

IDENTIFIKASI VARIAN G10398A GEN ND₃ DNA MITOKONDRIA PADA PENDERITA KANKER PAYUDARA

Ni Wayan Tianing

Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

ABSTRAK

Gen ND₃ adalah gen yang terdapat pada DNA mitokondria dan menyandi enzim NADH dehidrogenase yang terdapat pada kompleks I rantai respirasi dan terlibat pada proses oksidasi fosforilasi mitokondria untuk sintesa ATP (Adenosin Triphosfat). Adanya varian G10398A pada mtDNA menyebabkan terjadinya perubahan asam amino dari alanin (GCC) menjadi treonin (ACC). Perubahan ini dapat menginduksi meningkatnya ROS (Reactive Oxygen Species) di mitokondria. ROS dapat mengoksidasi DNA, menyebabkan mutasi pada DNA dan juga menyebabkan stres oksidatif dan kanker. Akibat lain dari ROS adalah mempengaruhi redox-cycling metabolisme estrogen. Individu yang mempunyai varian G10398A dihubungkan dengan resiko terjadinya kanker payudara sebesar 60%. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi varian G10398A dan proporsinya pada gen ND₃ dengan metode deskriptif non eksperimen dengan jumlah sampel 32 dan 5 kontrol. Penelitian dilakukan dengan serangkaian kerja: isolasi dan amplifikasi DNA total, elektroforesis, sekuensing dan analisis varian dilakukan dengan membandingkan hasil penelitian dengan *gen-bank*. Hasil penelitian ditemukan varian G10399A yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino serin (AGC) menjadi asparagin (AAC) ditemukan pada 16 sampel. Varian lain yang ditemukan adalah C10401T yang menyebabkan perubahan asam amino dari arginin (CGA) menjadi triptopan (TGA) pada 14 sampel. Terhadap kontrol ditemukan 2 kontrol mempunyai varian G10399A, 2 kontrol C10401T dan 1 kontrol sesuai dengan *gen-bank*, sehingga hasil penelitian ini berbeda dengan yang ditemukan oleh Jeffrey Canter. Homologi gen ND₃ yang diamplifikasi rata-rata 96%. [MEDICINA. 2012;43:158-62].

Kata kunci: Gen ND₃, varian G10398A dan kanker payudara

IDENTIFICATION OF G10398A VARIAN OF ND₃ GENE MITHOCONDRIA DNA IN BREAST CANCER PATIENT

Ni Wayan Tianing

Departement of Biochemistry, Medical School, Udayana University

ABSTRACT

ND₃ gene is a mitochondria DNA gene which code for NADH dehydrogenase enzyme, part of complex 1 respiratory chain oxidation and involved in phosphorylation process to synthesize ATP (Adenosin Triphosfat). The present of G10398A variant at mtDNA result in changing the amino acid code for alanine (GCC) to threonine (ACC). This changing induce elevation the ROS (Reactive Oxygen Species) concentration in mitochondria. ROS can cause oxidation of DNA, mutation of DNA, oxidative stress and cancer. The other effect of ROS can affect redox-cycling estrogen metabolism. Individual with G10398A variant has 60% risk for breast cancer. The purpose of this research are to identify G10398A variant and its proportion in ND₃ gene with non experimental descriptive method within 32 samples and 5 control. This research has done with sequence of steps with an isolation and total DNA amplification electrophoresis, sequencing and analysis by comparing with gene bank. This research identify G10399A variant that causes changing code from serine (AGC) amino acid in to asparagines (AAC) in 16 samples. Another variant found in this research is C10401T variant the cause changing in codon that code from arginin (CGA) in to triptopan (TGA) within 14 samples. In the control groups 2 samples identify with G10399A variant, 2 samples with C10401T and 1 control match like *gene-bank*. For this research, ND₃ gene homology that was amplified found in the average of 96%. [MEDICINA. 2012;43:158-62].

Keywords: ND₃ gene, G10398A variant and breast cancer

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker terbanyak kedua dan masih merupakan penyebab kematian tertinggi kedua sebagai akibat kanker pada wanita di negara barat.^{1,2} Hal ini juga terjadi di Indonesia.³

Di Bali (Denpasar) jumlah prevalensi kanker payudara juga terus meningkat. Angka prevalensi ini mungkin juga diikuti oleh kenaikan angka insiden, meskipun data pasti bersifat komunitas belum tersedia. Usaha pencegahan primer dan sekunder yang berupa pendidikan masyarakat dan pendidikan tenaga profesional, serta usaha deteksi dini (mass screening program) terhadap kanker payudara hingga saat ini belum memberikan hasil yang optimal. Program deteksi dini yang berhasil hanya pada tingkat stadium awal, namun lebih dari 70% penderita kanker payudara datang ke Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) Sanglah Denpasar Bali, berada dalam stadium III.⁴ Kondisi ini mempersulit pengobatan dan akan memberikan hasil pengobatan yang mengecewakan, serta biaya pengobatan semakin tinggi.

