

1. Mendapatkan Hibah Penelitian Kompetitif (Sebagai Ketua)

KODE K01

DESKRIPSI : Ketua Peneliti tahun ke-2 Hibah penelitian DRPM skema PDUPT tahun 2018
Judul : Perancangan primer universal MAGE A-12 untuk identifikasi mRNA MAGE A1-12 dalam upaya pengembangan marker deteksi dini kanker paru

	Halaman
BUKTI : SK Rektor No 893/UN3/2018, tgl 22 Januari 2018, Dana Rp 110.000.000,-	2
Gondo Mastutik di nomer urutan 7	6
Kontrak penelitian No 200/UN3.14/LT/2018	7
Laporan akhir	15



SALINAN

**KEPUTUSAN
REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOMOR 893/UN3/2018**

TENTANG

**PELAKSANAAN PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2018**

REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA,

- Menimbang : a. bahwa dalam rangka pelaksanaan penelitian sebagai salah satu wujud dari Tri Dharma Perguruan Tinggi, maka perlu menetapkan para peneliti dan judul penelitian dimaksud;
- b. bahwa sesuai hasil seleksi proposal penelitian yang didanai melalui Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Tahun 2018, maka perlu menetapkan para peneliti dan judul penelitian;
- c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a dan huruf b, perlu menetapkan Keputusan Rektor tentang Pelaksanaan Penelitian Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2018;
- Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4301);
2. Undang - Undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembaran Negara Tahun 2012 Nomor 5336);
3. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 57 Tahun 1954 tentang Pendirian Universitas Airlangga di Surabaya sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 3 Tahun 1955 tentang Pengubahan Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954.(Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1954 Nomor 99 Tambahan Lembaran Negara Nomor 695 juncto Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1955 Nomor 4 Tambahan Lembaran Negara Nomor 748);

4.Peraturan ...

4. Peraturan Pemerintah Nomor 37 Tahun 2009 tentang Dosen (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 76, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5007);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 4 Tahun 2014 tentang Penyelenggaraan Pendidikan Tinggi dan Pengelolaan Perguruan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 16, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5500);
6. Peraturan Pemerintah Nomor 30 Tahun 2014 tentang Statuta Universitas Airlangga (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5535);
7. Peraturan Pemerintah Nomor 26 Tahun 2015 tentang Bentuk dan Mekanisme Pendanaan Perguruan Tinggi Negeri Badan Hukum (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2015 Nomor 110, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5699);
8. Keputusan Majelis Wali Amanat Universitas Airlangga Nomor 1032/UN3.MWA/K/2015 tentang Pengangkatan Rektor Universitas Airlangga Periode 2015-2020;
9. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 42 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Airlangga sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Rektor Nomor 39 Tahun 2017;
10. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 38 Tahun 2017 Tentang Peraturan Pendidikan Universitas Airlangga sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Rektor Nomor 01 Tahun 2018;
11. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 1280/UN3/2015 tentang Pembentukan Lembaga Penelitian dan Inovasi;
12. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 1285/UN3/2015 tentang Pengangkatan Ketua pada Lembaga dan Kepala Perpustakaan di Lingkungan Universitas Airlangga;

Meperhatikan : Surat Ketua Lembaga Penelitian Dan Inovasi Universitas Airlangga Nomor 76/UN3.14/LT/2018, Tanggal 18 Januari 2018, perihal Permohonan Keputusan Rektor tentang Pelaksanaan Penelitian Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2018.

MEMUTUSKAN :

MENETAPKAN : KEPUTUSAN REKTOR TENTANG PELAKSANAAN PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA TAHUN ANGGARAN 2018.

KESATU : ...

- KESATU : Menetapkan Hasil Seleksi Proposal Penelitian Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2018.
- KEDUA : Penerima Penelitian Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2018 sebanyak **262 (dua ratus enam puluh dua) judul**, dengan susunan nama Tim Peneliti sebagaimana tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari keputusan Rektor ini.
- KETIGA : Biaya untuk pelaksanaan kegiatan penelitian sebagaimana dimaksud pada diktum KEDUA adalah sebesar Rp. **27.442.000.000,00** (dua puluh tujuh milyar empat ratus empat puluh dua juta rupiah).
- KEEMPAT : Dalam melaksanakan tugasnya, penerima penelitian sebagaimana dimaksud pada diktum KEDUA, bekerja secara jujur dan transparan dengan berpedoman pada peraturan dan ketentuan-ketentuan yang berlaku, serta bertanggungjawab kepada Rektor melalui Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga.
- KELIMA : Jangka waktu pelaksanaan penelitian sebagaimana dimaksud pada diktum KESATU adalah selama 11 (sebelas) bulan terhitung mulai tanggal **1 Februari s.d 15 Desember 2018**.
- KEENAM : Biaya pelaksanaan Keputusan ini dibebankan pada DIPA Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Nomor SP DIPA-042.06.1.401516/2018, tanggal 5 Desember 2017.
- KETUJUH : Apabila di kemudian hari ditemukan data yang tidak sesuai dengan fakta maka status penelitian yang bersangkutan dinyatakan gugur.
- KEDELAPAN : Keputusan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Salinan disampaikan Yth :

