



DNA Metilasi & Kanker Nasofaring

ADITYA KURNIAWAN

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat dan karunianya sehingga Buku yang berjudul "DNA Metilasi dan Kanker Nasofaring" dapat diselesaikan. Buku ini ditujukan untuk akademisi sebagai sumber dan sarana untuk menambah pengetahuan mengenai perkembangan kanker nasofaring di Indonesia.

Buku ini disusun berdasarkan standar buku ilmiah yaitu dengan menggunakan bahasa yang mudah dimengerti dan dipahami oleh berbagai kalangan. Buku ini disusun berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dan dikemas secara sederhana dalam bentuk buku.

Buku ini dapat tersusun dengan baik karena adanya bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada tim peneliti. Penulis juga berharap kritik dan saran yang membangun untuk buku ini.

Jember, 20 Mei 2022

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR ii

DAFTAR ISI..... iii

BAB 1. Pendahuluan..... 1

 1. Karsinoma 1

BAB 2. Karsinoma Nasofaring 12

 1. Pengertian Karsinoma Nasofaring 12

 2. Epidemiologi Karsinoma Nasofaring..... 13

 3. Etiologi Karsinoma Nasofaring..... 15

BAB 3. METILASI DNA 20

 1. Pengertian..... 20

 2. Metilasi DNA dan Karsinoma Nasofaring 22

 3. Metilasi dan Kebiasaan Merokok..... 26

 4. Metilasi DNA pada jaringan dan darah..... 30

BAB 4. METHYLATION SPECIFIC PCR..... 34

BAB 5. METILASI GEN WIF1, RASSF1A & p16..... 55

 1. WNT Inhibitory Factor 1 (WIF1) 55

 2. Metilasi Gen WIF1 dikaitkan dengan perilaku merokok..... 59

 3. RASSF1A..... 70

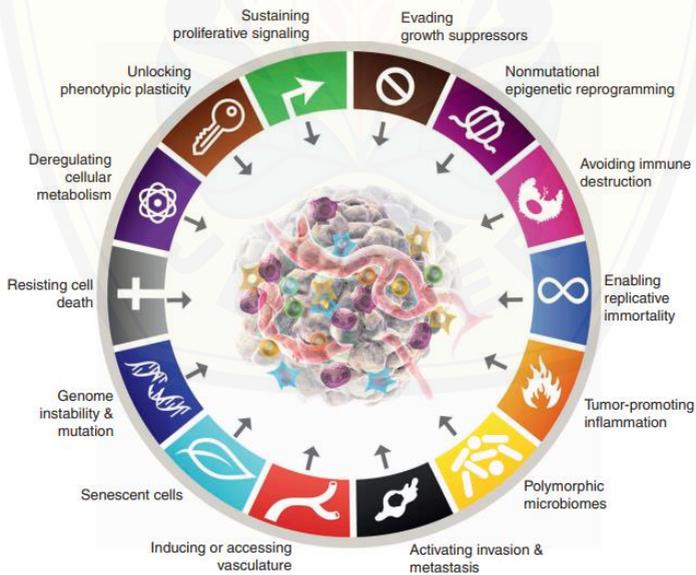
4. p16 / CDKNA2	73
5. Deteksi Metilasi RASSF1A dan CDKNA2 dari Sampel Darah Tepi.....	74
DAFTAR PUSTAKA	78



BAB 1. Pendahuluan

1. Kanker

Kanker merupakan penyebab kematian nomor dua di dunia. Secara keseluruhan, prevalensi kanker tentu meningkat. Kanker telah membunuh 585.720 orang di dunia pada tahun 2014. Oleh karena itu, kanker merupakan masalah serius yang mempengaruhi kesehatan semua masyarakat manusia. [1]



Kemampuan yang paling mendasar dari sel kanker adalah kemampuan mereka untuk mempertahankan proliferasi kronis. Jaringan normal dengan hati-hati mengontrol produksi dan pelepasan sinyal pemacu pertumbuhan masuk dan terus mendorong siklus pertumbuhan dan pembelahan sel, sehingga memastikan homeostasis dalam jumlah sel dan dengan demikian mempertahankan struktur dan fungsi normal jaringan. Sel-sel kanker, dengan menghilangkan sinyal-sinyal ini, menjadi penguasa nasib mereka. Sinyal aktivasi terutama dimediasi oleh faktor pertumbuhan yang mengikat reseptor permukaan sel, yang biasanya mengandung domain tirosin kinase intraseluler. Kemudian transduksi sinyal melalui jalur pensinyalan intraseluler bercabang yang mengatur pertumbuhan sepanjang siklus sel serta pertumbuhan sel (yaitu, peningkatan ukuran sel); Seringkali sinyal ini mempengaruhi sifat biologis sel lainnya, seperti kelangsungan hidup sel dan metabolisme energi. Khususnya, identitas yang tepat dan sumber sinyal proliferasi aktif dalam

jaringan normal tidak dipahami dengan baik satu dekade yang lalu dan umumnya tetap demikian. Selanjutnya, relatif sedikit yang diketahui tentang mekanisme yang mengendalikan pelepasan sinyal mitosis ini. Sebagian, pemahaman mekanisme ini diperumit oleh fakta bahwa sinyal faktor pertumbuhan yang mengontrol jumlah dan lokasi sel dalam jaringan dianggap ditransmisikan dengan cara yang diatur waktu, dan ruang sel-ke-selnya; Sinyal endokrin semacam itu sulit diakses secara eksperimental. Selanjutnya, ketersediaan hayati faktor pertumbuhan diatur oleh berbagai macam protein pro proliferasi di matriks ekstraseluler dan oleh aksi jaringan kompleks protease, sulfat, dan mungkin enzim lain melepaskannya dan mengaktifkannya, tampaknya dengan cara yang sangat spesifik dan terlokalisasi. Di sisi lain, pensinyalan molekuler dalam sel kanker lebih dipahami[2-5]. Sel kanker mungkin dapat mempertahankan pensinyalan proliferasi dalam beberapa cara berbeda: mereka dapat membuat ligan

faktor pertumbuhan mereka sendiri, yang dapat merekaanggapi melalui ekspresi reseptor untuk ligan faktor pertumbuhan, badan serumpun, yang mengarah pada stimulasi proliferasi autokrin. Selain itu, sel kanker dapat mengirimkan sinyal untuk merangsang sel normal yang mendukung jaringan stroma terkait tumor, untuk datang dan pergi dengan menyediakan sel kanker dengan faktor pertumbuhan lainnya [6,7]. Pensinyalan reseptor juga dapat tidak diatur dengan meningkatkan kadar protein reseptor yang ditampilkan pada sel kanker. Kanker hasil dari serangkaian mutasi genetik berturut-turut di mana mutasi mengubah fungsi sel. Senyawa memainkan peran yang jelas dalam mutasi gen dan desain sel kanker. Selain itu, rokok mengandung beberapa senyawa karsinogenik yang menyebabkan kanker paru-paru. Menariknya, bahan kimia lingkungan karsinogenik secara langsung atau tidak langsung mempengaruhi sitoplasma dan nukleus, menyebabkan penyakit keturunan dan mutasi genetik. Virus, bakteri dan radiasi adalah karsinogen lainnya,

terhitung sekitar 7% dari semua kanker. Secara umum, kanker mengganggu hubungan seluler dan mengakibatkan disfungsi gen yang signifikan. Penghancuran ini mempengaruhi siklus sel dan menyebabkan proliferasi abnormal. Proto-onkogen terlibat dalam pembelahan dan proliferasi sel dalam kondisi normal, tetapi mutasi gen menjadikannya onkogen berbahaya bagi keberadaan sel. Selain itu, kurangnya gen supresor tumor menyebabkan pembelahan sel yang tidak terkontrol. [8–11]

Gen perbaikan menerjemahkan protein dan enzim dengan sifat perbaikan dan mendeteksi lebih dari 30 jenis protein perbaikan. Menghilangkan urasil dari DNA dan memotong serta menghilangkan kerusakan DNA. Kerusakan DNA besar yang diinduksi UV. Ini pada dasarnya adalah fungsi dari gen perbaikan untuk memperbaiki DNA secara normal. Epigenetik adalah situasi dinamis dalam studi sel. Modifikasi epigenetik seperti metilasi DNA, modifikasi histon, dan penentuan posisi nukleosom memainkan peran penting dalam perkembangan kanker [12–16]. Sel

kanker memiliki ciri-ciri sebagai berikut: Adanya metilasi DNA dan pengurangan keseluruhan dalam monoasetilasi, terjadi modifikasi histon dalam skala besar pada sel kanker. Karakteristik yang memungkinkan dari ketidakstabilan dan mutasi genom (DNA) adalah komponen mendasar dari pembentukan dan patogenesis kanker. Saat ini, beberapa konsorsium internasional membuat katalog mutasi di seluruh genom sel kanker manusia, melakukannya di hampir setiap jenis kanker manusia, pada berbagai tahap perkembangan ganas, termasuk lesi metastasis, dan selama pengembangan resistensi adaptif terhadap terapi. Salah satu hasilnya adalah apresiasi yang sekarang tersebar luas bahwa mutasi pada gen yang mengatur, memodulasi, dan mempertahankan arsitektur kromatin, dan dengan demikian mengatur ekspresi gen secara global, semakin terdeteksi dan secara fungsional terkait dengan ciri kanker. Selain itu, ada kasus yang harus dibuat untuk mode pemrograman ulang genom lain yang tampaknya independen yang melibatkan



dipertahankan stabil dari waktu ke waktu oleh putaran umpan balik positif dan negatif. Semakin banyak bukti mendukung gagasan bahwa perubahan epigenetik serupa dapat berkontribusi pada perkembangan tumor dan perolehan sifat ganas yang sedang berlangsung[17,18].

Gambar 1. Epigenetik Reprogram. Salah satu karakteristik sel kanker adalah pemrograman ulang sel melalui jalur epigenetik

Gambar 2. Epigenetik Reprogram. Salah satu karakteristik sel kanker adalah pemrograman ulang sel melalui jalur epigenetik

perubahan luas. Dalam epigenom, perubahan yang mendukung seleksi fenotipik kemampuan sifat dapat menyebabkan klonalitas pertumbuhan sel kanker dengan peningkatan kompatibilitas dengan pertumbuhan prolifera-tif. Salah satu karakteristik

umum tumor (atau Hipoksia karena area yang tidak mencukupi di dalam tumor) angiogenesis. Misalnya, hipoksia mengurangi aktivitas demetilase TET, Methylome, terutama hypermethylated. Angiogenesis yang tidak memadai juga dapat membatasi bioavailabilitas memiliki nutrisi penting dari darah dan kekurangan gizi. Misalnya, ubah kontrol terjemahan, Akibatnya, sel kanker payudara memiliki fenotip yang ganas akan terus meningkat [12]. Contoh menarik dari regulasi epigenetik melalui hipoksia selalu merupakan bentuk mematikan dari endimoma pediatrik. Ini benar, seperti halnya dengan banyak embrio dan tumor masa kanak-kanak. Bentuknya tidak memiliki mutasi berulang dan sangat jarang Mutasi pada onkogen dan penekan tumor. Sebaliknya, pertumbuhan sel kanker abnormal ini telah terbukti diatur oleh program regulasi gen yang diinduksi oleh. Hipoksia secara khusus, sel-sel yang diduga asal kanker hadir di kompartemen hipoksia dan dapat menyebabkan sensitisasi sel-sel yang

terletak di sana untuk permulaan perkembangan tumor dengan kofaktor tidak diketahui.[19,20]

Secara umum, sel-sel aksesori di lingkungan mikro tumor yang secara fungsional berkontribusi pada akuisisi kemampuan khas tidak dianggap menderita genetik ketidakstabilan dan pemrograman ulang mutasi untuk meningkatkan kegiatan yang mempromosikan tumor; melainkan disimpulkan bahwa ini selffibroblas terkait kanker, sel imun bawaan, dan sel endotel dan perisit dari pembuluh darah tumor secara epigenetik diprogram ulang pada perekrutan mereka oleh larut dan faktor fisik yang menentukan lingkungan mikro tumor padat. Dapat diantisipasi bahwa teknologi profil multiomik yang saat ini diterapkan pada sel kanker akan semakin digunakan untuk menginterogasi aksesori (stromal) sel dalam tumor untuk menjelaskan bagaimana sel normal rusak untuk secara fungsional mendukung perkembangan dan progresi tumor. Sebagai contoh, sebuah studi barubaru ini menunjukkan bahwa pemrograman ulang semacam itu dapat melibatkan

modifikasi epigenom sebagai tambahan untuk pertukaran induktif sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan yang mengubah jaringan sinyal intraseluler dalam semua jenis sel ini: ketika model tikus bermetastasis ke paruparu diobati dengan kombinasi inhibitor DNA methyltransferase (dan inhibitor histone modifikasi (HDAC), sel sel myeloid yang menginfiltrasi adalah ditemukan telah beralih dari keadaan progenitor yang belum matang (peningkat tumor) menjadi sel yang menyerupai sel interstisial matang (tumorantagonizing) makrofag, yang, berbeda dengan rekan-rekan mereka di tumor yang tidak diobati, tidak mampu mendukung kemampuan khas yang diperlukan untuk efisiensi kolonisasi metastatik. Dapat dibayangkan bahwa profil multiomik dan gangguan farmakologis akan berfungsi untuk menjelaskan keadaan epigenetik yang diprogram ulang dalam myeloid sel serta jenis sel aksesori yang memungkinkan ciri khas lainnya mengisi lingkungan mikro tumor[20,21].

BAB 2. Karsinoma Nasofaring

1. Pengertian Karsinoma Nasofaring

Karsinoma nasofaring (KNF) adalah karsinoma yang berkembang dari sel epitel yang melapisi permukaan nasofaring. Nasofaring adalah lubang kecil di belakang rongga hidung. Nasofaring adalah penghubung antara faring dan rongga hidung[22]. Letak nasofaring yang tersembunyi membuat gejala karsinoma tidak spesifik dan sulit dideteksi. Gejala KNF antara lain pendarahan di daerah hidung, kesulitan menelan, perubahan suara, hidung tersumbat, kehilangan kemampuan mencium (anosmia), gangguan pendengaran, dan gangguan penglihatan. Gejala ini juga ditemukan pada penyakit lain; dengan demikian, kondisi ini menyebabkan pasien kanker nasofaring terlambat mengenali penyakitnya dan masuk rumah sakit dalam stadium yang parah, sehingga prognosinya buruk[23,24].

