

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

**Teja Kisananto¹, Rina Tri Wardani², 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 MNK SECARA SEMI KUANTITATIF DAN KUANTITATIF PADA KANKER SERVIKS SEBELUM RESPON KEMORADIOTERAPI. Kanker serviks merupakan penyakit kanker yang umum dijumpai pada wanita yang disebabkan oleh virus HPV (Human Papiloma Virus). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan ekspresi protein MNK (Mitogen Activated Protein Kinase) pada penderita kanker serviks sebelum tindakan pengobatan terhadap respon kemoradioterapi. Sampel uji yang digunakan adalah sediaan mikroskopis hasil biopsi jaringan kanker dari penderita kanker serviks stadium lanjut (IIB-IIIIB) sebanyak 20 sampel. Metode yang digunakan adalah metode imunohistokimia dengan menggunakan biomarker MNK pada biopsi jaringan kanker serviks. Ekspresi protein MNK yang positif ditandai dengan warna coklat tua yang terdapat pada inti sel. Respon kemoradioterapi diperoleh dari RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta dan RS Hasan Sadikin Bandung. Hasil penelitian menunjukkan nilai IRS (Imuno Reaktif Score) protein MNK pada grup respon kemoradioterapi baik lebih tinggi dibandingkan grup respon kemoradioterapi buruk dan tidak ditemukan adanya hubungan IRS protein MNK dengan respon kemoradioterapi. Sedangkan hubungan ekspresi MNK terhadap respon kemoradioterapi menunjukkan adanya korelasi perbedaan grup respon kemoradioterapi antara ekspresi protein MNK negatif dan ekspresi protein MNK positif.

Kata Kunci : MNK, respon radioterapi, ekspresi protein

ABSTRACT

DETECTION OF BIOMARKER MNK EXPRESSION SEMI QUANTITATIVELY AND QUANTITATIVELY IN CERVICAL CANCER RESPONSE BEFORE CHEMORADIOTHERAPY. Cervical cancer is a cancer that common in women caused by HPV (Human Papiloma Virus). The purpose of this study is to determine the relationship MNK protein expression (Mitogen-Activated Protein Kinase) in patients with cervical cancer before chemoradiotherapy treatment. Sample used was the preparation of microscopic cancer tissue biopsies from patients with advanced cervical cancer (IIB-IIIIB) is 20 samples. The method used is immunohistochemistry using MNK biomarkers in cervical cancer tissue biopsies. MNK positive protein expression marked with dark brown color that is contained in the cell nucleus. Chemoradiotherapy response obtained from RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo and Hasan Sadikin Hospital in Bandung. The results show the value of the IRS (Immuno Reactive Score) MNK protein in response to chemoradiotherapy group either higher than the response to chemoradiotherapy group was bad and did not find any relationship IRS MNK protein with chemoradiotherapy response. While the relationship MNK expression responses show a correlation chemoradiotherapy group differences in chemoradiotherapy response between MNK expression negative and MNK expression positive.

Keywords: MNK, chemoradiotherapy response, protein expression

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan penyakit keganasan yang umum dijumpai pada wanita, dan merupakan penyakit keganasan urutan pertama di Indonesia (Didit, dan Rukmini, 2002). Pengobatan yang dapat dilakukan adalah mulai dari histerektomi sampai radioterapi. Radioterapi adalah jenis terapi yang menggunakan radiasi tingkat tinggi untuk menghancurkan sel kanker (Khresnamurti dkk, 2010). Radioterapi ini merupakan tindakan utama pada kanker serviks, 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 (Stephanie dkk, 2006)

MNK adalah salah satu keluarga protein yang terlibat dalam fungsi seluler seperti pertumbuhan sel, proliferasi, diferensiasi, motilitas, dan kelangsungan hidup sel. Berbagai sistem normal didalam tubuh dan patologisnya diatur oleh protein ini, tergantung pada jenis sel, stimulasi apoptosis, dan agen kemoterapi (Ricardo dkk, 2008).

Protein MNK mempunyai peranan penting dalam proliferasi sel yaitu mengontrol siklus sel. MNK terdiri dari Mnk 1 dan Mnk 2, yang pada awalnya di temukan pada dua sekat bebas, sebagai substrat dari Erk 1 dan Erk 2. Protein MNK berperan pada perbaikan kerusakan DNA dan sintesis DNA, diferensiasi sel, serta program kematian sel (Nissim, 2000).

Adanya variasi respon sel kanker terhadap radioterapi baik dalam tipe sel kanker yang sama maupun 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 kelompok spesifik belum sepenuhnya dimengerti namun dapat dijadikan sebagai salah satu faktor penting dalam menentukan kegagalan atau keberhasilan radioterapi (Davidson, dkk, 1992; Prempre dkk, 1983). *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 dikelompokkan 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 MNK dan menghubungkannya dengan prediksi respon kemoradioterapi.

