979, disebut respons rendah (respons sebagian), apabila tumor menghilang lebih dari 50% (Lihat *Gambar 3a* dan *b*).

Pada kelompok Respons rendah (Tidak Ada Respons), ekspresi protein COX-2 kelompok pra-RT (a) memperlihatkan gambaran ekspresi protein COX-2 positif pada sitoplasma terlihat banyak yang berwarna merah kecoklatan, sedangkan kelompok pasca-RT (b)



**Gambar 3.** a) Ekspresi Protein COX-2 pada penderita KNF pra dan pasca RT dengan Pewarnaan IHK, pada kelompok respons rendah (respons sebagian). b) Pembesaran 400x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel.

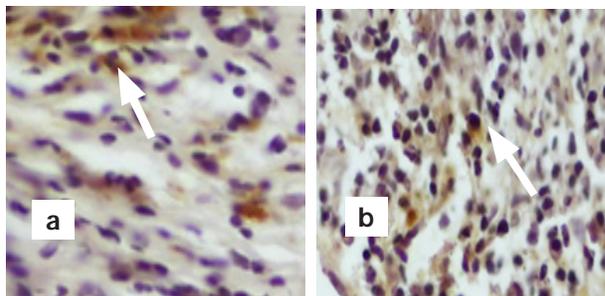
memperlihatkan gambaran ekspresi protein COX-2 positif pada sitoplasma yang berwarna merah kecoklatan masih banyak, dibandingkan pra-RT. Sesuai dengan kriteria WHO No 48 tahun 1979, disebut Respons rendah (Tidak Ada Respons), apabila pada penderita menghilang kurang dari 50% atau menetap. (lihat gambar 4).



**Gambar 4.** a) Ekspresi Protein COX-2 pada penderita KNF pra dan pasca RT dengan Pewarnaan IHK, pada kelompok respons rendah (tidak ada respons). Pembesaran 400x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel.

Pada kelompok respons rendah (Progresif), ekspresi protein COX-2 kelompok pra-RT (a) memperlihatkan gambaran ekspresi protein COX-2 positif pada sitoplasma terlihat banyak yang berwarna merah kecoklatan, sedangkan kelompok pasca-RT (b) memperlihatkan gambaran ekspresi protein COX-2 positif merah kecoklatan pada sitoplasma terlihat bertambah banyak dibandingkan pra-RT. Sesuai

dengan kriteria WHO No 48 tahun 1979, disebut respons rendah (respons progresif), apabila pada penderita makin besar atau timbul lesi baru yang sebelumnya tidak ada (lihat gambar 5).



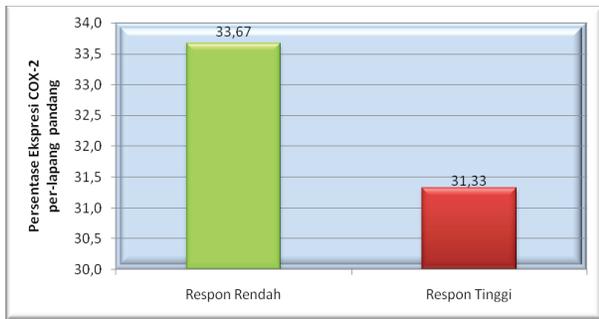
**Gambar 5.** a) Ekspresi Protein COX-2 pada penderita KNF pra dan pasca-RT dengan Pewarnaan IHK, pada kelompok respons rendah (Progresif). b) Pembesaran 400x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel.

Uji normalitas data dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Pada penelitian ini memperlihatkan ekspresi protein COX-2 pra-RT Respons tinggi dan Respons rendah mengikuti distribusi normal ( $p > 0,05$ ), sehingga analisis statistiknya menggunakan *independent samples t-test*, sedangkan uji normalitas data untuk ekspresi protein COX-2 pasca-RT respons tinggi dan respons rendah menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, ekspresi protein COX-2 tidak mengikuti distribusi normal ( $p < 0,05$ ), sehingga digunakan uji alternatifnya yaitu uji non-parametrik menggunakan uji *Mann-Whitney*.