Berdasarkan gambaran histopatologi, karsinoma nasofaring dibagi menjadi tiga tipe, yaitu tipe I, II dan

II WHO. Karsinoma nasofaring tipe 1 adalah jenis karsinoma sel skuamosa. Tipe ini umum terjadi pada populasi orang dewasa dan memiliki prognosis yang lebih baik daripada tipe 2 dan 3 dan banyak ditemukan di daerah yang tidak endemik karsinoma nasofaring, seperti Eropa dan Amerika. Tipe 2 adalah jenis karsinoma non-keratinisasi. Tipe 3 adalah karsinoma yang tidak berdiferensiasi. Tipe 2 dan 3 adalah karsinoma nasofaring yang berhubungan erat dengan infeksi EBV. Tipe 2 dan 3 juga memiliki insiden yang lebih tinggi di daerah endemik, seperti Cina bagian selatan, Asia Tenggara, Arktik, dan Afrika[24–27].

2. Epidemiologi Karsinoma Nasofaring

Karsinoma nasofaring adalah jenis karsinoma yang unik. Secara global, karsinoma nasofaring adalah jenis karsinoma yang jarang terjadi, tetapi menempati urutan pertama dalam insiden untuk semua jenis karsinoma di Cina selatan, Asia Tenggara, Arktik dan beberapa negara di Timur Tengah dan Afrika Utara.

Perbedaan etnis dan ras serta distribusi geografis merupakan salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi perkembangan karsinoma nasofaring. Insiden keseluruhan karsinoma nasofaring adalah 1 dari 100.000 orang per tahun. Diperkirakan ada 65.000 pasien baru kanker nasofaring setiap tahunnya[14,28-30]. Amerika Serikat memiliki insiden 0,5/100.000 pria per tahun dan 0,2/100.000 wanita per tahun. Insiden yang sangat berbeda ditemukan di Hong Kong, yaitu 24,3/100.000 per tahun pada pria dan 9,5/100.000 per tahun pada wanita. Hal yang mirip juga terjadi di wilayah Arktik, khususnya di Greenland dengan insiden 12,7/100.000 pria per tahun dan 9,2/100.000 wanita per tahun[1,31]. Di Indonesia, karsinoma nasofaring merupakan karsinoma regio kepala dan leher yang paling sering dijumpai, dengan insidensi 10.7/100.000 laki-laki per tahun[4].

Karsinoma nasofaring lebih banyak menyerang pria daripada wanita. Rasio pasien laki-laki dan perempuan adalah 2,73:1 Namun, sejauh ini tidak ada

bukti bahwa penyebab kanker orofaring lebih sering terjadi pada laki-laki daripada perempuan [32].

3. Etiologi Karsinoma Nasofaring

Penyebab kanker nasofaring sama dengan kanker pada umumnya dan bersifat multifaktorial. Secara umum, tiga penyebab utama kanker nasofaring adalah infeksi virus Epstein-Barr (EBV), faktor lingkungan, dan kerentanan genetik[33].

Kanker nasofaring tipe 2 dan tipe 3 sangat terkait dengan infeksi virus Epstein-Barr (EBV). EBV termasuk dalam keluarga virus herpes. EBV pertama kali diidentifikasi pada tahun 1964. Virus ini pertama kali diidentifikasi dalam kultur sel dari biopsi pasien dengan limfoma Burkitt. Saat terinfeksi, EBV atau latency. Diperkirakan sekitar 90% orang dewasa di seluruh dunia terinfeksi virus EBV. Di Indonesia, 100% anak-anak hingga usia 5 tahun positif terinfeksi EBV. Kehadiran virus EBV ini tidak menimbulkan gejala pada kebanyakan orang karena hanya sebagai pembawa dan EBV memasuki masa inkubasi sel

setelah infeksi primer. Selama masa inkubasi, EBV tidak menyebabkan penyakit karena kadarnya rendah dan dikendalikan oleh sistem imun. Ketidakseimbangan sistem kekebalan dapat mengaktifkan dan meningkatkan angka EBV dan menyebabkan penyakit[33,34].

Kejadian karsinoma nasofaring disebabkan oleh EBV yang sangat aktif dan memasuki fase litik. Transformasi sel normal menjadi karsinoma disebabkan oleh faktor lingkungan yang membuat EBV aktif. Faktor lingkungan yang dibahas di sini termasuk makanan tinggi nitrosamin seperti ikan asin dan makanan yang mengandung pengawet, konsumsi alkohol dan merokok[35].

Nitrosamin adalah prekursor yang dapat mengaktifkan EBV dari keadaan laten ke keadaan litik. Nitrosamin terdiri dari nitrat dan nitrit. Nnitrosamine dapat berubah menjadi karsinogen aktif sebagai hasil dari proses enzimatik dari mulut hingga esofagus. Nitrosamine telah terbukti meningkatkan tingkat replikasi EBV. Sebuah studi yang membandingkan

kebiasaan merokok (perokok dan bukan perokok) dengan titer VCA-IgA EBV pada populasi di Guangdong, Cina ditemukan bahwa perokok memiliki risiko 2.71 kali lipat lebih tinggi untuk menjadi positif VCA-IgA EBV dibanding non-perokok. Salah satu makanan yang mengandung nitrosamin tinggi adalah ikan asin. Ikan asin merupakan salah satu makanan favorit di Asia, terutama di China dan Asia Tenggara. Penelitian yang telah dilakukan menyebutkan bahwa faktor risiko kejadian karsinoma nasofaring akibat mengonsumsi ikan asin berkisar antara 1,78 hingga 20,2. Selain ikan asin, makanan lain yang dapat memicu EBV adalah makanan kaleng[36].

Konsumsi alkohol juga berkorelasi dengan kejadian kanker nasofaring. Minum alkohol dapat meningkatkan risiko kanker nasofaring sebesar 1,21 [37,38]. Asupan alkohol juga dapat mempengaruhi harapan hidup dan prognosis pasien karsinoma nasofaring. Peminum alkohol memiliki harapan hidup yang lebih pendek daripada bukan peminum. Peminum dengan intensitas 14 minuman/minggu

selama lebih dari 20 tahun juga memiliki prognosis 1,38 kali lipat lebih buruk daripada non-peminum pada kanker nasofaring[39]. Merokok merupakan salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi kejadian banyak karsinoma, termasuk karsinoma nasofaring. Hubungan antara kejadian kanker nasofaring dengan perilaku merokok sangat dipengaruhi oleh jumlah batang rokok yang dihisap. Misalnya, jika seseorang merokok 60 bungkus setahun, memiliki risiko 6,5 kali lebih tinggi untuk menjadi kanker nasofaring daripada non-perokok. Kebiasaan merokok juga sering dikaitkan dengan terjadinya 60 hingga 70% karsinoma nasofaring yang berdiferensiasi [40–42].

Penelitian dari Guangdong, China menunjukkan bahwa merokok dapat meningkatkan risiko karsinoma nasofaring, risiko ini meningkat dengan meningkatnya frekuensi merokok. Kebiasaan merokok dikaitkan dengan peningkatan aktivitas serum EBV dalam tubuh, karena zat aktif dalam tembakau termasuk Nitrosamine dapat mengaktifkan

virus EBV[43]. Merokok pada individu yang sehat dapat mempengaruhi peningkatan titer antibodi VCA-IgA EBV, yang merupakan penanda peningkatan risiko karsinoma nasofaring[33].



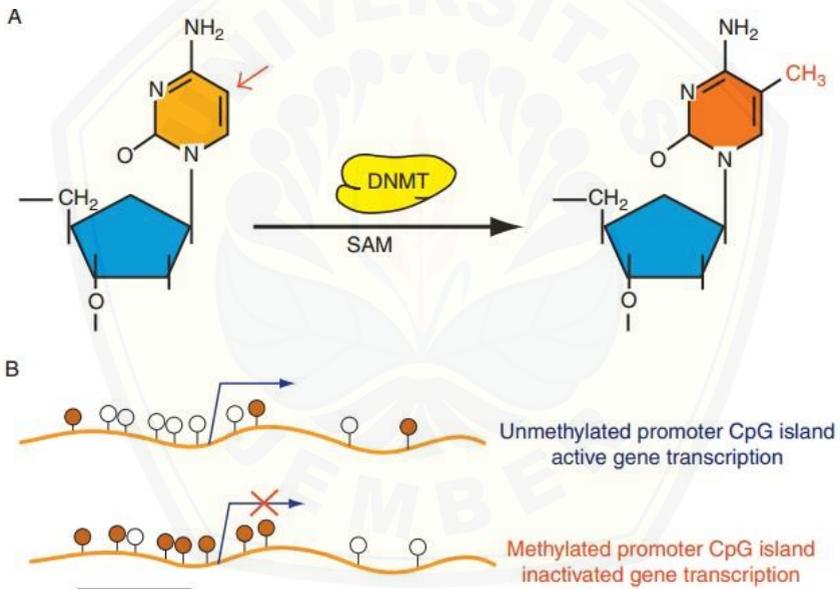
BAB 3. METILASI DNA

1. Pengertian

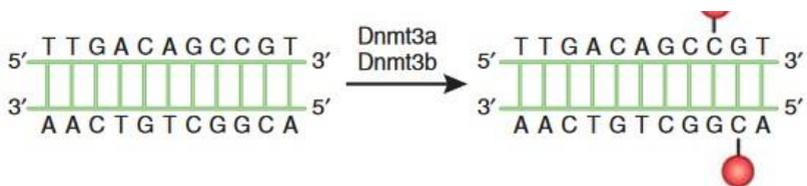
Metilasi DNA adalah salah satu proses epigenetik yang ditandai dengan penambahan gugus metil ke karbon nomor lima di basa sitosin. Penambahan gugus metil ke DNA dikatalisis oleh DNA methyltransferase (DNMT). Gugus metil ini berasal dari S-Adenosyl Methionine (SAM). Penambahan gugus metil ini hanya terjadi pada residu sitosin di sebelah guanin. Kumpulan basa sitosin (C) dan guanin (G) yang berdekatan disebut pulau CpG. Hanya pulau CpG dalam promotor gen yang dapat menjalani metilasi DNA. Untai DNA dikatakan sebagai pulau CpG jika terdapat lebih dari 50 sekuens CG. Genom manusia saja mengandung sekitar 27.000 pulau CpG dan 50-70% gen terletak di pulau CpG[44,45].

Metilasi DNA biasanya hilang selama pembentukan zigot, tetapi muncul kembali selama embriogenesis. Metilasi DNA adalah perkembangan normal dan memiliki fungsi penting untuk mengontrol ekspresi gen sehingga transkripsi tidak

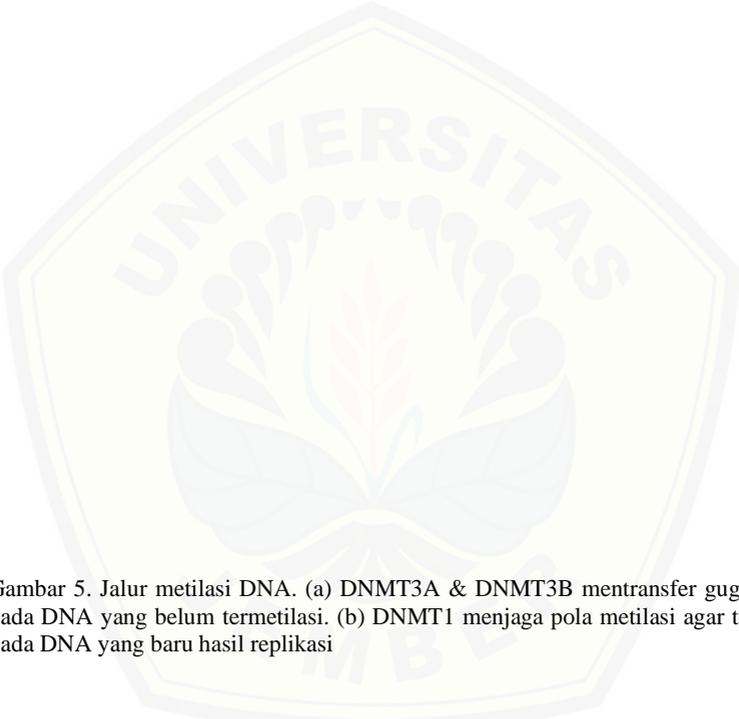
terjadi. Metilasi DNA diatur oleh keluarga gen DNMT, yaitu DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B dan DNMT3L. DNMT3A dan DNMT3B aktif dalam pembentukan pola metilasi baru. DNMT1 berfungsi untuk menyalin pola metilasi dari DNA induk ke DNA keturunan[46].



Gambar 3. (a) Metilasi DNA pada basa Cytosin. Gugus metil menempel pada karbon nomor 5. Metil berasal dari SAM (S-adenosyl-methionine) dan ditransfer oleh DNMT (DNA methyltransferase). (b atas) promotor gen yang memiliki CpG Island tetapi tidak mengalami hipermetilasi, sehingga gen tetap tertranskripsi. (b bawah) promotor gen yang memiliki CpG Island dan mengalami hipermetilasi yang menyebabkan gen tidak dapat terekspresi (Kulis and Esteller, 2010)



2. Metilasi DNA dan Karsinoma Nasofaring



Gambar 5. Jalur metilasi DNA. (a) DNMT3A & DNMT3B mentransfer gugus metil pada DNA yang belum termetilasi. (b) DNMT1 menjaga pola metilasi agar tetap ada pada DNA yang baru hasil replikasi

Gambar 6. Jalur metilasi DNA. (a) DNMT3A & DNMT3B mentransfer gugus metil pada DNA yang belum termetilasi. (b) DNMT1 menjaga pola metilasi agar tetap ada pada DNA yang baru hasil replikasi

termetilasi dengan gen tertentu, metilasi juga dapat memiliki efek buruk berupa penyakit. Penyakit yang

terkait dengan metilasi DNA termasuk kanker, lupus, distrofi otot, dan beberapa cacat lahir. Metilasi DNA yang terkait dengan perkembangan karsinoma terjadi pada gen supresor tumor. Ini karena promotor gen yang menekan proliferasi sel menyebabkan overmetilasi DNA, yang mengurangi ekspresi gen ini dan menyebabkan proliferasi sel yang tidak diatur [47].

