

Hubungan Positif Ekspresi Cyclooxygenase-2 dengan Microvessel Density pada Undifferentiated Carcinoma Nasopharynx di RSUP Sanglah Denpasar

Made Dwi Hartayati, I Gusti Ayu Sri Mahendra Dewi, Moestikaningsih

*Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana
 Denpasar*

ABSTRAK

Latar belakang

Tumor memerlukan pembentukan pembuluh darah baru atau angiogenesis untuk dapat tumbuh dan bermetastasis. Angiogenesis dapat dinilai dengan menghitung *microvessel density* (MVD). Salah satu cara untuk menentukan *microvessel* adalah dengan pewarnaan imunohistokimia CD31. Cyclooxygenase-2 (COX-2) adalah faktor potensial penting pada angiogenesis. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui hubungan ekspresi COX-2 dengan MVD pada *undifferentiated carcinoma nasopharynx* di RSUP Sanglah Denpasar.

Metode

Penelitian ini menggunakan metode analitik potong lintang. Sampel penelitian adalah sediaan blok parafin penderita *undifferentiated carcinoma nasopharynx* yang diperiksa secara histo-patologi di Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah Denpasar dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada/RSUP dr. Sardjito, Yogyakarta sejak 1 Januari 2014 sampai dengan 31 Agustus 2014. Diagnosis ulang sediaan histopatologi dilakukan dengan pulasan rutin H&E untuk mendapatkan sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga tercapai jumlah 31 sampel. Selanjutnya dilakukan pulasan imunohistokimia COX-2 dan CD 31 pada seluruh sampel. Kemudian hasil dianalisis dengan uji Pearson

Hasil

Ekspresi COX-2 positif ditemukan pada 24 (77,42%) subyek dan dijumpai negatif pada 7 (22,59%). Ditemukan 22 (70,97%) kasus *undifferentiated carcinoma nasopharynx* dengan MVD tinggi dan 9 (29,03%) dengan MVD rendah. Ditemukan adanya korelasi positif ekspresi COX-2 dengan MVD ($r=0,868$; $p=0,001$).

Kesimpulan

Pada penelitian ini, ditemukan adanya hubungan positif antara ekspresi COX-2 dan MVD pada *undifferentiated carcinoma nasopharynx*.

Kata kunci: *cyclooxygenase-2, microvessel density, undifferentiated carcinoma nasopharynx.*

ABSTRACT

Background

Tumors require new blood vessel formation or angiogenesis in order to grow and metastasize. Angiogenesis can be assessed by counting the microvessel density (MVD). One way to determine microvessel is the CD31 immunohistochemical staining. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is a potentially important factor in angiogenesis. The aim of this study was to prove the correlation between expression COX-2 and MVD in undifferentiated carcinoma nasopharynx at RSUP Sanglah Denpasar.

Methods

This study used cross-sectional analytic method. The sample were paraffin block preparation of patients with undifferentiated carcinoma of the nasopharynx were examined by histopathology in Departement of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine University of Udayana/RSUP Sanglah Denpasar and Laboratory of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine, University of Gadjah Mada/Dr. Sardjito Hospital, Yogyakarta since January 1 to August 31, 2014. Histo-pathological diagnosis performed on preparations with routine H & E staining to obtain samples that met the inclusion and exclusion criteria in order to reach the number of 31 samples. Subsequently immunohistochemical staining was performed for COX-2 and CD 31 on the entire sample. Then the results were analyzed by Pearson test.

Results

COX-2 positive expression were found in 24 (77.42%) subjects, were found negative in 7 (22.59%). Twenty two cases (70.97%) of undifferentiated carcinoma of the nasopharynx with high MVD and 9 (29.03%) with low MVD. There was positive correlation expression of COX-2 with MVD ($r=0.868$; $p=0.001$).

