

LAPORAN AKHIR RUUI TAHUN 2009
PROGRAM UTAMA BIDANG KESEHATAN

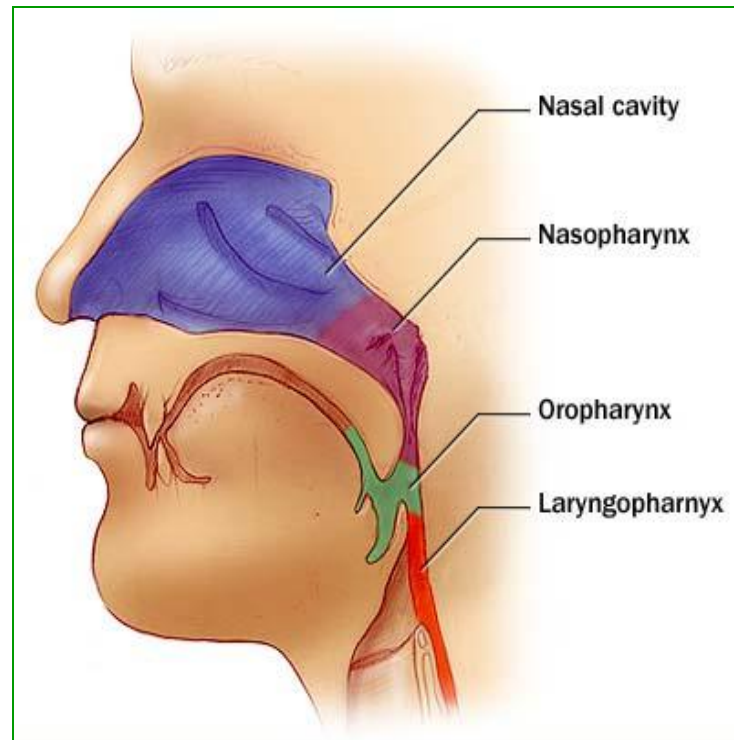
**Pengukuran Amplifikasi DNA Epstein-Barr Virus
pada Serum Darah Perifer Penderita Karsinoma
Nasofaring Menggunakan Fotoelektrokimia**

**Kusmardi
Aryo Tedjo
Yurnadi**

Fakultas Kedokteran UI

Karsinoma Nasofaring (KNF)

- KNF merupakan **karsinoma sel skuamosa** di kepala dan leher yang terjadi pada sel epitel nasofaring



- ❑ Penyakit genetik multifaktor, bersifat endemik, mempunyai perbedaan signifikan dalam distribusi geografik.
- ❑ Relatif jarang (80.000 kasus/tahun, 0,7% dari semua kanker)
- ❑ Insiden KNF ditandai variasi geografis
 - Tertinggi, Cina Selatan (30-50/100.000) ,
 - ASEAN (3/100.000),
 - India, Afrika , Eskimo, dan Alaska(10/100.000).

- Di Indonesia, cukup tinggi (4,2/100.000), urutan ke 4, sesudah ca. hati, serviks, dan mammae.
- Pria : wanita (2,4:1), progresif seiring usia.
- Tingginya insiden KNF di negara Asia tertentu diduga kuat faktor genetik ikut berperan dalam patogenesis penyakit.

Klasifikasi Histopatologis KNF (WHO) 3 Tipe :

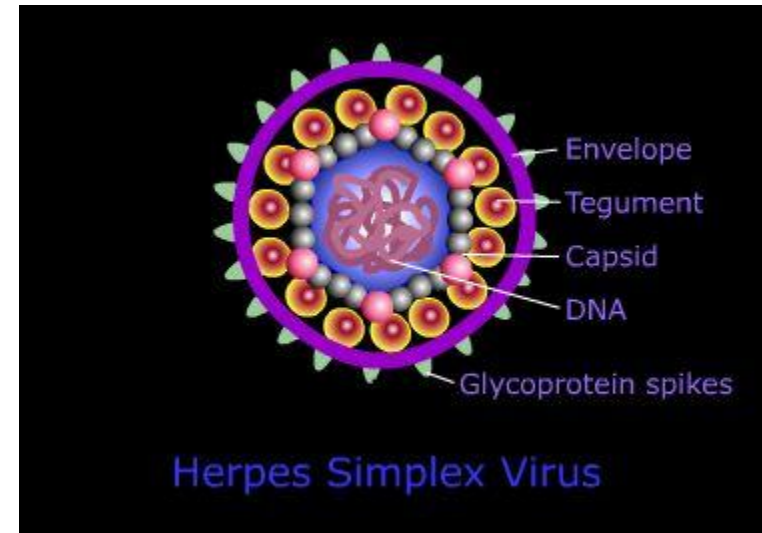
- ❑ Tipe 1 : Karsinoma sel skuamosa
(populasi dewasa tua)
- ❑ Tipe 2 : Karsinoma non-keratinisasi
- ❑ Tipe 3 : Karsinoma tanpa deferensiasi
 - ⇒ Sebagian besar KNF (anak² dan remaja) adalah tipe 3 dan sebagian kecil tipe 2.
 - ⇒ Kedua tipe ini berhubungan erat dengan peningkatan titer EBV.
 - ⇒ Di **Indonesia** banyak ditemukan bentuk **tipe 3**

Deteksi DNA EBV Sebagai Penanda Tumor

- ❑ Penyikatan langsung (*Brushing*) nasofaring (non-invasif).
- ❑ DNA EBV bebas (*cell free*) dapat ditemukan dalam serum penderita KNF
 - ⇒ Menunjukkan bhw virus dilepaskan ke sirkulasi setelah replikasi di jaringan KNF.
 - ⇒ EBV pada tumor identik dengan EBV dalam sirkulasi.

Virus Epstein-Barr (EBV)

- 🍁 Famili Herpesviridae
- 🍁 Virus dsDNA
- 🍁 Kapsid icosahedral
- 🍁 171.823 pb (85 gen)
- 🍁 Berasosiasi dengan KNF



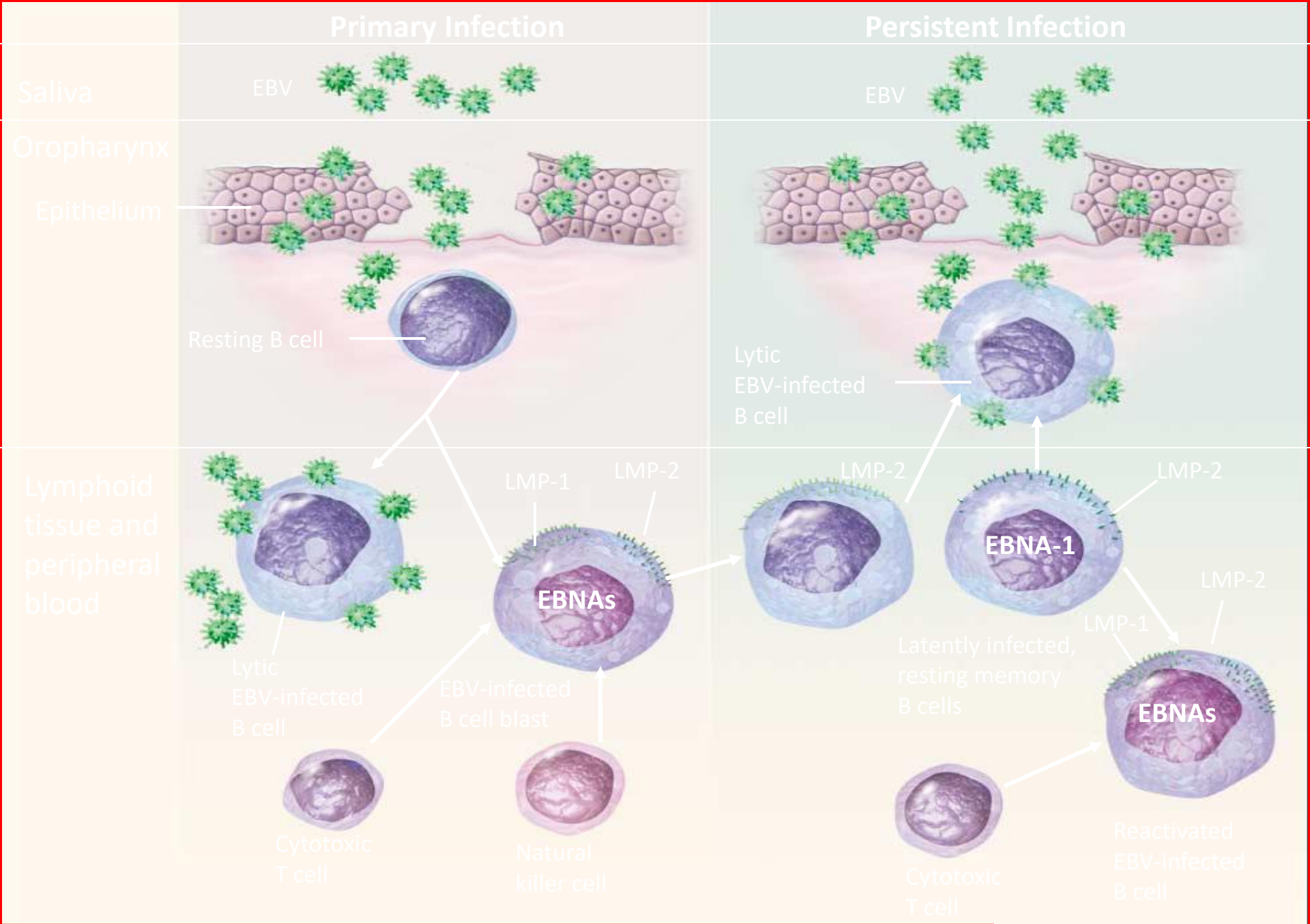
Infeksi Akibat Reaktivasi EBV

1. Infeksi Litik :

Infeksi EBV dimanifestasikan dengan adanya replikasi DNA, transkripsi, translasi genom virus, dilanjutkan pembentukan (*assembly*) virion baru dalam jumlah besar menyebabkan **sel pejamu menjadi lisis** dan **virion dilepaskan ke sirkulasi**.