Pada kejadian karsinoma, banyak gen - gen supresor tumor yang ditekan ekspresinya sehingga gen - gen tersebut tidak aktif. Gen - gen yang sering terkait antara lain p16INK4a (CDKN2A) dan p15INK4a (CDKN2B); kedua gen ini merupakan gen yang mengontrol progresivitas G1 yang menghambat ikatan Cyclin Dependent Kinase (CDK) [48]. Gen - gen yang berkaitan dengan perbaikan DNA juga mengalami metilasi sehingga gen tersebut tidak terekspresi dan sel mengarah ke proliferasi. Gen yang populer adalah BRCA1 yang berfungsi dalam perbaikan DNA karena putusanya ikatan untai ganda berpilin DNA. Metilasi BRCA1 ini banyak ditemukan

pada kejadian karsinoma payudara dan karsinoma ovarium. Penonaktifan gen akibat hipermetilasi DNA juga ditemukan pada gen yang terlibat dalam adhesi sel. Gen adhesi sel ini termasuk CDH1 (ecadherin) dan CDH13 (h-cadherin), yang jika tidak aktif, menyebabkan infiltrasi sel atau metastasis. Gen yang mempromosikan apoptosis juga sangat termetilasi. Protein Death-associated protein kinase 1 (DAPK1) adalah gen pemicu apoptosis yang sering mengalami hipermetilasi pada karsinoma. Adanya metilasi pada promotor gen DAPK1 menyebabkan sel kanker menghindari apoptosis. Meskipun jumlah gen yang menjalani metilasi DNA telah dilaporkan meningkat, bagaimana sel memperoleh sumber metil untuk mendukung proses tumorigenesis tidak sepenuhnya dipahami [49,50].

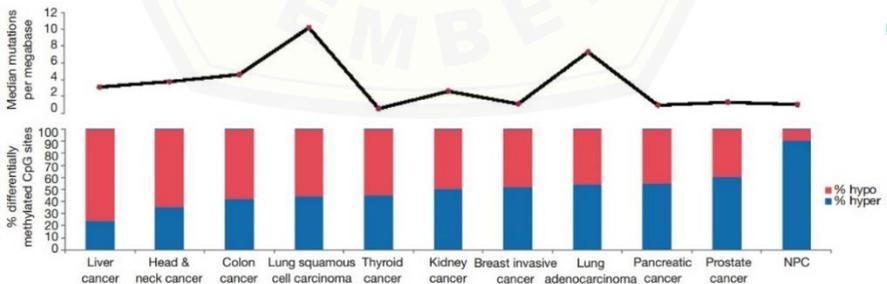
Diketahui bahwa penyebab kanker nasofaring adalah multifaktorial. Salah satu faktor yang meningkatkan aktivitas virus EBV adalah faktor lingkungan. Faktor lingkungan ini juga mendukung hipermetilasi DNA. Berkenaan dengan kejadian

kanker nasofaring, telah dilaporkan secara luas bahwa metilasi DNA lebih terkait dengan kanker ini dibandingkan dengan jenis kanker lainnya. Insiden hipermetilasi lebih tinggi daripada mutasi karena paparan terus menerus terhadap faktor lingkungan dan adanya infeksi EBV. Paparan terus menerus terhadap faktor lingkungan seperti tembakau dan asap yang terkontaminasi mempengaruhi pola epigenetik sel, salah satunya adalah metilasi [51]. Pada karsinoma lainnya, yang sering terjadi adalah mutasi gen, bukan hipermetilasi DNA. Hipermetilasi nasofaring mempengaruhi berbagai gen, termasuk gen yang mengontrol apoptosis, gen yang mengontrol siklus sel, dan gen yang mengontrol adhesi sel [52]. Infeksi EBV intraseluler menyisipkan beberapa gen. Salah satunya adalah EBNA1 (Epstein-Barr virus core antigen 1). EBNA1 mengekspresikan protein Wp (promotor W). Ini mengontrol pola metilasi gen sel inang dan mencegah sel membelah dan bertahan dalam masa inkubasi [53].

3. Metilasi dan Kebiasaan Merokok

Merokok sering dikaitkan dengan risiko berbagai penyakit. Tembakau mengandung sekitar 7.000 zat aktif yang bersifat racun dan dapat menyebabkan berbagai gangguan. Salah satu mekanisme yang menyebabkan berbagai penyakit adalah merokok dapat merusak DNA (baik ikatan basa ke basa maupun ikatan rangkap dua). Rokok dapat merusak DNA karena zat yang terkandung dalam rokok yaitu arsenik, formaldehida, hidrokarbon aromatik polisiklik, dan nitrosamin. Rokok dapat meningkatkan stres oksidatif, menyebabkan kerusakan DNA, dan dapat menyebabkan metilasi DNA [54,55].

Penduduk Indonesia merupakan salah satu konsumen rokok terbesar di dunia. Berdasarkan data



adalah 1322,3 batang per tahun [55]

Gambar 7. Perbandingan jumlah mutasi antar tipe karsinoma (Shen and Waterland, 2007)

Gambar 8. Perbandingan jumlah mutasi antar tipe karsinoma (Shen and Waterland, 2007)

pertama adalah rokok menyebabkan kerusakan DNA yang disebabkan oleh berbagai zat beracun dalam rokok, seperti arsenik, kromium, formaldehida, hidrokarbon aromatik polisiklik, dan nitrosamin. DNA yang rusak memobilisasi DNMT1 sebagai salah satu protein agen perbaikan DNA, sehingga mempengaruhi perubahan pola metilasi DNA yang mengarah pada hipermetilasi. Mekanisme kedua bergantung pada akumulasi DNMT1 oleh nikotin melalui jalur AKT. DNMT1 adalah protein yang harus didegradasi oleh proteasom ketika diekspresikan secara berlebihan. Namun, DNMT1 tidak terdegradasi karena nikotin dapat menstabilkan DNMT1 melalui jalur AKT, yang

mengarah pada hipermetilasi DNA. Mekanisme ketiga dimediasi oleh protein pengikat DNA seperti Sp1. Asap rokok meningkatkan ekspresi Sp1, yang berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk promotor CpG. Sp1 menyebabkan perubahan pola metilasi DNA yang mempengaruhi hipometilasi DNA. Mekanisme keempat adalah bahwa merokok menyebabkan hipoksia sel. Karbon monoksida yang terkandung dalam asap rokok memiliki afinitas lebih tinggi daripada oksigen dan karena itu mengikat hemoglobin, menyebabkan hipoksia. Hipoksia dalam darah mengurangi kandungan oksigen dalam jaringan. Karena hipoksia ini, sel mengekspresikan HIF1 α . HIF1 α merangsang regulasi metionin adenosiltransferase 2A, suatu enzim adenosilmetionin (SAM). SAM merupakan donor metil yang nantinya akan menyebabkan hipermetilasi DNA [56].

Hypoxia

- Nicotine induces uteroplacental underperfusion, decreasing oxygen supply to the fetus
- HIF-1 α enhances expression of MAT2A, which modulates methyl group availability

DNA damage

- Double-stranded breaks induced by certain chemicals in cigarette smoke
- DNMT1 recruited to repair site



Gambar 9. Beberapa proses metilasi DNA yang terkait dengan paparan rokok. Terdapat 4 mekanisme yang mempengaruhi metilasi DNA. Mekanisme tersebut yaitu hipoksia, kerusakan DNA, aktivasi DNA-binding protein dan akumulasi DNMT. Kebiasaan merokok sering dikaitkan dengan mekanisme kerusakan DNA (Lee & Pausova, 2013).

Gambar 10. Beberapa proses metilasi DNA yang terkait dengan paparan rokok. Terdapat 4 mekanisme yang mempengaruhi metilasi DNA. Mekanisme tersebut yaitu hipoksia, kerusakan DNA, aktivasi DNA-binding protein dan akumulasi DNMT. Kebiasaan merokok sering dikaitkan dengan mekanisme kerusakan DNA (Lee & Pausova, 2013).

promotor WIF1 meningkat 1,62 kali lipat pada pasien kanker paru-paru yang merokok dibandingkan dengan bukan perokok. Kebiasaan merokok pada pasien kanker paru juga telah terbukti berhubungan

dengan hipermetilasi berbagai jenis gen supresor tumor [56].

4. Metilasi DNA pada jaringan dan darah

Studi terkait metilasi DNA selalu didapatkan dari hasil biopsi jaringan. Sejauh ini, biopsi merupakan standar emas untuk diagnosis kanker dan juga termasuk deteksi metilasi DNA. Namun, biopsi adalah metode diagnostik invasif. Proses biopsi juga membutuhkan keahlian khusus dan tidak bisa dilakukan setiap saat. Pengambilan sampel darah tepi untuk diagnosis karsinoma dan pengamatan metilasi DNA dianggap kurang invasif. Deteksi metilasi DNA pada sampel darah tepi dapat dilakukan dengan menggunakan buffy coat (sel darah putih) yang mengandung DNA genom. Studi pada pasien dengan kanker lambung menunjukkan bahwa sampel darah tepi menunjukkan metilasi DNA dengan gen promotor APC, ACIN1, BCL2, CD44, DAPK1, CDKN2A, dan RARB dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa deteksi metilasi darah dapat dilakukan pada

sampel buffy coat. Studi metilasi DNA menggunakan sampel darah tepi juga dilakukan untuk pasien kanker paru-paru. Penelitian ini juga mengaitkan metilasi DNA dengan kebiasaan merokok seseorang. Pola metilasi diamati dengan menggunakan Illumina Infinium Human Methylation 450 BeadChip assays. Penelitian ini melaporkan bahwa kebiasaan merokok seseorang dapat mempengaruhi metilasi berbagai macam gen. Disimpulkan pada penelitian ini bahwa penggunaan darah tepi juga dapat memberikan gambaran yang baik mengenai metilasi DNA pada kanker paru-paru [57,58].

Penelitian lain melaporkan metilasi gen Septin 9 dapat dideteksi dari sampel darah tepi penderita karsinoma kolorektal. Gen Septin 9 yang berfungsi dalam proses kontrol siklus sel. Penelitian ini melaporkan bahwa deteksi metilasi gen Septin 9 dari darah tepi memiliki sensitivitas sebesar 0,75 [59].

Pengambilan sampel darah tepi untuk deteksi epigenom juga telah dilakukan pada pasien karsinoma payudara. Deteksi metilasi BRCA1 dan epigenom

darah tepi pasien telah dilaporkan bermanfaat sebagai penanda biologis yang sangat baik dan tepat untuk menentukan risiko kanker payudara [60]

Kegunaan buffy coat untuk memantau metilasi DNA juga telah dilaporkan dalam studi non-kanker. Pilsner et al (2007) Menemukan bahwa ada metilasi pada tingkat DNA genom manusia yang terpapar arsenik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan arsenik dapat meningkatkan metilasi DNA genomik dalam sampel darah tepi. Namun, penelitian ini tidak dapat menjelaskan bagaimana mekanisme paparan arsenik meningkatkan metilasi DNA genom [61].

Metilasi DNA juga telah terdeteksi dalam sampel darah tepi pasien diabetes. Gen yang dipilih dalam penelitian ini meliputi KCNJ11, PPAR γ , PDK4, KCNQ1, SCD1, PDX1, FTO, dan PEG3 dan metode pyrosequencing menggunakan kontrol dari subjek diabetes sehat dan tipe 2. Dalam penelitian ini, tidak ada perbedaan pola metilasi promotor dari delapan gen yang diamati, yang memperkuat citra bahwa

metilasi DNA dapat diamati pada sampel darah tepi
[62]



BAB 4. METHYLATION SPECIFIC PCR

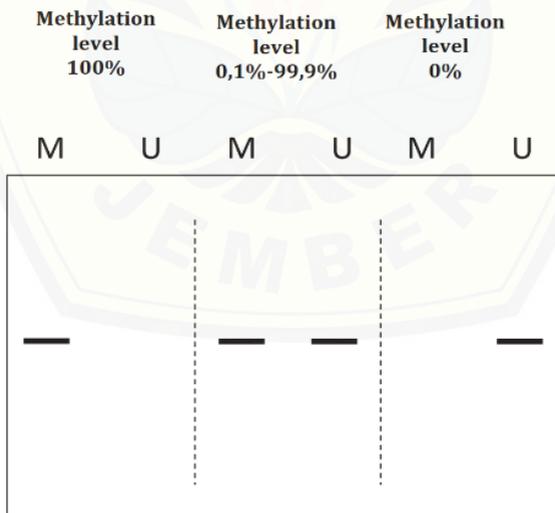
Berbagai metode telah dikembangkan untuk menganalisis metilasi DNA. Di antara metode ini terdapat teknik dengan pendekatan berbasis enzim restriksi dan natrium bisulfit yang secara langsung mendeteksi metilasi pada tingkat gen tunggal atau seluruh genom. Metode berbasis enzim restriksi didasarkan pada ketidakmampuan enzim restriksi sensitif metilasi untuk membelah sitosin termetilasi di situs pengenalannya. Identifikasi status metilasi bergantung pada teknik south hybridization atau PCR dan didasarkan pada panjang fragmen DNA yang dicerna oleh enzim tersebut. Ketidakmampuan untuk mencerna urutan termetilasi mengakibatkan fragmen yang lebih panjang, menunjukkan CpG termetilasi. Meskipun metode berbasis enzim restriksi sederhana, cepat dan sangat sensitif, teknik ini memiliki kelemahan yaitu hanya dapat mendeteksi pada situs restriksi tertentu dan membutuhkan sejumlah besar DNA berkualitas tinggi. Selain itu, pemotongan untai

DNA yang tidak lengkap dapat menyebabkan hasil positif palsu. Teknik ini cocok untuk analisis metilasi seluruh genom dan teknik penemuan marker tetapi kurang cocok untuk menganalisis status metilasi situs CpG tertentu. Pengenalan metode sekuensing genomik natrium bisulfit pada tahun 1992 telah membuat studi metilasi dapat diakses oleh berbagai laboratorium. Deteksi metilasi DNA berbasis natrium bisulfit (NaHSO_3) dapat menghindari masalah yang dapat ditimbulkan dari enzim restriksi dan sekarang metode sekuensing banyak digunakan. Perlakuan DNA untai tunggal dengan natrium bisulfit menghasilkan perbedaan urutan karena deaminasi sitosin yang tidak termetilasi menjadi urasil dalam kondisi di mana sitosin yang termetilasi tetap tidak berubah. Perbedaan status metilasi yang ditandai dengan reaktivitas bisulfit dapat ditentukan dan dikuantifikasi secara akurat dengan teknologi berbasis PCR. Teknik sekuensing bisulfit memberikan data kualitatif tentang status metilasi 5-metilsitosin dalam amplicon antara primer sekuens dan

sebagai timin dan sitosin yang dimetilasi akan tetap menjadi sitosin. Penting untuk dicatat bahwa setelah konversi BS, untai DNA tidak lagi saling melengkapi. Ini harus diingat ketika memilih metode untuk kuantifikasi BS yang dikonversi DNA. Keandalan analisis metilasi tergantung pada konversi BS lengkap. Sitosin yang tidak terkonversi, jika ada, akan disalahartikan sebagai lokus termetilasi dan analisis akan menghasilkan hasil yang bias. Sebelumnya, metode konversi memerlukan input DNA yang tinggi dan paparan konsentrasi garam bisulfit tinggi di bawah suhu tinggi dan pH rendah. Kondisi yang keras ini mengakibatkan fragmentasi dan kehilangan DNA yang signifikan. Saat ini, ada berbagai macam kit komersial yang tersedia yang mampu mengubah serendah 100 pg DNA dalam waktu kurang dari 2 jam. Kit ini, perbandingan yang bagus tersedia di sini, menggunakan sistem kolom yang nyaman dan menjamin efisiensi konversi lebih dari 99%.

