

**ANALISIS STATUS METILASI GEN SEPTIN9 DAN ZNF671 DALAM
SAMPEL SALIVA SEBAGAI BIOMARKER POTENSIAL UNTUK
DETEKSI DINI KANKER NASOFARING**

(Skripsi)

Oleh

GHINA AUFA FATHINA AZHAR

2157061002



**PROGRAM STUDI BIOLOGI TERAPAN
JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2025**

**ANALISIS STATUS METILASI GEN SEPTIN9 DAN ZNF671 DALAM
SAMPEL SALIVA SEBAGAI BIOMARKER POTENSIAL UNTUK
DETEKSI DINI KANKER NASOFARING**

Oleh

GHINA AUFA FATHINA AZHAR

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

Jurusan Biologi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



JURUSAN BIOLOGI

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG**

2025

ABSTRAK

ANALISIS STATUS METILASI GEN SEPTIN9 DAN ZNF671 DALAM SAMPEL SALIVA SEBAGAI BIOMARKER POTENSIAL UNTUK DETEKSI DINI KANKER NASOFARING

Oleh

GHINA AUFA FATHINA AZHAR

Kanker nasofaring (NPC) yang berhubungan dengan infeksi *Epstein-Barr Virus* (EBV) sering terdiagnosis pada stadium lanjut karena lokasi nasofaring yang sulit dijangkau. Oleh karena itu, deteksi dini berbasis metode non-invasif menjadi sangat penting. Penelitian ini bertujuan menganalisis status metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671 dalam saliva sebagai biomarker potensial untuk deteksi dini NPC. Sampel terdiri dari 20 subjek sehat (10 EBV positif, 10 EBV negatif), 10 pasien NPC EBV positif, serta sel RAJI sebagai kontrol positif. Deteksi metilasi dilakukan menggunakan metode *Methylation Sensitive Restriction Enzyme* PCR (PCR-MSRE) dengan enzim HpaII dan MspI. Uji normalitas dilakukan dengan *Shapiro-Wilk*, sedangkan perbandingan antar kelompok dianalisis menggunakan uji *Mann-Whitney*. Hasil menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan pada status metilasi antar kelompok ($p > 0,05$). Meskipun demikian, penelitian ini menunjukkan bahwa saliva berpotensi digunakan sebagai sampel non-invasif untuk mendeteksi metilasi DNA pada gen target terkait NPC.

Kata Kunci: *Epstein-Barr Virus*, Metilasi DNA, PCR MSRE

ABSTRACT

ANALYSIS OF SEPTIN9 AND ZNF671 GENE METHYLATION STATUS IN SALIVA SAMPLES AS A POTENTIAL BIOMARKER FOR EARLY DETECTION OF NASOPHARYNGEAL CANCER

By

GHINA AUFA FATHINA AZHAR

Nasopharyngeal carcinoma (NPC), commonly associated with *Epstein-Barr Virus* (EBV) infection, is often diagnosed at an advanced stage due to the anatomically inaccessible location of the nasopharynx. Therefore, early detection through non-invasive methods is crucial. This study aimed to evaluate the methylation status of the SEPTIN9 and ZNF671 genes in saliva as potential biomarkers for early NPC detection. Samples were collected from 20 healthy individuals (10 EBV-positive and 10 EBV-negative), 10 EBV-positive NPC patients, and RAJI cells as a positive control. DNA methylation was assessed using the Methylation Sensitive Restriction Enzyme PCR (MSRE PCR) method with HpaII and MspI enzymes. Normality was tested using the Shapiro-Wilk test, and group comparisons were performed using the Mann-Whitney U test. The results showed no statistically significant differences in methylation status between groups ($p > 0.05$). Although not statistically significant, the findings suggest that saliva is a feasible non-invasive sample for detecting DNA methylation in target genes associated with NPC.

Keywords: *Epstein-Barr Virus*, DNA Methylation, MSRE-PCR

Judul Skripsi : ANALISIS STATUS METILASI GEN SEPTIN9
DAN ZNF671 DALAM SAMPEL SALIVA SEBAGAI
BIOMARKER POTENSIAL UNTUK DETEKSI DINI
KANKER NASOFARING

Nama Mahasiswa : Ghina Aufa Fathina Azhar

Nomor Pokok Mahasiswa : 2157061002

Program Studi : Biologi Terapan

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed.

Ahmad Rusdan Handoyo Utomo, Ph.D.

NIP. 195704241987031001

NIDN. 0310077302

2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA Unila

Dr. Jani Master, S.Si., M.Si.

NIP. 198301312008121001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed.

Sekretaris

Ahmad Rusdan Handoyo Utomo, Ph.D.

Anggota

: Prof. Dr. Hendri Busman, M. Biomed.

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Heri Satria, S. Si., M. Si.

NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 12 Juni 2025

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ghina Aufa Fathina Azhar
NPM : 2157061002
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, bahwa skripsi saya berjudul:

**“Analisis Status Metilasi Gen SEPTIN9 dan ZNF671 dalam Sampel Saliva
Sebagai Biomarker Potensial Untuk Deteksi Dini Kanker Nasofaring”**

Baik gagasan, data, maupun pembahasannya adalah benar karya sendiri yang saya susun dengan mengikuti norma dan etika akademik yang berlaku.

Jika kemudian hari terbukti pernyataan saya tidak benar, saya bersedia menerima sanksi berupa pencabutan gelar sarjana maupun hukum.

Bandar Lampung, 16 Juni 2025



Ghina Aufa Fathina Azhar

NPM. 2157061002

RIWAYAT HIDUP



Penulis, Ghina Aufa Fathina Azhar, lahir di Jakarta pada 14 Agustus 2003 sebagai anak pertama dari dua bersaudara. Terlahir dari kedua orang tua yang berprofesi sebagai dosen, pendidikan selalu menjadi prioritas utama dalam keluarga penulis. Perjalanan pendidikan formal penulis dimulai dari TK Islam AN-Nahl Tangerang (2006-2009), dan dilanjutkan ke SDIT AL-Mufti (2009-2014).

Pendidikan penulis berlanjut ke SMPIT Tunas Harapan Ilahi (2014–2018), di mana penulis aktif mengikuti beragam kegiatan ekstrakurikuler seperti karate, fotografi, English club, serta bergabung dalam organisasi OSIS. Selanjutnya, penulis menempuh pendidikan menengah atas di SMAN 7 Tangerang (2018–2021), salah satu sekolah unggulan di kota tempat penulis tinggal. Pada masa ini, ketertarikan penulis terhadap bidang biologi mulai berkembang melalui keaktifan dalam ekstrakurikuler sains.

Tahun 2021 menjadi titik balik dalam hidup penulis ketika cita-cita menjadi dokter harus penulis relakan setelah beberapa kali kegagalan dalam seleksi masuk fakultas kedokteran. Situasi ini diperburuk dengan wafatnya ayah penulis secara mendadak pada tahun yang sama. Akhirnya, penulis diterima di jurusan Biologi Terapan Universitas Lampung (2021-sekarang), yang penulis pandang sebagai kesempatan baru untuk mengeksplorasi bidang yang masih berhubungan dengan ilmu kesehatan.

Masa awal perkuliahan penulis bertepatan dengan pandemi COVID-19, yang mengharuskan pembelajaran dilakukan secara daring hingga semester ketiga. Selama masa perkuliahan, penulis bergabung dalam Himpunan Mahasiswa Biologi bidang Komunikasi, Informasi, dan Hubungan Masyarakat (KOMINHUM) sebagai bagian dari kegiatan kemahasiswaan. Penulis memperoleh pengalaman praktis melalui Praktik Kerja Lapangan di Laboratorium Genomik Universitas YARSI (Desember 2023–Januari 2024) dengan fokus pada optimasi protokol pemeriksaan gen FMR-1 untuk diagnosis Sindrom Fragile-X.

Pada semester keenam, penulis mengikuti program Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Kuripan, Lampung (Juni–Juli 2024) melalui program Siger Berjaya dengan fokus pada pembuatan bubuk daun katuk sebagai intervensi stunting serta tepung pisang dari hasil pertanian lokal. Setelah menyelesaikan program KKN, penulis mengikuti program Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) sejak September 2024 untuk memperluas pengalaman akademik dan pengembangan diri. Selanjutnya, penulis melaksanakan penelitian skripsi secara intensif sejak Desember 2024 hingga saat ini sebagai bagian dari penyelesaian studi. Berbagai pengalaman dan tantangan selama perjalanan akademik ini telah memberikan pelajaran berharga mengenai ketahanan, kemampuan beradaptasi, serta pentingnya semangat belajar yang berkelanjutan.

HALAMAN PERSEMBAHAN

Dalam setiap langkah perjalanan akademik ini, tersimpan ribuan cerita tentang perjuangan yang tidak selalu terlihat oleh mata. Lelah dan penat seringkali menjadi teman setia, namun harapan yang tak pernah padam menjadi cahaya yang terus menerangi jalan. Karya ini kupersembahkan kepada mereka yang telah menjadi lentera dalam gelap, yang menginspirasi setiap langkah kecilku menuju impian yang semula terasa begitu jauh.

Teruntuk diriku yang tidak pernah menyerah. Di balik lembar-lembar skripsi ini tersembunyi kisah perjuangan yang hanya kau yang tahu malam-malam tanpa tidur, keraguan yang datang silih berganti, dan air mata yang jatuh diam-diam. Namun kau bertahan, terus melangkah meski kadang tertatih. Setiap tantangan yang kau lewati telah membentukmu menjadi pribadi yang lebih tangguh dari sebelumnya. Karya ini adalah bukti bahwa semua kerja kerasmu tidak sia-sia. Semoga pencapaian ini menjadi pengingat akan kekuatanmu sendiri ketika kau merasa lelah di perjalanan selanjutnya.

Kepada Ibuku tercinta, Dr. Juniarti S.Si., M.Si, sosok wanita tangguh yang menjadi panutanku. Terima kasih telah menjadi benteng terkuat dalam hidupku, terutama setelah kepergian Ayah. Doa-doamu adalah kekuatanku, nasihatmu adalah pedomanku, dan cintamu adalah pelindungku. Setiap tetes keringat dan air matamu telah membentuk jalan yang kulalui hari ini. Melalui karya ini, kuharap dapat membuktikan bahwa segala doa dan harapan yang kau titipkan untukku telah tumbuh dan berbuah manis.

Untuk Ayahku, Alm. Dr. Nazwirman S.Kom., MM, meski ragamu telah tiada, namun jejakmu masih terasa dalam setiap langkahku. Engkau yang membangun pondasi kuat dalam hidupku, yang mengajarkan arti ketekunan dan keberanian. Setiap pencapaianku hari ini adalah juga milikmu, Ayah. Di setiap doa dan kenangan, engkau selalu hidup. Kupersembahkan karya ini untukmu, sebagai bukti bahwa nilai-nilai yang kau tanamkan tetap tumbuh subur. Semoga dari surga, engkau tersenyum melihat putrimu semakin yakin melangkah menuju masa depan yang telah kau impikan untukku.

Semoga karya ini menjadi langkah awal menuju masa depan cerah yang kalian impikan untukku, sebuah masa di mana aku dapat membuat kalian bangga dan membagikan cinta yang telah kalian curahkan kepadaku, kepada dunia yang lebih luas.

MOTTO

“Life can be heavy, especially if you try to carry it all at once. Part of growing up and moving into new chapters of your life is about catch and release; you can't carry all things, decide what is yours to hold and let the rest go”

-Taylor Swift-

“To find something, anything, a great truth or a lost pair of glasses, you must first believe there will be some advantage in finding it”

–Jack Burden All the King's Men-

"Berusahalah demi diri sendiri, karena hanya diri sendiri yang tahu sebesar apa usahamu"

-2521-

"Ingatlah, sesungguhnya kepunyaan Allah apa yang ada di langit dan di bumi"

-Q.S Yunus: 55-

SANWACANA

Segala puji dan syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Analisis Status Metilasi Gen SEPTIN9 dan ZNF671 dalam Sampel Saliva Sebagai Biomarker Potensial Untuk Deteksi Dini Kanker Nasofaring”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S. Si) di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Dalam penyusunan skripsi ini, perkenalkan penulis menyampaikan ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu, mendukung, dan membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Dengan segala kerendahan hati, ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Dr. Jani Master, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi dan Gina Dania Pratami, S. Si., M. Si. selaku Ketua Program Studi Biologi Terapan FMIPA Universitas Lampung.
2. Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed. selaku dosen pembimbing 1 dan Ahmad Rusdan Handoyo Utomo Ph.D selaku dosen pembimbing 2 yang telah memberikan bimbingan, waktu, perhatian, saran, serta dukungan kepada penulis sepanjang proses penyusunan skripsi ini.
3. Prof. Dr. Hendri Busman, M.Biomed selaku pembahas yang telah memberikan banyak saran, pembelajaran, dan nasihat agar penulis lebih berkembang menjadi pribadi yang lebih baik.
4. Prof. Endang Linirin Widiastuti, Ph.D selaku Pembimbing Akademik yang telah bersedia meluangkan waktu dalam membimbing dan memberikan arahan selama penulis menjalani perkuliahan ini.