Mengingat tingkat kesulitan dalam penyembuhan kanker payudara sangat tinggi khususnya yang sudah stadium lanjut (metastase), maka perlu dicari solusi untuk menanggulangi hal tersebut yaitu dengan cara mengetahui awal (deteksi dini) munculnya kanker payudara sehingga perkembangan dan penyebaran kanker dapat ditekan dan dicegah, pengobatan bisa dilakukan

lebih awal dan diharapkan tingkat kesembuhan lebih tinggi serta biaya lebih murah. Penelitian ini nantinya diharapkan dapat menekan perkembangan dan jumlah penderita kanker payudara di masyarakat. Adapun metode yang digunakan adalah melalui analisis DNA (pendekatan sampai tingkat molekuler) terutama bagi yang mempunyai riwayat kanker payudara dikeluarganya. Selanjutnya analisis ini nantinya digunakan untuk uji tapis baik yang mempunyai riwayat kanker payudara maupun yang tidak dimasyarakat.

Peneliti yang telah menghubungkan antara kanker payudara dengan mutasi pada mtDNA adalah: Bianchi tahun 1995, Jeffrey Canter pada tahun 2005. Bianchi mendapatkan adanya delesi pada beberapa gen di dalam mtDNA sedangkan Jeffrey mendapatkan adanya varian dari guanin menjadi adenin pada posisi nukleotida 10398 (G10398A) yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino dari alanin (GCC) asam amino yang mengandung gugus R (metil) non polar menjadi treonin (ACC) asam amino yang mengandung gugus R polar. Varian ini diindikasikan meningkatkan risiko terjadinya kanker payudara pada individu tersebut sebesar 60%.⁵⁻⁹

Gen ND₃ adalah gen yang menyandi enzim NADH dehidrogenase yang terdapat pada mtDNA dengan panjang 346 bp dan berfungsi untuk menyediakan blue print sebagai komponen penting enzim NADH dehidrogenase (Jeffrey Canter, 2005). Secara biokimia gen ND₃ adalah protein awal/protein kompleks I yang

dibutuhkan dalam transpot elektron di dalam mitokondria untuk karena dalam sintesa ATP transport. Selanjutnya elektron ini merupakan ekwivalen pereduksi dalam proses oksidasi fosforilasi (OXPHOS) untuk sintesa ATP pada kompleks V.^{7,8} Akibat adanya varian G10398A menyebabkan fungsi dari gen ND₃ mengalami kelainan, menyebabkan transport elektron tidak sempurna dan dapat terbentuk senyawa oksigen yang reaktif /oksidan yang memicu terjadinya stres oksidatif (bila kadarnya melebihi jumlah antioksidan di dalam tubuh). Dampak selanjutnya dari stres oksidatif adalah memicu keadaan patologis seperti kanker payudara. Peningkatan ROS di mitokondria juga dapat mempengaruhi metabolisme estrogen di dalam sel yang juga diduga dapat memicu terjadinya kanker payudara.^{5,8,10} Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui profil dan proporsi gen ND₃ mtDNA pada penderita kanker payudara di Denpasar. Hasil penelitian nantinya diharapkan dapat memberikan informasi serta dapat dikembangkan pada penelitian lebih lanjut sehingga dapat dikembangkan sebagai genetic marker untuk ras/etnik Bali khususnya dan Asia umumnya.

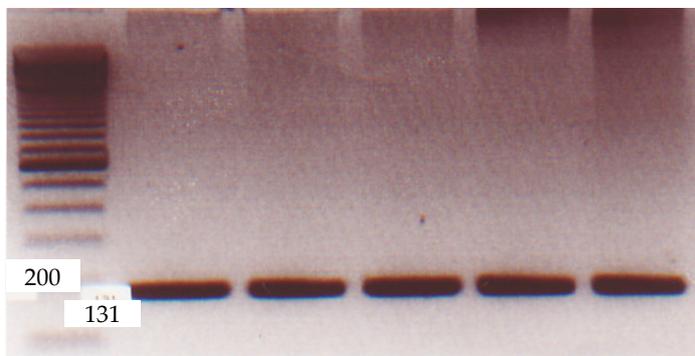
BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi molekuler FK Unud dan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta, selama kurang lebih satu tahun. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif non-experimen. Pengambilan sampel dilakukan di RSUP Sanglah Denpasar. Sampel