1. Pimpinan Unit Kerja di Lingkungan Unair
2. Yang bersangkutan

Ditetapkan di Surabaya
pada tanggal 22 Januari 2018

REKTOR,

TTD

Salinan sesuai dengan aslinya
Sekretaris Universitas,

MOHAMMAD NASIH
NIP.196508061992031002


KOKO SRIMALYO
NIP. 196602281990021001

LAMPIRAN KEPUTUSAN REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA**NOMOR : 893/UN3/2018, TANGGAL 22 JANUARI 2018****TENTANG : PELAKSANAAN PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA TAHUN ANGGARAN 2018**

NO	SKEMA	TIM PENELITI	NIDN	FA KUL TAS	JUDUL	STATUS	DANA PENELITIAN
1	Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT)	1. Dr. Ahmad Yudianto, dr., Sp.F, S.H., M.Kes. 2. Dr. Agung Sosiawan, drg., M.Kes. 3. Nily Sulistyorini, dr., Sp.F	8888130017 0011127110 0015048208	FK	Sibling DNA Profiling pada Suku Jawa, Madura, Bali, Sunda sebagai Dasar bagi Identifikasi Personal dengan Menggunakan Saudara Kandung sebagai Referens Pemanding	Baru	110.000.000
2	Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT)	1. Dr. Arie Utariani, dr., SpAn., KAP. 2. Bambang Pujo Semedi, dr., SpAn., KIC 3. Agustina Salinding, dr., SpAn., KIC	8808130017 0008027306 8832800016	FK	KEPATUHAN DAN OUTCOME PENATALAKSANAAN PASIEN SEPSIS DAN SYOK SEPSIS BERDASARKAN SSC (SURVIVING SEPSIS CAMPAIGN) 2016 DI RUANG RESUSITASI DAN INTENSIF RSUD DR SOETOMO	Baru	100.000.000
3	Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT)	1. Dr. Arifa Mustika, dr., M.Si. 2. Nurmawati Fatimah, dr., M.Si. 3. Dr. Gadis Meinar Sari, dr., M.Kes.	0015097006 0017088008 0004056612	FK	MEKANISME KERJA NANOPARTIKEL EKSTRAK DAUN SINGAWALANG (PETIVERIA ALLIACEAE) PADA REGULASI GLUKOSA MELALUI Glut-2, IRS-1, INSULIN, TNF- α , IL-6, SIRT-1 DAN PGC1 α PADA MODEL TIKUS DIABETES MELLITUS	Lanjutan	100.000.000
4	Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT)	1. Dr. Cita Rosita Sigit Prakoeswa, dr., Sp.KK 2. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh 3. Linda Astari, dr., Sp.KK	8865610016 0010035907 0006038108	FK	Efikasi Pengaruh Pemberian Topikal Produk Metabolit Amniotic Membrane Stem Cell (AMSC) terhadap Ulkus Plantar Kronis Morbus Hansen Berdasarkan Perawatan Standar Framycetin Gauze Dressing	Lanjutan	100.000.000
5	Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT)	1. Dr. Damayanti Tinduh, dr., Sp.KFR-K 2. Dr. Sri Mardjiati Meiwulan, dr., Sp.KFR-K 3. Patricia Maria K, dr., Sp.KFR-K 4. I Putu Alit Pawana, dr., SpKFR	8889900016 8871010016 0021116206 8894800016	FK	Perbedaan Aktivitas Myokine, Micro-RNA dan Stem Cell Endogen di PBMC Orang Dewasa dengan Pola Hidup Sedentary Dibandingkan Orang Dewasa dengan Pola Hidup Aktif	Baru	120.000.000