2. Infeksi Laten (Non-litik) :

Infeksi EBV berlanjut dengan inkorporasi DNA virus ke genom pejamu dan dapat **menginduksi sel normal menjadi maligna**.



Model infeksi EBV pada manusia (Cohen, 2000)

Tabel : Expression Of EBV Latent Genes In Disease* (Cohen, 2000)

PATTERN OF LATENCY	EBNA-1	EBNA-2	EBNA-3	LMP-1	LMP-2	EBER	DISEASE
Type 1	+	-	-	-	-	+	Burkitt's lymphoma
Type 2	+	-	-	+	+	+	<u>Nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin's disease, peripheral T-cell lymphoma</u>
Type 3	+	+	+	+	+	+	Lymphoproliferative disease, X-linked lymphoproliferative disease, infectious mononucleosis
Other	±	-	-	-	+	+	Healthy carrier

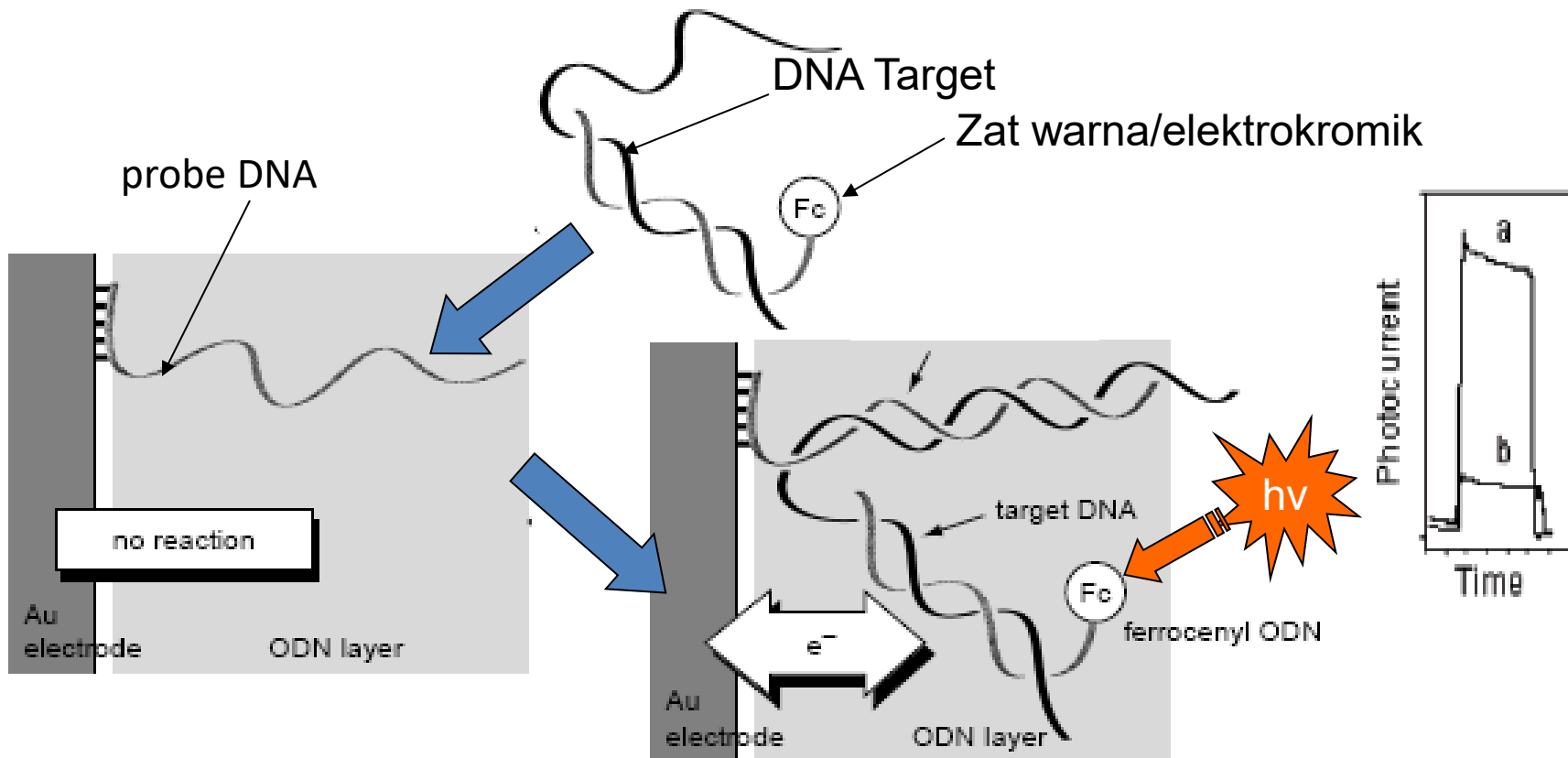
*EBV denotes Epstein-Barr virus, EBNA Epstein-Barr virus nuclear antigen, LMP latent membrane protein, and EBER Epstein-Barr virus-encoded RNA. A plus sign indicates that the gene is expressed in the disease, a minus sign that it is not expressed, and the two together that the gene may or may not be expressed.

Analisis Kuantitatif DNA Dengan Fotoelektrokimia

-Sistem elektrokimia :

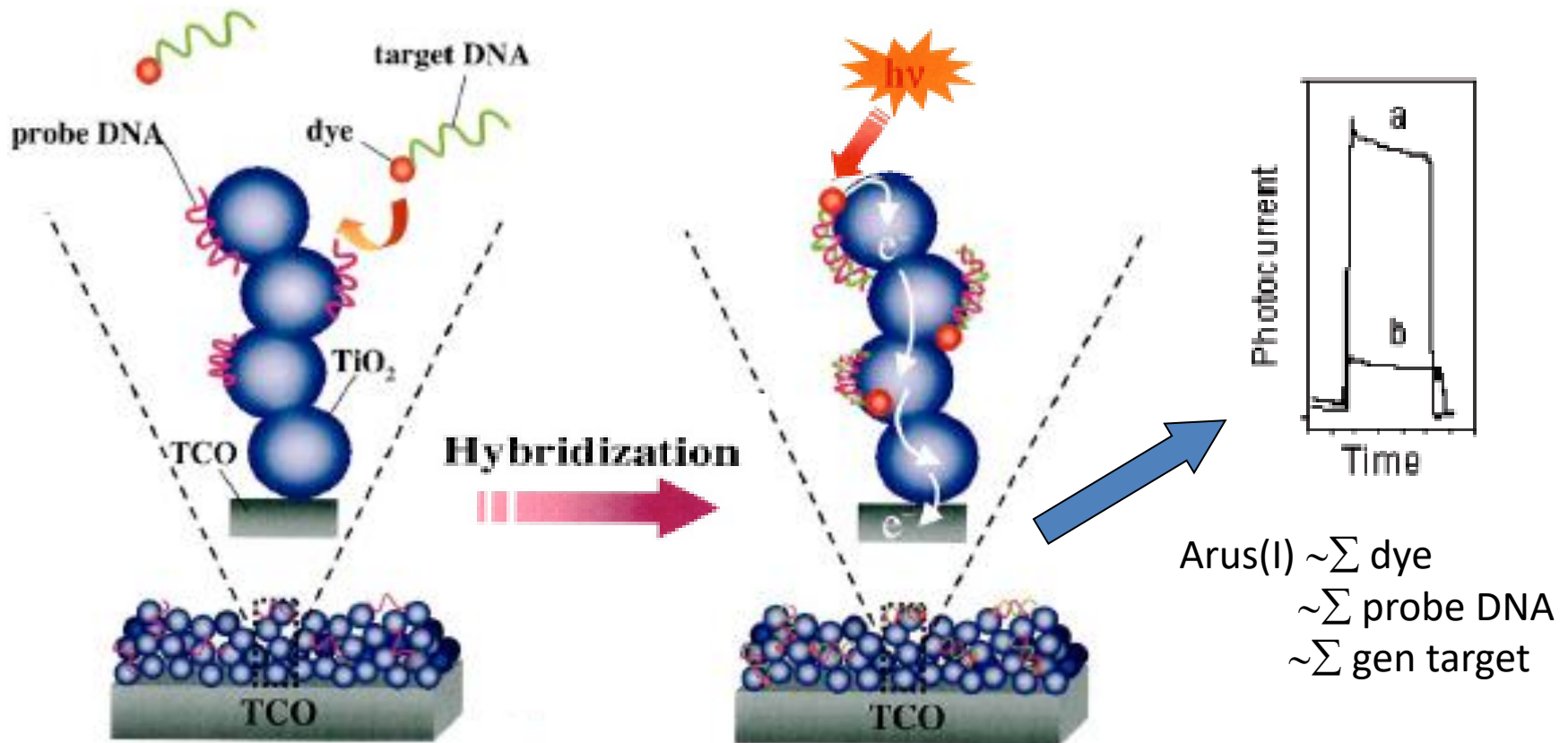
- 2 buah elektroda (salah satu di lapiasi probe DNA)
- larutan elektrolit (menghantarkan elektron)

