

VALIDASI METODE METHYLATION-SPECIFIC PCR DENGAN SEQUENCING UNTUK DETEKSI METILASI GEN RASSF1 PADA PASIEN KANKER PAYUDARA

Mulya Sari^{1*} · Puji Lestari² · Radhita Karima³

¹D IV Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Jakarta III, Jawa Barat, Indonesia

²Laboratorium Penelitian dan Pengembangan, Rumah Sakit Kanker Dharmais, DKI Jakarta, Indonesia

e-Mail: mlysari@gmail.com

No Tlp WA : 085767008669

Abstract

Metastasis in breast cancer can occur due to epigenetic events, namely DNA methylation, which causes the inactivation of tumour suppressor genes. One gene that can be used as a marker for metastasis in breast cancer is the RASSF1 gene (tumour suppressor gene). Methylation can be identified using molecular-based methods like real-time PCR, MSP, and sequencing. Methylation-specific PCR (MSP) is a simple and affordable methylation detection method with high sensitivity. However, the result's accuracy depends on the DNA band visualization. Visualization failure can occur if the number of amplicons is too small. So, validation using sequencing as the gold standard is needed to ensure that the MSP technique accurately detects methylation. This study aims to determine the accuracy of the MSP method in detecting RASSF1 gene methylation in breast cancer. This descriptive observational study with a cross-sectional design was conducted at the Research and Development Department of the Dharmais Cancer Hospital (RSKD) in January-June 2023. The specimens used were 16 breast cancer tissues. The results of this study show that the methylation status of the RASSF1 gene in all samples detected by the sequencing method corresponds to the results of the MSP method, namely fully methylated. Thus, it is proven that the MSP method can be used to detect methylation status as an alternative to sequencing methods.

Keywords : Breast cancer, RASSF1 gene methylation, MSP, Sequencing

Abstrak

Metastasis pada kanker payudara dapat terjadi karena peristiwa epigenetik yaitu metilasi DNA yang menyebabkan inaktivasi gen tumor supresor. Salah satu gen yang dapat digunakan sebagai penanda terjadinya metastasis pada kanker payudara adalah gen RASSF1 (gen tumor supresor). Metilasi dapat diidentifikasi menggunakan metode berbasis molekuler, misalnya *real time* PCR, MSP, dan *sequencing*. *Methylation-specific* PCR (MSP) merupakan metode deteksi metilasi yang sederhana dengan biaya terjangkau, serta memiliki sensitivitas tinggi. Namun akurasi hasilnya sangat bergantung pada visualisasi *band* DNA. Kegagalan visualisasi dapat terjadi jika jumlah amplicon terlalu sedikit, sehingga diperlukan validasi menggunakan *sequencing* sebagai *gold standard* untuk memastikan bahwa teknik MSP yang digunakan akurat dalam mendeteksi terjadinya metilasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui akurasi dari metode MSP dalam mendeteksi metilasi gen RASSF1 pada kanker payudara. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observasional dengan desain *cross-sectional* yang dilakukan di Bagian Penelitian dan Pengembangan Rumah Sakit Kanker Dharmais (RSKD) pada Januari-Juni 2023. Spesimen yang digunakan berjumlah 16 jaringan kanker payudara. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa

status metilasi gen RASSF1 pada keseluruhan sampel yang dideteksi dengan metode *sequencing* bersesuaian atau sama dengan hasil metode MSP, yaitu *fully methylated*. Hal ini membuktikan bahwa metode MSP dapat digunakan untuk mendeteksi status metilasi, sebagai alternatif metode *sequencing*.

Kata Kunci : Kanker payudara, Metilasi, Gen RASSF1, MSP, *Sequencing*

PENDAHULUAN

Kanker payudara adalah salah satu kanker yang paling umum pada wanita di seluruh dunia, yang menyebabkan sekitar 570.000 kematian pada tahun 2015 (Sun et al., 2017). Berdasarkan data Global Cancer Observatory (2020), insiden kanker payudara pada wanita di Indonesia dari segala umur sebanyak 65.858 ribu (16,6%) dengan angka mortalitas mencapai 22.430 ribu (20,4%) dari total kasus, serta prevalensi selama lima tahun terakhir sebanyak 201.143 ribu (36,1%). Berdasarkan data tersebut, kanker payudara menempati urutan pertama sebagai jumlah kanker terbanyak di Indonesia, serta menjadi salah satu penyumbang kematian tertinggi kedua akibat kanker. Menurut Scully et al. (2012), metastasis merupakan penyebab utama kematian pada kanker payudara. Metastasis merupakan proses penyebaran sel kanker dari tumor primer ke bagian tubuh/organ lainnya melalui sirkulasi darah atau sistem limfatik. Tingkat kelangsungan hidup (*survival rate*) pasien kanker payudara akan lebih baik apabila didiagnosis sejak dini, karena kanker cenderung bermetastasis sehingga dapat memperburuk prognosis pasien (Els, 2022).

