

**HUBUNGAN METILASI DAN EKSPRESI GEN *WRN*  
PADA PASIEN KANKER PAYUDARA  
DI RUMAH SAKIT KANKER DHARMAIS**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M. Biomedik)**

**RINI AGUSTIEN TANDJUNG  
NPM: 0706170955**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
KEKHUSUSAN ONKOLOGI  
JAKARTA  
JUNI 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.**

**Nama : Rini Agustien Tandjung**

**NPM : 0706170955**

**Tanda Tangan :**



**Tanggal : 23 Juni 2010**

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Rini Agustien Tandjung  
NPM : 0706170955  
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Onkologi  
Judul Tesis : Hubungan Metilasi dan Ekspresi Gen *WRN*  
Pada Pasien Kanker Payudara di Rumah Sakit  
Kanker Dharmais.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Kekhususan Onkologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. Samuel J. Haryono, Sp. B. (K) Onk

Pembimbing II : Ahmad Rusdan Handoyo Utomo, Ph.D.

Penguji I : dr. Nurjati Chairani Siregar, MS, PhD, Sp.PA(K)

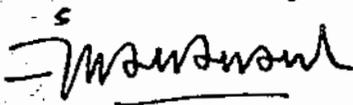
Penguji II : dr. Alida Harahap, PhD, Sp.PK(K)

Penguji III : Prof. drs. Purnomo Soeharso, PhD

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 23 Juni 2010

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FKUI

  
Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas pertolongan- Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini dengan judul “ **Hubungan metilasi dan ekspresi gen *WRN* pada pasien kanker payudara di Rumah Sakit Kanker Dharmais** “. Tesis ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (PMIB FKUI).

Terima kasih penulis sampaikan kepada Dr. dr. Ratna Sitompul, Sp.M (K) sebagai Dekan FKUI dan Prof. dr. Menaldi Rasmin, Sp.P (K), FCCP sebagai dekan FKUI periode 2004 – 2008 yang telah menerima penulis sebagai mahasiswa Magister Ilmu Biomedik tahun ajaran 2007.

Penghargaan dan terima kasih kepada Dr. rer.physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FKUI yang telah memberikan pengarahan selama penulis menjalankan pendidikan.

Penghargaan dan terima kasih kepada Prof. dr. Siti Boedina Kresno, SpPK (K) selaku Ketua Kekhususan Onkologi Ilmu Biomedik FKUI yang telah banyak memberikan pengarahan dan dukungan selama penulis menjalankan pendidikan.

Kepada Dr. dr. Aida Suriadiredja, SpKK (K) selaku Sekretaris Kekhususan Onkologi Ilmu Biomedik FKUI, penulis mengucapkan banyak terima kasih yang selalu bersedia membantu dalam segala hal untuk kelancaran perkuliahan dan selalu memberi semangat untuk menyelesaikan studi ini.

Terima kasih disertai rasa hormat dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada dr. Samuel J. Haryono, Sp. B (K) Onk selaku pembimbing. Terima kasih atas semua saran, bimbingan, dukungan dan waktu yang amat berharga yang telah diberikan selama penulis mengerjakan tesis ini.

Kepada Bapak Ahmad Rusdan Handoyo Utomo, Ph.D selaku pembimbing dalam melaksanakan kerja laboratorium penelitian ini juga memberi pengarahan dalam penulisan tesis ini, penulis mengucapkan terima kasih disertai rasa hormat dan penghargaan yang setinggi-tingginya atas semua saran, bimbingan, dukungan, kesabaran dan waktu yang amat sangat berharga yang diberikan selama penulis mengerjakan tesis.

Kepada Prof. dr. Santoso Cornain DSc. penulis mengucapkan banyak terima kasih yang telah bersedia memberi penjelasan teori, pengarahan dalam penulisan tesis dan dalam statistik analisis data.

Dengan penuh hormat penulis menyampaikan penghargaan dan banyak terima kasih kepada Dr. dr. Sutoto Cokro, M. Kes dan Dr. dr. Abidin Widjanarko, SpPD, KHOM yang telah memberikan kesempatan dan dukungan penuh kepada penulis untuk melaksanakan studi ini dan juga telah memberi ijin kepada penulis untuk melakukan penelitian di Stem Cell and Cancer Institute.

Terima kasih kepada dr. Lenny Sari Sp.PA selaku Kepala Instalasi Patologi Anatomi Rumah Sakit Kanker Dharmais yang telah membantu penulis dalam kelancaran perkuliahan dan penelitian beserta kawan-kawan di Patologi Anatomi Rumah Sakit Kanker Dharmais yang selalu memberi bantuan kepada penulis, khususnya Bapak Harry Haryono yang telah menolong penulis dalam mengumpulkan bahan sampel. Terima kasih semuanya atas apa yang dilakukan selama ini kepada penulis untuk kelancaran perkuliahan dan tesis ini.

Terima kasih kepada dr. Sutjipto, dr. Ramadan, dr. Walta G, dan dr Denny Joko Purwanto atas kontribusinya dalam tesis ini untuk pemakaian jaringan dari pasien masing-masing.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Stem Cell and Cancer Institute yang telah memberi ijin dan menyediakan semua fasilitas laboratorium kepada penulis untuk melakukan penelitian ini, kepada seluruh karyawan di Stem Cell and Cancer Institute terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya selama penulis melakukan penelitian di SCI, terutama untuk Ibu Fellecia Putri Yanuari Suyanto S si, Bapak Farid Sastra Nagara S si, Bapak Britanto Dani Wicaksono S si dan Ibu Liwenny Ho B.S. M. Eng. yang telah membantu penulis dengan sabar.

Terima kasih kepada Dr. dr. Noorwati Sutandyo, SpPD, KHOM dan Dr. dr. Tubagus Djumhana Atmakusuma, SpPD, KHOM yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk mengikuti AOS 2010 (Asian Oncology Summit), dimana Alhamdulillah poster penelitian ini juga diterima di AOS 2010.

Kepada seluruh staf sekretariat program studi Magister Biomedik FKUI, Bapak Zacky Zakaria, Bapak Danny Ramdany dan Ibu Dahayu Janitra Sadara, beserta Ibu Kartika Anastafuri dan Ibu Nia Suherniati di sekretariat kekhususan

Onkologi di RS Kanker Dharmais, terima kasih atas semua bantuannya terutama dalam melaksanakan semua proses-proses administrasi, perkuliahan dan kelancaran untuk ujian tesis hingga semua berjalan lancar.

Teruntuk keluarga yang tercinta penulis berterima kasih atas dukungan, motivasi dan doa selama penulis melaksanakan pendidikan ini.

Terima kasih penulis sampaikan kepada teman-teman yang tidak dapat disebut namanya satu persatu dan semua pihak yang telah membantu dengan doa-doa mereka selama penulis melanjutkan studi, melakukan penelitian dan penyusunan tesis ini.

Kiranya semua pihak yang telah memberikan bantuan dan kebaikan kepada penulis akan senantiasa diberi kemudahan oleh Allah SWT. Dengan rendah hati penulis menyadari bahwa tidak ada karya yang sempurna selain Maha Karya-Nya, oleh karena itu kepada segenap pembaca karya kecil ini, penulis menghaturkan penghargaan dan ucapan terima kasihserta tidak menutup mata untuk menerima koreksinya.

Jakarta, 23 Juni 2010

Penulis.

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rini Agustien Tandjung.  
NPM : 0706170955  
Program Studi : Pasca Sarjana Ilmu Biomedik  
Departemen : Onkologi  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis Karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Hubungan Metilasi dan Ekspresi Gen *WRN* Pada Pasien Kanker Payudara di Rumah Sakit Kanker Dharmais.**

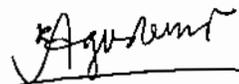
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 23 Juni 2010

Yang Menyatakan



( Rini Agustien Tandjung )

## ABSTRAK

Nama : Rini Agustien Tandjung  
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Onkologi  
Judul : Hubungan Metilasi dan Ekspresi gen *WRN* pada pasien kanker payudara di Rumah Sakit Kanker Dharmais

**Latar Belakang:** Akhir-akhir ini peristiwa epigenetik turut berperan menjadi penyebab keganasan. Peristiwa epigenetik meliputi metilasi DNA dan modifikasi histon. Gen penekan tumor adalah salah satu golongan gen yang merupakan target utama kerusakan DNA. Contohnya gen penekan tumor dapat tidak berfungsi karena termutasi, termetilasi dan mengalami LOH (*Loss of heterozygosity*), gen *WRN* adalah termasuk gen penekan tumor. Gen *WRN* termutasi pada penyakit Werner Syndrome, gen *WRN* yang terletak pada kromosom 8p 11.2-12 sering mengalami LOH dan pada lokus genetik ini terdapat pada pasien usia muda kanker payudara, laporan terakhir menyatakan bahwa gen *WRN* dapat mengalami metilasi, semua kejadian pada gen *WRN* tersebut dapat mengarah ke kanker.

**Tujuan:** Penelitian ini untuk mengetahui karakteristik status gen *WRN* yang termetilasi pada pasien kanker payudara di Rumah sakit Kanker Dharmais dan hubungan gen *WRN* yang termetilasi tersebut dengan ekspresi mRNA nya.

**Desain:** Analitik.

**Metode:** Jaringan segar kanker payudara di isolasi sehingga didapat DNA dan RNA. Untuk mengecek kualitas DNA yang didapat dilakukan PCR konvensional dengan primer Interferon-Gamma. Dilanjutkan perlakuan sodium bisulfit, untuk mengkonversi sitosin yang tidak termetilasi menjadi urasil sedangkan sitosin yang termetilasi tetap menjadi sitosin. Primer myod-1 untuk mengecek hasil perlakuan sodium bisulfit kemudian dilakukan teknik MSP dengan masing-masing Primer metilasi dan Primer tidak metilasi. RNA yang didapat di *reverse transcriptase* menjadi cDNA kemudian di perlakukan bersama cDNA B-actin diperiksa dengan Real Time PCR. Uji Mann- Whitney U dipakai untuk menguji hubungan antara gen *WRN* yang termetilasi dengan ekspresi mRNA dan uji Fisher untuk menguji hubungan antara gen *WRN* yang termetilasi dengan data klinik meliputi usia penderita, hasil pemeriksaan Immunohistokimia (ER, PR, Her2, p53) dan TNM.

**Hasil:** Gen *WRN* yang termetilasi sebanyak 9 sampel dari 60 sampel (15%). Ekspresi mRNA yang dapat dinilai datanya sebanyak 49 sampel dari 60 sampel (81,67%) dan Rasio ekspresi *WRN* terhadap B-actin sekitar 0,00 hingga 27,75.

**Kesimpulan:** Tidak ada hubungan antara gen *WRN* yang termetilasi dengan ekspresi mRNA dengan  $P = 0,61$  dan tidak ada hubungan antara gen yang termetilasi dengan data klinik yang terdiri dari hasil pemeriksaan ER, PR, Her2, Triple negatif, p53, dan TNM, tapi ada hubungan yang signifikan antara usia penderita yang muda (dibawah dan sama dengan 40 tahun) dengan gen *WRN* yang termetilasi dengan  $P = 0,02$ .

Kata kunci:

kanker payudara, metilasi DNA promoter, ekspresi gen *WRN*

## ABSTRACT

Name : Rini Agustien Tandjung  
Study Program: Master of Biomedical Sciences Oncology Specialty  
Title : Relationship between Methylation and Expression of *WRN* gene  
in breast cancer patients at the Dharmais National Cancer Hospital

**Background:** Epigenetic events including DNA methylation and histone modifications contribute to the cause of malignancy. Tumor suppressor genes belong to class of genes which may be subjected to DNA damage or modification. For instance, tumor suppressor gene may be inactivated by mutation, methylation and LOH ( *Loss of heterozigosity*), the *WRN* gene is an example of tumor suppressor gene. Mutated in the premature aging Werner syndrome, *WRN* gene is located on chromosome 8p 11.2-12. Futhermore, LOH in this genetic locus is found in a subset of early onset breast cancer patients. Recent report also indicated that *WRN* gene may be susceptible to methylation. These data suggest that *WRN* gene inactivation may lead to cancer.

**Objective :** This study aims to examine the characteristic of a methylation status of *WRN* gene in breast cancer patients at Dharmais National Cancer Hospital and the relationship between *WRN* gene methylation with its mRNA expression.

**Design:** Analytical.

**Methods:** DNA and RNA were isolated from archived frozen breast cancer tissue sample. DNA quality was checked by PCR amplification of Interferon-gamma gene. To determine promoter methylation, DNA was treated with bisulfite to distinguish methylated cytosine from unmethylated ones. The quality of converted DNA was determined by amplification of Myod-1 locus with contain cytosine rich sequences that are susceptible to uracil conversion upon bisulfite treatment. Subsequently, *WRN* methylation was determined using Methylation Specific PCR (MSP) using 2 set of primers recognizing either methylated or unmethylated *WRN* sequence. *WRN* expression was determined by the level of cDNA upon conversion of total, RNA using reverse transcriptase. Expression of *WRN* was calibrated to B-actin expression using Real-Time PCR and Pffaf1 method. Mann-Whitney U test was used to examine the relationship between *WRN* gene methylation and its mRNA expression. Fisher test was used to examine the relationship between *WRN* gene methylation status with clinical data include age, Immunohistokimia test (ER,PR,Her2,p53) and TNM.

**Results:** *WRN* gene is methylated in nine samples out of 60 samples (15%). mRNA expression data was assessed from 49 samples out of 60 samples only (81,67%). Although there is a trend of mRNA silencing in methylated *WRN* gene, the relationship does not reach statistical significance. *WRN* expression ratio of B- actin around 0,00 to 27,75

**Conclusion:** There is no relationship between the *WRN* gene methylation and mRNA expression,  $P = 0.61$  and no relationship between the *WRN* gene methylated with clinical data that consists of ER, PR, Her2, Triple negative, p53, and TNM. Interestingly, *WRN* methylation was found more frequently in early onset breast cancer patients,  $P = 0,02$ .

**Keywords:** Breast cancer, DNA methylation promoter, *WRN* gene expression.

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
<b>1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Hipotesis.....	4
1.4 Tujuan.....	4
1.5 Manfaat.....	5
<b>2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Kanker Payudara.....	6
2.1.1. Epidemiologi dan faktor-faktor resiko terjadinya kanker payudara.....	6
2.1.2. Jenis-jenis kanker payudara.....	12
2.1.3. Klasifikasi Kanker Payudara.....	13
2.1.4. Karsinogenesis.....	14
2.2. Epigenetik.....	15
2.3 Gen Penekan Tumor.....	18
2.4. Gen <i>WRN</i> .....	22
Gen <i>WRN</i> secara umum.....	22
Gen <i>WRN</i> secara molekuler.....	25
2.5. Real Time PCR ( <i>Polymerization Chain Reaction</i> ).....	30
<b>3 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>35</b>
3.1 Desain Penelitian.....	35
3.2 Lokasi Penelitian.....	35
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian.....	35
3.4 Jenis Sampel.....	36
3.5 Teknik Pengambilan Sampel.....	36
3.6 Subyek Penelitian.....	36
3.7 Besar Sampel.....	37
3.8 Bahan dan Cara Kerja.....	38
3.8.1. Rekrutmen subyek penelitian.....	38
3.8.2. Bahan penelitian.....	38

3.8.3. Metode Pemeriksaan.....	38
3.8.3.a. Isolasi DNA.....	38
3.8.3.b. Isolasi RNA.....	43
3.8.4. Amplifikasi cDNA menggunakan Real - Time PCR.....	45
3.9 Analisis Data .....	46
<b>4 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>47</b>
4.1 Karakteristik Subyek Penelitian .....	47
4.2 Demografi Subyek Penelitian.....	47
4.3 Status DNA .....	49
4.3.1. PCR dengan Primer Interferon – Gamma.....	50
4.3.2. Perlakuan Sodium Bisulfit.....	50
4.3.3. PCR dengan Primer Myod-1 (Myogenic Differentiation 1)..	52
4.3.4. PCR Metilasi Spesifik (MSP).....	54
4.3.5. Kontrol M (+) dan M (-).....	54
4.3.6. PCR dengan Primer Metilasi.....	55
4.3.7. PCR dengan Primer Tidak Termetilasi.....	56
4.4. Ekspresi mRNA WRN dengan <i>Reverse Transcriptase</i> PCR .....	57
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>65</b>
<b>DAFTAR KEPUSTAKAAN.....</b>	<b>66</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>74</b>
<b>RIWAYAT HIDUP.....</b>	<b>78</b>
<b>DRAFT ARTIKEL.....</b>	

## DAFTAR TABEL

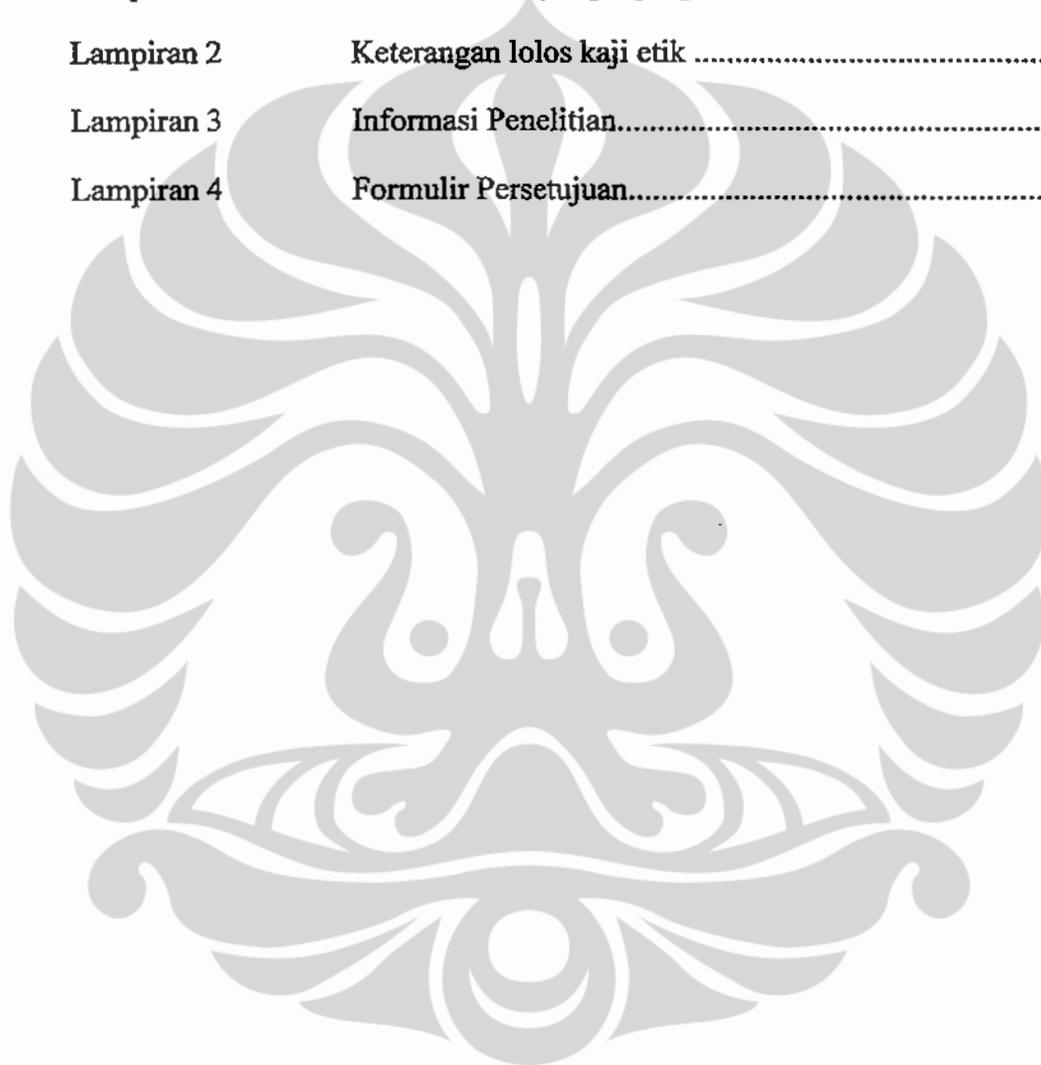
Tabel 2.1.	Gen Penekan Tumor dan Fungsinya.....	20
Tabel 2.2	Perbedaan antara Real-Time PCR dengan PCR Konvensional .....	31
Tabel 4.1.	Demografi Subyek Penelitian.....	48
Tabel 4.2.	Ekspresi untuk gen <i>WRN</i> yang termetilasi.....	62
Tabel 4.3.	Ekspresi untuk gen <i>WRN</i> yang tidak termetilasi .....	62
Tabel 4.4.	Hubungan Data Klinik dengan gen <i>WRN</i> yang termetilasi dan gen <i>WRN</i> yang tidak termetilasi .....	64

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Perbandingan Prosentase Penderita Kanker di Indonesia pada tahun 2005 dan tahun 2030.....	7
Gambar 2.2	Kasus Jenis Kanker Baru di Indonesia .....	8
Gambar 2.3	10 besar Kanker Tersering di Rumah Sakit Kanker Dharmais Rawat Jalan (Kasus Baru) tahun 2007.....	10
Gambar 2.4	Metilasi.....	17
Gambar 2.5	Metilasi yang mengganggu proses Transkripsi.....	17
Gambar 2.6	Mutasi, Metilasi dan <i>Loss of Heterozigote</i> .....	19
Gambar 2.7	Fusi sel Normal dan sel Neoplastik.....	19
Gambar 2.8	Gen kanker dan gen Normal.....	19
Gambar 2.9	Terjadinya Masalah Akhir Replikasi.....	24
Gambar 2.10	Struktur Protein WRN.....	26
Gambar 2.11	Lokasi gen <i>WRN</i> dalam kromosom 8 .....	26
Gambar 2.12	Hubungan gen <i>WRN</i> dengan penuaan dan kanker.....	26
Gambar 2.13	Gen <i>WRN</i> pada kanker .....	29
Gambar 2.14	Kurva Fluoresens pada Real-Time PCR.....	33
Gambar 2.15	<i>Cycle Threshold</i> .....	33
Gambar 4.1	Elektroforesis DNA .....	49
Gambar 4.2.	Hasil PCR dengan Primer Interferon- Gamma.....	50
Gambar 4.3.	Proses Perlakuan Sodium Bisulfit .....	51
Gambar 4.4.	Hasil PCR untuk Kontrol dengan Primer Myod-1 .....	53
Gambar 4.5.	Hasil PCR untuk Kontrol dan Sampel dengan Primer Myod-1 .....	53
Gambar 4.6.	Hasil PCR untuk Kontrol yang termetilasi.....	55
Gambar 4.7.	Hasil PCR untuk Kontrol dan Sampel yang termetilasi.....	55
Gambar 4.8.	Hasil PCR Kontrol yang tidak termetilasi.....	56
Gambar 4.9	Hasil PCR untuk Kontrol yang tidak termetilasi.....	56
Gambar 4.10	Elektroforesis RNA.....	57
Gambar 4.11.	Nilai C (t) gen <i>B- actin</i> dan gen <i>WRN</i> .....	58
Gambar 4.12	<i>Melting Curve</i> gen <i>B- actin</i> dan gen <i>WRN</i> .....	59
Gambar 4.13	Ekspresi gen <i>B-actin</i> dan gen <i>WRN</i> .....	60
Gambar 4.14.	Bagan Hasil Penelitian.....	61
Gambar 4.15.	Hubungan Metilasi dengan Ekspresi.....	63

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Daftar Primer yang dipergunakan.....	74
Lampiran 2	Keterangan lolos kaji etik .....	75
Lampiran 3	Informasi Penelitian.....	76
Lampiran 4	Formulir Persetujuan.....	77



## DAFTAR SINGKATAN

1. OR : *Odds ratio*
2. CI : *Confidence interval*
3. IHC : *Immunohistokimia*
4. ER : *Estrogen Reseptor*
5. PR : *Progesteron Reseptor*
6. Her 2 : *Human epidermal growth factor receptor 2*
7. Triple Negatif : Pemeriksaan IHC yang menghasilkan ER negatif,  
PR negatif dan Her 2negatif .
8. DNA : *Deoxyribonucleic acid*
9. RNA : *Ribonucleic acid*
10. DNMT : *DNA methyltransferase*
11. LOH : *Loss Of Heterozygosity*
12. BRCA : *Breast Cancer*
13. MLH1 : *Human mutL homolog 1, kanker kolon*
14. NTC : *No Template Control*

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Kanker payudara merupakan jenis kanker terbanyak diderita oleh perempuan di dunia menurut data WHO pada tahun 2002 dan merupakan penyebab kematian pertama pada perempuan di Indonesia pada tahun 2005.<sup>1</sup> Jumlah kasus kanker payudara pada perempuan menunjukkan peningkatan setiap tahunnya. Di seluruh dunia angka kejadian kanker payudara terus meningkat. Pada negara-negara besar mempunyai banyak kasus kanker payudara tetapi tidak selalu merupakan kasus tertinggi atau terbanyak dari seluruh keganasan. Di dunia kasus kanker payudara merupakan penyebab kematian terbanyak pada wanita.<sup>2,3</sup> Pada pria angka kejadian kanker payudara adalah satu diantara 1000 orang pria dari semua jenis kasus kanker payudara.<sup>4,5,6</sup> Frekwensi terjadinya kanker payudara pada wanita dapat 100 kali dari pada pria.<sup>5,6</sup> Di Indonesia diperkirakan angka kejadian kanker payudara lebih dari 26 orang per 100.000 penduduk dan kanker payudara menempati posisi kedua setelah kanker leher mulut rahim.<sup>7</sup> Data Bidang Rekam Medis di Rumah Sakit Kanker Dharmas menunjukkan bahwa sejak tahun 1993 hingga tahun 2009, kanker payudara selalu menempati peringkat pertama dari 10 besar jenis kanker yang ada di RSKD per tahun.<sup>8</sup> dan yang lebih mengkhawatirkan adalah penderitanya semakin banyak adalah wanita usia muda

Dari beberapa macam resiko yang berkaitan dengan terjadinya kanker payudara, salah satunya adalah karena faktor keturunan dan disamping itu juga ada peristiwa epigenetik yang berkaitan dengan terjadinya kanker payudara, peristiwa epigenetik adalah peristiwa metilasi DNA dan modifikasi histone.<sup>9,10</sup> Epigenetik adalah salah satu mekanisme penghambatan tanpa merubah sekuens DNA (non-mutasi) terhadap proses transkripsi tapi dapat mengakibatkan hilangnya atau berkurangnya ekspresi dari golongan gen-gen tertentu seperti gen penekan tumor yang berperan untuk menghambat terjadinya kanker.<sup>9</sup> Peristiwa metilasi DNA adalah satu peristiwa modifikasi pada eukariote,<sup>11</sup> peristiwa ini berguna untuk kehidupan,

contoh peristiwa epigenetik pada biologi eukariote adalah differensiasi sel pada masa embrio<sup>11</sup> tetapi perubahan metilasi sering berhubungan dengan penyakit.<sup>10,12</sup>

Gen penekan tumor adalah gen yang melindungi sel dengan cara mengatur kapan sel tersebut dapat membelah atau memperbanyak diri, memperbaiki kerusakan DNA dan menginduksi terjadinya apoptosis.<sup>13</sup> Produk gen penekan tumor, pada umumnya memberikan sinyal untuk menghambat pertumbuhan (mitosis) yang abnormal,<sup>13</sup> dan terlibat dalam proses biologis seperti kontrol siklus sel, replikasi DNA, rekombinasi DNA, sinyal transduksi, perbaikan DNA, differensiasi jaringan dan proses penuaan.<sup>11</sup> Gen-gen penekan tumor yang terlibat dalam perbaikan DNA antara lain adalah gen *MLH1* (yang sering termutasi pada kanker kolorektal tipe hereditas dan termetilasi pada kanker kolorektal tipe sporadik)<sup>14,15</sup>, gen *p53* (yang termutasi pada sekitar 50% jenis kanker<sup>16</sup> dan gen *BRCA1* (yang sering termutasi pada kanker payudara dan kanker ovarium).<sup>17</sup> Gen penekan tumor seperti gen *p53* juga menyandi protein yang berperan dalam sinyal transduksi untuk meningkatkan apoptosis sel-sel yang mengandung DNA yang rusak.<sup>17</sup> Jadi gen-gen tersebut mempunyai implikasi pada kanker (tumorigenesis), karena kegagalannya dalam menyandi sinyal dari stimulan tersebut (kegagalan perbaikan DNA, kegagalan transkripsi)<sup>14,18</sup> dan juga berimplikasi terhadap hasil kemoterapi.<sup>18</sup> Gen penekan tumor lainnya yang juga memiliki fungsi perbaikan DNA adalah gen *WRN*.<sup>19</sup> Perbaikan DNA merupakan bagian tidak terpisahkan dari mekanisme sel dalam mempertahankan sel terhadap kerusakan yang terjadi. Perbaikan DNA sangat penting sebagai proses untuk mengatasi mutasi sel, kesalahan replikasi, kerusakan DNA yang menetap dan ketidak stabilan genom. Kelainan pada mekanisme ini menyebabkan sel-sel tidak dapat melindungi diri dari kerusakan DNA yang antara lain akan mengakibatkan timbulnya keganasan.<sup>20</sup>

Gen *WRN* termasuk RecQ helikase<sup>21,22,23</sup> yaitu RecQL2 helikase.<sup>22</sup> RecQ helikase adalah enzim helikase yang sangat penting dalam menjaga genom.<sup>23</sup> Protein yang dihasilkan oleh gen *WRN* termasuk dalam RecQ DNA helikase dan RNA helikase<sup>22,23</sup> serta bertindak sebagai DNA helikase dengan kegiatan eksonuklease.<sup>24,25</sup> DNA helikase adalah enzim yang terlibat dalam berbagai mekanisme DNA meliputi

transkripsi, replikasi, rekombinasi dan perbaikan,<sup>22</sup> sesuai dengan fungsi gen *WRN* yang juga terlibat pada mekanisme replikasi DNA, pemeliharaan DNA, perbaikan DNA, penuaan dan kestabilan genom.<sup>19</sup> Lokasi gen *WRN* terletak pada kromosom 8p11.2-p12,<sup>25,26</sup> dimana pada lokasi ini sering terjadi *Loss of heterozygosity* (LOH) dan perubahan kromosom yang berhubungan dengan keganasan (kecenderungan kanker) di berbagai macam jenis kanker termasuk kanker payudara.<sup>22,23,27,28</sup> Gen *WRN* dapat termutasi pada penyakit Werner Syndrome (penyakit yang mengalami proses penuaan lebih cepat) dan berindikasi mengarah kepenyakit kanker, ada beberapa laporan terakhir menunjukkan bahwa polimorfisme pada gen *WRN* berasosiasi dengan peningkatan resiko terjadinya kanker payudara.<sup>28,29,30</sup> Secara *in vivo* pada mencit dan *in vitro*, gen *WRN* telah terbukti sebagai gen penekan tumor,<sup>25</sup> dan diketahui dapat mengalami inaktivasi epigenetik melalui metilasi promoter.<sup>25</sup> Terjadinya metilasi pada gen penekan tumor adalah salah satu mekanisme untuk menghilangkan atau menghambat fungsi gen tersebut. Mekanisme penghambatannya terjadi tanpa merubah sekuen DNA (non-mutasi) tetapi mengganggu proses transkripsi mRNA sehingga terjadi penurunan tingkat ekspresi mRNA. Proses epigenetik meliputi proses metilasi DNA dan modifikasi histon berarti ekspresi fenotip tidak hanya dipengaruhi oleh proses metilasi saja tapi dapat juga oleh proses modifikasi histon.<sup>9</sup> Perubahan genetik atau peristiwa epigenetik dapat memberikan nilai prognostik maupun prediktif tertentu seperti sensitivitas terhadap obat atau tingkat keganasan dalam penyebaran (metastatik).<sup>11,31,32</sup> Hingga saat ini efek metilasi pada promoter gen *WRN* pada kanker payudara belum dipelajari secara lebih detail secara *in vivo* atau pada pasien kanker. Disamping itu masih sedikit sekali penelitian mengenai gen *WRN*, promoter metilasi DNA dan ekspresinya pada kanker payudara. Ada penelitian mengenai metilasi pada gen *WRN* yang memberikan hasil yaitu gen *WRN* yang termetilasi sebesar 17% pada kanker payudara,<sup>25</sup> tetapi belum diketahui efek metilasi pada promoter *WRN* tersebut pada tingkat ekspresi mRNA gen *WRN*. Pada penelitian yang akan kami lakukan sekarang yaitu untuk mengetahui besarnya prosentasi kanker payudara yang termetilasi di Rumah Sakit Kanker Dharmas, apakah ada kesamaan hasil data metilasi gen *WRN* dengan hasil yang didapat dari

Universitas Indonesia

penelitian sebelumnya dan apakah metilasi tersebut mempengaruhi ekspresi mRNA gen *WRN*. Profil kanker payudara di Indonesia memang unik karena lebih sering berstatus Estrogen Reseptor negatif, yaitu sebesar 72,2% sedangkan di luar negeri sebesar 35%.<sup>33</sup>

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas, maka dapat disimpulkan pertanyaan penelitian sebagai berikut :

Apakah terdapat penurunan ekspresi gen *WRN* sebagai akibat terjadinya metilasi DNA promoter gen *WRN* pada kanker payudara.