NO	SKEMA	TIM PENELITI	NIDN	FA KUL TAS	JUDUL	STATUS	DANA PENELITIAN
6	Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT)	1. Prof. Djoko Santoso, dr., SpPD-KGH., Ph.D., FINASIM 2. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, drs., M.Si. 3. Anny Setijo Rahayu, dr., Sp.PA(K)	0726046101 0005075507 0020097009	FK	Pemodelan Pengembangan dan Penggunaan Potensi Ekstrak Tanaman Galing (Cayratia trifolia) Dalam Pencegahan Gangguan Fungsi Ginjal Akibat Pemberian Kemoterapi (Cisplatin) Pada Balb/c Mice	Baru	140.000.000
7	Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT)	1. Dr. Gondo Mastutik, drh., M.Kes. 2. Alphania Rahniayu, dr., SpPA 3. Nila Kurniasari, dr., SpPA	0027067304 0007028106 0023018107	FK	PERANCANGAN PRIMER UNIVERSAL MAGE A-12 UNTUK IDENTIFIKASI mRNA MAGE A1-12 DALAM UPAYA PENGEMBANGAN MARKER DETEKSI DINI KANKER PARU	Lanjutan	110.000.000
8	Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT)	1. Prof. Dr. Indri Safitri Mukono, dr., M.S 2. Dr. Agus Turchan, dr., SpBS 3. Hanik Badriyah, dr., SpS. 4. Prof. Dr. Suhartati, dr., M.S	0014065303 8822800016 0024097808 0017014701	FK	Eksplorasi Potensi Herba Solanum betaceum Sebagai Terapi Pada Model Hewan Coba Alzheimer	Baru	125.000.000
9	Penelitian Disertasi Doktor (PDD)	Lilik Herawati, dr., M.Kes.	0014037509	FK	Analisis Mekanisme Pengaruh Prekondisi Diet Glukosa secara Kontinyu-Bertahap terhadap Akt dan Hsp27 Sel Beta Pankreas yang Dipapar Stressor Diet Tinggi Glukosa	Baru	57.500.000
10	Penelitian Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU)	Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK	0007035703	FK	GENOTYPING SEKUENS NUKLEOTIDA GEN 16S rRNA Mycobacterium tuberculosis dari PASIEN TB PARU dan PENGEMBANGAN METODE MULTIPLEX PCR untuk IDENTIFIKASI Mycobacterium tuberculosis dan MOTT	Lanjutan	60.000.000
11	Penelitian Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU)	Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK	0007035703	FK	GENOTYPING SEKUENS NUKLEOTIDA GEN ECCB5 Mycobacterium Tuberculosis dari PASIEN TB PARU dan STUDI PENGEMBANGAN METODE DIAGNOSIS DINI pada Latent Tuberculosis Infection (Ltbi) DENGAN TARGET GEN Eccb5 pada POPULASI BERISIKO atau NARAKONTAK	Lanjutan	60.000.000



PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN
Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi
PDUPT

Tahun Anggaran 2018
Nomor: 200/UN3.14/LT/2018

Pada hari ini **Rabu** tanggal **Tujuh** bulan **Februari** tahun **Dua Ribu Delapan Belas**, kami yang bertandatangan di bawah ini:

1. **Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.** : Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi, Universitas Airlangga, dalam hal ini bertindak untuk dan atas nama Universitas Airlangga, yang berkedudukan di Kampus C Universitas Airlangga, Mulyorejo - Surabaya untuk selanjutnya disebut **PIHAK PERTAMA**;
2. **Dr. Gondo Mastutik, drh., M.Kes.** : Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, dalam hal ini bertindak sebagai pengusul dan Ketua Pelaksana Penelitian Tahun Anggaran 2018 untuk selanjutnya disebut **PIHAK KEDUA**.

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA**, secara bersama-sama sepakat mengikatkan diri dalam suatu Perjanjian Pendanaan Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2018 dengan ketentuan dan syarat-syarat sebagai berikut:

Pasal 1
Dasar Hukum

Perjanjian Pendanaan Penelitian ini berdasarkan kepada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 17 Tahun 2003, tentang Keuangan Negara;
2. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 20 Tahun 2003, tentang Sistem Pendidikan Nasional;
3. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 01 Tahun 2004, tentang Perbendaharaan Negara;
4. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 15 Tahun 2004, tentang Pemeriksaan Pengelolaan dan Tanggung Jawab Keuangan Negara;
5. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 39 Tahun 2008 tentang Kementerian Negara;
6. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi;
7. Peraturan Pemerintah Nomor 26 Tahun 2015 tentang Bentuk dan Mekanisme Perguruan Tinggi Negeri Badan Hukum;
8. Peraturan Presiden Nomor 7 Tahun 2015 tentang Organisasi Kementerian Negara;
9. Peraturan Presiden Nomor 13 Tahun 2015 tentang Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi;