METODOLOGI

Sediaan Mikroskopik

Sediaan mikroskopik berasal dari 20 sampel jaringan biopsi yang diambil 3 - 5 hari sebelum pemberian kemoradioterapi. Jaringan biopsi diambil dari penderita karsinoma sel skuamosa servik uteri (KSS) stadium lanjut lokal yang dirujuk oleh Departemen Obstetri Ginekologi ke Departemen Radioterapi di RSUPN-CM (Rumah Sakit Umum Pusat Nasional - 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 immunohistokimia, jenis sel tumor diverifikasi oleh ahli patologi (BS, BSW).

Pewarnaan Immunohistokimia MNK

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 MNK 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 (Wong dkk, 1999). Dalam analisis statistik, respon sebagian dikelompokkan dengan nilai 1, sedangkan respon keseluruhan dikelompokkan dengan nilai 2.

Analisis Data

Nilai ekspresi protein MNK diperoleh dengan metode IRS (*Imuno Reactive Score*). Sedangkan hubungan antara IRS MNK dan prediksi respon kemoradioterapi dianalisis dengan metode ANOVA (*One Way Analysis of Variance*) menggunakan *software Med-Calc* versi 9.6.2.0 (Harris dan Taylor, 2008)

HASIL DAN PEMBAHASAN

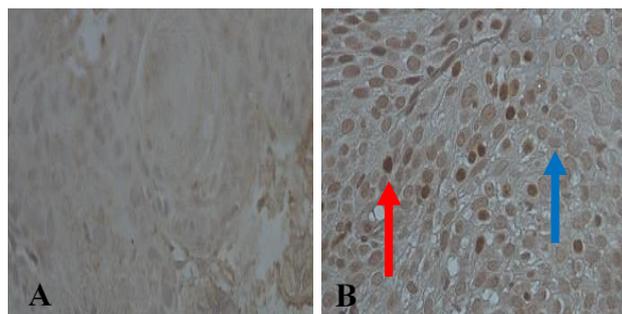
Pengamatan sel kanker servik menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x40. Hasil yang didapat bervariasi, dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil pengamatan ekspresi protein MNK sebelum radioterapi diolah dengan menggunakan metode ANOVA. Data pasien terhadap prediksi respon radioterapi dianalisis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

1. Grup Indeks:
 - a. Jika 0-10% dikatakan negatif dan dinilai dengan angka 1
 - b. Jika >10% dikatakan positif dan dinilai dengan angka 2.
2. Grup Respon:
 - a. 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 MNK dan Gambar 1 (B) adalah gambar sel kanker serviks yang sudah dilakukan pewarnaan dengan protein MNK.

Dalam prosedur pewarnaan MNK, digunakan dua jenis antibodi yang saling mendukung, yaitu antibodi primer protein MNK 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 MNK positif ditandai dengan bulatan hitam kecoklatan dan bulatan coklat tua di inti sel (Tanda Panah Merah). Sel kanker serviks dengan indeks MNK negatif ditandai dengan bulatan coklat muda keunguan di inti sel (Tanda Panah Biru). Protein MNK 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)



Gambar 1. Sel kanker servik sebelum dan setelah pewarnaan MNK

Hubungan Ekspresi Protein MNK Terhadap Respon Kemoradioterapi

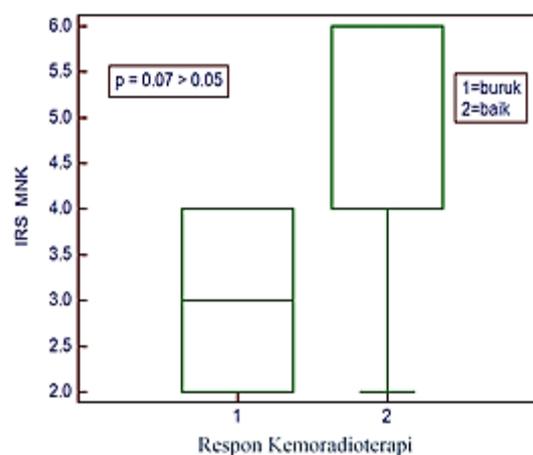
Dari Tabel 1 diperoleh nilai IRS MNK sebelum pengobatan kemoradioterapi dengan menggunakan teknik IRS (*Imuno Reaktif Score*) dan data respon kemoradioterapi pasien yang dianalisis oleh dokter ahli Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo Jakarta dan Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung. Dengan menghubungkan nilai IRS MNK dengan kelompok prediksi respon pasien terhadap kemoradioterapi menggunakan teknik ANOVA (Gambar 2).