## 1.3. Hipotesis

Terdapat hubungan antara adanya metilasi DNA promoter gen *WRN* dengan penurunan ekspresi gen *WRN* pada jaringan primer kanker payudara.

## 1.4. Tujuan Penelitian

### 1.4.1. Tujuan Umum

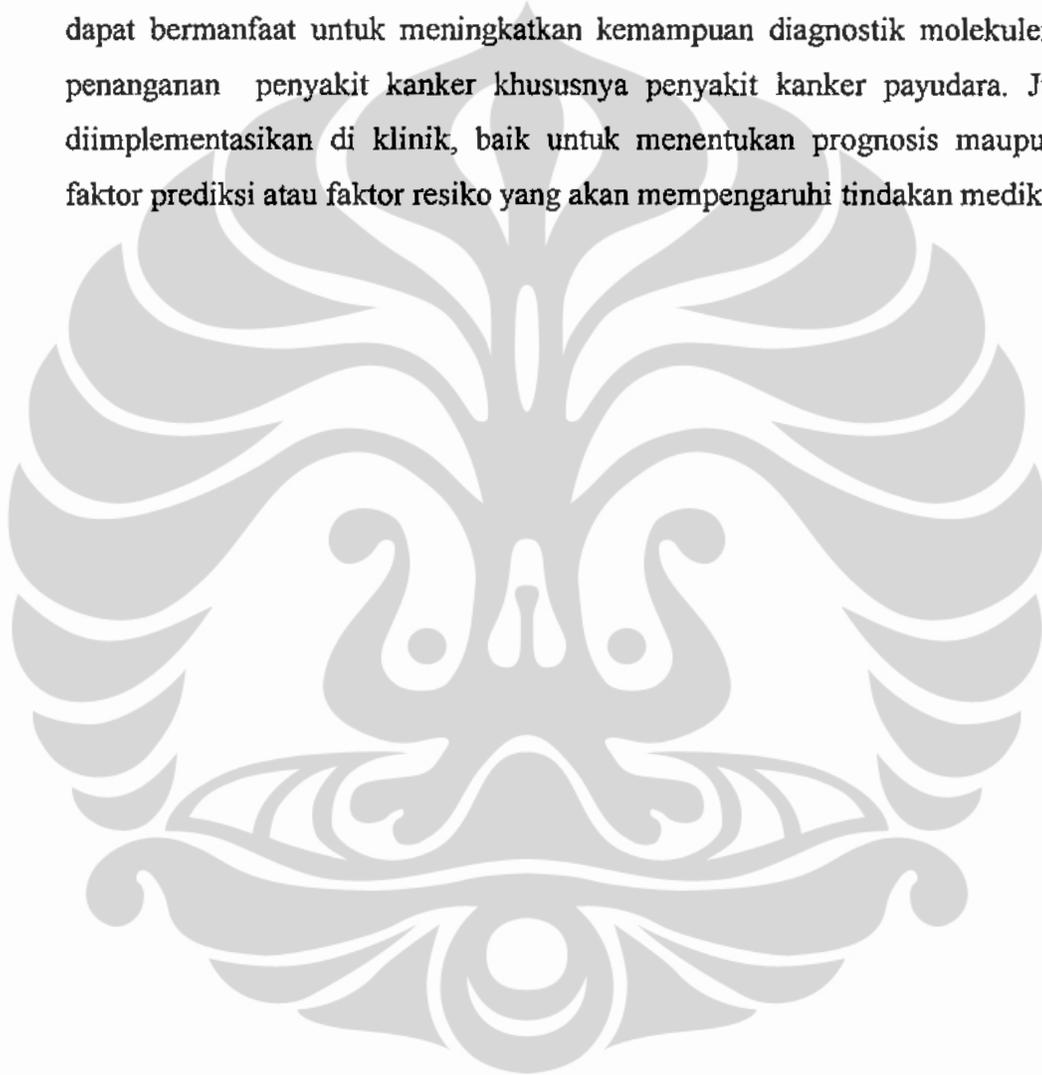
Untuk mengetahui peran metilasi terhadap gen perbaikan DNA: dengan tinjauan khusus pada terjadinya peristiwa metilasi DNA gen *WRN*.

### 1.4.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui karakteristik status metilasi DNA gen *WRN* pada kanker payudara.
2. Untuk mengetahui hubungan antara adanya metilasi DNA promoter gen *WRN* dengan penurunan ekspresi gen *WRN* pada kanker payudara.
3. Untuk mengetahui hubungan antara gen *WRN* yang termetilasi dan gen *WRN* yang tidak termetilasi dengan data klinik yang meliputi antara lain: usia, histopatologik dan TNM (T = ukuran tumor, N = node (getah bening, M = metastasis).

### 1.5. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam bidang akademik/ilmiah, memberikan data tambahan tentang gen *WRN*, yang masih sedikit jumlah jurnal tentang gen ini. Dalam bidang pelayanan kesehatan masyarakat, diharapkan dapat bermanfaat untuk meningkatkan kemampuan diagnostik molekuler terhadap penanganan penyakit kanker khususnya penyakit kanker payudara. Juga dapat diimplementasikan di klinik, baik untuk menentukan prognosis maupun sebagai faktor prediksi atau faktor resiko yang akan mempengaruhi tindakan medik.



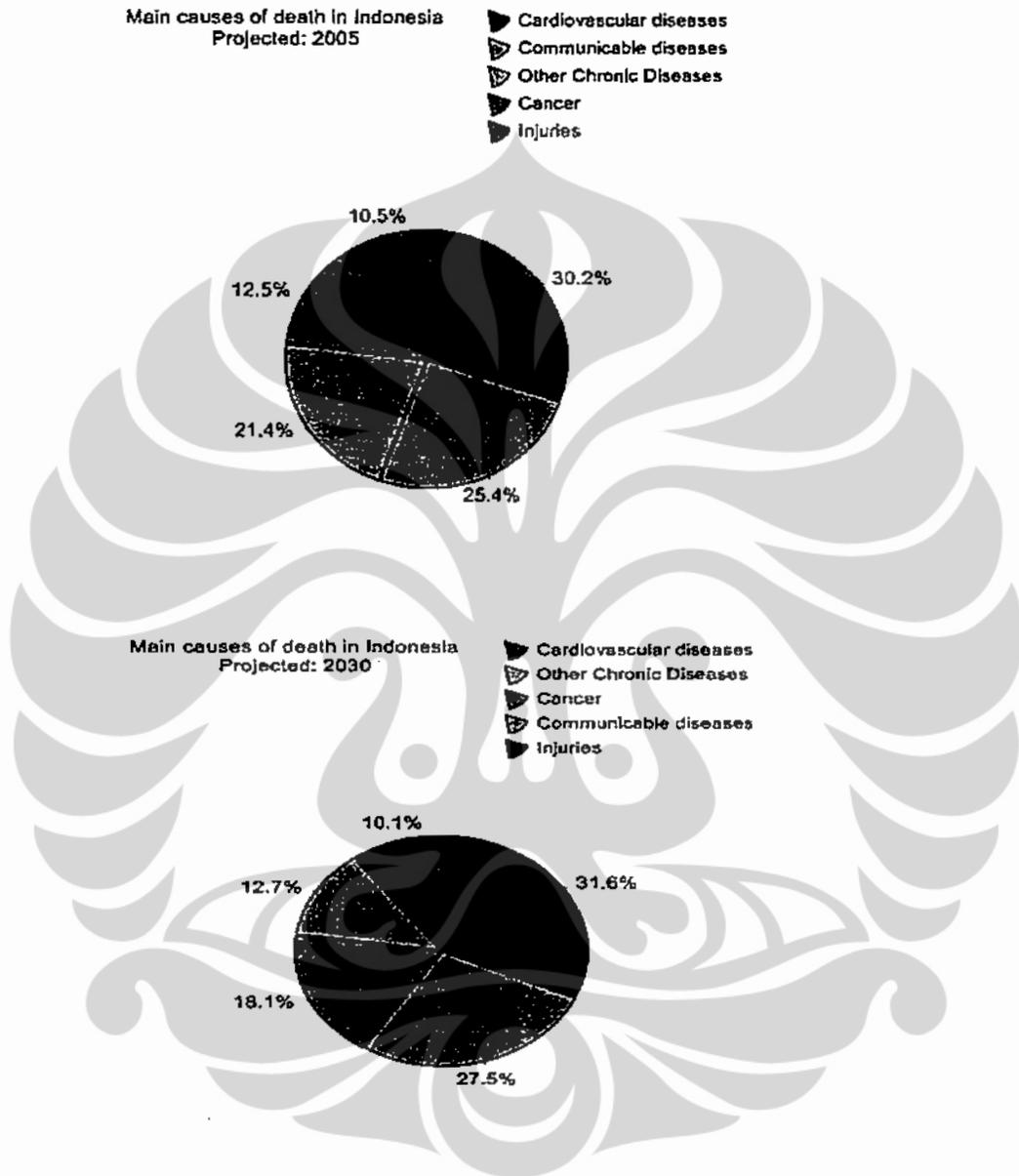
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

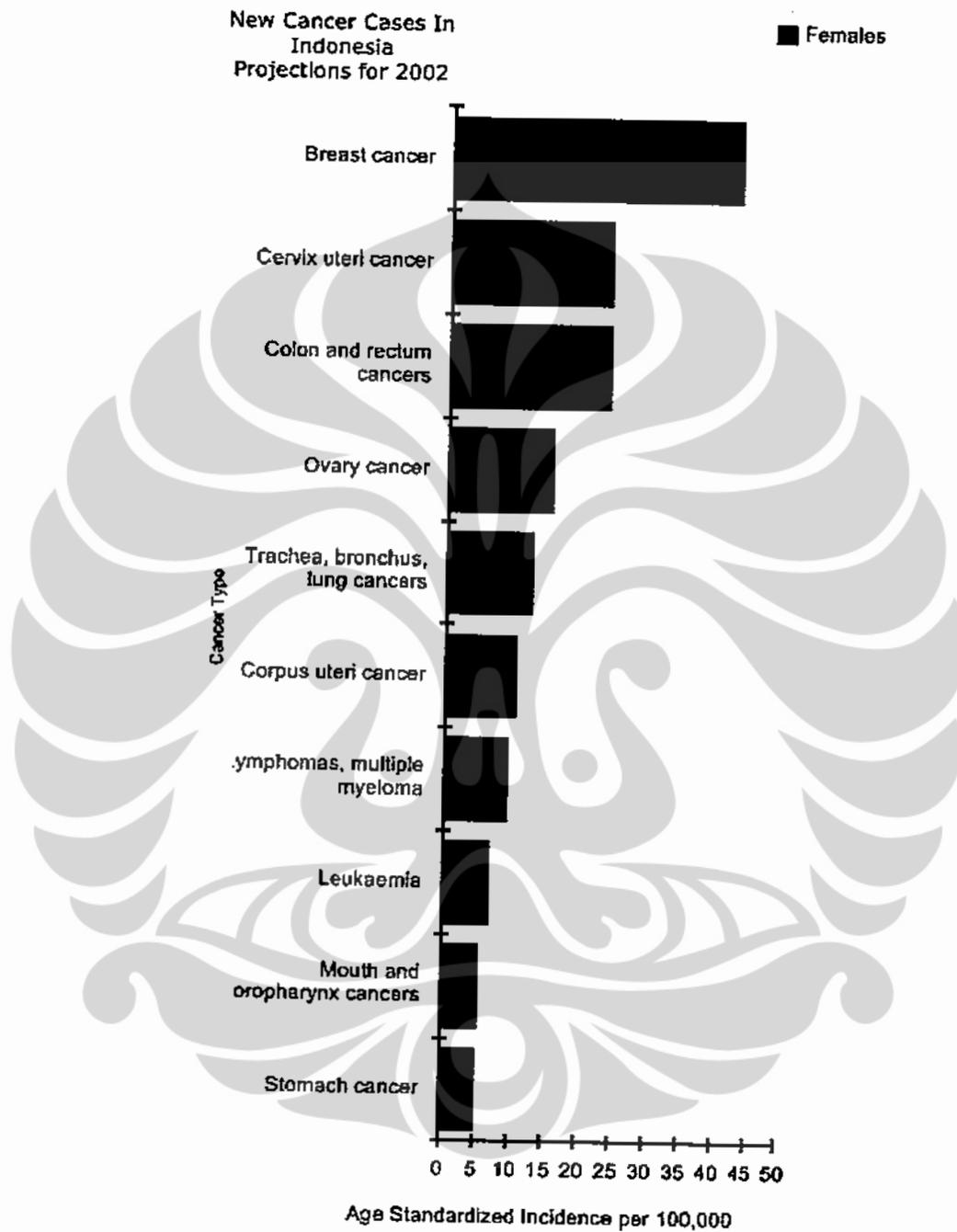
#### 2.1. Kanker Payudara

##### 2.1.1 Epidemiologi dan faktor-faktor resiko terjadinya kanker payudara.

Kanker merupakan penyakit yang diketahui penyebabnya karena faktor kimia, fisika dan biologi dan juga dipengaruhi oleh banyak faktor risiko, seperti diet yang tidak sehat, faktor lingkungan (pencemaran udara, air, polusi), obesitas, nutrisi (kurang mengonsumsi buah dan sayuran), kurang aktivitas fisik, dan stress.<sup>34</sup> Juga beberapa faktor yang turut membantu menyebabkan penyakit kanker yaitu: keturunan dan epigenetik, signaling faktor pertumbuhan yang abnormal, kegagalan pertahanan imun tubuh, kegagalan perbaikan DNA. Di Indonesia terdapat 170-190 kasus kanker baru per 100.000 penduduk.<sup>7</sup> Di dunia, kanker merupakan penyebab kematian nomor dua setelah penyakit kardiovaskular.<sup>5</sup> Menurut laporan Badan Kesehatan Dunia (WHO), setiap tahun ada lebih dari 11 juta kasus penderita baru kanker terdiagnosa dengan prediksi peningkatan setiap tahun kurang lebih 20%. Berdasarkan data WHO, dari tahun 2005 hingga tahun 2030 akan ada peningkatan jumlah penderita kanker hingga tiga kali lipat. WHO juga menyatakan, 70 persen penderita kanker berada di negara-negara berkembang.<sup>35,36</sup>, WHO menyatakan jumlah penderita kanker di Indonesia sebagai negara berkembang akan mengalami peningkatan hingga tujuh kali lipat pada tahun 2030 mendatang, dan lebih dari 7 juta penderita kanker meninggal setiap tahun.<sup>35,36,37</sup>



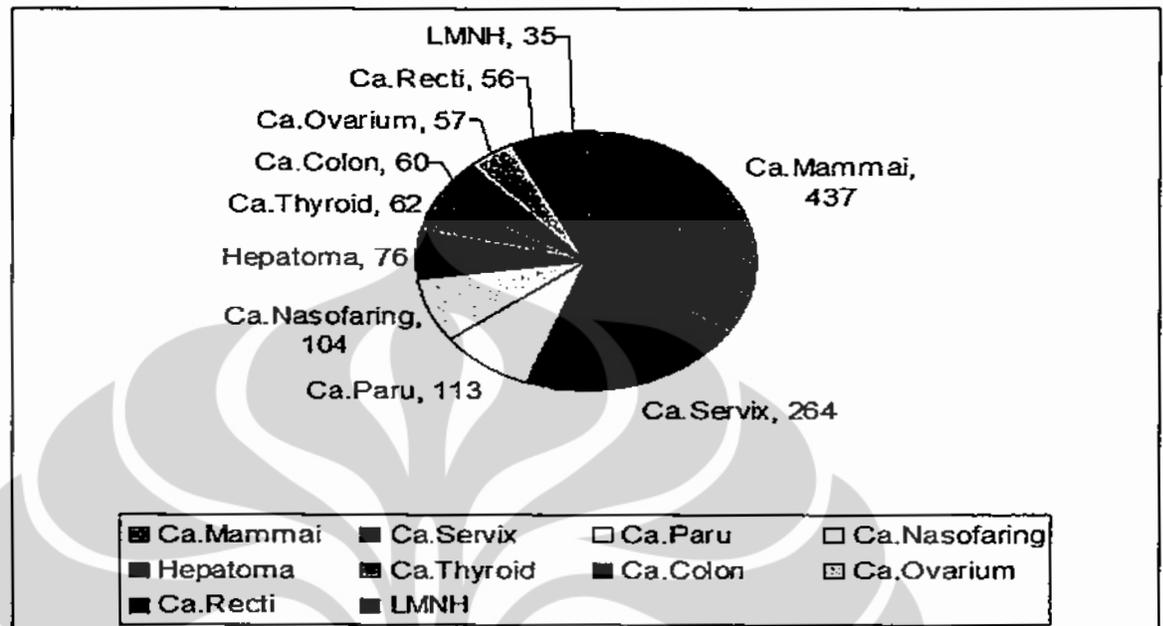
Gambar 2.1 : Perbandingan Prosentase Penderita Kanker di Indonesia Pada tahun 2005 dan tahun 2030.<sup>37</sup>



Gambar 2.2 : Kasus jenis kanker baru di Indonesia <sup>37</sup>

Riset kanker merupakan usaha ilmiah yang banyak ditekuni untuk memahami proses penyakit dan menemukan terapi yang memungkinkan. Meskipun pemahaman kanker memiliki tumbuh secara eksponen sejak dekade terakhir dari abad ke-20, terapi baru yang radikal hanya ditemukan dan diperkenalkan secara bertahap.<sup>4,5,35</sup> Para dokter ahli kanker akan mengupayakan pengobatan kanker tanpa menghilangkan organ atau pembedahan dengan bekerja sama dengan ahli-ahli ilmu dasar kedokteran seperti biologi molekuler (Ilmu Biomedik). Dengan menggunakan pendekatan ilmu kedokteran dasar maka akan diketahui akar penyebab kanker tersebut sehingga pengobatannya juga dilakukan pada akar penyebab kanker itu dan dengan pendekatan ini pula akan diperoleh suatu biomarker tertentu untuk mempermudah diagnosa. Metode pengobatan ini sudah dikembangkan di negara maju, seperti di Eropa dan Amerika Serikat. Di sejumlah negara Asia Pasifik akan mengembangkan metode ini,<sup>38</sup> termasuk di Indonesia. Disiplin Ilmu yang mengintegrasikan informasi tentang struktur genetika (DNA) maupun profil ekspresinya (mRNA dan protein) guna membedakan dan mengklasifikasikan sel normal, pra-lesi kanker, dan jaringan kanker disebut sebagai Diagnostik Molekuler (DM). Pada Diagnostik Molekuler, ada tiga aspek yang sudah mulai dikembangkan dan diterapkan untuk penanganan kanker payudara, yaitu *risk-assesment*, prognosis dan staging.<sup>38</sup>

Kanker Payudara merupakan salah satu jenis kanker terbanyak yang ditemukan pada wanita.<sup>1,3,39</sup> selain kanker leher rahim, kanker payudara ini sangat ditakuti karena sebagai penyebab kematian terbanyak.<sup>1,2,3,39</sup> Setiap tahun jumlah kasus kanker payudara terus bertambah walaupun penyuluhan untuk melakukan pencegahan terus dilakukan. Pada tahun 2006, kasus terbanyak adalah kasus kanker payudara sebesar 429.900 terdiagnosa di Eropa.<sup>39</sup> Di Amerika Serikat sebanyak 192.370 kasus baru kanker payudara.<sup>6,40</sup> Belum ada data statistik yang akurat di Indonesia<sup>7</sup>, namun data yang terkumpul menunjukkan bahwa kanker payudara menduduki rangking pertama menurut data dari Rumah Sakit Kanker Dharmais.<sup>8</sup>



Gambar 2.3. : 10 besar Kanker Tersering pada Rumah Sakit Kanker Dharmais

Rawat Jalan (Kasus Baru) tahun 2007<sup>8</sup>

Belum diketahui secara pasti apa yang menjadi penyebab secara spesifik kanker payudara terjadi, namun beberapa faktor yang harus diperhatikan sebagai resiko yang berkaitan dengan terjadinya kanker payudara adalah :<sup>41</sup>

1. Usia, penyakit kanker payudara akan meningkat pada usia remaja keatas.<sup>1,5</sup>
2. Jenis kelamin, wanita lebih beresiko 100 kali dari pada pria.<sup>4,5</sup>
3. Penggunaan hormon, hormon eksogen berhubungan dengan terjadinya kanker payudara. Laporan dari Harvard School of Public Health menyatakan bahwa terdapat peningkatan kanker payudara yang bermakna pada para pengguna terapi pengganti estrogen. Suatu metaanalisis menyatakan bahwa walaupun tidak terdapat risiko kanker payudara pada pengguna kontrasepsi oral, wanita yang menggunakan obat ini untuk waktu yang lama mempunyai risiko tinggi untuk mengalami kanker ini sebelum menopause.<sup>1,5</sup>

4. **Obesitas:** Terdapat hubungan yang positif antara berat badan dan bentuk tubuh dengan kanker payudara pada wanita pasca menopause. Variasi terhadap kekerapan kanker ini di negara-negara Barat dan bukan Barat serta perubahan kekerapan sesudah migrasi menunjukkan bahwa terdapat pengaruh diet terhadap terjadinya keganasan ini.<sup>1,5</sup>
5. **Konsumsi lemak:** Konsumsi lemak diperkirakan sebagai suatu faktor risiko terjadinya kanker payudara. Willett dkk. melakukan studi prospektif selama 8 tahun tentang konsumsi lemak dan serat dalam hubungannya dengan risiko kanker payudara pada wanita umur 34 sampai 59 tahun.<sup>1,5</sup>
6. **Faktor reproduksi:** Karakteristik reproduktif yang berhubungan dengan risiko terjadinya kanker payudara adalah nuliparitas, menarche pada umur muda, menopause pada umur lebih tua, dan kehamilan pertama pada umur tua. Risiko utama kanker payudara adalah bertambahnya umur. Diperkirakan, periode antara terjadinya haid pertama dengan umur saat kehamilan pertama merupakan awal *initiation* perkembangan kanker payudara. Secara anatomi dan fungsional, payudara akan mengalami atrofi dengan bertambahnya umur. Kurang dari 25% kanker payudara terjadi pada masa sebelum menopause sehingga diperkirakan awal terjadinya tumor terjadi jauh sebelum terjadinya perubahan klinis.<sup>5</sup>
7. **Riwayat keluarga dan faktor genetik:** Riwayat keluarga merupakan komponen yang penting dalam riwayat penderita yang akan dilaksanakan skrining untuk kanker payudara. Terdapat peningkatan risiko keganasan ini pada wanita yang keluarganya menderita kanker payudara. Pada studi genetik ditemukan bahwa kanker payudara berhubungan dengan gen tertentu. Apabila terdapat gen *BRCA 1* atau gen *BRCA 2*, yaitu suatu gen kerentanan terhadap kanker payudara, probabilitas untuk terjadi kanker payudara sebesar 60% pada umur 50 tahun dan sebesar 85% pada umur 70 tahun.<sup>1,5</sup>, faktor keturunan hanya berdampak 5% - 20% dari terjadinya kanker payudara.<sup>1,2</sup>
8. **Alkohol,** dapat meningkatkan resiko terjadinya kanker payudara.<sup>1,5</sup>

9. Radiasi: Paparan dengan radiasi ionisasi selama atau sesudah pubertas meningkatkan terjadinya risiko kanker payudara. Dari beberapa penelitian yang dilakukan disimpulkan bahwa risiko kanker radiasi berhubungan secara linier dengan dosis dan umur saat terjadinya paparan.<sup>1,5</sup>
10. Faktor lingkungan :<sup>1,37</sup>
- |             |          |
|-------------|----------|
| * Zat Kimia | * Air    |
| * Tembakau  | * Polusi |

Sebagian besar kanker payudara bersifat sporadik (80%)<sup>1</sup>, namun faktor yang mempunyai andil terbesar adalah faktor usia dan diikuti faktor riwayat keluarga (20%), Lima sampai duapuluh persen kanker payudara bersifat herediter, akibat adanya predisposisi genetik autosomal dominant berpenetrasi terbatas.<sup>42</sup>

### 2.1.2. Jenis-jenis kanker payudara.<sup>43</sup>

#### A. Jenis Kanker Payudara yang Umum Terjadi:

1. In situ breast cancer
  - Ductal Carcinoma In Situ (DCIS).
  - Lobular Carcinoma In Situ (LCIS).
2. Invasive breast cancer (Kanker payudara yang invasive)
  - Invasive Ductal Carcinoma (IDC)
  - Invasive Lobular Carcinoma (ILC)

#### B. Type – type yang tidak biasa / Jarang pada Kanker Payudara

Tidak semua type kanker payudara berasal dari saluran air susu atau kelenjar air susu. Beberapa jenis yang tidak umum adalah:

Inflammatory Breast Cancer, Medullary Carcinoma, Tubular carcinoma, Metaplastic carcinoma, Micropapillary carcinoma, Adenoid cystic carcinoma.

