

Hubungan Tumor-infiltrating Lymphocytes (TILs) dan Ekspresi Imunohistokimia *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dengan Jenis Histopatologi dan Stadium Klinis Karsinoma Nasofaring

Nancy Sartika Tambunan, Soekimin, Joko S. Lukito

*Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas, Sumatera Utara
 Medan*

ABSTRAK

Latar belakang

Karsinoma nasofaring merupakan karsinoma yang berasal dari mukosa nasofaring, secara mikroskopis tampak berupa diferensiasi skuamosa. Beberapa molekul target telah diidentifikasi dalam spesimen tumor penderita karsinoma nasofaring. VEGF merupakan faktor proangiogenik yang berperan dalam angiogenesis untuk pertumbuhan tumor, invasi, dan metastasis tumor. Limfosit T dikenal sebagai *main effector* dari respon imun anti tumor, dan sering dihubungkan dengan gambaran klinis yang lebih baik. Penderita karsinoma nasofaring dapat diklasifikasikan berdasarkan stadium klinis dengan menggunakan sistem TNM. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hubungan ekspresi imunohistokimia VEGF dan TILs dengan tipe histopatologi dan stadium klinis karsinoma nasofaring.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Sampel pada penelitian ini adalah slaid dan blok parafin dari jaringan nasofaring yang telah didiagnosis sebagai karsinoma nasofaring. Sediaan dinilai kembali untuk penentuan jenis histopatologi dan TILs. Blok parafin tersebut kemudian dipulas dengan hematoxilin-eosin dan imunohistokimia VEGF (Biocare Medical®). TILs dan ekspresi VEGF dianalisis dengan Kruskal-Wallis untuk melihat hubungannya dengan jenis histopatologi dan stadium klinis karsinoma nasofaring.

Hasil

Uji Kruskal-Wallis terhadap 42 kasus karsinoma nasofaring untuk melihat hubungan antara VEGF dengan tipe histopatologi dan stadium klinis menunjukkan hasil tidak bermakna ($p=0,501$ dan $0,772$); hubungan antara TILs dengan tipe histopatologi dan stadium klinis juga tidak bermakna ($p=0,884$ dan $0,886$) dan hubungan antara VEGF dan TILs tidak bermakna ($p=0,609$).

Kesimpulan

Tidak ada hubungan yang bermakna antara ekspresi imunohistokimia VEGF dan TILs dengan tipe histopatologi dan stadium klinis karsinoma nasofaring, serta tidak ada hubungan yang bermakna antara VEGF dan TILs.

Kata kunci: karsinoma nasofaring, stadium klinis, TILs, tipe histopatologi, VEGF.

ABSTRACT

Background

Nasopharyngeal carcinoma is a carcinoma arising in the nasopharyngeal mucosa that shows squamous differentiation. Several target molecules have been identified in nasopharyngeal carcinoma. VEGF is an angiogenesis factor, which contributes to angiogenesis and subsequent growth, invasion and metastasis of tumours. T lymphocytes are recognized as the main effectors of anti tumor immune responses. They often associated with better clinical outcomes. Nasopharyngeal carcinoma patients can be classified according to their clinical stage using TNM system. The aim of this study investigate the correlation between the immunoeexpression of VEGF and TILs with histopathological type and clinical staging of nasopharyngeal carcinoma.

Methods

This is an analytic and descriptive study with cross sectional approach. The sample of this study were nasopharyngeal carcinoma tissue which were diagnosed histopathologically as nasopharyngeal carcinoma. The slides were reviewed for histopathology subtypes and TILs. Then slides were stained with anti VEGF (Biocare Medical®). TILs count and VEGF expression will then be analyzed with Kruskal-Wallis to know the correlation with histological subtype and clinical stage.

Results

Based on Kruskal-Wallis test on 42 nasopharyngeal carcinoma, there were no statistical significance found between TILs count and VEGF expression with histological subtypes and clinical stage ($p=0.50$ and 0.77 respectively) and between TILs count and VEGF expression ($p=0.60$).

Conclusion

There is no significant correlation between the expression of immunohistochemistry VEGF and TILs with histopathological type and clinical staging of nasopharyngeal carcinoma, and the correlation between VEGF and TILs.

