

## EKSPRESI DINAMIS MIR-320C PADA KANKER OVARIUM

Reny Guspratiwi<sup>1\*</sup>, Aprilia Indra Kartika<sup>2</sup>, Siti Nur Chasanah<sup>3</sup>, Akbar Satria Fitriawan<sup>3</sup>, Dewi Sahfitri Tanjung<sup>2</sup>, Meutia Srikandi Fitria<sup>2</sup>, Ferdinan Krisna Pukan<sup>3</sup>, Rizky Oktriani<sup>4</sup>, Addin Trirahmanto<sup>5</sup>, Heru Pradjatmo<sup>5</sup>, Teguh Aryandono<sup>6</sup>, Sofia Mubarika Haryana<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh, Payakumbuh, Indonesia

<sup>2</sup>Post Graduate Program in Biotechnology, School of Post Graduate Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>3</sup>Post Graduate Program in Biomedical Science, Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>4</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>5</sup>Department of Obstetric Gynecology, Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>6</sup>Department of Surgery, Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>7</sup>Department of Histology and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

Email: reny.guspratiwi@gmail.com

### ABSTRAK

Kanker ovarium mengalami peningkatan insidensi dan kematian yang disebabkan oleh kesulitan dalam mendeteksi kanker pada stadium awal dan belum ada uji skrining yang efektif untuk kanker ovarium. Dibutuhkan metode deteksi yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi berupa biomarker yang bersirkulasi di dalam plasma darah berupa mikroRNA. Deteksi melalui mikroRNA diharapkan dapat meminimalkan rasa sakit atau minimal invasif. Penelitian analisis profil mikroRNA yang berperan dalam kanker ovarium perlu dilakukan untuk mendapatkan biomarker deteksi awal minimal invasif kanker ovarium yang tepat. Analisis profil ekspresi mikroRNA pada kanker ovarium dilakukan dengan isolasi plasma darah, sintesis cDNA, dan qRT-PCR sampel yang disatukan, dan qPCR miR-320c. *Profiling* mikroRNA pada kanker ovarium dilakukan dengan metode *pooling* sampel, kemudian dilanjutkan dengan kuantifikasi mikroRNA yang mengalami peningkatan dan penurunan paling signifikan secara individu sampel. Hasil analisis profil ekspresi mikroRNA pada kanker ovarium menunjukkan peningkatan ekspresi miR-320c baik pada *serous* maupun pada *mucinous*. Hasil kuantifikasi ekspresi individu menunjukkan penurunan ekspresi miR-320c pada stadium awal dan peningkatan yang signifikan miR-320c pada stadium lanjut kanker ovarium. Penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi mikroRNA dapat berbeda-beda pada masing-masing orang.

**Kata kunci :** kanker ovarium., miR-320c., profil ekspresi., minimal invasif

### ABSTRACT

The increase of incidence and death rate of ovarian cancer is caused by the difficulty and the absence of effective screening method to detect its early stages. Therefore, necessary to find the detection method which is highly sensitive and specific by using particular circulating biomarker in the blood plasma; microRNA. Detection method by microRNA is minimally invasive-expected. In the purpose to get an accurate biomarker candidate detects invasive minimum, an analytical research of microRNA profile causing the ovarian cancer is required. Analysis of microRNA expression profile in the ovarian cancer was started by isolating the blood plasma, cDNA synthesis, qPCR pooling samples, and real time qPCR of miR-320c. The profiling of microRNA of the ovarian cancer used the sample pooling method, then was followed by quantifying the significantly increased and decreased microRNA over individual sample. The result of microRNA expression profile in the ovarian cancer type of serous and mucinous showed that the maximum increased expression of miR-320c. The result of quantification of individual expression showed decrease of miR-320c expression in the early stages of ovarian cancer but significantly increase of miR-320c expression in the late stages of ovarian cancer. This research showed that the expression of microRNA has differences in each patient.