Pemeriksaan berbasis molekuler untuk kanker telah berkembang pesat, hal ini karena beberapa perubahan genetik maupun epigenetik terlibat dalam mekanisme perkembangan kanker (karsinogenesis). Menurut Sun et al. (2017), salah satu peristiwa epigenetik yang terlibat dalam karsinogenesis adalah metilasi DNA yang terjadi pada awal karsinogenesis. Metilasi yang terjadi pada nukleotida sitosin situs CpG daerah promotor gen mengakibatkan penurunan ekspresi atau inaktivasi gen tumor supresor. Metilasi tersebut juga terjadi pada kanker payudara dan diketahui terjadi di

awal karsinogenesis (Salvi et al., 2016; Shen et al., 2016; Han et al., 2018; Saelee & Pongtheerat, 2020). Metilasi pada kanker payudara telah banyak dipelajari dengan tujuan untuk menemukan penanda biologis (biomarker) untuk kanker tersebut (Liyana et al., 2019; Vietri et al., 2021).

Salah satu gen tumor supresor yaitu *Ras association domain family 1* (RASSF1) yang terletak di kromosom 3p21.3. Gen tersebut mengkode protein yang dapat memengaruhi inisiasi dan perkembangan kanker. Gen ini memiliki delapan isoform, namun hanya RASSF1A dan RASSF1C yang paling banyak diekspresikan di dalam sel (Raos et al., 2021). Melalui *Rho family signalling pathways*, RASSF1A terlibat dalam regulasi migrasi dan invasi sel, hal ini menjelaskan mengapa hilangnya ekspresi RASSF1A dapat menyebabkan metastasis (García-Gutiérrez et al., 2020). Beberapa penelitian menunjukkan metilasi gen RASSF1 dapat dijadikan sebagai biomarker. Penelitian yang dilakukan oleh Fackler et al. (2014) menggunakan serum pasien pada pasien kanker payudara metastatik didapatkan hasil metilasi RASSF1A sebesar 70% (40 dari 57 sampel). Lalu pada studi yang dilakukan oleh Hagrass et al. (2014) dengan metode *methylation-specific* PCR ditemukan metilasi RASSF1A di jaringan dan serum pada pasien kanker payudara masing-masing adalah 70% dan 63,3%. Kemudian pada meta-analisis oleh Li et al. (2019) menyimpulkan bahwa metilasi RASSF1A berpotensi untuk digunakan sebagai biomarker prognosis yang potensial untuk kanker payudara.

Deteksi dan identifikasi metilasi DNA dapat dilakukan dengan beberapa teknik molekuler, diantaranya *methylation-specific* PCR (MSP), *quantitative methylation-specific* PCR (qMSP), dan *sequencing* (Šestáková, Šálek & Remešová, 2019). Metode *methylation-specific* PCR (MSP) memiliki keunggulan diantaranya pengerjaannya yang mudah, sensitivitas tinggi, fleksibilitas dalam memilih wilayah untuk analisis, efektivitas waktu, dan biaya yang terjangkau. Namun, kekurangan dari metode ini adalah hasilnya

yang kualitatif dimana penentuan status metilasi berdasarkan visualisasi *band* DNA. Selain itu, metode ini tidak mampu menentukan persentase metilasi (Khodadadi et al., 2021; Pajares et al., 2021). Jika jumlah persentase metilasi kecil, maka besar kemungkinan akan terdeteksi normal pada hasil MSP, meskipun sebenarnya terdapat metilasi.

Persentase metilasi dapat ditentukan menggunakan metode qMSP. Metode ini menggabungkan metode MSP dengan probe TaqMan. Dua probe digunakan untuk berikatan secara spesifik pada sekuens DNA. Kelebihan dari metode qMSP yaitu sangat spesifik dan pengerjaannya yang lebih cepat daripada metode MSP. Namun, metode ini relatif mahal karena penggunaan probe dan tidak dapat memberikan informasi tentang status metilasi masing-masing situs CpG (Šestáková et al., 2019; Sigalotti et al., 2019)

Untuk mengetahui status metilasi tiap situs CpG dapat menggunakan metode *sequencing*. Metode ini merupakan *gold standard* untuk deteksi metilasi DNA karena memberikan pendekatan kuantitatif dan efisien untuk mengidentifikasi status metilasi (Y. Li & Tollefsbol, 2011). Selain dapat menilai status metilasi di setiap situs CpG, kelebihan dari metode ini yaitu mampu menilai keberhasilan konversi bisulfit DNA. Namun, metode ini menggunakan instrumen yang mahal dan prosedur pengerjaan yang panjang serta kompleks (Gouil & Keniry, 2019).