Conclusion

In this study, found a positive correlation between the expression of COX- 2 and MVD in undifferentiated carcinoma nasopharynx

Key words: *cyclooxygenase-2, microvessel density, undifferentiated carcinoma nasopharynx.*

PENDAHULUAN

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan tumor ganas yang berasal dari epitel yang berasal dari epitel mukosa nasofaring dengan predileksi di *fossa Rossenmuller*. Karsinoma nasofaring adalah tumor ganas yang sering terdapat di Asia Tenggara insidensinya adalah 10-53 kasus per 100.000 penduduk.¹ Sementara di Indonesia, insidensinya adalah 3,9 kasus per 100.000 populasi. Berdasarkan data registrasi kanker tahun 2010 di Bali karsinoma nasofaring menempati peringkat kelima dari seluruh karsinoma pada laki-laki dan perempuan dengan jumlah 70 kasus, pada laki-laki menempati peringkat pertama dengan jumlah 47 kasus dari seluruh karsinoma.²

Kesulitan diagnosis dini pada karsinoma nasofaring sampai saat ini masih tetap merupakan masalah besar. Hal ini disebabkan oleh karena gejala penyakit yang tidak khas dan letak tumor yang tersembunyi sehingga sulit diperiksa. Hampir seluruh penderita datang dengan stadium lanjut.³

Karsinoma nasofaring mempunyai perangan berbeda dibandingkan dengan keganasan pada daerah lain di kepala dan leher, karena sifatnya yang sangat invasif dan sangat mudah bermetastasis sering ditemukan pada stadium yang lanjut.⁴ Faktor yang diduga terkait dengan timbulnya karsinoma nasofaring adalah genetik, faktor lingkungan dan Virus Epstein Barr (VEB). Pemeriksaan serologi dan imunohistokimia belum rutin dilakukan.⁵ Hal ini menyebabkan penatalaksanaan karsinoma nasofaring menjadi sulit dan belum memberi hasil yang memuaskan.⁶ Salah satu prognosis buruk pada *undifferentiated carcinoma nasopharynx* adalah dijumpainya banyak pembuluh darah kecil.³

Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru yang terjadi secara normal dan sangat penting dalam proses pertumbuhan dan perkembangan. Pertumbuhan jaringan pembuluh darah baru sangat penting untuk proliferasi sel kanker, karena proliferasi bergantung pada suplai oksigen, zat makanan dan pembuangan zat sisa yang adekuat. Angiogenesis juga berperan penting dalam penyebaran sel kanker. Sel-sel kanker dapat menembus masuk kedalam pembuluh darah ataupun limfe, bersirkulasi melalui aliran vaskular, dan kemudian berproliferasi pada tempat yang lain atau metastasis.⁷ Pendekatan secara patologis untuk memperkirakan adanya suatu angiogenesis

adalah dengan perkiraan secara mikroskopik densitas pembuluh darah (*microvessel density/ MVD*) dari jaringan tumor melalui pemeriksaan imunohistokimia. *Cyclooxygenase-2* (COX-2) merupakan faktor potensial yang penting pada angiogenesis tumor. COX-2 secara konsisten terekspresi dalam pembentukan pembuluh darah baru dalam tumor dan pembuluh darah disekitar tumor.⁸

Induksi COX-2 atau ekspresi berlebihan berhubungan dengan peningkatan produksi prostaglandin-E2 (PGE2). PGE2 menunjukkan adanya hubungan antara perkembangan tumor dan biosintesis prostaglandin. PGE2 juga penting pada invasi tumor. PGE2 dapat meningkatkan kadar *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF memproduksi matrix metalloprotein (MMP) untuk memulai suatu proses angiogenesis. MMP memecah ekstraseluler matrix. Hal ini merangsang migrasi sel endotel. Sel endotel mulai membelah begitu mereka bermigrasi ke jaringan sekitarnya. Kemudian tersusun menjadi pembuluh darah baru dan kemudian berkembang menjadi pembuluh darah matur.⁷

Penelitian Hasibuan (2014) menemukan adanya korelasi positif sedang antara ekspresi COX-2 dan *microvessel density* pada karsinoma nasofaring.⁹ Sedangkan pada penelitian Tan dan Putti (2005) menyatakan tidak dijumpai adanya perbedaan yang bermakna *microvessel density* pada kelompok COX-2 positif dengan COX-2 negatif.¹⁰