**Keywords :** ovarian cancer., miR-320c., expression profile., minimally invasive

## PENDAHULUAN

Tingkat kejadian dan kematian yang disebabkan oleh kanker ovarium meningkat di Indonesia disebabkan oleh kesulitan dalam mendeteksi kanker pada stadium awal serta belum ada uji skrining yang efektif pada kanker ovarium.<sup>1</sup> Kanker ovarium stadium awal hanya bisa terdeteksi sebesar 20%, sementara 80% lainnya berhasil dideteksi ketika sudah mengalami metastasis ke daerah peritoneum.<sup>2</sup> Menurut Engel et al.,<sup>3</sup> pada tahun 2002, pertahanan pasien dapat ditingkatkan hingga 95% jika kanker ovarium berhasil dideteksi pada stadium awal.

Beberapa metode deteksi awal kanker ovarium yang pernah digunakan antara lain pemeriksaan pelvis secara berkala, ultrasound transvaginal, biomarker serum CA-125, serta biopsi jaringan. Metode deteksi tersebut memiliki kekurangan pada sensitivitas dan spesifisitas, menambah rasa sakit yang diderita pasien, serta masih belum dapat mendeteksi stadium awal kanker ovarium dengan baik.<sup>4,5</sup> Oleh karena itu, dibutuhkan metode deteksi minimal invasif yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi berupa biomarker yang bersirkulasi di dalam plasma darah, sehingga mudah untuk mengetahui perubahan pembentukan kanker ovarium sejak awal. Salah satu kandidat biomarker untuk deteksi kanker ovarium adalah mikroRNA.

MikroRNA merupakan *non-coding single strand* RNA yang mengatur ekspresi gen melalui interaksi komplemen dengan daerah 3'UTR mRNA.<sup>6</sup> MikroRNA mengatur mRNA target dengan mendegradasi atau menekan ekspresi mRNA tersebut.<sup>7</sup> Perubahan ekspresi mikroRNA di dalam sel dapat memengaruhi aktivitas mRNA yang diregulasi oleh mikroRNA, sehingga menimbulkan abnormalitas pada perkembangan sel.<sup>8</sup>

MikroRNA dapat digunakan sebagai biomarker karena dikeluarkan oleh sel tumor ke sirkulasi dan dapat dideteksi pada cairan tubuh seperti urin, darah, serum, plasma, dan saliva. MikroRNA yang bersirkulasi di dalam tubuh berada dalam kondisi stabil dan tahan terhadap suhu tinggi, pH ekstrim, dan aktivitas RNase. Hal tersebut dikarenakan mikroRNA berada di dalam vesikel yang disebut eksosom yang menjaga mikroRNA dari degradasi. Dengan demikian, mikroRNA merupakan kandidat biomarker minimal invasif yang sangat potensial untuk mendiagnosis kejadian kanker.<sup>9,10</sup>

MikroRNA memiliki ekspresi yang spesifik pada setiap etnis.<sup>11</sup> Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian analisis profil mikroRNA pada kanker ovarium di Indonesia untuk mengetahui ekspresi mikroRNA pada populasi Indonesia. Penelitian dilakukan bersifat eksploratif untuk mengetahui

ekspresi mikroRNA secara keseluruhan. Pengukuran ekspresi individu dilakukan untuk melihat perbedaan ekspresi mikroRNA dengan hasil *profiling* metode *pooling*, sehingga dapat menambah *database* kandidat biomarker deteksi awal kanker ovarium di Indonesia.

## BAHAN DAN METODE

### Sampel Pasien

Sampel penelitian diambil dari pasien yang terdiagnosis kanker ovarium sebelum menerima perlakuan, seperti kemoterapi, radioterapi, maupun imunoterapi. Sampel darah pasien didapat dari pembuluh vena tepi sebelum operasi sebanyak 5 mL, sedangkan untuk kontrol sehat, didapat dari volunteer berjenis kelamin wanita dengan usia sekitar 20 hingga 70 tahun yang sehat dan belum pernah mendapat pengobatan kanker. *Ethical clearance* didapat dari institusi dan *informed consent* ditandatangani oleh individu yang menjadi subjek penelitian. Sampel darah yang dikumpulkan berjumlah 17 sampel mucinous, 13 sampel serous, dan 30 sampel sehat.

### Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA dilakukan dengan prosedur sesuai protokol miRCURY RNA Isolation Kit-Biofluid (Exiqon, Vedbaek, Denmark). Sampel darah yang digunakan untuk ekstraksi RNA diambil sebanyak 5 mL dari darah pasien sebelum operasi.

### Sintesis cDNA

Hasil ekstraksi RNA digunakan selanjutnya untuk sintesis cDNA yang mengikuti protokol universal cDNA synthesis kit II 8-64 rxns (Exiqon, Vedbaek, Denmark). Campuran reagen dan RNA dimasukkan ke dalam *thermal cycler Biorad C1000* dengan program inkubasi selama 60 menit pada suhu 42 °C, inaktivasi reverse transkriptase selama 5 menit pada suhu 95 °C, dan didinginkan pada suhu 4 °C.

### Kuantifikasi miR-320c dengan qRT-PCR

Berdasarkan hasil analisis *profiling*, miR-320c yang mengalami peningkatan signifikan dikuantifikasi dari masing-masing sampel pasien. Kuantifikasi miR-320c dilakukan 2 ulangan (*duplo*). MikroRNA yang digunakan sebagai *reference gene* yaitu Hsa-let-7. *Master mix* dibuat dengan mencampurkan 5 µL *SYBR Green master mix*, 1 µL primer PCR, dan 4 µL cDNA yang sudah diencerkan. Primer PCR yang digunakan untuk Has-miR-320c: AAA

AGC UGG GUU GAG AGG GU dan Has-let-7a: UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU U.

Program *real time* qPCR diatur pada mesin Biorad CFX 96 (Bio-Rad, Laboratories, Inc, California, USA) sebagai berikut: denaturasi pada suhu 95 °C selama 10 menit, amplifikasi pada suhu 95 °C selama 10 detik sebanyak 40 siklus, ramp-rate 1,6 °C/s *optical read* pada suhu 60 °C selama 1 menit dan analisis kurva leleh. Analisis hasil qRT-PCR menggunakan *software* CFX Manager™ 96 (Bio-Rad, Laboratories, Inc, California, USA). Perubahan ekspresi miR-320c dibandingkan dengan Has-Let-7 sebagai *reference gene* dan dihitung menggunakan rumus Livak.<sup>12</sup>

#### Analisis Statistika

Analisis statistika dilakukan dengan menggunakan SPSS 20. Perbedaan rerata ekspresi miR-320c antara sampel kanker ovarium dan kontrol sehat digunakan uji *independent T-test* jika data terdistribusi normal atau uji non parametrik Mann Whitney jika data terdistribusi tidak normal. Uji statistik yang digunakan menggunakan tingkat kepercayaan  $p < 0,05$  dan rentang kepercayaan 95%.

#### HASIL

Lembar *Ethical clearance* penelitian analisis profil mikroRNA menggunakan plasma darah disetujui tanggal 2 Mei 2016 dengan nomor surat KE/FK/423/EC/2016. Sampel yang digunakan sebanyak 13 sampel *serous*, 17 sampel *mucinous*, dan 30 sampel sehat.

Hasil analisis profil ekspresi mikroRNA dengan metode pooling sampel menunjukkan miR-320c mengalami peningkatan ekspresi. Peningkatan ekspresi miR-320c sebanyak 1.082 kali pada *serous* dan 1.896 kali pada *mucinous* dibandingkan dengan kontrol sehat. Ekspresi miR-320c pada sampel individu mengalami penurunan sebanyak 22 sampel pasien dengan tipe histologi *serous* maupun *mucinous*. Peningkatan ekspresi hanya terjadi pada 8 pasien kanker ovarium tipe histologis *serous* dan *mucinous* stadium IA, IC, IC2, dan IC3. (Tabel 1).