Pilihan metode yang tepat tergantung pada kebutuhan dan teknologi yang tersedia di laboratorium (Sigalotti et al., 2019). *Methylation-specific* PCR (MSP) merupakan metode paling sederhana, dimana sumber daya yang diperlukan umumnya tersedia di sebagian besar laboratorium molekuler seperti mesin *thermal cycler*, *chamber* elektroforesis, dan instrumen lain yang biasanya digunakan pada PCR konvensional. Tetapi, kemampuan metode MSP untuk secara akurat menentukan status metilasi hanya didasarkan oleh visualisasi *band* DNA. Jika amplikon yang dihasilkan terlalu sedikit, maka *band* DNA dapat tidak tervisualisasikan pada elektroforesis gel

agarosa (Magdeldin, 2012). Oleh sebab itu, peneliti tertarik untuk memvalidasi metode MSP dengan metode Sanger *sequencing*. Validasi ini bertujuan untuk menilai akurasi dari metode MSP dalam mendeteksi metilasi.

BAHAN DAN METODE

Metode penelitian adalah deskriptif observasional dengan desain *cross sectional*. Sampel yang digunakan berjumlah 16 jaringan kanker payudara yang tersimpan di *biobank* Rumah Sakit Kanker Dharmais (RSKD). Prosedur penelitian dimulai dengan ekstraksi DNA mengikuti protokol QIAamp DNA Mini & Blood Kit (LOT: 160031233). Hasil ekstraksi DNA kemudian dikonversi dengan natrium bisulfit menggunakan protokol EpiTect® Plus DNA Bisulfite Kit (LOT: 172034905). Konsentrasi ssDNA yang diperoleh diukur dengan NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific). Hasil konversi DNA ini yang akan digunakan sebagai *template* pada *methylation-specific* PCR (MSP). Pengerjaan MSP diawali dengan pembuatan *master mix* masing-masing untuk dua pasang primer berbeda yaitu primer *methylated* (primer M) dan primer *unmethylated* (primer U) (Hagrass et al., 2014). Berikut adalah sekuens primer *methylated* RASSF1 dengan panjang produk 269 bp dan suhu annealing 52°C; primer RASSF1 (M) *forward* 5'-GGTTTTTTTTAGTTTTTTTTTCGTC-3' dan primer RASSF1 (M) *reverse* 5'-CTACCGTATAAAATTACACGC-3'. Berikut adalah sekuens primer *unmethylated* RASSF1 dengan panjang produk 271 bp dan suhu annealing 53°C; primer RASSF1 (U) *forward* 5'-TGGTTTTTTTTAGTTTTTTTTTGTT-3' dan primer RASSF1 (U) *reverse* 5'-ACTACCATATAAAATTACACACA-3'.

Methylation-specific PCR (MSP) dilakukan sesuai dengan protokol EpiTect® MSP Kit (LOT: 142347565). Komponen *master mix* dengan volume total sebanyak 25 µL sebagai berikut; 12,5 µL EpiTect Master Mix (2X), 0,75 µL primer *forward* (10 µM), 0,75 µL primer *reverse* (10 µM), 10 µL RNase-

free water, dan 1 μL *template* DNA (<100 ng/25 μL reaksi). Program MSP pada mesin *thermal cycler* ProFlex (Thermo Scientific) diatur sebagai berikut; pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 10 menit; dilanjutkan dengan 40 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 52°C (primer M) dan 53°C (primer U) selama 30 detik, dan *extension* pada suhu 72°C selama 30 detik; diakhiri dengan satu siklus *final extension* pada suhu 72°C selama 10 menit.

Produk MSP kemudian divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa dan GelDoc Biorad. Hasil yang diharapkan adalah *single band* DNA dengan panjang produk termetilasi seluruhnya (*fully methylated*) dan tidak termetilasi (*unmethylated*) berturut-turut adalah 269 bp dan 271 bp. Apabila kedua *band* DNA muncul bersamaan maka diidentifikasi termetilasi sebagian (*partially methylated*). Kemudian hasil tersebut divalidasi dengan *Sanger sequencing*.

Sanger sequencing digunakan untuk mengidentifikasi susunan nukleotida DNA (sekuens) dengan cara membandingkan sekuens dari sampel dengan sekuens yang ada pada *gene bank*. DNA yang akan ditentukan urutan sekuensnya dijadikan sebagai *template* untuk kemudian diamplifikasi. Modifikasi DNA dengan konversi bisulfit dilakukan terlebih dahulu kemudian diamplifikasi dengan PCR yang menyebabkan urasil berubah menjadi timin sehingga metilasi DNA dapat dibaca langsung dengan metode Sanger. Proses *sequencing* diawali dengan PCR untuk mengamplifikasi *template* DNA RASSF1 yang telah dikonversi bisulfit menggunakan sepasang primer RASSF1 *bisulphite sequencing* (Zhang et al., 2014). Sekuens primer sebagai berikut; RASSF1 (BF) 5'-AGTTTTTGTATTTAGGTTTTTATTG-3' dan RASSF1 (BR) 5'-AACTCAATAAACTCAAACCTCCCC-3'. PCR dilakukan menggunakan protokol HotStarTaq® DNA *Polymerase* (LOT: 172011386). Komponen *master mix* dengan volume total sebanyak 25 μL sebagai berikut; 5 μL *Buffer* PCR (10X); 5 μL *Q solution*; 0,5 μL dNTPs mix (10 mM); 0,75 μL primer RASSF1 BF (10