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya hubungan antara ekspresi COX-2 dengan angiogenesis, yang dinilai dengan MVD, pada penderita *undifferentiated carcinoma nasopharynx* di RSUP Sanglah Denpasar.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode analitik observasional potong lintang. Penelitian dilakukan di Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah dan Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Universitas Gadjah Mada/RSUP dr. Sarjito, sejak tanggal 1 Januari 2014 sampai dengan 31 Agustus 2014. Populasi penelitian ini adalah semua sediaan blok parafin dari bahan penderita karsinoma nasofaring di RSUP Sanglah Denpasar. Sampel penelitian berasal dari sediaan blok parafin yang telah

diperiksa secara histopatologi di Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Denpasar sejak tanggal 1 Januari 2014 sampai 31 Agustus 2014, yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi sampel adalah sediaan berasal dari salah satu bahan biopsi dekstra atau sinistra yang mengandung minimal 3mm jaringan tumor, sediaan merupakan tumor primer, dan penderita belum pernah mendapat kemoterapi dan radio-terapi. Sedangkan kriteria eksklusi sampel adalah kasus dengan diagnosis histopatologi yang belum pasti (masih ada diagnosis banding), blok parafin yang rusak dan sediaan mengandung sel-sel radang padat, jika limfosit menginfiltrasi tumor secara difus seluruh komponen tumor. Sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi terdiri dari 31 kasus *undifferentiated carcinoma nasopharynx*. *Undifferentiated carcinoma nasopharynx* adalah keganasan yang berasal dari epitel mukosa nasofaring yang memperlihatkan gambaran sel berbentuk oval atau spindle dengan inti bulat sampai oval dan vesikular, dan ditemukan anak inti membentuk pola sinsisial infiltratif pada stroma.¹¹

Preparat hasil pulasan hematoxilil dan eosin (H&E) sesuai nomor-nomor yang telah dikumpulkan, dievaluasi ulang oleh peneliti dan dua ahli patologi untuk memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kemudian dilakukan pematangan ulang blok parafin, untuk dilakukan pengecatan imunohistokimia COX-2 dan CD31 untuk mengetahui MVD. Penilaian protein COX-2 dengan pulasan imunohistokimia menggunakan antibodi primer monoklonal COX-2 clone D07 dari Dako secara semikuantitatif dengan menggunakan mikroskop cahaya *binokuler Olympus CX21* mulai dari pembesaran lemah (40x) kemudian pembesaran kuat (400x). Sediaan jaringan yang akan dinilai, dibandingkan dengan kontrol positif. Kontrol positif diambil dari jaringan kolon. Sel yang mengekspresikan COX-2 akan tampak berwarna coklat pada sitoplasma sel ganas. Penilaian ekspresi COX-2 dibuat berdasarkan analisis persentase sel tumor yang positif dan intensitas pewarnaan. Berdasarkan persentase sel ganas yang menunjukkan overekspresi COX-2 maka dibagi menjadi 3 skor (0-3) yaitu: 0 (tidak terwarnai), 1 (<10% sel dari seluruh sel ganas terwarnai), 2 (10-50% sel dari seluruh sel ganas terwarnai), 3 (>50% sel dari seluruh sel ganas terwarnai). Berdasarkan

intensitas sel-sel ganas yang menunjukkan overekspresi COX-2 maka dibagi menjadi 3 skor (0-3) yaitu: 0 (negatif), 1 (lemah), 2 (sedang), 3 (kuat). Interpretasi ekspresi COX-2 dari sel tumor, sesuai dengan penelitian sebelumnya digunakan skor immunoreaktif, diperoleh dengan mengalikan skor persentase sel ganas yang mengekspresikan COX-2 dengan skor intensitas. Skor immunoreaktif 4 atau lebih dinilai sebagai ekspresi COX-2 positif, skor immunoreaktif kurang dari 4 dinyatakan sebagai COX-2 negatif.¹⁰ Penilaian MVD dengan pulasan imunohistokimia menggunakan antibodi primer *monoclonal mouse anti human CD 31 endothelial cell* secara semikuantitatif, diamati dengan mikroskop cahaya binokuler merk Olympus CX-21 mulai dari pembesaran lemah (40x) kemudian pembesaran kuat (400x). Penghitungan dilakukan pada seluruh sel tumor dimulai dari bagian tumor dengan ekspresi terkuat ke bagian yang lebih lemah. Sediaan jaringan yang akan dinilai, dibandingkan dengan kontrol positif. Kontrol positif diambil dari jaringan tonsil. Untuk menentukan *microvessel*, dilihat dari ekspresi lemah sampai kuat CD31 yaitu berwarna coklat pada sitoplasma dan atau membrane sel endotel. Intratumoral dan peritumoral *microvessel* (pembuluh darah dengan diameter <50 μ m tanpa lapisan muskular) dihitung jumlah *microvessel* pada masing-masing empat lapang pandang, dan hasilnya digabungkan untuk mendapatkan *microvessel/mm*².¹² Interpretasi MVD rendah dan tinggi ditentukan dengan analisis menggunakan kurva ROC.