**Tabel 1.** Ekspresi miR-320c pada kanker ovarium

SAMPEL	Ekspresi	Keterangan	Stadium
ovp 8	-2,77	<i>Serous</i>	IVB
<b>ovp 84</b>	<b>1,18</b>	<b><i>Serous</i></b>	<b>IC</b>
ovp11	-1,20	<i>Serous</i>	IIIC
ovp 12	-5,21	<i>Serous</i>	IC3
<b>ovp 91</b>	<b>1,67</b>	<b><i>Serous</i></b>	<b>IC</b>
<b>ovp 15</b>	<b>3,19</b>	<b><i>Serous</i></b>	<b>IC3</b>
ovp 102	-24,55	<i>Serous</i>	IIIC
ovp 17	-4,79	<i>Serous</i>	IIIC
ovp 104	-3,42	<i>Serous</i>	IC
ovp 20	-1,09	<i>Serous</i>	IIIC
ovp 105	-1,79	<i>Serous</i>	IC
ovp 106	-1,12	<i>Serous</i>	IIIB
ovp 82	-2,44	<i>Serous</i>	IIA
ovp 3	-6,53	<i>Mucinous</i>	IA
ovp 69	-18,02	<i>Mucinous</i>	IIIC
<b>ovp 13</b>	<b>1,22</b>	<b><i>Mucinous</i></b>	<b>IA</b>
<b>ovp 79</b>	<b>1,59</b>	<b><i>Mucinous</i></b>	<b>IC2</b>
<b>ovp 14</b>	<b>1,55</b>	<b><i>Mucinous</i></b>	<b>IC</b>
ovp 86	-14,06	<i>Mucinous</i>	IIIC
<b>ovp 19</b>	<b>1,72</b>	<b><i>Mucinous</i></b>	<b>IC3</b>
ovp 90	-1,66	<i>Mucinous</i>	IC
ovp 93	-2,48	<i>Mucinous</i>	IVC
<b>ovp 27</b>	<b>1,42</b>	<b><i>Mucinous</i></b>	<b>IC3</b>
ovp 97	-3,50	<i>Mucinous</i>	IC
ovp 46	-1,82	<i>Mucinous</i>	IC
ovp 109	-2,63	<i>Mucinous</i>	IC3
ovp 62	-1,46	<i>Mucinous</i>	IA
ovp 95	-9,86	<i>Mucinous</i>	IC
ovp 108	-2,73	<i>Mucinous</i>	II
ovp 61	-5,01	<i>Mucinous</i>	IIIC

Secara rerata, ekspresi miR-320c mengalami penurunan sebesar 1,98 kali jika dibandingkan dengan kontrol sehat (Tabel 2). Tanda minus (-) menunjukkan terjadi penurunan ekspresi mikroRNA. Penurunan ekspresi miR-320c menjadi signifikan dengan  $p = 0,000$  dibandingkan dengan kontrol sehat.

**Tabel 2.** Ekspresi relatif miR-320c antara kanker ovarium dan kontrol sehat

Sampel	$\Delta Cq$ (Mean $\pm$ SD)	$\Delta\Delta Cq$	p value*	Fold Change ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) (-1/FC)
Kanker Ovarium (n=30)	3,27 $\pm$ 0,68	0,99	0,000	0,503175 (-1,98738)
Kontrol Sehat (n=30)	2,28 $\pm$ 0,04			

\* $p < 0,05$  data berbeda signifikan

## PEMBAHASAN

MikroRNA-320c menunjukkan peningkatan yang sangat signifikan, yaitu mencapai 1.082 kali pada tipe histologi *serous* dan 1.896 kali pada *muicinous*. Peningkatan ekspresi miR-320c menjadi temuan baru dalam profil ekspresi mikroRNA pada kanker ovarium, karena belum ada laporan penelitian sebelumnya yang menunjukkan ekspresi miR-320c pada kanker ovarium. MikroRNA-320c diketahui mengalami peningkatan pada Hepatocellular Carcinoma yang diikuti dengan peningkatan metastasis dan proliferasi.<sup>13</sup>