μM); 0,75 μL primer RASSF1 BR (10 μM); 0,125 μL HotStart DNA *polymerase*; 10,875 μL RNase-free water; dan 1 μL *template* DNA (<100 ng/25 μL reaksi). PCR *tube* berisi komponen reaksi dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* ProFlex (Thermo Scientific). Program PCR menggunakan protokol PCR *Touch-Up* (Rowther et al., 2012) sebagai berikut; aktivasi awal pada suhu 95°C selama 15 menit; dilanjutkan dengan 10 siklus yang terdiri dari 95°C selama 30 detik, 48°C selama 30 detik (+0,5°C setiap siklus), dan 72°C selama 1 menit. Perulangan 10 siklus dilakukan sebanyak lima kali (50 siklus). Produk PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa dan GelDoc Biorad. Hasil yang diharapkan adalah *single band* DNA dengan panjang produk 191 bp.

Hasil PCR DNA RASSF1 kemudian dipurifikasi sesuai dengan protokol Geneaid GenepHlow™ Gel/PCR Kit (LOT: FF36105). Kemudian konsentrasi dan kemurnian DNA diukur dengan NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific). Selanjutnya dilakukan proses *cycle sequencing* dengan mesin *thermal cycler* Biorad T-100 menggunakan BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (LOT: 1308242). Komponen master mix dengan volume total sebanyak 20 μL sebagai berikut; 10,25 μL RT *Grade Water*; 3,75 μL BigDye 5x *Sequencing Buffer*; primer 3,5 μL (1 μM); 0,5 μL BigDye Ready Reaction Mix; dan 2 μL *template* DNA (5 ng/ μL). Program *thermal cycler* untuk *cycle sequencing* menggunakan protokol yang sudah dioptimasi sebagai berikut; *pre-cycle* pada suhu 37°C selama 15 menit; dilanjutkan dengan 25 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 96°C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama 5 detik, dan *extension* pada suhu 60°C selama 4 menit.

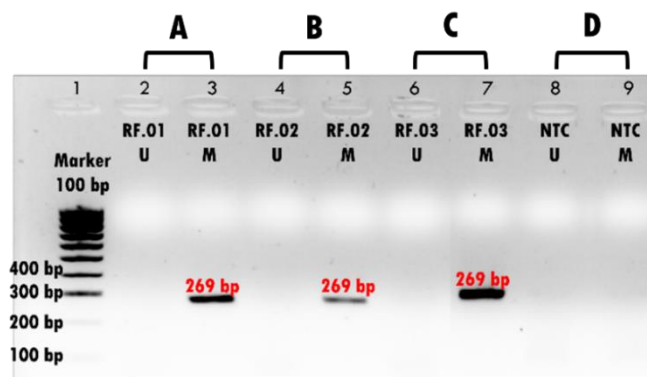
Hasil *cycle sequencing* kemudian dipurifikasi sesuai protokol dari Applied Biosystems Big-Dye XTerminator (LOT: 2009179). Produk *cycle sequencing* (20 μL) ditambahkan 90 μL SAM solution dan 20 μL BigDye XTerminator. Kemudian divortex selama 30 menit, lalu disentrifugasi pada 1000xg selama 1 menit. Supernatan hasil purifikasi *cycle sequencing*

sebanyak 20 μ L kemudian dilakukan Sanger *sequencing* menggunakan alat Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystem) dengan referensi sekuens yang digunakan adalah >NC_000003.12:c50340967-50340777.

Penelitian ini dilakukan berdasarkan kaidah etik dan telah mendapat persetujuan komite etik RSKD melalui surat nomor: 157/KEPK/V/2023. Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk gambar dan tabel, kemudian dianalisis secara deskriptif. Hasil deteksi metilasi dengan metode MSP dikategorikan menjadi tiga yaitu tidak termetilasi (*unmethylated*), termetilasi seluruhnya (*fully methylated*), dan termetilasi sebagian (*partially methylated*). Seluruh sampel yang telah diidentifikasi status metilasinya dengan metode MSP, selanjutnya dilakukan Sanger *sequencing* untuk memvalidasi hasilnya. Analisis data *sequencing* menggunakan *software* SeqScape v.2.7.

HASIL

Hasil visualisasi elektroforesis gel agarosa pada status metilasi gen RASSF1 pada jaringan kanker payudara yang dideteksi dengan metode MSP ditunjukkan oleh Gambar 1.