10. Peraturan Menteri Keuangan Nomor 139/PMK.02/2015 tentang Tata Cara Penyediaan, Pencairan, dan Pertanggungjawaban Pemberian Bantuan Pendanaan Perguruan Tinggi Negeri Badan Hukum;
11. Peraturan Menteri Keuangan Nomor 49/PMK.02/2017 tentang Standar Biaya Masukan Tahun 2018;
12. Peraturan Menteri Keuangan Nomor 86/PMK.02/2017 tentang Standar Biaya Keluaran Tahun 2018;
13. Peraturan Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia Nomor 15 Tahun 2015 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi;
14. Peraturan Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia Nomor 69 Tahun 2016 tentang Tata Cara Pembentukan Komite Penilaian dan/atau Reviewer Penelitian;
15. Peraturan Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia Nomor 6 Tahun 2018 tentang Bantuan Operasional Perguruan Tinggi Negeri;
16. Peraturan Direktur Jenderal Perbendaharaan Kementerian Keuangan Republik Indonesia Nomor 15/PB/2017 tentang Petunjuk Pelaksanaan Pembayaran Anggaran Penelitian Berbasis Standar Biaya Keluaran Sub Keluaran Penelitian;
17. Keputusan Direktur Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Nomor 23a/E/KPT/2017 tentang Panduan Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Edisi XI Tahun 2017;
18. Keputusan Direktur Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Nomor 01/E/KPT/2018 tentang Penerimaan Pendanaan Penelitian dan Pengabdian Masyarakat di Perguruan Tinggi Negeri Badan Hukum Tahun Anggaran 2018;
19. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 893/UN3/2018 tentang Pelaksanaan Penelitian Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2018

Pasal 2

Ruang Lingkup Perjanjian

PIHAK PERTAMA memberi pendanaan kepada **PIHAK KEDUA** dan **PIHAK KEDUA** menerima pendanaan tersebut dari **PIHAK PERTAMA**, untuk melaksanakan dan menyelesaikan Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2018 dengan judul :

PERANCANGAN PRIMER UNIVERSAL MAGE A-12 UNTUK IDENTIFIKASI mRNA MAGE A1-12 DALAM UPAYA PENGEMBANGAN MARKER DETEKSI DINI KANKER PARU

Pasal 3

Dana Penelitian

- (1) **PIHAK PERTAMA** memberikan pendanaan penelitian Tahun Anggaran 2018 kepada **PIHAK KEDUA** dan **PIHAK KEDUA** menerima pendanaan tersebut dan bertanggungjawab terhadap penggunaan dana yang diterima.
- (2) **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab mutlak atas pelaksanaan, administrasi, dan keuangan atas pekerjaan sebagaimana dimaksud pada ayat (1), dan implementasi pelaksanaan tugas tersebut.
- (3) Besarnya dana untuk melaksanakan penelitian dengan judul sebagaimana dimaksud pada Pasal 2 adalah sebesar **Rp. 110.000.000 (Seratus Sepuluh Juta Rupiah)** sudah termasuk pajak.
- (4) Dana Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (3) dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Nomor SP

- (5) Tahapan seleksi dan pelaksanaan penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (4) mengacu pada Panduan Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat di Perguruan Tinggi Edisi XI Tahun 2017. DIPA-042.06.1.401516/2018, tanggal 5 Desember 2017.