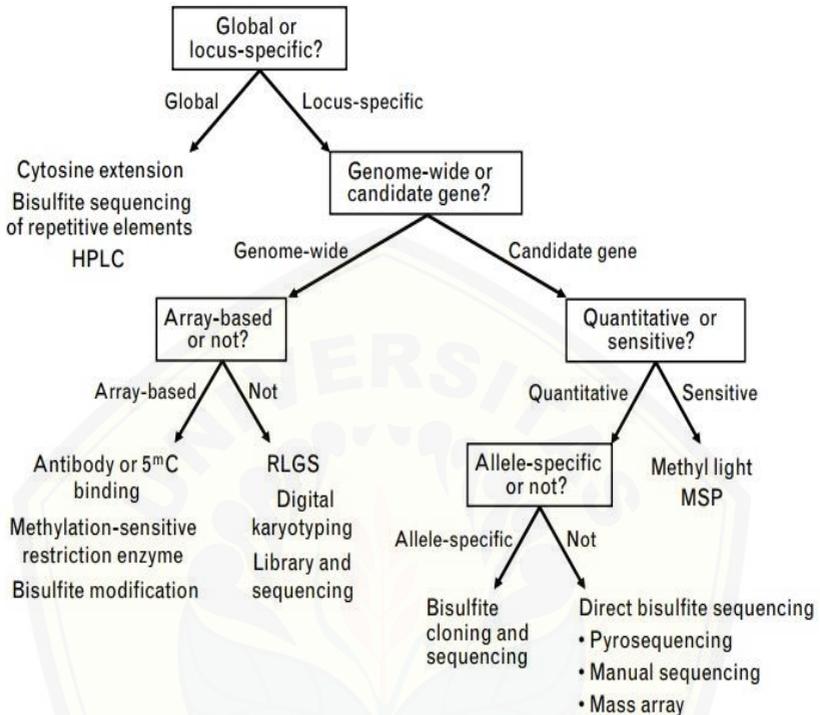
Banyaknya penelitian yang dilakukan di bidang metilasi DNA juga berdampak pada bertambahnya

variasi metode analisis metilasi DNA. Metode-metode tersebut menjadi pilihan peneliti untuk mencapai tujuan yang diinginkan. Metode ini dibagi menjadi dua, yaitu deteksi metilasi DNA global dan deteksi metilasi DNA spesifik pada situs tunggal. Untuk penelitian yang ingin menggali metilasi suatu gen lebih dalam, peneliti terlebih dahulu menentukan gen mana yang akan dipelajari dan hanya berfokus pada gen tersebut sehingga peneliti menentukan metode mana yang akan difokuskan untuk pengembangan metilasi [65]



Gambar 13. Ilustrasi hasil elektroforesis MSP

Gambar 14. Ilustrasi hasil elektroforesis MSP



Gambar 15. Algoritma penentuan metode analisis metilasi DNA (Shen and Waterland, 2007)

Gambar 16. Algoritma penentuan metode analisis metilasi DNA (Shen and Waterland, 2007)

yang paling umum digunakan dalam analisis metilasi DNA. MSP adalah teknik analisis DNA yang cepat dan sensitif. MSP menggunakan konsep PCR berupa transfeksi DNA. Sebelum MSP dilakukan, perlu

dilakukan modifikasi bisulfit yaitu penambahan natrium bisulfit pada sampel DNA yang diisolasi. Prinsip konversi ini adalah mengubah basa sitosin yang tidak termetilasi menjadi basa urasil, sedangkan sitosin yang termetilasi tetap tidak berubah. Konversi bisulfit ini dimaksudkan untuk membedakan antara DNA termetilasi dan tidak termetilasi [66]. MSP menggunakan dua pasangan primer, satu untuk mengamplifikasi DNA yang termetilasi dan yang lainnya untuk mengamplifikasi DNA yang tidak termetilasi. Setelah MSP, sampel diamati dengan elektroforesis gel agarosa. Hasil elektroforesis menentukan adanya metilasi DNA, jika sampel memiliki pita dengan primer termetilasi maka dapat disimpulkan sampel telah termetilasi, jika sampel dengan primer yang tidak termetilasi tampak pita, dapat disimpulkan sampel tidak termetilasi yang dapat dilihat pada gambar 8. Kelebihan dari MSP adalah metode ini memiliki sensitivitas yang tinggi. Kelemahan dari MSP adalah metode ini bersifat kualitatif dan bukan kuantitatif [67].

Sejak publikasi pertama kali mengenai protokol MSP, beberapa varian telah dikembangkan. Varian ini dikembangkan untuk meningkatkan sensitivitas MSP untuk mendeteksi DNA termetilasi, dikembangkan MSP dua tahap (Nested MSP). Tahap pertama PCR dilakukan dengan menggunakan primer yang mengamplifikasi DNA yang dimodifikasi natrium bisulfit, meskipun primer ini tidak membedakan antara alel termetilasi dan tidak termetilasi. Ini berarti bahwa primer terletak di daerah yang mengapit primer MSP dan menyimpan sejumlah besar sitosin tetapi tidak ada dinukleotida CpG (analog dengan primer urutan bisulfit). Produk PCR yang diperoleh diencerkan 50-100 kali lipat dan dilakukan PCR tahap kedua menggunakan primer MSP spesifik U dan M. (Nested PCR) memungkinkan deteksi metilasi yang lebih sensitif (1 alel termetilasi dalam >50.000 alel tidak termetilasi) sehingga dapat menganalisa sampel klinis dengan kualitas DNA berkualitas buruk [68].

Positif palsu, yang disebabkan oleh kurangnya konformasi untai tunggal, renaturasi dan konversi

natrium bisulfit yang tidak lengkap yang disebabkan oleh perlindungan sitosin termetilasi dari sitosin luar yang tidak termetilasi. Untuk memeriksa penyelesaian konversi bisulfit, standar internal yang terdiri dari oligonukleotida termetilasi in vitro dapat dimasukkan. Jika DNA yang diperoleh dari jaringan pada parafin terformalin, direkomendasikan untuk merancang primer tahap pertama agar mendapatkan amplikon yang lebih kecil dari 150 bp untuk lebih meningkatkan tingkat keberhasilan multipleks primer. Pendekatan ini menawarkan keuntungan tambahan bahwa produk PCR yang diperoleh dengan PCR putaran pertama stabil dan dapat disimpan untuk waktu yang lama. Strategi ini sekarang telah berhasil digunakan untuk profil metilasi tumor stroma gastrointestinal dan karsinoma hepatoseluler. MSP klasik dan (Nested PCR) sangat cocok untuk mendeteksi DNA tumor termetilasi dalam berbagai cairan tubuh. DNA yang didapatkan dari tumor kolorektal, paru-paru, hati, kepala dan leher, dan otak telah terdeteksi dalam serum dan plasma menggunakan metode Nested PCR.

Promotor gen termetilasi dalam urin dan air mani telah digunakan untuk mendiagnosis kanker prostat dan penanda metilasi yang ada dalam ductal lavage telah dilaporkan sebagai tambahan yang berguna untuk mamografi dalam diagnosis dini kanker payudara. Sputum telah dianalisis untuk hipermetilasi promotor untuk mendiagnosis kanker paru-paru. Penelitian lain melaporkan bahwa metilasi promotor yang menyimpang dalam air liur dapat digunakan untuk mendeteksi dan memantau kanker kepala dan leher [69,70].

Pada proses pengukuran jumlah alel termetilasi, beberapa protokol kuantitatif MSP (Q-MSP) telah dikembangkan yang memanfaatkan pengembangan PCR kuantitatif real-time. Di antara pengujian ini adalah pendekatan menggunakan primer MSP berlabel fluoresens dan yang didasarkan pada teknologi Taqman (MethyLight). Dua primer dan fluorogenic, probe berlabel ganda (pewarna reporter (misalnya FAM) dan pewarna quencher (misalnya TAMRA) khusus untuk DNA yang tidak termetilasi

atau termetilasi digunakan di MethyLight. Selama fase ekstensi PCR, eksonuklease 5' hingga 3' aktivitas TaqDNA Polymerase memisahkan reporter dari probe, melepaskannya dari quencher, menghasilkan peningkatan emisi fluoresens. Data dinormalisasi ke gen referensi internal, misalnya myoblast Determination Protein 1 (MYOD1) atau actin (ACTB) yang dirancang di wilayah yang tidak mengandung nukleotida CpG apa pun untuk memungkinkan amplifikasi yang tidak bias. Penelitian lain melaporkan hasil positif palsu karena amplifikasi DNA yang tidak dikonversi dan merekomendasikan dimasukkannya langkah deteksi konversi natrium bisulfit (ConLight-MSP) untuk menghindari deteksi yang berlebihan dari Metilasi DNA. Perbaikan desain primer, seperti dijelaskan di atas untuk primer MSP, juga dapat menghilangkan amplifikasi DNA yang tidak dimodifikasi ini. Lainnya termasuk primer serta masalah khusus untuk DNA tipe liar yang termetilasi, tidak termetilasi, atau tidak terkonversi. Paling umum, penelitian ini hanya menentukan DNA yang dikonversi

bisulfit termetilasi untuk gen yang diinginkan dan membandingkan hasil ini dengan gen referensi internal. Perlu dicatat bahwa kuantisasi yang diberikan adalah untuk jumlah relatif DNA termetilasi dengan pola metilasi tertentu dibandingkan dengan beberapa DNA masukan (gen kontrol referensi atau urutan tidak termetilasi). Kuantisasi ini mungkin mencerminkan perubahan aktual dalam kepadatan metilasi atau perbedaan dalam DNA tumor dalam sampel tertentu [71].

Keuntungan tambahan dari Q-MSP adalah tidak melibatkan langkah PCR tambahan, elektroforesis gel atau hibridisasi. Karakteristik ini membuat Q-MSP dapat diterapkan untuk skrining cepat metilasi DNA dalam sampel klinis. Beberapa penelitian menjelaskan penerapan Q-MSP untuk menganalisis jaringan yang difiksasi formalin dan tertanam parafin. Penelitian lain berhasil membandingkan metilasi promotor GSTP1 dalam jaringan formalin yang tertanam parafin dari jaringan prostat non-neoplastik dengan adenokarsinoma prostat yang dibatasi organ. Juga,

spesimen formalin, tertanam parafin dari saluran pencernaan bagian atas, biopsi prostat, tumor payudara dan bahkan sampel diseksi mikro laser dari tumor payudara telah dianalisis untuk hipermetilasi promotor secara kuantitatif. Selain itu, Q-MSP telah digunakan untuk mendeteksi profil metilasi yang menyimpang dari DNA tumor yang bersirkulasi dalam serum pasien dengan kanker esofagus, prostat, paru, hati, dan serviks. Selanjutnya, hipermetilasi promotor telah dideteksi oleh Q-MSP pada usap serviks [72].

Data MSP hanya mewakili sebagian kecil dari sel yang dianalisis dalam suatu populasi kecuali PCR dilakukan semi-kuantitatif, sehingga tingkat heterogenitas hilangnya ekspresi selama tumorigenesis tidak dapat ditentukan. Lebih lanjut, waktu yang tepat dari perubahan metilasi DNA pada tipe sel tertentu selama perkembangan embrionik dan karsinogenesis tidak dapat dianalisis. Untuk mengatasi masalah ini, penelitian lain menggabungkan MSP dengan hibridisasi in situ (ISH) yang memungkinkan deteksi in situ DNA termetilasi

pada slide jaringan. Tiga bagian jaringan berurutan ditempatkan pada slide, diperlakukan dengan natrium bisulfit dan dianalisis dengan MSP. Satu slide dianalisis dengan U-primer, satu slide dengan M-primer, sementara tidak ada primer yang diterapkan pada slide kontrol. Setelah amplifikasi, hibridisasi in situ (ISH) dilakukan menggunakan probe berlabel digoxin internal spesifik-U atau M, sesuai dengan produk U dan M yang dihasilkan oleh MSP fase-solusi. Visualisasi dapat dilakukan dengan pewarnaan nuklir cepat merah yang mewarnai sel negatif merah muda dan sel positif biru. MSP in situ menawarkan informasi pada tingkat sel karena visualisasi metilasi alel spesifik dalam sel individu dimungkinkan. Metode ini dapat digunakan untuk menguji peran metilasi pulau CpG selama embriogenesis, waktu perkembangan - dan pencetakan yang menyimpang dalam jenis sel tertentu, inaktivasi kromosom X mamalia dan perkembangan tumor dalam sampel klinis dengan heterogenitas dan konsekuensi seluler yang tepat dari metilasi untuk ekspresi gen. Selain deteksi berbasis

gel dan fluoresensi produk MSP, varian MSP berbasis HPLC dan DGGE telah dikembangkan [73,74].

Baru-baru ini, denaturasi kromatografi cair kinerja tinggi (DHPLC) dalam kombinasi dengan MSP untuk analisis profil metilasi telah dijelaskan. Setelah konversi natrium bisulfit, amplifikasi PCR dengan primer khusus untuk DNA yang dikonversi natrium bisulfit, tetapi tidak untuk alel yang tidak termetilasi dan termetilasi tercapai, diikuti oleh denaturasi dan renaturasi produk PCR, memungkinkan pembentukan DNA heteroduplex yang dapat dideteksi oleh HPLC. Prinsip metode ini didasarkan pada suhu denaturasi yang berbeda antara fragmen termetilasi yang dikonversi bisulfit dan tidak termetilasi yang disebabkan oleh kandungan G/C yang berbeda. DHPLC dalam kombinasi dengan MSP memungkinkan pendeteksian metilasi CpG minimal serta metilasi CpG sampel yang lengkap. Selanjutnya, derajat metilasi situs CpG dapat diperkirakan dari derajat pembentukan heteroduplex dan adanya sinyal heteroduplex tambahan dan berbeda dapat

menunjukkan adanya mutasi pada fragmen yang dianalisis. HPLC lain yang juga digunakan untuk membedakan antara amplicon termetilasi dan tidak termetilasi menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik pasangan ion (IP RP HPLC), yang didasarkan pada perbedaan panjang rantai polinukleotida setelah perlakuan bisulfit dan reaksi ekstensi primer yang dilakukan dengan deoksi dan dideoksinukleotida [55].

