

PENDETEKSIAN EKSPRESI BIOMARKER ERK SECARA SEMI KUANTITATIF DAN KUANTITATIF PADA KANKER SERVIKS SEBELUM RESPON KEMORADIOTERAPI

Teja Kisananto¹, Elisabeth Novianti Simatupang², Budiningsih Siregar³, Mellova Amir², Setiawan Soetopo⁴,
Irwan Ramli³, Tjahya Kurjana⁴, Andrijono³, Bethy S Hernowo⁴,
Maringan DL Tobing⁴, dan Devita Tetriana¹

¹Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi – BATAN
Jln. Lebak Bulus Raya No.49 , Jakarta Selatan 12070

²Program Studi Farmasi – ISTN Jakarta

³Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Cipto Mangunkusumo, Jakarta

⁴Rumah Sakit Umum Pusat Hasan Sadikin, Bandung

e-mail : kisananto@batan.go.id

ABSTRAK

PENDETEKSIAN EKSPRESI BIOMARKER ERK SECARA SEMI KUANTITATIF DAN KUANTITATIF PADA KANKER SERVIKS SEBELUM RESPON KEMORADIOTERAPI. *Kanker serviks merupakan penyakit keganasan urutan pertama yang umum dijumpai pada wanita di Indonesia. Pilihan utama dalam menangani kanker serviks khususnya pada stadium lanjut yaitu kemoradioterapi. Salah satu substansi yang dapat mengukur dan menilai kanker serviks, yaitu dengan penandaan biomarker. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan ekspresi protein ERK (Extra Signal-Regulated Protein Kinase) secara semi kuantitatif dan kuantitatif sebelum pengobatan terhadap respon kemoradioterapi pada penderita kanker serviks. Metode yang digunakan adalah metode imunohistokimia dengan menggunakan biomarker pada sediaan mikroskopis hasil biopsi jaringan kanker serviks sebanyak 20 sampel. Ekspresi protein ERK yang positif ditandai dengan bulatan coklat tua atau muda pada inti sel. Respon kemoradioterapi diperoleh dari Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr.Cipto Mangunkusumo Jakarta dan Rumah Sakit Umum Pusat Hasan Sadikin Bandung. Hasil penelitian dihitung dengan teknik IRS kemudian dianalisis dengan metode ANOVA (one way analysis of variance). Hasil penelitian menunjukkan tidak ditemukan adanya hubungan nilai IRS (Imuno Reaktif Score) secara semi kuantitatif dan kuantitatif dengan respon kemoradioterapi sebelum mengalami tindakan pengobatan apapun pada penderita kanker serviks. Ekspresi ERK pada grup respon kemoradioterapi baik lebih tinggi dibandingkan grup respon kemoradioterapi buruk dan tidak ditemukan adanya korelasi terhadap respon kemoradioterapi.*

Kata Kunci : ERK, respon kemoradioterapi, ekspresi protein

ABSTRACT

DETECTION OF BIOMARKER ERK EXPRESSION SEMI QUANTITATIVELY AND QUANTITATIVELY IN CERVICAL CANCER RESPONSE BEFORE CHEMORADIOTHERAPY. *Cervical cancer is a malignant disease first order which common in women in Indonesia. The main options in dealing with cervical cancer, especially at an advanced stage that chemoradiotherapy. One substance that Dapa tmengukur and assess cervical cancer, the tagging biomarker. The purpose of this study to determine the relationship of the expression of ERK protein (Extra signal-regulated protein kinase) are semi-quantitative and quantitative before chemoradiotherapy treatment responses in patients with cervical cancer. The method used is immunohistochemical using biomarkers in microscopic preparations cervical cancer tissue biopsy results of 20 samples. ERK protein expression is positively characterized by brown dots old or young in the cell nucleus. Chemoradiotherapy response was obtained from the General Hospital Dr. Cipto Mangunkusumo National Center and General Hospital Hasan Sadikin. The research result is calculated by using the IRS then analyzed by ANOVA (one-way analysis of variance). The results showed there were no value relationships IRS (immuno Reactive Score) are semi-quantitative and quantitative response to chemoradiotherapy before experiencing any treatment measures in patients with cervical cancer. ERK expression in chemoradiotherapy response group either higher than the chemoradiotherapy group was bad and did not find any correlation with chemoradiotherapy response.*