Key words : clinical staging, histopathological type, nasopharyngeal carcinoma, TILs, VEGF.

PENDAHULUAN

Karsinoma nasofaring merupakan karsinoma yang berasal dari mukosa nasofaring dan secara mikroskopik menunjukkan gambaran diferensiasi skuamosa, meliputi *non keratinizing carcinoma (differentiated atau undifferentiated subtype)*, *keratinizing squamous cell carcinoma* serta *basaloid squamous cell carcinoma*. Namun *adenocarcinoma* dan *salivary gland-type carcinoma* tidak termasuk di dalamnya.¹

Karsinoma nasofaring merupakan neoplasma yang jarang dijumpai di Amerika Serikat, dengan angka kejadian sekitar 0,25% dari seluruh keganasan. Insidensi karsinoma nasofaring yang tertinggi di dunia terdapat pada penduduk daratan Cina bagian selatan (Mongoloid), dengan angka rata-rata 30-50/100.000 penduduk per tahun. Insidensi terendah dijumpai pada bangsa Kaukasia, Jepang dan India. Di Indonesia diperkirakan dijumpai 10.000 kasus baru pertahun. *Tulip Integrated Cancer Unit* RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta pada tahun 2001-2005, mencatat 80% karsinoma nasofaring terdiagnosis pada stadium lanjut dan tipe histopatologi yang terbanyak adalah WHO tipe III (*Undifferentiated carcinoma*), yang berkorelasi kuat dengan infeksi laten EBV.² Di RSUP Haji Adam Malik Medan pada tahun 1998-2000 ditemukan 130 penderita karsinoma nasofaring dari 1.370 pasien baru onkologi kepala dan leher.³ Perbandingan antara pria dengan wanita adalah 2 berbanding 1. Usia produktif merupakan kelompok usia yang paling sering menderita karsinoma nasofaring, dengan angka kesakitan terbanyak adalah pada kelompok usia 40-50 tahun.^{1,4,5}

Beberapa molekul target telah diidentifikasi dalam spesimen tumor nasofaring, misalnya *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *pan-cytokeratin*, *high molecular-weight cytokeratin* dan p63. VEGF merupakan faktor pro angiogenik yang sangat berperan dalam angiogenesis.³ VEGF adalah sinyal kunci yang digunakan oleh sel yang kekurangan oksigen (*oxygen-hungry cells*) untuk memicu pertumbuhan pembuluh darah, terutama dalam hal ini yaitu sel-sel tumor. VEGF akan berikatan dengan *vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)*, setelah itu akan terjadi peristiwa dimerisasi atau perubahan konformasi pada VEGFR. Pembuluh darah baru itu akan membuat sel kanker tumbuh dengan cepat, semakin banyak mengeluarkan VEGF dan

semakin memicu tumbuhnya pembuluh darah baru lagi.²

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk melihat hubungan ekspresi imunohistokimia VEGF dengan karsinoma nasofaring. Pada penelitian di China dari 127 spesimen karsinoma nasofaring yang dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan VEGF, didapati nilai positif sebesar 66,9%.^{3,6} Penelitian di India didapati overekspresi VEGF 67% dari 103 penderita karsinoma nasofaring,^{3,7} sedangkan penelitian di Singapura dari 42 pasien dijumpai overekspresi VEGF pada seluruh sampel.^{3,8} Li *et al.* dalam penelitian mereka mengemukakan adanya hubungan yang signifikan antara stadium klinis, angka kekambuhan dan metastasis jauh pada karsinoma nasofaring dengan ekspresi VEGF.⁹

Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) sering ditemukan pada tumor, yang mencerminkan respon imun terhadap pertumbuhan kanker. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa peningkatan TILs berhubungan dengan prognosis yang lebih baik. Namun, hal ini masih menjadi perdebatan.^{10,11} TILs adalah sel-sel darah putih yang telah meninggalkan aliran darah dan bermigrasi ke dalam tumor. Sel-sel tersebut terdiri atas sel-sel mononuklear dan campuran dari berbagai jenis sel, seperti sel T, sel B, sel NK dan makrofag.¹²

Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik untuk meneliti hubungan ekspresi imunohistokimia *vascular endothelial growth factor (VEGF)* dan *tumor-infiltrating lymphocytes (TILs)* dengan tipe histopatologi dan stadium klinis karsinoma nasofaring, dalam kaitannya dengan prediksi prognosis karsinoma nasofaring dan hubungannya dengan perencanaan terapi dan penatalaksanaan yang adekuat.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Penelitian ini dilakukan di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/RSUP Haji Adam Malik Medan.