Data-data penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan deskriptif. Dalam penelitian ini data umur, jenis kelamin, ekspresi COX-2 dan ekspresi CD31, terlebih dahulu diuji normalitas datanya. Berdasarkan hasil analisis dengan uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan bahwa data umur, jenis kelamin, ekspresi COX-2 dan ekspresi CD31 berdistribusi normal sehingga digunakan uji *Pearson* untuk analisis korelatif dengan tingkat kemaknaan (α) ditetapkan pada $p < 0,05$.

HASIL

Dari 31 kasus *undifferentiated carcinoma nasofaring*, didapatkan 26 (83,9%) adalah laki-laki dan 5 (16,1%) perempuan (Tabel 1).

Tabel 1. Distribusi sampel berdasarkan jenis kelamin.

| Jenis kelamin | Jumlah | Persentase |
|---------------|--------|------------|
| Laki-laki | 26 | 83,9% |
| Perempuan | 5 | 16,1% |
| Jumlah | 31 | 100% |

Berdasarkan hasil analisis didapatkan bahwa rerata umur pasien adalah 49,52±11,64 tahun dengan rentangan 18-71 tahun (Tabel 2).

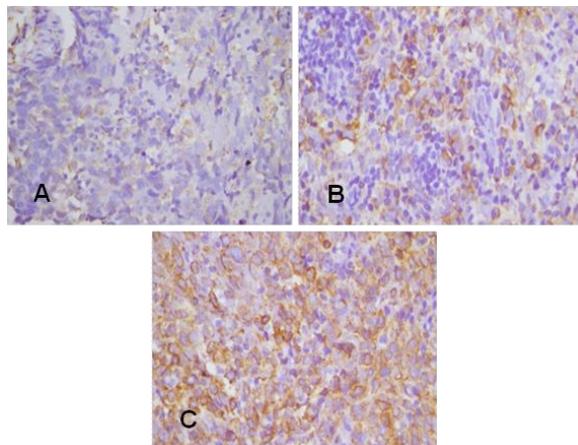
Tabel 2. Distribusi sampel berdasarkan umur.

| Umur | Jumlah | Persentase |
|--------|--------|------------|
| 11-20 | 1 | 3,23% |
| 21-30 | 1 | 3,23% |
| 31-40 | 4 | 12,90% |
| 41-50 | 11 | 35,48% |
| 51-60 | 8 | 25,80% |
| 61-70 | 5 | 16,13% |
| 71-80 | 1 | 3,23% |
| Jumlah | 31 | 100% |

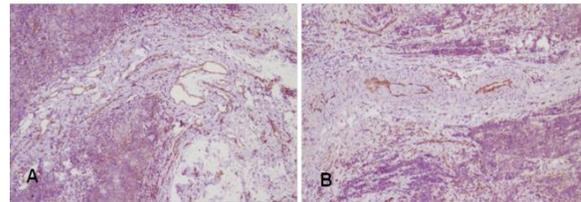
Tabel 3. Hubungan antara COX-2 dengan microvessel density.

| COX-2 | MVD | | r | p |
|---------|--------|--------|-------|-------|
| | Tinggi | Rendah | | |
| Positif | 23 | 1 | 0,868 | 0,001 |
| Negatif | 1 | 6 | | |

Tabel 3 di atas menunjukkan bahwa dengan uji korelasi Pearson didapatkan nilai $r=0,868$ dan $p=0,001$. Hal ini berarti bahwa terdapat hubungan positif secara bermakna antara COX-2 dengan MVD ($p<0,05$).



Gambar 1. Hasil Pewarnaan imunohistokimia COX-2 pada *Undifferentiated carcinoma nasopharynx* dengan intensitas kuat. A. Terpulas pada <10% sel ganas; B. Terpulas pada 10-50% sel ganas; C. Terpulas pada >50% sel ganas (IHK COX-2, pembesaran 400x).



Gambar 2. Hasil pewarnaan imunohistokimia dengan hasil A. MVD tinggi dan B. MVD rendah (IHK CD 31 pembesaran 40x).