### 2.1.3. Klasifikasi Kanker Payudara.<sup>4</sup>

Terdiri dari empat group :

1. Patologi, berdasarkan penilaian histopatologi.
2. Grade dari tumor,
3. Protein dan ekspresi gen, dengan pemeriksaan Immunohistopatologi memeriksa Estrogen Reseptor, Progesteron Reseptor dan lain-lain.
4. Stage dari tumor, sistem TNM. Banyak sekali cara untuk menentukan stadium, namun yang paling banyak dipakai saat ini adalah stadium kanker berdasarkan klasifikasi sistim TNM yang direkomendasikan oleh UICC (International Union Against Cancer dari WHO atau World Health Organization) / AJCC(American Joint Committee On cancer yang disponsori oleh American Cancer Society dan American College of Surgeons).<sup>1,5</sup> Pada sistim TNM dinilai tiga faktor utama yaitu "T" yaitu Tumor size atau ukuran tumor , "N" yaitu Node atau kelenjar getah bening regional dan "M" yaitu metastasis atau penyebaran jauh. Ketiga faktor T,N,M dinilai baik secara klinis sebelum dilakukan operasi , juga sesudah operasi dan dilakukan pemeriksaan Histopatologi (PA) . Pada kanker payudara, penilaian TNM mempunyai nilai masing-masing. Setelah masing-masing faktor T,N,M didapatkan, ketiga faktor tersebut kemudian digabung dan didapatkan stadium kanker sebagai berikut :<sup>5</sup>

- Stadium 0 : T0 N0 M0
- Stadium 1 : T1 N0 M0
- Stadium II A : T0 N1 M0 / T1 N1 M0 / T2 N0 M0
- Stadium II B : T2 N1 M0 / T3 N0 M0
- Stadium IIIA : T0 N2 M0/ T1 N2 M0 / T2 N2 M0 / T3 N1 M0 / T2 N2 M0
- Stadium III B : T4 N0 M0 / T4 N1 M0 / T4 N2 M0

- Stadium III C : Tiap T N3 M0
- Stadium IV : Tiap T-Tiap N -M1

Terapi kanker payudara dilakukan setelah mengetahui semua klasifikasi payudara tersebut.

#### 2.1.4. Karsinogenesis

Mekanisme karsinogenesis baik biokimiawi maupun molekuler berbeda antara satu karsinogen dengan yang lain, bergantung pada struktur dan sumber karsinogen masing-masing, tetapi pada dasarnya sasaran karsinogen adalah menimbulkan lesi pada untaian DNA yang mengandung berbagai jenis gen.<sup>44</sup> Telah terungkap bagaimana hubungan karsinogen dengan lesi DNA dan jenis mutasi gen yang ditimbulkannya, demikian pula peran gen DNA repair dan respon tubuh lainnya terhadap kerusakan DNA. Berbagai jenis gen penekan tumor yang berperan sebagai regulator siklus sel atau pertumbuhan dan differensiasi sel pada umumnya merupakan sasaran penonaktifan gen penekan tumor.

Pada tingkat molekuler, perkembangan tumor diakibatkan oleh akumulasi lesi genetik dan pada beberapa keadaan sebagai akibat dari perbaikan (repair) DNA yang tidak berfungsi. Target utama kerusakan DNA adalah golongan gen yang meliputi:<sup>45</sup>

- a. Proto-onkogen adalah gen normal sel yang dapat berubah menjadi onkogen aktif karena mutasi atau ekspresi yang berlebihan.
- b. Gen penekan tumor ( tumor supressor genes ) yang tidak aktif.
- c. Gen perbaikan DNA yang tidak berfungsi.

Pemahaman dasar lesi genetik yang terjadi selama karsinogenesis memiliki potensi besar untuk aplikasi klinis dalam diagnosis, prognosis dan terapi.<sup>45,46</sup>

Onkogen adalah gen yang terjadi dari gen Proto-onkogen yang mengalami mutasi. Gen Proto-onkogen adalah gen yang normal dan merupakan gen yang mengkode protein-protein yang berperan dalam mengatur pertumbuhan sel dan

pembelahan sel. Mutasi gen yang mengaktifasi proto-onkogen menjadi onkogen terletak pada gen struktural yang secara langsung menghasilkan produk gen (protein) abnormal, atau pada kasus-kasus tertentu mutasi itu terdapat pada bagian regulator dari gen sehingga menghasilkan protein normal secara berlebihan. Kedua hal tersebut menyebabkan peningkatan fungsi dan peningkatan fungsi ini seringkali mengakibatkan sinyal pertumbuhan terus menerus dan proliferasi yang abnormal.<sup>14,47</sup>

Telah dijelaskan beberapa macam resiko yang berkaitan dengan terjadinya kanker payudara, resiko tersebut antara lain adalah adanya riwayat keluarga dan faktor genetik, tetapi akhir-akhir ini epigenetik turut harus diperhatikan karena kejadian tersebut dapat menyebabkan kanker juga.<sup>9,11,48,49</sup>

## 2.2. Epigenetik

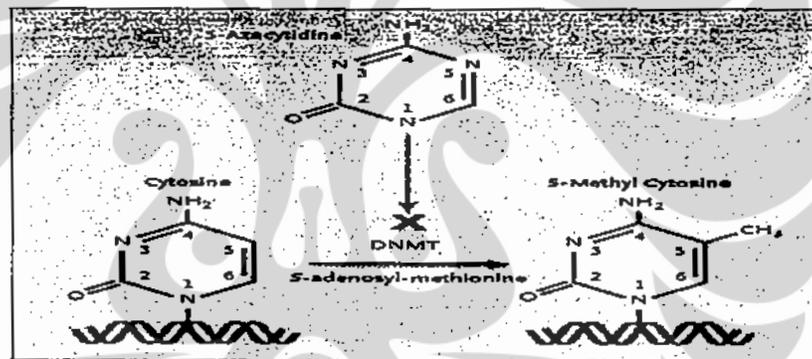
Epigenetik pertama kali diperkenalkan oleh C.H.Waddington tahun 1939,<sup>9,50,51</sup> tapi baru tahun 1980 dan permulaan tahun 1990 mulai banyak penelitian tentang epigenetik.<sup>12</sup> Mekanisme epigenetik dipengaruhi oleh beberapa faktor dan kejadian mekanisme yang secara normal terjadi antara lain: pada proses differensiasi seluler, karena faktor lingkungan, obat-obatan, diet dan usia.<sup>9</sup>

Proses epigenetik adalah salah satu penjelasan bagaimana genotip yang sama tapi mempunyai fenotip yang berbeda, contoh perubahan warna kulit tikus Agouti ada hubungannya dengan perubahan DNA yang termetilasi tanpa adanya perubahan genetik.<sup>9</sup> Proses epigenetik antara lain meliputi proses metilasi DNA dan modifikasi histon,<sup>9,44,48</sup> berarti ekspresi fenotip tidak hanya dipengaruhi oleh proses metilasi DNA saja tetapi dapat juga oleh proses modifikasi histon.<sup>12,48</sup> Pada tesis ini hanya membahas peristiwa epigenetik yang disebabkan oleh karena metilasi DNA, walaupun ada penelitian yang menyatakan bahwa metilasi DNA dan modifikasi histon ada bekerja sama dalam mempengaruhi aktivasi beberapa gen penekan tumor,<sup>52</sup> (perubahan metilasi DNA mempengaruhi modifikasi histon.)<sup>53</sup>

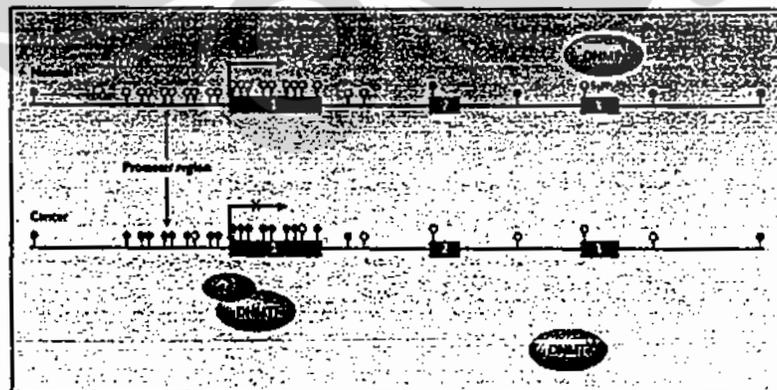
Metilasi DNA adalah suatu proses pergantian posisi atom H pada posisi 5 dari sitosin oleh metil ( $\text{CH}_3$ ). Penambahan kelompok metil terjadi pada sebagian besar di situs CpG promoter, sehingga mengubah sitosin pada posisi 5 menjadi metilsitosin oleh DNA methyltransferase (DNMT).<sup>54,55</sup> Struktur 5-metilsitosin yang kurang lebih hampir sama dengan struktur sitosin, oleh sebab itu 5-metilsitosin masih tetap berpasangan dengan guanin, pada pembelahan sel berikutnya akan digantikan dengan sitosin, namun pada beberapa situs yang termetilasi lebih banyak dan lebih berat cenderung akan mengganggu proses transkripsi. Proses metilasi hanya terjadi pada nukleotida sitosin dan pada C-G yang banyak berulang di daerah promoter. Peristiwa metilasi DNA adalah proses yang normal terjadi pada manusia dan proses tersebut penting untuk pertumbuhan dan perkembangan dalam kehidupan.<sup>9,12,49</sup> Terjadinya proses metilasi DNA pada gen penekan tumor adalah salah satu mekanisme untuk menghilangkan atau menghambat fungsi gen tersebut. Mekanisme penghambatannya terjadi tanpa merubah sekuen DNA (non-mutasi), tetapi mengganggu proses transkripsi mRNA sehingga terjadi penurunan tingkat ekspresi mRNA. Tidak seperti perubahan genetik, perubahan epigenetik berpotensi reversibel.<sup>50,56,57</sup>

Metilasi DNA adalah perubahan epigenetik yang pertama harus diperhatikan dalam sel-sel kanker,<sup>57</sup> karena pada manusia ada sekitar 70% pulau CpG yang termetilasi.<sup>52</sup> Petanda metilasi DNA berguna sebagai deteksi dini, pencegahan dan menentukan karakteristik dari kanker untuk terapi.<sup>11,58</sup> Petanda metilasi DNA juga bersifat sensitif, spesifik, obyektif dan multiparameter.<sup>11</sup> Perubahan genetik atau epigenetik dapat memberikan nilai prognostik maupun prediktif tertentu seperti sensitivitas terhadap obat atau tingkat keganasan dalam penyebaran (metastatik),<sup>11</sup> sehingga petanda hipermetilasi DNA dapat berguna sebagai diagnostik, faktor prognostik dan melihat efek respon dari pengobatan.<sup>50</sup> Hipermetilasi pada pulau CpG promoter gen penekan tumor adalah kejadian yang utama untuk awalnya terjadi kanker,<sup>50</sup> atau tanda yang umum untuk semua jenis kanker.<sup>11,59</sup> Hipermetilasi pada pulau CpG promoter dapat mempengaruhi gen yang terlibat pada siklus sel, perbaikan DNA, metabolisme karsinogen, interaksi

antar sel, apoptosis, angiogenesis.<sup>50</sup> Pola metilasi DNA dan modifikasi histone sangat berhubungan dengan perkembangan dan kemajuan kanker<sup>59</sup> sehingga dapat digunakan untuk pengobatan.<sup>50</sup> Hingga saat ini efek metilasi pada promotor gen *WRN* pada kanker payudara belum dipelajari secara lebih detail secara in vivo atau pada pasien kanker. Disamping itu masih sedikit sekali penelitian mengenai gen *WRN*, metilasi DNA promotor dan ekspresinya pada kanker payudara juga pengobatannya pada kanker payudara yang disebabkan oleh metilasi belum ada. Penelitian mengenai metilasi DNA pada gen *WRN*, yang memberikan hasil yaitu gen *WRN* yang termetilasi sebesar 17% pada kanker payudara<sup>25</sup>, tetapi belum diketahui efek metilasi pada promotor *WRN* tersebut dihubungkan dengan tingkat ekspresi mRNA gen *WRN* tersebut pada kanker payudara.



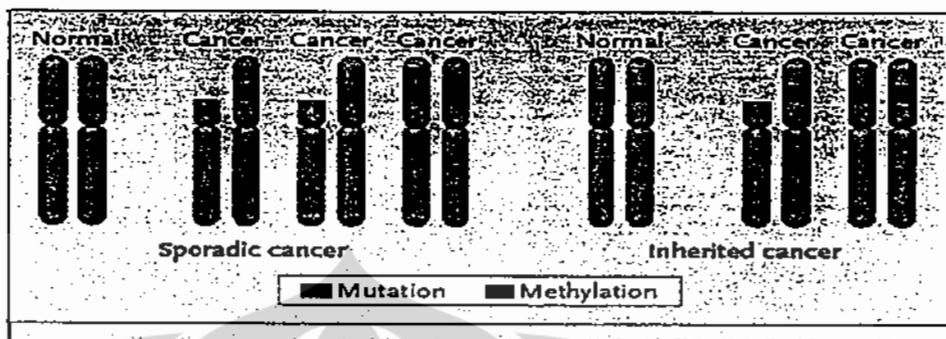
Gambar 2.4. : Metilasi<sup>9,12</sup>



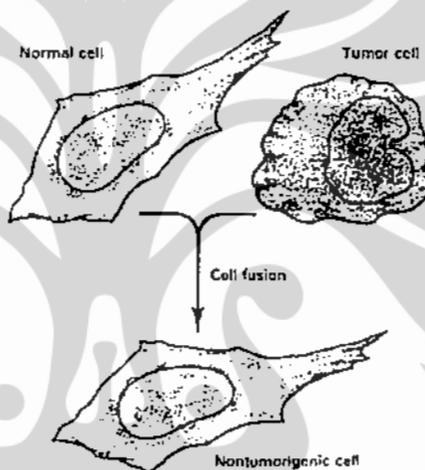
Gambar 2.5. : Metilasi yang mengganggu Proses Transkripsi<sup>9,12</sup>

### 2.3. Gen Penekan Tumor

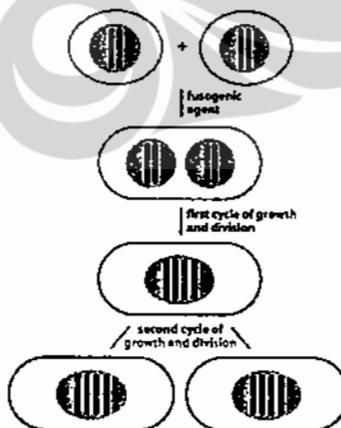
Gen penekan tumor adalah gen yang normal dan berguna terlibat dalam berbagai proses biologis antara lain: kontrol siklus sel, replikasi DNA, rekombinasi DNA, sinyal transduksi, perbaikan DNA, differensiasi jaringan, apoptosis dan proses penuaan,<sup>14</sup> gen ini juga berfungsi sebagai kontrol adhesi antar sel (penghambat metastasis) dan sebagai komponen dari jalur sinyal sel.<sup>59</sup> Gen Penekan Tumor berlokasi pada kromosom autosomal,<sup>60</sup> gen ini bekerja memberikan sinyal untuk menghambat pertumbuhan dengan mengatur checkpoint siklus sel, disebut *Gatekeepers* sedangkan penjaga kestabilan gen, melindungi genom disebut *Caretakers*.<sup>14</sup> Bukti pertama keberadaan adanya gen yang dapat menekan fenotip diperoleh dari berbagai percobaan in vitro yang menggabungkan (fusi) sel normal dengan sel kanker. Hasil fusi kedua jenis sel ini adalah suatu hibrid yang tidak lagi memiliki ciri-ciri awal sifat sel tersebut, misalnya sel-sel ini tidak lagi menunjukkan kemampuan proliferasi berlebihan.<sup>61</sup> Bukti kedua yaitu sesuai dengan *Knudson's Two Hit Hypothesis*, Alfred Knudson mengajukan hipotesa setelah pengamatannya pada retinoblastoma, bahwa ada gen yang dalam keadaan normal mencegah pertumbuhan tumor dan bahwa tumor akan timbul bila kedua alel dari gen ini hilang.<sup>62</sup> Bukti-bukti ini menimbulkan asumsi bahwa ada golongan gen dalam sel normal yang bekerja berlawanan dengan onkogen atau menekan aktivitas onkogen.<sup>14,59</sup> Suatu gen yang kemudian dapat disebut sebagai gen penekan tumor dikarenakan gen tersebut dapat berfungsi sebagai penekan pertumbuhan abnormal dan juga gen tersebut dapat mengalami mutasi, metilasi dan LOH (*Loss Of Heterozygosity*)<sup>27,63</sup> Sampai saat ini, kurang lebih baru ada 30 gen penekan tumor,<sup>14</sup> gen *WRN* termasuk sebagai gen penekan tumor,<sup>14</sup> hal ini baru sedikit yang mengetahuinya, terbukti dengan baru sedikitnya jurnal-jurnal yang membahas tentang gen *WRN*.



Gambar 2.6. : Mutasi, Metilasi dan *Loss Of Heterozigosity*<sup>12,49</sup>



Gambar 2.7. : Fusi Sel Normal dan Sel Neoplastik<sup>16</sup>



Gambar 2.8. : Gen Kanker dan Gen Normal<sup>17,48</sup>

Tabel 1 : GEN PENEKAN TUMOR DAN FUNGSINYA.<sup>11</sup>

GEN	KROMO SOM	TUMOR HEREDITER	TUMOR SPORADIK	LOKASI KERJA	MEKANISME KERJA
1. p53	17p13	Li – Fraumeni Family Syndrome	Kandung Kemih. Payudara. Esofagus. Ovarium. Paru sarkoma. Otak. Limfoma leukimia. Kolon	Nukleus	Faktor transkripsi regulator
2. Rb	13q14	Retinoblastoma	Retinoblastoma. Esofagus. Payudara. Paru	Nukleus	regulator transkripsi
3. APC	5q21	FAP	Kolorektoral, lambung, prankreas	Sitoplasma	
4. NF-1	17q11	Neufribromato sis tipe 1	Kolon. Astrositoma	Sitoplasma	P21 aktivator GTP
5. NF-2	22q12	Neufribromato sis tipe 2	Meningioma	Membran bagian dalam	Hubungan sitoskeleton membran
6. WF-1	11p3	Wilm's tumor	Wilm's tumor	Nukleus	Faktor Transkripsi

7. VHL	3p25	Von Hippel lindau	Renal	sitoplasma	Menghambat transkripsi
8. BRCA1	17q21	Payudara. Ovarium.	Testis, thymus, payudara, ovarium	Nukleus	Faktor transkripsi
9. BRCA2	13q12	Payudara	Payudara, Ovarium	Nukleus	Faktor transkripsi
10. DCC	18q21		Kolorektal	Membran	Cell adhesion
11. MTS-1	9p21	Melanoma	Melanoma, Otak, leukemia, sarcoma, renal, ovarium paru	Nukleus	Inhibitor cdk
12. MSH2	2p	HNPCC	Endometrial,	Nukleus	Nucl mismatch repair
13. MLH1	3p21	HNPCC	lambung, hepatoibilier saluran kemih	Nukleus	Nucl mismatch repair

Dalam keadaan normal, kerja gen penekan tumor adalah menghambat proliferasi sel dengan kerusakan DNA, kadang-kadang gen ini disebut juga onkogen resesif atau anti onkogen.<sup>45</sup> Beberapa penelitian membuktikan bahwa produk gen penekan tumor secara langsung atau tidak langsung berinteraksi dengan produk onkogen, sehingga fungsi produk onkogen tersebut dihambat.<sup>13</sup>

*Loss of heterozygosity* (kehilangan heterozigositas) dalam sel mewakili hilangnya fungsi normal dari satu alel dari suatu gen dimana alel lain yang sudah tidak aktif. Mekanisme *Loss of Heterozygosity*<sup>52,62,64</sup>

1. Penghilangan :
  - o alel normal
  - o lengan kromosom yang mengandung alel normal
  - o seluruh kromosom yang mengandung alel normal (yang mengakibatkan aneuploidi).
2. Pada wanita, X-inaktivasi dari kromosom X membawa alel normal.
3. Hilangnya kromosom mengandung alel normal diikuti oleh duplikasi kromosom yang mengandung alel bermutasi.
4. Rekombinasi mitosis.

#### 2.4. Gen *WRN*

##### a. Gen *WRN* secara umum

Penyakit Werner Syndrome ditemukan oleh Otto Werner pada tahun 1904.<sup>65</sup> Werner syndrome adalah penyakit dengan kelainan genetik yang langka dan ditandai dengan proses penuaan yang cepat (penuaan dimulai setelah pubertas) terkait dengan patologi dan kanker.<sup>66</sup> Hal ini disebabkan oleh mutasi pada gen *WRN*, gen yang berada di lengan pendek kromosom 8.<sup>65,67</sup> Werner syndrome adalah suatu penyakit yang dialami oleh manusia yang disebabkan oleh adanya mutasi pada gen *WRN* dan menyebabkan berkurangnya fungsi RecQ helikase *WRN*, sehingga sel-sel dari pasien ini mengalami tingkat pertumbuhan yang lambat, penuaan dini, ketidakstabilan genomik serta abnormal metabolisme telomere (mempercepat telomere menjadi pendek).<sup>68</sup> Fungsi *WRN* adalah mempertahankan struktur dan integritas DNA.

Beberapa proses genetika umum seperti telomere yang disfungsi, perubahan pada perbaikan DNA, akumulasi lesi DNA, ketidakstabilan genomik berperan penting dalam proses menuju karsinogenesis dan penuaan.<sup>25,69</sup> dan

Universitas Indonesia

dengan telah terbuktinya gen *WRN* sebagai gen penekan tumor,<sup>14,17,52</sup> dimana diketahui bahwa gen penekan tumor dapat mengalami peristiwa epigenetik melalui peristiwa metilasi DNA promoter<sup>25,52</sup> selain juga dapat mengalami peristiwa mutasi dan *LOH*. Dari keterangan di atas dapat dimengerti bahwa terdapat hubungan antara telomere, penuaan dan kanker dengan gen *WRN*.

Penuaan (usia) adalah faktor resiko utama yang berhubungan dengan perkembangan kanker.<sup>23,70</sup> Ada hubungan yang nyata antara lanjut usia dan meningkatnya insiden kanker,<sup>71</sup> karena faktor genetik dan lingkungan berkontribusi terhadap penuaan. Gen *WRN* adalah gen yang bertanggung jawab juga terhadap proses penuaan.<sup>70</sup> Penuaan sel pada umumnya disebabkan oleh :<sup>72</sup>

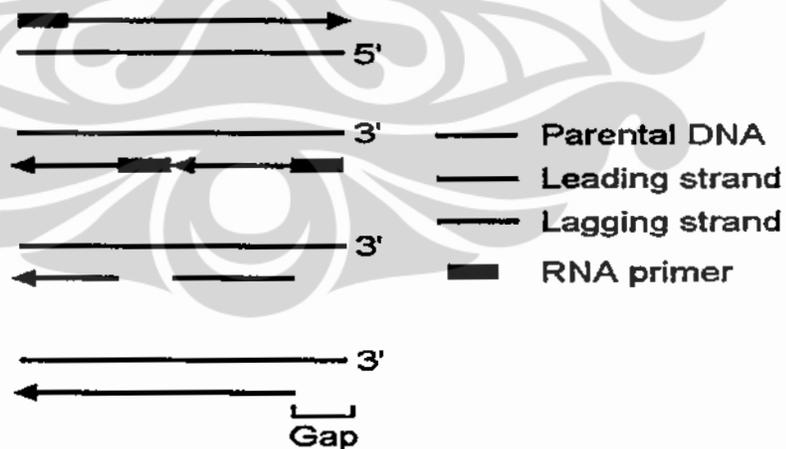
- Karena aktifitas sel menurun
- Stress oksidatif di dalam sel merupakan penyebab proses aging.
- Mitokondria yang menghasilkan ROS (reactive oxygen species) memegang peranan dalam proses aging suatu organism.
- Superoksida dgn konsentrasi tertentu dapat menurunkan daya tahan hidup organisme invertebrate.
- Pada mamalia, pemberian antioksidan, terbukti dapat mencegah disfungsi organ2.
- Selama penuaan terjadi perpendekan telomer pada berbagai jaringan. Hal ini di modulasi oleh adanya stres oksidatif akibat terakumulasinya radikal bebas di dalam sel.

Proses penuaan dapat berkecenderungan kearah kanker oleh karena beberapa mekanisme :<sup>69</sup>

1. Akumulasi jaringan sel dalam tahap akhir karsinogenesis.
2. Perubahan dalam homeostasis khususnya perubahan dalam sistem kekebalan tubuh dan endokrin.
3. Ketidakstabilan telomer, mengakibatkan penuaan lebih cepat dan meningkatkan resiko kanker. Proses penuaan adalah terkait dengan sejumlah kejadian di molekuler, seluler dan tingkat fisiologis yang mempengaruhi karsinogenesis. Sudah ada pengamatan yang membuktikan bahwa dengan bertambahnya umur

dan dengan kejadian terus menerus metilasi CpG promoter pada jaringan normal, akan lebih memungkinkan terjadinya kanker pada gen-gen tertentu.<sup>70</sup>

Telomer merupakan elemen berulang yg berlokasi pada tiap ujung kromosom dari sel eukariota. Telomere adalah repetitif DNA pada akhir sebuah kromosom, terdiri dari sebanyak 2000 mengulangi urutan 5'-TTAGGG-3'.<sup>65</sup> Panjang telomer pada manusia 5–20 kb. Fungsi dari telomer adalah untuk menutup ujung kromosom (melindungi ujung kromosom dari kerusakan), sehingga mencegah DNA “terbuka”, yang dapat menyebabkan kerusakan DNA, mencegah bersatunya kromosom-kromosom dan menjaga ketidakstabilan kromosom. Telomere berperan penting dalam proses pembelahan sel. Pada setiap proses pembelahan sel selalu terjadi “*end-replication problem*” (masalah akhir replikasi) dari DNA polimerase, karena enzim yang bertanggung jawab untuk replikasi DNA tidak bisa sepenuhnya mensintesis ujung 3 DNA linier sehingga panjang telomer memendek sebanyak 50–100 pb. Ketika telomer mencapai panjang yang kritis, menyebabkan fungsi dari telomer tidak optimal. Hal ini menginduksi penuaan sel, yang ditandai oleh adanya gangguan pertumbuhan secara permanent.<sup>73</sup>



Gambar 2.9. Terjadinya Masalah akhir replikasi<sup>74</sup>

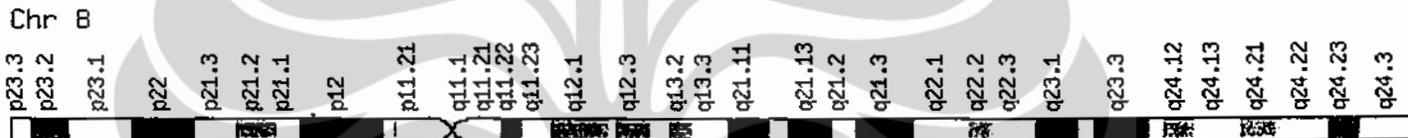
b. Gen *WRN* secara molekuler :

Gen *WRN* terdiri dari 35 exon<sup>72,75</sup>, gen *WRN* termasuk RecQ helikase protein,<sup>21-23,72,75</sup> yaitu RecQL2 helikase.<sup>22,28,73</sup> RecQ helikase adalah enzim helikase yang sangat penting dalam menjaga genom.<sup>23,29,73</sup> Fungsi RecQ helikase ada pada proses replikasi, penuaan, rekombinasi dan perbaikan DNA.<sup>19,68,73</sup> Lokasi gen *WRN* terletak pada kromosom 8p11.2 - p12,<sup>25,26,75</sup> dari pasangan basa 31.010.319 ke 31.150.818 pasangan basa,<sup>75</sup> dimana pada lokasi ini sering terjadi *Loss of heterozygosity* (LOH)<sup>22,23,25,50,76-79</sup> dan perubahan kromosom yang berhubungan dengan keganasan (kecenderungan kanker) di berbagai macam jenis kanker termasuk biasanya kanker payudara,<sup>27,28,76-79</sup> serta LOH yang terjadi pada kromosom 8p akan memberikan keadaan prognosis yang lebih buruk.<sup>76,80,81</sup> Data penelitian menunjukkan bahwa terjadinya LOH pada lengan 8p berasosiasi dengan penderita kanker payudara pada usia muda dan hilangnya gen penekan tumor pada kromosom 8p merupakan peristiwa penting dalam tahap awal kanker payudara.<sup>79</sup>

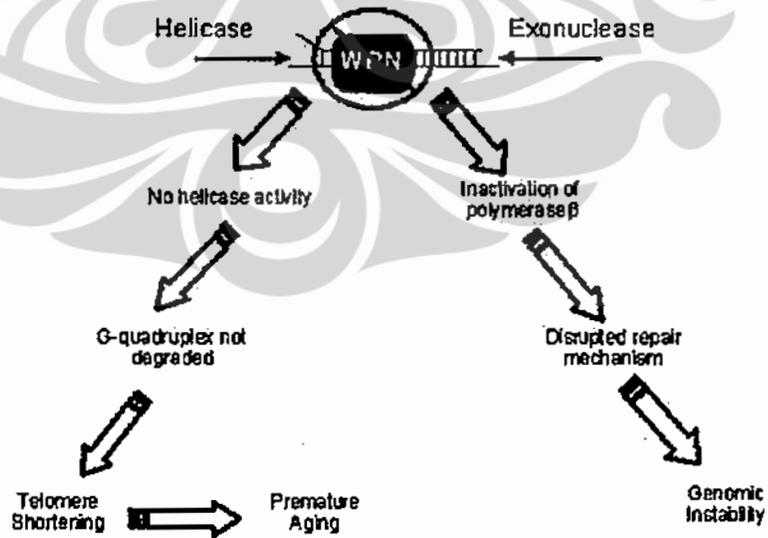
Protein WRN terdiri dari 1432 asam amino.<sup>21,23,75</sup> dan seberat 180 kD.<sup>75</sup> Protein yang dihasilkan oleh gen *WRN* termasuk dalam tipe enzim yang disebut helikase, RecQ DNA helikase dan RNA helikase<sup>22,23,82</sup>, dan satu-satunya gen yang bertindak juga sebagai DNA helikase dengan kegiatan eksonuklease,<sup>23-25,83-87</sup> Protein WRN juga mempunyai bagian nuklease N-terminal, yang pada RecQ lainnya tidak ada. Guna N-terminal ini sebagai eksonuklease.<sup>23</sup> Protein WRN mewakili hubungan yang penting antara perbaikan DNA dengan proses penuaan dan kanker.<sup>21,23,70,81,83,84</sup>