5. Seluruh dosen dan staf karyawan Prodi Biologi Terapan, FMIPA, Universitas Lampung atas dedikasi, serta ilmu yang sangat membantu dan memotivasi penulis dalam proses belajar, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi ini dengan baik.
6. Mba Kinasih Prayuni S.Si., M. Si selaku asisten peneliti di Laboratorium Genomik Universitas Yarsi yang telah mengarahkan, mengajarkan, serta membimbing penulis selama proses penelitian.
7. Keluarga tercinta, Ayah Dr. Nazwirman S.Kom., MM dan terkhusus Ibunda Dr. Juniarti S.Si., M.Si serta Adek Athaya Nasywa Brilian atas kepercayaan, dukungan, kasih sayang, do'a, serta pengorbanan tanpa henti yang selalu diberikan kepada penulis untuk mencapai keberhasilan.
8. Reyhan Mulya Pratama Diva, S.Kg yang telah menemani dan memberikan semangat selama proses penyelesaian skripsi ini.
9. Teman-teman seperjuangan penulis yang sudah mengisi kehidupan kampus penulis.
10. Berbagai pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah memberikan dukungan dalam proses penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari skripsi ini masih memiliki berbagai keterbatasan Dengan segala kerendahan hati, penulis meminta maaf atas kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Penulis sangat menerima kritik serta saran dari berbagai pihak untuk penyempurnaan karya ini. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan kontribusi yang bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, baik bagi penulis sendiri maupun para pembaca.

Bandar Lampung, 12 Juni 2025

Penulis,

Ghina Aufa Fathina Azhar

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	v
MOTTO	vi
SANWACANA	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Kerangka Berpikir	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.5 Hipotesis Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Epigenetika dan Metilasi DNA	6
2.2 Metilasi DNA dalam Regulasi Gen.....	7
2.2.1 Transkripsi dan Translasi.....	7
2.2.2 Mekanisme Metilasi DNA dalam Mempengaruhi Regulasi Gen.....	8
2.2.3 Hipermetilasi dan Hipometilasi.....	9
2.3 Epstein-Barr Virus (EBV)	10
2.3.1 Sejarah, Definisi, dan Struktur EBV	10
2.3.2 Patogenesis EBV	12
2.3.2.1 Fase Infeksi Primer dan Replikasi Litik EBV.....	12
2.3.2.2 Fase Infeksi Laten EBV	13
2.3.2.3 Fase Reaktivasi Litik EBV.....	14
2.3.3 Prevalensi Infeksi EBV dan Kanker Nasofaring.....	14
2.4 Metilasi DNA Terkait Infeksi EBV.....	17
2.4.1 Pengaruh Metilasi pada Genom EBV.....	17

2.4.2	Metilasi DNA pada Gen Host	18
2.5	Penerapan PCR MSRE (<i>Methylation-Sensitive Restriction Enzyme</i>) dengan Enzim Restriksi HPaII dan MspI	19
2.6	Saliva Sebagai Sampel dalam Penelitian Epigenetik	20
III.	METODE.....	22
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2	Alat dan Bahan.....	22
3.2.1	Alat	22
3.2.2	Bahan	22
3.3	Rancangan Penelitian	23
3.4	Kriteria Sampel	23
3.5	Definisi Operasional.....	24
3.6	Prosedur penelitian.....	25
3.6.1	Ekstraksi DNA	25
3.6.2	Optimalisasi Protokol PCR MSRE (<i>Methylation-Sensitive Restriction Enzyme</i>)	26
3.6.3	Penerapan PCR MSRE DNA Saliva	27
3.6.3.1	Perlakuan Enzim restriksi HPaII dan MSPI terhadap DNA	27
3.6.3.2	Amplifikasi PCR	28
3.6.4	Analisis Persen Metilasi DNA	28
3.6.5	Analisis Statistik Perbandingan Persentase Metilasi Antar Kelompok	29
3.7	Diagram Alir	30
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1	Hasil Penelitian dan Analisis Data	31
4.1.1	Analisis Persentase Metilasi Gen SEPTIN9 dan ZNF671	31
4.1.2	Analisis Statistik Persentase Metilasi Gen SEPTIN9 dan ZNF671	33
4.1.3	Analisis Potensi Saliva sebagai Sampel Non-Invasif untuk Deteksi Metilasi Gen SEPTIN9 dan ZNF671	34
4.2	Pembahasan.....	35
4.2.1	Status Metilasi Gen SEPTIN9 dan ZNF671 pada Subjek Normal dan Pasien Kanker Nasofaring	35
4.2.2	Pengaruh Status Infeksi EBV pada Metilasi DNA.....	38
4.2.3	Efektivitas Penggunaan Sampel Saliva dalam Mendeteksi Metilasi DNA	39
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1	Kesimpulan	41
5.2	Saran.....	41
	DAFTAR PUSTAKA	42
	LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Definisi Operasional.....	24
Tabel 3.2 Sekuen Primer Target DNA Metilasi	26
Tabel 3.3 Tempat Pemotongan HpaII dan MspI pada Sekuen Produk SEPTIN9 dan ZNF671	28
Tabel 4. 1 Statistik Deskriptif Persentase Metilasi gen SEPTIN9.....	31
Tabel 4. 2 Statistik Deskriptif Persentase Metilasi gen ZNF671	32
Tabel 4. 3 Proporsi Sampel yang Termetilasi pada Gen SEPTIN9 dan ZNF671	32
Tabel 4. 4 Perbandingan Persentase Metilasi Gen SEPTIN9 dan ZNF671 antar Kelompok Berdasarkan Uji Mann-Whitney	33
Tabel 4. 5 Deteksi Metilasi Gen SEPTIN9 dan ZNF671 dalam Sampel Saliva secara Keseluruhan.....	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Struktur EBV	11
Gambar 2. 2 Distribusi Usia Penderita NPC berdasarkan CMNH tahun 2013 ..	15
Gambar 2. 3 Karakteristik Sosiodemografi Pasien NPC di CMNH.....	16
Gambar 2. 4 Mekanisme MSRE.....	20
Gambar 3. 1 Design Penelitian.....	23
Gambar 3. 2 Diagram Alir Penelitian.....	30

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker nasofaring (NPC) telah menjadi tantangan kesehatan masyarakat yang signifikan di Indonesia. Data epidemiologi menunjukkan angka kejadian NPC mencapai 6,2 per 100.000 penduduk, yang menghasilkan sekitar 13.000 kasus baru setiap tahunnya. Penyakit ini umumnya menyerang individu pada usia produktif, yaitu antara 20 hingga 50 tahun. Kondisi tersebut berdampak signifikan terhadap aspek sosial dan ekonomi, terutama melalui penurunan produktivitas serta peningkatan beban biaya pelayanan kesehatan (Adham *et al.*, 2012).

Kompleksitas NPC terletak pada karakteristik anatomisnya yang tersembunyi di daerah nasofaring, ditambah dengan manifestasi gejala awal yang bersifat non-spesifik. Kondisi ini menyebabkan sebagian besar diagnosis NPC baru ditegakkan pada stadium lanjut, sehingga mempersulit upaya deteksi dini (Chan *et al.*, 2017). Realitas tersebut menegaskan kebutuhan mendesak akan pengembangan metode skrining yang tidak hanya efektif secara klinis, tetapi juga mudah diakses secara geografis dan ekonomis. Hal ini menjadi sangat krusial di wilayah endemik seperti Indonesia, di mana keterbatasan akses terhadap fasilitas diagnostik canggih masih menjadi kendala utama dalam penanganan NPC.

Patogenesis NPC erat kaitannya dengan infeksi *Epstein-Barr Virus* (EBV), virus herpes yang hampir ditemukan pada semua manusia dan berperan besar dalam perkembangan kanker ini (Su *et al.*, 2023). EBV tidak hanya bertindak

sebagai pemicu awal terjadinya kanker, tetapi juga menginduksi perubahan epigenetik yang mendasar dalam proses karsinogenesis. Di antara berbagai perubahan epigenetik yang terjadi, metilasi DNA merupakan kunci mekanisme yang mempengaruhi ekspresi gen dalam sel. Metilasi DNA adalah proses epigenetik di mana gugus metil ditambahkan pada residu sitosin di pulau CpG, yang secara langsung mempengaruhi aktivitas gen tanpa mengubah sekuens DNA itu sendiri (Hsu *et al.*, 2025).

Perubahan pola metilasi DNA dalam NPC menunjukkan dua fenomena yang berbeda namun saling berkaitan dalam proses karsinogenesis. Hipermetilasi atau peningkatan metilasi pada promotor gen *tumor suppressor* dapat menurunkan ekspresi gen tersebut, sehingga memungkinkan sel-sel abnormal tumbuh tanpa kontrol dan berkembang menjadi kanker (Mazloumi *et al.*, 2022). Di sisi lain, hipometilasi atau penurunan metilasi di daerah yang seharusnya tetap dimetilasi dapat mengaktifkan onkogen, yaitu gen yang mendorong pertumbuhan dan pembelahan sel secara tidak terkendali. Fenomena hipometilasi ini sangat menarik karena sering ditemukan pada tahap awal penyakit dan berperan penting dalam transformasi sel normal menjadi sel kanker (Hoang & Landi, 2022).

Keberadaan perubahan epigenetik pada stadium awal perkembangan NPC memberikan peluang besar untuk pengembangan strategi diagnostik yang lebih efektif. Perubahan epigenetik ini dapat dideteksi pada berbagai sampel biologis yang relatif mudah diperoleh, sehingga membuka peluang untuk metode diagnostik yang lebih sederhana dan non-invasif. Pendekatan diagnostik berbasis perubahan epigenetik ini diharapkan dapat mengatasi keterbatasan metode konvensional, khususnya dalam hal aksesibilitas dan efektivitas deteksi dini. Dengan demikian, pengembangan metode skrining berbasis biomarker epigenetik dapat menjadi solusi strategis untuk meningkatkan deteksi dini NPC, terutama di daerah endemik dengan keterbatasan sumber daya diagnostik.

Dalam konteks pengembangan metode diagnostik non-invasif tersebut, saliva muncul sebagai medium diagnostik yang sangat menjanjikan. Pendekatan penggunaan saliva memiliki beberapa keunggulan utama, yaitu sifatnya yang non-invasif, mudah dikumpulkan, dan memungkinkan pengambilan sampel secara mandiri. Keunggulan ini menjadi sangat relevan terutama di daerah dengan sumber daya kesehatan terbatas. Saliva mengandung berbagai biomolekul penting dan sel turunan tumor yang menawarkan potensi untuk skrining kanker kepala dan leher, termasuk NPC, dengan sensitivitas dan spesifisitas yang baik. Penggunaan saliva sebagai medium diagnostik tidak hanya meningkatkan kenyamanan pasien, tetapi juga dapat mengurangi biaya dan risiko komplikasi dibandingkan dengan metode invasif seperti biopsi atau pengambilan darah (Kumar *et al.*, 2024).

Berdasarkan potensi tersebut, fokus penelitian diarahkan pada evaluasi metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671 dalam saliva sebagai biomarker untuk deteksi dini NPC. Pemilihan kedua gen ini didasarkan pada studi terdahulu yang menunjukkan bahwa SEPTIN9 mengalami hipermetilasi pada 92% kasus NPC dengan sensitivitas mencapai 90,5% dalam sampel *swab* nasofaring (Lyu *et al.*, 2020). Sementara itu, ZNF671 juga menunjukkan pola metilasi yang signifikan dalam jaringan NPC mencapai 8,9 kali lebih tinggi dibandingkan jaringan non-NPC (Xu *et al.*, 2020). Meskipun demikian, pemanfaatan kedua gen ini dalam saliva sebagai medium diagnostik masih belum banyak dieksplorasi, sehingga menjadi celah pengetahuan yang perlu dijawab.