Gambar 1. Visualisasi Elektroforesis Metilasi Gen RASSF1 Metode MSP

Keterangan:

Kolom 1 menunjukkan marker 100 bp sebagai referensi panjang produk *band* DNA. Hasil *fully methylated* apabila panjang produk primer (M) *single band* DNA 269 bp dan *unmethylated* apabila panjang produk primer (U) *single band* DNA 271 bp. (A) Sampel kode RF.01 status metilasinya *fully methylated* ditunjukkan oleh kolom 3 dengan panjang produk primer (M) adalah *single band* DNA 269 bp dan kolom 2 dengan primer (U) tidak terdapat *band* DNA. (B) Sampel kode RF.02 status metilasinya *fully methylated* ditunjukkan oleh kolom 5 dengan

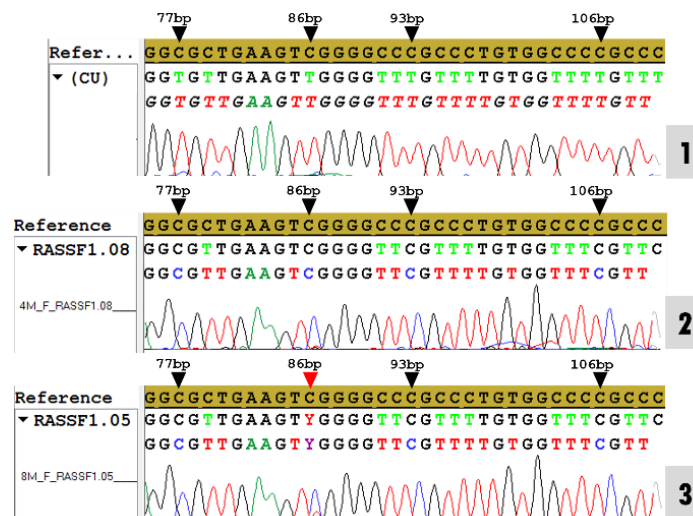
panjang produk primer (M) adalah *single band* DNA 269 bp dan kolom 4 dengan primer (U) tidak terdapat *band* DNA. (C) Sampel kode RF.03 status metilasinya *fully methylated* ditunjukkan oleh kolom 7 dengan panjang produk primer (M) adalah *single band* DNA 269 bp dan kolom 6 dengan primer (U) tidak terdapat *band* DNA. (D) *No template control* (NTC) pada primer (U) dan primer (M) tidak menunjukkan *band* DNA yang artinya tidak terjadi kontaminasi sehingga hasil valid.

Gambar 1. pada kolom 3, 5, dan 7 yang menunjukkan *single band* DNA dengan panjang produk 269 bp merupakan sampel dengan hasil termetilasi seluruhnya (*fully methylated*).

Tabel 1. Distribusi Frekuensi Metilasi Gen RASSF1 Metode MSP

Hasil	N	%
<i>Fully methylated</i>	16	100%
<i>Partially methylated</i>	0	0%
<i>Unmethylated</i>	0	0%
Total	16	100%

Tabel 1. menunjukkan persentase status metilasi gen RASSF1, yaitu didapatkan sampel dengan status *fully methylated* sebanyak 16 sampel (100%). Kemudian, status metilasi tersebut divalidasi dengan metode Sanger sequencing menggunakan alat *genetic analyzer* dan *software* analisis SeqScape v.2.7. Hasil analisis *sequencing* ditunjukkan oleh Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Sequencing Gen RASSF1

Keterangan:

Segitiga hitam menunjukkan situs CpG dan segitiga merah menunjukkan situs CpG yang

termetilasi sebagian. (1) Sampel tidak termetilasi (*unmethylated*) (2) Sampel termetilasi seluruhnya (*fully methylated*) (3) Sampel termetilasi sebagian (*partially methylated*).

Gambar 2. menunjukkan hasil *sequencing* gen RASSF1 yaitu berupa urutan basa nukleotida (sekuens) RASSF1. Sebanyak 16 situs CpG dapat diidentifikasi dari sekuens yang terbaca. Status metilasi pada Gambar 2. diidentifikasi sebagai berikut:

- 1) Nomor 1: Tidak termetilasi (*unmethylated*) yaitu tidak terjadi metilasi di seluruh situs CpG.
- 2) Nomor 2: Termetilasi seluruhnya (*fully methylated*) yaitu terjadi metilasi di seluruh situs CpG.
- 3) Nomor 3: Termetilasi sebagian (*partially methylated*) yaitu tidak terjadi metilasi di sejumlah situs CpG dari total situs CpG yang ada.