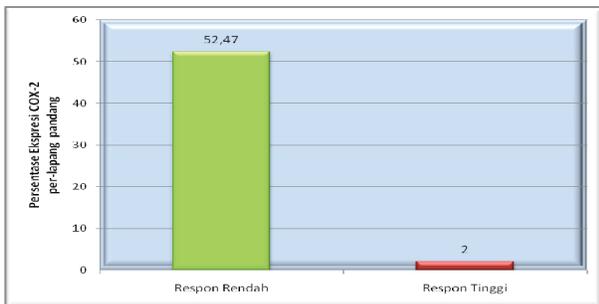
Hasil yang hampir sama juga terlihat pada rerata ekspresi protein COX-2 pada pada penderita KNF perlapang pandang, sebelum dilakukan RT (pra-RT) menunjukkan kelompok respons tinggi adalah  $31,33 \pm 15,31\%$ , sedangkan kelompok respons rendah adalah  $33,67 \pm 25,62\%$ . Berdasarkan *Independent Samples t-Test*, hasil ini menunjukkan ekspresi protein COX-2 antara respons tinggi dan respons rendah sebelum dilakukan RT tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p = 0,883$ ) (Lihat Lampiran 11). Sebaliknya, rerata persentase ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF perlapang pandang pada penelitian ini, sesudah dilakukan RT (pasca-RT) menunjukkan kelompok respons tinggi adalah  $2,00 \pm 1,00\%$ , sedangkan kelompok respons rendah adalah  $52,47 \pm 30,69\%$ . Data ekspresi protein COX-2 tidak terdistribusi normal, maka digunakan uji alternatifnya yaitu uji *Mann-Whitney*. Hasil uji *Mann-Whitney* memperlihatkan gambaran ekspresi protein COX-2 setelah dilakukan Radioterapi, pada kelompok respons

tinggi ekspresinya terlihat lebih sedikit dibandingkan kelompok respons rendah, terlihat berbeda bermakna ( $p = 0,007$ ) (Lihat Lampiran 12). Dengan demikian hipotesis ke 3 yaitu ada perbedaan ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF kelompok respons tinggi dan respons rendah pasca RT terbukti.

Rerata persentase hasil pengamatan ekspresi protein COX-2 pra-RT maupun pasca RT antara kelompok respons tinggi dan respons rendah, selengkapnya disajikan pada Gambar 6 dan 7.



**Gambar 6.** Rerata Ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF pra-RT antara kelompok respons tinggi dan respons rendah pasca-RT.



**Gambar 7.** Rerata Ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF pasca-RT antara kelompok respons tinggi dan respons rendah pasca-RT.

Hasil penelitian ini tampak ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF pra-RT secara keseluruhan tidak memperlihatkan adanya perbedaan bermakna antara respons tinggi dan rendah. Secara ringkas disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Rerata persentase ekspresi protein dan hasil uji statistik COX-2 pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pra-RT

Variabel	Respons rendah		Respons tinggi		$\rho$
	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	
COX-2	33,67	25,62	31,33	15,31	0,883

Hasil penelitian ini tampak ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF pasca-RT secara keseluruhan memperlihatkan adanya perbedaan bermakna diantara kelompok respons tinggi dan respons rendah. Secara ringkas disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Rerata persentase ekspresi protein dan hasil uji statistik masing-masing variabel pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca-RT

Variabel	Respons rendah		Respons tinggi		$\rho$
	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	
COX-2	52,47	30,69	2,00	1,00	0,007

### Perbedaan ekspresi protein COX-2 penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pra dan pasca-RT

Berdasarkan Tabel 1 didapatkan hasil Uji Statistik yang menunjukkan bahwa rerata ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF per-lapang pandang sebelum dilakukan RT untuk kelompok respons tinggi adalah  $31,33 \pm 15,31$  sedangkan kelompok respons rendah adalah  $33,67 \pm 25,62$ . Setelah dilakukan Uji Normalitas Data dengan memakai Uji Kolmogorov Smirnov, ekspresi protein COX-2 sebelum dilakukan RT didapatkan normal distribusinya, dengan nilai  $p > 0,05$  yaitu ( $p = 0,819$ ). Untuk data yang terdistribusi normal kemudian dilakukan Uji Independent Samples *t-Test*, ternyata memperlihatkan hasil rerata ekspresi protein COX-2 antara kelompok respons tinggi dan kelompok respons rendah sebelum dilakukan RT didapatkan perbedaan tidak bermakna, dengan nilai  $p > 0,05$  yaitu ( $p = 0,883$ ).