Penelitian ini menerapkan teknik *Methylation-sensitive restriction enzyme PCR* (PCR MSRE) untuk mengidentifikasi pola metilasi yang khas, sehingga dapat membedakan individu sehat dari pasien NPC. Keberhasilan validasi metilasi SEPTIN9 dan ZNF671 dalam saliva berpotensi menjadi terobosan menuju pengembangan alat skrining yang terjangkau dan mudah diakses. Pada akhirnya, hal ini diharapkan dapat berkontribusi dalam menurunkan angka kematian akibat NPC di Indonesia, sehingga penelitian ini tidak hanya

memiliki nilai ilmiah tetapi juga dampak nyata dalam menjawab kebutuhan kesehatan masyarakat.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengidentifikasi status metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671 pada sampel subjek normal dan pasien kanker nasofaring.
2. Mengidentifikasi potensi deteksi metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671 dalam sampel saliva sebagai sumber non-invasif.

1.3 Kerangka Berpikir

Kanker nasofaring memiliki karakteristik yang tersembunyi sehingga menyulitkan deteksi dini. Ketika gejala mulai dirasakan, kanker ini sering kali sudah memasuki stadium lanjut dan peluang kesembuhan menjadi sangat kecil. Kondisi ini mendorong perlunya dikembangkan cara baru untuk mendeteksi kanker nasofaring lebih awal, sehingga pasien memiliki kesempatan hidup yang lebih baik.

Kunci pemecahan masalah terletak pada pemahaman bahwa virus EBV yang menginfeksi sel-sel nasofaring meninggalkan jejak molekuler berupa perubahan pola metilasi DNA. Perubahan ini terjadi pada gen-gen penting seperti SEPTIN9 dan ZNF671 yang berperan sebagai gen *tumor suppressor*, sehingga menciptakan pola metilasi khusus yang dapat membedakan antara sel normal dan sel yang berpotensi menjadi kanker. Menariknya, perubahan molekuler ini umumnya terjadi jauh sebelum munculnya gejala klinis, sehingga memberikan peluang strategis untuk deteksi dini.

Berdasarkan fenomena tersebut, penelitian ini dibangun atas asumsi bahwa pola metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671 pada individu yang sehat akan berbeda secara signifikan dengan pola metilasi pada penderita kanker nasofaring. Perbedaan pola ini dapat dijadikan sebagai potensi biomarker

yang dapat diandalkan untuk membedakan status kesehatan seseorang, bahkan sebelum gejala klinis berkembang.

Untuk membuktikan konsep ini, penelitian dilakukan menggunakan pendekatan yang praktis dan mudah diterima oleh masyarakat, yaitu menganalisis saliva sebagai sumber sampel. Dari sampel saliva tersebut, DNA akan diekstraksi dan dianalisis untuk mengidentifikasi pola metilasi kedua gen target. Keberhasilan penelitian ini akan menghasilkan inovasi berupa metode skrining yang sederhana, ekonomis, dan dapat diakses secara luas. Dengan adanya cara deteksi dini yang lebih praktis, diharapkan kasus kanker nasofaring dapat ditemukan pada stadium awal, sehingga angka kematian akibat penyakit ini dapat ditekan secara signifikan.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan dasar mengenai perbedaan status metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671 pada sampel saliva subjek normal dan pasien kanker nasofaring.
2. Mendukung penggunaan saliva sebagai sampel non-invasif yang efektif untuk analisis metilasi gen.

1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671 meningkat pada sampel saliva pasien kanker nasofaring dibandingkan dengan sampel saliva subjek normal.
2. Sampel saliva efektif untuk mendeteksi metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Epigenetika dan Metilasi DNA

Epigenetika adalah bidang studi yang berfokus pada perubahan ekspresi gen tanpa mengubah urutan DNA itu sendiri, memainkan peran kunci dalam pengaturan aktivasi atau inaktivasi gen yang memengaruhi perkembangan dan fungsi organisme (Tao et al., 2024). Mekanisme utama epigenetik mencakup modifikasi kimia pada DNA atau protein histon, seperti metilasi DNA dan asetilasi histon. Metilasi DNA, yang melibatkan penambahan gugus metil pada sitosin dalam dinukleotida CpG, sering kali menyebabkan inaktivasi gen dengan menghambat akses mesin transkripsi ke DNA (Zhang *et al.*, 2023). Sebaliknya, asetilasi histon, yang dikatalisis oleh enzim histone acetyltransferase (HAT), dapat membuka struktur kromatin, memfasilitasi transkripsi gen dengan meningkatkan aksesibilitas DNA untuk faktor transkripsi (Tao *et al.*, 2024).

Epigenetika menunjukkan bagaimana faktor lingkungan dan gaya hidup mempengaruhi ekspresi gen. Pola makan, pola tidur, paparan bahan kimia, dan stres berperan dalam aktivitas epigenetik, yang berkontribusi pada perkembangan penyakit kronis serta respons terhadap pengobatan. Penelitian epigenetik telah memberikan wawasan baru dalam memahami penyakit genetik dan kompleks, termasuk kanker, diabetes, dan gangguan neuropsikiatrik, serta membuka peluang pengembangan terapi yang lebih tepat sasaran dan pencegahan penyakit melalui intervensi epigenetik (Saraswaty *et al.*, 2023).

Metilasi DNA adalah proses penambahan gugus metil (CH_3) pada basa sitosin (C) dalam DNA, khususnya pada situs dinukleotida CpG. Situs CpG adalah area di mana sitosin dan guanin berdekatan dalam satu untai DNA. Ketika terjadi metilasi pada situs CpG di daerah promotor gen, biasanya dapat menyebabkan gen tersebut menjadi tidak aktif atau mengalami penurunan ekspresi. Proses ini merupakan salah satu mekanisme penting dari epigenetik, yang berarti bahwa metilasi DNA dapat mempengaruhi ekspresi gen tanpa mengubah urutan DNA. Dalam genom mamalia, sekitar 60% situs CpG mengalami metilasi yang terjadi di daerah yang dikenal sebagai "*CpG island*". Oleh karena itu, metilasi DNA berperan penting dalam regulasi gen dan menjaga stabilitas genom (Joseph *et al.*, 2018; Almatarneh *et al.*, 2022).

2.2 Metilasi DNA dalam Regulasi Gen

2.2.1 Transkripsi dan Translasi

Transkripsi adalah proses di mana molekul asam ribonukleat (mRNA) pembawa pesan dibentuk berdasarkan urutan DNA suatu gen. RNA polimerase merupakan enzim yang bertanggung jawab untuk sintesis mRNA dari DNA, mengenali dan mengikat ke daerah promotor yang terletak di hulu gen sebelum memulai transkripsi. Setelah terbentuk, mRNA berfungsi sebagai *blueprint* untuk perakitan asam amino, di mana setiap *triplet* (pasangan rangkap tiga) basa menyandikan satu asam amino tertentu. Proses ini dilanjutkan dengan translasi, di mana mRNA diterjemahkan menjadi protein yang berperan dalam mengatur atau mendukung fungsi sel. Rangkaian proses transkripsi dan translasi ini menggambarkan dogma sentral biologi molekuler, di mana ekspresi gen berhasil menghasilkan protein fungsional dari urutan genetik tertentu (Saponaro, 2022).

2.2.2 Mekanisme Metilasi DNA dalam Mempengaruhi Regulasi Gen

Metilasi DNA dimediasi oleh satu atau lebih dari sekelompok enzim yang dikenal sebagai DNA metiltransferase (DNMT). Enzim ini mengikat DNA dan "memutar" sitosin dari heliks DNA untuk menambahkan kelompok metil ke posisi 5' dari sitosin. DNMT mencakup DNMT1, DNMT2, dan subfamili DNMT3 yang terdiri dari DNMT3A, DNMT3B, dan DNMT3L. DNMT1 (*DNA Methyltransferase 1*) cenderung mengikat situs DNA yang sudah termetilasi sebagian (hemi-metilasi) dan berperan dalam mempertahankan pola metilasi selama replikasi sel. DNMT1 berlokasi di tempat replikasi DNA dan memastikan pola metilasi ini diwariskan ke sel anak. Sementara itu, DNMT3A dan DNMT3B bertindak sebagai metiltransferase *de novo*, yang berarti mereka dapat menambahkan gugus metil ke DNA yang belum mengalami metilasi. Kedua enzim ini sangat penting selama perkembangan embrio dan gametogenesis, karena mereka bekerja sama untuk menetapkan pola metilasi baru yang diperlukan untuk regulasi gen yang tepat. Terakhir, DNMT3L, meskipun tidak memiliki aktivitas katalitik sendiri (tidak dapat menambahkan gugus metil), enzim ini berfungsi sebagai ko-regulator yang membantu DNMT3A dan DNMT3B dalam proses metilasi *de novo* (Joseph *et al.*, 2018).

Ketika kelompok metil ditambahkan ke daerah promotor gen, hal ini dapat menghalangi faktor transkripsi, yaitu protein yang diperlukan untuk memulai proses transkripsi (pembacaan gen) (Ji *et al.*, 2023).

Penghambatan ini terjadi karena metilasi dapat menarik protein spesifik yang berfungsi sebagai penghambat transkripsi ke urutan DNA yang termetilasi. Misalnya seperti protein MeCP2, yang termasuk kedalam protein pengikat metil CpG. Protein ini akan mengenali dan mengikat secara selektif ke situs CpG yang termetilasi. Ketika protein ini mengikat DNA yang termetilasi, mereka akan memicu deasetilasi pada protein histon. Protein histon berfungsi sebagai "gulungan" tempat DNA membungkus dirinya untuk membentuk struktur yang disebut kromatin.

Dalam konteks regulasi gen, asetilasi histon biasanya membuka struktur kromatin, membuat DNA lebih mudah diakses oleh mesin transkripsi, dan mendukung ekspresi gen. Sebaliknya, deasetilasi histon menyebabkan kromatin menjadi lebih padat dan kurang dapat diakses oleh mesin transkripsi, sehingga mengganggu mekanisme transkripsi dan menghambat ekspresi gen (Ji *et al.*, 2023; Yi-Ming *et al.*, 2023).

2.2.3 Hipermetilasi dan Hipometilasi

Peningkatan metilasi (hipermetilasi) di lokasi yang sebelumnya tidak termetilasi, seperti pada daerah promotor gen *tumor suppressor*, dapat menyebabkan gen tersebut menjadi "dibungkam" atau mengalami *silencing*. Hal ini terjadi karena gugus metil yang ditambahkan dapat menghalangi akses faktor transkripsi ke DNA, yang secara langsung menghambat proses transkripsi sehingga gen tersebut menjadi tidak aktif dan tidak mampu menjalankan fungsinya. Akibatnya, apabila gen *tumor suppressor* yang berperan dalam mencegah pembelahan sel yang tidak terkendali menjadi tidak aktif, maka akan memungkinkan sel kanker untuk tumbuh dan berkembang (Al-Jumaili, 2024).

Sebaliknya, hipometilasi (kurangnya metilasi) memungkinkan akses yang lebih mudah bagi faktor transkripsi ke DNA. Akibatnya, gen yang sebelumnya tidak aktif dapat diaktifkan kembali, sehingga terjadi peningkatan ekspresi gen tersebut. Hal ini dapat mengakibatkan aktivasi gen, terutama gen-gen yang mungkin seharusnya tetap dalam keadaan tidak aktif untuk mencegah pertumbuhan sel yang tidak terkendali. Misalnya, hipometilasi dapat menyebabkan aktivasi gen onkogen, yaitu gen yang ketika diekspresikan secara berlebihan atau tidak terkendali, dapat menyebabkan kanker (Howard *et al.*, 2022). Selain menyebabkan aktivasi gen, hipometilasi juga berkontribusi pada ketidakstabilan genom. Ketidakstabilan ini terjadi karena hipometilasi dapat mengaktifkan elemen transposon yaitu segmen DNA yang dapat berpindah-pindah dari satu lokasi ke lokasi lain dalam genom suatu organisme. Aktivasi

elemen-elemen ini dapat menyebabkan penyisipan, penghapusan, atau duplikasi sekuens DNA di lokasi yang berbeda dalam genom, yang berpotensi menyebabkan mutasi yang mendukung perkembangan kanker atau penyakit lainnya (Pappalardo & Barra, 2021).