Genotipe yang dimodifikasi secara epigenetik dapat dicirikan dengan menggabungkan MSP dengan denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Prinsip dari aplikasi ini adalah setelah konversi bisulfit, amplicon DNA yang dimetilasi memiliki kandungan GC yang lebih tinggi dibandingkan dengan DNA yang tidak termetilasi, sehingga menghasilkan suhu leleh yang berbeda, sehingga dasar pemisahan didasarkan pada stabilitas termal. Selain mendeteksi hampir semua perubahan urutan di setiap wilayah DNA, teknik ini juga memungkinkan deteksi urutan termetilasi diferensial yang tidak dikelola oleh

penggunaan enzim restriksi. Studi pertama menggambarkan kemampuan untuk membuat perbedaan antara situs sepenuhnya, hemi dan tidak termetilasi. Kemudian, metode yang lebih sensitif dikembangkan dengan menggunakan GC-clamp dan perbedaan antara situs CpG termetilasi atau tidak termetilasi dapat dibuat pada perubahan urutan basa tunggal dalam fragmen tertentu. Pendekatan ini secara teknis bukan MSP, tetapi dapat digunakan untuk menguji perbedaan metilasi secara keseluruhan. Singkatnya, MSP adalah metode cepat untuk mendeteksi metilasi promotor yang menyimpang dalam jaringan dan cairan tubuh dan menyediakan metode non-invasif untuk diagnosis molekuler penyakit yang terkait dengan metilasi DNA yang menyimpang [75].

Tidak dapat disangkal, pyrosequencing memiliki sebagian besar keuntungan dalam hal penilaian metilasi DNA dari lokus tertentu. Desain primer dan interpretasi hasil dapat dilakukan secara langsung dengan perangkat lunak yang tersedia. Hanya langkah

PCR yang mungkin memerlukan beberapa optimasi untuk mendapatkan amplikon yang cukup tetapi ini tidak selalu diperlukan. Kerugian dari metode ini mungkin harga instrumen yang relatif tinggi. Selain itu, metode ini lebih memakan waktu karena terdiri dari tiga langkah: PCR, elektroforesis gel dan sekuensing itu sendiri. Ini juga sesuai dengan harga yang lebih tinggi per satu pengukuran. Ketika instrumentasi pyrosequencing tidak tersedia, kami merekomendasikan penggunaan MS-HRM. Desain primer layak untuk sebagian besar wilayah. Dalam percobaan kami, kami memiliki wilayah miskin CpG (IM) serta wilayah padat CpG (M dan U) dan mampu merancang set primer yang andal untuk keduanya. Seperti yang telah kita bahas dalam bab tentang hasil dari MS-HRM, optimasi mendalam dari urutan primer dan Tann tidak diperlukan untuk resolusi metode 5-10%. Cara ini sangat sederhana serta hemat biaya dan waktu. Hasil perkiraan dapat diturunkan segera dari kurva leleh. Kuantifikasi yang tepat tidak begitu mudah ketika perangkat lunak tertentu tidak

disediakan. Analisis MSRE terbukti menjadi metode yang cepat dan sederhana. Keuntungan utama dari pendekatan ini adalah tidak memerlukan konversi bisulfit DNA. Dengan demikian, lebih sedikit DNA yang dibutuhkan untuk melakukan analisis dan juga membuat desain primer lebih mudah. Kami dapat mengukur metilasi DNA secara akurat di wilayah M dan U. Jelas meskipun, metode ini tidak cocok untuk lokus termetilasi menengah [76].

Bahkan di era array dan sekuensing generasi berikutnya, sangat penting untuk memiliki metode untuk validasi data metilasi DNA yang diperoleh. Metode yang cepat, hemat biaya, dan andal yang memungkinkan untuk mengkonfirmasi atau menolak potensi signifikansi klinis dari perubahan metilasi tertentu dan dapat digunakan dalam praktik laboratorium umum masih diperlukan. Penelitian lain membandingkan empat metode standar yang digunakan untuk validasi metilasi DNA: analisis MSRE, pyrosequencing, MS-HRM dan qMSP. Dalam hal kelayakan keseluruhan, memperoleh informasi

metilasi DNA dan konsistensi di berbagai tingkat metilasi, kami menganggap pendekatan pyrosequencing dan MS-HRM sebagai yang paling cocok. Pyrosequencing memungkinkan resolusi dasar dan dengan demikian memperoleh tingkat metilasi untuk setiap CpG di wilayah tersebut, manfaat yang tak terbantahkan. MS-HRM juga dapat dirancang untuk menyelidiki satu lokus CpG bila diperlukan. Jika tidak, ini memberikan status metilasi DNA keseluruhan dari semua CpG di dalam wilayah yang dipelajari. Rupanya, MSRE dan qMSP tidak terlalu berlaku untuk mendeteksi metilasi DNA tingkat menengah. Meskipun demikian, MSRE tidak memerlukan konversi DNA bisulfit dan seperti yang kami tunjukkan di sini, waktu pencernaan dapat dipersingkat menjadi setengahnya. Hal ini membuat analisis MSRE menjadi yang paling sederhana dan tercepat dari keempat metode yang dibandingkan. Pendekatan qMSP terbukti cukup tidak tepat dan menuntut sehingga mungkin lebih mudah untuk

mempertahankan metode ini hanya sebagai alat kualitatif[77].



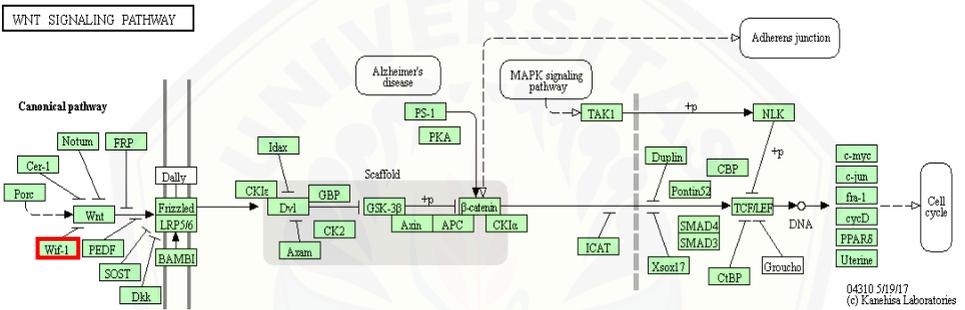
BAB 5. METILASI GEN WIF1, RASSF1A & p16

1. WNT Inhibitory Factor 1 (WIF1)

WIF1 adalah gen yang berfungsi untuk menekan ekspresi gen Wingless-type MMTV Integration site family (WNT). Gen memiliki fungsi kerja untuk menekan apoptosis dan mendorong proliferasi sel. Gen WIF1 terletak pada kromosom 12q14.3. Di wilayah promotornya, gen WIF1 memiliki banyak titik CpG. Mekanisme proliferasi sel terkait WNT ini melalui jalur catenin [78,79].

WNT merupakan protein yang akan berikatan dengan reseptornya yang disebut Frizzled dan LRP5/6. Jika tidak terdapat WNT, maka Frizzled dan LRP5/6 tidak akan aktif, sehingga akan terbentuk kompleks destruktif yang menyebabkan protein β catenin didegradasi oleh ubiquitin. Kompleks destruktif ini terdiri atas axin, GSK3, CK1 dan PP2A. Jika terdapat WNT, maka kompleks destruktif ini akan berikatan dengan protein frizzled dan LRP5/6. Protein destruktif tidak akan berikatan dengan β catenin

sehingga protein ini tetap ada dan dapat mengaktifkan transkripsi – transkripsi sel yang mengarah pada migrasi dan proliferasi sel. WIF1 merupakan salah satu protein pengatur kunci agar jalur WNT tetap terkendali agar tidak mengarah pada keganasan [80–82]



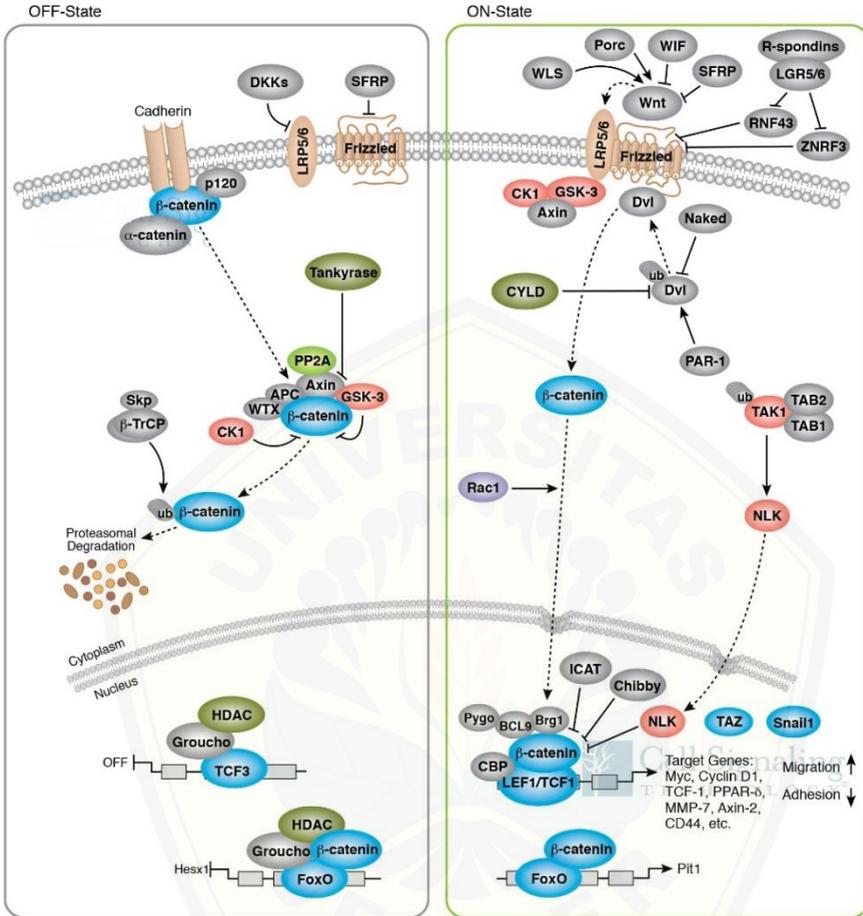
Gambar 17. Jalur persinyalan WNT yang berfungsi dalam proliferasi sel. WIF-1 (di dalam kotak merah) merupakan penghambat WNT yang berguna dalam regulasi siklus sel (Kanehisa Laboratories, 2017)

Gambar 18. Jalur persinyalan WNT yang berfungsi dalam proliferasi sel. WIF-1 (di dalam kotak merah) merupakan penghambat WNT yang berguna dalam regulasi siklus sel (Kanehisa Laboratories, 2017)

meningkatkan secara dramatis untuk dan menginduksi ekspresi catenin yang tidak terkontrol. Catenin merupakan salah satu komponen penting dalam perkembangan siklus sel. Dalam berbagai penelitian di bidang karsinoma, juga telah dilaporkan bahwa non-ekspresi WIF1 berkontribusi pada

tumorigenesis. WIF1 telah dilaporkan tidak diekspresikan dalam berbagai kanker, seperti kanker kandung kemih, kelenjar ludah, prostat, payudara dan paru-paru [82]

WIF1 telah dilaporkan dimetilasi pada pasien kanker nasofaring. Hipermetilasi promotor WIF1 terjadi pada 61,2 dari 49 pasien kanker nasofaring yang direkrut di RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, dibandingkan dengan 18,2% (4 dari 22) pada kelompok risiko tinggi. Metilasi ini menyebabkan non-ekspresi WIF1 dan jalur WNT terus aktif, menyebabkan keganasan intraseluler. Penelitian ini juga mengusulkan untuk mendeteksi hipermetilasi WIF1 sebagai biomarker risiko karsinoma nasofaring di Indonesia[83].



Gambar 19. Jalur persinyalan WNT. Pada gambar kiri merupakan jalur persinyalan jika tidak terdapat WNT, yang menyebabkan β-catenin didegradasi oleh ubiquitin. Pada gambar kanan merupakan jalur persinyalan jika terdapat WNT, yang menyebabkan β-catenin tidak terdegradasi dan dapat mengaktifkan transkripsi gen yang berkaitan dengan proliferasi sel (Cell Signaling Technology, 2017)

Gambar 20. Jalur persinyalan WNT. Pada gambar kiri merupakan jalur persinyalan jika tidak terdapat WNT, yang menyebabkan β-catenin didegradasi oleh ubiquitin. Pada gambar kanan merupakan jalur persinyalan jika terdapat WNT, yang menyebabkan β-catenin tidak terdegradasi dan dapat mengaktifkan transkripsi gen yang berkaitan dengan proliferasi sel (Cell Signaling Technology, 2017)

2. Metilasi Gen WIF1 dikaitkan dengan perilaku merokok

Kandungan karsinogen dalam rokok dapat menyebabkan hipermetilasi gen promotor, salah satunya adalah gen WIF1. Kebiasaan merokok seseorang pada gen penekan tumor yang mengalami DNA hypermethylation sangat dipengaruhi oleh durasi merokok dan jumlah rokok yang dihisap. Semakin lama seseorang merokok, semakin tinggi risiko hipermetilasi DNA[84].

Hilangnya hasil ekspresi WIF1 dari hipermetilasi gen promotor WIF1. WIF1 adalah penghambat gen WNT. WNT merupakan gen yang berfungsi dalam proliferasi sel. WIF1 yang tidak diekspresikan mengakibatkan tidak adanya inhibitor WNT, sehingga jalur catenin menjadi aktif dan menyebabkan proliferasi sel yang tidak terkontrol [84].

Dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah ada keterkaitan antara kebiasaan merokok dengan

pola metilasi pada gen WIF1. Subyek penelitian ini berjumlah 79 orang yang terdiri dari 40 orang sehat (kelompok kontrol) dan 39 orang KNF (Karsinoma Nasofaring - kelompok kasus) [84].