Pasal 4

Tata Cara Pembayaran Dana Penelitian

- (1) Proses pencairan pendanaan penelitian dilakukan dengan 2 tahap pencairan yaitu pada bulan April dan Oktober sesuai dengan jadwal pembayaran sebagaimana dimaksud Pasal 8 Peraturan Menteri Keuangan Nomor 139/PMK.02/2015, dan tidak tergantung waktu penandatanganan kontrak kinerja antara Rektor PTN Badan Hukum dengan Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.
- (2) Pendanaan Pelaksanaan Penelitian diberikan pada skema Penelitian Berbasis Kompetensi, Penelitian Kerjasama Luar Negeri, Penelitian Strategis Nasional, Penelitian Unggulan Strategis Nasional, Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi, Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi, Penelitian Pengembangan Unggulan Perguruan Tinggi, Penelitian Tim Pascasarjana, Penelitian Pasca Doktor yang dibayarkan secara bertahap sebesar 70% dan 30%.
- (3) Pendanaan Pelaksanaan Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (2) tidak termasuk untuk Skema Penelitian Disertasi Doktor dan Penelitian Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul.
- (4) **PIHAK PERTAMA** akan membayarkan Dana Penelitian kepada **PIHAK KEDUA** secara bertahap dengan ketentuan sebagai berikut:
- Pembayaran Tahap Pertama sebesar 70% dari total dana penelitian yaitu $70\% \times \text{Rp. (110.000.000)} = \text{Rp. (77.000.000)}$ (**Tujuh Puluh Tujuh Juta Rupiah**) yang akan dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** setelah **PARA PIHAK** membuat dan melengkapi rancangan pelaksanaan penelitian yang memuat judul penelitian, pendekatan dan metode penelitian yang digunakan, data yang akan diperoleh, anggaran yang akan digunakan, dan tujuan penelitian berupa luaran yang akan dicapai.
 - Pembayaran Tahap Kedua sebesar 30% dari total dana penelitian yaitu $30\% \times \text{Rp. (110.000.000)} = \text{Rp. (33.000.000)}$ (**Tiga Puluh Tiga Juta Rupiah**) dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** setelah **PIHAK KEDUA** mengunggah ke SIMLITABMAS yaitu Laporan Kemajuan Pelaksanaan Penelitian dan Catatan Harian.
- (5) Pendanaan untuk Skema Penelitian Disertasi Doktor dan Penelitian Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul sebagaimana dimaksud pada ayat (3) dilaksanakan secara sekaligus bersamaan dengan Pembayaran Tahap Pertama.
- (6) Dalam hal terdapat sisa dana pada Tahap Pertama yang tidak terserap untuk kegiatan pelaksanaan penelitian, maka sisa dana tersebut diperhitungkan sebagai bagian dari pembayaran Tahap Kedua.
- (7) Apabila terdapat sisa dana yang tidak terserap untuk kegiatan penelitian setelah Perjanjian ini berakhir, maka **sisa dana tersebut diperhitungkan sebagai bahan dari alokasi anggaran pendanaan penelitian pada tahun berikutnya dan tidak diperbolehkan digunakan di luar alokasi penelitian.**
- (8) Dana Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (4) akan disalurkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** ke rekening sebagai berikut:

Nama : Gondo Mastutik
Nomor Rekening : 0079429121
Nama Bank : BNI

- (9) **PIHAK PERTAMA** tidak bertanggung jawab atas keterlambatan dan/atau tidak terbayarnya sejumlah dana sebagaimana dimaksud pada ayat (1) yang disebabkan karena kesalahan **PIHAK KEDUA** dalam menyampaikan data peneliti, nama bank, nomor rekening, dan persyaratan lainnya yang tidak sesuai dengan ketentuan.

Pasal 5 Jangka Waktu

Jangka waktu pelaksanaan penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 sampai selesai 100%, adalah dihitung sejak **Tanggal 1 Februari 2018** dan berakhir pada **Tanggal 15 Desember 2018**.

Pasal 6 Target Luaran

- (1) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk mencapai target luaran wajib penelitian sebagaimana yang telah ditetapkan dalam Buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Edisi XI dan/atau sesuai yang telah diisikan dalam SIMLITABMAS.
- (1) **PIHAK KEDUA** diharapkan dapat mencapai target luaran tambahan penelitian sebagaimana yang telah dicantumkan dalam Buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Edisi XI dan/atau sesuai yang telah diisikan dalam SIMLITABMAS.
- (2) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk melaporkan perkembangan pencapaian target luaran sebagaimana dimaksud pada ayat (1) kepada **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 7 Hak dan Kewajiban Para Pihak

- (1) Hak dan Kewajiban **PIHAK PERTAMA**:
 - a. **PIHAK PERTAMA** berhak untuk mendapatkan dari **PIHAK KEDUA** luaran penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 8;
 - b. **PIHAK PERTAMA** berkewajiban untuk memberikan dana penelitian kepada **PIHAK KEDUA** dengan jumlah sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 ayat (3) dan dengan tata cara pembayaran sebagaimana dimaksud dalam Pasal 4.
- (2) Hak dan Kewajiban **PIHAK KEDUA**:
 - a. **PIHAK KEDUA** berhak menerima dana penelitian dari **PIHAK PERTAMA** dengan jumlah sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 ayat (3);
 - b. **PIHAK KEDUA** berkewajiban menyerahkan kepada **PIHAK KEDUA** luaran Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi dengan judul PERANCANGAN PRIMER UNIVERSAL MAGE A-12 UNTUK IDENTIFIKASI mRNA MAGE A1-12 DALAM UPAYA PENGEMBANGAN MARKER DETEKSI DINI KANKER PARU dan catatan harian pelaksanaan penelitian;
 - c. **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk bertanggungjawab dalam penggunaan dana penelitian yang diterimanya sesuai dengan proposal kegiatan yang telah disetujui;
 - d. **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk menyampaikan kepada **PIHAK PERTAMA** laporan penggunaan dana sebagaimana dimaksud dalam Pasal 8.