Sampel penelitian berasal dari sediaan blok parafin yang berasal dari jaringan nasofaring yang didiagnosis sebagai karsinoma nasofaring di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/RSUP Haji Adam Malik Medan yang memenuhi kriteria inklusi dan kriteria eksklusi,

dan dengan menggunakan rumus didapatkan sampel sejumlah 42. Pada penelitian ini, sediaan diperiksa kembali oleh peneliti dan ahli patologi anatomik untuk penentuan tipe histopatologinya dan untuk menilai TILs. Pada penelitian ini yang dinilai adalah *stromal* TILs yaitu dengan melihat infiltrasi limfosit pada stroma. Penilaiannya dibagi berdasarkan tiga kelompok yaitu: *low*, jika didapatkan infiltrasi limfosit pada stroma sebanyak 0-10%; *intermediate*, jika didapatkan infiltrasi limfosit pada stroma sebanyak 20-40% dan *high*: jika didapatkan infiltrasi limfosit pada stroma sebanyak 50-90%. Kemudian dilakukan pemotongan ulang blok parafin dan dilakukan pewarnaan imunohistokimia VEGF. Hasil pewarnaan imunohistokimia VEGF dievaluasi kembali oleh dua orang ahli patologi bersama dengan peneliti. Ekspresi VEGF adalah persentase warna coklat pada membran dan/atau sitoplasma sel tumor pada 10 lapangan pandang besar dinilai dengan pembesaran 400x (mikroskop Olympus BX 51). Dalam hal ini, apabila membran dan/atau sitoplasma sel tumor terwarnai coklat lebih dari 10%, maka dapat dianggap ekspresi kuat.⁹ Selanjutnya hasil penilaian dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis.

HASIL

Penelitian ini dilakukan terhadap 42 sampel kar-

sinoma nasofaring. Pada penelitian ini didapatkan usia penderita karsinoma nasofaring terbanyak pada kelompok usia 45-53 tahun dengan rerata usia 48,8 tahun dan simpangan baku 12,7 tahun, laki-laki lebih banyak daripada perempuan, stadium lanjut lebih banyak daripada stadium dini dan NKSCC (*undifferentiated type*) merupakan tipe histopatologi yang terbanyak. Karakteristik kasus karsinoma nasofaring dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik kasus karsinoma nasofaring.

Karakteristik	Jumlah (n)	(%)	Total
Usia (tahun) 48,8 ± 12,7	31	73,8	42
Jenis kelamin			
Laki-laki	27	64,3	
Perempuan	15	35,7	42
Stadium klinis			
Stadium dini	14	33,3	
Stadium lanjut	28	66,66	42
Tipe histopatologi			
KSCC	3	7,1	
NKSCC (<i>diff.subtype</i>)	16	38,1	
NKSCC (<i>undiff.subtype</i>)	23	54,8	
Basaloid SCC	0	0	42

Uji statistik Kruskal-Wallis untuk melihat hubungan antara ekspresi imunohistokimia VEGF dengan tipe histopatologi dan stadium klinis karsinoma nasofaring menunjukkan hasil tidak bermakna (p=0,501 dan 0,772) (p>0,05).

Tabel 2. Tabulasi silang hubungan antara ekspresi imunohistokimia VEGF dengan tipe histopatologi dan stadium klinis karsinoma nasofaring.