Keywords: ERK, chemoradiotherapy response, protein expression

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan salah satu tumor ganas yang sering ditemukan di negara berkembang dengan tingkat sosial ekonomi rendah, biasanya penderita datang ke rumah sakit dalam stadium lanjut sehingga diperlukan pengobatan lebih lanjut (Kurnia dkk, 2008). Kanker serviks adalah tumor ganas yang tumbuh di dalam leher rahim (bagian terendah dari rahim yang menempel pada

puncak vagina). Berawal terjadi pada leher rahim, apabila telah memasuki tahap lanjut, kanker ini biasa menyebar ke organ-organ lain di seluruh tubuh penderita (Andriyono. 2003).

Pengobatan yang dapat dilakukan adalah mulai dari histerektomi sampai radioterapi. Radioterapi adalah jenis terapi yang menggunakan radiasi tingkat tinggi untuk menghancurkan sel kanker (Sthephanie dkk, 2006).

Radioterapi ini merupakan tindakan utama pada kanker servik, khususnya pada stadium lanjut. Respon sel kanker terhadap radiasi pengion sangat bervariasi dan dapat dijelaskan melalui mekanisme kematian sel, sedangkan resistensi sel kanker terhadap radiasi merupakan salah satu penyebab dari kegagalan penanganan kanker dengan radioterapi (Ricardo, 2008). Kemoterapi adalah salah satu upaya pengobatan kanker dengan cara memberikan suatu zat atau obat yang berfungsi dan mempunyai khasiat untuk membunuh sel-sel kanker. Pengobatan dengan kemoterapi berdasarkan pada eliminasi sel-sel kanker dengan sedikit mungkin memberikan efek yang merugikan terhadap jaringan normal. Dengan pemberian kemoradioterapi, akan semakin banyak sel-sel kanker yang mati. Sel-sel kanker yang mati akan hancur, dibawa oleh darah dan diekskresi keluar dari tubuh. Sebagian besar sel-sel sehat akan bisa pulih kembali dari pengaruh radiasi (Fitriana dan Ambarini, 2006)

ERK (*Extra signal-regulated protein kinase*) adalah salah satu keluarga protein yang terkait dengan fungsi seluler seperti pertumbuhan sel, proliferasi sel, diferensiasi, dan kelangsungan hidup. Berbagai sistem normal didalam tubuh dan patologisnya diatur oleh protein ini, tergantung jenis sel, stimulasi apoptosis, dan agen kemoterapi. Mutasi pada protein ini akan mengaktifasi sifat penekan tumornya yang terkait dengan terjadinya progresi tumor. ERK digunakan sebagai biomarker untuk mengetahui ekspresi protein ERK pada sel kanker serviks dan menghubungkannya dengan respon kemoradioterapi (Johnson dan Lavapadat, 2002).

Ekspresi dari ERK dapat menyebabkan apoptosis dan menghambat pertumbuhan sel kanker. Ekspresi protein ERK dapat diamati pada sel kanker yang didasarkan pada penilaian warna sitoplasma sel kanker. Adanya ekspresi ditandai dengan warna coklat yang berada pada inti sel. Pada warna coklat yang lebih pekat maka dapat dinilai sebagai intensitas kuat. Sedangkan pada intensitas warna coklat lebih muda maka dapat dinilai sebagai intensitas lemah (Asroel, 2002).

Adanya variasi respon sel kanker terhadap radioterapi baik dalam tipe sel kanker yang sama atau tipe sel yang berbeda terhadap radioterapi telah terbukti secara klinis. Sejumlah faktor yang mempengaruhi respons sel kanker terhadap radioterapi meliputi tipe histologik, volume tumor, pola pertumbuhan, tingkat keganasan dan derajat diferensiasi. Dasar variasi respon radiasi individu dalam grup spesifik belum sepenuhnya dimengerti namun dapat menjadi salah satu faktor penting dalam menentukan kegagalan atau keberhasilan radioterapi (Davidson dkk, 2008, Prempree dkk, 1983).