DISKUSI

Pada penelitian ini didapatkan kasus *undifferentiated carcinoma nasopharynx* dari bahan biopsi 26 kasus (83,9%) pada laki-laki dan 5 kasus (16,1%) pada perempuan. Hasil yang didapatkan ini tidak jauh berbeda dengan yang didapatkan dari kepustakaan bahwa karsinoma nasofaring lebih sering pada laki-laki daripada perempuan.¹¹ Lebih banyaknya penderita karsinoma nasofaring pada laki-laki dibanding perempuan kemungkinan berhubungan dengan kebiasaan merokok pada laki-laki lebih banyak daripada perempuan. Hal ini sesuai dengan penelitian Taweevisit, *et al.* (2010) yang mendapatkan insiden pada laki laki lebih sering daripada perempuan. Beberapa penelitian di berbagai negara juga menunjukkan penderita karsinoma nasofaring lebih banyak daripada perempuan dengan rata-rata perbandingan 2:1.^{10,13} Berdasarkan data registrasi kanker tahun 2010 di Bali karsinoma nasofaring lebih sering terjadi pada laki daripada perempuan dengan rasio 2:1.

Kasus *undifferentiated carcinoma nasopharynx* terbanyak ditemukan pada dekade kelima.¹¹ Pada penelitian ini didapatkan usia terbanyak pada dekade kelima dengan rentang usia 18 tahun sampai usia 71 tahun. Rerata usia pasien dalam penelitian ini adalah 49,52±11,64 tahun. Hal ini sesuai dengan penelitian Hasibuan (2014) mendapatkan kelompok usia terbanyak adalah kelompok 41-60 tahun dengan rerata 47,54±11,651.

Cyclooxygenase (COX) merupakan enzim penting pada jalur biosintetik prostaglandin, tromboxan dan prostasiklin dari asam arakhidonat. Ekspresi seluler COX-2 meningkat diatas normal pada stadium awal karsinogenesis dan selama perkembangan serta invasif tumor. Prostaglandin dan enzim COX-2, yang mengkatalisis produksi prostaglandin, merupakan mediator inflamasi yang terlibat dalam

proses angiogenesis.¹⁴

Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru. Pertumbuhan jaringan pembuluh darah baru sangat penting untuk proliferasi sel kanker, karena proliferasi bergantung pada suplai oksigen, zat makanan dan pembuangan zat sisa yang adekuat. Menurut Nishida, *et al.* (2006) angiogenesis juga berperan penting dalam penyebaran sel kanker. Sel-sel kanker dapat menembus masuk kedalam pembuluh darah ataupun limfe, bersirkulasi melalui aliran intrakaskular, dan kemudian berproliferasi pada tempat yang lain yang dikenal sebagai metastasis. Angiogenesis merupakan proses pertumbuhan massa tumor. Cyclooxygenase-2 (COX-2) merupakan faktor potensial yang penting pada angiogenesis tumor. COX-2 secara konsisten terekspresi dalam pembentukan pembuluh darah baru dalam tumor dan pembuluh darah disekitar tumor.⁸

Prostaglandin endoperoksidasesintase-2 atau COX-2 adalah enzim kunci dalam produksi prostaglandin. Enzim ini ditemukan meningkat pada berbagai keganasan. Induksi COX-2 atau ekspresi berlebihan berhubungan dengan peningkatan produksi prostaglandin-E2 (PGE2). PGE2 menunjukkan adanya hubungan antara perkembangan tumor dan biosintesis prostaglandin. Prostaglandin dan izoenzim COX-2 dapat membantu proses sel normal seperti proliferasi sel, angiogenesis, dan apoptosis. PGE2 juga penting pada invasi tumor. PGE2 dapat meningkatkan kadar *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF memproduksi matrix metalloprotein (MMP) untuk memulai suatu proses angiogenesis. MMP memecah ekstraseluler matrix. Hal ini merangsang migrasi sel endotel. Sel endotel mulai membelah begitu mereka bermigrasi ke jaringan sekitarnya. Kemudian tersusun menjadi pembuluh darah baru dan kemudian berkembang menjadi pembuluh darah matur.⁷ Hal tersebut menjelaskan mengapa pada penelitian ini ditemukan jumlah subyek dengan ekspresi COX-2 positif lebih besar dibandingkan dengan yang negatif.