VEGF	Tipe histopatologi			p	Stadium klinis		
	KSCC n (%)	NKSCC <i>Diff</i> n (%)	NKSCC <i>Undiff</i> n (%)		Dini n (%)	Lanjut n (%)	p
Negatif	1 (5,6)	7 (38,0)	10 (55,5)	0,501	7 (38,9)	11 (61,1)	0,772
Ekspresi lemah	1 (6,3)	5 (31,3)	10 (62,4)		5 (31,3)	11 (61,7)	
Ekspresi kuat	1 (12,3)	4 (50,0)	3 (37,7)		2 (25,0)	6 (75,0)	

* Uji Kruskal-Wallis

Uji statistik Kruskal-Wallis untuk menguji hubungan antara TILs dengan tipe histopatologi

dan stadium klinis karsinoma nasofaring menunjukkan hasil tidak bermakna (p=0,884 dan 0,886) (p>0,05).

Tabel 3. Tabulasi silang hubungan antara tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) dengan tipe histopatologi dan stadium klinis karsinoma nasofaring.

TILs	Tipe histopatologi			p-value*	Stadium klinis		
	KSCC n (%)	NKSCC <i>Diff</i> n (%)	NKSCC <i>Undiff</i> n (%)		Dini n (%)	Lanjut n (%)	p-value*
<i>Low</i>	1 (11,1)	3 (33,3)	5 (55,6)	0,884	3 (33,3)	6 (66,7)	0,886
<i>Intermediate</i>	0 (0)	6 (42,9)	8 (57,1)		4 (28,6)	10 (71,4)	
<i>High</i>	2 (10,5)	7 (36,8)	10 (54,7)		7 (36,8)	2 (63,2)	

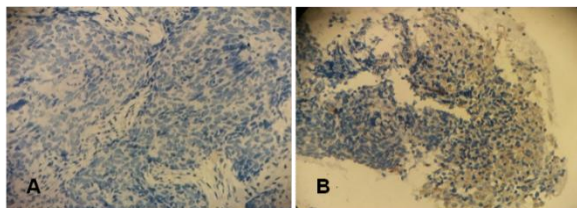
* Uji Kruskal-Wallis

Uji statistik Kruskal-Wallis untuk menguji hubungan antara TILs dengan ekspresi imunohistokimia VEGF pada karsinoma nasofaring menunjukkan hasil tidak bermakna ($p=0,609$) ($p>0,05$).

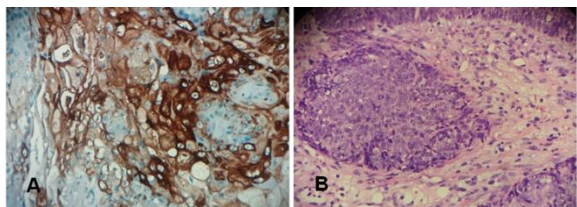
Tabel 4. Tabulasi silang distribusi tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) berdasarkan ekspresi imunohistokimia vascular endothelial growth factor (VEGF) pada karsinoma nasofaring.

TILs	VEGF			p
	Negatif n (%)	Ekspresi lemah n (%)	Ekspresi kuat n (%)	
Low	3 (33,3)	4 (44,4)	2 (22,3)	0,609
Intermediate	7 (50,0)	6 (42,9)	1 (7,1)	
High	8 (42,1)	6 (31,6)	5 (26,3)	

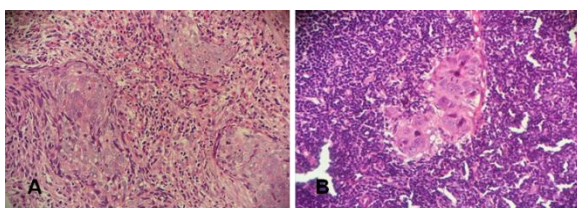
*Uji Kruskal-Wallis



Gambar 1. A. Karsinoma nasofaring VEGF negatif; B. Karsinoma nasofaring VEGF ekspresi lemah. (Pembesaran 400x).



Gambar 2. Karsinoma nasofaring VEGF ekspresi kuat; B. Karsinoma nasofaring Low TILs (HE). (Pembesaran 400x).



Gambar 3. Karsinoma nasofaring Intermediate TILs (HE); B. Karsinoma nasofaring High TILs (HE). (Pembesaran 400x).