Tabel 1. Nilai IRS MNK, Indeks MNK Sebelum Radioterapi Serta Prediksi Respon Kemo-radioterapi pada Pasien Kanker Servik

No	Nama	IRS MNK	Indeks MNK (%)	Grup Indeks MNK	Respon	Grup Respon
1	A	4	40	2	Baik	2
2	B	4	30	2	Baik	2
3	C	6	60	2	Baik	2
4	D	6	70	2	Baik	2
5	E	2	35	2	Baik	2
6	F	4	30	2	Baik	2
7	G	4	45	2	Baik	2
8	H	6	60	2	Baik	2
9	I	4	40	2	Baik	2
10	J	6	60	2	Baik	2
11	K	2	12	1	Buruk	1
12	L	4	30	2	Baik	2
13	M	4	14	1	Buruk	1
14	N	4	20	2	Baik	2
15	O	6	40	2	Baik	2
16	P	4	25	2	Baik	2
17	Q	4	13	1	Buruk	1
18	R	2	90	2	Baik	2

19	S	2	12	1	Buruk	1
20	T	4	25	2	Baik	2

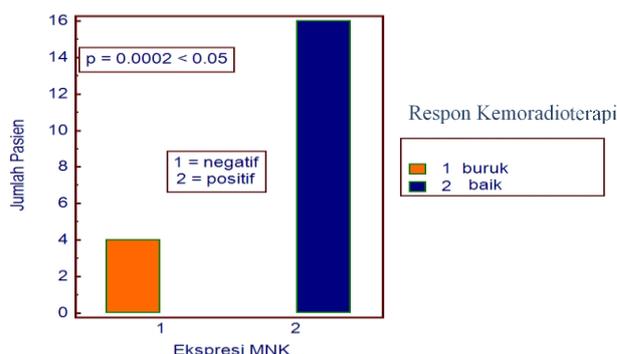
Pada Tabel 1 diperoleh data IRS MNK dan prediksi respon kemoradioterapi dimana diketahui jumlah sampel pada grup respon kemoradioterapi buruk sebanyak 4 sampel dan pada grup respon kemoradioterapi baik sebanyak 16 sampel. Berdasarkan perhitungan dengan statistik ANOVA hubungan antara MNK dengan kelompok respon kemoradioterapi diperoleh nilai $p = 0,07 > 0,05$ dan memperlihatkan tidak adanya hubungan. Hal ini ditunjukkan dari analisis gambar grafik adanya perbedaan pada grup respon kemoradioterapi baik lebih tinggi dibandingkan dengan grup respon kemoradioterapi buruk (Gambar 2).



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

Hubungan Ekspresi Protein MNK Secara Semi Kuantitatif Terhadap Respon Kemoradioterapi

Dari data Tabel 1 diperoleh data indeks MNK sebelum pengobatan kemoradioterapi dan data prediksi respon kemoradioterapi yang dianalisis oleh dokter ahli Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta dan Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung.



Gambar 3. Hubungan Ekspresi MNK yang Diamati Secara Semi Kuantitatif dengan Respon Kemo-radioterapi pada Kanker Serviks

Dari Gambar 3, diperoleh nilai $p = 0,0002 < 0,05$ yang menunjukkan adanya hubungan antara indeks MNK dengan respon kemoradioterapi. Hal ini ditunjukkan

dengan ditemukannya perbedaan grup respon kemoradioterapi antara ekspresi *MNK* negatif dan ekspresi *MNK* positif. Dimana jumlah pasien grup respon kemoradioterapi baik lebih tinggi dibandingkan grup respon kemoradioterapi buruk, baik pada ekspresi *MNK* negatif ataupun ekspresi *MNK* positif.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Nilai IRS protein *MNK* pada grup respon kemoradioterapi baik lebih tinggi dibandingkan grup respon kemoradioterapi buruk dan tidak ditemukan adanya hubungan IRS protein *MNK* dengan respon kemoradioterapi. Serta Ditemukannya hubungan perbedaan grup respon kemoradioterapi antara ekspresi protein *MNK* negatif dan ekspresi protein *MNK* positif.

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. Didit, T. and Rukmini, M. 2002. Cancer in Indonesia, Present and Future. *Jpn J Clin Oncol* 32 (Supplement 1) : S17-S21.
2. Khresnamurti, I., et al. 2010. Radioterapi Pada Kanker Servik, Refrat Radioterapi, Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, RS Mohammad Hoesin Palembang.
3. Stephanie, 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 Res*12(13) : 3922-3927.
4. Ricardo, S. 2008. WENDEL HSANS GUIDO, ERK, EIF4E and Targeting Translation For Therapy. *Cancer Biology & Genetics Program; Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. New York USA.*
5. Nissim, H. 2000. Mnk earmarks EIF4E for cancer therapy. Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Illinois, Chicago, IL 60607.
6. Davidson, S. E., West, C. M. L., and Hunter, R. D. 1992. 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.
7. Prempre, T., Patanaphan, V., Sewchand, W., and Scott, R. M. 1983. The Influence of Patients Age and Tumour Grade on The Prognosis of Carcinoma of The Cervix. *Cancer* (51) : 1764-1771.
8. Kurnia, I., Budiningsih, S., Setiawan, S., Irwan, R., Tjahya, K., Andriano, 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 (1) : 51-54*
9. Wong, L. C., Ngan, A. N. Y., Cheung, D. K. L., Ng, T. Y., and Choy, D. T. K. 1999. Chemoradiation and Adjuvant Chemotherapy in Cervical Cancer. *J Clin Oncol* (17) : 2055-2060.
10. Harris, M and Taylor, G. 2008. *Medical Statistic made Easy. 2nd Edition Scion Publishing Ltd.*
11. There, D. 2000. AgNOR staining and quantification. *Micron* (31) : 127-131.