- Prinsip kerja : metode Ihara et.al, (1997)¹⁰.




Metode Tokudome et al. (2005)¹¹.

1. Elektroda : *transparent conducting oxide* /TCO (TiO₂, SnO₂)
2. Elektrolit : iodine (I⁻) & Iodide (I₂)

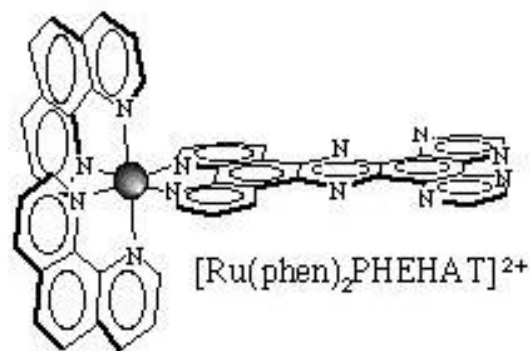
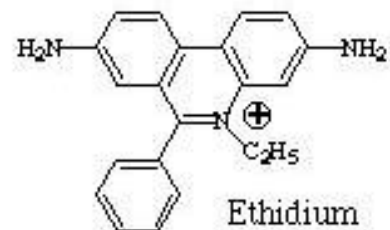
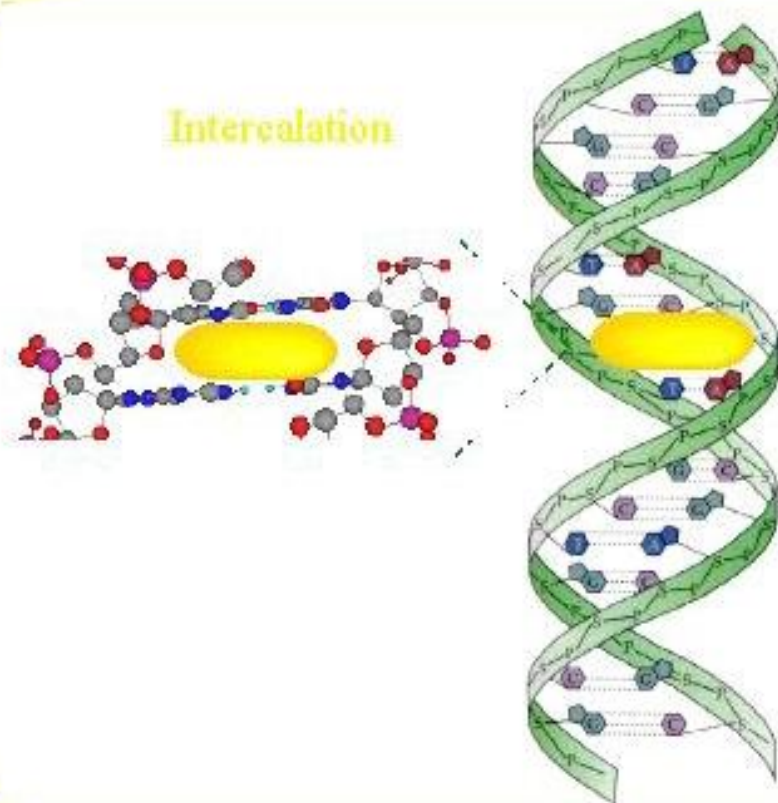


Mengapa metode fotoelektrokimia digunakan untuk mengukur amplifikasi gen?

- Sensitif, dapat mengukur jumlah asam nukleat sampai ukuran nanoMolar (nM)¹²⁻¹⁴.
 Deteksi dini & evaluasi/prognosis penyakit
- Dengan teknik **interkalasi DNA**, bahan zat warna berikatan langsung dengan DNA yang terhibridisasi, sehingga **tidak memerlukan proses labelisasi DNA oleh zat warna**¹².
- Tidak memerlukan tahap isolasi DNA sehingga dapat dilakukan ***insitu*** pada sel atau jaringan.

Intercalation – Insertion of a planar aromatic ring system between base pairs of the DNA double helix

Intercalation



TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan suatu metode pengukuran amplifikasi DNA virus EBV pada serum penderita kanker nasofarink dengan **teknik interkalasi DNA** menggunakan metode **fotoelektrokimia**.

Tujuan khusus penelitian ini adalah mendapatkan sistem fotoelektrokimia yang memiliki reponsivitas dan sensitivitas cukup baik terhadap perubahan konsentrasi DNA di dalam sistem, terutama yang terkait dengan penggunaan zat warna sebagai interkalator DNA.

Manfaat yang ingin diperoleh dari penelitian ini adalah tersedianya suatu metode yang **sederhana, relatif murah, dan mudah digunakan, namun cukup sensitif**.

METODOLOGI RISET

Subjek Penelitian

- Penderita KNF yang menjalani terapi di Dept. Radioterapi FKUI /RSCM
- *Informed consent*
- Diagnosis KNF berdasarkan kriteria WHO (tipe I, tipe II, dan tipe III).

Isolasi DNA EBV

- Darah tepi 3 ml disentrifus (diperoleh serum).
- Serum (100 μ l)+ 300 μ l TE, 50 μ l 10% SDS, dan 1 μ l proteinase-K.
- 200 μ l phenol dan 200 μ l Chloroform Iso-Amyl-Alcohol (C-IAA).
- 10.000 rpm , 10 menit -> (*aquous layer*).
- 100 μ l phenol dan 300 μ l C-IAA
- Diulangi 2-3 kali.
- DNA disimpan pada suhu -20oC, siap dianalisis .

Isolasi bahan elektrokromik

- Satu gr bahan (anggur, stroberi dan kol ungu) dimaserasi dengan 100 ml akuades dan 100 ml etanol, 30 menit.
- Ekstrak dikeringkan.

Pembuatan Elektroda

- Elektroda TiO₂ :
 - * 0,2 g TiO₂,
 - * 0,4 ml lar. nitrat 0,1M,
 - * 0,08 g PEG,
 - * Triton X.
- Campuran dilapiskan pd gelas konduktif SnO₂, dipanaskan 450 °C, 2 jam.

Uji bahan elektrokromik sebagai interkalator DNA

- Beberapa variasi konsentrasi DNA hasil isolasi.
- Kemampuan menginterkalasi DNA dilakukan dengan dengan spektrofotometer UV-VIS.
- Data yang diamati adalah perubahan intensitas puncak serapan dan pergeseran puncak serapan dari spektrum absorpsi larutan DNA setelah penambahan ekstrak bahan organik.

Uji sistem fotoelektrokimia yang akan digunakan

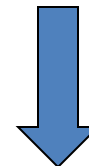
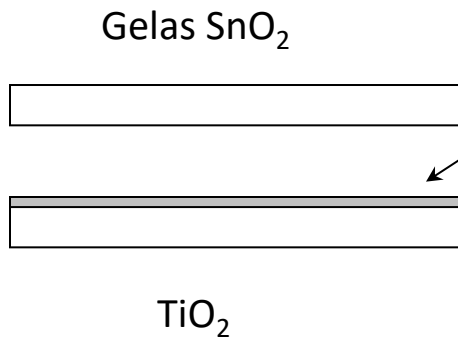
Sistem fotoelektrokimia yang dipakai pada penelitian ini menggunakan elektroda 'sandwich' yang terdiri dari elektroda kerja TiO_2 dan elektroda penghitung (*counter electrode*) SnO_2 .