Perbedaan hasil ekspresi *profiling* dengan kuantifikasi miR-320c secara individu disebabkan oleh ekspresi miR-320c yang sangat heterogen antar sampel individu. Kelimpahan sekuens yang tinggi pada mikroRNA tertentu dan tingkat heterogenitas yang tinggi menyebabkan sinyal mikroRNA tersebut terdeteksi tinggi.<sup>14</sup> Hal tersebut terlihat dari hasil kuantifikasi ekspresi miR-320c pada sampel individu yang menunjukkan peningkatan dan penurunan yang signifikan. Perbedaan hasil kuantifikasi secara individu menunjukkan bahwa setiap individu memiliki gambaran ekspresi mikroRNA sendiri sehingga sangat dibutuhkan *personalized medicine*.

Hasil kuantifikasi ekspresi miR-320c secara individu menunjukkan kemungkinan ekspresi miR-320c yang dinamis atau memiliki *dual role* yaitu sebagai onkomiR dan *tumor suppressor*. Peningkatan miR-320c pada stadium awal menunjukkan perannya yang kemungkinan sebagai

onkomiR sedangkan penurunan miR-320c pada stadium lanjut menunjukkan perannya sebagai mikroRNA *tumor suppressor*. MikroRNA-320c memerlukan penelitian lebih lanjut dengan melihat ekspresi mRNA ditarget dan perannya dalam kejadian kanker ovarium. Gen mRNA yang ditarget oleh miR-320c antara lain GNAI1, SMARCC1, CDK6, SOX4, FOXM1, dan FOXQ1. MikroRNA-320c ditemukan mengalami peningkatan ekspresi pada *hepatocellular carcinoma* (HCC) yang diikuti dengan peningkatan metastasis dan proliferasi. MikroRNA-320c menarget gen guanine nucleotide binding protein G(i),  $\alpha$ -1 subunit atau GNAI1 yang berperan dalam menghambat metastasis dan proliferasi sel. Peningkatan ekspresi miR-320c pada HCC menyebabkan penurunan ekspresi gen GNAI1 sehingga metastasis dan proliferasi meningkat.<sup>13</sup> Peningkatan miR-320c juga ditemukan pada sel kanker pankreas yang resisten terhadap gemcitabine melalui mekanisme SMARCC1 yaitu suatu komponen dari *chromatin remodeling complex*. Gen SMARCC1 berperan sebagai tumor suppressor pada kejadian kanker pankreas.<sup>15</sup>

Peningkatan ekspresi miR-320c pada 8 sampel pasien stadium awal kemungkinan disebabkan oleh ekspresi mikroRNA pada setiap orang yang dipengaruhi oleh subtype tumor, data klinis, serta kemoresisten.<sup>16</sup> Peningkatan ekspresi tersebut juga kemungkinan berhubungan dengan protein yang berperan dalam metastasis, seperti ZEB1 yang menekan E-cadherin. Penurunan miR-320c pada stadium lanjut memiliki hubungan dengan metastasis pada kanker ovarium karena terjadi penurunan E-cadherin. Protein E-cadherin merupakan molekul yang berperan dalam adhesi sel pada jaringan epitel. Terdapat pada permukaan sel epitel dan berperan penting pada kontak antar sel. Penurunan ekspresi E-cadherin berhubungan dengan peningkatan invasi dan metastasis tumor.<sup>17</sup> Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang ekspresi miR-320c pada berbagai stadium kanker ovarium dan hubungannya dengan ekspresi protein ZEB1 serta E-cadherin.