Imunohistokimia adalah metode untuk mendeteksi protein target (antigen) di dalam sel kanker atau suatu jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dan antigen pada jaringan. Interaksi antara antigen-antibodi adalah reaksi yang tidak dapat dilihat secara visual, tetapi reaksi yang dapat dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40.

Imuno Reactive Score (IRS) adalah nilai yang menunjukkan reaktivitas antara antigen dan antibodi pada jaringan kanker. Perhitungan IRS berdasarkan pada persentase sel yang positif. Nilai IRS digrupkan menjadi 4

bagian, yaitu negatif (0-1), intensitas lemah (2-3), intensitas sedang (4-8), dan intensitas tinggi (9-12). Penelitian ini bertujuan untuk menilai dan mengetahui ekspresi protein ERK dan menghubungkannya dengan prediksi respon kemoradioterapi.

METODOLOGI

Sediaan Mikroskopik

Sediaan mikroskopik berasal dari 20 sampel jaringan biopsi yang diambil 3 - 5 hari sebelum pemberian radioterapi. Jaringan biopsi diambil dari penderita karsinoma sel skuamosa servik uteri (KSS) stadium lanjut lokal yang dirujuk oleh Departemen Obstetri Ginekologi ke Departemen Radioterapi di RSCM (Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo, Jakarta) atau RSHS (Rumah Sakit Hasan Sadikin, Bandung) tahun 2010-2012 untuk memperoleh tindakan kemoradioterapi. Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (PT 02.FK/Etik/2010) dan RSHS (LB 04.01/A05/EC/061/VI/2012). Sebelum diwarnai dengan teknik imunohistokimia, jenis sel tumor diverifikasi oleh ahli patologi (BS, BSW).

Pewarnaan Imunohistokimia ERK

Blok paraffin berisi jaringan biopsi kanker servik dipotong dengan ketebalan 4 μ m menggunakan mikrotom, kemudian dilakukan deparafinisasi dengan xilol. Selanjutnya dilakukan rehidrasi dengan etanol konsentrasi menurun, diikuti pembilasan dengan *Phosphate Buffer Saline (PBS)* selama 3x5 menit. Sediaan jaringan kemudian diinkubasi pada DAKO® *Buffer Antigen Retrieval* pada *microwave* dengan suhu 94°C selama 20 menit dan dilanjutkan dengan pendinginan pada suhu ruang selama 20 menit. Langkah selanjutnya, sediaan dicuci dengan PBS selama 3x5 menit, dan diinkubasi pada Blok Peroksidase (Novocastra®) selama 20 menit. Selanjutnya sediaan dicuci kembali dengan PBS selama 3x5 menit dan diinkubasi pada Blok Protein selama 20 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan PBS selama 3x5 menit dan diinkubasi *overnight* (12-18 jam) dengan antibodi primer protein ERK pada suhu 4°C. Langkah selanjutnya adalah pembilasan dengan PBS selama 3x5 menit dan diinkubasi dengan larutan *post primary* dan *post protein* selama 45 menit dan dilanjutkan dengan inkubasi antibodi sekunder (Novolink® *Horse Radish Peroxidase (HRP)*) selama 60 menit pada suhu ruang. Setelah inkubasi, sediaan dicuci dengan PBS selama 3x5 menit dan dilakukan counterstain dengan hematoksilin (Novocastra). Selanjutnya, dilakukan dehidrasi menggunakan etanol konsentrasi meningkat. Proses selanjutnya adalah dilakukan penjernihan dengan xilol, kemudian dilakukan *mounting* (Kurnia dkk, 2013).

Respon Kemoradioterapi

Respon kemoradioterapi diamati oleh dokter ahli radioterapi secara langsung melalui pengamatan *pelvic control*. Respon sebagian (*partial response*), yaitu pengurangan ukuran jaringan kanker terlihat lebih dari 50% dan respon keseluruhan (*complete response*), yaitu jaringan kanker relatif tidak terlihat lagi (Prempree dkk,

1983). Dalam analisis statistik, respon sebagian digrupkan dengan nilai 1, sedangkan respon keseluruhan digrupkan dengan nilai 2.