Tabel 1 Karakteristik subjek penelitian metilasi Gen WIF1 dikaitkan dengan kebiasaan merokok (Kurniawan, 2019)

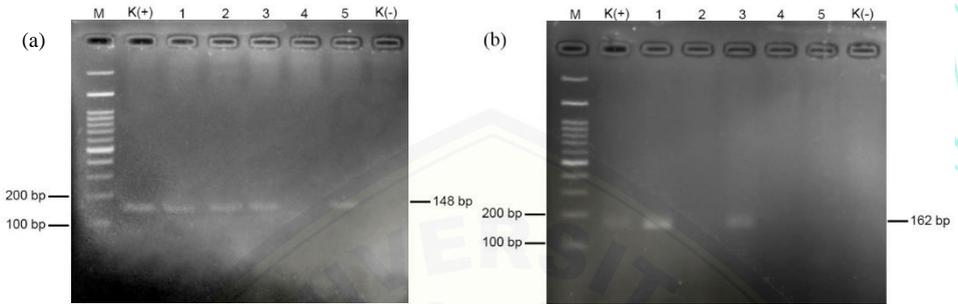
Variabel	Kontrol n = 40	Kasus (KNF) n=39	<i>p</i> *
Usia			
Rerata ± SD (tahun)	49,58 ± 2,56	50,58 ± 2,38	0,79
Status Merokok			
Perokok	19	19	0,91
Bukan Perokok	21	20	
Durasi Merokok			
Rerata ± SD (tahun)	28,89 ± 13,07	33,21 ± 2,99	0,47
Batang Rokok/hari			
Rerata ± SD (tahun)	8,95 ± 1,30	12,89 ± 1,93	0,21
Tipe WHO			
Tipe 2	0	1	
Tipe 3	0	38	

*uji statistic chi square; KNF : Karsinoma Nasofaring

Subyek penelitian ini berjumlah 79 orang yang terdiri dari 40 orang sehat (kelompok kontrol) dan 39 orang KNF (kelompok kasus). Karakteristik subjek penelitian dapat dilihat pada Tabel 1. Rerata usia subjek penelitian pada kelompok kontrol adalah 49,58 (SD \pm 2,56) tahun dan kelompok kasus adalah 50,58 (SD \pm 2,38) tahun. Tidak ada perbedaan umur yang signifikan dengan $p=0,79$. Subyek penelitian meliputi perokok dan bukan perokok. Ada 19 perokok pada kelompok kontrol dan kasus. Kelompok bukan merokok pada kelompok kontrol sebanyak 21 orang, sedangkan pada kelompok kasus 20 orang. Rasio status merokok dibandingkan dengan kontrol menunjukkan hasil yang tidak signifikan dengan $p = 0,91$. Rerata lama merokok kelompok kontrol adalah 28,89 tahun (SD \pm 13,07) tahun dan kelompok kasus adalah 33,21 tahun (SD \pm 2,99) dengan tidak ada perbedaan dengan $p = 0,47$. Konsumsi tembakau dinyatakan dalam satuan batang rokok per hari. Rerata konsumsi rokok kelompok kontrol 8,95 batang/hari (SD \pm 1,30) dan kelompok penyakit 12,89

batang/hari ($SD \pm 1,98$) dengan proporsi tidak berbeda dengan $p\text{-value} = 0,21$ [84].

Penelitian ini menggunakan subjek laki-laki. Hal ini untuk menghindari bias karena perbedaan gender. Subjek penelitian yang digunakan pada penelitian ini merupakan orang sehat dan pasien KNF dengan rentang umur dari 25-76 tahun. Pada penelitian epidemiologi KNF di Indonesia, umur puncak pasien berkisar antara 40-50 tahun. Secara umum, semakin tua seseorang, kemungkinan untuk terpapar lingkungan semakin tinggi sehingga dapat mempengaruhi pola metilasi. Subyek dipilih dengan usia yang sama (kecocokan) untuk menghindari bias karena alasan di atas dan tidak ada perbedaan antara kelompok kontrol (rata-rata $49,579 \pm 2.558$) dan kasus (rata-rata 50.579 ± 2.385), dengan nilai $p = 0,790$ [84].



Gambar 21. Hasil MSP Gen WIF1. (a) MSP menggunakan primer metilasi, K(+) kontrol positif, K(-) kontrol negatif, sampel nomor 1, 2, 3 dan 5 merupakan sampel yang positif mengalami metilasi, sedangkan sampel nomor 4 negatif metilasi. (b). MSP primer menggunakan non metilasi, K(+) kontrol positif, K(-) kontrol negatif, sampel nomor 1, dan 3 merupakan sampel yang positif non metilasi sedangkan sampel nomor 2, 4 dan 5 negatif non metilasi.

Gambar 22. Hasil MSP Gen WIF1. (a) MSP menggunakan primer metilasi, K(+) kontrol positif, K(-) kontrol negatif, sampel nomor 1, 2, 3 dan 5 merupakan sampel yang positif mengalami metilasi, sedangkan sampel nomor 4 negatif metilasi. (b). MSP primer menggunakan non metilasi, K(+) kontrol positif, K(-) kontrol negatif, sampel nomor 1, dan 3 merupakan sampel yang positif non metilasi sedangkan sampel nomor 2, 4 dan 5 negatif non metilasi.

merepresentasikan jumlah paparan lingkungan yang berperan dalam metilasi gen. Semakin banyak dan semakin lama seseorang merokok maka semakin tinggi pula risiko metilasi gen yang terjadi [84].

Tabel 2. Status metilasi promotor gen WIF1 pada kelompok kasus dan kontrol

Variabel	Kontrol n (%)	KNF n (%)	<i>p</i> *
Status metilasi promotor gen WIF1			
Termetilasi	20 (57,1%)	15 (42,9%)	0,30
Tidak Termetilasi	20 (45,5%)	24 (61,5%)	

*uji statistik chi square; nilai $P \leq 0,05$ dianggap signifikan secara statistik

Deteksi metilasi menggunakan metode yang disebut dengan Methylation Specific PCR (MSP). Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan adanya metilasi promotor gen WIF1 pada kelompok kontrol dan penyakit. Penulis tidak menemukan perbedaan dalam metilasi promotor gen WIF1 dalam kasus dan kontrol. Penelitian sebelumnya oleh Hutajulu et al (2011) menunjukkan bahwa metilasi promotor gen WIF1 dalam sampel jaringan adalah salah satu biomarker yang dapat digunakan untuk deteksi dini KNF. Deteksi dini KNF pada penelitian ini dilakukan

dengan mengumpulkan sel nasofaring dengan metode NP brushing dan menunjukkan bahwa 61,2% subjek pasien KNF mengalami metilasi promotor WIF1. Promotor gen WIF1 juga termetilasi dalam kultur sel KNF, khususnya C6661. Dalam kultur sel ini, promotor gen WIF1, NLK dan APC mengalami hipermetilasi, mengurangi ekspresi ketiga gen ini [85] menggunakan sampel darah lengkap dari 902 wanita dengan kanker payudara tanpa mutasi BRCA1 dan 990 wanita sehat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 47,1% pasien kanker payudara mengalami metilasi promotor gen BRCA1 dan 45,9% wanita sehat mengalami metilasi promotor gen WIF1 ($p = 0,08$). Hal ini menunjukkan bahwa metilasi promoter gen BRCA1 dalam darah tepi dapat digunakan sebagai penanda awal kanker payudara. Penggunaan sampel darah tepi dapat digunakan sebagai sumber untuk mengamati adanya metilasi pada promotor gen dan dikaitkan dengan risiko berkembangnya penyakit, bila observabilitas tidak memungkinkan ditemukan kelainan patologis.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa tidak ada perbedaan status metilasi promotor gen WIF1 yang diisolasi dari DNA, baik pada kasus dan kontrol, maupun pada perokok dan bukan perokok. Metilasi promotor gen WIF1 tidak dapat digunakan sebagai penanda deteksi dini (screening) KNF yang terkait dengan kebiasaan merokok [86].

Tabel 3. Tabel 3. Stratifikasi uji beda antara status metilasi promotor gen WIF1 dengan kelompok kasus dan kontrol pada subjek perokok (kiri) dan subjek bukan perokok (kanan)

	Perokok					Bukan Perokok			
	Kasus	Kontrol	OR	p*		Kasus	Kontrol	OR	p*
Tidak Metilasi	12 (63,2%)	10 (52,6%)	0,65	0,51	Tidak Metilasi	12 (60%)	10 (47,6%)	0,61	0,43
Metilasi	7 (36,8%)	9 (47,4%)			Metilasi	8 (40%)	11 (52,4%)		

Studi ini menganalisis status metilasi promotor gen WIF1 pada perokok dan non-perokok untuk mengamati hubungannya dengan risiko KNF. Terdapat 16 metilasi promotor gen WIF1 pada perokok sedangkan 22 pada bukan perokok ($p = 0,797$). Ini menunjukkan bahwa metilasi promotor gen WIF1 dari sampel darah tepi tidak terkait dengan perilaku merokok. Hasil penelitian ini serupa dengan

yang diamati oleh =yang melakukan penelitian untuk mengetahui hubungan antara status merokok dan metilasi promotor gen WIF1 jaringan kanker paru-paru sel non-kecil (NSCLC). Sebanyak 139 pasien NSCLC terdaftar dalam penelitian ini dan dibagi menjadi dua kelompok, perokok (104) dan bukan perokok (35). Hasil penelitian menunjukkan bahwa promotor gen WIF1 dimetilasi pada perokok dan bukan perokok dengan nilai $p = 0,331$. Penelitian lain mempelajari 44 jaringan paru-paru NSCLC dan 32 jaringan paru-paru normal dari pasien yang sama. Penelitian ini juga membagi subjek menjadi 2 kelompok: bukan perokok (21 orang) dan perokok (23 orang). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada dua non-perokok termetilasi dan lima perokok termetilasi. Disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan antara perokok dan bukan perokok. Selanjutnya mengamati bahwa nilai prognostik yang diberikan oleh metilasi promotor WIF1 pada pasien NSCLC dengan metilasi promotor WIF1. 7 orang mengalami kambuh 120 bulan setelah diagnosis sementara 37 tidak diketahui.

Hal ini menunjukkan bahwa metilasi WIF1 pada pasien NSCLC menunjukkan prognosis yang buruk dan tidak berhubungan dengan perilaku merokok [81,87]. Sementara itu, Huang dkk. (2011) meneliti metilasi dalam kultur sel Het1A (garis sel epitel esofagus) yang diobati dengan ekstrak primer (MSE) atau ekstrak asap tembakau pasif (SSE) selama 6 hari. Ditemukan penurunan ekspresi gen WIF1 karena metilasi dalam regio promotor. Dapat disimpulkan dari dua penelitian di atas bahwa model metilasi promotor WIF1 yang diturunkan dari kultur sel memiliki hasil yang berbeda dari model metilasi buffer yang diturunkan dari darah tepi berdasarkan hipotesis yang sama, lingkungan kontak [88].

Penelitian ini menganalisis hubungan antara kebiasaan merokok dengan perkembangan metilasi promotor gen WIF1. Penelitian ini tidak menganalisis masalah yang berkaitan dengan faktor lingkungan lain yang dapat menyebabkan metilasi. Metilasi tidak hanya dipengaruhi oleh kebiasaan merokok, tetapi juga oleh gaya hidup secara keseluruhan. Gaya hidup

yang dapat mempengaruhi perkembangan metilasi termasuk diet, aktivitas fisik, penggunaan obat-obatan tertentu, dan tempat kerja yang terpapar zat berbahaya. Orang yang makan makanan kaya pengawet menunjukkan pola metilasi yang berbeda dari mereka yang makan lebih banyak makanan alami. Aktivitas fisik dan penggunaan obat-obatan tertentu mempengaruhi metabolisme seseorang dan mempengaruhi pola metilasi mereka. Orang yang bekerja terus-menerus terpapar kontaminan seperti hidrokarbon aromatik polisiklik dan benzena dilaporkan memiliki metilasi DNA yang lebih tinggi daripada mereka yang bekerja di ruang yang tidak terkontaminasi [89,90].

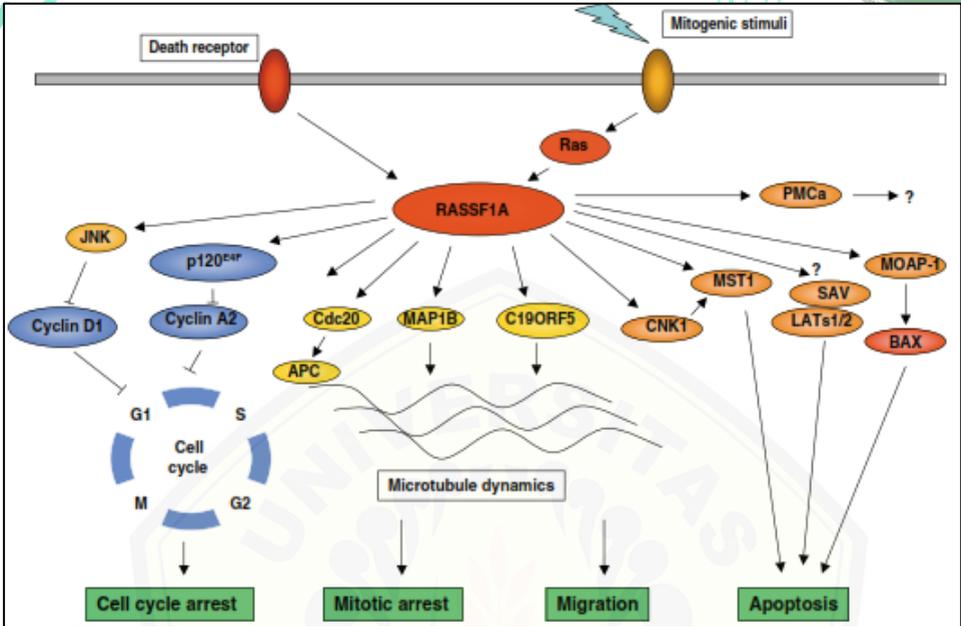
Kajian ini dapat dilanjutkan untuk memperoleh data yang lebih lengkap dengan mengkuantifikasi metilasi promotor gen WIF1. Studi kuantitatif diharapkan dapat mengungkapkan proporsi metilasi promotor WIF1 pada kelompok kontrol dan kasus. Selain itu, tingkat metilasi WIF1 pada kanker nasofaring yang sehat dapat ditentukan. Oleh karena

itu, dapat dilihat bahwa mereka yang memiliki tingkat metilasi dari promotor gen WIF1 di bawah ambang batas tidak berisiko terkena kanker nasofaring, tetapi mereka yang melebihi ambang batas tersebut diduga menderita kanker nasofaring. Kuantifikasi metilasi harus dilakukan karena lebih sensitif daripada menggunakan metode MSP saja. Sementara metode MSP hanya dapat mendeteksi ada tidaknya metilasi DNA, kuantifikasi dapat menentukan derajat metilasi DNA dan membandingkan derajat metilasi antara individu yang sehat dan nasofaring [69].