DISKUSI

Pada Tabel 1 diketahui bahwa usia rerata penderita tumor nasofaring yaitu 48,8 tahun, dengan simpangan baku 12,7 tahun. Hal ini sesuai dengan kepustakaan yang menyebutkan bahwa prevalensi karsinoma nasofaring antara usia 40-50 tahun. Penelitian Munir juga menemukan usia rerata penderita karsinoma nasofaring adalah 48,8 tahun. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Li *et al.* menyebutkan bahwa dari 188 kasus karsinoma nasofaring yang diteliti, 95 kasus (50,5%) dijumpai pada usia <46 tahun, dan sebanyak 93 kasus (49,5%) dijumpai pada usia ≥ 46 tahun. Kecenderungan penderita karsinoma nasofaring terjadi pada usia yang lebih tua mungkin berhubungan dengan sistem imunitas yang menurun pada usia tersebut, sehingga baik antigen EBV sebagai penyebab maupun antigen tumor sendiri tidak dapat dieliminasi secara baik oleh sistem imun tubuh.^{9,13} Penderita karsinoma nasofaring terbanyak dijumpai pada laki-laki, yaitu sebanyak 27 kasus (64%). Menurut kepustakaan perbandingan insidensi karsinoma nasofaring pada laki-laki dan perempuan adalah 2 berbanding 1. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Li *et al.* menyebutkan bahwa dari 188 kasus karsinoma nasofaring yang diteliti, 147 kasus (78,2%) dijumpai pada laki-laki, dan selebihnya sebanyak 41 kasus (21,8%) dijumpai pada perempuan. Tingginya insidensi pada laki-laki mungkin disebabkan perbedaan gaya hidup serta pekerjaan yang menyebabkan laki-laki lebih sering kontak dengan karsinogen penyebab karsinoma nasofaring. Merokok, paparan uap, asap debu, gas kimia dan formaldehid juga dapat meningkatkan risiko terjadinya karsinoma nasofaring.^{9,14} Karsinoma nasofaring terbanyak dijumpai pada stadium lanjut, yaitu sebanyak 28 kasus (66,7%). Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Li *et al.* yang menyebutkan bahwa dari 188 kasus karsinoma nasofaring yang diteliti, 146 kasus di antaranya (77,6%) adalah stadium III dan IV (stadium lanjut), dan selebihnya sebanyak 42 kasus (22,4%) adalah stadium I dan II (stadium dini). Karsinoma nasofaring sulit untuk didiagnosis pada stadium dini, kemungkinan karena nasofaring letaknya tersembunyi di belakang rongga hidung sehingga sulit untuk diperiksa dan gejala karsinoma nasofaring mirip dengan penyakit lain yang lebih umum sehingga pasien tidak datang

berobat. Biasanya pasien baru datang berobat bila gejala telah mengganggu dan tumor tersebut telah mengadakan infiltrasi serta bermetastasis ke kelenjar getah bening (KGB) leher, yang merupakan stadium lanjut dan biasanya dengan prognosis yang buruk.^{5,9} Tipe histopatologi karsinoma nasofaring terbanyak adalah tipe NKSCC (*undifferentiated subtype*), yaitu sebanyak 23 kasus (54,8%). Hasil ini sesuai dengan kepustakaan yang menyatakan bahwa tipe yang paling umum dijumpai pada karsinoma nasofaring adalah sub tipe *non-keratinizing carcinoma undifferentiated subtype*. Sub tipe ini dijumpai sekitar 92 % dari seluruh karsinoma nasofaring di Hongkong, sekitar 42% di Singapura, dan 76% di Tunisia. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Li *et al.* dari 188 kasus karsinoma nasofaring yang diteliti, 124 kasus (55,0%) di antaranya adalah tipe II (*Nonkeratinizing carcinoma*).^{1,9}