Gambar 2.10. : Struktur Protein WRN<sup>88</sup>



Gambar 2.11. : Lokasi gen *WRN* dalam kromosom 8<sup>75, 88</sup>



Gambar 2.12 : Hubungan Gen *WRN* dengan Penuaan dan Kanker<sup>69</sup>

RecQ helikase protein berperan juga sebagai protein penekan tumor, yang berfungsi sebagai penjaga genom.<sup>84</sup> DNA helikase adalah enzim yang terlibat dalam berbagai mekanisme DNA meliputi transkripsi, replikasi, rekombinasi dan perbaikan.<sup>22</sup> Gen *WRN* juga terlibat pada mekanisme pemeliharaan DNA, perbaikan DNA dan kestabilan genom.<sup>19,21</sup> RNA helikase berpartisipasi dalam semua proses biologis yang melibatkan RNA, seperti proses transkripsi, *splicing* dan translasi<sup>89</sup>

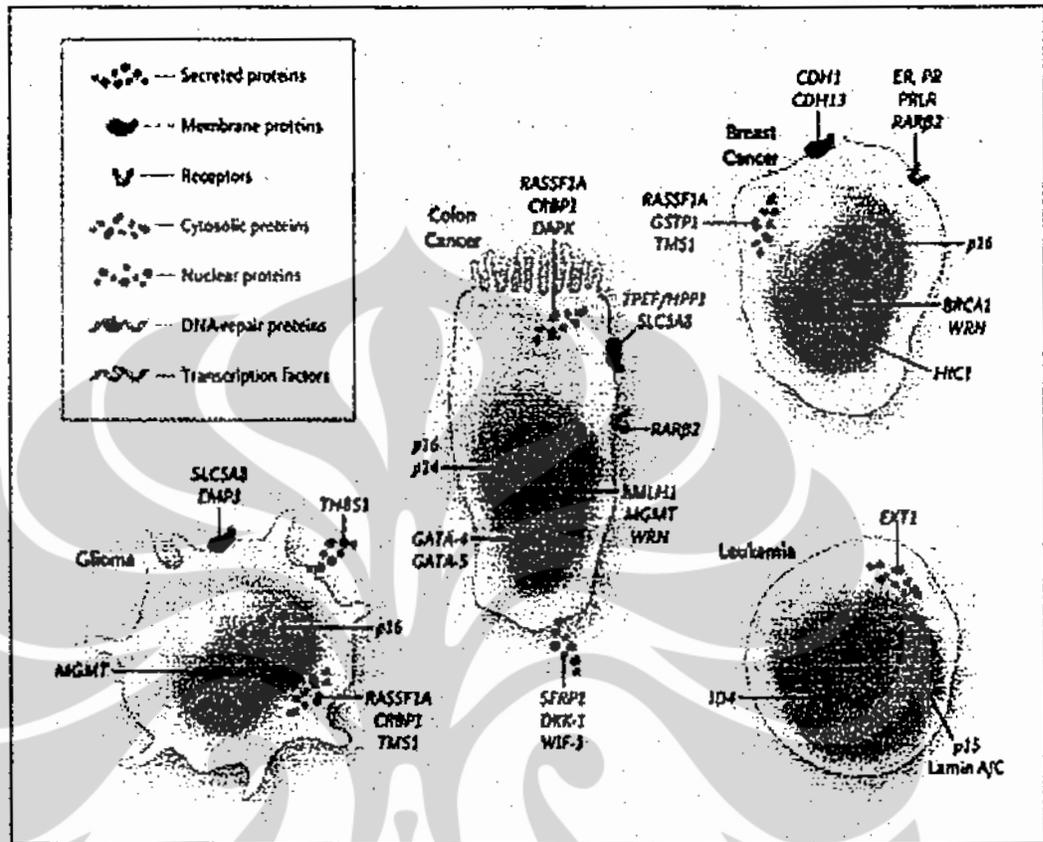
Beberapa laporan terakhir menunjukkan bahwa polymorfisme pada gen *WRN* juga berasosiasi dengan peningkatan resiko terjadinya kanker payudara.<sup>28-30</sup> Secara *in vivo* pada mencit dan *in vitro*, gen *WRN* telah terbukti sebagai gen penekan tumor,<sup>25</sup> dan diketahui dapat mengalami inaktivasi epigenetik melalui metilasi promotor.<sup>25</sup> Metilasi gen *WRN* pada pulau CpG di promotor, berkaitan dengan menurunnya fungsi gen *WRN* sebagai gen penekan tumor dan membuat terjadinya peristiwa tumorigenesis.<sup>25</sup>

Saat ini tidak hanya karena genetik, tapi juga kejadian epigenetik turut berpengaruh terhadap pemicu dan perkembangan kanker.<sup>9,11,48,49</sup> Gen penekan tumor yang sangat sering tidak aktif dalam kanker manusia, yaitu sebagai contoh hilangnya fungsi gen *p53*. Selain itu, perubahan dalam aktivitas gen *p53* telah terlibat dalam proses replikatif selular penuaan. Protein WRN dapat membentuk interaksi dengan protein *p53*. Interaksi ini melibatkan terminal karboksil bagian dari ekstrem WRN dan terminal karboksil dari *p53*, dimana daerah ini berperan penting dalam mengatur keadaan fungsional protein *p53*. Sebuah WRN sebagian kecil dapat ditemukan dalam kompleks dengan *p53* di endogen sel. Protein WRN dapat berpartisipasi dalam pengaktifan *p53* untuk memperbaiki DNA yang rusak.<sup>85</sup> (kegagalan untuk menginduksi *p53* efektif dapat berkontribusi untuk meningkatkan ketidakstabilan genomik dan peningkatan resiko kanker pada pasien Werner syndrom).<sup>85</sup> Temuan ini mendukung adanya *cross-talk* antara protein WRN dengan protein *p53*, yang mungkin penting untuk mempertahankan integritas genomik dan untuk mencegah akumulasi penyimpangan yang dapat menimbulkan penuaan dini dan kanker.<sup>90</sup> Induksi apoptosis oleh gen *p53* juga

Universitas Indonesia

akan diperlemah daya kerjanya pada sel yang kekurangan gen *WRN*,<sup>25,84,87</sup> hal ini membuktikan juga bahwa protein WRN sebagai protein penekan tumor yang berfungsi sebagai penjaga genom.<sup>84</sup> Ketidak beradaan protein WRN akan membuat ketidak normalan jalur metabolisme DNA seperti perbaikan DNA, replikasi DNA dan rekombinasi DNA juga akan mengganggu keseimbangan telomere, apoptosis serta membuat terjadinya ketidak seimbangan genetik.<sup>69,83</sup> Keadaan dengan fenotip seperti ini tidak akan dapat ditolong oleh RecQ DNA helikase lainnya seperti gen *BLM*.<sup>25</sup> Juga telah dapat disimpulkan bahwa gen *WRN* sebagai penggerak transkripsional RNA polymerase II (m RNA).<sup>91</sup> Jadi dapat disimpulkan tentang gen *WRN*:<sup>69,70,81-83,85</sup>

1. Gen *WRN* sebagai helikase yang terutama penting dalam proses replikasi DNA.
2. Tanpa adanya gen *WRN*, proses replikasi pada ujung DNA akan merusak telomere karena fungsi gen ini adalah untuk metabolisme telomere dan menjaga kestabilan telomere. Telomere yang rusak dapat berakibat :
  - Penuaan yang lebih cepat ( karena telomere semakin cepat pendek).
  - DNA menjadi tidak stabil (*genomic instability*) karena tanpa telomere yang tidak menutup kembali akan mudah terjadi rekombinasi antar kromosom sehingga rawan terjadi proses delesi, translokasi, dan kerusakan genom lainnya yang merupakan karakter genom kanker.
3. Protein WRN mewakili hubungan penting antara proses perbaikan DNA yang rusak dengan proses yang berkaitan dengan penuaan dan kanker.
4. Kekurangan protein WRN akan menyebabkan fase S terganggu pada siklus sel.



Gambar 2.13 : Gen *WRN* pada kanker <sup>12</sup>

Dari gambar dapat dilihat bahwa gen *WRN*, kemungkinan berperan banyak di kanker kolon dan kanker payudara. Oleh karena itu masih banyak dibutuhkan penelitian tentang hubungan gen ini pada penyakit kanker, serta fungsi gen ini sebagai marker, prognosis, prediktif dan terapi.

Pada tabel di bawah ini akan ditampilkan beberapa gen penekan tumor dan terapi yang telah dipakai. Response metilasi gen penekan tumor untuk terapi yang telah dilakukan

* gen <i>MGMT</i>	Glioma	BCNU, Temodar
* gen <i>MLH1</i>		cisplatin
* gen <i>RFC</i>		methotrexate
* gen <i>WRN</i>		irinotecan (baru hanya untuk kanker kolon) <sup>12</sup>

### 2.5. Real Time PCR (*Polymerization Chain Reaction*)

Merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan nukleotida dalam suatu termocycler. Teknik ini sangat efektif untuk menghitung jumlah DNA produk PCR secara spesifik.

Panjang target DNA berkisar puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit oleh sepasang primer. Primer yang berada sebelum daerah target dikenal dengan primer forward, sedangkan primer yang berada setelah daerah target dikenal dengan primer reverse. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dengan teknik PCR, materi yang dibutuhkan antara lain :

- a. DNA (typically genomic DNA)
- b. Thermostable DNA polymerase (contoh, Taq polymerase)
- c. Primers (oligonucleotides complementary to specific sequences in DNA)
- d. dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Prinsip pelipatgandaan molekul DNA pada target yang diinginkan melalui teknik PCR terdiri dari tiga tahapan yaitu :<sup>92</sup>

1. **Denaturasi**, pada suhu sekitar 95°C molekul DNA mengalami denaturasi sehingga strukturnya berubah dari untai ganda (dsDNA) menjadi untai tunggal (ssDNA).
2. **Annealing**, merupakan penempelan oligonukleotida sebagai primer kepada ssDNA. biasanya suhu annealing berkisar antara 50-60°C, primer forward yang sekuen nukleotidanya berkomplemen dengan salah satu untai tunggal akan menempel pada posisi komplemennya, demikian juga primer reversenya akan menempel pada untai tunggal lainnya.
3. **Ekstensi atau sintesis**. Pada tahap ketiga temperatur naik menjadi 75°C dengan demikian satu molekul DNA satu molekul DNA akan melipat jumlahnya menjadi dua molekul DNA. Setelah itu proses diulang dalam beberapa siklus (25 hingga 35 siklus).

Tabel 2: Perbedaan antara Real-Time PCR dan PCR konvensional<sup>93</sup>

	Real-Time PCR	PCR konvensional
1. Keseluruhan:	Amplifikasi produk PCR dapat dideteksi dan diukur selama reaksi berlangsung	Produk amplifikasi atau amplicon dapat dideteksi setelah reaksi berlangsung melalui elektroforesis pada agarose.
2. Data	Data dikumpulkan saat fase eksponensial dan jumlah produk PCR sebanding dengan jumlah template asam nukleat.	Data didapat setelah dilakukan perbandingan intensitas band dengan standrat band yang telah diketahui konsentrasinya
3. Dipakai untuk	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Kuantitasi dari ekspresi gen</li> <li>b. Verifikasi microarray.</li> <li>c. Quality kontrol dan uji validasi</li> <li>d. Mendeteksi patogen.</li> <li>e. Genotyping SNP</li> <li>f. Analisis Micro RNA</li> <li>g. Variasi jumlah copy</li> <li>h. Kuantitasi viral</li> <li>i. Percobaan SiRNA/RNAi</li> </ul>	Amplifikasi DNA untuk <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Skuensing</li> <li>b. Genotyping</li> <li>c. Kloning</li> </ul>
4. Kesimpulan:	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Tidak ada proses setelah PCR</li> <li>b. Dapat mendeteksi perubahan dibawah dari 2 lipatan.</li> <li>c. Data dikumpulkan pada Fase Eksponensial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Ada proses elektroforesis setelah PCR.</li> <li>b. Sensitivitas rendah</li> <li>c. Tidak otomatis.</li> <li>d. Ketelitiannya rendah</li> <li>e. Kurang sensitif</li> </ul>

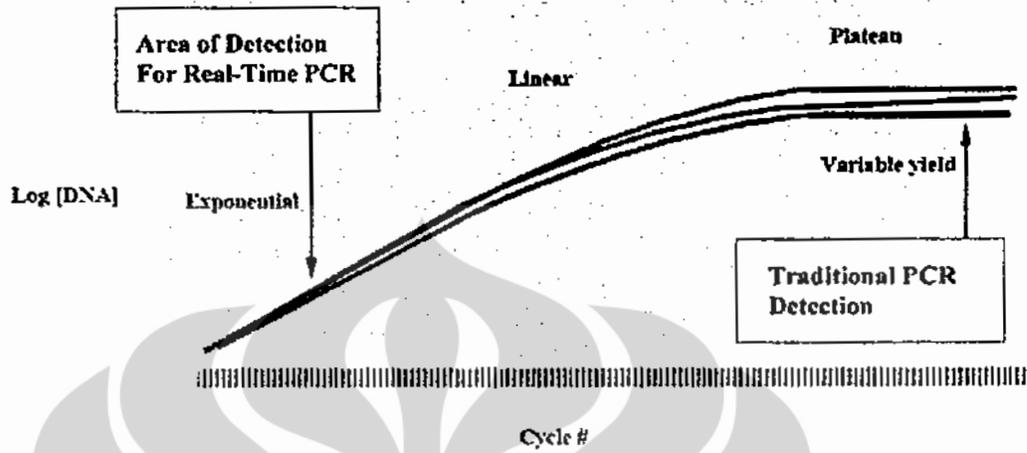
- |   |  |
|---|--|
| d. Meningkatnya signal fluorescent sebanding dengan jumlah dari amplikon. | f. Resolusi rendah                                     |
| e. Mengukur kerusakan DNA.  | g. Hasil tidak memberikan angka.                       |
| f. Kemanjuran terapi obat.  | h. Pewarnaan Ethidium Bromide tidak sangat kuantitatif |
|   | i. Hasil didapat hanya berdasarkan perbedaan ukuran.   |
- 

Amplifikasi pada real time PCR terdiri dari :<sup>93</sup>

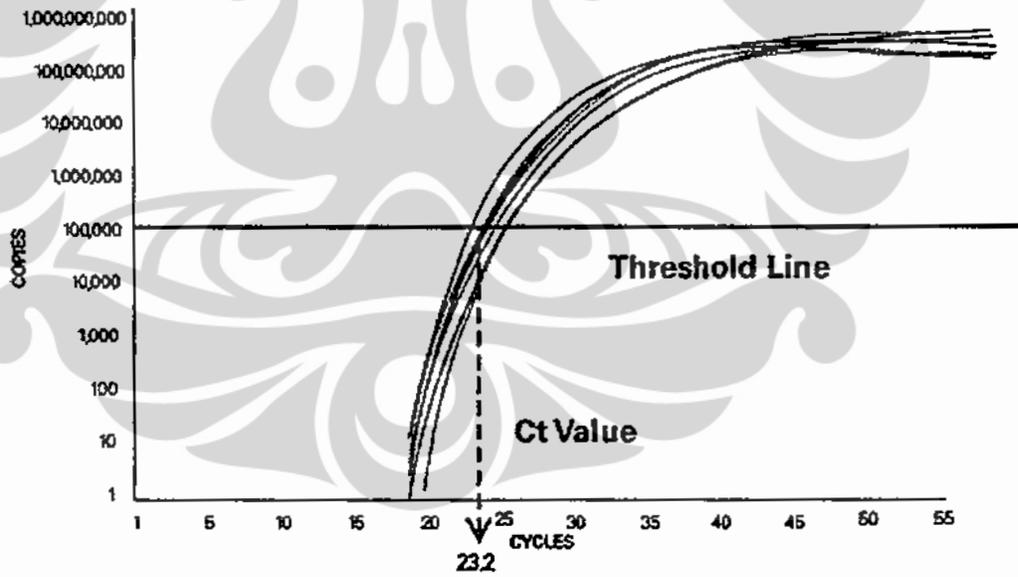
1. Fase Eksponensial, selama fase eksponensial jumlah produk PCR kira-kira dua kali lipat dalam setiap siklus.
2. Fase Linear, reaksi mulai menurun dan hasil PCR tidak dua kali lipat lagi.
3. Fase *Plateau*, akumulasi dari produk PCR yang mulai lambat untuk menghentikan banyaknya ragam komponen yang dapat diraih dalam penilaian akhir dari keefektifannya.

Selama reaksi berlangsung, komponen-komponen reaksi dikonsumsi sehingga satu atau lebih komponen menjadi terbatas. Pada saat tersebut, reaksi berjalan lambat dan memasuki fase *Plateau*.

Pada awalnya, fluorescens belum terdeteksi karena masih berada dibawah ambang batas (*threshold line*), kemudian produk terakumulasi secara eksponensial. Apabila produk yang berakumulasi tersebut berada dalam jumlah yang cukup, maka sinyal fluoresensi akan terdeteksi. Jumlah siklus dimana sinyal fluoresens dapat terdeteksi disebut sebagai *Cycle threshold* atau Ct.



Gambar 2.14 : Kurva Fluoresens pada Real-Time PCR.<sup>93</sup>



Gambar 2.15. : Cycle Threshold.<sup>93</sup>

Nilai Ct dari suatu reaksi terutama ditentukan oleh jumlah *template* DNA pada awal reaksi amplifikasi. Apabila terdapat *template* dalam jumlah besar pada awal reaksi, maka siklus amplifikasi yang diperlukan relatif sedikit untuk memperoleh akumulasi produk yang cukup memberikan sinyal fluoresens di atas ambang batas. Dengan demikian reaksi tersebut akan mempunyai nilai Ct yang rendah atau lebih awal. Namun sebaliknya, apabila hanya terdapat jumlah *template* yang kecil pada awal reaksi, siklus amplifikasi lebih banyak diperlukan untuk memberikan sinyal fluoresens di atas ambang batas. Dengan demikian reaksi tersebut akan mempunyai nilai Ct yang tinggi atau lebih lambat.

Metode analisis hasil real time PCR dapat secara perhitungan mutlak (*absolute quantification*) maupun secara perhitungan relatif (*relative quantification*). Perhitungan mutlak diperoleh dengan membandingkan nilai Ct sampel uji terhadap kurva standar. Hasil analisis berupa jumlah asam nukleat per sel. Pada perhitungan relatif, hasil analisis merupakan suatu rasio untuk mengetahui perbedaan tingkat ekspresi relatif suatu gen target pada sel yang normal dibandingkan dengan yang terkena suatu penyakit. Baik metode perhitungan mutlak maupun perhitungan relatif harus dinormalisasi, sehingga data yang diperoleh menjadi bermakna. Hal ini dilakukan dengan menggunakan *normalizers* yaitu *housekeeping gene*, yang merupakan gen dengan ekspresi yang konstan pada semua sampel, di mana ekspresinya tidak dipengaruhi oleh perlakuan. Analisis perhitungan relatif dapat menggunakan metode Pfaffl.

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi analitik untuk mengetahui peran metilasi DNA promoter gen *WRN* dan hubungan antara metilasi DNA promoter gen *WRN* dengan ekspresi gen *WRN* pada kanker payudara. Status metilasi DNA promoter gen *WRN* diperiksa dengan melakukan teknik MSP (*Methylation-specific PCR*) dan PCR konvensional sedangkan Ekspresi gen *WRN* diperiksa dengan Real Time PCR yang sebelumnya dilakukan *Reverse Transcriptase PCR*.

#### 3.2. Lokasi Penelitian

Penelitian di lakukan di:

1. Rumah sakit Kanker Dharmais (RSKD).

Jl. Let. Jen. S. Parman kav. 84-86 Slipi Jakarta Barat 11420 Indonesia sejak bulan November 2009 hingga bulan Juni 2009 untuk pengumpulan sampel penelitian dan sejak bulan Februari 2010 hingga bulan Mei 2010 untuk pengumpulan data.

2. Laboratorium Stem Cell and Cancer Institute (SCI).

Jl. Ahmad Yani no. 2, Pulo Mas, Jakarta Timur 13210 Indonesia sejak bulan Januari 2009 hingga pertengahan bulan Desember 2009 untuk kerja di laboratorium dan bimbingan hingga bulan Juli 2010.

#### 3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah sampel yang didapat dari spesimen/ jaringan hasil operasi pasien kanker payudara yang menjalani pembedahan di Rumah Sakit Kanker Dharmais dan secara histopatologik melalui pemeriksaan potong beku, jaringan dinyatakan menunjukkan gambaran yang sesuai dengan karsinoma

payudara serta sampel didapat dari pasien yang telah menyetujui dengan mengisi *informed consent*.

### **3.4. Jenis Sampel**

Sampel berupa jaringan segar ( berarti belum terkena reagen fiksasi atau Preservasi ).

### **3.5. Teknik Pengambilan Sampel**

Sampel berdiameter kurang lebih 1 cm. Sampel diambil dari jaringan pada bagian yang dekat dengan bagian jaringan yang dipakai untuk pemeriksaan potong beku dan jaringan telah dinyatakan menunjukkan gambaran yang sesuai dengan karsinoma payudara dan memenuhi kriteria inklusi.

### **3.6. Subyek Penelitian**

#### **Kriteria Inklusi**

- a. Menjalani operasi di Rumah Sakit Kanker Dharmais pada tahun 2002 dan dari pertengahan bulan November tahun 2008 hingga pertengahan bulan Juni tahun 2009.
- b. Jaringan hasil operasi / pembedahan secara histopatologik menunjukkan gambaran yang sesuai dengan karsinoma payudara.
- c. Pasien atau keluarga pasien tidak keberatan spesimennya dipakai sebagai bahan penelitian dengan menandatangani lembar *informed consent*.

#### **Kriteria Eksklusi**

- a. Pasien atau keluarga pasien menolak spesimennya dipakai sebagai bahan penelitian.
- b. Keadaan spesimen yang ada tidak memenuhi kecukupan untuk dipakai sebagai bahan penelitian karena harus didahulukan pemeriksaan rutin Histopatologi Patologi Anatomik.

### 3.7. Besar Sampel

Besarnya sampel dihitung dengan rumus *Single proportion* :

$$n = \frac{(Z\alpha)^2 p q}{d^2}$$

n : total jumlah bahan penelitian.

$\alpha$  : nilai distribusi normal baku pada tingkat kemaknaan 1-5%,  
(pada umumnya 5%),  $\alpha = 0,05$  % dan  $Z_{0,975}$  yaitu : 1,96.

p : proporsi metilasi gen *WRN* pada penderita kanker payudara  
berdasarkan kepustakaan yaitu : 17,2 %  $\rightarrow$  17 %

q : 1- p

d : batas kesalahan .

Diketahui :  $\alpha = 1,96$

p = 17%

q = 1 - 17% = 83%

d = 13%

Perhitungan besar sampel :

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,17) (0,83)}{(0,13)^2} = 32 \text{ sampel}$$

### 3.8. Bahan dan Cara Kerja

#### 3.8.1. Rekrutmen subyek penelitian

Sampel jaringan kanker payudara yang masuk ke Instalasi Patologi Anatomi RSKD dari kamar operasi, langsung dilakukan pemeriksaan potong beku dan setelah dokter spesialis Patologi Anatomi menyatakan bahwa jaringan tersebut sesuai dengan gambaran karsinoma payudara, serta besar jaringan yang masih berlebih untuk pemeriksaan rutin Histopatologi di Instalasi Patologi Anatomi, baru peneliti dapat mengambil untuk sampel penelitian ini. Pasien / keluarga pasien dengan hasil yang memenuhi syarat untuk penelitian ini dihubungi untuk diminta kesediaannya menanda tangani *informed consent*.

#### 3.8.2. Bahan penelitian

Bahan penelitian adalah spesimen/ jaringan segar yang berasal dari pasien kanker payudara yang menjalani operasi pengangkatan jaringan payudara di Rumah Sakit Kanker Dharmas. Bahan penelitian harus disimpan di  $-80^{\circ}\text{C}$ . Bahan penelitian dibagi 2, yaitu untuk isolasi DNA (sebagai bahan mendeteksi metilasi DNA promoter gen *WRN*) dan untuk isolasi RNA (sebagai bahan untuk mengukur tingkat ekspresi gen *WRN*).

#### 3.8.3. Metode Pemeriksaan

Metode pemeriksaan yang dilakukan sesuai dengan metode pemeriksaan yang telah dilakukan sebelumnya oleh sentral-sentral penelitian lain.

##### 3.8.3.a. Isolasi DNA

- Alat dan bahan :

- Alat:
  - Tabung Eppendroft
  - Tip Eppendrof berukuran 100  $\mu$ l dan 500  $\mu$ l dan harus yang berfilter.
  - Alat sentrifuse.
  - Mikropipet
  - Rak tabung
  - *Collection Tube* yang tersedia di kit isolasi DNA.
  - Inkubator.
- Bahan:
  - Jaringan segar
  - Kit Isolasi DNA (High Pure PCR template preparation kit, Roche-applied-science).
  - Isopropanol.
  - Proteinase K.

- Cara kerja :

Isolasi DNA dilakukan dengan prosedur dari kit isolasi DNA (High Pure PCR template preparation kit, Roche - applied-science). Bahan penelitian diletakkan ditabung Eppendrof, serta tambahkan 200  $\mu$ l Tissue Lysis Buffer dan 40  $\mu$ l Proteinase K kemudian diletakkan di oven pada suhu 70° C hingga jaringan hancur. Beberapa hari kemudian setelah jaringan menjadi hancur, dilakukan isolasi DNA sesuai dengan prosedur yaitu: ditambahkan 200  $\mu$ l Binding buffer, kemudian diletakkan pada inkubator selama 10 menit. Ditambahkan 100  $\mu$ l isopropanol, campur sempurna. Disentrifuse pada 8.000 g selama 1 menit (setelah dipindah ke tube yang ada di kit). *Collection tube* diganti, ditambahkan 500  $\mu$ l Inhibitor Removal Buffer. Disentrifuse pada 8.000 g selama 1 menit. *Collection tube* diganti, ditambahkan 500  $\mu$ l Wash Buffer. Disentrifuge pada 8.000 g selama 1 menit, lakukan 2 kali. Setelah dibuang cairan yang di *collection tube*, disentrifuse lagi pada 13.000 g selama 5 menit, tanpa mengganti *collection tube*. *Collection tube* diganti dengan tube Eppendroff 1,5 ml. Dimasukkan 50  $\mu$ l elution buffer yang hangat (setelah diletakkan di inkubator suhu 70°C sebelumnya)

dibiarkan 1 menit pada temperatur ruangan. Disentrifuse pada 8.000 g selama 1 menit. Ditambahkan lagi 50 µl Elution Buffer dan disentrifuse lagi pada 8.000 g selama 1 menit. DNA yang didapat sebanyak 100 µl kemudian disimpan di freezer -80° C , setelah pemberian label. Kuantitas DNA yang ada, dihitung dengan alat Spektrofotometer.

- Untuk mengontrol kualitas DNA yang diperoleh, diperiksa dengan memperlakukan teknik PCR konvensional menggunakan primer Interferon-Gamma.<sup>94</sup> Menurut laporan sebelumnya, primer Interferon-Gamma di disain untuk mengenali sekuen DNA lokus gen Interferon-Gamma (IFN-γ) secara spesifik.<sup>94</sup> Terlihatnya produk PCR dari penggunaan primer ini merupakan indikator bahwa DNA yang terisolasi layak digunakan untuk analisa berikutnya. Primer Interferon-Gamma yang digunakan adalah sense: 5'- TCT TTT CTT TCC CGA TAG GT- 3' dan anti sense adalah 5'- CAG GGA TGC TCT TCG ACC TC- 3'. Hasil ampikon dari penggunaan primer Interferon-Gamma adalah sebesar 150 bp.<sup>94</sup> PCR sebanyak 35 siklus, 1 menit pada suhu 94° C; 1 menit pada suhu 50° C; 1 menit pada suhu 70° C. Hasil isolasi DNA yang baik selanjutnya akan diperlakukan Sodium Bisulfit kemudian diperlakukan metode PCR metilasi spesifik untuk yang termetilasi atau untuk yang tidak termetilasi (Metode MSP)<sup>25</sup>

- I. Perlakuan Sodium Bisulfit (SB)<sup>25</sup>

- Alat dan Bahan :

- Alat : - Mesin PCR - Tip berfilter  
 - Tube PCR - Mikropipet  
 - Rak tabung - Tabung Eppendroft
- Bahan : - DNA - Bisulfit kit (Qiagen).