3. RASSF1A

Gen RASSF1A merupakan gen supresor tumor yang terletak pada kromosom 3p21. RASSF1A merupakan protein efektor yang berperan dalam berbagai jalur kanker seperti jalur Ras/PI3K/AKT/RAF/MEK/ERK dan Hippo. Peran protein RASSF1A dalam siklus sel adalah untuk menghambat cyclin D1 dan cyclin A2, sehingga menyebabkan penghentian siklus sel. RASSF1A juga

berperan dalam migrasi sel dengan mempengaruhi mikrotubulus dan juga berperan dalam apoptosis sel. Inaktivasi RASSF1A pada berbagai kanker telah dibuktikan secara luas. Inaktivasi ini memainkan peran penting dalam patogenesis dan perkembangan tumor padat. Mekanisme epigenetik dan genetik dapat menginduksi inaktivasi RASSF1A. Penelitian pada kanker paru-paru telah menunjukkan bahwa inaktivasi protein RASSF1A disebabkan oleh peningkatan hipermetilasi gen promotor daripada oleh LOH (Loss of Allergy). Studi serupa pada KNF telah menunjukkan hasil yang serupa, bahwa inaktivasi RASSF1A pada NPC lebih disebabkan oleh hipermetilasi promotor gen daripada mutasi genetik [48,72,91,92].



Gambar 23. Jalur persinyalan RASSF1A. RASSF1A berperan dalam proses siklus sel yaitu sebagai inhibitor Cyclin D1 dan Cyclin A2 sehingga menyebabkan terjadinya cell cycle arrest. RASSF1A berperan dalam pergerakan sel dengan mempengaruhi mikrotubulus sehingga sel dapat bermigrasi ataupun mitosis arrest. RASSF1A juga berperan dalam proses apoptosis sel (Donninger et al, 2007)

Peningkatan metilasi promotor gen RASSF1A dikaitkan dengan merokok. Penelitian di India menunjukkan bahwa metilasi promotor gen RASSF1A secara signifikan lebih tinggi pada perokok daripada non-perokok. Penelitian pada pasien kanker paru-paru juga menunjukkan bahwa hipermetilasi gen promotor RASSF1A adalah 1,75 kali lebih tinggi pada

perokok daripada non-perokok dengan kanker paru-paru. Namun, tidak ada penelitian yang membandingkan metilasi promotor RASSF1A pada perokok dan non-perokok di [48]

4. p16 / CDKNA2

p16 adalah protein penghambat (Cyclin Dependent Kinase) CDK dari keluarga INK4. Protein ini dikodekan oleh gen yang terletak pada kromosom 9p21 di lokus INK4a/ARF yang mengkodekan dua protein dari dua urutan promotor yang berbeda, p16INK4a dan p19ARF. Kedua protein ini bertindak untuk menghambat proliferasi sel dengan mempengaruhi aktivitas protein Rb (retinoblastoma) dan pensinyalan p53. Protein p16INK4a memiliki peran penghambatan siklus sel dengan menghambat fase S. Protein ini mengikat CDK4/6 sehingga menghambat CDK4/6 membentuk kompleks dengan cyclin D1. Kompleks ini mampu memfosforilasi protein Rb sehingga faktor transkripsi E2F terlepas

ikatannya dari protein Rb. Lepasnya protein E2F menyebabkan siklus sel akan berjalan dan menyebabkan terjadinya proliferasi sel. Protein p16INK4a membuat protein Rb tetap dalam keadaan hipofosforilasi sehingga siklus sel terhenti). Inaktivasi protein p16 terjadi pada berbagai macam kanker termasuk KNF. Inaktivasi ini sebagian besar disebabkan karena hipermetilasi promotor gen p16. Delesi homozigot kromosom 9p21.3 pernah dilaporkan pada satu kasus KNF primer. Kromosom ini, selain protein p16, mengkode ARF dan p15INK4b. Namun, penelitian telah menunjukkan bahwa hipermetilasi gen promotor adalah penyebab paling umum dari inaktivasi protein ini [48,93]

5. Deteksi Metilasi RASSF1A dan CDKNA2 dari Sampel Darah Tepi

Proliferasi sel abnormal biasanya dilaporkan sebagai akibat dari mutasi DNA. Namun, metilasi telah dilaporkan lebih sering pada KNF dibandingkan

dengan kanker lainnya. Metilasi gen terjadi pada jaringan nasofaring atau gen virus Epstein-Barr (EBV) dan mendukung peran karsinogeniknya. Beberapa penelitian telah melaporkan perkembangan promotor metilasi pada gen penekan tumor NPC. Penelitian ini menggunakan jaringan nasofaring untuk mencerminkan perubahan epigenetik in situ. Namun, penggunaan jaringan nasofaring dibatasi oleh kuantitas dan kualitasnya. Kanker nasofaring bukanlah kanker yang bisa dioperasi. Biopsi menghasilkan sepotong jaringan yang sering digunakan dalam persiapan pemeriksaan histopatologi untuk diagnosis (parafin tertanam formalin (FFPE)). Biopsi adalah metode invasif yang dilakukan hanya dengan: Karena itu, batasi penggunaan yang sering. Juga disarankan untuk menggunakan sikat nasofaring yang dimaksudkan untuk mengelupas sel-sel epitel[58,94].

Penggunaan darah tepi dianggap sebagai pengganti yang lebih tepat karena kurang invasif dan memungkinkan pengambilan sampel yang lebih

sering, dan oleh karena itu cocok untuk skrining atau tindak lanjut. DNA seluler (cfDNA) baru-baru ini telah digunakan untuk menggantikan jaringan dengan asumsi bahwa DNA berasal dari jaringan kanker melalui apoptosis. Namun, efisiensi cfDNA cukup rendah. Di sisi lain, darah utuh/sel darah juga bisa digunakan. Telah dikemukakan bahwa proses imunologi yang terkait dengan peradangan dalam perkembangan kanker menyebabkan perubahan pada populasi leukosit. Perubahan ini dapat mengubah epigenetik darah tepi [95].

Studi metilasi darah tepi bertujuan untuk menjelaskan keadaan metilasi jaringan. Studi metilasi jaringan otak, kanker payudara, dan kanker usus besar telah menunjukkan bahwa metilasi darah tepi tidak dapat menjelaskan kondisi jaringan ini.. Namun, penelitian jaringan paru-paru ini menunjukkan hasil yang berbeda. Pada penelitian ini tidak ditemukan hubungan antara perilaku merokok pada pasien KNF dengan metilasi RASSF1A dan CDKN2A. Distribusi metilasi RASSF1A dan CDKN2A yang serupa

ditemukan pada perokok dan bukan perokok. Penelitian sebelumnya menggunakan FFPE nasofaring dan detasemen jaringan nasofaring menunjukkan bahwa status metilasi RASSF1A dan CDKN2A lebih tinggi pada pasien KNF dibandingkan pada pasien non-kanker. Studi yang dilakukan menunjukkan bahwa metilasi kedua gen lebih tinggi pada perokok dibandingkan bukan perokok menjelaskan kemungkinan menggunakan proses ini sebagai biomarker untuk merokok. Perilaku merokok tanpa mengkonfirmasi hasil paralel metilasi RASSF1A dan CDKN2A di NPC. Penelitian ini memiliki keterbatasan seperti kurangnya perokok pasif dan batasan ukuran sampel[48].

DAFTAR PUSTAKA

- [1] WHO. The Global Cancer Atlas - World. International Agency for Research on Cancer 2012. <http://globocan.iarc.fr/ia/World/atlas.html> (accessed October 24, 2017).
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [3] The Global Cancer Observatory. Cancer Incident in Indonesia. International Agency for Research on Cancer 2020;858:1–2.
- [4] International Agency for Research on Cancer (IARC). Indonesia - Global Cancer Observatory. *Globocan* 2020;858:1–2.
- [5] Nakata S, Phillips E, Goidts V. Biomarkers in Cancer. 2015. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7681-4_11.
- [6] Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:116–29. <https://doi.org/10.1038/nrc2780>.

- [7] Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *Journal of Endocrinology* 2011;209:139–51. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>.
- [8] Gao X, Zhang Y, Saum K-U, Schöttker B, Breitling LP, Brenner H. Tobacco smoking and smoking-related DNA methylation are associated with the development of frailty among older adults. *Epigenetics* 2017;12:149–56. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1271855>.
- [9] Brown RA, Lewinsohn PM, Seeley JR, Wagner EF. Cigarette smoking, major depression, and other psychiatric disorders among adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1996;35:1602–10. <https://doi.org/10.1097/00004583-199612000-00011>.
- [10] Kabir Z, Connolly GN, Alpert HR. Secondhand smoke exposure and neurobehavioral disorders among children in the United States. *Pediatrics*

- 2011;128:263–70.
<https://doi.org/10.1542/peds.2011-0023>.
- [11] Watson WL, Conte AJ. Smoking and lung cancer. *Cancer* 1954;7:245–9.
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195403\)7:2<245::AID-CNCR2820070206>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195403)7:2<245::AID-CNCR2820070206>3.0.CO;2-V).
- [12] Ostrow KL, Park HL, Hoque MO, Kim MS, Liu J, Argani P, et al. Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced genes in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2009;15:1184–91.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1304>.
- [13] Zhang Z, Chen F, Kuang H, Huang G. Epigenetics of Nasopharyngeal Carcinoma 2012.
- [14] Dai W, Zheng H, Cheung AKL, Lung ML. Genetic and epigenetic landscape of nasopharyngeal carcinoma. *Chin Clin Oncol* 2016;5:16.
<https://doi.org/10.21037/cco.2016.03.06>.
- [15] Toyota M, Sasaki Y, Satoh A, Ogi K, Kikuchi T, Suzuki H, et al. Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*

2003;100:7818–23.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1337066100>.

- [16] Li LL, Shu XS, Wang ZH, Cao Y, Tao Q. Epigenetic disruption of cell signaling in nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer* 2011;30:231–9.

<https://doi.org/10.5732/cjc.011.10080>.

- [17] Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022;12:31–46.

<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

- [18] Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes Cancer* 2011;2:607–17.

<https://doi.org/10.1177/1947601910393957>.

- [19] D’Anna F, van Dyck L, Xiong J, Zhao H, Berrens R v., Qian J, et al. DNA methylation repels binding of hypoxia-inducible transcription factors to maintain tumor immunotolerance. *Genome Biol* 2020;21:1–36. <https://doi.org/10.1186/S13059-020-02087-Z/FIGURES/6>.

- [20] Kim I, Park JW. Hypoxia-driven epigenetic regulation in cancer progression: A focus on

- histone methylation and its modifying enzymes. *Cancer Lett* 2020;489:41–9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.05.025>.
- [21] Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 2007;1:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.01.001>.
- [22] Chua MLK, Wee JTS, Hui EP, Chan ATC. Nasopharyngeal carcinoma. *The Lancet* 2016;387:1012–24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00055-0).
- [23] National Cancer Institute. Nasopharyngeal Cancer Treatment–Patient Version (PDQ®). PDQ® Nasopharyngeal Cancer Treatment 2015. <http://www.cancer.gov/types/head-and-neck/patient/nasopharyngeal-treatment-pdq> (accessed April 6, 2016).
- [24] Yu MC, Yuan J-M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biology* 2002;14:423–30. <https://doi.org/10.1016/S1044>.
- [25] Bruce JP, Yip K, Bratman S v., Ito E, Liu F-F. Nasopharyngeal Cancer: Molecular Landscape.

- Journal of Clinical Oncology 2015;33:3346–55.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2015.60.7846>.
- [26] American Cancer Society. Surgery for Nasopharyngeal Cancer 2016.
<https://www.cancer.org/cancer/nasopharyngeal-cancer/treating/surgery.html> (accessed July 18, 2017).
- [27] Petersson F. Nasopharyngeal carcinoma: A review. *Semin Diagn Pathol* 2015;32:54–73.
<https://doi.org/10.1053/j.semdp.2015.02.021>.
- [28] Soeripto. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Berita Kedokteran Masyarakat (Ina)* 1998;XIII:207–11.
- [29] Chang ET, Adami HO. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2006;15:1765–77. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0353>.
- [30] Adham M, Kurniawan AN, Muhtadi AI, Roezin A, Hermani B, Gondhowiardjo S, et al. Nasopharyngeal carcinoma in indonesia: Epidemiology, incidence, signs, and symptoms at

- presentation. *Chin J Cancer* 2012;31:185–96.
<https://doi.org/10.5732/cjc.011.10328>.
- [31] Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. CHAPTER 2 Tumours of the Nasopharynx. WHO Classification of Tumours Pathology & Genetics: Head and Neck Tumors 2003:82–106.
- [32] World Health Organization. Indonesia Source GLOBOCAN 2018. International Agency for Research on Cancer 2019;256:1–2.
- [33] Fachiroh J, Schouten T, Hariwiyanto B, Paramita DK, Harijadi A, Haryana SM, et al. Molecular Diversity of Epstein-Barr Virus IgG and IgA Antibody Responses in Nasopharyngeal Carcinoma: A Comparison of Indonesian, Chinese, and European Subjects. *Journal of Infectious Diseases* 2004;190:53–62.
<https://doi.org/10.1086/421245>.
- [34] Tsurumi T, Fujita M, Kudoh A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* 2005;15:3–15.
<https://doi.org/10.1002/rmv.441>.

- [35] Xu F-H, Xiong D, Xu Y-F, Cao S-M, Xue W-Q, Qin H-D, et al. An Epidemiological and Molecular Study of the Relationship Between Smoking, Risk of Nasopharyngeal Carcinoma, and Epstein–Barr Virus Activation. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2012;104:1396–410. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs320>.
- [36] Jakszyn P, Gonzalez C-A. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* 2006;12:4296–303. <https://doi.org/10.3748/WJG.V12.I27.4296>.
- [37] Chen L. Alcohol Consumption and the Risk of Nasopharyngeal Carcinoma: A Systematic Review 2011;61:1–15. <https://doi.org/10.1080/01635580802372633>. Alcohol.
- [38] Chen Y-P, Zhao B, Chen C, Lei X, Shen L, Chen G, et al. Alcohol drinking as an unfavorable prognostic factor for male patients with nasopharyngeal carcinoma. *Sci Rep* 2016;6:19290. <https://doi.org/10.1038/srep19290>.