2.3 Epstein-Barr Virus (EBV)

2.3.1 Sejarah, Definisi, dan Struktur EBV

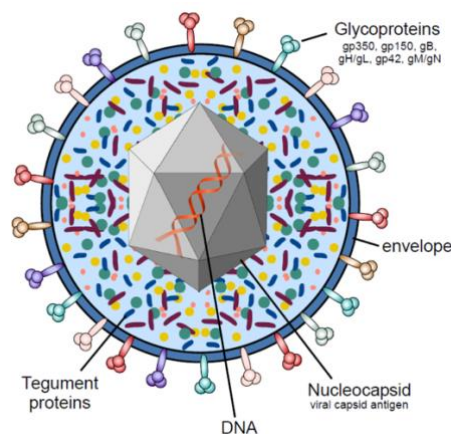
Epstein-Barr Virus (EBV) pertama kali ditemukan oleh Michael Epstein dan Yvonne Barr pada tahun 1964 dalam sampel sel dari limfoma Burkitt (Shechter *et al.*, 2022). Sejak penemuan tersebut, EBV menjadi subjek penelitian yang signifikan. Pada tahun 1966, ditemukan bahwa pasien dengan limfoma Burkitt dan karsinoma nasofaring memiliki kadar antibodi EBV yang tinggi. Tahun 1968, EBV diidentifikasi sebagai penyebab Mononukleosis Infeksiosa (IM) atau sering disebut juga sebagai “*the kissing disease*” karena penyakit ini ditularkan melalui air liur. Penelitian lanjutan kemudian mengonfirmasi adanya asam nukleat spesifik EBV di dalam sel NPC. Sejak itu, DNA EBV ditemukan dalam jaringan dari berbagai jenis kanker lainnya (Yu & Robertson, 2023).

EBV termasuk anggota famili *Herpesviridae*, lebih spesifiknya subfamili *Gammaherpesvirinae* dan juga dikenal sebagai *Human herpesvirus 4* (HHV4) (Shechter *et al.*, 2022). Virus ini umum ditemukan di seluruh dunia dengan prevalensi sekitar 90-95% pada populasi dewasa (Silva *et al.*, 2024). EBV merupakan virus onkogenik pertama yang ditemukan pada manusia dan telah dikaitkan dengan penyakit ganas, termasuk kanker epitel dan limfoma. Penularan utama EBV terjadi melalui air liur, di mana setelah infeksi awal, kadar DNA virus dalam air liur akan terus meningkat (Shechter *et al.*, 2022). Selain itu, penyebaran virus ini juga dapat terjadi melalui paparan cairan tubuh lainnya, seperti air susu ibu (ASI) dan transplantasi organ yang terinfeksi EBV (Huang *et al.*, 2023). Diperkirakan lebih dari 250.000 kasus kanker setiap tahunnya disebabkan

oleh EBV, dan sekitar 2% dari kematian akibat kanker dipicu oleh virus ini (Yu & Robertson, 2023).

Sebagian dari genom EBV mengandung onkogen, yang diekspresikan bersama dengan DNA sel inang. Onkogen tersebut berfungsi sebagai faktor transkripsi, yang dapat mengganggu regulasi pertumbuhan dan proliferasi sel inang, sehingga dapat memicu transformasi sel menjadi ganas (Dewi *et al.*, 2020).

Genom EBV terdiri dari DNA linier berutai ganda yang panjangnya sekitar 172 kilobase dan mengandung sekitar 85 gen (Shechter *et al.*, 2022). Partikel virus EBV berbentuk bulat dan dilindungi oleh kapsid protein berbentuk ikosahedral, yang kemudian dilapisi oleh tegumen. Di bagian luar, virus ini dikelilingi oleh amplop lipid yang mengandung beberapa glikoprotein, seperti gB, gH, dan gL, yang berperan penting dalam proses pengikatan dan masuknya virus ke dalam sel inang. EBV mengkode sekitar 85 protein dan sekitar 50 RNA *noncoding* (Huang *et al.*, 2023).



Gambar 2.1 Struktur EBV

(Sumber:

<https://deainfo.nci.nih.gov/advisory/joint/archive/1215/1315Cohen.pdf>,

diakses pada 10 September 2024)

2.3.2 Patogenesis EBV

Infeksi EBV terdiri dari tiga fase utama yaitu infeksi primer dan replikasi litik, latensi serta reaktivasi litik. Sebagian besar individu mengalami fase laten tanpa menunjukkan gejala klinis yang berbahaya (Huang *et al.*, 2023). Pada saat fase laten, DNA EBV melakukan ekspresi gen yang terbatas dan virus bertahan di dalam sel B memori, yang memungkinkan virus ini dapat menghindari deteksi oleh sistem kekebalan tubuh (Dewi *et al.*, 2020). Namun, ketika kekebalan tubuh melemah, EBV dapat kembali aktif dan memasuki fase reaktivasi litik, yang dapat memicu timbulnya penyakit tertentu (Huang *et al.*, 2023).

2.3.2.1 Fase Infeksi Primer dan Replikasi Litik EBV

Fase infeksi primer EBV dimulai ketika virus masuk ke dalam tubuh manusia melalui rongga mulut, biasanya melalui kontak dengan air liur yang terinfeksi. Pada tahap ini, EBV menginfeksi sel epitel di mukosa orofaring dan sel B yang merupakan bagian dari sistem imun. EBV yang menginfeksi dan bereplikasi dalam sel epitel dan sel B melalui rongga mulut, mengakibatkan pelepasan sejumlah besar virus di orofaring dan masuknya sel B yang terinfeksi ke dalam aliran darah (Huang *et al.*, 2023). Glikoprotein yang terdapat pada amplop virus, seperti gB dan gH/gL, berperan penting dalam proses pengikatan, fusi, dan masuknya virus ke dalam sel inang (Hong *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2023).

Setelah berhasil menginfeksi sel inang, virus akan memasuki fase replikasi litik, di mana EBV bereplikasi secara aktif. Selama fase ini, virus baru diproduksi dalam jumlah besar. Genom EBV mengkode lebih dari 100 protein virus, dan 11 diantaranya diekspresikan pada sel B yang mengalami transformasi akibat infeksi EBV. Protein-protein ini memiliki peran penting dalam mengatur ekspresi gen virus, replikasi DNA virus, pembentukan struktur virion, serta mengatur respon imun sel inang (Dewi *et al.*, 2020).

Infeksi EBV pada sel epitel akan mengaktifkan replikasi virus, produksi virus baru, dan mengakibatkan infeksi litik pada sel inang. Sebaliknya, ketika EBV menginfeksi sel B maka akan menyebabkan infeksi laten dimana sel yang terinfeksi dapat terus bertahan tanpa menunjukkan tanda-tanda replikasi virus secara aktif (Hayman *et al.*, 2023). Aktivasi replikasi virus hanya terjadi pada sebagian kecil sel B yang terinfeksi laten (Dewi *et al.*, 2020).

2.3.2.2 Fase Infeksi Laten EBV

Setelah infeksi primer, EBV memasuki fase laten di mana virus tidak aktif secara replikasi, tetapi tetap bertahan di dalam sel B inang. Selama fase laten ini, EBV bersembunyi di dalam sel inang dan mampu bertahan tanpa memicu gejala atau penyakit yang tampak selama bertahun-tahun. Infeksi laten umumnya terjadi pada sel B memori yang memungkinkan virus untuk menghindari respon imun inang. Selama infeksi laten, replikasi genom EBV hanya terjadi sebanyak satu kali dalam setiap siklus sel dengan bantuan DNA polimerase (Dewi *et al.*, 2020).

Selama infeksi laten, EBV mengekspresikan sejumlah gen, termasuk EBNA (*Epstein-Barr Nuclear Antigen*) dan LMP (*Latent Membrane Protein*), yang membantu kelangsungan hidup sel B yang terinfeksi serta menjaga keberadaan virus dalam jangka panjang (Dewi *et al.*, 2020). Gen-gen ini berperan dalam onkogenesis yang dimediasi EBV (Shechter *et al.*, 2022) dan memungkinkan virus menghindari sistem imun inang untuk melancarkan proses tersebut (Dewi *et al.*, 2020).

EBV bertransformasi layaknya sel inang. Potensi tumorigenik EBV berasal dari gen laten seperti LMP1, LMP2A, LMP2B, EBNA1, dan EBNA2 (Dewi *et al.*, 2020). EBV bersifat spesifik dan unik karena kemampuannya untuk membentuk pola ekspresi gen laten yang bervariasi. Fase laten EBV terdiri dari tiga pola ekspresi gen, yaitu laten tipe I, II, dan III. Genom EBV laten menyebar dalam sel B memori

selama Latensi I, kemudian menginduksi diferensiasi sel B selama Latensi II, dan mendorong pertumbuhan serta transformasi sel B naif melalui ekspresi gen-gen selama Latensi III. Selanjutnya, semua ekspresi gen virus dihentikan pada latensi 0 (Huang *et al.*, 2023).

2.3.2.3 Fase Reaktivasi Litik EBV

Fase reaktivasi litik terjadi ketika EBV yang sebelumnya berada dalam kondisi laten kembali diaktifkan untuk memulai siklus litik. Reaktivasi biasanya dipicu oleh penurunan imunitas inang, stres, atau infeksi lain yang melemahkan sistem kekebalan tubuh (Tan *et al.*, 2023). Selama fase reaktivasi litik, EBV kembali bereplikasi secara aktif, mengekspresikan gen-gen yang terkait dengan fase litik, dan memproduksi partikel virus baru bersifat infeksius yang dapat menyebar ke sel lain atau ditularkan ke individu lain melalui air liur (Damania & Munz, 2019). Setelah bereplikasi, sel baru genom EBV akan membentuk *episom*, memungkinkan virus untuk kembali memasuki fase laten (Dewi *et al.*, 2020).

Reaktivasi litik EBV dapat berperan dalam perkembangan penyakit yang terkait dengan EBV, seperti mononukleosis infeksius, dan pada beberapa kasus, juga berperan dalam patogenesis kanker terkait EBV seperti limfoma dan karsinoma nasofaring. Reaktivasi litik EBV dapat mengaktifkan proliferasi sel B yang terinfeksi dan meningkatkan risiko terjadinya transformasi sel menjadi ganas, terutama pada individu dengan gangguan sistem imun. Dengan demikian, reaktivasi litik EBV tidak hanya memainkan peran dalam penyebaran virus, tetapi juga berpotensi memicu perkembangan penyakit serius terkait EBV (Tan *et al.*, 2023; Dewi *et al.*, 2020).

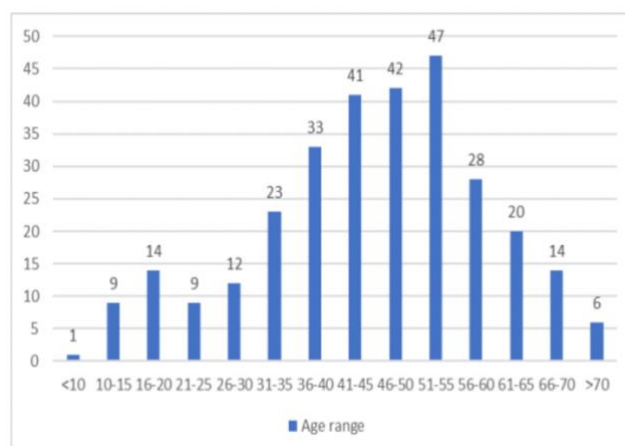
2.3.3 Prevalensi Infeksi EBV dan Kanker Nasofaring

Secara global, EBV bertanggung jawab atas sekitar 1,5% dari semua jenis kanker pada manusia (Shechter *et al.*, 2022). NPC merupakan salah

satu jenis kanker yang paling sering dikaitkan dengan EBV. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Al-Anazi *et al.*, (2023), terdapat prevalensi sebesar 96% infeksi EBV pada pasien NPC. Dalam penelitian lain di Saudi Arabia menunjukkan bahwa 92% dari 25 pasien NPC juga positif terinfeksi EBV. Di beberapa negara lain, prevalensi infeksi EBV pada pasien NPC sangat bervariasi, seperti di Finlandia (62%), Sudan (61,3%), Jepang (63%), dan Turki (87%) (Al-Anazi *et al.*, 2023).

Berdasarkan data dari 11 pusat kesehatan di Indonesia, estimasi insidensi regional NPC adalah 5,66 per 100.000, atau sekitar 1.000 kasus baru setiap bulannya. Namun, angka ini kemungkinan masih jauh dari kenyataan karena banyak kasus yang tidak tercatat, yang disebabkan oleh keterbatasan sumber daya dan fasilitas rumah sakit serta tidak adanya sistem registrasi kanker nasional (Gondhowiardjo *et al.*, 2019).

Berdasarkan data *Hospital Based Cancer Registry* (HBCR) di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (CMNH) tahun 2013, terdapat 299 pasien yang terdiagnosis NPC, dengan 212 pasien (70,9%) laki-laki dan 87 pasien (29,1%) perempuan. Distribusi usia menunjukkan puncak kasus pada kelompok umur 51-55 tahun, dengan usia median 47 tahun, usia termuda 10 tahun, dan usia tertua 77 tahun. Mayoritas pasien berasal dari luar Jakarta (Gondhowiardjo *et al.*, 2019).