- Cara kerja :

Cara kerja perlakuan sodium bisulfit ini dilakukan sesuai dengan prosedur Bisulfite kit Handbook (Qiagen) . 20  $\mu$ l DNA ditambah 85  $\mu$ l Bisulfit, dicampur dan ditambahkan 35  $\mu$ l DNA protect buffer. Dilakukan PCR dengan program yang sudah ada (sesuai di Bisulfite kit Handbook). Hasil PCR di spin down, ditransfer ke 1,8 ml tube Eppendroft, dipersiapkan Carrier RNA + 310  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, divortex dan dimasukkan kebox es. Ditambahkan 560  $\mu$ l buffer BL yang mengandung 10  $\mu$ g/ml Carrier RNA. Ditambahkan 560  $\mu$ l EtOH 100%, divortex dan dispin down. Ditransfer sebanyak 630  $\mu$ l ke spin column (yang disimpan pada freezer -4°C dan sudah tersedia pada kemasan kit) dan disentrifuse pada 13.000 g selama 1 menit (lakukan dua kali), cairan dibuang. Ditambahkan 500  $\mu$ l buffer BW, disentrifuse pada 13.000 g selama 1 menit., cairan dibuang. Ditambahkan 500  $\mu$ l buffer BD, diinkubasi 15 menit pada suhu ruangan, kemudian disentrifuse pada 13.000 g selama 1 menit. Ditambahkan 500  $\mu$ l buffer BW, disentrifuse pada 13.000 g selama 1 menit, cairan dibuang (lakukan 2 kali). Dipindahkan ke *collection tube* yang baru, sentrifuse pada 13.000 g selama 5 menit, cairan dibuang. Dipindahkan ke tube Eppendrof 1,8 ml, ditambahkan 20  $\mu$ l EB, disentrifuse pada 13.000 g selama 1 menit, dilakukan 2 kali. Didapatkan 40  $\mu$ l DNA yang sudah diperlakukan sodium bisulfit. Diberi label dan simpan pada freezer -20° C.

- Untuk mengontrol hasil DNA yang telah diperlakukan dengan perlakuan sodium bisulfit atau untuk memonitor kualitas konversi DNA oleh sodium bisulfit, maka DNA yang didapat diperiksa dengan memperlakukan teknik PCR konvensional menggunakan primer Myod-1.<sup>95</sup> Primer Myod-1 yang digunakan adalah sense 5'- TGA TTA ATT TAG ATT GGG TTT AGA GAA GGA- 3' dan antisense 5'-CCA ACT CCA AAT CCC CTC TCT AT- 3'. Hasil amplikon primer Myod-1 sebesar 152 bp.<sup>95</sup> PCR sebanyak 40 siklus, 30 detik pada suhu 95° C; 30 detik pada suhu 58° C; 30 detik pada suhu 72° C. Menurut laporan sebelumnya, primer Myod-1 di disain untuk mengenali lokus gen Myod-1 yang kaya dengan susunan nukleotida Cytosine yang tidak terletak

pada klaster CG. Apabila perlakuan sodium bisulfit telah berhasil mengkonversi Cytosine (C) yang tidak termetilasi menjadi Urasil (U), maka primer ini hanya akan mengamplifikasi hasil konversi sodium bisulfit. Dengan kata lain, primer ini tidak dapat meng- *anneal* dengan sekuen Myod-1 yang asli (sebelum diperlakukan sodium bisulfit) atau berarti perlakuan sodium bisulfitnya gagal. Dengan demikian, kualitas perlakuan sodium bisulfit dapat diperiksa dengan menggunakan primer ini. DNA yang sudah diperlakukan sodium bisulfit tersebut dan yang telah pasti memberikan hasil yang baik setelah diperiksa menggunakan primer Myod-1 kemudian diperlakukan dengan teknik PCR konvensional dengan masing - masing primer untuk termetilasi atau primer untuk tidak termetilasi (Metode MSP)<sup>25</sup>

- II. PCR Metilasi Spesifik (Metode MSP).<sup>25</sup>

- Metilasi :

Primer yang digunakan adalah sense: 5'- CGG GTA GGG GTA TCG TTC GC- 3', lokasi pada -36 bp dari tempat mulai transkripsi dan antisense: 5-AAC GAA ATC CAC CGC CCG CC-3' lokasi pada +129 bp dari tempat mulai transkripsi. Hasil amplicon primer sebesar 165 bp. Teknik ini mengikuti protokol jurnal sebelumnya,<sup>25</sup> diperlakukan dengan PCR konvensional sebanyak 40 siklus, 30 detik pada suhu 95° C; 30 detik pada suhu 65° C; 30 detik pada suhu 72° C. Sebagai Kontrol positif yang dipakai yaitu HCT 116<sup>25</sup> dan M (+), HCT 116 adalah *cell line* yang berasal dari kanker kolon dan M (+) adalah DNA dari hasil isolasi limfosit darah tepi manusia yang sehat, DNA yang didapat ditambahkan dengan pemberian SssI metilase (New England Biolabs, Inc. Beverly, Mass, USA)<sup>96</sup> berarti DNA yang berasal dari limfosit darah tepi manusia sehat tersebut telah mengalami metilasi. Sebagai Kontrol negatif yang dipakai adalah : MCF-7<sup>25</sup> dan M (-). MCF-7 adalah *cell line* yang berasal dari kanker payudara. M (-) adalah DNA dari hasil isolasi limfosit sel darah tepi manusia sehat yang tidak

ditambahkan SssI metilase.<sup>97</sup> Jumlah sampel yang diperlakukan menggunakan primer WRN termetilasi sebanyak 60 sampel.

- Tidak termetilasi:

Primer yang digunakan yaitu sense: 5'- GTA GTT GGG TAG GGG TAT TGT TTG T - 3' dan antisense: 5 - AAA CAA AAT CCA CCA CCC ACC CC - 3', Hasil amplicon primer sebesar 165 bp. Diperlakukan dengan PCR konvensional sebanyak 35 siklus, 30 detik pada suhu 95° C; 30 detik pada suhu 60° C; 30 detik pada suhu 72° C. Sebagai kontrol positif adalah BT 549, MCF-7 dan M (-), BT 549 adalah *cell line* yang berasal dari kanker kolon dan sebagai kontrol negatif adalah: HCT 116 dan M (+). Jumlah sampel yang diperlakukan menggunakan primer WRN yang tidak termetilasi sebanyak 60 sampel. Catatan : Desain primer yang digunakan untuk mengenali gen *WRN* yang termetilasi dan gen *WRN* yang tidak termetilasi memang menghasilkan produk amplicon yang sama yaitu 165 bp. Kesamaan produk ini tidak berarti menghasilkan produk PCR yang tidak spesifik. Hal ini bermaksud agar primer untuk mengenali status metilasi atau tidak metilasi pada gen *WRN* menargetkan lokus yang sama. Bedanya, primer yang di disain untuk mengenali lokus metilasi memiliki susunan sekuen yang berbeda dari primer yang digunakan untuk mendeteksi DNA yang tidak termetilasi. Itu sebabnya, spesifisitas dari dua pasang primer ini selalu di uji pada DNA yang diketahui mengalami metilasi dan DNA yang diketahui tidak mengalami metilasi.

### 3.8.3.b. Isolasi RNA

- Alat dan Bahan :

- Alat : - Mortir - Mikropipet
- Tabung Eppendroft - Rak Tabung
- Tip yang berfilter - Sentrifuse 4° C



- Bahan : - H<sub>2</sub>O - AMV kit (Roche).  
- Random Hexamer

- Cara kerja :

Perubahan RNA menjadi cDNA dilakukan sesuai dengan prosedur dari AMV kit (Roche). 11 µl (RNA + H<sub>2</sub>O) + 2µl Random Hexamer + 7µl AMV rt; 10 detik pada suhu 65° C; 60 detik pada suhu 42° C; 10 detik pada suhu 65° C.

### 3.8.4. Amplifikasi cDNA menggunakan Real - Time PCR

- Alat dan Bahan :

- Alat : - RT PCR tube - Tip putih, kuning, dan biru.  
- Mikropipet - Mesin PCR.

- Bahan : Primer WRN  
Primer β-actin  
Kapa HiFi Hotstart (Kapa Biosystem).

- Cara kerja :

cDNA diamplifikasi dengan menggunakan alat Real - Time PCR (Corbett) dengan protokol reaksi yang sudah dioptimalisasi, berguna untuk pemeriksaan ekspresi, dilakukan dengan Real-Time PCR sebanyak 40 siklus, 20 detik pada suhu 98° C; 20 detik pada suhu 60° C; 30 detik pada suhu 72° C. Primer β-actin yang dipakai adalah: sense 5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC- 3' dan antisense 5'- GGA ATC CTT CTG ACC CAT GC- 3', hasil ampikon yang akan dihasilkan dari primer ini sebesar 204 bp.<sup>94</sup> Sedangkan primer WRN untuk ekspresi yang digunakan yaitu sense: 5'- GGA TCA GCA CAG TCA GAA AAT GTT CT - 3' dan antisense: 5'- GGA TAG ATT CAG TTT CCT AAG TTC ACC- 3', hasil ampikon yang akan dihasilkan dari primer ini sebesar 513 bp.<sup>98</sup> Perlakuan di Real-Time PCR harus

selalu bersamaan antara  $\beta$ -actin dengan WRN dan setiap kali jalan harus ada kontrol positif dan NTC (no template control).

Dengan Real Time PCR diperoleh nilai efisiensi dan *Cycle Threshold* (Ct). Analisis ekspresi gen dinilai secara “*relative quantification*” sehingga diperoleh nilai kadar relatif mRNA, dengan menggunakan metode Pfaffl dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Ratio} = \frac{(E \text{ target})^{\Delta Ct \text{ target (calibrator - test)}}}{(E \text{ ref})^{\Delta Ct \text{ ref (calibrator - test)}}$$

Keterangan :

Target = gen *WRN*

Referensi = gen  *$\beta$ -actin*

Calibrator = BT 54

Test = sel kanker payudara.

### 3.9. Analisis Data

Evaluasi hubungan metilasi DNA dengan ekspresi gen *WRN* dilakukan dengan uji statistik Mann Whitney U. Sedangkan untuk evaluasi hubungan data klinik dengan peristiwa metilasi dan peristiwa tidak metilasi dilakukan dengan uji Fisher. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program *software* SPSS 16.0

**BAB IV**  
**HASIL PENELITIAN**  
**Dan**  
**PEMBAHASAN**

**4.1. Karakteristik Subyek Penelitian**

Subyek penelitian ini menggunakan sampel jaringan segar kanker payudara dari pasien-pasien di Rumah Sakit Kanker Dharmais. Jumlah sampel penelitian yang dipakai sebanyak 64 buah sampel dengan perincian: sebesar 20 buah sampel (31,25%) berasal dari tahun 2002 dan sebesar 44 buah sampel penelitian (68,75%) berasal dari pertengahan bulan November tahun 2008 hingga pertengahan bulan Juni tahun 2009.

**4.2. Demografi Subyek Penelitian**

Dari 64 buah sampel penelitian, dari demografi usia: usia termuda sampel penelitian adalah 25 tahun dan usia tertua sampel penelitian adalah 72 tahun. Mean data usia sebesar 46,05 dan median data usia adalah 45,5. Kelompok usia 30 - 40 tahun jumlahnya sama banyak dengan kelompok usia 40 – 50 tahun dan merupakan jumlah yang terbanyak.

Tabel 4.1. Demografi Subyek Penelitian

Data Klinik	Total Sampel N (%)
1. Usia	
a. $\leq$ 40 tahun	21 (35%)
b. $>$ 40 tahun	39 (65%)
2. Pemeriksaan IHC:	
a. ER (+)	11 (22.92%)
b. ER (-)	37 (77.08%)
c. PR (+)	12 (25%)
d. PR (-)	36 (75%)
e. Her 2 (+)	24 (50%)
f. Her 2 (-)	24 (50%)
g. p 53 (+)	18 (38.30%)
h. p 53 (-)	29 (61.70%)
i. Triple negatif	15 (31.25%)
3. TNM	
a. T = 1 & 2	27 (71.05%)
b. T = 3 & 4	11 (28.95%)
c. N = 0	21 (53.85%)
d. N = 1 & 2	18 (46.15%)
e. M = 0	25 (96.15%)
f. M = 1	1 (3.85%)

### 4.3. Status DNA

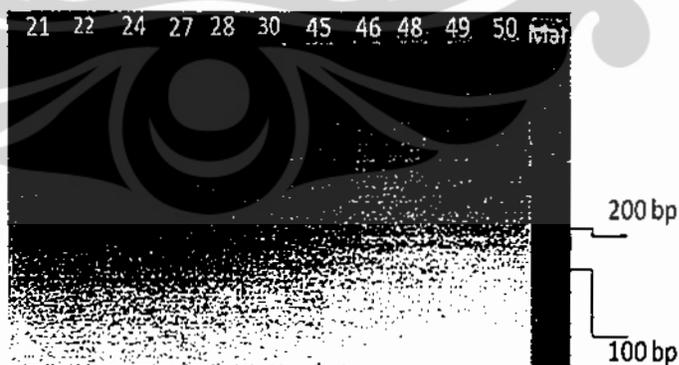
Dari 64 buah sampel jaringan kanker payudara yang digunakan untuk penelitian ini, sebanyak 60 (93,75%) buah sampel berhasil mendapatkan DNA yang baik dari hasil isolasi DNA. Hal ini disebabkan :

a. 4 buah sampel tidak memberikan hasil isolasi DNA yang berkualitas baik setelah dilakukan pemeriksaan dengan teknik PCR konvensional menggunakan primer Interferon  $\gamma$ ,<sup>93</sup> yaitu untuk nomor sampel 5, 7, 8, 9

b. setelah DNA diperlakukan proses perlakuan Sodium Bisulfit dan yang tidak memberikan hasil yang baik setelah diperiksa dengan memperlakukan teknik PCR konvensional menggunakan primer MyoD-1<sup>94</sup> yaitu untuk nomor 5, 7, 8, 9 (6,25%) juga.

Semua hasil isolasi DNA (sebelum diperiksa dengan primer Interferon-Gamma) diukur serapan cahayanya dengan sinar UV dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm kemudian dilakukan juga elektroforesis DNA pada gel agarose 2,5% sebanyak 20  $\mu$ l tapi hanya untuk beberapa sampel saja.

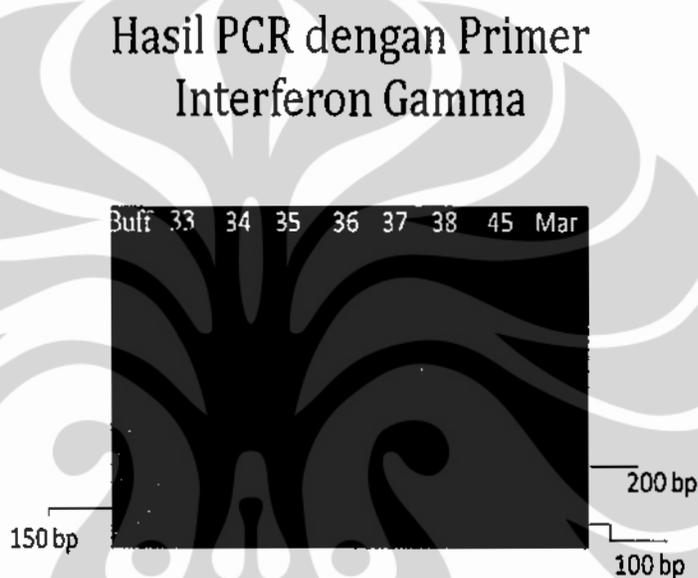
### Elektroforesis DNA



Gambar 4.1. Hasil isolasi DNA di elektroforesis pada gel agarose 2,5%.  
No. 21, 22, 24, 27, 28,30,45,46,48,49,50 adalah sampel  
Mar = Marker  
100 bp, 200 bp adalah ukuran jenjang DNA

#### 4.3.1. PCR dengan Primer Interferon - Gamma <sup>93</sup>

Berguna untuk mengecek kualitas hasil isolasi DNA yang didapat. Jadi sampel penelitian yang mempunyai hasil PCR sebesar 150 bp berarti DNA yang didapat dari hasil isolasi cukup baik kualitasnya untuk diperlakukan proses selanjutnya, yaitu proses perlakuan Sodium Bisulfit (SB) dan perlakuan PCR Metilasi Spesifik (MSP).



Gambar 4.2 DNA hasil PCR dengan Primer Interferon- Gamma sebesar 150 bp.

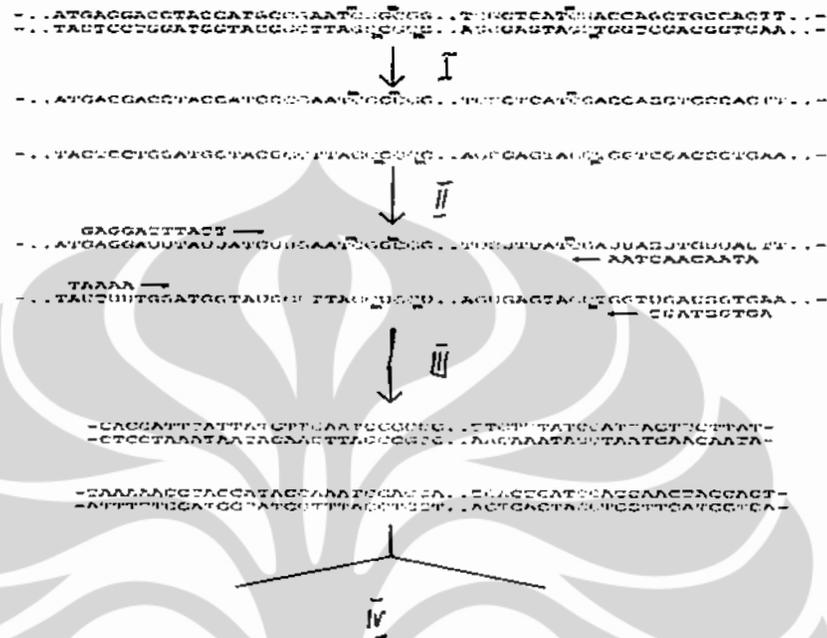
Buff. = buffer, sebagai NTC (no template control)

Mar = marker

100 bp, 200 bp adalah ukuran jenjang DNA

#### 4.3.2. Perlakuan Sodium Bisulfit. <sup>25</sup>

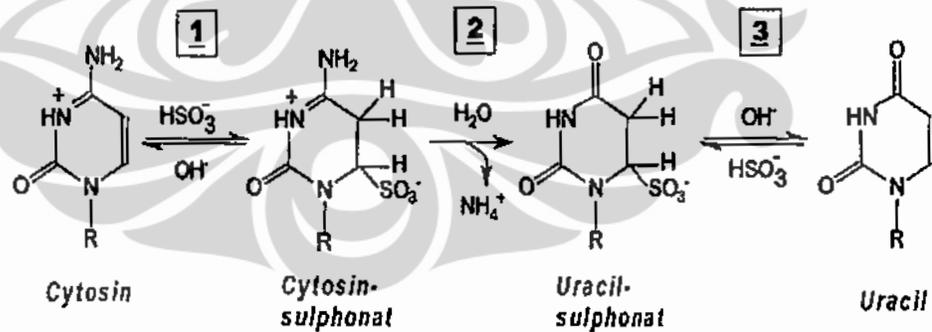
Perlakuan Sodium Bisulfit berfungsi untuk mengkonversi cytosine yang tidak termetilasi menjadi urasil, sedangkan cytosine yang termetilasi tetap menjadi cytosine. DNA awalnya didenaturasi dengan perlakuan alkali, DNA berantai tunggal dengan Sodium Bisulfit mengubah residu cytosine (C) menjadi urasil (U) karena deaminasi spontan sedangkan 5 metil cytosine tidak bereaksi. Urutan DNA ini kemudian diamplifikasi oleh PCR dengan primer spesifik untuk DNA yang telah dirubah oleh perlakuan sodium bisulfit.



Gambar 4.3 Proses Perlakuan Sodium Bisulfit

Keterangan proses yang terjadi :

- Denaturasi
- Reaksi Sodium Bisulfit yang terdiri dari :



- Keterangan gambar:
- Sulfonasi.
  - Deaminasi Hidrolitik.
  - Desulfonasi Alkali.

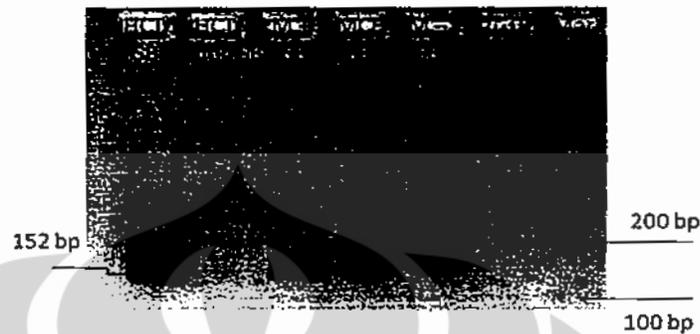
III. Amplifikasi PCR

IV. Metode PCR metilasi spesifik (Teknik MSP).

#### 4.3.3. PCR dengan Primer Myod-1 (Myogenic Differentiation 1).<sup>94</sup>

Berfungsi untuk menguji kualitas DNA setelah dilakukan perlakuan Sodium Bisulfit dan untuk membuktikan apakah DNA telah terkonversi dengan baik. Tujuannya adalah untuk memastikan bahwa setiap cytosine (C) yang termetilasi tetap sebagai cytosine, sedangkan cytosine (C) yang tidak termetilasi akan berubah menjadi urasil (U). Apabila perlakuan sodium bisulfit tidak sempurna maka cytosine yang tidak termetilasi tetap menjadi cytosine dan tidak berubah menjadi urasil, akibatnya ketika dilakukan proses *Polymerase chain reaction* Metilasi Spesifik (MSP) akan memberikan hasil positif yang salah (*“false positive”*). Untuk menguji kualitas DNA setelah perlakuan sodium bisulfit, kami menggunakan Primer Myod-1 (Myogenic Differentiation 1) seperti yang telah dipublikasi sebelumnya<sup>94</sup> karena situs gen *Myod-1* ini diposisikan pada untai sekuens yang kaya dengan cytosine (C). Apabila perlakuan sodium bisulfit terjadi dengan baik maka setiap cytosine (C) pada situs gen *Myod-1* akan berubah menjadi urasil (U), yang properti kimianya mirip dengan timin (T). Primer Myod-1 yang dipakai hanya akan berhibridisasi (atau *“anneal”*) dengan timin (T), bukan dengan cytosine (C). Oleh karena itu jika proses sodium bisulfit gagal, dimana C tetap sebagai C, sebagai akibatnya Primer Myod-1 ini tidak dapat berhibridisasi, oleh karena primer ini memerlukan timin (T) untuk dapat berhibridisasi dengan baik., berarti DNA yang memberikan hasil tersebut dapat diperlakukan untuk proses selanjutnya yaitu perlakuan PCR Metilasi Spesifik (MSP).

### Hasil PCR untuk Kontrol dengan Primer Myod-1



Gambar 4.4. DNA dengan hasil PCR primer Myod-1 sebesar 152 bp untuk kontrol. HCT , M (+), MCF dan M (-) yang diperlakukan sodium bisulfit akan memberikan hasil positif, tapi HCT yang tidak di sodium bisulfit (non SB) akan memberikan hasil negatif  
Buff. = buffer (NTC), Mar = marker  
SB = sodium bisulfit.

### Hasil PCR untuk Kontrol dan Sampel dengan Primer Myod-1



Gambar 4.5. DNA dengan hasil PCR primer Myod-1 sebesar 152 bp untuk kontrol dan sampel. HCT = kontrol, no. 20, 44 = sampel penelitian (sudah di sodium bisulfit) = hasil positif  
HCT yang tidak di sodium bisulfit = hasil negatif  
Buff. = buffer (NTC), Mar = marker  
SB = sodium bisulfit.

Sebagaimana terlihat pada gambar 4.4. dan gambar 4.5., amplifikasi dengan primer Myod-1 berhasil pada sampel yang telah diperlakukan sodium bisulfit. Hal ini menunjukkan bahwa primer Myod-1 yang digunakan memang spesifik untuk mengenali sampel DNA yang telah terkonversi. Dengan demikian apabila tidak terlihat produk PCR sebesar 152 bp<sup>94</sup> maka pada sampel penelitian tidak terjadi konversi sodium bisulfit yang baik sehingga perlu diulang.

#### 4.3.4. PCR Metilasi Spesifik (MSP).<sup>25</sup>

*Polymerase chain reaction* Metilasi Spesifik (MSP) adalah sebuah teknik yang berfungsi untuk mendeteksi CpG promoter hipermetilasi. Teknik ini adalah perlakuan MSP yaitu perlakuan dengan teknik PCR konvensional menggunakan primer yang spesifik untuk yang termetilasi atau primer yang spesifik untuk yang tidak termetilasi.

#### 4.3.5. Kontrol M (+) dan M (-).

Kontrol ini berfungsi sebagai kontrol positif dan negatif. Kedua kontrol ini dipakai bertujuan untuk mendapatkan ketepatan yang lebih mendekati antara kontrol dengan sampel penelitian yang juga berasal dari manusia. Baik M (+) dan M (-) juga harus diperlakukan sodium bisulfit. Disamping itu juga dipakai kontrol *cell line* HCT 116 dan *cell line* MCF 7 karena berdasarkan jurnal yang sebelumnya<sup>25</sup> juga memakai kontrol ini, hasil yang didapat dari jurnal sebelumnya adalah sebagai berikut *cell line* HCT 116 memberikan hasil positif untuk gen *WRN* yang termetilasi dan *cell line* MCF 7 memberikan hasil positif untuk gen *WRN* yang tidak termetilasi (kami pun mendapatkan hasil yang sama). Kontrol *cell line* yang dipergunakan juga harus diperlakukan sodium bisulfit.

#### 4.3.6. PCR dengan Primer Metilasi

Berfungsi untuk mengenali gen *WRN* yang termetilasi.

Amplikon yang terjadi sebesar 165 bp.

#### Hasil PCR untuk Kontrol yang termetilasi



Gambar 4.6. Hasil PCR untuk Kontrol yang termetilasi dengan primer yang termetilasi, sebesar = 165 bp.

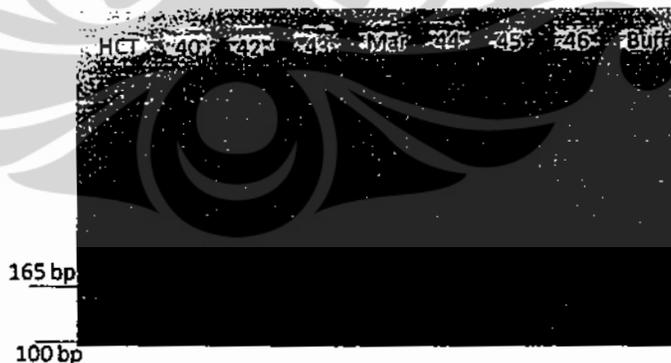
Mar = marker,

Buff = buffer (NTC = *no template control*).

HCT dan M (+), hasil positif = kontrol positif

BT, MCF, M (-), hasil negatif = kontrol negatif

#### Hasil PCR untuk Kontrol dan Sampel yang Termetilasi



Gambar 4.7. Hasil PCR untuk Kontrol dan sampel yang termetilasi dengan primer yang termetilasi sebesar 165 bp.

HCT kontrol positif, Mar = marker,

Buff = buffer = NTC (*no template control*).

No. 40, 42, 43, 44, 45, 46 = sampel penelitian

#### 4.3.7. PCR dengan Primer Tidak Termetilasi.

Berfungsi untuk mengenali gen *WRN* yang tidak termetilasi, ampikon yang dihasilkan sebesar 165 bp.

### Hasil PCR untuk Kontrol yang Tidak Termetilasi



Gambar 4.8. Hasil PCR untuk Kontrol yang tidak termetilasi, dengan primer yang tidak termetilasi, sebesar 165 bp. Mar = marker, Buff = NTC (*no template control*) HCT dan M (+) sebagai kontrol negatif BT, MCF dan M (-) sebagai kontrol positif

### Hasil PCR untuk Kontrol dan Sampel yang Tidak Termetilasi



Gambar 4.9. Hasil PCR untuk Kontrol dan Sampel yang tidak termetilasi, dengan primer yang tidak termetilasi sebesar 165 bp. BT dan MCF = kontrol positif. No. 1,2,3,4,10,11,13,14,16,17,19,20,22,23 24 25 = sampel penelitian. Buff = NTC. Mar = marker.

**Hasil:** didapat 9 sampel yang termetilasi (15%) dari 60 sampel yang dipakai untuk penelitian. Dari 9 sampel yang termetilasi, umur sampel penelitian yang termetilasi adalah 6 sampel penelitian yang umurnya dibawah dan sama dengan 40 tahun (28,57%) dan 2 sampel yang umurnya diatas 40 tahun (5,13%).

#### 4.4. Ekspresi mRNA WRN dengan *Reverse Transcriptase* PCR.

Sebanyak 60 sampel penelitian diisolasi RNA, untuk hasil RNA yang didapat, semua diukur serapan cahayanya dengan sinar UV dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm kemudian dilakukan juga elektroforesis DNA pada gel agarose 2,5% sebanyak 20  $\mu$ l tapi hanya untuk beberapa sampel.