Pasal 8 Laporan Pelaksanaan Penelitian

- (1) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk menyampaikan kepada **PIHAK PERTAMA** berupa laporan kemajuan dan laporan akhir mengenai luaran penelitian dan rekapitulasi penggunaan anggaran sesuai dengan jumlah dana yang diberikan

oleh **PIHAK PERTAMA** yang tersusun secara sistematis sesuai pedoman yang ditentukan oleh **PIHAK PERTAMA**.

- (2) **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengunggah Laporan Kemajuan, Catatan Harian Pelaksanaan Penelitian dan Surat Pernyataan Tanggung Jawab Belanja (SPTB) yang telah dilaksanakan ke SIMLITABMAS paling lambat **14 September 2018**.
- (3) **PIHAK KEDUA** berkewajiban menyerahkan *Hardcopy* Laporan Kemajuan kepada **PIHAK PERTAMA**, paling lambat **18 September 2018**.
- (4) **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengunggah Laporan Akhir, Berkas Seminar Hasil (Borang Capaian Penelitian, Poster, Artikel Ilmiah dan Profil) pada SIMLITABMAS paling lambat **15 November 2018**.
- (5) Laporan hasil Penelitian sebagaimana tersebut pada ayat (4) harus memenuhi ketentuan sebagai berikut:
 - a. Bentuk/ukuran kertas A4;
 - b. Jenis huruf Times New Romans ukuran 12 dengan spasi 1,5;
 - c. Di bawah bagian cover ditulis:

Dibiayai oleh:

**Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Perjanjian Pendanaan Penelitian dan Pengabdian kepada
Masyarakat
Tahun Anggaran 2018**

Fasal 9

Monitoring dan Evaluasi

PIHAK PERTAMA dalam rangka pengawasan akan melakukan Monitoring dan Evaluasi internal terhadap kemajuan pelaksanaan Penelitian Tahun Anggaran 2018 ini sebelum pelaksanaan Monitoring dan Evaluasi eksternal oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.

Pasal 10

Penilaian Luaran

- (1) Penilaian luaran penelitian dilakukan oleh Komite Penilai/*Reviewer* Luaran sesuai dengan ketentuan yang berlaku.
- (2) Apabila dalam penilaian luaran terdapat luaran tambahan yang tidak tercapai maka dana tambahan yang sudah diterima oleh peneliti harus disetorkan kembali ke kas negara.

Pasal 11

Perubahan Susunan Tim Pelaksana dan Substansi Pelaksanaan

Perubahan terhadap susunan tim pelaksana dan substansi pelaksanaan Penelitian ini dapat dibenarkan apabila telah mendapat persetujuan tertulis dari Direktur Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.

Pasal 12
Penggantian Ketua Pelaksana

- (1) Apabila **PIHAK KEDUA** selaku ketua pelaksana tidak dapat melaksanakan Penelitian ini, maka **PIHAK KEDUA** wajib mengusulkan pengganti ketua pelaksana yang merupakan salah satu anggota tim kepada **PIHAK PERTAMA**.
- (2) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat melaksanakan tugas dan tidak ada pengganti ketua sebagaimana dimaksud pada ayat (1), maka **PIHAK KEDUA** harus mengembalikan dana penelitian kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya disetor ke Kas Negara.
- (3) Bukti setor sebagaimana dimaksud pada ayat (2) disimpan oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 13
Kekayaan Intelektual

- (1) Kekayaan Intelektual yang dihasilkan dari Pelaksanaan Penelitian diatur dan dikelola sesuai dengan peraturan dan perundang-undangan.
- (2) Setiap publikasi, makalah, dan/atau ekspos dalam bentuk apapun yang berkaitan dengan hasil penelitian ini, wajib mencantumkan Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi sebagai pemberi dana.

Pasal 14
Keadaan Memaksa (*Force Majeure*)

- (1) **PARA PIHAK** dibebaskan dari tanggung jawab atas keterlambatan atau kegagalan dalam memenuhi kewajiban yang dimaksud dalam Perjanjian Pendanaan Penelitian yang disebabkan atau diakibatkan oleh peristiwa atau kejadian di luar kekuasaan **PARA PIHAK** yang dapat digolongkan sebagai keadaan memaksa (*force majeure*).
- (2) Peristiwa atau kejadian yang dapat digolongkan keadaan memaksa (*force majeure*) dalam Perjanjian Pendanaan Penelitian ini antara lain: bencana alam, wabah penyakit, kebakaran, perang, blokade, peledakan, sabotase, revolusi, pemberontakan, huru-hara, serta adanya tindakan pemerintah dalam bidang ekonomi dan moneter yang secara nyata berpengaruh terhadap pelaksanaan Perjanjian Pendanaan Penelitian ini.
- (3) Apabila terjadi keadaan memaksa (*force majeure*) maka, pihak yang mengalami wajib memberitahukan kepada pihak lainnya secara tertulis, selambat-lambatnya dalam waktu 7 (Tujuh) hari kerja sejak terjadinya keadaan memaksa (*force majeure*), disertai dengan bukti-bukti yang sah dari pihak yang berwajib, dan **PARA PIHAK** dengan itikad baik akan segera membicarakan penyelesaiannya.