Elektrolit yang digunakan adalah larutan Iodida-Iodin ($\text{I}_2\text{-KI}$).

Uji yang dilakukan adalah uji sensitivitas sistem fotoelektrokimia terhadap perubahan konsentrasi DNA. Data yang dianalisis adalah data perubahan arus yang dihasilkan oleh sistem terhadap perubahan konsentrasi DNA.

Ditambahkan :

- DNA probe
- Larutan DNA pada berbagai variasi konsentrasi
- Interkalator berupa zat warna
- Larutan elektrolit



PENGAMATAN PERUBAHAN ARUS

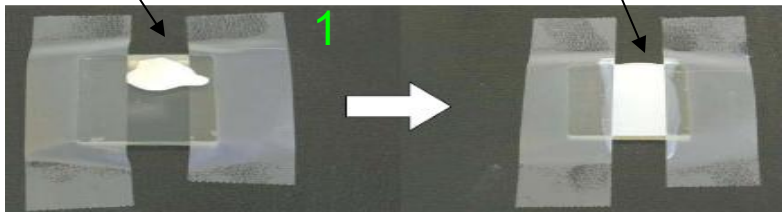
Deteksi menggunakan probe DNA

- probe DNA diimobilisasi pada lapisan elektroda TiO₂ (25 μ l probe DNA 200 μ M , 50 mM bufer HEPES pH 7, pada 60 °C, 6 jam).
- Hibridisasi: 25 μ l DNA EBV pada beberapa konsentrasi.
- Bahan elektrokromik (ekstrak antosianin), dan elektrolit ditambahkan ke dalam sistem, kemudian diamati perubahan arus yang terjadi.
- Data yang dianalisis adalah perubahan arus yang dihasilkan oleh sistem terhadap perubahan konsentrasi DNA target.

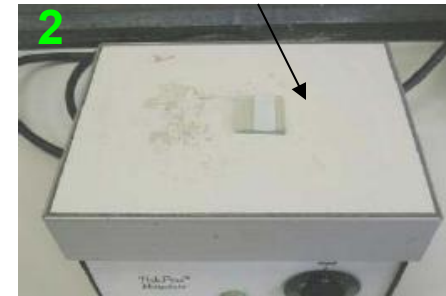
Analisis Eksistensi DNA EBV dengan PCR

- Amplikon DNA dipisahkan dg elektroforesis 90 volt selama 60 menit (agarosa 1,5%, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ EtBr, bufer TAE, 3 μl *loading buffer*).
- Sebagai penanda digunakan DNA *ladder* 100 bp.
- Pita fragmen DNA hasil elektroforesis divisualisasikan dengan menggunakan iluminator ultra violet (positif jika ditemukan 1 pita DNA berukuran 120 bp).
- pita DNA tersebut didokumentasikan dengan kamera polaroid untuk analisis eksistensi DNA EBV

pasta TiO_2 diratakan dengan *glass rod*



Elektroda TiO_2 dipanaskan



Penambahan *DNA probe*



1) Inkubasi 50 °C,
1 jam



2) Dicuci dengan
bufer TE

Penambahan *ssDNA*

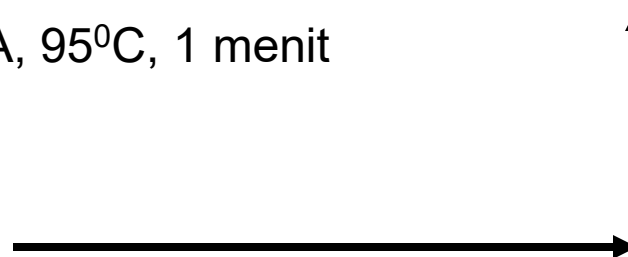


1) Inkubasi 50 °C,
1 jam

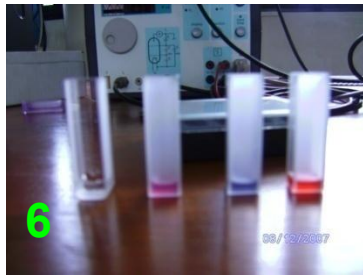


2) Dicuci dengan
bufer TE

Denaturasi dsDNA, 95°C, 1 menit

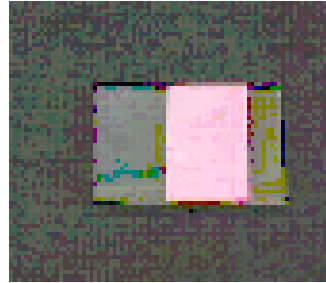


Penambahan *dye/interkalator*



1) Inkubasi 50 °C,
20 menit

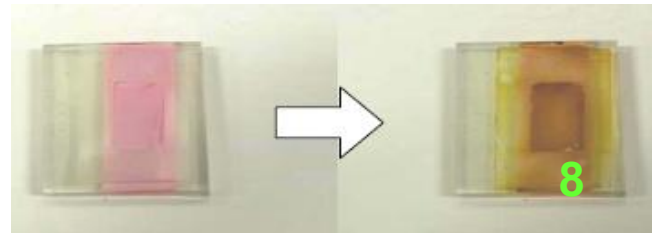
2) Dicuci dengan
bufer TE



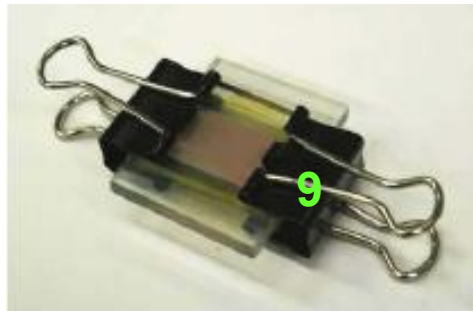
counter electrode
dengan lapisan
katalis karbon



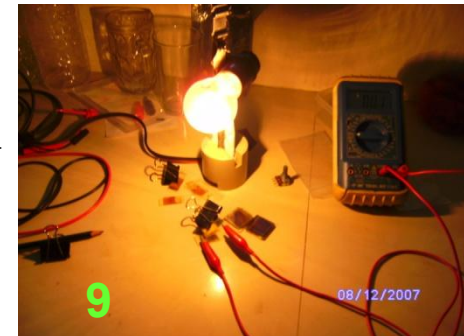
Pemberian elektrolit (diteteskan)



Gabungkan kedua elektroda
saling berhadapan dengan
sebuah penjepit



Pengukuran *photocurrent, I*



HASIL DAN DISKUSI

Isolasi DNA EBV

- Dari seluruh sampel serum penderita KNF baik telah dilakukan isolasi DNA.

Ekstraksi antosianin dan penentuan kadar antosianin total

- Ekstraksi terbaik dengan kadar total antosianin terbanyak, terjadi pada pelarut alkohol.