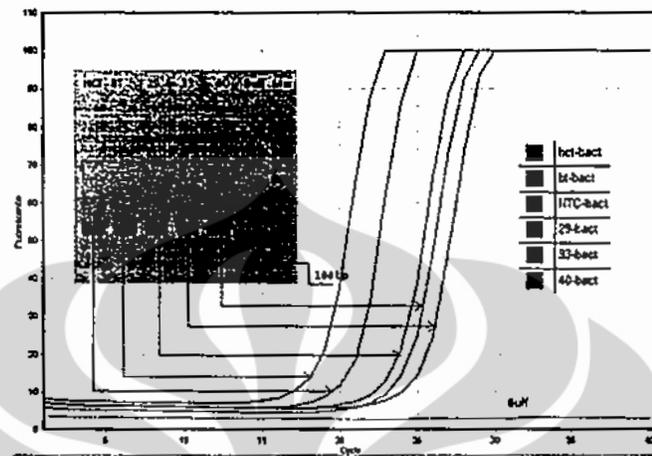
### Elektroforesis RNA



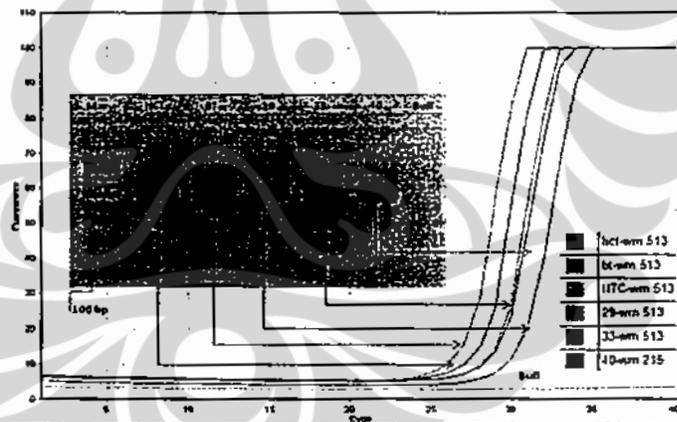
Gambar 4.10. Hasil Isolasi RNA di elektroforesis pada gel Agarose 2.5%  
 Mar = marker.  
 100 bp dan 200 bp adalah ukuran jenjang DNA.  
 No. 13, 14, 16,18, 26,28,31,51 = sampel penelitian

Semua sampel yang berjumlah 60 buah sampel, hasil isolasi RNA dibuat dulu menjadi cDNA. Semua sampel dilakukan pemeriksaan dengan Real-Time PCR untuk menghasilkan ekspresi dan dipakai Primer  $\beta$ -actin sebagai kontrol. Fungsi dari pemeriksaan dengan primer  $\beta$ -actin sebagai kontrol untuk melihat jumlah cDNA.<sup>94</sup> Untuk sampel yang Primer  $\beta$ -actin nya memberikan hasil yang negatif yaitu nilai  $E < 1,6$  berarti sampel tidak dapat dipakai.

## B-actin

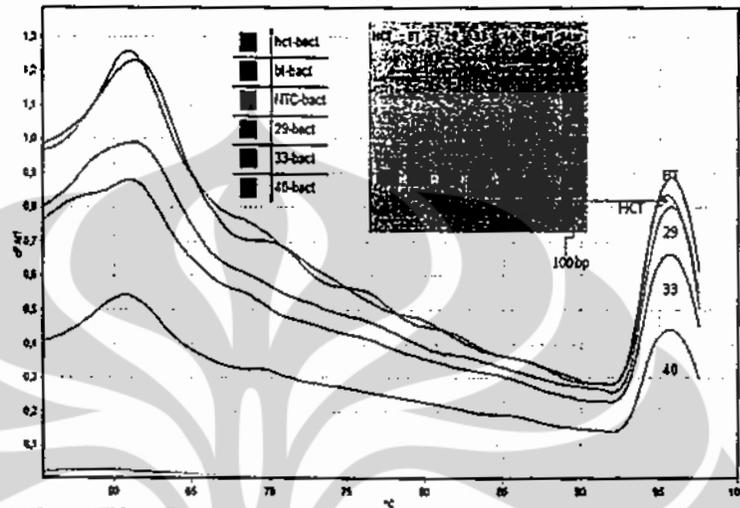


## WRN

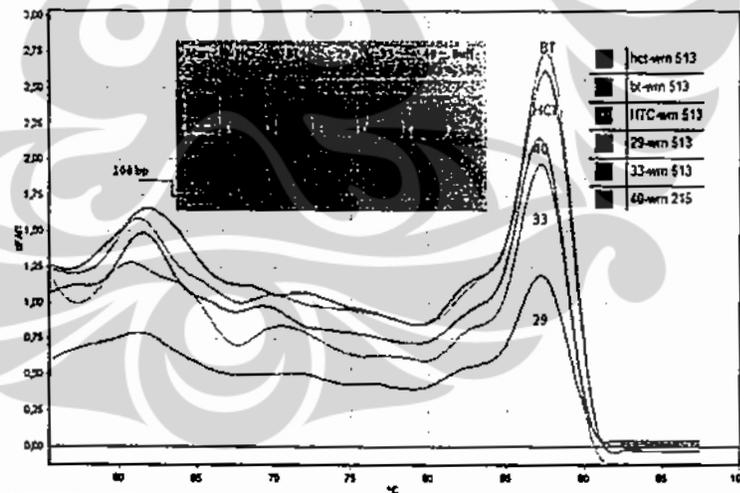


Gambar 4.11. Nilai C (t) gen *B-actin* dan gen *WRN*  
 HCT 116 dan BT 549 = kontrol positif  
 Buff = NTC = *no template control*  
 Mar = marker  
 No. 29, 33,40 = sampel penelitian.

## B-actin



## WRN



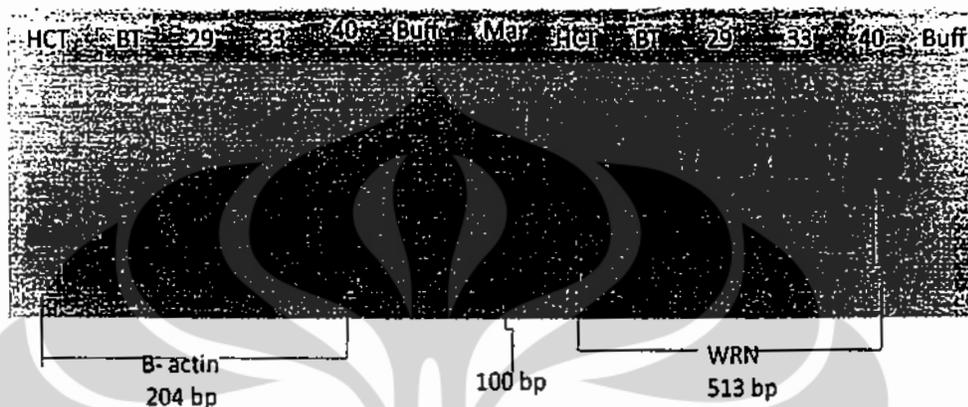
Gambar 4. 12. *Melting Curve* gen *B-actin* dan gen *WRN*

HCT 116 dan BT 549 = kontrol positif.

Mar = marker, Buff = NTC (*no template control*)

No. 29,33,40 = sampel penelitian.

## Ekspresi B-actin dan WRN

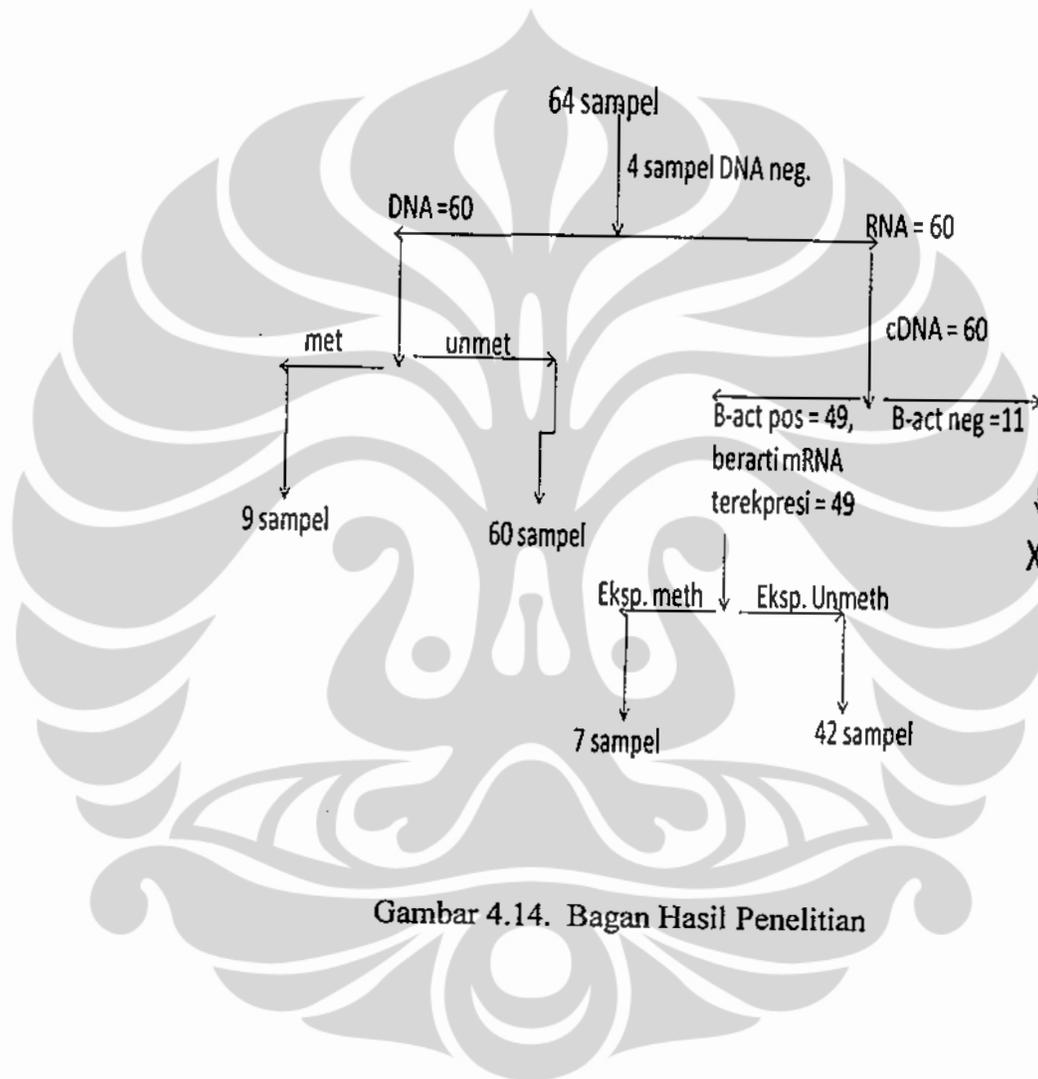


Gambar 4.13. Ekspresi gen *B-actin* dan gen *WRN* dengan elektroforesis pada agarose 2,5% secara PCR konvensional. DNA gen *B-actin* sebesar 204 bp, DNA gen *WRN* sebesar 513 bp. No. 29, 33, 40 = sampel penelitian HCT dan BT sebagai kontrol positif Mar = marker, Buff. = buffer = NTC 100 bp sebagai ukuran jenjang DNA

Dari 60 sampel yang diperiksa dan memberikan hasil ekspresi  $\beta$ -actin yang positif, berarti ekspresi RNA dapat dinilai sebanyak 49 buah sampel (81,67%) dan ada 11 buah sampel penelitian yang memberikan hasil ekspresi  $\beta$ -actin negatif (18,33%) berarti ekspresi mRNA tidak dapat dinilai.

Hasil terakhir yang didapat setelah dihubungkan antara hasil metilasi DNA dengan hasil ekspresi mRNA adalah sebagai berikut: 7 sampel penelitian yang termetilasi dengan hasil ekspresi  $\beta$ -actin yang positif berarti ekspresi mRNA dapat dinilai, sedangkan 2 sampel penelitian yang termetilasi tetapi hasil  $\beta$ -actin negatif berarti ekspresi mRNA tidak dapat dinilai. Untuk sampel penelitian yang tidak termetilasi sebanyak 60 buah sampel hanya 42 buah sampel yang memberikan hasil ekspresi  $\beta$ -actin yang positif berarti ekspresi mRNA dapat dinilai hasil ekspresinya.

## BAGAN HASIL PENELITIAN



Gambar 4.14. Bagan Hasil Penelitian

Tabel 4.2. Ekspresi untuk gen *WRN* yang termetilasi

Nomor Sampel	Ekspresi Rata-rata Ratio <i>WRN</i> / B-actin
18	0,21
31	1,25
38	0,00
40	0,00
43	4,62
45	0,00
58	0,21

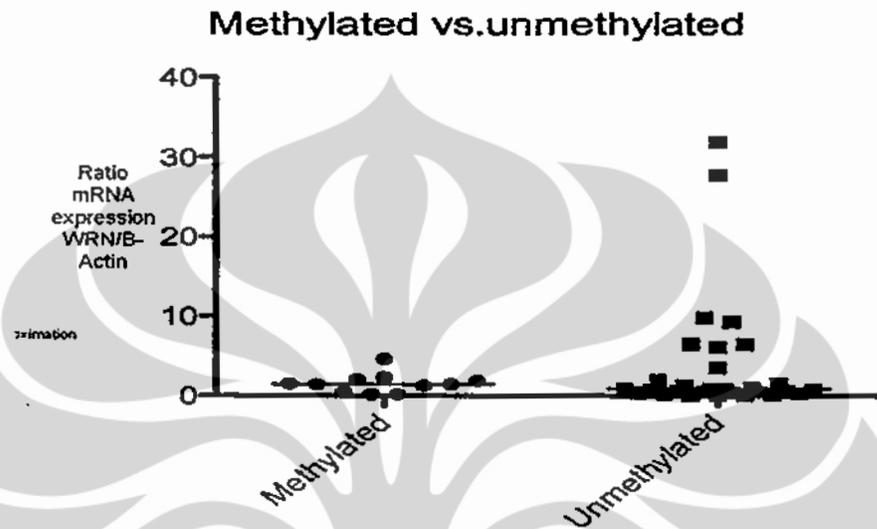
Tabel 4.3. Ekspresi untuk gen *WRN* yang tidak termetilasi

Nomor Sampel	Ekspresi Rata-rata Ratio <i>WRN</i> / B-actin TIDAK METILASI	Nomor Sampel	Ekspresi Rata-rata Ratio <i>WRN</i> / B-actin TIDAK METILASI
2	0,63	33	26,59
3	0,16	35	0,00
4	1,5	36	0,00
10	1,99	41	1,27
13	0,49	42	0,65
14	1,01	44	4,32
16	9,34	46	0,84
17	3,51	48	0,00
19	9,81	49	0,73
20	0,88	50	2,31
21	0,00	51	0,53
22	1,55	52	1,44
23	0,00	54	2,05
24	27,75	59	6,49
25	1,38	61	0,00
26	1,88	62	0,00
27	0,21	63	0,00
28	6,1	64	0,02
29	0,37	65	0,00
30	0,41	66	0,87
32	0,74	67	0,32

Perbandingan ekspresi mRNA WRN per  $\beta$ -actin:

Uji Mann Whitney U

P = 0.61



Gambar 4.15. Hubungan Metilasi dengan Ekspresi

Dari hasil analisis data dengan menggunakan uji Mann Whitney U pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekspresi gen *WRN* yang terjadi jika dihubungkan dengan peristiwa metilasi DNA gen *WRN* dan peristiwa tidak termetilasi DNA gen *WRN* : menurut hipotesa, sampel yang menunjukkan adanya metilasi DNA gen *WRN* diperkirakan mengalami pembungkaman atau penurunan ekspresi mRNA gen *WRN*, karena proses metilasi pada promotor menghambat proses transkripsi. Namun gambar 4.15 justru menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang berarti pada tingkat ekspresi gen *WRN* pada kelompok sampel yang tidak termetilasi maupun pada kelompok sampel yang termetilasi. Hal ini menimbulkan asumsi bahwa kemungkinan terjadinya peristiwa epigenetik tidak hanya disebabkan oleh peristiwa metilasi tetapi juga disebabkan oleh peristiwa modifikasi histon. Penemuan ini juga pernah ditemukan sebelumnya pada gen *TWIST 1*, dimana metilasi pada gen *TWIST 1* tidak diikuti oleh penurunan ataupun pembungkaman ekspresi mRNA nya.

Tabel 4.4. Hubungan data Klinik dengan gen *WRN* yang termetilasi dan gen *WRN* yang tidak termetilasi

Data Klinik	Ket.	WRN met.	WRN unmet.	P value	OR	95% CI
usia	$\leq 40$	6 (28.57%)	15 (71.43%)	0.02	7.40	1.34 – 40.88
	$> 40$	2 (5.13%)	37 (94.87%)			
ER	Positif	2 (18.18%)	9 (81.82%)	0.22		
	Negatif	2 (5.41%)	35 (94.59%)			
PR	Positif	0 (0%)	12 (100%)	0.56		
	Negatif	4 (11.11%)	32 (88.89%)			
Her2	Positif	1 (4.17%)	23 (95.83%)	0.61		
	Negatif	3 (12.50%)	21 (87.50%)			
p53	Positif	1 (5.56%)	17 (94.44%)	1.00		
	Negatif	3 (10.34%)	26 (89.66%)			
Triple Neg.	Positif	2 (13.33%)	13 (86.67%)	0.30		
	Negatif	2 (5%)	38 (95%)			
TNM	T 1 - 2	3 (11.11%)	24 (88.89%)	1.00		
	T 3 & 4	1 (12.50%)	10 (87.50%)			
	N 0	1 (4.76%)	20 (95.24%)	0.59		
	N 1 & 2	2 (11.11%)	16 (88.89%)			
	M 0	2 (8%)	23 (92%)	1.00		
	M 1	0 (0%)	1 (100%)			

Dari hasil uji Fisher yang dilakukan :

- Untuk hubungan antara kelompok usia dengan kelompok gen *WRN* yang termetilasi dan gen *WRN* yang tidak termetilasi memberikan hasil yang signifikan dengan  $P = 0.02$ ,  $OR = 7.40$  dan  $95\% CI = 1.34 - 40.88$  berarti ada hubungan diantara kedua kelompok tersebut yang dapat diterima sedangkan
- Untuk hubungan kelompok hasil pemeriksaan IHC dan kelompok TNM dengan gen *WRN* yang termetilasi dan gen *WRN* yang tidak termetilasi tidak memberikan hasil yang signifikan (tidak ada hubungan).

## BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

1. Gen *WRN* yang termetilasi pada pasien kanker payudara di Rumah Sakit Kanker Dharmais sebesar 15%.
2. Tidak ada hubungan antara gen *WRN* yang termetilasi dan gen *WRN* yang tidak termetilasi dengan ekspresi mRNA nya masing-masing.
3. Terjadinya peristiwa metilasi DNA promoter gen *WRN* pada kanker payudara berkaitan dengan usia yang muda.

### 5.2. Saran

1. Diharapkan penelitian ini dilanjutkan dengan memperbanyak jumlah sampel penelitian berumur dibawah dan atau sama dengan usia 40 tahun guna mengkonfirmasi asosiasi antara metilasi dengan usia muda.
2. Diharapkan dilakukan pemeriksaan ekspresi mRNA gen *WRN* pada sampel penelitian non keganasan (contoh pada sampel pasien FAM) untuk mempelajari pola ekspresi gen *WRN*.
3. Sebaiknya juga dilakukan pemeriksaan asetilasi untuk lebih memperjelas tipe sel yang mengekspresikan gen *WRN* pada jaringan payudara sehingga dapat lebih mengetahui hubungan antara peristiwa metilasi yang terjadi dengan ekspresinya.
4. Dilakukan penelitian perbandingan tingkat kesembuhan dan / atau kesintasan hidup antara pasien kanker payudara akibat metilasi DNA gen *WRN* dengan pasien kanker payudara akibat yang tidak termetilasi gen *WRN* setelah kedua kelompok diberi perlakuan obat kemoterapi yang sama. Hal ini dilakukan karena laporan sebelumnya menunjukkan adanya perbedaan hasil pengobatan kemoterapi pada kelompok pasien kanker kolorektal yang mengalami metilasi gen *WRN* dengan kelompok yang tidak mengalami metilasi.

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. WHO, Preventing Cancer. World Health Statistics, USA: 2001;
2. Bray Freddie, McCarron Peter, Parkin D Maxwell, The changing global of female breast cancer incidence and mortality. Breast cancer research, 2004;
3. Bertucci Francois, Birnbaum Daniel, Goncalves Anthony, Proteomics of Breast Cancer. Molecular and Cellular Proteomics, USA: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. 2006; 5: p.1772 – 86.
4. Alberta Cancer Board, Breast Cancer. Alberta Cancer Board and Foundation, USA: 2006;
5. Brandeberry Mary, Cancer to Be Number One Killer by 2010. Health & Wellness, USA: 2009;
6. Stephan Pam, Why Man are at Risk for Breast Cancer. USA: 2010;
7. Tjindarbumi Didid, Mangunkusumo Rukmini, Cancer in Indonesia, Present and Future. Foundation for Promotion of Cancer Research, Japan: Japanese J clin Oncol 2002; 32: p. 17 - 21.
8. Bidang Rekam Medik Rumah Sakit Kanker Dharmais, Data Rekam Medik per Tahun. Jakarta: Rumah Sakit Kanker Dharmais, 2009;
9. Esteller Manel, Epigenetic Gene Silencing in Cancer: the DNA hypermethylome. Madrid, Spain: Oxford University Press, Hum Mol Gen, 2007; 16 (1): p. 50 – 59.
10. Jones Peter A, Baylin Stephen B, The Fundamental role of epigenetic events in cancer. Nature Review, USA: 2002; 3: p. 415 – 28.
11. Paluszczak Jaroslaw, Baer-Dubowska Wanda, Epigenetics Diagnostics of Cancer – the Application of DNA methylation marker. Department of Pharmaceutical Biochemistry, Poland: Review Article 2006; p. 365-375.
12. Herman James G, Baylin Stephen B, Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. Review Article, USA: Massachusetts Medical Society, 2004; 350 (9): p. 947 – 8.
13. Osborne Cynthia, Wilson Paschal, Tripathy Debu, Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. USA: The Oncologists 2004; 9 (4): p. 361 – 77.
14. Simpkins Sally B, Bocker Tina, Gersell Deborah J, Palazzo Juan P, Swisher EM, Fishel R, *MLH1* promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancer. Life

Sciences and Medicine, Oxford Journals, Oxford University Press, Human Molecular Genetics 1999; 8 (4): p. 661 – 6.

15. Russo A, Bazan V, Agnese V, Rodolico V, Gebbia N, Prognostic and Predictive Factors in Colorectal Cancer: K-Ras in CRC (RASCAL) and TP53 CRC Collaborative Studies. Department of Oncology, Italy: Ann. Oncol 2005; 16 Suppl 4: iv 44 – 49.
16. Valero Colomer, Anna, Cancer Colorectal Gen Suppressor TP53: Studi Comparation and Metodology. USA: Department of Biology Molecular, 2002;
17. Oesterreich S, Fuqua S A W, Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer. USA: Endocrine- Related Cancer 1999; 6: p. 405 – 19.
18. Takagi M., Shimamoto A., Sugimoto M., Furuichi Y. Increased Chemotherapeutic Activity of Camptothecin in Cancer Cells by siRNA-Induced Silencing of WRN Helicase (Molecular and Cell Biology) USA: Biological & Pharmaceutical bulletin, 2007; 30: p. 1958 – 61,
19. Oshima, The Werner Syndrome protein: an update. USA: John Wiley and son, Inc. Bioessays 2000; (10): p. 894-901.
20. Alberts Bruce, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Johnson Alexander, Walter Peter, Molecular Biology of The Cell: DNA Repair. Fourth Edition, USA: Garland Publishing, Inc. 2002;
21. Pirzio Livia Maria, Pichierri Pietro, Bignami Margherita, Franchitto Annapaola, Werner Syndrome Helicase Activity is Essential in Maintaining Fragile Site Stability. Italy: The Rockefeller University Press, The Journal Of Cell Biology, 2008; 180 (2): p. 305 – 314.
22. Nakayama Hiroaki, RecQ Family Helicases: Roles as Tumor Suppressor Proteins. Japan: Kyushu University, 2002; 21 (58): p. 9008 – 21.
23. Shen Jiang- Cheng, Loeb Lawrence A, The Werner Syndrome Gene the moleculer basis of RecQ helicase-deficiency diseases. USA: Trends Genet 2000; 16 (5): p. 213 – 20.
24. Futami Kazunobu, Ishikawa Yuichi, Goto Makoto, Furuichi Yasuhiro, Sugimoto Masanobu, Role of Werner Syndrome Gene Product Helicase in Carcinogenesis and in Resistance to Genotoxins by Cancer Cells. Japan: Cancer Science, 2008; 99 (5): p. 843 – 8.
25. Agrelo Ruben, Setien Fernando, Cheng Wen-Hsing, Ropero Santiago, Espada Jesus, Esteller Manel et al, Epigenetic inactivation of the premature aging Werner Syndrome gene in human cancer. USA: The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Jahns Hopkins, Baltimore, MD. 2006; 103 (23): p. 8822 – 27.

26. Kashino Genro, Kodama Seiji, Suzuki Keiji, Oshimura Mitsuo, Watanabe Masami, Preferential Expression of an Intact *WRN* Gene in Werner Syndrome Cell Lines in Which a Normal Chromosome 8 Has Been Introduced. Japan: Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001; 289 (1): p. 111 – 5.
27. Goate Alison M, Tumor Suppressor Gene in early Breast Cancer and its Progression. USA: Biological Sciences, Genetic Engineering and Molecular Biology, 2000;
28. Ding Shian-Ling, Yu Jyh-Cherng, Chen Shou-Tung, Hsu Giu-Cheng, Shen Chen-Yang, Genetic Variation in The Premature Aging Gene *WRN*: A Case-Control Study on Breast Cancer Susceptibility. American association for Cancer Research, USA: Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2007; 16: p. 263 - 9.
29. Bhatti Parveen, Struewing, Jeffery P, Alexander, Bruve H, Hauptmann, Michael, et al. Polymorphisms in DNA repair genes, ionizing radiation exposure and risk of breast cancer in U.S. radiologic technologists. New York: Wiley InterScience, International Journal of Cancer 2008; 123 (11): p. 2713 – 16.
30. Wirtenberger Michael, Frank Bernd, Hemminki Kari, Klaes Rudiger, Schmutzler Rita K, Kiechle Marion, et al. Interaction of Werner and Bloom syndrome genes with p53 in familial breast cancer. Molecular Epidemiology and Cancer Prevention, Jerman: Carcinogenesis, 2006; 27 (8): p. 1655 – 60.
31. Y Nakamura, M Kasumi, M Emi, S Matsumoto, Genetic alterations and DNA based diagnosis in breast cancer. Japan: Nippon Geka Gakkai Zasshi, 1996; 97 (5): p. 375-80.
32. Stanbridge Eric J., Human Tumor Suppressor Genes. USA: Annual Review Genetic 1990. 24 (6): p. 15 - 57.
33. Sutandyo, Noorwati, Pola Alur Pensinyalan Kanker Payudara Usia Muda Non-Familial : Tinjauan pada alur hormonal (Estrogen) dan Non-hormonal (IGF-IR, HER-2). Jakarta: Universitas Indonesia, 2006;
34. WHO, Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020. Geneva: 2003;
35. WHO, About Cancer. International Union Against Cancer, USA: WHO InfoBase Source Metadata, 2009.;
36. WHO, Are the number of Cancer cases increasing or decreasing in the world. USA: WHO InfoBase Source Metadata, 2009;
37. WHO, The Impact of Cancer In Your Country – Graphs. USA: WHO global InfoBase Report, 2005;

38. Utomo Ahmad R, Diagnostik Molekuler pada Kanker Payudara. Jakarta: Stem Cell and Cancer Institute Jakarta, 2008;
39. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P, Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Oxford Journals Medicine, Annals of Oncology, European Society for Medical Oncology*, 2007; 18 (3): p. 581 – 92.
40. Jemal Ahmedin, Siegel Rebecca, Ward Elizabeth, Hao Yongping, Xu Jiaquan, Thun Michael J, *Cancer Statistics 2009. USA: American Cancer Society, A Cancer Journal for Clinicians 2009*; 59: p. 225 – 49.
41. Singletary, S. Eva, *Rating the Risk Factors for Breast Cancer. Surgery USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2003*; 237 (4): p. 474 - 82.
42. Haryono Samuel JH, Suardi Drajad R, *Payudara. Jakarta: 2008; Bab 27.*
43. Devilee Peter, Tavassoli Fattaneh A, *World Health Organization : Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Pathology and Genetics, USA: International Agency for Research on Cancer (IARC) Press, 2003*;
44. Alberts Bruce, Bray Dennis, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Watson James D., *Molecular Biology of The Cell., Third Edition, New York: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2007*;
45. Allred Craig D, Bookstein Robert, *Recessive Oncogenes. New York: Wiley InterScience, Cancer, 1993*; 71 (3): p. 1179-86.
46. Popescu NC, Zimonjic DB, *Chromosome and Gene Alterations in Breast Cancer as Markers for Diagnosis and Prognosis as well as Pathogenetic Targets for Therapy. USA: American Journal Medical Genetic 2002*; 115 (3): p. 142 – 9.
47. Madhani Hiten, *Genes that Prevent and Cause Cancer: Tumor Suppressor Genes and Oncogenes. 2008*;
48. Vaissiere Thomas, Sawan Carla, Herceg Zdenko, *Epigenetic interplay between Histone modifications and DNA methylation in gene silencing. International Agency for Research on Cancer (IARC), Elsevier B.V, France: Mutat Res. 2008*; 659 (1-2): p. 40 – 8.
49. Weinberg Robert A., *The Biology of Cancer. Garland Science, New York USA: Taylor and Francis Group, LLC, 2007*;
50. Esteller Manel, *Epigenetics in Cancer. The New England Journal of Medicine, Spanish: Review Article, 2008*; 358 (11): p. 1148 – 59.
51. Paszkowski Jerzy, Whitham Steven A., *Gene Silencing and DNA Methylation Processes. Plant in Biology Review, USA: Elsevier Science Ltd. 2001*; 4 (2): p. 123-29.