Pasal 15
Sanksi

- (1) Apabila sampai dengan batas waktu yang telah ditetapkan untuk melaksanakan Penelitian ini telah berakhir, namun **PIHAK KEDUA** belum menyelesaikan tugasnya, terlambat mengirim laporan Kemajuan, dan/atau terlambat mengirim laporan akhir, maka **PIHAK KEDUA** dikenakan sanksi administratif berupa penghentian pembayaran dan tidak dapat mengajukan proposal penelitian dalam kurun waktu dua tahun berturut-turut.
- (2) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat mencapai target luaran sebagaimana dimaksud dalam Pasal 5, maka kekurangan capaian target luaran tersebut akan

dicatat sebagai hutang **PIHAK KEDUA** kepada **PIHAK PERTAMA** yang apabila tidak dapat dilunasi oleh **PIHAK KEDUA**, akan berdampak pada kesempatan **PIHAK KEDUA** untuk mendapatkan pendanaan penelitian atau hibah lainnya yang dikelola oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 16 **Pembatalan Perjanjian**

- (1) Apabila dikemudian hari terhadap judul Penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ditemukan adanya duplikasi dengan Penelitian lain dan/atau ditemukan adanya ketidakjujuran, itikad tidak baik, dan/atau perbuatan yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah dari atau dilakukan oleh **PIHAK KEDUA**, maka perjanjian Penelitian ini dinyatakan batal dan **PIHAK KEDUA** wajib mengembalikan dana penelitian yang telah diterima kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya akan disetor ke Kas Negara.
- (2) Bukti setor sebagaimana dimaksud pada ayat (1) disimpan oleh **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 17 **Pajak-Pajak**

- (1) Hal-hal dan/atau segala sesuatu yang berkenaan dengan kewajiban pajak berupa PPN dan/atau PPh menjadi tanggungjawab **PIHAK KEDUA** dan harus dibayarkan oleh **PIHAK KEDUA** ke bank persepsi setempat sesuai ketentuan yang berlaku.
- (2) Kelengkapan administrasi dalam pembayaran pajak berupa PPN dan / atau PPh sebagaimana dimaksud pada ayat (1) Pasal 17 wajib menggunakan NPWP sebagai berikut :

Nama Wajib Pajak : **Universitas Airlangga**
Nomor NPWP : **73.773.758.5-619.000**
Alamat Wajib Pajak : **Mulyorejo, Surabaya**

- (3) Kesalahan administrasi dalam ketentuan perpajakan yang diatur pada Pasal 17 sehingga menyebabkan terjadinya kekurangan pembayaran, sanksi dan/atau denda pajak menjadi tanggungjawab mutlak **PIHAK KEDUA**.

Pasal 18 **Peralatan dan/atau alat Hasil Penelitian**

- (1) Hasil Pelaksanaan Penelitian ini yang berupa peralatan dan/atau alat yang dibeli dari pelaksanaan Penelitian ini adalah milik Negara yang dapat dihibahkan kepada Universitas Airlangga sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan.
- (2) Hasil Pelaksanaan Penelitian ini yang berupa peralatan dan/atau alat yang dibeli dari pelaksanaan penelitian ini adalah milik negara dan wajib dihibahkan kepada Universitas Airlangga melalui Berita Acara Serah Terima (BAST) sesuai dengan ketentuan peraturan perundang – undangan.
- (3) BAST sebagaimana dimaksud pada ayat (2), wajib melampirkan foto serah terima barang/alat dari Pejabat berwenang yang didampingi oleh pelaksana penelitian.
- (4) Apabila terdapat hal – hal lain yang belum diatur dalam Perjanjian Pendanaan Penelitian ini dan memerlukan pengaturan, maka akan diatur kemudian oleh **PARA PIHAK** melalui amandemen dan/atau perjanjian tersendiri yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Perjanjian Pendanaan Penelitian ini.