Gambar 2.2 Distribusi Usia Penderita NPC berdasarkan CMNH tahun 2013

(Sumber: Gondhowiardjo *et al.*, 2019)

	n	%
Characteristics		
Sex		
Male	212	70.9
Female	87	29.1
Age (Mean $\pm$ SD = 43.53 $\pm$ 13.796)		
6-10	1	0.3
10-15	9	3
16-20	14	4.7
21-25	9	3
26-30	12	4
31-35	23	7.7
36-40	33	11
41-45	41	13.7
46-50	42	14
51-55	47	15.7
56-60	28	9.4
61-65	20	6.7
66-70	14	4.7
>70	6	2
Ethnicity		
Non-chinese	116	38.8
Chinese	8	2.7
Not Listed	175	58.5
Domicile		
Jakarta	102	34.1
Other than Jakarta	162	54.2
Not Listed	35	11.7

Gambar 2. 3 Karakteristik Sosiodemografi Pasien NPC di CMNH

(Sumber: Gondhowiardjo *et al.*, 2019)

Lebih dari 95% orang dewasa sehat dari berbagai kelompok etnis di seluruh dunia adalah pembawa EBV (Adham *et al.*, 2012). Prevalensi infeksi EBV lebih tinggi pada pria dibandingkan wanita, yang mungkin terkait dengan beberapa faktor risiko tertentu (Al-Anazi *et al.*, 2023). Di Indonesia, NPC terkait EBV merupakan penyebab kematian tertinggi kelima di antara jenis kanker lainnya, dengan menduduki peringkat ketiga tertinggi pada pria dan peringkat kelima pada wanita (Sudiono & Hassan, 2013). Selain itu, menurut Afriansya *et al.*, (2023) juga dijelaskan bahwa tingkat kejadian NPC pada pria 2-3 kali lebih tinggi dibandingkan wanita.

Risiko terkena NPC lebih rendah pada individu yang tidak merokok atau merokok kurang dari 30 bungkus per tahun dibandingkan dengan mereka

yang merokok lebih dari jumlah tersebut (Afriansya *et al.*, 2023). Selain infeksi EBV, faktor lingkungan dan kerentanan genetik juga berperan dalam patogenesis NPC. Faktor lingkungan yang diduga berkaitan dengan NPC meliputi diet, paparan bahan kimia di tempat kerja, dan konsumsi tembakau (Sudiono & Hassan, 2013).

Menurut penelitian Ali (2023), prevalensi antibodi IgG anti-EBV lebih tinggi pada remaja dibandingkan anak-anak. Di negara berkembang, infeksi EBV sering terjadi pada anak-anak di usia dini. Sebagian besar anak-anak terinfeksi pada usia 6 tahun dan mengembangkan kekebalan tubuh yang stabil. Sebaliknya, di negara maju, infeksi EBV cenderung tertunda hingga masa remaja.

Sebagai contoh, Balfour *et al.*, (2013) melaporkan bahwa di Amerika Serikat, tingkat infeksi EBV pada anak-anak usia 6-8 tahun relatif rendah 50%, sementara pada remaja usia 18-19 tahun, tingkat infeksi meningkat signifikan menjadi 89%. Selain itu, Kuri (2020), juga menyebutkan bahwa seroprevalensi EBV meningkat bertahap dari masa kanak-kanak hingga remaja, dengan prevalensi pada usia 0–5 tahun mencapai 67,8% pada perempuan dan 72,0% pada laki-laki, lalu meningkat hingga 96,4% pada perempuan dan 95,5% pada laki-laki pada usia 20–25 tahun.

2.4 Metilasi DNA Terkait Infeksi EBV

2.4.1 Pengaruh Metilasi pada Genom EBV

EBV adalah virus umum yang sering menginfeksi tanpa menimbulkan gejala pada sebagian besar individu, tetapi dapat berperan dalam perkembangan berbagai jenis kanker. Dalam sel kanker, genom EBV direplikasi bersamaan dengan genom inang selama siklus sel, namun hanya sebagian kecil gen virus yang diekspresikan. Metilasi DNA pada wilayah CpG genom EBV berperan dalam mengatur ekspresi gen tersebut (Sinclair, 2021; Buschle *et al.*, 2020).

Kasus kanker yang berhubungan dengan EBV menunjukkan tingkat metilasi DNA sangat tinggi, baik pada genom EBV maupun pada gen inang, yang terkait dengan penurunan ekspresi gen *tumor suppressor* tertentu (Ho *et al.*, 2023). EBV mempertahankan dirinya melalui metilasi pada gennya sendiri dan memicu metilasi abnormal pada gen inang yang dapat mengganggu siklus sel dan menyebabkan transformasi sel (Zhang *et al.*, 2022). Metilasi situs CpG pada DNA virus merupakan salah satu bentuk regulasi epigenetik yang terjadi selama fase laten EBV, sehingga gen-gen yang diekspresikan selama fase replikasi litik tidak aktif (Sinclair, 2021). Ketika gen litik tidak aktif, EBV mampu bertahan dalam sel inang tanpa menyebabkan lisis. Sekitar 90% gen EBV tidak diekspresikan, dan sebagian besar kanker yang berhubungan dengan EBV disebabkan oleh tidak aktifnya promotor gen yang menginduksi ekspresi gen-gen yang menghasilkan respons imun (Ho *et al.*, 2023).

2.4.2 Metilasi DNA pada Gen Host

Metilasi DNA pada gen inang EBV merupakan mekanisme epigenetik yang memainkan peran penting dalam patogenesis kanker, termasuk NPC (Lyu *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020). EBV menginfeksi sel inang dan menyebabkan perubahan pada status metilasi gen-gen inang, yang berperan dalam proses transformasi seluler dan penghindaran respons imun. Dalam konteks infeksi EBV laten, metilasi DNA pada gen-gen inang seperti gen *tumor suppressor* sering kali meningkat, menghambat ekspresi gen-gen penting yang bertanggung jawab untuk mengatur siklus sel dan mencegah pertumbuhan sel yang tidak terkendali. Metilasi ini memengaruhi ekspresi gen-gen *tumor suppressor* dan protein imunogenik, sehingga memungkinkan EBV tetap dalam keadaan laten dan mendukung perkembangan sel-sel tubuh yang tidak normal (Scott, 2017).

Pada jaringan NPC, gen inang seperti SEPTIN9 (Lyu *et al.*, 2020), ZNF671 dan RERG (Xu *et al.*, 2020) menunjukkan tingkat metilasi yang

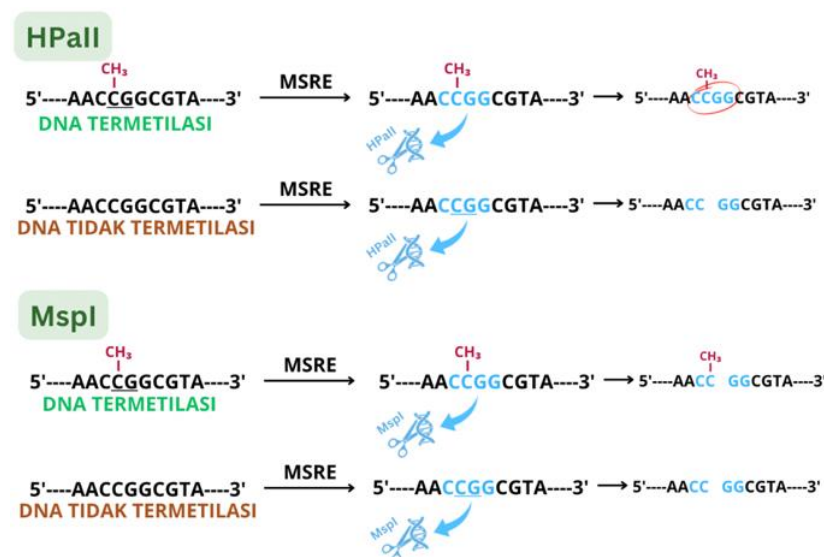
lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan *non-NPC* (Lyu *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2017). SEPTIN9 dan ZNF671 merupakan gen *tumor suppressor* dan telah terbukti mengalami metilasi dalam berbagai tumor. Gen SEPTIN9 mengalami hipermetilasi sekitar 92% pada kasus NPC dan 25% pada kontrol (nasofaringitis dan subyek sehat) (Lyu *et al.*, 2020). Tingkat metilasi yang tinggi ini berhubungan dengan penurunan ekspresi gen yang bertugas mengatur siklus sel, sehingga berkontribusi pada karsinogenesis (Zhao *et al.*, 2017).

Selain SEPTIN9, gen ZNF671 juga ditemukan mengalami hipermetilasi signifikan pada jaringan NPC, dengan tingkat metilasi yang mencapai 8,9 kali lebih tinggi dibandingkan jaringan *non-NPC* (Xu *et al.*, 2020). Prevalensi hipermetilasi ini menunjukkan bahwa SEPTIN9 dan ZNF671 merupakan target epigenetik yang kuat dan berpotensi diandalkan untuk deteksi dini NPC (Xu *et al.*, 2020; Lyu *et al.*, 2020).

2.5 Penerapan PCR MSRE (*Methylation-Sensitive Restriction Enzyme*) dengan Enzim Restriksi HpaII dan MspI

Metilasi DNA dapat dianalisis melalui berbagai metode seperti konversi bisulfit dan *Methylation-Sensitive Restriction Enzyme* (MSRE). Pemilihan metode yang digunakan bergantung pada target analisis yang dituju. MSRE merupakan salah satu metode analisis metilasi DNA yang didasarkan pada sensitivitas enzim restriksi terhadap metilasi pada situs pemotongannya. Metode ini dapat dilakukan tanpa perlu melalui proses konversi bisulfit yang dapat mendegradasi DNA. Enzim MSRE tidak dapat memotong DNA apabila situs restriksinya telah termetilasi, sehingga DNA yang termetilasi akan tetap utuh, sementara DNA yang tidak termetilasi akan dipotong oleh enzim tersebut. Metode ini dapat dilakukan dengan menggunakan kombinasi enzim yang tidak sensitif terhadap metilasi. Pasangan enzim yang paling sering digunakan pada metode ini adalah enzim restriksi HpaII dan MspI (Martisova *et al.*, 2021).

Kedua enzim ini sama-sama memotong urutan spesifik 5'-CCGG-3', di mana MspI dapat memotong baik pada situs yang termetilasi maupun yang tidak, sementara HpaII hanya dapat memotong situs yang tidak termetilasi (Sant *et al.*, 2012). Keunggulan utama dari metode MSRE adalah tidak memerlukan konversi bisulfit, sehingga dapat dilakukan dengan lebih cepat dan membutuhkan input DNA yang lebih sedikit dibandingkan dengan metode konversi bisulfit, yang sering kali memerlukan lebih banyak DNA untuk proses konversi yang kompleks. Namun, kekurangan dari metode ini adalah kemampuannya yang terbatas, yang hanya dapat menganalisis situs target spesifik untuk MSRE (Martisova *et al.*, 2021).



Gambar 2. 4 Mekanisme MSRE

2.6 Saliva Sebagai Sampel dalam Penelitian Epigenetik

Saliva memiliki keunggulan sebagai sampel dalam penelitian epigenetik karena sifatnya yang non-invasif, tanpa prosedur menyakitkan seperti pengambilan darah atau biopsi jaringan, serta mudah diperoleh tanpa prosedur medis kompleks. Saliva mencerminkan komponen biologis darah, termasuk DNA, RNA, protein, dan berbagai metabolit, sehingga memberikan informasi relevan untuk analisis molekuler dalam kondisi yang lebih nyaman bagi pasien (Birknerova *et al.*, 2022). Selain itu, pengumpulan sampel dapat dilakukan secara mandiri tanpa alat medis canggih atau tenaga

ahli, menjadikannya lebih hemat biaya dan mudah diterapkan dalam studi epidemiologi maupun populasi. Saliva dapat dikumpulkan di berbagai setting, termasuk rumah atau klinik, tanpa memerlukan laboratorium khusus, sehingga menjadi pilihan ideal untuk penelitian epigenetik dengan skala sampel besar di berbagai lokasi (Parmar *et al.*, 2021). Dengan kemampuannya mencerminkan status epigenetik tubuh dan proses pengumpulan yang sederhana, saliva merupakan sampel unggul untuk studi epigenetik.

III. METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2024 s/d Januari 2025 di Laboratorium Genomik, Lembaga Penelitian Terpadu Universitas YARSI, Cempaka Putih, Jakarta Pusat, Daerah Khusus Ibukota Jakarta, 10510.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

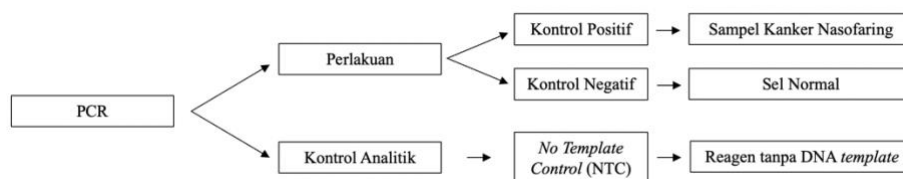
Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mikropipet, tabung mikrosentrifus 1,5 ml, *PCR tube*, *rak tube*, *collection tube*, *Zymo-Spin Columns*, gelas ukur, erlenmeyer, *multimode microplate reader Infinite M200 TECAN*, *centrifuge*, *vortex*, *Mini Centrifuge Spindown*, cetakan gel elektroforesis, elektroforesis, *Gel Documentation*, PCR konvensional, dan RT-PCR.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel saliva subjek normal, saliva pasien kanker nasofaring, sel RAJI yang terinfeksi EBV, *Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit by Zymo Research (BioFluid & Cell Buffer, Proteinase K, Genomic Binding Buffer, DNA Pre-Wash Buffer, g-DNA Wash Buffer, DNA Elution Buffer)*, *Gotaq Green Master Mix 2x*, *SYBR Green master mix*, *Nuclease Free-Water (NFW)*, *Primer ZNF671*, *Primer SEPTIN9*, *rCutSmart Buffer B6004S*, enzim restriksi *HPaII R0171S* (memotong DNA yang termetilasi) dan *MspI R0106S* (memotong DNA yang termetilasi dan yang tidak termetilasi), *6x DNA Loading Dye Green*, agarose, serta *buffer TAE 1x*.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam kategori penelitian deskriptif analitik karena bertujuan untuk membandingkan persentase metilasi DNA antara subjek normal dan pasien kanker nasofaring pada gen SEPTIN9 dan ZNF671. Sel RAJI, yang diketahui memiliki tingkat metilasi tinggi, digunakan sebagai kontrol positif untuk memastikan validitas deteksi metilasi. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa DNA subjek normal umumnya memiliki tingkat metilasi sangat rendah atau bahkan tidak terdeteksi, sementara pada pasien kanker nasofaring, metilasi cenderung jauh lebih tinggi. Selain menganalisis perbedaan tingkat metilasi antar kelompok, penelitian ini juga mengevaluasi efektivitas saliva sebagai sampel dalam mendeteksi metilasi DNA. Dengan demikian, hasil penelitian diharapkan memberikan gambaran menyeluruh tentang pola metilasi serta mengkaji potensi penggunaan gen SEPTIN9 dan ZNF671 sebagai biomarker deteksi dini kanker nasofaring berbasis saliva.



Gambar 3. 1 Design Penelitian

3.4 Kriteria Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel saliva dari subjek normal, pasien kanker nasofaring, dan sel RAJI. Pemilihan sampel normal didasarkan pada karakteristik DNA, yaitu 10 sampel yang terdeteksi positif EBV dan 10 sampel yang terdeteksi negatif EBV. Sementara itu, sampel pasien kanker nasofaring yang digunakan, hanya terdiri dari DNA yang terdeteksi positif EBV. Sampel yang digunakan harus memiliki rasio kemurnian DNA dalam rentang 1,8 hingga 2,0, yang menunjukkan bahwa kualitas DNA memenuhi standar untuk analisis lebih lanjut. Kriteria lain yang dipertimbangkan dalam pemilihan sampel mencakup jenis kelamin laki-laki serta rentang usia yang terdiri atas kelompok dewasa (19–44 tahun) hingga lanjut usia (> 60 tahun),

sebagaimana diatur dalam Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 25 Tahun 2016 (Permenkes Nomor 25 Tahun 2016, diakses pada 6 Februari 2025).

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 3.1**

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Ekstraksi DNA dari Sampel Saliva	Proses isolasi DNA dari sampel saliva untuk memperoleh template DNA yang digunakan dalam analisis status metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671.	<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	Sampel saliva dikumpulkan menggunakan metode <i>Biosaliva Gargle</i> , kemudian DNA diekstraksi menggunakan <i>QIAamp DNA Mini Kit</i> . Setelah ekstraksi, kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan diverifikasi menggunakan spektrofotometer.	Kualitas dan kuantitas DNA (ng/μL)	Kuantitatif (konsentrasi DNA)
2.	PCR MSRE pada DNA Saliva	Proses analisis status metilasi DNA menggunakan PCR MSRE dengan enzim HpaII dan MspI yang sensitif terhadap metilasi.	<i>PCR Reagents</i> , HpaII, MspI, <i>Thermal Cycler</i>	Reagen PCR MSRE diinkubasi menggunakan Visualisasi hasil menggunakan <i>Thermal Cycler</i> . Selanjutnya di elektroforesis gel agarose 2% pada 100 V selama 30 menit.	Hasil elektroforesis: Ada atau tidaknya <i>strand</i> DNA teramplifikasi, tergantung pemotongan oleh enzim HpaII atau MspI	Kualitatif (Ada/Tidak ada <i>strand</i> DNA)
3.	Status Metilasi Gen SEPTIN9 dan ZNF671	Perubahan epigenetik metilasi pada promotor gen SEPTIN9 dan ZNF671 yang memengaruhi ekspresi gen dan berpotensi sebagai biomarker untuk deteksi kanker.	<i>Real-Time PCR</i> , PCR MSRE (<i>Methylating Sensitive Restriction Enzyme</i>)	DNA <i>template</i> hasil ekstraksi dianalisis status metilasinya menggunakan metode PCR MSRE. Amplifikasi dilakukan dengan <i>real-time PCR</i> . <i>Ct-value</i> yang didapatkan digunakan untuk menghitung persentase metilasi dengan rumus $[2^{-\Delta CT(HpaII)} - 2^{-\Delta CT(MspI)}] \times 100\%$.	Nilai metilasi (persentase) pada lokasi tertentu di gen SEPTIN9 dan ZNF671, perbandingan antara sel normal dan sel RAJI	Kuantitatif, skala 0-100%

3.6 Prosedur penelitian

3.6.1 Ekstraksi DNA

Sebanyak 10 µl sampel dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml, kemudian ditambahkan 200 µl *BioFluid & Cell Buffer*, dan 20 µl Proteinase K. Campuran tersebut divortex selama 10-15 detik, lalu diinkubasi pada suhu 55 °C selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan *Genomic Binding Buffer* sebanyak 1x volume dari campuran tersebut dan divortex selama 15-10 detik. Campuran dipindahkan ke dalam *Zymo-Spin Columns* yang diletakkan di dalam *collection tube* kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 x g selama 1 menit. Buang *collection tube* dan diganti dengan *collection tube* yang baru, lalu ditambahkan 400 µl *g-DNA Wash Buffer*, diikuti dengan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 x g selama 1 menit. Cairan yang ada di dalam *collection tube* dibuang, kemudian ditambahkan 700 µl *g-DNA Wash Buffer* ke dalam *Spin Columns* dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 x g selama 1 menit. *Collection tube* dikosongkan dan ditambahkan 200 µl *g-DNA Wash Buffer* ke dalam *Spin Columns*, lalu disentrifugasi pada kecepatan 20.000 x g selama 1 menit. Setelah itu, *collection tube* beserta isinya dibuang, *Spin Columns* dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml baru, dan tambahkan ≥ 50 µl *DNA Elution Buffer*. Campuran diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit, kemudian sentrifugasi pada kecepatan maksimal selama 1 menit untuk mengelusi DNA. Filtrat yang dihasilkan merupakan hasil DNA *template*.

DNA *template* yang didapatkan kemudian di uji secara kuantitatif menggunakan *multimode microplate reader* untuk melihat tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA nya melalui perangkat lunak *Microsoft Excel*. Kemurnian DNA dapat ditentukan dari perbandingan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Hasil isolasi DNA dianggap murni jika rasio absorbansinya berkisar 1,8–2,0. DNA yang terkontaminasi dengan protein dan polisakarida akan memiliki nilai absorbansi kurang dari 1,8,

sedangkan DNA yang terkontaminasi dengan RNA akan memiliki nilai absorbansi lebih dari 2,0 (Dewanata & Mushlih, 2021).

3.6.2 Optimalisasi Protokol PCR MSRE (Methylation-Sensitive Restriction Enzyme)

Primer ZNF671 dan SEPTIN9 yang telah dirancang untuk mendeteksi metilasi DNA akan dicek kemampuannya dalam menghasilkan produk PCR yang spesifik. Optimalisasi suhu *annealing primer* dan jumlah siklus PCR dilakukan untuk memastikan pemeriksaan PCR dapat berlangsung secara efisien pada beberapa target DNA yang termetilasi secara bersamaan. Tujuan dari optimalisasi ini adalah mengembangkan protokol yang efisien dengan suhu *annealing* dan siklus PCR yang sama. Komposisi master mix yang digunakan untuk optimasi meliputi *Gotaq Green Master Mix 2x*, NFW, *primer forward* dan *reverse* ZNF671 dan SEPTIN9, sel RAJI yang terinfeksi dengan dan DNA subyek normal. Kemudian, disiapkan juga satu tube PCR sebagai *No Template Control* (NTC) yaitu 1x volume master mix tanpa DNA *template*. Program PCR akan dioptimasi pada suhu *annealing* 55-60°C untuk menentukan suhu yang paling optimal dalam mengamplifikasi DNA target. Produk PCR kemudian divisualisasi dengan menggunakan gel elektroforesis 2% 100 V, selama 30 menit. Sekuens *primer* ZNF671 dan SEPTIN9 dapat dilihat pada **Tabel 3.2**

Tabel 3.2 Sekuen *Primer* Target DNA Metilasi

Gen Target Metilasi	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>	Panjang Amplikon (bp)
SEPTIN9 manusia	5' AGGCCCTTATTGTGGAGGAA 3'	5' CTTCTGCAGGAGGCTGTATTG 3'	381
ZNF671 manusia	5' CACACTCTACCCACAAACCTATAC3'	5' GGACAGCCTGACAGAAACAA3'	138

3.6.3 Penerapan PCR MSRE DNA Saliva

3.6.3.1 Perlakuan Enzim restriksi HpaII dan MspI terhadap DNA

Setelah protokol PCR sudah optimal, langkah selanjutnya adalah menerapkan protokol tersebut pada sampel saliva. PCR MSRE akan mengandalkan enzim restriksi HpaII dan MspI yang keduanya mengenali urutan spesifik 5'-CCGG-3' dalam DNA. Enzim HpaII hanya dapat memotong situs ini jika basa C tidak mengalami metilasi. Oleh karena itu, apabila basa C pada situs restriksi mengalami metilasi, maka HpaII tidak dapat memotong DNA tersebut, sehingga produk PCR tetap terbentuk. Enzim HpaII umumnya digunakan berpasangan dengan enzim MspI sebagai pembanding, dikarenakan enzim ini tidak dipengaruhi oleh metilasi dan akan tetap memotong DNA baik dalam keadaan metilasi maupun tidak. Jika HpaII tidak memotong DNA sedangkan MspI memotong, maka dapat dipastikan ada metilasi pada situs CpG.

Pemotongan DNA dengan enzim restriksi dilakukan dengan komposisi master mix yang 1x volume nya berisi 50 µl yang terdiri dari 2,5 µl DNA, 5 µl *rCutSmart Buffer*, 1,25 µl enzim restriksi, dan 41,25 µl NFW. Inkubasi HpaII dilakukan pada 37°C selama 15 menit, diikuti dengan pemanasan 80°C selama 20 menit, dan suhu simpan pada 4°C; MspI diinkubasi pada 37°C selama 15 menit, dan suhu simpan pada 4°C. Tempat pemotongan sekuen DNA *primer* ZNF671 oleh enzim restriksi HpaII dan MspI dapat dilihat pada **Tabel 3.3**.