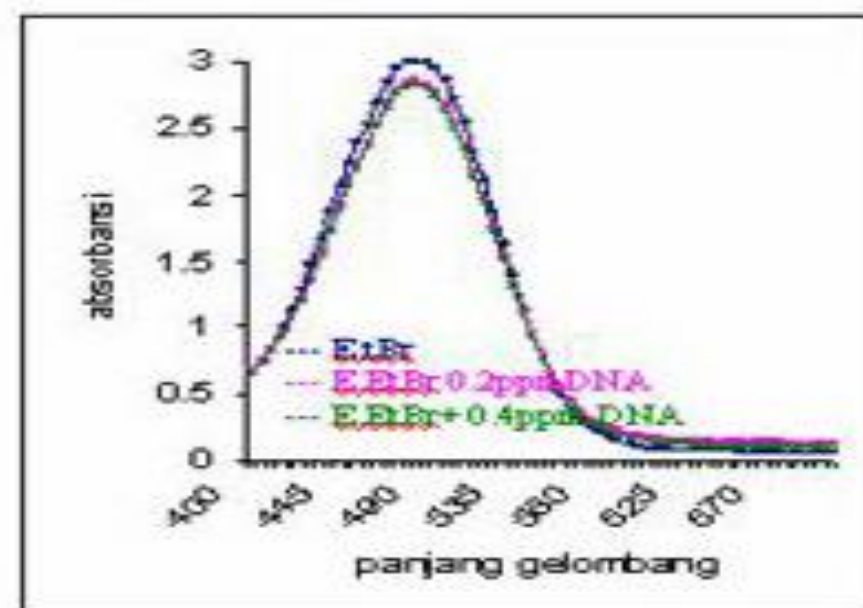
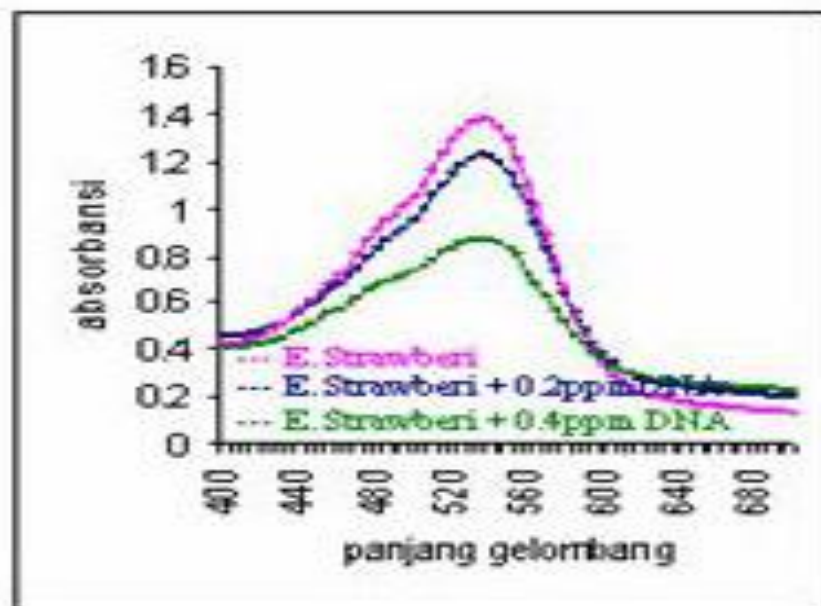
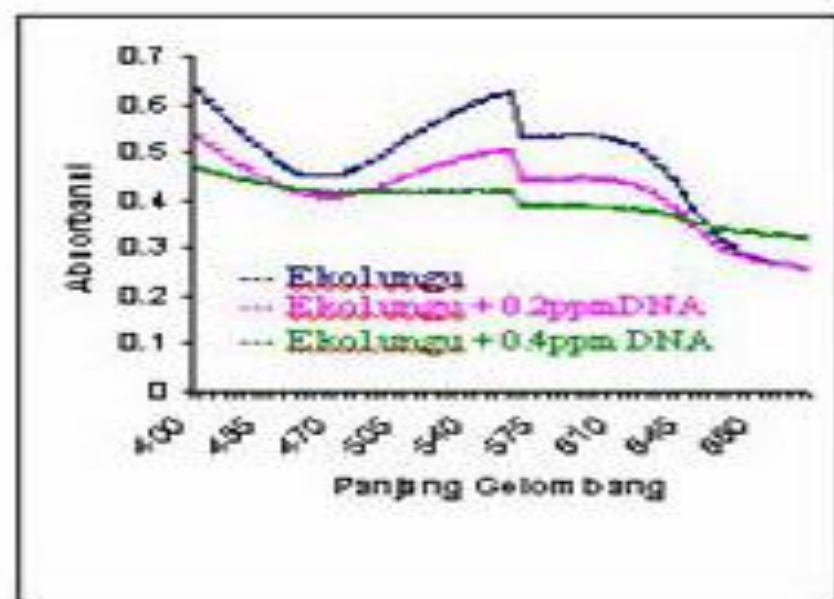
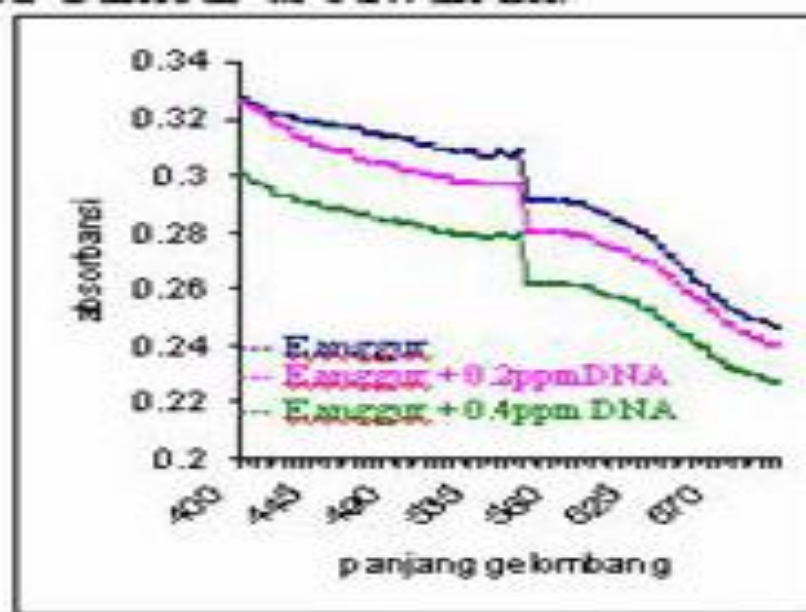
Tabel 1. Pengukuran Antosianin Total

Pelarut	Kol ungu (mg/100 g)	Strawberi (mg/100g)	Anggur (mg/100 g)	Asam
Alkohol	15.57 ± 0.50	1.01 ± 0.021	1.96 ± 0.12	0,5% sitrat
Alkohol	15.66 ± 0.48	1.46 ± 0.58	1.78 ± 0.24	1% sitrat
Alkohol	17.04 ± 0.48	2.14 ± 0.36	1.22 ± 0.06	0,5% tartarat
Alkohol	9.08 ± 0.33	1.28 ± 0.16	0.47 ± 0.47	1% tartarat
Alkohol	28.85 ± 0.59	12.65 ± 0.99	6.72 ± 0.22	0,5% asetat
Alkohol	31.36 ± 0.52	0.32 ± 0.00	6.19 ± 0.19	1% asetat
Alkohol	23.31 ± 0.55	20.13 ± 0.03	15.87 ± 0.51	0%
Akuades	2.53 ± 0.11	2.14 ± 0.15	0	0,5% sitrat
Akuades	8.09 ± 0.16	0.84 ± 0.15	0.75 ± 0.14	1% sitrat
Akuades	5.39 ± 0.17	0	0.32 ± 0.11	0,5% tartarat
Akuades	13.59 ± 0.72	0.19 ± 0.05	0	1% tartarat
Akuades	9.31 ± 0.51	1.10 ± 0.10	1.75 ± 0.05	0,5% asetat
Akuades	3.15 ± 0.17	4.11 ± 0.09	1.37 ± 0.03	1% asetat
Akuades	10.10 ± 0.01	1.90 ± 0.10	0	0%
Etil Asetat	0	0	0	0,5% sitrat
Etil Asetat	0	0	0.37 ± 0.07	1% sitrat
Etil Asetat	0	0	0	0,5% tartarat
Etil Asetat	0	0	0	1% tartarat
Etil Asetat	0	4.78 ± 0.08	0	0,5% asetat
Etil Asetat	0	0	0	1% asetat
Etil Asetat	0.14 ± 0.07	0.19 ± 0.11	0.14 ± 0.01	0%

Uji bahan elektrokromik sebagai interkalator DNA

Senyawa antosianin pada ekstrak anggur, strawberi dan kol ungu dapat berfungsi sebagai interkalator DNA.

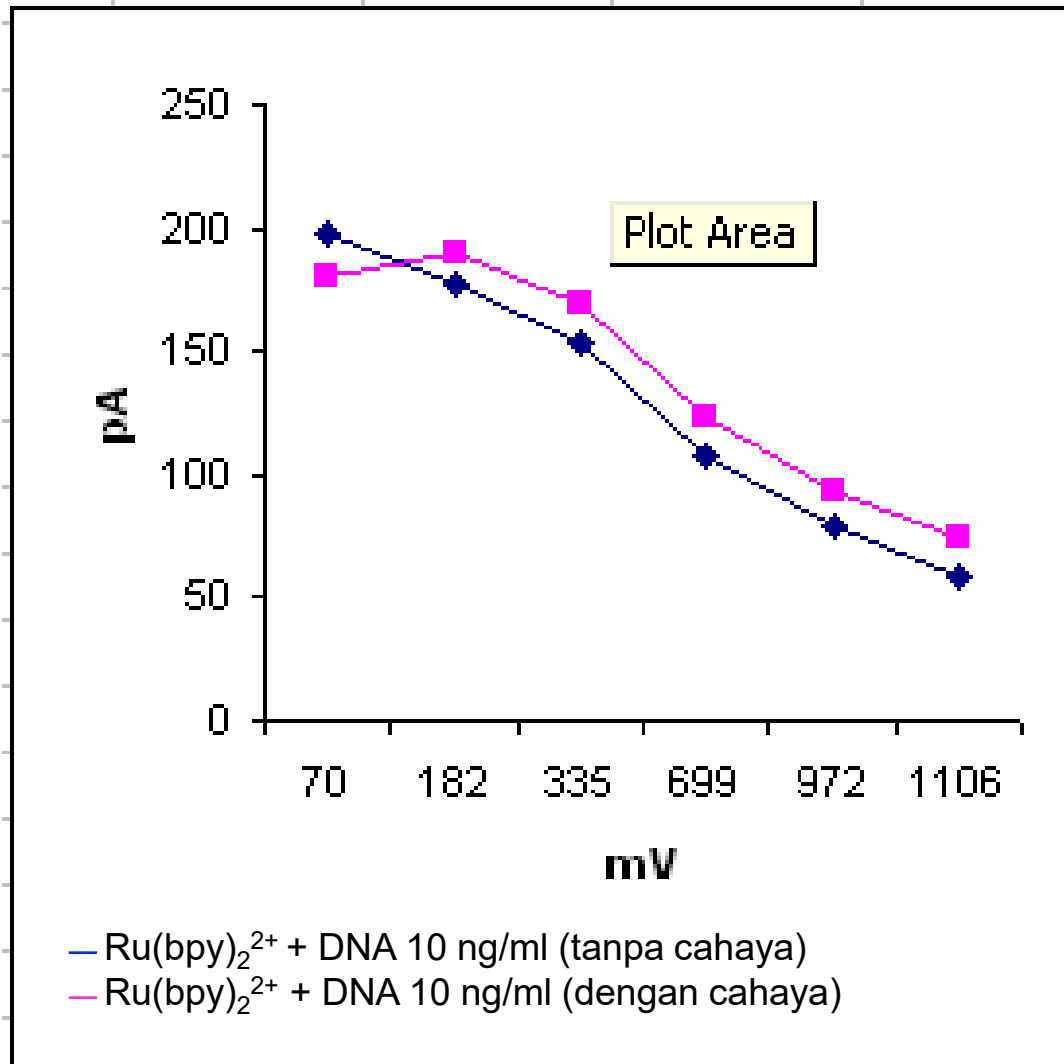
Hal ini ini dapat diamati dari terjadinya efek hipokromisme (penurunan nilai absorbansi) dari kurva spektra masing-masing ekstrak setelah penambahan DNA utas ganda.