Berdasarkan *Tabel 2* didapatkan hasil Uji Statistik yang menunjukkan bahwa persentase rerata ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF perlapang pandang sesudah dilakukan RT kelompok respons tinggi adalah  $2,00 \pm 1,00$  sedangkan kelompok respons rendah adalah  $52,47 \pm 30,69$ . Setelah dilakukan Uji Normalitas Data dengan memakai Uji Kolmogorov Smirnov, ekspresi protein COX-2 pasca-RT didapatkan distribusinya tidak normal, dengan nilai  $p < 0,05$  yaitu ( $p = 0,013$ ). Oleh karena distribusinya tidak normal, kemudian dilanjutkan dengan Uji alternatifnya yaitu Uji Non Parametrik menggunakan Uji *Mann Whitney*. Berdasarkan Uji *Mann Whitney* didapatkan bahwa ekspresi protein COX-2 setelah dilakukan RT (pasca-RT) pada kelompok respons tinggi dibandingkan dengan kelompok respons rendah berbeda bermakna, dengan nilai  $p < 0,05$  yaitu ( $p = 0,007$ ).

*Cyclooxygenase* (COX) adalah suatu enzim kunci pada perubahan asam arakhidonat menjadi prostaglandin (PG). COX-2 dalam keadaan normal tak terdeteksi, akan tetapi COX-2 dapat terinduksi oleh adanya kanker dan proses inflamasi. Sel kanker mengekspresikan protein COX-2 dalam kadar tinggi dan ekspresi protein yang berlebihan dari COX-2 berhubungan dengan prognosis buruk.

Telah dilaporkan bahwa intake aspirin mengurangi insidensi dan mortalitas kanker kolon dan esofagus. Sebagai tambahan, beberapa laporan telah membuktikan bahwa inhibitor selektif COX-2 menekan karsinogenesis pada binatang percobaan. Pada uji coba manusia sebagaimana pada model binatang, efek kemoprotektif dari inhibitor selektif COX-2 telah terbukti pada kondisi prekanker. Terdapat beberapa bukti yang mendukung hubungan antara COX-2 dan karsinogenesis. Aktivitas COX-2 selama karsinogenesis terlihat pada paru maupun esofagus. Sebagian besar penderita kanker kolon, kanker nasofaring, protein COX-2 diekspresikan berlebihan dan adanya hambatan terhadap ekspresi protein COX-2 menunjukkan adanya pengurangan resiko residif.

Dari 85 kasus didapatkan ekspresi protein COX-2 lebih sering ditemukan pada progresi epitelium KNF dibandingkan kondisi orang normal. Peningkatan ekspresi protein COX-2 sejalan dengan peningkatan progresifitas invasi epitelium KNF dari sel normal kemudian mengalami displasia dan menjadi karsinoma. Hal tersebut menunjukkan bahwa COX-2 berkontribusi pada proses *multi step* untuk proses karsinogenesis KNF. COX-2 mempersentasikan target terapi untuk COX-2 inhibitor dan sebagai basis penelitian lebih lanjut untuk modalitas terapi ajuvan untuk KNF. COX-2 inhibitor dikenal berperan untuk meningkatkan efek potensiasi radioterapi sebagai pengobatan COX-2 telah

diketahui memiliki peranan penting pada karsinogenesis pada beberapa tipe keganasan.

Didapatkan hasil ekspresi protein COX-2 lebih banyak pada pasien dengan rekurensi lokoregional dan metastasis jauh dibandingkan yang tidak. Ekspresi COX-2 tampaknya memiliki pengaruh signifikan secara statistik pada kegagalan terapi, ditunjukkan dengan Uji *Mann-Whitney* ( $p = 0,024$ ) dan Tes *Chi-Square Mantel-Haenszen* ( $p = 0,018$ ). Ekspresi COX-2 dipercaya merupakan salah satu faktor penting yang berhubungan dengan rekurensi lokoregional atau metastasis jauh. Ekspresi COX-2 yang tinggi telah diketahui berhubungan dengan kegagalan terapi atau prognosis buruk terutama pada KNF jenis *Undifferentiated*. Beberapa laporan menunjukkan bahwa inhibitor COX-2 dapat mempengaruhi efek radioterapi dan menghambat pertumbuhan tumor itu sendiri pada binatang percobaan.

Penderita dengan peningkatan ekspresi COX-2 memiliki angka harapan hidup yang menurun secara signifikan. Ekspresi COX-2 dapat menjadi salah satu faktor prognostik pada pasien dengan kanker nasofaring, sehingga dapat dipergunakan untuk mengevaluasi hubungan antara kegagalan pengobatan dengan nilai ekspresi COX-2 pada pasien KNF dengan pemberian kemoterapi dan radioterapi atau dengan radioterapi saja.