Analisis Data

IRS dinilai dari ekspresi protein ERK sebelum kemoradioterapi dengan menilai persentase sel kanker serviks yang positif dan menilai intensitas warna dari sel kanker tersebut. Sel kanker serviks yang positif dapat dilihat dari inti sel yang terwarnai oleh protein ERK. Sedangkan intensitas warna dari sel kanker serviks dapat dilihat dari seberapa pekat warna coklat yang dihasilkan (intensitas kuat, menengah dan lemah).

Hubungan antara nilai IRS ERK, dan respon kemoradioterapi dianalisis dengan uji ANOVA (*One Way Analysis of Variance*). software yang digunakan adalah *Med-Calc* versi 9.6.2.0 (Benjamin dan Ananthaswamy, 2007)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan sel kanker servik menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x40. Hasil yang didapat bervariasi, dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil pengamatan ekspresi protein ERK sebelum radioterapi diolah dengan menggunakan metode ANOVA. Data pasien terhadap prediksi respon radioterapi dianalisis oleh pihak dokter RSCM dan RSHS yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai IRS ERK, indeks ERK sebelum kemoradioterapi serta prediksi respon kemoradioterapi pada pasien kanker servik

No	Nama	IRS ERK	Indeks ERK (%)	Grup Indeks ERK	Respon	Grup Respon
1	A	2	35	2	Buruk	1
2	B	3	56	2	Buruk	1
3	C	2	40	2	Baik	2
4	D	3	60	2	Baik	2
5	E	1	10	1	Baik	2
6	F	2	30	2	Baik	2
7	G	1	0	1	Buruk	1
8	H	3	75	2	Baik	2
9	I	2	40	2	Baik	2
10	J	2	5	1	Baik	2
11	K	2	45	2	Baik	2
12	L	2	65	2	Baik	2
13	M	4	90	2	Baik	2
14	N	4	58	2	Buruk	1
15	O	2	15	1	Baik	2
16	P	3	52	2	Buruk	1
17	Q	2	50	2	Baik	2
18	R	4	80	2	Baik	2
19	S	3	75	2	Baik	2
20	T	1	10	1	Baik	2

1. Grup Indeks :

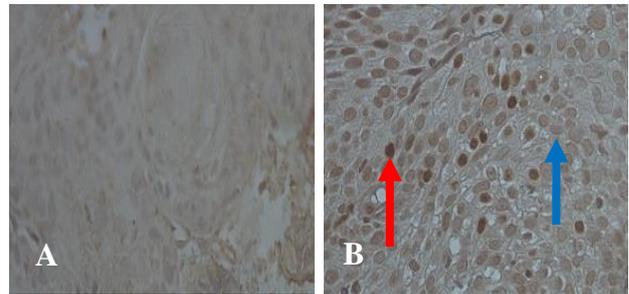
- Jika 0-10% dikatakan negatif dan dinilai dengan angka 1
- Jika >10% dikatakan positif dan dinilai dengan angka 2.

2. Grup Respon :

- Respon buruk dinilai dengan angka 1

b. Respon baik dinilai dengan angka 2

Gambar 1 (A) adalah gambar Sel kanker serviks yang belum dilakukan pewarnaan protein ERK dan Gambar 1 (B) adalah gambar Sel kanker serviks yang sudah dilakukan pewarnaan dengan protein ERK.