Tabel 3.3 Tempat Pemotongan HpaII dan MspI pada Sekuen *Produk SEPTIN9 dan ZNF671*

Gen	Sekuen
Target	
Metilasi	
SEPTIN9	5'AGGCCCTTATTGTGGAGGAAGGGAGGCGTCGCCCCGTCCCTGGCTTCT CTGACAGCCGTGTTCCATCCCCGCCCTGTGCCCCCTTCTC CCGG ACAGTG CCTTCTCCAGGGCTCACCCAGGAGGGTGCAGCGGTGGCCCC CCGG GGCG GTGGTCGTGGTGGGGGTGTTAGCTGCAGGGGTGCCCTCGGTGGGTGGG AGTTGGTGGCCTCTCGCTGGTGGCATGGGACTCGCATGTTCCGCCCTGCG CCCCTCGGCTCTTGAGCCACAGG CCGG GATCCTGCCTGCCAGCCGCG TGCCTGCGGTTTAACCCCTGCAGGCGCAGAGCGCGCGGCGCGGTGA CAGAGAACTTTGTTTGGCTGCCCAAATACAGCCTCCTGCAGAAG 3'
ZNF671	5'GGACAGCCTGACAGAAACAAAATGTCCGCTACAAGGAGGAG CCGGA AGTCCCGCCACGCACCCCGCAGGCACTGAAACACCCCTCTCCTGG GCCCTCATTGGGTATGCAACGTATAGGTTTGTGGGTAGAGTGTG3'

3.6.3.2 Amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR dilakukan melalui metode RT-PCR menggunakan sampel DNA, baik yang telah dipotong dengan enzim restriksi maupun yang tidak mengalami pemotongan sebagai perbandingan. Komposisi master mix PCR disiapkan dengan 1x volume total 20 µl, 10 µL *SYBR Green master mix*, 0,5 µL primer *forward* dan *reverse* (10 µM), 2 µL DNA *template*, serta 7 µL *Nuclease-Free Water*. Campuran ini selanjutnya diamplifikasi menggunakan program PCR yang telah dioptimalkan sebelumnya. Status metilasi dapat dianalisis dari nilai Ct (*Cycle threshold*) *value* atau jumlah siklus yang dibutuhkan dari produk amplifikasi mencapai ambang tertentu yang dapat terdeteksi.

3.6.4 Analisis Persen Metilasi DNA

Persentase metilasi DNA dianalisis menggunakan *Microsoft Excel* berdasarkan nilai Ct (*Cycle threshold*) dari produk RT-PCR. Perhitungan dilakukan dengan rumus $[2^{-\Delta CT(HpaII)} - 2^{-\Delta CT(MspI)}] \times 100\%$, di mana ΔCT merupakan selisih antara Ct DNA hasil pemotongan enzim dengan Ct DNA tanpa perlakuan enzimatis (Ni *et al.*, 2018).

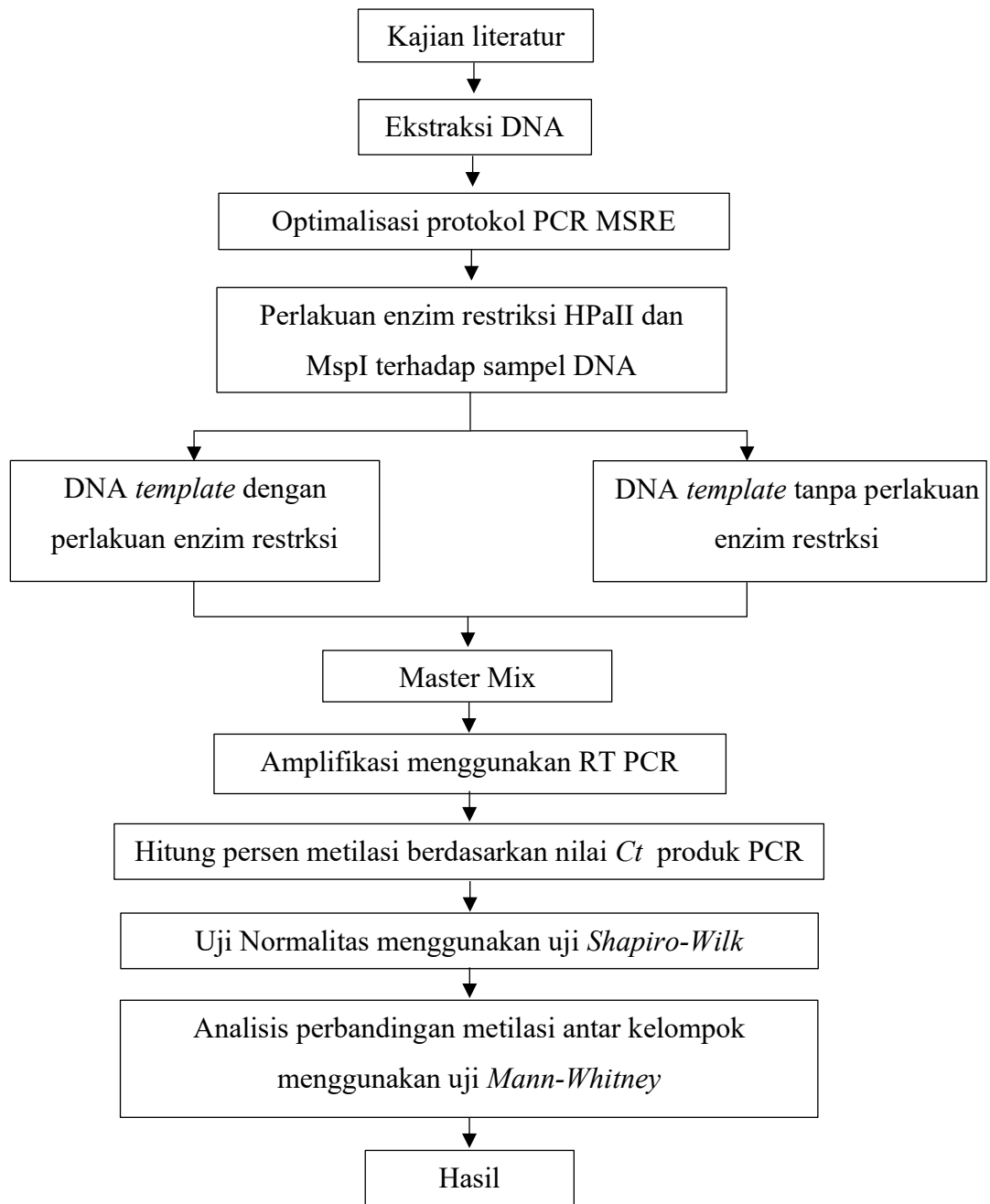
3.6.5 Analisis Statistik Perbandingan Persentasi Metilasi Antar Kelompok

Analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak IBM SPSS *Statistics* versi 26. Sebelum melakukan analisis perbandingan, dilakukan uji normalitas data dengan metode *Shapiro-Wilk*. Metode ini dipilih karena merupakan uji normalitas yang memiliki kekuatan statistik lebih baik untuk sampel yang berukuran kecil ($n < 30$). Uji *Shapiro-Wilk* dilakukan pada data persentase metilasi untuk setiap kelompok, dengan nilai $p < 0,05$ menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal.

Hasil uji normalitas menunjukkan sebagian besar data persentase metilasi tidak berdistribusi normal, sehingga perbandingan antar kelompok dilakukan menggunakan uji non-parametrik *Mann-Whitney*. Uji *Mann-Whitney* dipilih karena merupakan alternatif dari uji t independen ketika asumsi normalitas tidak terpenuhi dan cocok untuk membandingkan perbedaan median antara dua kelompok independen. Perbandingan dilakukan untuk menganalisis perbedaan persentase metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671 antara: (1) subjek normal keseluruhan dengan pasien kanker nasofaring, (2) subjek normal positif EBV dengan subjek normal negatif EBV, dan (3) subjek normal positif EBV dengan pasien kanker nasofaring positif EBV. Nilai $p < 0,05$ dianggap menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik.

3.7 Diagram Alir

Diagram alir penelitian ini dapat dilihat pada **Gambar 3.2**



Gambar 3. 2 Diagram Alir Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Analisis metilasi gen SEPTIN9 dan ZNF671 menunjukkan tidak adanya peningkatan signifikan secara statistik pada pasien kanker nasofaring dibandingkan dengan subjek normal ($p > 0,05$).
2. Metilasi gen SEPTIN9 (53,3%) dan ZNF671 (100%) terdeteksi dalam sampel saliva, mendukung potensinya sebagai sampel non-invasif untuk deteksi kanker nasofaring.

5.2 Saran

1. Melakukan penelitian lanjutan menggunakan biomarker lain dari sampel saliva untuk mendapatkan hasil yang lebih komprehensif.
2. Melakukan penelitian lanjutan dengan menguji ulang biomarker SEPTIN9 dan ZNF671 dengan jenis sampel lain untuk membandingkan efektivitasnya dengan sampel saliva.

DAFTAR PUSTAKA

- Adham, M., Kurniawan, A. N., Muhtadi, A. I., Roezin, A., Hermani, B., Gondhowiardjo, S., & Middeldorp, J. M. (2012). Nasopharyngeal carcinoma in Indonesia: Epidemiology, incidence, signs, and symptoms at presentation. *Chinese Journal of Cancer*, 31(4), 185–196
- Afriansya, R., Rosidah, U. & Sofyanita, E.N., 2023. Deteksi Karsinoma Nasofaring Menggunakan Rapid Test Uji Imunokromatografi pada Petugas SPBU. *Jurnal Laboratorium Medis*, 5(1), 29-33
- Al-Anazi, A. E., Alanazi, B. S., Alshanbari, H. M., Masuadi, E., Hamed, M. E., Dandachi, I., & Alosaimi, B. (2023). Increased prevalence of EBV infection in nasopharyngeal carcinoma patients: a Six-Year Cross-Sectional study. *Cancers*, 15(3), 643.
- Al-Jumaili, M. M. O. (2024). Transcription Silencing and CpGs Hypermethylation as Therapeutic Gene Editing in Clinical Colorectal Adenocarcinoma Repression. *The Korean Journal of Gastroenterology*, 83(1), 6-16.
- Ali, Aesha Saber. (2023). 1. Serological Prevalence of Latent *Epstein-Barr Virus* Infection in Children and Adolescents. *Med Clin Res*, 8(10), 01-06.
- Almatarneh, Mansour H., Kayed, Ghada G., Al Abbad, Sanaa S., Alsunaidi, Zainab H.A., Al-Sheraideh, Mohammed S., Zhao, Yuming. (2022). Mechanistic study on DNA mutation of the cytosine methylation reaction at C5 position. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(8), 1878-5352.
- Balfour Jr, Henry H., et al. (2013). Age-specific prevalence of *Epstein-Barr virus* infection among individuals aged 6–19 years in the United States and factors affecting its acquisition. *The Journal of infectious diseases*, 208(8), 1286-1293.

- Birknerova, N., Mancikova, V., Paul, E. D., Matyasovsky, J., Cekan, P., Palicka, V., & Parova, H. (2022). Circulating cell-free DNA-based methylation pattern in saliva for early diagnosis of head and neck cancer. *Cancers*, 14(19), 4882.
- Buschle, A., Hammerschmidt, W. (2020). Epigenetic lifestyle of *Epstein-Barr virus*. *Semin Immunopathol*, 42, 131–142.
- Chan, K. C. A., Woo, J. K. S., King, A., Zee, B. C. Y., Lam, W. K. J., Chan, S. L., ... & Lo, Y. M. D. (2017). Analysis of plasma *Epstein-Barr virus* DNA to screen for nasopharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 513–522.
- Cohen, J. I. Epstein–barr virus vaccines. Presentation at the Laboratory of Infectious Diseases National Institutes of Health. <https://deainfo.nci.nih.gov/advisory/joint/archive/1215/1315Cohen.pdf>, diakses pada 10 September 2024.
- Damania, B., & Münz, C. (2019). Immunodeficiencies that predispose to pathologies by human oncogenic γ -herpesviruses. *FEMS microbiology reviews*, 43(2), 181-192.
- Dewanata, P. A., & Mushlih, M. (2021). Differences in DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15.
- Dewi, S. P., Yudartho, M. A., & Gondhowiardjo, S. A. (2020). Kadar Plasma *Epstein-Barr Virus* (EBV) DNA sebagai Parameter Prognosis pada Kanker Nasofaring Tidak Berkeratin. *Radioterapi & Onkologi Indonesia*, 11(1), 17-23.
- Dufek, G., Katriel, G., Snir, S., & Pellegrini, M. (2024). Exponential dynamics of DNA methylation with age. *Journal of Theoretical Biology*, 579, 111697.
- Ghaly, S. M., Khayyal, A. E., Naguib, A. M., & Abdelshafi, I. A. A. (2024). Evaluation of Methylated Septin 9 as a Biomarker in Colorectal Carcinoma. *QJM: An International Journal of Medicine*, 117(Supplement_2), hcae175-402.
- Glover, S., Illyuk, J., Hill, C., McGuinness, B., McKnight, A. J., & Hunter, R. F. (2025). A systematic review of associations between the environment, DNA methylation, and cognition. *Environmental Epigenetics*, 11(1), dvae027.
- Gondhowiardjo, S. A., Meidania, L., Senoaji, F., & Sekarutami, S. M. (2019). Nasopharyngeal Carcinoma Profile in dr. Cipto Mangunkusumo Hospital Year 2013. *Radioterapi & Onkologi Indonesia*, 10(1), 8-11.
- Hayman, I. R., Temple, R. M., Burgess, C. K., Ferguson, M., Liao, J., Meyers, C., & Sample, C. E. (2023). New insight into *Epstein-Barr Virus* infection using models of stratified epithelium. *PLoS pathogens*, 19(1), e1011040.