Penelitian ini pada kelompok respons tinggi, didapatkan ekspresi protein COX-2 lebih sedikit dibandingkan kelompok respons rendah secara bermakna ( $p = 0,007$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok respons tinggi (respons lengkap) banyak terjadi apoptosis sel tumor KNF sehingga VTN akan mengecil, bahkan menghilang pada. Ekspresi COX-2 yang berlebih terlihat pada progresifitas sel KNF. Pada kelompok respons rendah pasca-RT, ekspresi protein COX-2 lebih banyak ( $52,47 \pm 30,69$ ) dibandingkan dengan kelompok respons tinggi ( $2,00 \pm 1,00$ ) (Lihat *Gambar 5.18* dan *5.19*).

Keadaan ini menunjukkan bahwa pasca RT terjadi kerusakan sel tumor baik secara langsung maupun tidak langsung melalui jalur kerusakan DNA dan jalur peningkatan sitokin pro-inflamasi, selanjutnya akan memicu terjadinya apoptosis. Sinyal pro-inflamasi dan stres oksidatif tersebut akan menginduksi ekspresi protein COX-2. Ekspresi protein yang berlebihan ini akan berakibat pada hasil RT, dimana pada kelompok Respons rendah (respons sebagian, tak ada respons dan progresif) tampak ekspresi protein COX-2 bertambah, hal ini sesuai dengan hasil VTN pasca-RT juga makin bertambah besar volume tumornya. Hasil ini sejalan dengan pendapat **Ogino et al.**, 2008, yang menyatakan bahwa peningkatan ekspresi COX-2 akan meningkatkan

aktivitas dan sintesis prostaglandin, kemudian akan memicu pengeluaran angiopoitin, CD-44 dan VEGF. Peningkatan ekspresi COX-2 tersebut akan merangsang proliferasi, angiogenesis, invasi tumor, progresifitas dan berlanjut ke proses metastasis.

Hipotesis penelitian ini yaitu ada perbedaan ekspresi protein COX-2 penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca RT telah terbukti.

Polimorfisme nukleotida tunggal di promotor COX-2 dapat mengubah fungsi enzim COX-2 dalam mempengaruhi risiko perkembangan malignansi. Analogi dengan hal tersebut dapat sebagai penjelasan peran ekspresi COX-2 pra dan pasca-RT pada penderita KNF dapat berbeda tingkat responsnya.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- 1) Tidak terdapat perbedaan ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF respons tinggi respons rendah pra-RT.
- 2) Terdapat perbedaan ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF respons tinggi dan respons rendah pasca-RT.
- 3) Ekspresi protein COX-2 pasca RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok respons tinggi dan respons rendah, didapatkan nilai cut off – 1,3 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 88,9%.
- 4) Ekspresi protein COX-2 respons rendah pasca-RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok respons sebagian dan tidak ada respons, didapatkan nilai cut off - 0,268 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 60%
- 5) Ekspresi protein COX-2 respons rendah pasca RT merupakan variabel yang mampu memisahkan sekelompok individu menjadi kelompok tidak ada respons dan kelompok progresif, didapatkan nilai cut off 0,184 dengan angka kekuatan pembeda sebesar 60%.

### Saran

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka ada beberapa saran, yaitu:

- 1) Pemilihan dan pengawasan sampel harus lebih ketat lagi untuk menghindari atau meminimalkan kasus *drop out*.