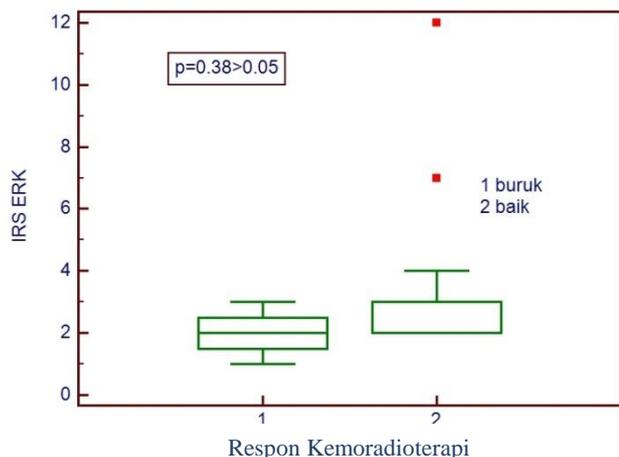


Gambar 1. Sel kanker servik sebelum dan setelah pewarnaan ERK

Dalam prosedur pewarnaan ERK, digunakan dua jenis antibodi yang saling mendukung, yaitu antibodi primer protein ERK serta antibodi sekunder Novolink Polymer HRP. Antibodi primer bekerja dengan mengikat antigen jaringan dan antibodi sekunder bekerja berikatan dengan antibodi primer sehingga memperkuat antibodi primer untuk berikatan dengan antigen jaringan. Antibodi sekunder ini akan berikatan dengan substrat dan menghasilkan warna pada sel. Sel kanker serviks dengan indeks ERK positif ditandai dengan bulatan hitam kecoklatan dan bulatan coklat tua di inti sel (Tanda Panah Merah). Sel kanker serviks dengan indeks ERK negatif ditandai dengan bulatan coklat muda keunguan di inti sel (Tanda Panah Biru). Protein ERK mempunyai peranan penting dalam proliferasi sel yaitu mengontrol siklus sel. Mutasi gen ini akan mengaktifkan sifat penekan tumornya dan terkait dengan terjadinya progresi tumor (There, 2000)

Hubungan Ekspresi Protein ERK Terhadap Respon Kemoradioterapi

Dari Tabel 1 diperoleh nilai IRS ERK sebelum pengobatan kemoradioterapi dengan menggunakan teknik IRS (*Imuno Reactive Score*) dan data respon kemoradioterapi pasien yang dianalisis oleh dokter ahli Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta dan Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung.



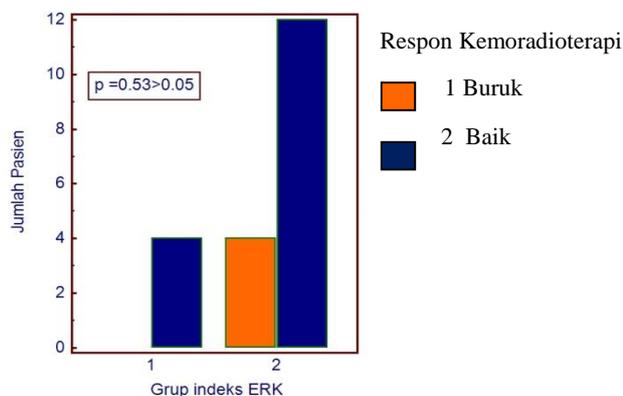
Gambar 2. Hubungan IRS ERK secara kuantitatif dengan respon kemoradioterapi pada kanker serviks

Dengan menghubungkan nilai IRS ERK dengan grup respon pasien terhadap kemoradioterapi yang diolah dengan teknik IRS dihubungkan dengan metode ANOVA maka dapat dilihat pada gambar dibawah ini.

Pada Tabel 1 diperoleh data IRS ERK dan prediksi respon kemoradioterapi yaitu jumlah sampel pada grup respon kemoradioterapi buruk sebanyak 5 sampel dan pada grup respon kemoradioterapi baik sebanyak 15 sampel. Berdasarkan perhitungan dengan statistik ANOVA hubungan antara ERK dengan grup respon kemoradioterapi diperoleh nilai $p = 0,38 > 0,05$ memperlihatkan tidak adanya hubungan sama sekali. Hal ini ditunjukkan dari analisis gambar grafik adanya perbedaan pada grup respon baik lebih tinggi dibandingkan dengan grup respon kemoradioterapi buruk.

Hubungan Ekspresi Protein ERK Secara Semi Kuantitatif Terhadap Respon Kemoradioterapi

Dari data Tabel 1 diperoleh data indeks ERK sebelum pengobatan kemoradioterapi dan data prediksi respon kemoradioterapi yang dianalisis oleh dokter ahli Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr. Cipto Mangunkusomo Jakarta dan Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung. Dengan menghubungkan Indeks ERK dan grup respon kemoradioterapi diperoleh gambar di bawah ini.