Pada penelitian ini diperoleh *cut of point* nilai MVD dengan kurva ROC adalah 4,5 MV/LP. Sehingga pada penelitian diperoleh MVD rendah 29,03% dan MVD tinggi 70,97%. Pada penelitian Hasibuan ditetapkan batas MVD 45 MV/LP. Penelitian oleh Xu *et al.* (2006)

menemukan rata-rata MVD 32. Perbedaan hasil MVD pada berbagai penelitian ini mungkin disebabkan perbedaan teknik pembacaan dan teknik pewarnaan dengan marker yang berbeda seperti CD31, CD34, dan factor VIII, dan hingga saat ini belum ada penelitian yang membandingkan berbagai teknik pewarnaan ini untuk menentukan teknik pewarnaan yang ideal.¹⁵

Berdasarkan hasil uji normalitas data dengan uji Kolmogrov-Smirnov didapatkan bahwa data COX-2 dan *microvessel density* berdistribusi normal ($p > 0,05$). Untuk mengetahui hubungan antara COX-2 dan *microvessel density* digunakan uji korelasi *Pearson*. Hasil analisis dengan uji korelasi *Pearson* didapatkan nilai $r = 0,868$ dan $p = 0,001$. Hal ini berarti bahwa terdapat hubungan positif antara COX-2 dengan *microvessel density* ($p < 0,05$). Hal ini sesuai dengan penelitian Hasibuan pada tahun 2014, dimana hasil penelitiannya menunjukkan adanya korelasi positif sedang antara COX-2 dengan *microvessel density* dengan koefisien korelasi $r = 0,559$ dengan $p = 0,005$. Berbeda dengan Tan dan Putti pada tahun 2005 yang tidak menemukan adanya hubungan antara ekspresi COX-2 dan MVD *undifferentiated carcinoma nasopharynx* karsinoma nasofaring ($p = 0,774$).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi positif antara ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) dan *microvessel density* (MVD) pada *undifferentiated carcinoma nasopharynx*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tse LA, Yu IT-S, Mang OW-K, Wong SL. Incidence rate trends of histological subtypes of nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong. *Br J Cancer*. 2006; 95: 1269-73.
2. Direktorat Jendral Pelayanan Medik. Kanker di Indonesia Tahun 2010, Data Histopatologi. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2010.
3. Roezin A. Karsinoma nasofaring. In: Soepardi, Arsyad E, editors. Buku Ajar Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Kepala dan Leher. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2007.
4. Brennan B. Nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet J Rare Diseases*. 2006; 1: 1-5.

5. Cho WC, 2007. Nasopharyngeal Carcinoma: Molecular Biomarker Discovery and Progres. *Mol Cancer*. 2007; 6: 1.
6. Garden A. The nasopharynx. In: Co, J.D, Ang, K.K, editors. *Radiation oncology: rationale, technique, results*. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2010.
7. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*. 2006; 2: 213-9.
8. Choi WWL, Lewis MM, Lawson D, Goen QY, Birdsong GG, Cotsonis GA. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameter and VEGF family gene expression. *Mod Pathol*. 2005; 18: 143-52.
9. Hasibuan NR, Farhat, Haryuna TSH, Yudhistira A. Korelasi positif ekspresi cyclooxygenase-2 dengan gambaran microvessel density pada karsinoma nasofaring. *ORLI*. 2014; 44: 34-43.
10. Tan KB, Putti TC. Cyclooxygenase-2 expression in nasopharyngeal carcinoma: Immuno-histochemical finding and potential implication. *J Clin Pathol*. 2005; 58: 535-8.
11. Chan JKC, Pilch BZ, Kuo TT, Wenig BM, Lee AWM. Nasopharyngeal carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidrasky, D editors. *WHO classification of tumours: Pathology and genetics head and neck tumours*. Lyon: IARC Press; 2005.
12. Tawevisit M, Keelawat S, Thoner PS. Correlation of microvascular density and proliferation index in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Asian Biomed*. 2010; 4: 315-21.
13. Xu X, Hu G, Li S, Xu F, Li D, Dai D, *et al*. Expression of cyclooxygenase-2 in nasopharyngeal carcinoma and its relation to angiogenesis and prognosis. *Chinese-German J Clin Oncol*. 2006; 5: 104-7.
14. Bertagnolli M, Viner JI, Hawk ET. Cyclooxygenase-2 as a Target for Cancer Prevention and Treatment. In: Tavassoli, FA, Devilee, P (eds). *Molecular Targeting in Oncology*. Boston: Humana Press; 2008.
15. Rao VUS, Shenoy AM, Karthikeyan B. Role of angiogenetic markers to predict neck node metastasis in head and neck. *J Cancer Res Ther*. 2011; 6: 142-6.