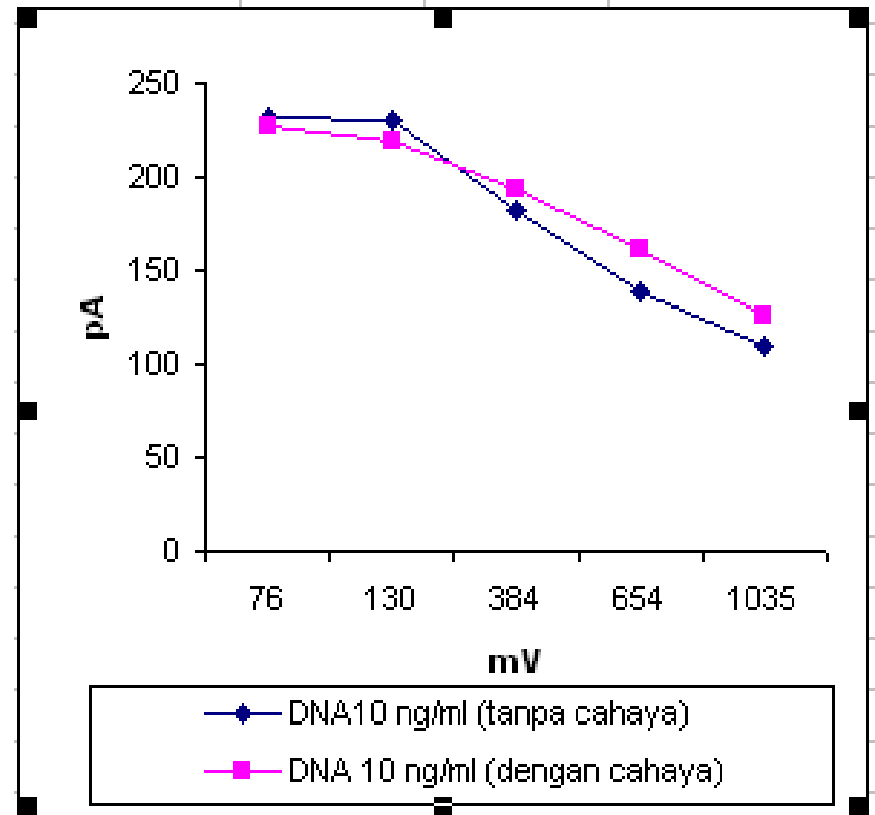
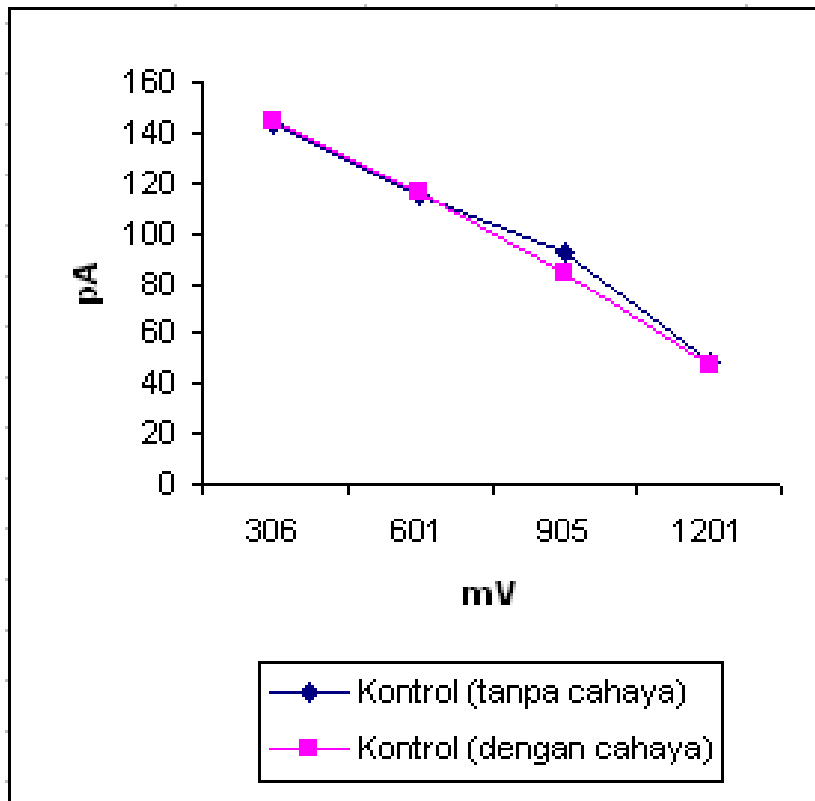


Gambar 3. Kurva absorpsi ekstrak anggur, kolongu, ekstrak strawberi dan EtBr dengan berbagai variasi konsentrasi DNA



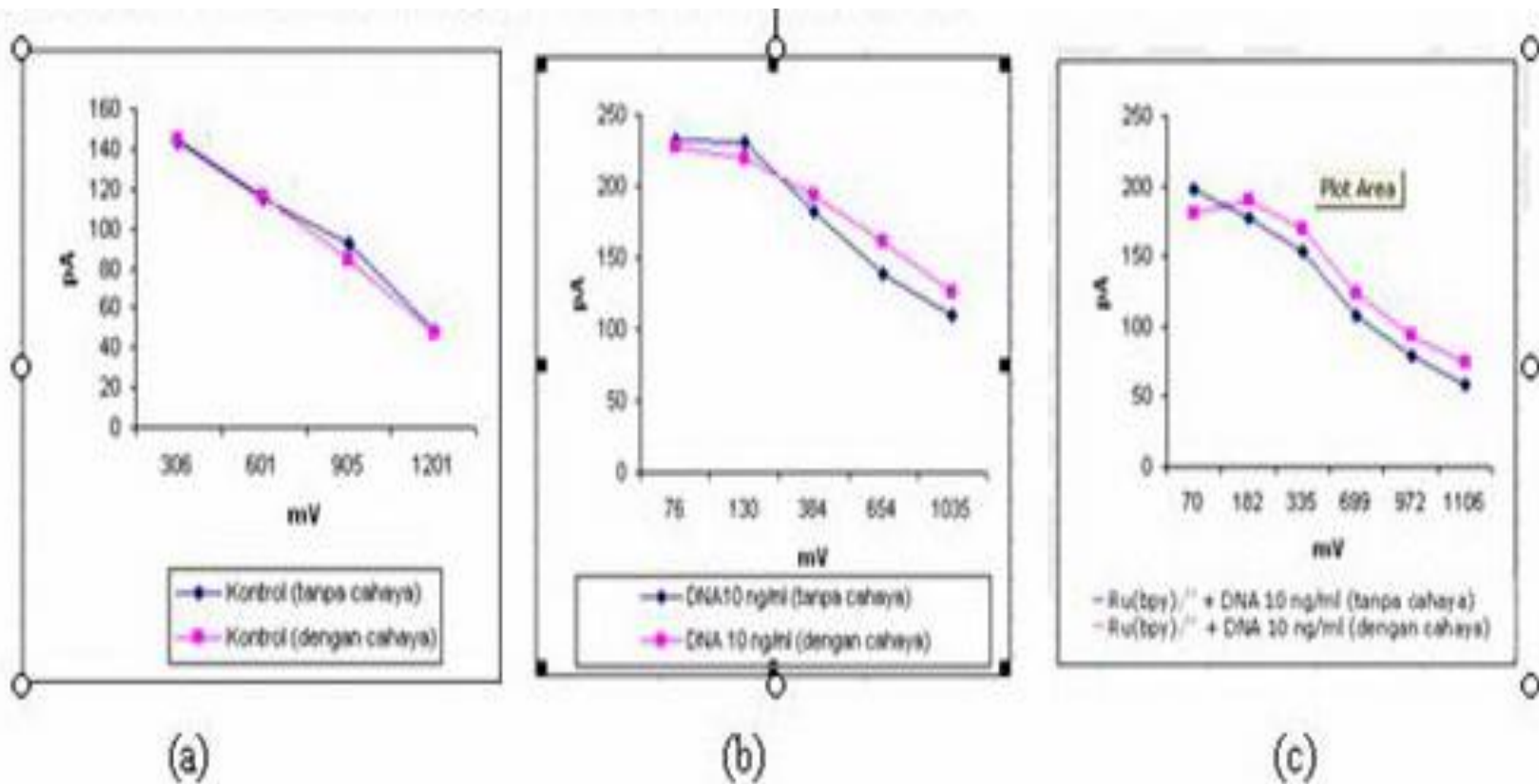
— E. Kol ungu — E. Kol ungu+0.2ppm DNA — E.Kol ungu + 0.4ppm DNA