Uji statistik Kruskal-Wallis menunjukkan tidak ada hubungan bermakna antara ekspresi imunohistokimia VEGF dengan tipe histopatologi dan stadium klinis karsinoma nasofaring ($p=0,501$ dan $0,772$). Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.* dan Harahap yang mungkin disebabkan karena sitokin lebih teraktivasi pada stadium dini sehingga ekspresi imunohistokimia VEGF tertampil dengan ekspresi kuat, sedangkan pada stadium lanjut, sitokin kurang teraktivasi sehingga ekspresi imunohistokimia VEGF menjadi tertampil dengan ekspresi lemah.^{9,14}

Uji statistik Kruskal-Wallis menunjukkan tidak ada hubungan bermakna antara TILs dengan tipe histopatologi dan stadium klinis karsinoma nasofaring ($p=0,884$ dan $0,886$). Sebagaimana telah dijelaskan oleh Yu dan Fu, bahwa peran TILs sebagai faktor prognostik masih menjadi perdebatan. Salgado *et al.*, juga menyatakan hal yang sama, dan menurut mereka TILs tidak bisa mendefinisikan sub tipe tumor tertentu, tetapi dapat digunakan untuk mengenali *lymphocyte-rich tumors*.^{10,12}

Uji statistik Kruskal-Wallis menunjukkan tidak ada hubungan bermakna antara TILs dengan ekspresi imunohistokimia VEGF ($p=0,609$). Belum ditemukan kepustakaan yang menyebutkan hubungan antara TILs dengan ekspresi imunohistokimia VEGF, sehingga peneliti tidak dapat membandingkan hasil penelitian ini dengan kepustakaan.

KESIMPULAN

Tidak terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi imunohistokimia VEGF dan TILs dengan tipe histopatologi dan stadium klinis karsinoma nasofaring, serta tidak terdapat hubungan yang bermakna antara TILs dengan ekspresi imunohistokimia VEGF.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chan JKC, Bray F, McCarron. Nasopharyngeal Carcinoma. In: Barnes L. Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetic Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press: 2005. p.82-97.
2. Kurnianda J, Hardianti MS, Harijadi, Taroen-Hariadi KW, Purwanto I, Haryana SM, *et al.* Elevation of vascular endothelial growth factor in Indonesian advanced stage nasopharyngeal carcinoma. Kobe J Med Sci. 2009; 55: 36-44.
3. Farhat. Vascular endothelial growth factor pada karsinoma nasofaring. Majalah Kedokteran Nusantara. 2009; 42: 59-65.
4. Rosai J. Nasal Cavity, Paranasal Sinuses, and Nasopharynx. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology 10th ed. Philadelphia; Elsevier: 2011. p.291-300.
5. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran-Pathologic Basis of Disease 8th ed. Philadelphia; Saunders: 2010. p.785-7.
6. Sha D, He YJ. Expression and clinical significance of VEGF and its receptors Flt-1 and KDR in nasopharyngeal carcinoma. Ai Zheng. 2006; 25: 229-34.
7. Khrisna SM, James S, Balaram P. Expression of VEGF as prognosticator in primary nasopharyngeal cancer and its relation to EBV status. Virus Res. 2006; 115: 85-90.
8. Soo R, Putti T, Tao Q. Overexpression of cyclooxygenase-2 in nasopharyngeal carcinoma and association with epidermal growth factor receptor expression. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2005; 131: 147-52.
9. Li YH, Hu CF, Shao Q, Huang MY, Hou JH, Xie D, *et al.* Elevated expression of survivin and VEGF protein are strong independent predictors of survival in advanced nasopharyngeal carcinoma. J Translat Med. 2008; 6: 1-11.

10. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: Friends or Foes. *Lab Invest.* 2006; 86: 231-45.
11. Uppaluri R, Dunn GP, Lewis JS. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immunity.* 2009; 8: 16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2935779>
12. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, *et al.* The Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an international TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015; 26: 259-71.
13. Ganguly NK, Satyanarayana K, Srivastava VK, Singh P, Kant L, Shah B, *et al.* Epidemiological and etiological factors associated with nasopharyngeal carcinoma. *ICMR Bulletin* 2003; 33. Available from: <http://www.icmr.nic.in/BUSEPT03.pdf>
14. Harahap MPH. Ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor pada Karsinoma Nasofaring. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara; 2009. Available from: <http://www.repository.usu.ac.id/handle/123456789/6425>