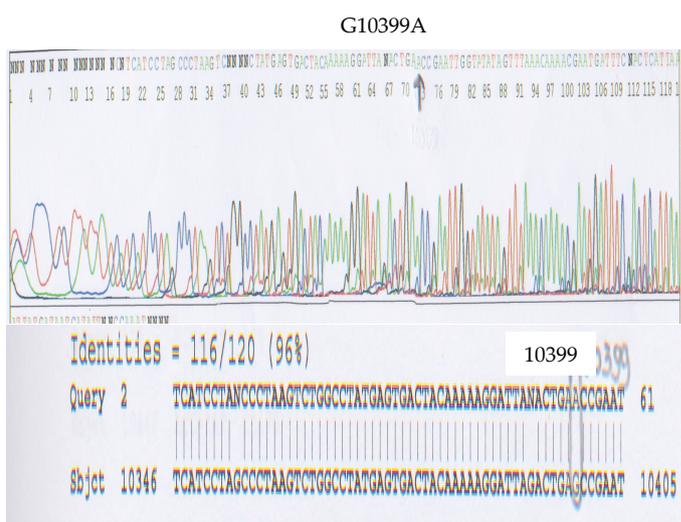
adalah darah penderita kanker payudara wanita (grade I-IV) berumur 35–65 tahun. Besar sampel 32 dengan 22 etnik Bali

10 etnik Jawa Jumlah kontrol 5. Penelitian ini dilakukan dengan serangkaian kerja: Isolasi DNA total menggunakan metode Pure-gene,¹¹ amplifikasi dan

sekuensing untuk deteksi mutasi dan dianalisis dengan membandingkan sekuen sampel dengan gen-bank menggunakan tehnik BLAST. Hasil BLAST dihitung varian dan proforsi gen ND₃ dan disimpulkan.



Gambar 1. Elektroforesis hasil amplifikasi sampel. menggunakan gel agarose 2% tegangan 100 volt, 45 menit.



Gambar 2. Hasil sekuensing dalam bentuk elektroserogram terhadap sampel.

Tabel. Distribusi varian gen ND₃ pada penderita kanker payudara di Denpasar

Nomer Sampel	Total Sampel	Varian gen ND ₃		
		A10399A	G10399A	C10401T
1,3,5,8,10,12,13,16,24,25,26,28,29,30,31,32	16	--	++	--
4,6,7,11,14,15,17,18,20,21,22,23,27	14	--	--	++
2,19	2	++	--	--
Total Sampel	32	2	16	14

Keterangan. Ditemukan 2 varian: G10399A dan C10401T. 2 sampel (2, 19) urutan nukleotidanya sesuai dengan gen-bank). (++) artinya terjadi perubahan nukleotida pada posisi tersebut dan menyebabkan perubahan asam amino; (-) tidak terjadi perubahan nukleotida pada posisi tersebut dan tidak menyebabkan perubahan asam amino.

HASIL

Hasil pengamatan sampel, mendapatkan umur penderita 36-65 tahun, namun penderita terbanyak berumur antara 35–55 tahun. Pada isolasi DNA total mendapatkan hasil isolasi sangat bagus dengan OD rerata 1,90 yang diukur pada 260/280 nm dan hasilnya memenuhi syarat untuk di amplifikasi (syarat OD/kemurnian yang bagus untuk dapat dilakukan amplifikasi 1,88–2,0).

Hasil amplifikasi memunculkan amplicon (pita/band) dari hasil elektroforesis dan sesuai dengan kriteria primer yang digunakan. Hal ini menyatakan bahwa amplifikasi berhasil baik seperti terlihat pada **Gambar 1**.

Hasil sekuensing terhadap semua sampel memunculkan elektroserogram secara komplit dan jelas, hal ini menyatakan bahwa sekuensing berhasil baik seperti terlihat pada **Gambar 2**.

Hasil sekuensing selanjutnya dianalisis dengan membandingkan antara sekuen sampel dengan gen-bank (menggunakan tehnik BLAST) seperti terlihat pada tabel di samping.

DISKUSI

Hasil analisis dan perhitungan varian pada sampel di atas tidak menemukan varian

G10398A melainkan ditemukan varian seperti; G10399A yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino dari serin (AGC) menjadi asparagin (AAC) pada 16 sampel. Varian lain adalah C10401T yang menyebabkan perubahan asam amino dari arginin (CGA) menjadi triptopan (TGA). Varian ini ditemukan sebanyak 14 sampel dan 2 sampel sesuai dengan gen-bank. Pada kontrol ditemukan 2 sampel mempunyai varian G10399A 2 sampel dengan varian C10401T dan 1 kontrol sesuai dengan gen-bank.

Hasil analisis sampel tidak menemukan perbedaan yang prinsip antara varian yang ditemukan pada etnik Bali dengan non-etnik Bali. Hal ini karena varian yang ditemukan pada etnik Bali juga ditemukan pada non etnik Bali.