Konsentrasi probe DNA 0.5 ng/ml
 Zat warna yang digunakan : ekstrak antosianin
 Kontrol (tanpa penambahan DNA target)

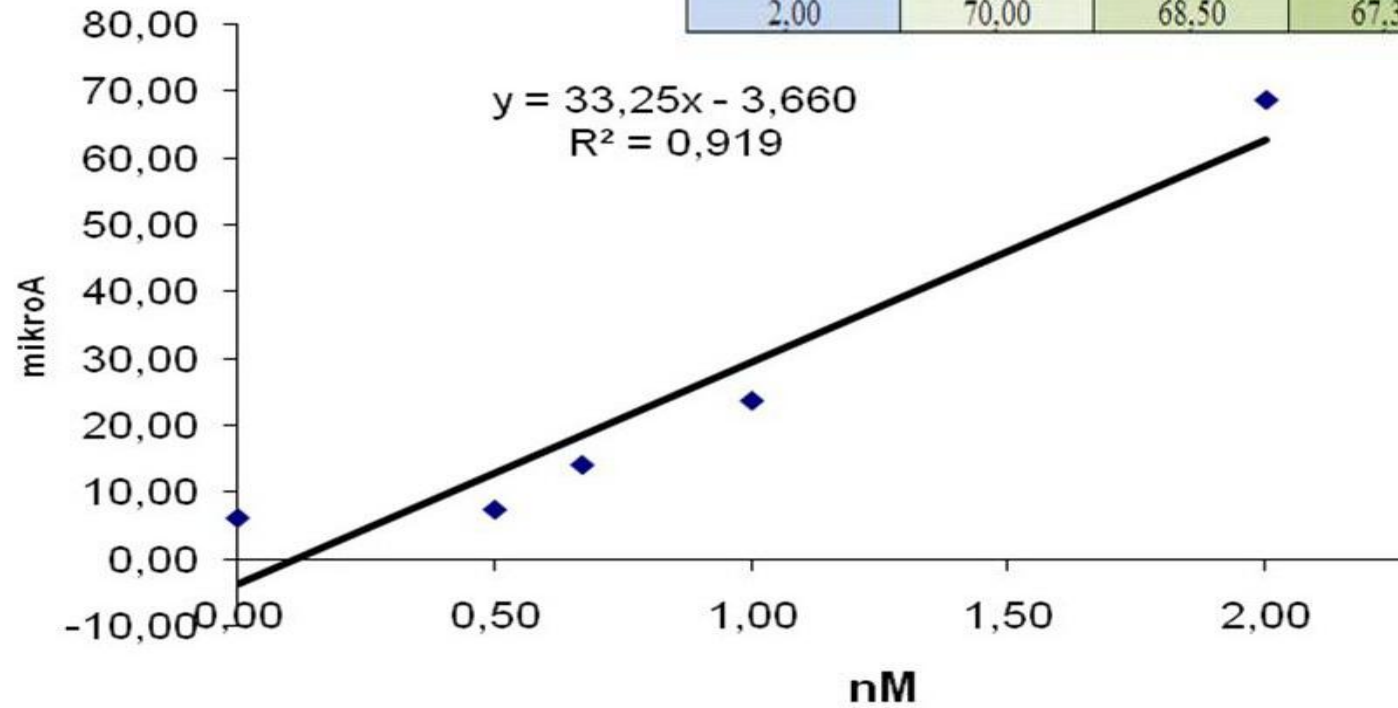
Uji sistem fotoelektrokimia



Gambar 4. Perubahan kuat arus yang dihasilkan pada sistem fotoelektrokimia untuk mendeteksi keberadaan DNA utas ganda. Konsentrasi DNA yang digunakan 10 ng/ml dan konsentrasi ekstrak antosianin 10 µg/ml. Sumber cahaya yang digunakan lampu pijar 25 watt (535 lux pada jarak 25 cm)

Pengukuran fotoelektrokimia DNA standar.

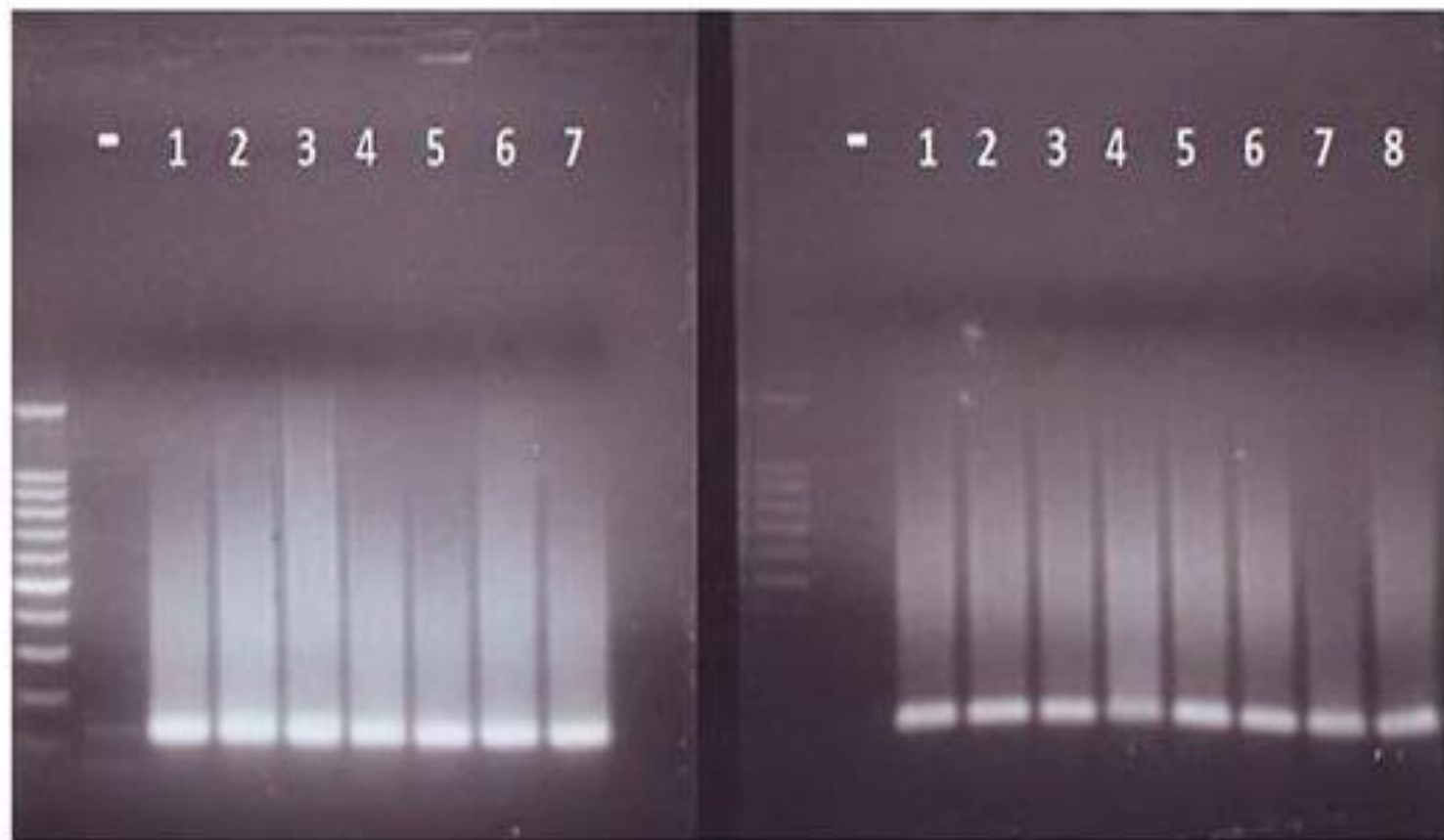
Konsentrasi (nM)	Kuat arus (μA)				
	1	2	3	rerata	deviasi
0,00	6,70	6,00	6,10	6,27	0,31
0,50	7,40	7,60	7,60	7,53	0,09
0,67	14,30	14,10	14,20	14,20	0,08
1,00	23,60	24,00	23,70	23,77	0,17
2,00	70,00	68,50	67,30	68,60	1,10