Gambar 2. Hubungan indeks ekspresi ERK secara semi kuantitatif dengan respon kemoradioterapi pada kanker serviks

Dari analisis gambar di atas dengan menggunakan metode statistik ANOVA diperoleh nilai $0,53 < 0,05$, sehingga dapat dikatakan tidak adanya hubungan antara indeks ERK dengan prediksi respon kemoradioterapi. Hal ini ditunjukkan dengan tidak ditemukannya perbedaan grup respon kemoradioterapi antara ekspresi ERK negatif dan ekspresi ERK positif. Dimana jumlah pasien grup respon kemoradioterapi baik lebih tinggi dibandingkan grup respon kemoradioterapi buruk baik pada ekspresi ERK negatif ataupun ekspresi ERK positif.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan tidak ditemukan adanya hubungan nilai IRS secara semi kuantitatif dan kuantitatif dengan respon kemoradioterapi sebelum mengalami tindakan pengobatan apapun pada penderita kanker serviks. Ekspresi ERK pada grup respon kemoradioterapi baik lebih tinggi dibandingkan grup respon kemoradioterapi buruk dan tidak ditemukan adanya korelasi terhadap respon kemoradioterapi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Dana penelitian DIPA PTKMR-BATAN Tahun Anggaran 2010. Penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada Kepala Bidang Teknik Nuklir Kedokteran dan Biologi Radiasi, Kepala Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi–Badan Tenaga Nuklir Nasional, Kepala Departemen Radioterapi, Ketua Departemen Patologi Anatomi, Kepala Departemen Obsterik Ginekologi, Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo–Jakarta dan Rumah Sakit Hasan Sadikin–Bandung.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kurnia, I., Budiningsih, S., Andrijono, Ramli, I., and Badri, C. 2008. AgNOR Sebagai Marker Poliferasi Dalam Penilaian Respon Awal Radiasi Pada Kemoradioterapi Kanker Serviks. Prosiding Seminar Nasional Keselamatan, Kesehatan, dan Lingkungan IV, Depok.
2. Andriyono. 2003. Kanker Serviks, Sinopsis Kanker Ginekologi. Rekam medik pasien RSUP Dr. Kariadi, Semarang : 14-28.
3. Sthephanie, S.L., Kelvin, Y. K. C., Annie, N. Y. C., Xiao, Y. L., Tsin, W. L., and Hextan, Y. S. N. 2006. Expression of Np73 and Tap73A Independently Associated with Radiosensitivities and Prognoses in Cervical Squamous Cell Carcinoma. Clin Cancer Res12(13) : 3922-3927.
4. Silva Ricardo. 2008. WENDEL HSANS GUIDO, ERK, EIF4E And Targeting Translation For Therapy. Cancer Biology & Genetics Program; Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. New York USA.
5. Fitriana, N. A., and Ambarini, T. K. 2012. Kualitas Hidup Pada Penderita Kanker Serviks yang Menjalani Pengobatan Radioterapi. Jurnal Psikologis Klinis dan Kesehatan Mental, Vol.1 No.2 : 124.
6. Johnson, G. L., and Lavapadat, R. 2002. Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinase. 298.

7. Asroel, H. A. 2002. Penatalaksanaan Radioterapi pada Karsinoma Nasoparing.
8. Davidson, S. E., West, C. M. L., and Hunter, R. D. Lack of an Association between In Vitro Clonogenic Growth of Human Cervical Carcinoma and Tumor Stage, Differentiation, Patient Age, Host Cell Infiltration or Patient Survival. *Int J Cancer* (50) : 10-14.
9. Prempre, T., Patanaphan, V., Sewchand, W., and Scott, R. M. 1983. The Influence of Patients Age and Tumor Grade on The Prognosis of Carcinoma of The Cervix. *Cancer* (51) : 1764-1771.
10. Kurnia, I., Budiningsih, S., Setiawan, S., Irwan, R., Tjahya, K., Andriono, Maringan, D. L. T., Bethy, S., and Devita, T. 2013. Korelasi Antara MIB-1, AgNOR dan Apoptosis Caspase-3 dengan Respons Kemoradioterapi pada Kanker Servik. *Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia*. Vol.14, No 1 : 51-64.
11. Benjamin, C. L., and Ananthaswamy, H. N. 2007. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *J Toxi col and Apl Pharmacol*. 244.
12. There, D. 2000. AgNOR Staining and Quantification. *Micron* (31) : 127-131.