Situs CpG yang termetilasi ditunjukkan dengan adanya *single peak* berwarna biru yang mengkode basa sitosin (C). Hal ini menandakan tidak terjadi perubahan 5-metilsitosin (5mC) menjadi urasil (C→C) saat konversi bisulfit sebelumnya. Kemudian, situs CpG yang tidak termetilasi ditunjukkan dengan adanya *single peak* berwarna merah yang mengkode basa timin (T). Hal ini menandakan terjadi perubahan pada sitosin tidak termetilasi menjadi urasil (C→U) saat konversi bisulfit. Pada situs CpG yang memiliki *double peak* (disimbolkan dengan huruf “Y”) artinya sitosin di situs CpG tersebut termetilasi sebagian saja. Sampel yang status metilasinya berhasil diidentifikasi dengan metode MSP disandingkan dengan hasil metode Sanger *sequencing*. Kesesuaian hasil ditunjukkan oleh Tabel 2.

Tabel 2. Status Metilasi Gen RASSF1 dari Metode MSP dan Metode Sanger *sequencing*

No	Kode Sampel	Hasil Pemeriksaan Status Metilasi Gen RASSF1	
		Metode MSP	Metode Sanger <i>sequencing</i>
1	RF.01	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>
2	RF.02	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>
3	RF.03	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>
4	RF.04	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>

No	Kode Sampel	Hasil Pemeriksaan Status Metilasi Gen RASSF1	
		Metode MSP	Metode Sanger sequencing
5	RF.05	<i>Fully methylated</i>	<i>Partially methylated</i>
6	RF.06	<i>Fully methylated</i>	<i>Partially methylated</i>
7	RF.07	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>
8	RF.08	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>
9	RF.09	<i>Fully methylated</i>	<i>Partially methylated</i>
10	RF.10	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>
11	RF.11	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>
12	RF.12	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>
13	RF.13	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>
14	RF.14	<i>Fully methylated</i>	<i>Partially methylated</i>
15	RF.15	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>
16	RF.16	<i>Fully methylated</i>	<i>Fully methylated</i>

Tabel 2. menunjukkan hasil metilasi gen RASSF1 yang telah divalidasi dengan metode Sanger *sequencing* diperoleh hasil *fully methylated* sebanyak 12 sampel (75%) dan *partially methylated* sebanyak 4 sampel (25%). Terdapat 4 sampel yang hasilnya tidak sama dengan hasil metode MSP.

DISKUSI

Metode *methylation-specific* PCR (MSP) dan Sanger *sequencing* merupakan metode berbasis konversi bisulfit DNA. Proses konversi mengubah sitosin (C) tidak termetilasi menjadi urasil (U), sementara sitosin (C) termetilasi tidak berubah sehingga memungkinkan penentuan status metilasi. Keberadaan sitosin pada situs non-CpG sebagai indikator keberhasilan konversi dilihat melalui analisis hasil *sequencing*. Keberhasilan konversi bisulfit DNA sangat penting karena hasil konversi yang tidak sempurna (*incomplete conversion*) akan menyebabkan sitosin yang belum terkonversi diinterpretasikan sebagai sitosin termetilasi yang menyebabkan hasil pemeriksaan status metilasi tidak akurat (Pajares et al., 2021).

Sebanyak 16 (100%) sampel dideteksi status metilasinya *fully methylated* oleh metode MSP. Hasil tersebut kemudian divalidasi

menggunakan metode Sanger *sequencing*. Metode Sanger *sequencing* merupakan *gold standard* yang digunakan untuk validasi karena memiliki keunggulan utama yaitu kemampuannya dalam menilai status metilasi di setiap situs CpG sekaligus melihat keberhasilan konversi bisulfit DNA sehingga mengeliminasi hasil positif palsu. Namun, metode ini memerlukan instrumen yang mahal dan prosedur pengerjaan yang panjang serta kompleks (Gouil & Keniry, 2019).

Tabel 2. menunjukkan terdapat perbedaan hasil status metilasi antara metode MSP dan metode Sanger *sequencing*. Keempat sampel yaitu RF.05, RF.06, RF.09, dan RF.14 yang status metilasinya diidentifikasi *fully methylated* oleh metode MSP ternyata menunjukkan hasil *partially methylated* pada metode Sanger *sequencing*. Perbedaan ini terjadi karena pada empat sampel tersebut, tidak semua situsya termetilasi. Satu dari 16 situs CpG yang berhasil diidentifikasi, tepatnya pada situs CpG 86 bp hanya terjadi metilasi sebagian. Hal ini yang menyebabkan primer *unmethylated* (U) pada metode MSP tidak dapat mengamplifikasi *template* DNA karena pengenalan situs CpG yang terlalu sedikit. Sekalipun terjadi amplifikasi, produk MSP yang dihasilkan sangat sedikit sehingga tidak dapat divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa.

Metode MSP menggunakan primer yang didesain untuk mengenali 1-3 situs CpG pada sampel untuk amplifikasi. Primer *unmethylated* (U) didesain untuk menempel (*annealing*) pada situs CpG yang tidak termetilasi (*unmethylated*). Namun, pada keempat sampel yang status metilasinya *partially methylated*, hanya satu situs CpG yang tidak termetilasi, itupun termetilasi sebagian dan posisinya di tengah sekuens. Hal inilah yang menyebabkan primer tidak menempel ke *template* DNA sehingga amplifikasi tidak terjadi (Kurdyukov & Bullock, 2016).