52. Kondo Yutaka, Epigenetic Cross-Talk between DNA methylation and Histone modifications in Human Cancers. PubMed Central, Japan: Yonsei Medical Journal. 2009; 50 (4): p. 455-463.
53. Meng CF, Zhu XJ, Peng G, Dai DQ, Re-expression of methylation-induced tumor suppressor gene silencing is associated with state of histone modification in gastric cancer cell line. Cina: World Journal Gastroentrol, 2007; 13 (46); p. 6166 – 71.
54. Novak Kris, Epigenetics Changes in Cancer Cells. Highlights of The American Association for Cancer Research, PubMed Journal Centre, Hawaii: Medscape General Medicine, 2004; 6 (4): p.7.
55. PL Opresko, JP Calvo, C von Kobbe, Role for the Werner Syndrome Protein in the Promotion of tumor cell growth. USA: Mech Ageing Dev. 2007; 128 (7-8): p. 423-36.
56. Feinberg Andrew P, The Epigenetics of Cancer Etiology. USA: Seminar Cancer Biology 2004; 14 (6): p. 427 – 32.
57. Baylin SB, Esteller Manel, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG, Aberant patterns of DNA methylation, chromation formation and gene expression in cancer. USA: Human Molecular Gene 2001; 10 (7): p. 687-92.
58. Verma M, Maruvada P, Srivastava S, Epigenetics and Cancer. USA: Crit Rev Clin Lab Sci. 2004; 41 (5-6): p. 585 – 607.
59. Verma M, Seminara D, Arena FJ, John C, Iwamoto K, Hartmuller V, Genetic and Epigenetic Biomarkers in Cancer: Improving Diagnosis, Risk Assessment and Disease Stratification. USA: Mol Diagn Ada, 2006; 10 (1): p. 1 – 15.
60. Turker Mitchell S, Autosomal Mutation in Somatic Cells of the mouse. UK: Oxford University Press, Mutagenesis 2003; 18 (1): p.1-6.
61. Harris Henry, The Analysis of Malignancy by Cell Fusion: The Position in 1988. United Kingdom: Cancer Research 1988; 48: p. 3302 – 6.
62. Wolman Sandra R, Heppner Gloria H, Genetic Heterogeneity in breast Cancer. U.S. National Cancer Institute, USA: Journal of The National Cancer Institute 1992; 84 (7): p. 469 – 70.
63. Bieche AKU, Lidereau R, Genetic Alterations in Breast Cancer. Perancis: Genes Chromosomes Cancer 1995; 14 (4): p. 227 – 51.
64. Tannock Ian F, Hill Richard P, Bristow Robert G, Harrington Lea, The Basic Science of Oncology. Fourth Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc. New York: 2005; p. 134.

65. Ostrowski R, McNally L, Premature Aging. World Wide Web, 2001;
66. Multani AS, Chang S, WRN in Telomere: Implication for Aging and Cancer. USA: Journal Cell Science, 2007; 120 (5): p. 713 – 21.
67. Ichikawa Koji, Shimamoto Akira, Imamura Osamu, Tokutake Yoshiki, Yamabe Yukako, Kitao Saori, et al., Physical Map of The Human Chromosome 8p12-21 Encompassing Tumor Suppressor and Werner's Syndrome Gene Loci. Japan: DNA Research 1998; 5: p. 105 – 15.
68. Crabbe Laure, Verdun Ramiro E, Haggblom Candy I, Karlseder Jan, Defective telomere Lagging Strand Synthesis in cells Lacking WRN Helicase Activity. Science of Aging Knowledge Enviroment, 2004; 506 (5703): p. 1951 – 3.
69. Anisimov Vladimir N, The Relationship between Aging and Carcinogenesis: a critical appraisal. Rusia: Crit Rev Oncologi Hematologi 2003; 45 (3): p. 277-304,
70. Opresko Patricia L, Cheng Wen-Hsing, Kobbe Cayetano von, Harrigan Jeanine A., Bohr Vilhelm A, Werner Syndrome and the Function of the Werner Protein; what they can teach us about the molecular aging process. Oxford University Press, USA: Carcinogenesis 2003; 24 (5): p. 791-802.
71. DePinho Ronald A, The Age of Cancer. Macmillan Magazines Ltd. Boston: Nature 2000; 408 (6809): p. 248 – 54.
72. Pegoraro Gianluca, Misteli Tom, The Central Role of Chromatin Maintenance in Aging. USA: Aging, 2009; 1 (12): p. 1017 – 22.
73. Bohr Vilhelm A, Brosh Robert M, Human Premature Aging, DNA Repair and RecQ Helicases. USA: Nucleid Acids Research Advance Access, 2007;
74. Davis Terence, Haughton Michele F, Jones Christopher J, Kipling David, Prevention of Accelerated Cell Aging in The Werner Syndrome. UK: Ann N Y Acad Sci 2006; 1067: p. 243 – 47.
75. Carol C, The *WRN* Gene. Registry International of Werner Syndrome, USA: 2005;
76. Arnes Jane E, Hammet Fleur, De Silva Melanie, Ciciulla John, et al. Candidate tumor-suppressor genes on chromosome arm 8p in early-onset and high-grade breast cancer. Australia: Oncogene 2004; 23 (5): p. 5697 - 702.
77. Pole JCM, Garcia MJ, Blood KA, Cooke SL, Cahen C, Alsop AE, et al., High-resolution analysis of chromosome rearrangements on 8p in breast, colon and pancreatic cancer reveals a complex pattern of loss, gain and translocation. Nature Publishing Group, UK: Oncogene 2006; 25 (5): p. 5693-706.

78. Anbazhagan R, Fujii H, Gabrielson E, Allelic loss of chromosome arm 8p in breast cancer progression. USA: *Am J Pathol.* 1998; 52 (3): p. 815-19.
79. Yaremko ML, Recant WM, Westbrook CA, Loss of Heterozygosity from the short arm of chromosome 8 in an early event in breast cancers. USA: *Genes Chromosome Cancer*, 1995; 13 (3): p. 186 – 91.
80. J Worm, P Guldberg, DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anti cancer therapi. Denmark: *Journal Oral Pathol Medical*, 2002; 31 (8): p. 443-8.
81. Hegi Monika E, Sciuscio Davide, Murat Anastasia, Levivier Marc, Stupp Roger, Epigenetic Deregulation of DNA Repair and Its Potential for Therapy. USA: *Clin Cancer Res* 2009; 15 (16): p. 5026 – 31.
82. Ramirez C.L., Cadinanos J., Varela I., Freije J.M.P., Lopez-Otin, C., Human progeroid syndromes, aging and cancer : new genetic and epigenetic insights into old questions. Spanyol: *Celluler Moleculer Life Sciences* 2007; 64 (2): p. 155 -170.
83. Muftuoglu Meltem, Oshima Junko, Cheng Wen-Hsing, Leistriz Dru F, Von Kobbe C., Bohr VA, The Clinical Characteristic of Werner Syndrome : Molecular and Biochemical Diagnosis. USA: *Human Genetic*, 2008; 124 (4): p. 369 – 377.
84. Bohr Vilhelm A, Brosh Robert M Jr., Kobbe Cayetano von, Opresko Patricia, Karmakar Parimal, Pathway Defective in The Human Premature Aging Disease Werner Syndrome. USA: *Kluwer Academic Publishers, Biogerontology* 2002; 3 (1-2) : 89 – 94.
85. Blander Gil, Zalle Noa, Leal Fernando Martinez, Bar-Or Ruth Lev, Yu Chang-En, Oren Moshe, The Werner syndrome protein contributes to induction of p53 by DNA damage. USA: *The FASEB Journal express article* 2000; 14: 2138 – 40.
86. Lebel M, Werner Syndrome : genetic and moleculer basis of a prematur aging disorder. Canada: *Cell Mol Life Sci*, 2001; 58 (7): p. 857 – 67.
87. Shen Jiang-Cheng, Loeb Lawrence A, Unwinding the moleculer basis of the Werner syndrome. Elsevier, USA: *Mechanisms of Ageing and Development*, 2001; 122 (9): 921-944.
88. JJ Perry, SM Yannone, Alcatel Holden, C Hitomi, S Han, PK Cooper, et al. WRN exonuclease structure and molecular mechanism imply an editing role in DNA end processing. *Medical Research News*, USA: *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13 (5): p. 414 – 22.
89. Abdelhaleem M, RNA Helicases: Regulators of Differentiation. Kanada: *Clin Biochem.* 2005; 38 (6): 499 – 503.

90. Blander Gil, Kipnis J, Leal JF, Yu CE, Schellenberg GD, Oren M, Physical and Functional Interaction between p53 and Werner's Syndrome protein. Israel: J Biol Chem. 1999; 274 (41): 29463 – 9.
91. Machwe A, Mei A, Gray MD, Oshima J, Martin GM, Nehlin JO, et al., The Werner Syndrome Protein is involved in RNA polymerase II transcriptional. USA: Mol Cell Biol 1999; 10 (8): 2655 – 68.
92. BioRad Laboratories, Real-Time PCR (Application guide).
93. AB applied Biosystem, Real-Time PCR vs Traditional PCR. 2009.
94. Goebel Stephan U., Iwamoko Michiko, Raffeld Mark, Gibril Fathia, Hou Wei, Serrano Jose, Jensen Robert T, Her-2/ neu Expression and Gene Amplification in Gastrimonas : Correlations with Tumor Biology, Growth, and Aggressiveness. Maryland: Cancer Research, 2002; 62: p. 3702 – 10.
95. Righini Christian Adrien, de Fraipont Florence, Timsit Jean-Francois, Faure Claire, Brambilla Elisabeth, Reyt Emile, Favrot Marie-Christine, Tumor-Specific Methylation in Saliva: A Promising Biomarker for Early Detection of Head and Neck Cancer Recurrence. USA: Clinical Cancer Research 2007; 13 (4): p. 1179 – 85.
96. Shivapurkar Narayan, Stastny Victor, Takahashi Takao, Suzuki Makoto, Echebiri Chinyere, Reddy Jyotsna et.al., Novel real-time PCR assay using a universal molecular marker for diagnosis of hematologic cancers. USA: International Journal of Cancer, 2005; 116 (4): p. 656 – 60.
97. Iannello Rocco C, Gould Jodee A, Young Julia C, Giudice Antonietta, Medcalf Robert, Kola Ismail, Methylation-dependent Silencing of the Testis-specific *Pdha-2* Basal Promoter Occurs through Selective Targeting of an Activating Transcription Factor/ cAMP-responsive Element-binding Site. Australia: The Journal of Biological Chemistry The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., 2000; 275 (26): p. 19603 – 08.
98. Zhou Bei, Ikejima Takashi, Watanabe Takeshi, Iwakoshi Keiko, Idei Yohei, Tanuma Sei-ichi, et.al., The effect of 2- deoxy-D-glucoxe on Werner Syndrome RecQ helicase gene. Japan: FEBS, Elsevier., 2009; p. 1331 – 36.

## Daftar Primer yang digunakan

	Nama Primer	Sense	Antisense
1.	Primer Interferon Gamma	5'- TCT TTT CTT TCC CGA TAG GT- 3'	5'- CAG GGA TGC TCT TCG ACC TC- 3'
2.	Primer Myod-1 (Myogenic Differentiation 1)	5'- TGA TTA ATT TAG ATT GGG TTT AGA GAA GGA- 3'	5'-CCA ACT CCA AAT CCC CTC TCT AT- 3'.
3.	Primer Metilasi	5'- CGG GTA GGG GTA TCG TTC GC - 3'	5'- AAC GAA ATC CAC CGC CCG CC - 3',
4.	Primer Tidak Termetilasi	5'- GTA GTT GGG TAG GGG TAT TGT TTG T - 3'	5 - AAA CAA AAT CCA CCA CCC ACC CC - 3'
5.	Primer $\beta$ -actin	5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC- 3'	5'- GGA ATC CTT CTG ACC CAT GC- 3'
6.	Primer WRN ekspresi	5'- GGA TCA GCA CAG TCA GAA AAT GTT CT - 3'	5'- GGA TAG ATT CAG TTT CCT AAG TTC ACC- 3'



**RUMAH SAKIT KANKER  
"DHARMAIS"  
(PUSAT KANKER NASIONAL)**

No. : 19/PEP/05/2009

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK  
ETHICAL CLEARANCE**

Panitia Etik Penelitian, Rumah Sakit Kanker "Dharmais" dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protocol berjudul :

*The committee of the Medical Research Ethics of the "Dharmais" Cancer Hospital, with regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*

**Hubungan Metilasi dan Ekspresi gen WRN pada Pasien Kanker Payudara di Rumah Sakit Kanker "Dharmais"**

Nama Peneliti Utama : Dra. Rini Agustien Tandjung  
*Name of the Principal Investigator :*

Nama Institusi : Rumah Sakit Kanker "Dharmais"  
*Name of Institution*

Dan telah menyetujui proposal tersebut di atas.  
*And approved the above mentioned proposal*

Semua prosedur persetujuan ini dilakukan sesuai dengan standar prosedur ICH-GCP  
*All procedures of ethical approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.*

Jakarta, 11 Mei 2009



Ketua  
Chairman

Prof.Dr.dr. A. Harryanto Reksodiputro, SpPD-KHOM

## LAMPIRAN

### INFORMASI PENELITIAN

#### Hubungan Metilasi dan Ekspresi Gen *WRN*

#### Pada Pasien Kanker Payudara di Rumah Sakit Kanker Dharmais

Kanker payudara sebagai jenis kanker yang paling banyak ditemui pada wanita. Setiap tahun lebih dari 250.000 kasus baru kanker payudara terdiagnosa di Eropa dan kurang lebih 175.000 di Amerika Serikat. Belum ada data statistik yang akurat di Indonesia, namun data yang terkumpul dari rumah sakit Kanker Dharmais menunjukkan bahwa kanker payudara menduduki rangking pertama diantara kanker lainnya pada wanita. Kanker payudara penyebab utama kematian pada wanita akibat kanker. Kami, sebagai peneliti di Rumah Sakit Kanker Dharmais (RSKD) sedang melakukan penelitian "Studi Genetik Pada Kanker Payudara".

Penelitian ini bertujuan untuk menilai status genetik di jaringan tumor pasien yang secara Histopatologik telah dinyatakan sebagai jaringan karsinoma payudara. Pengetahuan genetik tentang kanker diperkirakan dapat mendukung strategi pengobatan kanker payudara untuk dapat lebih efektif di masa depan baik untuk menentukan prognosis maupun sebagai faktor prediksi.

Kami menawarkan kepada Ibu/Saudari yang sedang menjalani pengobatan kanker payudara dengan operasi untuk berminat ikut serta dalam penelitian ini. Responden tidak diminta bayaran dan tidak akan mendapat ganti rugi karena juga tidak akan ada efek samping atau resiko. Biaya pemeriksaan laboratorium yang berkaitan dengan penelitian ini akan menjadi tanggungan pihak penyelenggara sepenuhnya.

Ibu/Saudari bebas menolak untuk ikut dalam penelitian ini, tetapi jika Ibu/Saudari bersedia ikut, maka akan dimintakan untuk menanda-tangani formulir persetujuan.

Untuk kepentingan pengumpulan data penelitian ini, kami menggunakan bahan jaringan sisa operasi Ibu/Saudari. Untuk keperluan pemeriksaan contoh bahan jaringan di atas, kami membutuhkan ijin tertulis dari Ibu/Saudari secara sukarela.

Peneliti akan merahasiakan semua data identitas Ibu/Saudari. Bila Ibu/Saudari memerlukan penjelasan lebih lanjut, Ibu/Saudari dapat menghubungi Peneliti setiap saat. Berikut nama dan alamat Peneliti yang dapat dihubungi:

**RINI AGUSTIEN TANDJUNG**

**RUMAH SAKIT KANKER DHARMAIS**

**Jl. Letjen S. Parman Kav. 84 – 86, Jakarta 11420**

**Telp. 021-5681570 ext. 2066; Fax 021-5681579**

**LAMPIRAN**

**FORMULIR PERSETUJUAN**

Saya telah membaca dan mendengarkan penjelasan mengenai Penelitian “Studi Genetik pada Kanker Payudara”. Saya sudah mengerti mengenai semua pemeriksaan dan saya bersedia ikut dalam penelitian ini.

Dengan menanda-tangani formulir ini, saya menyatakan bersedia ikut dalam penelitian ini secara sukarela. Lembar informasi telah saya terima.

Tanda Tangan Pasien:

Tanda Tangan Saksi:

(.....)  
Tgl. ....

(.....)  
Tgl. ....

Nama Lengkap : .....

Alamat : .....

.....

.....

.....

No telepon : .....

## RIWAYAT HIDUP

**Nama** : Rini Agustien Tandjung

**Tempat dan Tanggal Lahir** : Jakarta, 15 Agustus 1963.

**Alamat** : Jl. Cendana kav. 1334 Bukit Nusa Indah  
Ciputat.

**Agama** : Islam

**Pekerjaan** : Pegawai Negeri Sipil Rumah Sakit Kanker  
Dharmais

**Riwayat pekerjaan** : • Program Melati Fertilisasi In vitro  
Rumah Sakit Anak dan Bunda Harapan Kita  
• Pengawasan Obat dan Makanan  
• Instalasi Patologi Anatomi Rumah Sakit  
Kanker Dharmais.

**Sumber dana penelitian tesis** : Stem Cell and Cancer Institute

### Hubungan Metilasi dan Ekspresi gen *WRN* pada pasien kanker payudara di Rumah Sakit Kanker Dharmais

Rini Agustien Tandjung\*, Samuel J. Haryono\*, Ahmad Rusdan H. Utomo\*\*

\* Rumah Sakit Kanker Dharmais

\*\* Stem Cell and Cancer Institute

**Latar Belakang:** Akhir-akhir ini peristiwa epigenetik turut berperan menjadi penyebab keganasan. Peristiwa epigenetik meliputi metilasi DNA dan modifikasi histon. Gen penekan tumor adalah salah satu golongan gen yang merupakan target utama kerusakan DNA. Contohnya gen penekan tumor dapat tidak berfungsi karena termutasi, termetilasi dan mengalami LOH (*Loss of heterozygosity*), gen *WRN* adalah termasuk gen penekan tumor. Gen *WRN* termutasi pada penyakit Werner Syndrome, gen *WRN* yang terletak pada kromosom 8p 11.2-12 sering mengalami LOH dan pada lokus genetik ini terdapat pada pasien usia muda kanker payudara, laporan terakhir menyatakan bahwa gen *WRN* dapat mengalami metilasi, semua kejadian pada gen *WRN* tersebut dapat mengarah ke kanker.

**Tujuan:** Penelitian ini untuk mengetahui karakteristik status gen *WRN* yang termetilasi pada pasien kanker payudara di Rumah sakit Kanker Dharmais dan hubungan gen *WRN* yang termetilasi tersebut dengan ekspresi mRNA nya.

**Desain:** Analitik.

**Metode:** Jaringan segar kanker payudara di isolasi sehingga didapat DNA dan RNA. Untuk mengecek kualitas DNA yang didapat dilakukan PCR konvensional dengan primer Interferon-Gamma. Dilanjutkan perlakuan sodium bisulfit, untuk mengkonversi sitosin yang tidak termetilasi menjadi urasil sedangkan sitosin yang termetilasi tetap menjadi sitosin. Primer myod-1 untuk mengecek hasil perlakuan sodium bisulfit kemudian dilakukan teknik MSP dengan masing-masing Primer metilasi dan Primer tidak metilasi. RNA yang didapat di *reverse transcriptase* menjadi cDNA kemudian di perlakukan bersama cDNA B-actin diperiksa dengan Real Time PCR. Uji Mann-Whitney U dipakai untuk menguji hubungan antara gen *WRN* yang termetilasi dengan ekspresi mRNA dan uji Fisher untuk menguji hubungan antara gen *WRN* yang termetilasi dengan data klinik meliputi usia penderita, hasil pemeriksaan Immunohistokimia (ER, PR, Her2, p53) dan TNM.

**Hasil:** Gen *WRN* yang termetilasi sebanyak 9 sampel dari 60 sampel (15%). Ekspresi mRNA yang dapat dinilai datanya sebanyak 49 sampel dari 60 sampel (81,67%) dan Rasio ekspresi WRN terhadap B-actin sekitar 0,00 hingga 27,75.

**Kesimpulan:** Tidak ada hubungan antara gen *WRN* yang termetilasi dengan ekspresi mRNA dengan  $P = 0,61$  dan tidak ada hubungan antara gen yang termetilasi dengan data klinik yang terdiri dari hasil pemeriksaan ER, PR, Her2, Triple negatif, p53, dan TNM, tapi ada hubungan yang signifikan antara usia penderita yang muda (dibawah dan sama dengan 40 tahun) dengan gen *WRN* yang termetilasi dengan  $P = 0,02$ .

**Kata kunci:** kanker payudara, metilasi DNA promoter, ekspresi gen *WRN*

**Background:** Epigenetic events including DNA methylation and histone modifications contribute to the cause of malignancy. Tumor suppressor genes belong to class of genes which may be subjected to DNA damage or modification. For instance, tumor suppressor gene may be inactivated by mutation, methylation and LOH (*Loss of heterozygosity*), the *WRN* gene is an example of tumor suppressor gene. Mutated in the premature aging Werner syndrome, *WRN* gene is located on chromosome 8p 11.2-12. Furthermore, LOH in this genetic locus is found in a subset of early onset breast cancer patients. Recent report also indicated that *WRN* gene may be susceptible to methylation. These data suggest that *WRN* gene inactivation may lead to cancer.

**Objective :** This study aims to examine the characteristic of a methylation status of *WRN* gene in breast cancer patients at Dharmais National Cancer Hospital and the relationship between *WRN* gene methylation with its mRNA expression.

**Design:** Analytical.

**Methods:** DNA and RNA were isolated from archived frozen breast cancer tissue sample. DNA quality was checked by PCR amplification of Interferon-gamma gene. To determine promoter methylation, DNA was treated with bisulfite to distinguish methylated cytosine from unmethylated ones. The quality of converted DNA was determined by amplification of Myod-1 locus with contain cytosine rich sequences that are susceptible to uracil conversion upon bisulfite treatment. Subsequently, *WRN* methylation was determined using Methylation Specific PCR (MSP) using 2 set of primers recognizing either methylated or unmethylated *WRN* sequence. *WRN* expression was determined by the level of cDNA upon conversion of total, RNA using reverse transcriptase. Expression of *WRN* was calibrated to B-actin expression using Real-Time PCR and Pfaffl method. Mann-Whitney U test was used to examine the relationship between *WRN* gene methylation

and its mRNA expression. Fisher test was used to examine the relationship between *WRN* gene methylation status with clinical data include age, Immunohistokimia test (ER,PR,Her2,p53) and TNM.

**Results:** *WRN* gene is methylated in nine samples out of 60 samples (15%). mRNA expression data was assessed from 49 samples out of 60 samples only (81,67%). Although there is a trend of mRNA silencing in methylated *WRN* gene, the relationship does not reach statistical significance. WRN expression ratio of B-actin around 0,00 to 27,75

**Conclusion:** There is no relationship between the *WRN* gene methylation and mRNA expression,  $P = 0,61$  and no relationship between the *WRN* gene methylated with clinical data that consists of ER, PR, Her2, Triple negative, p53, and TNM. Interestingly, WRN methylation was found more frequently in early onset breast cancer patients,  $P = 0,02$ .

**Keywords:** Breast cancer, DNA methylation promoter, *WRN* gene expression.

## Pendahuluan

Kanker payudara merupakan jenis kanker terbanyak diderita oleh perempuan di dunia menurut data WHO pada tahun 2002 dan merupakan penyebab kematian terbanyak pada wanita di Indonesia pada tahun 2005.<sup>1</sup> Data Bidang Rekam Medis di Rumah Sakit Kanker Dharmas menunjukkan bahwa sejak tahun 1993 hingga tahun 2009, kanker payudara selalu menempati peringkat pertama dari 10 besar jenis kanker yang ada di RSKD per tahun<sup>2</sup> dan yang lebih memprihatinkan adalah penderitanya semakin banyak wanita berusia muda

Dari beberapa macam resiko yang berkaitan dengan terjadinya kanker, salah satunya adalah keturunan dan disamping itu juga ada peristiwa epigenetik yang berhubungan dengan terjadinya kanker, contohnya adalah peristiwa DNA metilasi dan modifikasi histone.<sup>3</sup>

Epigenetik adalah salah satu mekanisme penghambatan tanpa merubah sekuens DNA (non-mutasi) terhadap proses transkripsi tapi dapat mengakibatkan hilangnya atau berkurangnya ekspresi dari gen-gen tertentu (seperti gen penekan tumor) yang berperan untuk menghambat terjadinya kanker.<sup>3</sup> Metilasi DNA adalah suatu proses pergantian posisi atom H pada posisi 5 dari sitosin oleh metil ( $\text{CH}_3$ ). Penambahan kelompok metil terjadi pada sebagian besar di situs CpG promoter, sehingga mengubah sitosin pada posisi 5 menjadi metilsitosin oleh DNA methyl-transferase (DNMT).<sup>4</sup> Struktur 5-

metilsitosin yang kurang lebih hampir sama dengan struktur sitosin, oleh sebab itu 5- metilsitosin masih tetap berpasangan dengan guanin, pada pembelahan sel berikutnya akan digantikan dengan sitosin, namun pada beberapa situs yang termetilasi lebih banyak dan lebih berat cenderung akan mengganggu proses transkripsi. Proses metilasi hanya terjadi pada nukleotida sitosin dan pada C-G yang banyak berulang di daerah promoter.

Gen penekan tumor adalah gen yang melindungi sel dengan cara mengatur kapan sel tersebut dapat membelah atau memperbanyak diri, memperbaiki kerusakan DNA dan menginduksi terjadinya apoptosis.<sup>5</sup> Produk gen penekan tumor, pada umumnya memberikan sinyal untuk menghambat pertumbuhan (mitosis) yang abnormal,<sup>5</sup> dan terlibat dalam proses biologis seperti kontrol siklus sel, replikasi DNA, rekombinasi DNA, sinyal transduksi, perbaikan DNA, differensiasi jaringan dan proses penuaan.<sup>6</sup> Dalam keadaan normal, kerja gen penekan tumor adalah menghambat proliferasi sel dengan kerusakan DNA, kadang-kadang gen ini disebut juga onkogen resesif atau anti onkogen.<sup>7</sup> Beberapa penelitian membuktikan bahwa produk gen penekan tumor secara langsung atau tidak langsung berinteraksi dengan produk onkogen, sehingga fungsi produk onkogen tersebut dihambat.<sup>8</sup>

Salah satu gen penekan tumor yang juga memiliki fungsi perbaikan DNA adalah gen *WRN*.<sup>9</sup> Gen *WRN*

termasuk RecQ helikase<sup>10</sup> yaitu RecQL2 helikase.<sup>10</sup> RecQ helikase adalah enzim helikase yang sangat penting dalam menjaga genom.<sup>11</sup> Fungsinya pada proses replikasi, penuaan, rekombinasi dan perbaikan DNA.<sup>9</sup> Protein yang dihasilkan oleh gen *WRN* termasuk dalam RecQ DNA helikase dan RNA helikase<sup>10</sup> dan bertindak sebagai DNA helikase dengan kegiatan eksonuklease,<sup>12</sup> DNA helikase adalah enzim yang terlibat dalam berbagai mekanisme DNA meliputi transkripsi, replikasi, rekombinasi dan perbaikan.<sup>10</sup> Gen ini juga terlibat pada mekanisme pemeliharaan DNA, perbaikan DNA dan kestabilan genom.<sup>9</sup> Lokasi gen *WRN* terletak pada kromosom 8p11.2-p12,<sup>12</sup> dimana pada lokasi ini sering terjadi *Loss of heterozygosity* (LOH) dan perubahan kromosom yang berhubungan dengan keganasan (kecenderungan kanker) di berbagai macam jenis kanker termasuk kanker payudara.<sup>10</sup> Protein WRN terdiri dari 1432 asam amino.<sup>11</sup> dan seberat 180 kD.<sup>13</sup> Protein WRN mewakili hubungan yang penting antara perbaikan DNA dengan proses penuaan dan kanker.<sup>10</sup> Protein WRN dapat membentuk interaksi dengan protein p53. Interaksi ini melibatkan terminal karboksil bagian dari ekstrem WRN dan terminal karboksil dari p53, dimana daerah ini berperan penting dalam mengatur keadaan fungsional protein p53. Sebuah WRN sebagian kecil dapat ditemukan dalam kompleks dengan p53 di endogen sel. Protein WRN dapat berpartisipasi dalam pengaktifan p53 untuk memperbaiki DNA yang rusak.<sup>14</sup> (kegagalan untuk menginduksi p53 efektif dapat berkontribusi untuk meningkatkan ketidakstabilan genomik dan peningkatan resiko kanker pada pasien Werner syndrome).<sup>14</sup> Temuan ini mendukung adanya *cross-talk* antara protein WRN dengan protein p53, yang mungkin penting untuk mempertahankan integritas genomik dan untuk mencegah akumulasi penyimpangan yang dapat menimbulkan penuaan dini dan kanker.<sup>15</sup> Jadi dapat disimpulkan tentang gen *WRN* yaitu :<sup>14</sup>

1. Gen *WRN* sebagai helikase yang penting terutama dalam proses replikasi pada ujung DNA.
2. Tanpa adanya gen *WRN*, proses replikasi pada ujung DNA akan bermasalah dan merusak telomere. Telomere yang rusak dapat berakibat Penuaan yang lebih cepat (karena telomere semakin pendek) dan DNA menjadi tidak stabil (*genomic instability*) karena tanpa telomere akan mudah terjadi rekombinasi antar kromosom sehingga rawan terjadi proses delesi, translokasi, dan kerusakan genom lainnya yang merupakan karakter genom kanker.
3. Protein WRN mewakili hubungan penting antara proses perbaikan DNA yang rusak dengan proses yang berkaitan dengan penuaan dan kanker.
4. Kekurangan protein WRN akan menyebabkan fase S terganggu pada siklus sel.