Keterlibatan reactive oxygen species (ROS) dan juga aktivitas enzim yang menyandi gen ND₃ dalam proses terjadinya kanker payudara mungkin sangat erat hubungannya walaupun hubungan ini masih perlu dibuktikan secara analisis melalui penelitian lebih lanjut, yang nantinya diperlukan pembahasan lebih mendalam tentang keterlibatan varian G10399A dan C10401T terhadap terjadinya kanker payudara, mengingat gen ND₃ menyandi sebuah enzim yang bekerjanya dipengaruhi oleh beberapa faktor dan apakah varian tersebut mempengaruhi sisi aktif pengikatan enzim dengan substrat yang selanjutnya mempengaruhi kerja/aktivitas serta ekspresi gen tersebut, semua hal ini membutuhkan penelitian lebih lanjut.⁷⁻¹⁰

SIMPULAN

Hasil penelitian tidak ditemukan varian G10398A tetapi ditemukan 2 varian seperti: G10399A yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino serin (AGC) menjadi asparagin (AAC) varian ini ditemukan sebanyak 16 sampel. Varian C10401T yang menyebabkan perubahan asam amino dari arginin (CGA) menjadi triptopan (TGA) varian ini ditemukan sebanyak 14 sampel dan 2 sampel sesuai dengan gen-bank. Varian ini juga ditemukan pada kontrol (dengan jumlah masing-masing varian 2) dan 1 kontrol sesuai dengan gen-bank.

Homologi sampel didapatkan sebesar rata-rata 96% yang artinya bahwa gen ND₃ yang di amplifikasi pada sampel identik dengan gen-bank.

SARAN

Diperlukan penelitian lanjutan dengan menggunakan sampel lebih banyak dan primer/sequence DNA yang dapat mengamplifikasi semua gen ND₃ dan pengukuran aktivitas enzim NADH dehidrogenase serta total oksidan pada penderita kanker payudara.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIRJEN DIKTI yang telah memberi dana penelitian Bapak Ketua LEMLIT Unud, Bapak Dekan dan ketua LITBANG FK Unud, Bapak Kepala Bagian beserta Staf Biokimia yang telah membantu dan memberi ijin dalam melaksanakan penelitian

ini serta teman-teman yang tidak bisa peneliti sebutkan satu per satu yang telah membantu dalam melaksanakan dan menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Alberg AJ, Lam A, Helzlsouer KJ. Epidemiology Prevention and early detection of Breast cancer. *Current Opinion in Oncology*. 1999; 11(6):435-41.
2. Gradishar WJ. Male Breast Cancer. Dalam: Harris JM, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, penyunting. *Disease of Breast*. Edisi ke-3. Philadelphia: Lippincott William & Wilkin, 2004; h. 983-90.
3. Sarjati, Padmini Trihartini. Cancer Registration In Indonesia. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*. 2001;2:21-4.
4. Sudarsa Wayan. Respon dari Locally Advanced Breast Cancer (LABC) Terhadap Pemberian Neoadjuvant Chemotherapy. Makalah akhir dan dipresentasikan pada ujian akhir Pendidikan Bedah Onkology di UNHAS, th 2000. Buku terdapat pada Divisi Bedah Onkologi, FK Unud/RSUP Sanglah Denpasar.
5. Bianchi, Baillet. Mitochondria DNA mutation in normal and cancer tissue from Breast Cancer Patient. *Instituto Multidisciplinario de Biologia Celular, la Plata Argentina*. *Citogenet Cell*

- Cenet. 1995;71:99-103.
6. Ren-Kui Bai, Suzanne M. Leal, Daniel Covarrubias, Aiyi Liu, Lee-Jun C. Wong. Mitochondrial Genetic Background Modifies Breast Cancer Risk Cancer Research 67,4687, May 15 2007. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3554 2007 American Association for Cancer Research.
 7. Teguh Nugroho Jenny Go, Budijanto, Widjayanto. Info Sehat. Buletin triwulan edisi ke 5 Januari 2000.
 8. Jeffrey Canter. Breast cancer Risk increased For African-Americans with Mitochondrial DNA Variant, 2005. Diunduh dari: [http:// w.w.w.sciencedaily. Com/release /2005/09/050901072326. htm](http://w.w.w.sciencedaily.Com/release/2005/09/050901072326.htm).
 9. Robert K, Murray, Daryl K, Granner MD, Peter A Mayes, Victor W Rodwell. Harper's Illustrated Biochemistry. Edisi ke-27. New York: Mc Graw Hill, 2006; h. 49-59.
 10. Suryohudoyo Purnomo. Kapita selekta Ilmu Kedokteran Molekuler. Jakarta: Penerbit CV INFOMRDIKA ISSN, 2000; h.31-47.
 11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning Laboratory Manual. Edisi ke-2. NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.