Berdasarkan penjelasan tersebut, maka perbedaan keempat hasil sebelumnya tidak terlalu berarti signifikan terhadap akurasi hasil status

metilasi yang didapatkan dari metode MSP karena hanya satu situs CpG yang termetilasi sebagian dari total 16 situs CpG. Artinya, sebanyak 15 situs CpG yang termetilasi tetap akan mendominasi, sehingga menyebabkan promotor gen RASSF1 pada keempat sampel tersebut tetap mengalami inaktivasi. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat kesesuaian antara hasil metode MSP dengan metode Sanger *sequencing* karena pada seluruh sampel yang diperiksa status metilasinya dengan kedua metode tersebut diidentifikasi mengalami metilasi (*methylated*). Hasil ini menunjukkan bahwa pemeriksaan status metilasi dengan metode MSP adalah valid, sehingga dapat digunakan untuk deteksi metilasi gen RASSF1.

Penelitian yang dilakukan oleh Buhmeida et al. (2011) dengan menggunakan sampel FFPE, didapatkan hasil gen yang paling sering termetilasi adalah RASSF1A (65 dari 100 sampel). Dari penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara metilasi RASSF1A dan metastasis kelenjar getah bening (KGB), serta metilasi RASSF1A dapat digunakan sebagai prediktor independen untuk prognosis buruk pada kanker payudara. Selanjutnya berdasarkan hasil studi meta-analisis Jiang et al. (2012) pada pasien yang mengalami hipermetilasi promotor RASSF1A memiliki risiko yang lebih tinggi untuk kambuh (*relapse*) dan memiliki kelangsungan hidup lebih buruk. Oleh sebab itu, identifikasi status metilasi ini sangat penting untuk meningkatkan strategi terapi pada pasien kanker payudara untuk meningkatkan kualitas dan kelangsungan hidup pasien. Metode MSP memungkinkan untuk digunakan sebagai prosedur identifikasi status metilasi gen RASSF1 pada kanker payudara.

KESIMPULAN

Metode *methylation-specific* PCR (MSP) merupakan metode yang akurat dalam mendeteksi metilasi gen RASSF1 pada jaringan kanker payudara.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan pada segenap pimpinan dan staf laboratorium Penelitian dan Pengembangan RS Kanker Dharmais, Jakarta.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan untuk penerbitan prosiding ini.

REFERENSI

- Buhmeida, A., Merdad, A., El-Maghrabi, J., Al-Thobaiti, F., Ata, M., Bugis, A., Syrjänen, K., Abuzenadah, A., Chaudhary, A., Gari, M., Al-Qahtani, M., & Dallol, A. (2011). RASSF1A methylation is predictive of poor prognosis in female breast cancer in a background of overall low methylation frequency. *Anticancer Research*, 31(9), 2975-2981.
- Els, V. (2022). Keterkaitan Cara Kerja Kontrasepsi Hormonal Dengan Risiko Terjadinya Kanker Payudara. *Essential: Essence of Scientific Medical Journal*, 19(2), 25. <https://doi.org/10.24843/estl.2021.v19.i02.p05>
- Fackler, M. J., Bujanda, Z. L., Umbricht, C., Teo, W. W., Cho, S., Zhang, Z., Visvanathan, K., Jeter, S., Argani, P., Wang, C., Lyman, J. P., De Brot, M., Ingle, J. N., Boughey, J., McGuire, K., King, T. A., Carey, L. A., Cope, L., Wolff, A. C., & Sukumar, S. (2014). Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor dna in metastatic breast cancer. *Cancer Research*, 74(8), 2160-2170. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3392>
- García-Gutiérrez, L., McKenna, S., Kolch, W., & Matallanas, D. (2020). RASSF1A tumour suppressor: Target the network for effective cancer therapy. *Cancers*, 12(1), 1-22. <https://doi.org/10.3390/cancers12010229>
- Global Cancer Observatory. (2020). *Cancer in Indonesia*. International Agency for Research on Cancer (IARC). <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/360-indonesia-fact-sheets.pdf>
- Gouil, Q., & Keniry, A. (2019). Latest techniques to study DNA methylation. *Essays in Biochemistry*, 63(6), 639-648.