## SIMPULAN DAN SARAN

Terjadi peningkatan ekspresi miR-320c pada 8 sampel stadium awal kanker ovarium sedangkan pada stadium lanjut terjadi penurunan ekspresi. Peningkatan ekspresi bisa dihubungkan dengan sifat miR-320c sebagai onkomiR pada stadium awal dan sebagai *tumor suppressor* pada stadium lanjut. Perbedaan tersebut dapat menjadikan miR-320c sebagai kandidat biomarker pembeda antara stadium awal dan lanjut kanker ovarium.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang ekspresi miR-320c pada berbagai stadium kanker ovarium untuk melihat

perbedaan ekspresi miR-320c pada setiap stadium kanker ovarium. Serta perlu penelitian lebih lanjut tentang ekspresi mikroRNA pada tipe histologis endometrioid dan clear cell agar didapatkan profil ekspresi mikroRNA pada ke-empat tipe histologis kanker ovarium di Indonesia.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penelitian ini, terutama perawat di RSUP Dr. Sardjito dan para *volunteer*. Penelitian ini dibiayai oleh Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran, Kementerian Kesehatan Indonesia, 2016.

### DAFTAR PUSTAKA

- Jayson, G., Kohn, E.C., Kitchener, H.C., & Lederman, J.A. Ovarian cancer. *Lancet*. 2014; 384: 1376-88.
- Bast, R.C., Hennessy, B., & Mills, G.B. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature Review Cancer*. 2009;9: 415-428.
- Engel, J., Eckel, R., Schubert-Fritschle, G., Kerr, J., Kuhn, W., Diebold, J., et al. Moderate progress for ovarian cancer in the last 20 years: prolongation of survival, but no improvement in the cure rate. *European Journal of Cancer*. 2002;38(2002): 2435-2445.
- Bhatt, A.N., Mathur, R., Farooque, A., Verma, A., & Dwarakanath, B.S. Cancer biomarkers-current perspectives. *Indian Journal of Medical Research*. 2010;132: 129-149.
- Dutta, S., Wang, F., Phalen, A., & Fishman, D.A. Biomarkers for ovarian cancer detection and therapy. *Cancer Biology & Therapy*. 2010;9(9): 668-677.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomic, Biogenesis, Mechanism, And Function. *Cell*. 2004;116: 281-297.
- Friendman, R.C., Farh, K.K.H., Burge, C.B., & Bartel, D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. 2009;19(1): 92-105.
- Zhang, H. Zuo, Z., Lu, X., Wang, L., Wang, H., & Zhu Z. MiR-25 regulates apoptosis by targeting Bim in human ovarian cancer. *Oncology Report*. 2012;27: 594-598.
- Cheng, H.H., Son Yi, H., Kim, Y., Kroh, E.M., Chien, J.W., M Eaton, K.D., et al. Plasma processing condition substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *Plos one*. 2013;8(6): e64795.
- Falcone, G., Felsani, A., D'Agnano, I. Signaling by exosomal microRNA in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2015;34.
- Wang, J., Zhang, K.Y., Liu, S.M., & Sen, S. Tumor-Associated Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Cancer. *Review. Molecules*. 2014; 19: 1912-1938.
- Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 2001;25: 402-408.
- Yao, J., Liang, L., Zhang, Y., Ding, J., Tian, Q., Li, J., & He, X. GNAI1 suppresses tumor cell migration and invasion and is post transcriptionally regulated by miR-320a/c/d in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biology & Medicine*. 2012;9: 234-241.
- Chugh, P. & Dittmer, D.P. Potential pitfalls in microRNA profiling. *WIREs RNA*. 2012: 1-6.
- Iwagami, Y., Eghuci, H., Nagano, H., Akita, H., Hama, N., Wada, H., et al. MiR-320c regulates gemcitabine-resistance in pancreatic cancer via SMARCC1. *British Journal of Cancer*. 2013;109: 501-511.
- Dileva, G., & Croce, C.M. The Role of microRNAs in the Tumorigenesis of Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2013;3: 153.
- Slaus-Pecina N. Tumor Suppressor Gene E-Cadherin And Its Role In Normal And Malignant Cells. *Cancer Cell International*. 2003;3(17): 1-7.