Pada tingkat molekuler, perkembangan tumor diakibatkan oleh akumulasi lesi genetik dan pada beberapa keadaan sebagai akibat dari perbaikan (repair) DNA. Target utama kerusakan DNA adalah golongan gen yang meliputi:<sup>7</sup>

- a. Proto-onkogen adalah gen normal sel yang dapat berubah menjadi onkogen aktif karena mutasi atau ekspresi yang berlebihan.
- b. Gen penekan tumor yang tidak aktif.
- c. Gen perbaikan DNA yang tidak berfungsi.

Pemahaman dasar lesi genetik yang terjadi selama karsinogenesis memiliki potensi besar untuk aplikasi klinis dalam diagnosis, prognosis dan terapi.<sup>7</sup>

### Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan studi analitik untuk mengetahui peran metilasi promotor gen *WRN* dan hubungan antara metilasi promotor gen *WRN* dengan ekspresi gen *WRN* pada kanker payudara. Status metilasi promotor gen *WRN* diperiksa dengan melakukan teknik MSP (*Methylation-specific PCR*) dan PCR konvensional

*WRN* diperiksa dengan melakukan teknik MSP (*Methylation-specific PCR*) dan PCR konvensional sedangkan untuk Ekspresi gen *WRN* diperiksa dengan Real Time PCR yang sebelumnya dilakukan *Reverse Transcriptase PCR*. Penelitian dilakukan di Rumah sakit Kanker Dharmais dan Laboratorium Stem Cell and Cancer Institute (SCI). Populasi penelitian adalah sampel yang didapat dari spesimen/ jaringan hasil operasi pasien kanker payudara yang menjalani pembedahan di Rumah Sakit Kanker Dharmais dan secara histopatologik melalui pemeriksaan potong beku, jaringan dinyatakan menunjukkan gambaran yang sesuai dengan karsinoma payudara serta sampel didapat dari pasien yang telah menyetujui dengan mengisi *informed consent*. Sampel berupa jaringan segar (berarti belum terkena reagen fiksasi atau preservasi). Sampel berdiameter kurang lebih 1 cm. Kriteria Inklusi : a. Menjalani operasi di Rumah Sakit Kanker Dharmais pada tahun 2002 dan dari pertengahan bulan November tahun 2008 hingga pertengahan bulan Juni tahun 2009. b. Jaringan hasil operasi / pembedahan secara histopatologik menunjukkan gambaran yang sesuai dengan karsinoma payudara. c. Pasien atau keluarga pasien tidak keberatan spesimennya dipakai sebagai bahan penelitian dengan menandatangani lembar *informed consent*.

Perhitungan besar sampel berdasarkan rumus uji *single proportion* dan diperoleh sebesar 32 buah sampel. Metode pemeriksaan yang dilakukan sesuai dengan metode pemeriksaan yang telah dilakukan sebelumnya oleh sentral-sentral penelitian lain.

Isolasi DNA : Isolasi DNA dilakukan dengan prosedur dari kit isolasi DNA (High Pure PCR template preparation kit, Roche - applied-science). DNA yang didapat sebanyak 100 µl disimpan di freezer -80°C, setelah diberi label. Simpan pada freezer - 80°C. Untuk mengontrol kualitas DNA

yang diperoleh, diperiksa dengan memperlakukan teknik PCR konvensional menggunakan primer Interferon  $\gamma$ <sup>16</sup>, Primer Interferon-Gamma yang digunakan adalah sense: 5'- TCT TTT CTT TCC CGA TAG GT- 3' dan anti sense adalah 5'- CAG GGA TGC TCT TCG ACC TC- 3'. Hasil amplikon dari penggunaan primer Interferon - Gamma adalah sebesar 150 bp.<sup>16</sup> PCR sebanyak 35 siklus, 1 menit pada suhu 94°C; 1 menit pada suhu 50°C; 1 menit pada suhu 70°C. Hasil isolasi DNA yang baik selanjutnya akan diperlakukan dengan Sodium Bisulfit dan PCR metilasi spesifik (MSP).<sup>12</sup> Cara kerja perlakuan sodium bisulfit ini dilakukan sesuai dengan prosedur Bisulfit kit Handbook (Qiagen). Untuk mengontrol hasil DNA yang telah diperlakukan dengan perlakuan sodium bisulfit, maka DNA yang didapat diperiksa dengan memperlakukan teknik PCR konvensional menggunakan primer Myod1,<sup>17</sup> Primer Myod-1 yang digunakan adalah sense 5'- TGA TTA ATT TAG ATT GGG TTT AGA GAA GGA- 3' dan antisense 5'-CCA ACT CCA AAT CCC CTC TCT AT- 3'. Hasil amplikon primer Myod-1 sebesar 152 bp. PCR sebanyak 40 siklus, 30 detik pada suhu 95°C; 30 detik pada suhu 58°C; 30 detik pada suhu 72°C. DNA yang sudah diperlakukan sodium bisulfit tersebut dan yang telah pasti memberikan hasil yang baik setelah diperiksa menggunakan primer Myod-1 kemudian diperlakukan dengan teknik PCR konvensional dengan masing-masing primer untuk termetilasi atau primer untuk tidak termetilasi Metilasi : Primer yang digunakan adalah sense: 5'- CGG GTA GGG GTA TCG TTC GC - 3', lokasi pada - 36 bp dari tempat mulai transkripsi dan antisense: 5'- AAC GAA ATC CAC CGC CCG CC - 3', lokasi pada + 129 bp dari tempat mulai transkripsi. Hasil amplikon primer sebesar 165 bp.<sup>12</sup> PCR konvensional sebanyak 40 siklus, 30 detik pada suhu 95°C; 30 detik pada suhu 65°C; 30 detik pada suhu 72°C. Sebagai Kontrol positif yaitu : HCT 116, *cell line* yang berasal dari kanker kolon dan M (+)

adalah DNA yang didapat dari hasil isolasi limfosit darah tepi manusia yang sehat dan kemudian diperlakukan dengan pemberian SssI metilase (New England Biolabs, Inc. Beverly, Mass, USA).<sup>18</sup> sedangkan sebagai kontrol negatif yaitu : MCF 7 *cell line* yang berasal dari kanker payudara dan M (-) adalah DNA yang didapat dari hasil isolasi limfosit darah tepi manusia yang sehat dan tidak diperlakukan apa-apa. Semua kontrol yang dipakai juga harus diperlakukan sodium bisulfit. Jumlah sampel yang diperlakukan menggunakan primer WRN metilasi sebanyak 60 sampel.

Tidak termetilasi : Primer yang digunakan yaitu sense: 5'- GTA GTT GGG TAG GGG TAT TGT TTG T - 3' dan antisense: 5 - AAA CAA AAT CCA CCA CCC ACC CC - 3'. Hasil amplikon primer sebesar 165 bp.<sup>12</sup> PCR konvensional sebanyak 35 siklus, 30 detik pada suhu 95° C; 30 detik pada suhu 60° C; 30 detik pada suhu 72° C. Sebagai Kontrol positif yaitu : BT 549, MCF-7 dan M (-) dan sebagai kontrol negatif yaitu HCT 116 dan M (+). Semua kontrol yang dipakai juga harus diperlakukan sodium bisulfit. Jumlah sampel yang diperlakukan menggunakan primer WRN yang tidak termetilasi sebanyak 60 sampel.

Isolasi RNA: Cara kerja: (lakukan di Laminar air flow). Isolasi RNA dilakukan sesuai dengan prosedur dari kit isolasi RNA (Invitrogen). RNA yang didapat beri label dan simpan pada freezer -80° C. Sebelum melakukan pemeriksaan ekspresi dengan Real - Time PCR, RNA yang telah didapat dirubah dulu menjadi cDNA dengan *Reverse Transcriptase* menggunakan kit AMV (Roche). Perubahan RNA menjadi cDNA dilakukan sesuai dengan prosedur dari AMV kit (Roche). Jumlah RNA yang dipakai diperhitungkan sebanyak 250 ng dari hasil perhitungan kuantitasi dengan alat Spektrofotometer dan menjadi 20 µl cDNA.

Primer  $\beta$ -actin yang dipakai adalah: sense 5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC- 3' dan antisense 5'- GGA ATC CTT CTG ACC CAT GC- 3', hasil

amplikon yang akan dihasilkan dari primer ini sebesar 204 bp.<sup>16</sup> Sedangkan primer WRN untuk ekspresi yang digunakan yaitu sense: 5'- GGA TCA GCA CAG TCA GAA AAT GTT CT - 3' dan antisense: 5'- GGA TAG ATT CAG TTT CCT AAG TTC ACC- 3', hasil amplikon yang akan dihasilkan dari primer ini sebesar 513 bp.<sup>19</sup> Amplifikasi cDNA (untuk melihat ekspresi) dengan menggunakan alat Real - Time PCR (Corbett) dengan protokol reaksi yang sudah dioptimalisasi yaitu PCR sebanyak 40 siklus, 20 detik pada suhu 98°C; 20 detik pada suhu 60°C; 30 detik pada suhu 72°C. Uji statistik dikatakan bermakna bila  $p < 0,05$ .

### Hasil dan Pembahasan

Jumlah sampel yang berhasil diikutsertakan dalam penelitian ini sebanyak 64 buah sampel jaringan segar kanker payudara. Dari 64 buah sampel penelitian, dari demografi usia: usia termuda sampel penelitian adalah 25 tahun, usia tertua sampel penelitian adalah 72 tahun. Mean data usia sebesar 46,05 dan median data usia adalah 45,5. Kelompok umur 30 - 40 tahun jumlahnya sama banyak dengan kelompok umur 40 - 50 tahun dan merupakan jumlah yang terbanyak.

Dari 64 buah sampel jaringan kanker payudara yang digunakan untuk penelitian ini, sebanyak 60 (93,75%) buah sampel berhasil mendapatkan DNA yang baik dari hasil isolasi DNA. Hal ini disebabkan :

a. 4 buah sampel tidak memberikan hasil isolasi DNA yang berkualitas baik setelah dilakukan pemeriksaan dengan teknik PCR konvensional menggunakan primer Interferon Gamma,<sup>16</sup> yaitu untuk nomor sampel 5, 7, 8, 9

b. setelah DNA diperlakukan proses perlakuan Sodium Bisulfit dan yang tidak memberikan hasil yang baik setelah diperiksa dengan memperlakukan teknik PCR konvensional menggunakan primer MyoD1<sup>17</sup> yaitu untuk nomor 5, 7, 8, 9 (6,25%) juga. Semua hasil isolasi DNA (sebelum diperiksa dengan primer

Interferon-Gamma) diukur serapan cahayanya dengan sinar UV dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm kemudian dilakukan juga elektroforesis DNA pada gel agarose 2,5% sebanyak 20 µl tapi hanya untuk beberapa sampel saja.

Primer Interferon- Gamma<sup>16</sup>

berguna untuk mengecek kualitas hasil isolasi DNA yang didapat. Jadi sampel penelitian yang mempunyai hasil PCR sebesar 150 bp, berarti DNA yang didapat dari hasil isolasi cukup baik kualitasnya untuk diperlakukan proses selanjutnya, yaitu proses perlakuan sodium bisulfit (SB) dan perlakuan PCR Metilasi Spesifik (MSP).

Perlakuan sodium bisulfit<sup>12</sup> berfungsi untuk mengkonversi sitosin yang tidak termetilasi menjadi urasil, sedangkan sitosin yang termetilasi tetap menjadi sitosin. DNA awalnya didenaturasi dengan perlakuan alkali, DNA beruntai tunggal dengan sodium bisulfit mengubah residu sitosin (C) menjadi urasil (U) karena deaminasi spontan sedangkan 5 metil sitosin tidak bereaksi. Urutan DNA ini kemudian diamplifikasi oleh PCR dengan primer spesifik untuk DNA yang telah dirubah oleh perlakuan sodium bisulfit.

Primer Myod-1 (Myogenic Differentiation 1).<sup>17</sup> berfungsi untuk menguji kualitas DNA setelah dilakukan perlakuan sodium bisulfit dan untuk membuktikan apakah DNA telah terkonversi dengan baik. Tujuannya adalah untuk memastikan bahwa setiap Sitosin (C) yang termetilasi tetap sebagai sitosin, sedangkan Sitosin (C) yang tidak termetilasi akan berubah menjadi Urasil (U). Apabila perlakuan sodium bisulfit tidak sempurna maka sitosin yang tidak termetilasi tetap menjadi sitosin dan tidak berubah menjadi urasil. Akibatnya ketika dilakukan proses *Polymerase chain reaction* Metilasi Spesifik (MSP) akan memberikan hasil positif yang salah ("false positive"). Untuk menguji kualitas DNA setelah perlakuan sodium bisulfit, kami menggunakan Primer Myod-1 (Myogenic Differentiation 1) seperti yang telah dipublikasi sebelumnya.<sup>17</sup> Situs gen *Myod-1* ini diposisikan pada untai

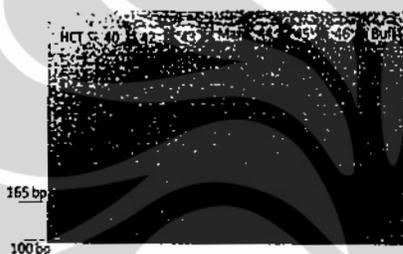
sekuens yang kaya dengan sitosin (C). Apabila perlakuan bisulfit terjadi dengan baik maka setiap sitosin (C) pada situs gen *Myod-1* akan berubah menjadi urasil (U), yang properti kimianya mirip dengan timin (T). Primer Myod-1 yang dipakai hanya akan berhidridisasi (atau "anneal") dengan timin (T), bukan dengan sitosin (C). Oleh karena itu jika proses bisulfit gagal, dimana C tetap sebagai C, sebagai akibatnya Primer Myod-1 ini tidak dapat berhibridisasi, oleh karena primer ini memerlukan timin (T) untuk dapat berhibridisasi dengan baik. DNA yang memberikan hasil sebesar 152 bp berarti dapat diperlakukan untuk proses selanjutnya yaitu perlakuan PCR Metilasi Spesifik (MSP). *Polymerase chain reaction* Metilasi Spesifik (MSP) adalah sebuah teknik yang berfungsi untuk mendeteksi CpG promotor hipermetilasi. Teknik ini adalah perlakuan MSP yaitu perlakuan dengan teknik PCR konvensional menggunakan primer yang spesifik untuk yang termetilasi atau primer yang spesifik untuk yang tidak termetilasi.

Kedua kontrol M (+) dan M (-) dipakai bertujuan untuk mendapatkan ketepatan yang lebih mendekati antara kontrol dengan sampel penelitian yang juga berasal dari manusia. Disamping itu dipakai juga kontrol *cell line* HCT 116 dan *cell line* MCF 7 karena berdasarkan jurnal yang sebelumnya<sup>12</sup> yang memakai kontrol ini, hasil yang didapat dari jurnal sebelumnya adalah sebagai berikut *cell line* kontrol HCT 116 memberikan hasil positif untuk gen *WRN* yang termetilasi dan *cell line* kontrol MCF 7 memberikan hasil positif untuk gen *WRN* yang tidak termetilasi, kami pun mendapatkan hasil yang sama.

### Hasil PCR untuk Kontrol yang termetilasi



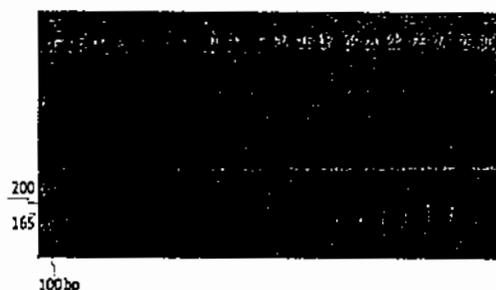
### Hasil PCR untuk Kontrol dan Sampel yang Termetilasi



### Hasil PCR untuk Kontrol yang Tidak Termetilasi



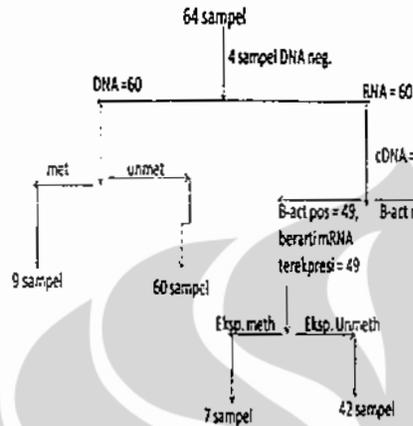
### Hasil PCR untuk Kontrol dan Sampel yang Tidak Termetilasi



Hasil: didapat 9 sampel yang termetilasi (15%) dari 60 sampel yang dipakai untuk penelitian. Dari 9 sampel yang termetilasi, umur sampel penelitian yang termetilasi adalah 6 sampel penelitian yang umurnya dibawah dan sama dengan 40 tahun (28,57%) dan 2 sampel yang umurnya diatas 40 tahun (5,13%).

Ekspresi mRNA WRN dengan *Reverse Transcriptase PCR*. Sebanyak 60 sampel penelitian diisolasi RNA, untuk hasil RNA yang didapat. Dari 60 sampel, hasil isolasi RNA dibuat dulu menjadi cDNA. Semua sampel dilakukan pemeriksaan dengan Real-Time PCR untuk menghasilkan ekspresi dan dipakai Primer  $\beta$ -actin sebagai kontrol. Fungsi dari pemeriksaan dengan primer  $\beta$ -actin sebagai kontrol untuk melihat jumlah cDNA.<sup>17</sup> Untuk sampel yang Primer  $\beta$ -actin nya memberikan hasil yang negatif yaitu jika nilai  $E < 1,6$  berarti sampel tidak dapat dipakai. Dari 60 sampel yang diperiksa dan memberikan hasil ekspresi  $\beta$ -actin yang positif, berarti ekspresi RNA dapat dinilai sebanyak 49 buah sampel (81,67%) dan ada 11 buah sampel penelitian yang memberikan hasil ekspresi  $\beta$ -actin negatif (18,33%) berarti ekspresi RNA tidak dapat dinilai. Hasil terakhir yang didapat setelah dihubungkan antara hasil metilasi DNA dengan hasil ekspresi adalah sebagai berikut: 7 sampel penelitian yang termetilasi dengan hasil ekspresi  $\beta$ -actin yang positif berarti ekspresi RNA dapat dinilai, sedangkan 2 sampel penelitian yang termetilasi tetapi hasil  $\beta$ -actin negatif. Untuk sampel penelitian yang tidak termetilasi sebanyak 60 buah sampel hanya 42 buah sampel yang memberikan hasil ekspresi  $\beta$ -actin yang positif berarti ekspresi RNA dapat dinilai hasil ekspresinya.

BAGAN HASIL PENELITIAN



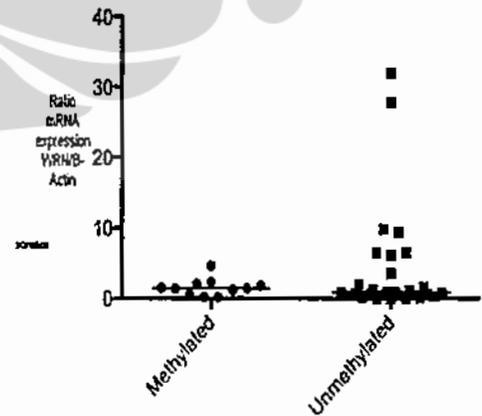
Ekspresi untuk gen *WRN* yang Termetilasi

Nomor Sampel	Ekspresi Rata-rata Ratio <i>WRN</i> / <i>B-actin</i>
18	0,21
31	1,25
38	0,00
40	0,00
43	4,62
45	0,00
58	0,21

Ekspresi untuk gen *WRN* yang tidak termetilasi

Nomor Sampel	Ekspresi Rata-rata Ratio <i>WRN</i> / <i>B-actin</i>	Nomor Sampel	Ekspresi Rata-rata Ratio <i>WRN</i> / <i>B-actin</i>
2	0,63	33	26,59
3	0,16	35	0,00
4	1,5	36	0,00
10	1,99	41	1,27
13	0,49	42	0,65
14	1,01	44	4,32
16	9,34	46	0,84
17	3,51	48	0,00
19	9,81	49	0,73
20	0,88	50	2,31
21	0,00	51	0,53
22	1,55	52	1,44
23	0,00	54	2,05
24	27,75	59	6,49
25	1,38	61	0,00
26	1,88	62	0,00
27	0,21	63	0,00
28	6,1	64	0,02
29	0,37	65	0,00
30	0,41	66	0,87
32	0,74	67	0,32

Methylated vs.unmethylated



Hubungan Metilasi dengan ekspresi

Dari hasil analisis data dengan menggunakan uji Mann Whitney U pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekspresi gen *WRN* yang terjadi jika dihubungkan dengan peristiwa metilasi DNA gen *WRN* dan peristiwa tidak termetilasi DNA gen *WRN* : menurut hipotesa, sampel yang menunjukkan adanya metilasi DNA gen *WRN* diperkirakan mengalami pembungkaman atau penurunan ekspresi mRNA gen *WRN*, karena proses metilasi pada promotor menghambat proses transkripsi. Namun gambar justru menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang berarti pada tingkat ekspresi gen *WRN* pada kelompok sampel yang tidak termetilasi maupun pada kelompok sampel yang termetilasi. Hal ini menimbulkan asumsi bahwa kemungkinan terjadinya peristiwa epigenetik tidak hanya disebabkan oleh peristiwa metilasi tetapi juga disebabkan oleh peristiwa modifikasi histon. Penemuan ini juga pernah ditemukan sebelumnya pada gen *TWIST 1*, dimana metilasi pada gen *TWIST 1* tidak diikuti oleh penurunan ataupun pembungkaman ekspresi mRNA nya.

#### Hubungan data Klinik dengan gen *WRN* yang termetilasi dan gen *WRN* yang tidak termetilasi

Data	Ket.	WRN met.	WRN unmet.	P value	OR	95% CI
<b>Klinik</b>						
usia	<= 40	6 (28.57%)	15 (71.43%)	0.02	7.40	40.88
	> 40	2 (5.13%)	37 (94.87%)			
ER	Positif	2 (18.18%)	9 (81.82%)	0.22		
	Negatif	2 (5.41%)	35 (94.59%)			
PR	Positif	0 (0%)	12 (100%)	0.56		
	Negatif	4 (11.11%)	32 (88.89%)			
Hcr2	Positif	1 (4.17%)	23 (95.83%)	0.61		
	Negatif	3 (12.50%)	21 (87.50%)			
p53	Positif	1 (5.56%)	17 (94.44%)	1.00		
	Negatif	3 (10.34%)	26 (89.66%)			
Triple	Positif	2 (13.33%)	13 (86.67%)	0.30		
	Neg.	2 (5%)	38 (95%)			
TNM	T 1 - 2	3 (11.11%)	24 (88.89%)	1.00		
	T 3 & 4	1 (12.50%)	10 (87.50%)			
	N 0	1 ( 4.76%)	20 (95.24%)			
	N 1 & 2	2 (11.11%)	16 (88.89%)			
	M 0	2 (8%)	23 (92%)			
M 1	0 (0%)	1 (100%)				

Dari hasil uji Fisher yang dilakukan :

- Untuk hubungan antara kelompok usia dengan kelompok gen *WRN* yang termetilasi dan gen *WRN* yang tidak termetilasi memberikan hasil yang signifikan dengan  $P = 0.02$ ,  $OR = 7.40$  dan  $95\% CI = 1.34 - 40.88$  berarti ada hubungan diantara kedua kelompok tersebut yang dapat diterima sedangkan
- Untuk hubungan kelompok hasil pemeriksaan IHC dan kelompok TNM dengan gen *WRN* yang termetilasi dan gen *WRN* yang tidak termetilasi tidak memberikan hasil yang signifikan (tidak ada hubungan).

## KESIMPULAN

1. Gen *WRN* yang termetilasi pada pasien kanker payudara di Rumah Sakit Kanker Dharmais sebesar 15%.
2. Tidak ada hubungan antara gen *WRN* yang termetilasi dan gen *WRN* yang tidak termetilasi dengan ekspresi mRNA nya masing-masing.
3. Terjadinya peristiwa metilasi DNA promoter gen *WRN* pada kanker payudara berkaitan dengan usia yang muda.

## Daftar Pustaka

1. WHO, Preventing Cancer. World Health Statistics, USA: 2001;
2. Bidang Rekam Medik Rumah Sakit Kanker Dharmais, Data Rekam Medik per Tahun. Jakarta: Rumah Sakit Kanker Dharmais, 2009;
3. Esteller Manel, Epigenetic Gene Silencing in Cancer: the DNA hypermethylome. Madrid, Spain: Oxford University Press, Human Molecular Genetics, 2007; 16 (1): p. 50-59.
4. Novak Kris, Epigenetics Changes in Cancer Cells. Highlights of The American Association for Cancer Research, PubMed Journal Centre, Hawaii: Medscape General Medicine, 2004; 6 (4): p.7.
5. Osborne Cynthia, Wilson Paschal, Tripathy Debu, Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. USA: The Oncologists 2004; 9 (4): p. 361 – 77.
6. Paluszczak Jaroslaw, Baer Dubowska Wanda, Epigenetic Diagnostics of Cancer – the Application of DNA methylation marker. Department of Pharmaceutical Biochemistry, Poland: Review Article 2006; p. 365-375.
7. Allred Craig D, Bookstein Robert, Recessive Oncogenes. New York: Wiley InterScience, Cancer, 1993; 71 (3): p. 1179-86.
8. Alberts Bruce, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Johnson Alexander, Walter Peter, Molecular Biology of The Cell: DNA Repair. Fourth Edition, USA: Garland Publishing, Inc. 2002;
9. Oshima, The Werner Syndrome protein: an update. USA: John Wiley and son, Inc. Bioessays 2000; (10): p. 894-901.
10. Nakayama Hiroaki, RecQ Family Helicases: Roles as Tumor Suppressor Proteins. Japan: Kyushu University, 2002; 21 (58): p. 9008 – 21.
11. Shen Jiang- Cheng, Loeb Lawrence A, The Werner Syndrome Gene the molecular basis of RecQ helicase-deficiency diseases. USA: Trends Genet 2000; 16 (5): p. 213 – 20.
12. Agrelo Ruben, Setien Fernando, Cheng Wen-Hsing, Ropero Santiago, Espada Jesus, Esteller Manel et al, Epigenetic inactivation of the premature aging Werner Syndrome gene in human cancer. USA: The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, Baltimore, MD. 2006; 103 (23): p. 8822 – 27.
13. Carol C, The WRN Gene. Registry International of Werner Syndrome, USA: 2005;
14. Blander Gil, Zalle Noa, Leal Fernando Martinez, Bar-Or Ruth Lev, Yu Chang-En, Oren Moshe, The Werner syndrome protein contributes to induction of p53 by DNA damage. USA: The FASEB Journal express article 2000; 14: 2138 – 40.
15. Blander G, Kipnis J, Leal JF, Yu CE, Schellenberg GD, Oren M, Physical and Functional Interaction between p53 and Werner's Syndrome protein. Israel: J Biol Chem. 1999; 274 (41): 29463 – 9.
16. Goebel Stephan U., Iwamoko Michiko, Raffeld Mark, Gibril Fathia, Hou Wei, Serrano Jose, Jensen Robert T, Her-2/ neu Expression and Gene Amplification in Gastrimonas : Correlations with Tumor Biology, Growth, and Aggressiveness. Maryland: Cancer Research, 2002; 62: p. 3702 – 10.
17. Righini Christian Adrien, de Fraipont Florence, Timsit Jean-Francois, Faure Claire, Brambilla Elisabeth, Reyt Emile, Favrot Marie-Christine, Tumor-Specific Methylation in Saliva: A Promising Biomarker for Early Detection of Head and Neck Cancer Recurrence. USA: Clinical Cancer Research 2007; 13 (4): p. 1179 – 85.
18. Shivapurkar Narayan, Stastny Victor, Takahashi Takao, Suzuki Makoto, Echebiri Chinyere, Reddy Jyotsna et.al., Novel real-time PCR assay using a universal molecular marker for diagnosis of hematologic cancers. USA: International Journal of Cancer, 2005; 116 (4): p. 656 – 60.
19. Zhou Bei, Ikejima Takashi, Watanabe Takeshi, Iwakoshi Keiko, Idei Yohei, Tanuma Sei-ichi, et.al., The effect of 2- deoxy-D- glucoxe on Werner Syndrome RecQ helicase gene. Japan: FEBS, Elsevier., 2009; p. 1331 – 36.