- Ho, J. W., Li, L., Wong, K. Y., Srivastava, G., & Tao, Q. (2023). Comprehensive profiling of EBV gene expression and promoter methylation reveals latency II viral infection and sporadic abortive lytic activation in peripheral T-cell lymphomas. *Viruses*, 15(2), 423.
- Hoang, P. H., & Landi, M. T. (2022). DNA methylation in lung cancer: mechanisms and associations with histological subtypes, molecular alterations, and major epidemiological factors. *Cancers*, 14(4), 961.
- Hong, J., Wei, D., Zhong, L., Wu, Q., Chen, K., Zhang, W., & Chen, Y. (2022). Glycoprotein B antibodies completely neutralize EBV infection of B cells. *Frontiers in Immunology*, 13, 920467.
- Howard, Cedar., Ofra, Sabag., Yitzhak, Reizel. (2022). (9) The role of DNA methylation in genome-wide gene regulation during development. *Development*, 49 (2): dev200118.
- Hsu, C. L., Chang, Y. S., & Li, H. P. (2025). Molecular diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: Past and future. *Biomedical Journal*, 48(1), 100748.
- Hsu, W. L., Chien, Y. C., Huang, Y. T., Yu, K. J., Ko, J. Y., Lin, C. Y., & GEV-NPC Study Group. (2020). Cigarette smoking increases the risk of nasopharyngeal carcinoma through the elevated level of IgA antibody against *Epstein-Barr virus* capsid antigen: a mediation analysis. *Cancer medicine*, 9(5), 1867-1876.
- Huang, W., Bai, L., & Tang, H. (2023). *Epstein-Barr virus infection*: the micro and macro worlds. *Virology Journal*, 20(1), 220.
- Ji, J., Jing, A., Geng, T., Ma, X., Liu, W., & Liu, B. (2023). Protein modifications in epigenetic dysfunctional diseases: mechanisms and potential therapeutic strategies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1216637.
- Jiang, Y. H., Liu, Y. S., Wei, Y. C., Jhang, J. F., Kuo, H. C., Huang, H. H., & Wang, H. J. (2024). Hypermethylation loci of ZNF671, IRF8, and OTX1 as potential urine-based predictive biomarkers for bladder cancer. *Diagnostics*, 14(5), 468.
- Joseph DB., Strand DW., Vezina CM. (2018). DNA methylation in development and disease: an overview for prostate researchers. *Am J Clin Exp Urol*, 6(6):197-218.
- Karlow, J. A., Pehrsson, E. C., Xing, X., Watson, M., Devarakonda, S., Govindan, R., & Wang, T. (2022). Genome-Wide Epigenomic Profiling of Primary Non-Small Cell Lung Cancer Reveals Specific and Recurrent DNA Methylation Alterations in Smoker Versus Never-Smoker Patients. *bioRxiv*, 2022-10.
- Klemp, I., Hoffmann, A., Müller, L., Hagemann, T., Horn, K., Rohde-Zimmermann, K., & Keller, M. (2022). DNA methylation patterns reflect individual's lifestyle independent of obesity. *Clinical and Translational Medicine*, 12(6), e851.

- Kumar, P., Gupta, S., & Das, B. C. (2024). Saliva as a potential non-invasive liquid biopsy for early and easy diagnosis/prognosis of head and neck cancer. *Translational oncology*, 40, 101827.
- Kuri, Ashvin., Jacobs, Benjamin Meir., Vickaryous, Nicola., Pakpoor, Julia., Middeldorp, Jaap., Giovannoni, Gavin., Dobson, Ruth. (2020). Epidemiology of *Epstein-Barr Virus* infection and Infectious Mononucleosis in the United Kingdom. *medRxiv*.
- Lin, J. H., Wen, C. P., Jiang, C. Q., Yuan, J. M., Chen, C. J., Ho, S. Y., & Lam, T. H. (2021). Smoking and nasopharyngeal cancer: individual data meta-analysis of six prospective studies on 334 935 men. *International Journal of Epidemiology*, 50(3), 975-986.
- Lyu, J. Y., Chen, J. Y., Zhang, X. J., Zhang, M. W., Yu, G. S., Zhang, L., & Wen, Z. (2020). Septin 9 methylation in nasopharyngeal swabs: a potential minimally invasive biomarker for the early detection of nasopharyngeal carcinoma. *Disease Markers*, 2020(1), 7253531.
- Martisova, A., Holcakova, J., Izadi, N., Sebuyoya, R., Hrstka, R., & Bartosik, M. (2021). DNA methylation in solid tumors: functions and methods of detection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4247.
- Mazloumi, Z., Farahzadi, R., Rafat, A., Asl, K. D., Karimipour, M., Montazer, M., & Charoudeh, H. N. (2022). Effect of aberrant DNA methylation on cancer stem cell properties. *Experimental and Molecular Pathology*, 125, 104757.
- Murata, Y., Fujii, A., Kanata, S., Fujikawa, S., Ikegame, T., Nakachi, Y., & Iwamoto, K. (2019). Evaluation of the usefulness of saliva for DNA methylation analysis in cohort studies. *Neuropsychopharmacology Reports*, 39(4), 301-305.
- Ni, W., Pan, C., Pan, Q., Fei, Q., Huang, X., & Zhang, C. (2018). Methylation levels of IGF2 and KCNQ1 in spermatozoa from infertile men are associated with sperm DNA damage. *Andrologia*, 51(5), e13239.
- Pajares, María J., Palanca-Ballester, Cora., Urtasun, Raquel., Alemany-Cosme, Ester., Lahoz, Agustín., Sandoval, Juan. (2021). Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Methods*, 187, 3-12
- Pappalardo, X.G & Barra, V. (2021). Losing DNA methylation at repetitive elements and breaking bad. *Epigenetics & Chromatin*. 14, 25
- Parmar, G., Khandelwal, N., Jhala, S., & Rana, A. (2021). Whole Saliva (*Oral Bio Fluid*) as a Non-Invasive Biological Marker or Specimen for Detecting the Novel *Corona Virus* in Covid-19 Patients: A Multicentric Study in Surat, Gujarat Population. *International Journal of Research and Review*, 8(3), 672-678

- Patel, A., Patel, S., Patel, P., & Tanavde, V. (2022). Saliva based liquid biopsies in head and neck cancer: how far are we from the clinic?. *Frontiers in oncology*, 12, 828434.
- PERATURAN MENTERI KESEHATAN (Permenkes). Nomor, 25. 2016. RENCANA AKSI NASIONAL KESEHATAN LANJUT USIA TAHUN 2016-2019. Diakses pada 6 februari 2025.
- Qian, T., Zhou, Z., Zhang, Q., Liou, Y. L., & Zhou, H. (2023). SEPT9, H4C6, and RASSF1A methylation in nasopharyngeal swabs: a reflection of potential minimally invasive biomarkers for early screening of nasopharyngeal cancer. *Medicine*, 102(50), e36583.
- Sant, K. E., Nahar, M. S., & Dolinoy, D. C. (2012). DNA methylation screening and analysis. *Developmental Toxicology: Methods and Protocols*, 385-406.
- Santarelli, R., Pascucci, Giuseppe Rubens., Presti, Salvatore Lo., et al. (2024). EBV infection alters DNA methylation in primary human colon cells: A path to inflammation and carcinogenesis?. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, 1867(195064).
- Saponaro, Marco. (2022). Transcription–Replication Coordination. *Reproductive and developmental Biology*, 12, 108.
- Saraswaty, I., Azizah, F. N., Aisyah, A., & Diki, D. (2023). Epigenetik Sebagai Proses Pewarisan Sifat Non Genetik Pada Anggrek *Cattleya Sp.* In *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi SainTek*, 1(1), pp. 258-265.
- Scott, R. S. (2017). *Epstein–Barr virus: a master epigenetic manipulator. Current opinion in virology*, 26, 74-80.
- Shechter, Oren., Sausen, Daniel G., Gallo, Elisa S., Dahari, Harel., Borenstein, Ronen. (2022). *Epstein–Barr Virus (EBV) Epithelial Associated Malignancies: Exploring Pathologies and Current Treatments. Int. J. Mol. Sci*, 23(22), 14389.
- Silva, J. D. M., Alves, C. E. D. C., & Pontes, G. S. (2024). *Epstein-Barr virus: the mastermind of immune chaos. Frontiers in Immunology*, 15, 1297994.
- Sinclair, A. J. (2021). Could changing the DNA methylation landscape promote the destruction of *Epstein-Barr virus*-associated cancers?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 695093.
- Su, X. L., Wang, Y. F., Li, S. J., Zhang, F., & Cui, H. W. (2014). High methylation of the SEPT9 gene in Chinese colorectal cancer patients. *Genet Mol Res*, 13(2), 2513-2520.
- Su, Z. Y., Siak, P. Y., Leong, C. O., & Cheah, S. C. (2023). The role of Epstein–Barr virus in nasopharyngeal carcinoma. *Frontiers in microbiology*, 14, 1116143.

- Sudiono, J., & Hassan, I. (2013). DNA *Epstein-Barr virus* (EBV) sebagai biomarker diagnosis karsinoma nasofaring. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 46(3), 140-147.
- Tan, H., Gong, Y., Liu, Y., Long, J., Luo, Q., Faleti, O. D., & Lyu, X. (2023). Advancing therapeutic strategies for *Epstein-Barr virus*-associated malignancies through lytic reactivation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 164, 114916.
- Tao, L., Zhou, Y., Luo, Y., Qiu, J., Xiao, Y., Zou, J., & Zhao, Y. (2024). Epigenetic regulation in cancer therapy: From mechanisms to clinical advances. *MedComm–Oncology*, 3(1), e59.
- Wang, L., Mai, Z. M., Ngan, R. K. C., Ng, W. T., Lin, J. H., Kwong, D. L. W., & Lam, T. H. (2021). Dose-response reduction in risk of nasopharyngeal carcinoma from smoking cessation: a multicenter case-control study in Hong Kong, China. *Frontiers in Oncology*, 11, 699241.
- Xu, Y., Zhao, W., Mo, Y., Ma, N., Midorikawa, K., Kobayashi, H., & Murata, M. (2020). Combination of RERG and ZNF671 methylation rates in circulating cell-free DNA: A novel biomarker for screening of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer science*, 111(7), 2536-2545.
- Yi-Ming, Ma., Mark, W., Budde., Junqin, Zhu., Michael, B., Elowitz. (2023). Tuning methylation-dependent silencing dynamics by synthetic modulation of CpG density. *bioRxiv*, 12(9), 2536-2545.
- Yu, H., & Robertson, E. S. (2023). *Epstein–barr virus* history and pathogenesis. *Viruses*, 15(3), 714.
- Zhang, L., Wang, R., & Xie, Z. (2022). The roles of DNA methylation on the promotor of the *Epstein–Barr virus* (EBV) gene and the genome in patients with EBV-associated diseases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(12), 4413-4426.
- Zhang, W., Liu, T., Li, X., Li, T., Ma, X., Zhao, D., & Zhao, X. (2023). Decreased methylation of ZNF671 suppresses tumor progression by promoting MAPK6 transcription in laryngeal carcinoma. *International Journal of Biological Sciences*, 19(8), 2443.-2457.
- Zhang, Y., Rumgay, H., Li, M., Cao, S., & Chen, W. (2023). Nasopharyngeal cancer incidence and mortality in 185 countries in 2020 and the projected burden in 2040. *JMIR Public Health and Surveillance*, 9, e49968.
- Zhao, W., Ma, N., Wang, S., Mo, Y., Zhang, Z., Huang, G., & Takeuchi, K. (2017). RERG suppresses cell proliferation, migration and angiogenesis through ERK/NF- κ B signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36, 1-15.

Zheng, X. H., Deng, C. M., Zhou, T., Li, X. Z., Tang, C. L., Jiang, C. T., & Jia, W. H. (2023). Saliva biopsy: Detecting the difference of EBV DNA methylation in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Cancer*, 153(4), 882-892.