- 2) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh radioterapi terhadap angka residif tumor (*recurrence rate*) dan angka harapan hidup (*survival rate*), dikaitkan dengan status ekspresi protein COX-2 pada penderita KNF stadium dini dan lanjut.
- 3) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut di tingkat genetik (**polimorfisme genetik**) dan tingkat seluler (*nasopharynx cancer stem cell* yang ikut menentukan penyebab perbedaan antara respons tinggi dan respons rendah pasca Radioterapi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S**, 2007. *Immunity to Tumors*. In Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (eds): Cellular and Molecular Immunology, 6<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: W.B. Saunders Co, pp. 397–417.
- Baert AL**, 2008. *Apoptosis*. In: Encyclopedia of Diagnostic Imaging Volume 2. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. pp. 94–8.
- Bryan N, Mark C**, 2001. *Nasopharyngeal cancer*. In Bailey BJ (ed): Head and neck surgery otolaryngology, volume one, Lippincott Co, Philadelphia, pp. 1413–26.
- Chan AT, Teo PM, Johnson PJ**, 2002. Review Nasopharyngeal carcinoma. *Ann. Oncol.* 2002 Jul; 13(7): 1007–15.
- Chao DT, Korsmeyer SJ**, 1998. Bcl-2 Family Regulators of Cell Death. *Ann Rev. Immunology*16: 393–419.
- Chew CT**, 2003. Risk factors, symptoms and diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma, *Cancer Reviews Asia Pacific*, Singapura, World Scientific Publishing Co, 109–20.
- Cho WC**, 2007. Nasopharyngeal Carcinoma: Molecular Biomarker Discovery and Progres. *Molecular Cancer* 6:1.
- Gallo OG, Masini EM, Bianchi S, Bruschini L, Paglierani M, Franchi A**, 2002. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Human Path:* 33: 708–14.
- Hill RP, Tannock IF**, 1998. *Introduction Cancer Biology*. In Tannock IF, Hill RP (eds): The Basic Science of Oncology third edition. McGraw-Hill Health Professions Division, New York, pp. 1–5.
- Kentjono WA**, 2003. Penatalaksanaan Kanker Nasofaring masa kini. Dalam: Naskah lengkap Simposium Kanker Nasofaring dan demo biopsi Nasofaring dengan teknik jarum halus, Widodo Ario Kentjono dan J.H. Lunardhi (eds). Surabaya, hlm. 24–44.

- Kirkpatrick K, Ogunkolade W**, 2002. The mRNA Expression of Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Human Breast Cancer.
- Lodish**, 2000. Molecular Cell Biology. fourth ed. New York: W. H. Freeman, 2000. Nature 407, no 12, Oct. Issue devoted to review articles on apoptosis.
- Lung ML**, 2003. Functional approaches to localize and identify tumor suppressive region required for development of nasopharyngeal carcinoma. In: Cancer Reviews Asia Pacific, Singapura, World Scientific Publishing Co, 21–30.
- Mulyarjo**, 2003. Epidemiologi dan Gambaran Klinik Kanker Nasofaring. dalam Naskah lengkap Simposium Kanker Nasofaring dan demo biopsi Nasofaring dengan teknik jarum halus Surabaya, Widodo Ario Kentjono (ed), hlm: 1–7.
- Perez CA, Cao KSC**, 1997. *Nasopharynx*. In Perez CA, Brady LN (eds): Principles and Practise Radiation Oncology of 3 Lippincott – Ravens Publishers Philladelphia, pp. 349–69.
- Prasad U**, 2000. Current status of combination chemotherapy and radiotherapy in the treatment of advanced nasopharyngeal carcinoma. *Medical progress*, April, 7–10.
- Rhoychowdury DF, Tseng A, Fu KK**, 1996. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 77: 1419–26.
- Roezin A, Syafril A**, 2006. Karsinoma Nasofaring. Dalam: Soepardi E A. (ed). Buku Ajar Ilmu Penyakit Telinga Hidung Tenggorok. Edisi kelima. Jakarta: FK UI, h. 149–53.
- Suhartati G**, 1998. Faktor Prediksi Respons Radiasi pada Karsinoma Nasofaring. Disertasi untuk memperoleh gelar doktor pada Program Pascasarjana Universitas Indonesia, Jakarta.
- Susworo**, 1990. Kombinasi radiasi Eksterna dan Intrakaviter (alternatif pengobatan Karsinoma Nasofaring yang Responsif terhadap Radiasi). Disertasi, FKUI Jakarta.
- Susworo**, 2004. Kanker Nasofaring: Epidemiologi dan Pengobatan Mutakhir. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran* 144: 16–19.
- Wolden S, Zelefsky M, Krau DH, Rozenzweig KE, Chong LM, Shaha AR, Zhang H, Harrison LB, Shah JP, Pfister DG**, 2001. Accelerated concomitant boost radioteraphy and Chemotherapy for advanced nasopharyngeal carcinoma. *Journ. Of Clin. Oncol* 19(4): 1105–10.
- Yip, Kenneth W**, 2006. Prognostic significance of the Epstein-Barr Virus, p53, Bcl-2, and survivin in Nasopharyngeal Cancer. *Clin cancer Res.* 12–9.
- Zingide SM**, 2001. Cancer genes in Cancer Research Institute, Tata Memorial Centre Parel, Mumbai 400 012. *Current Science.* 81(5): 1–10.