- [39] Li Y, Yang H, Cao J. Association between alcohol consumption and cancers in the chinese population-a systematic review and meta-analysis. PLoS One 2011;6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018776>.
- [40] Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, Gieger C, et al. Tobacco Smoking Leads to Extensive Genome-Wide Changes in DNA Methylation. PLoS One 2013;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063812>.
- [41] Huang Y, Chang X, Lee J, Cho YG, Zhong X, Park I-S, et al. Cigarette smoke induces promoter methylation of single-stranded DNA-binding protein 2 in human esophageal squamous cell carcinoma. Int J Cancer 2011;128:2261–73. <https://doi.org/10.1002/ijc.25569>.
- [42] Chen R, Clifford A, Lang L, Anstey KJ. Is exposure to secondhand smoke associated with cognitive parameters of children and adolescents?- a systematic literature review. Ann Epidemiol 2013;23:652–61. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2013.07.001>.

- [43] Fachiroh J, Paramita D. Single-assay combination of Epstein-Barr Virus (EBV) EBNA1-and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG). *J Clin Microbiol* 2006;44:1459–67. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1459>.
- [44] Dauksa A, Gulbinas A, Endzinas Z, Oldenburg J, El-Maarri O. DNA methylation at selected CpG sites in peripheral blood leukocytes is predictive of gastric cancer. *Anticancer Res* 2014;34:5381–8.
- [45] Weinberg R. *The Biology of Cancer*, Second Edition. Taylor & Francis Group; 2013.
- [46] Kulis M, Esteller M. 2 – DNA Methylation and Cancer. *Adv Genet* 2010;70:27–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2>.
- [47] Tang YA, Lin RK, Tsai YT, Hsu HS, Yang YC, Chen CY, et al. MDM2 overexpression deregulates the transcriptional control of RB/E2F leading to DNA methyltransferase 3A overexpression in lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2012;18:4325–

33. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2617>.
- [48] Risanti ED, Kurniawan A, Wahyuningsih L, Dwianingsih EK, Rinonce HT, Fachiroh J. Association of Peripheral Blood RASSF1A and CDKN2A Methylation Status with Smoking Behaviour in Nasopharyngeal Carcinoma. *Indones Biomed J* (in Press) 2018.
- [49] Jung K-J, Min K, Bae JH, Kwon TK. Carnosic acid sensitized TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of c-FLIP and Bcl-2 expression at the post translational levels and CHOP-dependent up-regulation of DR5, Bim, and PUMA expression in human carcinoma caki cells. *Oncotarget* 2015;6:1556–68.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2727>.
- [50] Xiang T, Li L, Yin X, Yuan C, Tan C, Su X, et al. The ubiquitin peptidase UCHL1 induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis through stabilizing p53 and is frequently silenced in breast cancer. *PLoS One* 2012;7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029783>.

- [51] Hsu WL, Chen JY, Chien YC, Liu MY, You SL, Hsu MM, et al. Independent effect of EBV and cigarette smoking on nasopharyngeal carcinoma: A 20-year follow-up study on 9,622 males without family history in Taiwan. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2009;18:1218–26. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-1175>.
- [52] Tsao SW, Yip YL, Tsang CM, Pang PS, Lau VMY, Zhang G, et al. Etiological factors of nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol* 2014;50:330–8. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.02.006>.
- [53] Frappier L. The Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein. *Scientifica (Cairo)* 2012;2012:438204. <https://doi.org/10.6064/2012/438204>.
- [54] Xu F-H, Xiong D, Xu Y-F, Cao S-M, Xue W-Q, Qin H-D, et al. An Epidemiological and Molecular Study of the Relationship Between Smoking, Risk of Nasopharyngeal Carcinoma, and Epstein–Barr Virus Activation. *JNCI: Journal of the National*

- Cancer Institute 2012;104:1396–410.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djs320>.
- [55] Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:576–81.
<https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282bf6f43>.
- [56] Lee KWK, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet* 2013;4:1–11.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00132>.
- [57] Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Gayther SA, Apostolidou S, et al. An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer. *PLoS One* 2009;4.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008274>.
- [58] Gao X, Zhang Y, Saum K, Schöttker B, Breitling LP, Brenner H, et al. DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality. *Nat Commun* 2017;8:14617.
<https://doi.org/10.1038/ncomms14617>.
- [59] Luo X, Huang R, Sun H, Liu Y, Bi H, Li J, et al. Methylation of a panel of genes in peripheral blood leukocytes is associated with colorectal cancer. *Sci*

Rep 2016;6:1–10.

<https://doi.org/10.1038/srep29922>.

- [60] Severi G, Southey MC, English DR, Jung C, Lonie A, McLean C, et al. Epigenome-wide methylation in DNA from peripheral blood as a marker of risk for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2014;148:665–73. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3209-y>.
- [61] Pilsner JR, Liu X, Ahsan H, Ilievski V, Slavkovich V, Levy D, et al. Genomic methylation of peripheral blood leukocyte DNA: Influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults. *American Journal of Clinical Nutrition* 2007;86:1179–86.
- [62] Otterdijk SD van, Binder AM, Szarc K, Schwald J, Michels KB. DNA methylation of candidate genes in peripheral blood from patients with type 2 diabetes or the metabolic syndrome. *PLoS One* 2017;12:1–13. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5160385>. Funding.
- [63] Hernández HG, Tse MY, Pang SC, Arboleda H, Forero DA. Optimizing methodologies for PCR-

based DNA methylation analysis. *Biotechniques* 2013;55:181–97.

<https://doi.org/10.2144/000114087>.

[64] Derks S, Lentjes MHFM, Hellebrekers DMEI, de Bruïne AP, Herman JG, van Engeland M. *Methylation-specific PCR unraveled*. vol. 26. IOS Press; 2004.

[65] Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. *Methylation-sensitive high-resolution melting*. *Nat Protoc* 2008;3:1903–8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.191>.

[66] Li Y, Tollefsbol TO. *DNA Methylation Detection: Bisulfite Genomic Sequencing Analysis*. vol. 791, 2011, p. 11–21. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_2.

[67] Parrella P, la Torre A, Copetti M, Valori VM, Barbano R, Notarangelo A, et al. High specificity of quantitative methylation-specific pcr analysis for mgmt promoter hypermethylation detection in gliomas. *J Biomed Biotechnol* 2009;2009. <https://doi.org/10.1155/2009/531692>.

- [68] Šestáková Š, Šálek C, Remešová H. DNA Methylation Validation Methods: A Coherent Review with Practical Comparison. *Biol Proced Online* 2019;21. <https://doi.org/10.1186/s12575-019-0107-z>.
- [69] Lin R, Hsieh Y, Lin P, Hsu H, Chen C, Tang Y, et al. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients 2010;120. <https://doi.org/10.1172/JCI40706DS1>.
- [70] Zhang Z, Sun D, Hutajulu SH, Nawaz I, Nguyen Van D, Huang G, et al. Development of a Non-Invasive Method, Multiplex Methylation Specific PCR (MMSP), for Early Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS One* 2012;7:1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045908>.
- [71] Nawaz I, Moumad K, Martorelli D, Ennaji MM, Zhou X, Zhang Z, et al. Detection of nasopharyngeal carcinoma in Morocco (North Africa) using a multiplex methylation-specific

- PCR biomarker assay. *Clin Epigenetics* 2015;7:89.
<https://doi.org/10.1186/s13148-015-0119-8>.
- [72] Lai HC, Lin YW, Chang CC, Wang HC, Chu TW, Yu MH, et al. Hypermethylation of two consecutive tumor suppressor genes, BLU and RASSF1A, located at 3p21.3 in cervical neoplasias. *Gynecol Oncol* 2007;104:629–35.
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.10.003>.
- [73] Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protocols* 2008;3:1903–8.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.191>.
- [74] Yang X, Dai W, Kwong DLW, Szeto CYY, Wong EHW, Ng WT, et al. Epigenetic markers for noninvasive early detection of nasopharyngeal carcinoma by methylation-sensitive high resolution melting. *Int J Cancer* 2015;136:E127–35. <https://doi.org/10.1002/ijc.29192>.
- [75] Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel)* 2016;5:3.
<https://doi.org/10.3390/biology5010003>.

- [76] Jiang W, Cai R, Chen QQ. DNA methylation biomarkers for nasopharyngeal carcinoma: Diagnostic and prognostic tools. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2016;16:8059–65. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.18.8059>.
- [77] Huang YT, Chu S, Loucks EB, Lin CL, Eaton CB, Buka SL, et al. Epigenome-wide profiling of DNA methylation in paired samples of adipose tissue and blood. *Epigenetics* 2016;11:227–36. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1146853>.
- [78] Lin YC, You L, Xu Z, He B, Mikami I, Thung E, et al. Wnt signaling activation and WIF-1 silencing in nasopharyngeal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:635–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.220>.
- [79] Lee BB, Lee EJ, Jung EH, Chun H-K, Chang DK, Song SY, et al. Aberrant Methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 Genes in Plasma as a Biomarker for Early Detection of Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 2009;15:6185–91. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0111>.

- [80] Kanehisa Laboratories. KEGG PATHWAY: Wnt signaling pathway - Homo sapiens (human) 2017. http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04310 (accessed September 27, 2017).
- [81] Lee SM, Park JY, Kim DS. Wif1 hypermethylation as unfavorable prognosis of non-small cell lung cancers with EGFR mutation. *Mol Cells* 2013;36:69–73. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0060-7>.
- [82] Gene Cards. WIF1 Gene (WNT Inhibitory Factor 1) 2010. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WIF1> (accessed September 27, 2017).
- [83] Hutajulu SH, Indrasari SR, Indrawati LP, Harijadi A, Duin S, Haryana SM, et al. Epigenetic markers for early detection of nasopharyngeal carcinoma in a high risk population. *Mol Cancer* 2011;10:48. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-48>.
- [84] Kurniawan A, Risanti ED, Suhda S, Rinonce HT, Dwianingsih EK, Fachiroh J. Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) qualitative-methylation from peripheral

- blood could not be used as biomarker for the risk of nasopharyngeal carcinoma or smoking behavior in Yogyakarta panel. *Indonesian Biomedical Journal* 2019;11:273–8. <https://doi.org/10.18585/inabj.v11i13.810>.
- [85] Bosviel R, Garcia S, Lavediaux G, Michard E, Dravers M, Kwiatkowski F, et al. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls. *Cancer Epidemiol* 2012;36:177–82. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.02.001>.
- [86] Chen Y, Zhao W, Lin L, Xiao X, Zhou X, Ming H, et al. Nasopharyngeal Epstein-Barr Virus Load: An Efficient Supplementary Method for Population-Based Nasopharyngeal Carcinoma Screening. *PLoS One* 2015;10:e0132669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132669>.
- [87] Liu S, Chen X, Chen R, Wang J, Zhu G, Jiang J, et al. Diagnostic role of Wnt pathway gene promoter methylation in non small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8:36354–67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16754>.

- [88] Kwong J, Lo KW, To KF, Teo PM, Johnson PJ, Huang DP. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:131–7.
- [89] Li P, Gan Y, Qin S, Han X, Cui C, Liu Z, et al. DNA hydroxymethylation increases the susceptibility of reactivation of methylated P16 alleles in cancer cells. *Epigenetics* 2020;15:618–31.
<https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1700004>.
- [90] Demokan S, Chang X, Chuang A, Mydlarz WK, Kaur J, Huang P, et al. KIF1A and EDNRB are differentially methylated in primary HNSCC and salivary rinses 2010;127:2351–9.
<https://doi.org/10.1002/ijc.25248.KIF1A>.
- [91] Amato E, Barbi S, Fassan M, Luchini C, Vicentini C, Brunelli M, et al. RASSF1 tumor suppressor gene in pancreatic ductal adenocarcinoma: Correlation of expression, chromosomal status and epigenetic changes. *BMC Cancer* 2016;16:1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12885-016-2048-0>.

- [92] Donniger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor 2007. <https://doi.org/10.1242/jcs.010389>.
- [93] Li P, Zhang X, Gu L, Zhou J, Deng D. P16 methylation increases the sensitivity of cancer cells to the CDK4/6 inhibitor palbociclib. *PLoS One* 2019;14:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223084>.
- [94] Li L, Choi J-Y, Lee K-M, Sung H, Park SK, Oze I, et al. DNA methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology. *Journal of Epidemiology / Japan Epidemiological Association* 2012;22:384–94. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20120003>.
- [95] Aarthy R, Mani S, Velusami S, Sundarsingh S, Rajkumar T. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Mol Diagn Ther* 2015;19:339–50. <https://doi.org/10.1007/s40291-015-0167-y>.

GLOSARIUM

epigenetik: perubahan ekspresi gen (fenotipe) tanpa perubahan basa nukleotida7, 9, 10, 20, 25, 49, 71, 75, 76

Kanker : Keganasan yang terjadi pada sel. Sel mengalami pembelahan tak terkendali 1

metilasi : penambahan gugus metil (CH₃) basa Sitosin yang bersebelahan dengan G (CpG Island)5, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 39, 41, 42, 45, 46, 48, 50, 52, 56, 60, 62, 63, 64, 66, 68, 69, 72, 74, 76

MSP : Methylation Specific PCR39, 41, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 64, 70

proliferasi : pembelahan sel 2, 23, 55, 56, 59, 73

INDEKS

B

bisulfite..... 34, 36, 40, 41, 42, 44, 47, 48, 49, 52, 53

E

epigenetik5, 11, 100

K

Kanker ii, 1, 4, 15, 75, 100

M

merokok iii, 16, 17, 18, 26, 28, 29, 31, 59, 60, 61, 63, 66, 68, 72, 76

metilasi.....6, 21, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 37, 38, 40, 43, 45, 47, 48,
50, 52, 63, 64, 66, 68, 69, 72, 75, 76, 100

MSP 39, 41, 43, 45, 46, 48, 50, 70, 100

N

Nested PCR..... 41, 42

P

PCR..... iii, 34, 36, 39, 41, 42, 43, 45, 46, 48, 51, 64, 91, 92, 93, 94, 100

proliferasi.....3, 23, 55, 59, 74, 100

R

RASSF1A..... iii, iv, 55, 70, 72, 74, 76, 88, 94, 99

W

WIF1 iii, 29, 55, 56, 57, 59, 60, 64, 66, 68, 69, 96



BIODATA PENULIS



Aditya Kurniawan, S.Si., M.Biomed terlahir di Kota Malang pada 3 November 1992 telah menempuh SD, SMP, dan SMA di Kota Malang. Selanjutnya menempuh

jenjang sarjana di Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya dan lulus tahun 2014. Pendidikan magister ditempuh di UGM, menempuh bidang Bimedik pada Program Studi Magister Ilmu Biomedis dan lulus tahun 2018. Penulis bekerja sebagai Dosen di Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember sejak tahun 2019 hingga sekarang. Penulis menekuni bidang biologi sel khususnya biologi molekuler. Artikel ilmiah yang telah dihasilkan dalam bidang biologi sel dan bioteknologi.