<https://doi.org/10.1042/EBC20190027>

- Hagrass, H. A., Pasha, H. F., Shaheen, M. A., Abdel Bary, E. H., & Kassem, R. (2014). Methylation status and protein expression of RASSF1A in breast cancer patients. *Molecular Biology Reports*, 41(1), 57-65. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2837-3>
- Han, W., Wang, Y., Fan, J., & Wang, C. (2018). Is APC hypermethylation a diagnostic biomarker for bladder cancer? A meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*, 11, 8359-8369. <https://doi.org/10.2147/OTT.S177601>
- Jiang, Y., Cui, L., Chen, W. de, Shen, S. hai, & Ding, L. dong. (2012). The prognostic role of RASSF1A promoter methylation in breast cancer: A meta-analysis of published data. *PLoS ONE*, 7(5), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036780>
- Khodadadi, E., Fahmideh, L., Khodadadi, E., Dao, S., Yousefi, M., Taghizadeh, S., Asgharzadeh, M., Yousefi, B., & Kafil, H. S. (2021). Current advances in DNA methylation analysis methods. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8827516>
- Kurdyukov, S., & Bullock, M. (2016). DNA methylation analysis: Choosing the right method. *Biology*, 5(1), 1-21. <https://doi.org/10.3390/biology5010003>
- Li, M., Wang, C., Yu, B., Zhang, X., Shi, F., & Liu, X. (2019). Diagnostic value of RASSF1A methylation for breast cancer: A meta-analysis. *Bioscience Reports*, 39(6), 1-10. <https://doi.org/10.1042/BSR20190923>
- Li, Y., & Tollefsbol, T. O. (2011). DNA Methylation Detection: Bisulfite Genomic Sequencing Analysis. *Methods in Molecular Biology*, 791(3), 11-21. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_2
- Liyanage, C., Wathupola, A., Muraleetharan, S., Perera, K., Punyadeera, C., & Udagama, P. (2019). Promoter hypermethylation of tumor-suppressor genes p16ink4a, rassf1a, timp3, and pcqap/med15 in salivary dna as a quadruple biomarker panel for early detection of oral and oropharyngeal cancers. *Biomolecules*, 9(4), 1-19. <https://doi.org/10.3390/biom9040148>
- Magdeldin, S. (2012). *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. IntechOpen. <https://doi.org/10.32388/9CU07B>
- Pajares, M. J., Palanca-Ballester, C., Urtasun, R., Alemany-Cosme, E., Lahoz, A., & Sandoval, J. (2021). Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Methods*, 187, 3-12.
-

<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.06.021>

- Raos, D., Ulamec, M., Bojanac, A. K., Bulic-Jakus, F., Jezek, D., & Sincic, N. (2021). Epigenetically inactivated rassf1a as a tumor biomarker. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(4), 386-397. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.5219>
- Rowther, F. B., Karooni, H., & Warr, T. (2012). TOUCH-UP gradient amplification method. *Journal of Biomolecular Techniques*, 23(1), 1-3. <https://doi.org/10.7171/jbt.12-2301-004>
- Saelee, P., & Pongtheerat, T. (2020). APC Promoter Hypermethylation as a Prognostic Marker in Breast Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(12), 3627-3632. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.12.3627>
- Salvi, S., Gurioli, G., de Giorgi, U., Conteduca, V., Tedaldi, G., Calistri, D., & Casadio, V. (2016). Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: Current insights. *OncoTargets and Therapy*, 9, 6549-6559. <https://doi.org/10.2147/OTT.S100901>
- Scully, O. J., Bay, B.-H., Yip, G., & Yu, Y. (2012). Breast Cancer Metastasis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1187). https://doi.org/10.1007/978-981-32-9620-6_9
- Šestáková, Š., Šálek, C., & Remešová, H. (2019). DNA Methylation Validation Methods: A Coherent Review with Practical Comparison. *Biological Procedures Online*, 21(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12575-019-0107-z>
- Shen, C., Sheng, Q., Zhang, X., Fu, Y., & Zhu, K. (2016). Hypermethylated APC in serous carcinoma based on a meta-analysis of ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 9(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0271-6>
- Sigalotti, L., Covre, A., Colizzi, F., & Fratta, E. (2019). Quantitative Methylation-Specific PCR: A Simple Method for Studying Epigenetic Modifications of Cell-Free DNA. In V. Casadio & S. Salvi (Eds.), *Cell-free DNA as Diagnostic Markers: Methods and Protocols* (pp. 137-162). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7_11
- Sun, Y., Zhao, Z., Yang, Z., Xu, F., Lu, H., Zhu, Z., & Shi, W. (2017). *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer*. 13. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>

Vietri, M. T., D'elia, G., Benincasa, G., Ferraro, G., Caliendo, G., Nicoletti, G. F., & Napoli, C. (2021). DNA methylation and breast cancer: A way forward (Review). *International Journal of Oncology*, 59(5), 1-12. <https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5278>

Zhang, C. Y., Zhao, Y. X., Xia, R. H., Han, J., Wang, B. S., Tian, Z., Wang, L. Z., Hu, Y. H., & Li, J. (2014). RASSF1A promoter hypermethylation is a strong biomarker of poor survival in patients with salivary adenoid cystic carcinoma in a Chinese population. *PLoS ONE*, 9(10), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110159>