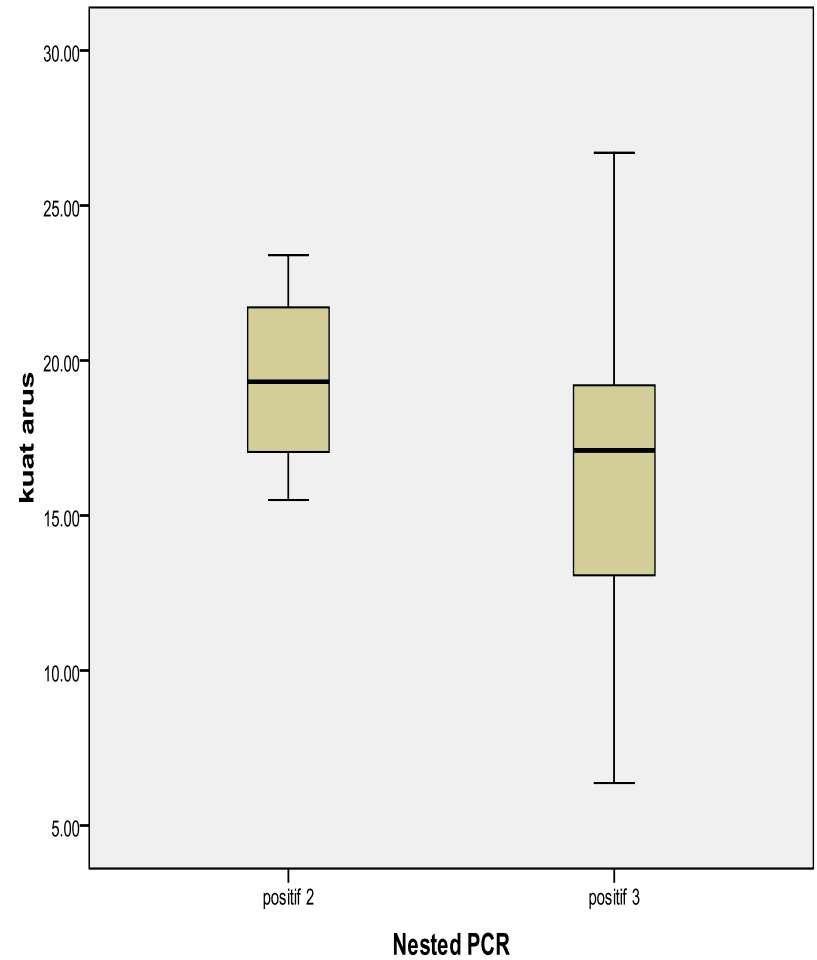
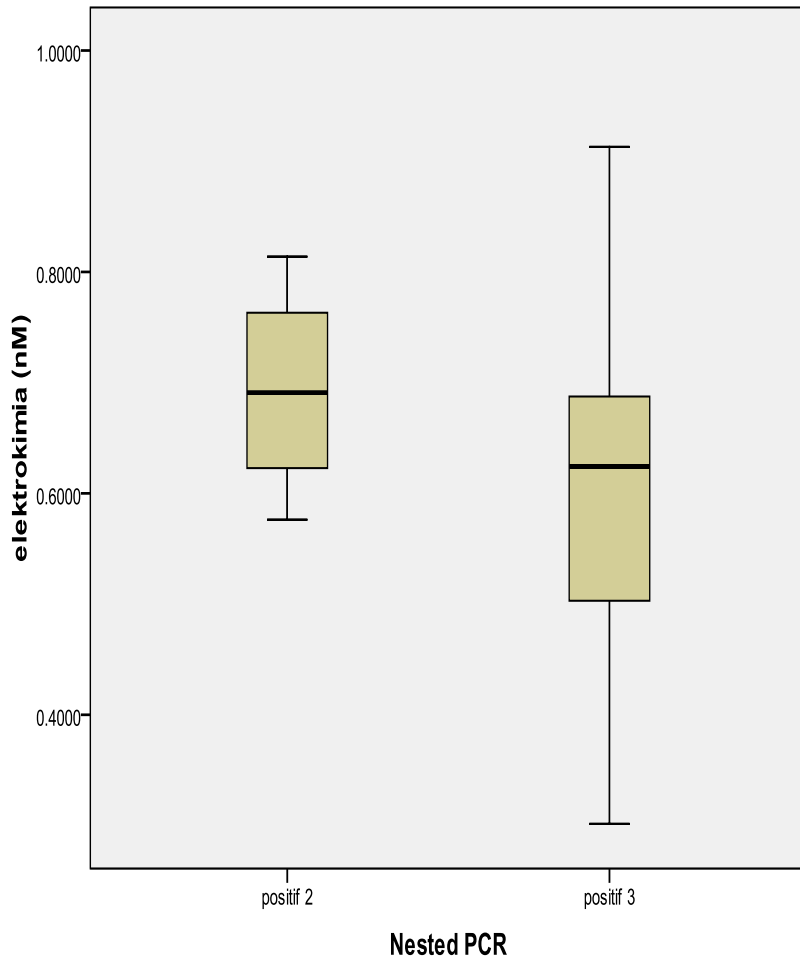
Gambar 5. Garis regresi yang menghubungkan antara konsentrasi DNA standard dengan kuat arus yang diukur menggunakan fotoelektrokimia

Tabel 2. Hasil pengukuran konsentrasi dan kuat arus DNA EBV EBNA-1 menggunakan fotoelektrokimia

No	Kuat arus (mA)	Konsentrasi DNA (nM)
1	1.3039	39.70
2	0.6002	16.30
3	0.7225	20.37
4	0.3216	7.03
5	0.5030	13.07
6	0.7125	20.03
7	0.9130	26.70
8	0.3015	6.37
9	0.4950	12.80
10	0.6784	18.90
11	0.6694	18.60
12	0.5311	14.00
13	0.6484	17.90
14	0.5762	15.50
15	0.6875	19.20
16	0.8138	23.40
rerata	0.6549	18.12



Gambar 6. Hasil PCR EBV EBNA-1(-, serum normal, 1-7 berasal dari serum penderita KNF)



Gambar 7. Hubungan antara hasil pembacaan EBV EBNA-1 dengan PCR dengan fotoelektrokimia.

LAMPIRAN 2. Kuat arus pada fotoelektrokimia serum pasien KNF

<u>No. Sampel</u>	<u>Kuat arus (μA)</u>	<u>Konsentrasi DNA (nM)</u>
6i	39.70	1.3039
6D	16.30	0.6002
14i	20.37	0.7225
14D	7.03	0.3216
18i	13.07	0.5030
18c	20.03	0.7125
21i	26.70	0.9130
21c	6.37	0.3015
38i	12.80	0.4950
38c	18.90	0.6784
41i	18.60	0.6694
41c	14.00	0.5311
42i	17.90	0.6484
42c	15.50	0.5762
45i	19.20	0.6875
45c	23.40	0.8138

KESIMPULAN

- Ekstraksi terbaik dengan kadar total antosianin terbanyak dapat dilakukan dengan pelarut alkohol.
- Antosian diekstraksi menggunakan alkohol lebih tinggi kadarnya dibandingkan menggunakan air dan etil asetat.
- Daun kol ungu memiliki kadar antosian tertinggi dibandingkan antosian pada buah strawberi dan anggur.

KESIMPULAN

- Senyawa antosianin pada ekstrak anggur, strawberi dan kol ungu dapat berfungsi sebagai interkalator DNA.
- Penggunaan zat elektrokromik sebagai interkalator DNA menghasilkan perbedaan kuat arus yang dihasilkan antara sistem fotoelektrokimia dengan pemberian cahaya dibandingkan tanpa pemberian cahaya.

KESIMPULAN

- Terdapat korelasi yang sangat kuat antara konsentrasi DNA yang diencerkan serial dengan kuat arus yang ditunjukkan oleh sistem elektrokimia yang telah dibuat.
- Tidak terdapat korelasi pembacaan konsentrasi DNA EBV EBNA-1 menggunakan fotoelektrokima dengan menggunakan PCR.

- Terima kasih