Pasal 19
Penyelesaian Sengketa

Apabila terjadi perselisihan antara **PIHAK PERTAMA** dan **PIHAK KEDUA** dalam pelaksanaan perjanjian ini akan dilakukan penyelesaian secara musyawarah dan mufakat, dan apabila tidak tercapai penyelesaian secara musyawarah dan mufakat maka penyelesaian dilakukan melalui proses hukum.

Pasal 20
Lain-lain

- (1) **PIHAK KEDUA** menjamin bahwa penelitian dengan judul tersebut di atas belum pernah dibiayai dan/atau diikutsertakan pada Pendanaan Penelitian lainnya, baik yang diselenggarakan oleh instansi, lembaga, perusahaan atau yayasan, baik di dalam maupun di luar negeri.
- (2) Segala sesuatu yang belum cukup diatur dalam Perjanjian ini dan dipandang perlu diatur lebih lanjut dan dilakukan perubahan oleh **PARA PIHAK**, maka perubahan-perubahannya akan diatur dalam perjanjian tambahan atau perubahan yang merupakan satu kesatuan dan bagian yang tidak terpisahkan dari Perjanjian ini.

Perjanjian ini dibuat dan ditandatangani oleh **PARA PIHAK** pada hari dan tanggal tersebut di atas, dibuat dalam rangkap 3 (Tiga) dan bermeterai cukup sesuai dengan ketentuan yang berlaku, yang masing-masing mempunyai kekuatan hukum yang sama.

PIHAK PERTAMA



Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D
NIDN: 0005076704

PIHAK KEDUA

Dr. Gondo Mastutik, drh., M.Kes.
NIDN: 0027067304

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran



Prof. Dr. Soetjo, dr., Sp.U (K)
NIDN: 0008065604

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



**PERANCANGAN PRIMER UNIVERSAL MAGE A-12 UNTUK IDENTIFIKASI
mRNA MAGE A1-12 DALAM UPAYA PENGEMBANGAN
MARKER DETEKSI DINI KANKER PARU**

TAHUN KE-2 DARI RENCANA 3 TAHUN

Dr. GONDO MASTUTIK, drh., M.Kes.	0027067304
PROF. Dr. SUHARTONO TAAT PUTRA, dr., MS.	0002064806
ALPHANIA RAHNIAYU, dr., SpPA	0007028106

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : PERANCANGAN PRIMER UNIVERSAL MAGE A-12
UNTUK IDENTIFIKASI mRNA MAGE A1-12 DALAM
UPAYA PENGEMBANGAN MARKER DETEKSI DINI
KANKER PARU

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. drh. GONDO MASTUTIK, S.KH, M.Kes
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0027067304
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Patologi Anatomik
Nomor HP : +6281231071818
Alamat surel (e-mail) : gondomastutik@fk.unair.ac.id;
gdomastutik@gmail.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. dr. Dr SUHARTONO TAAT PUTRA M.S
NIDN : 9990409798
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : dr. ALPHANIA RAHNIAYU S.Ked, Sp.P.A
NIDN : 0007028106
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 110,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 360,000,000

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran




(Prof. Dr. Soetjo, dr., SpU(K))
NIP/NIK 19560608 198612 1001

Kota Surabaya, 8 - 11 - 2018
Ketua,



(Dr. drh. GONDO MASTUTIK, S.KH, M.Kes)
NIP/NIK 197306272002122001

Menyetujui,
Ketua LPI Universitas Airlangga



(Prof. H. Hery Purnobasuki, drs., Msi., PhD.)
NIP/NIK 19670507 199102 1001

RINGKASAN

Kanker paru merupakan penyebab kematian pertama akibat kanker. Diagnosis kanker paru biasanya pada stadium lanjut dan prognosis yang buruk dengan mortalitas masih tinggi sehingga masih diperlukan pengembangan deteksi dini kanker paru dengan menggunakan penanda molekuler yang spesifik untuk kanker. Gen melanoma antigen (MAGE) MAGE hanya diekspresikan pada sel kanker dan jaringan testis normal. Sel kanker paru jenis *small cell lung cancer* (SCLC) atau *non small cell lung cancer* (NSCLC), mengekspresikan gen MAGE A yang dapat diidentifikasi dengan teknik *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT PCR). Ekspresi gen MAGE A berpotensi sebagai *marker* molekuler untuk pengembangan *marker* deteksi dini kanker paru. Gen MAGE A terdapat 12 varian yaitu MAGE A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12. Primer universal yang ada saat ini hanya mampu mendeteksi ekspresi gen MAGE varian A1 sampai A6, padahal varian lain gen MAGE yaitu varian A7, A8, A9, A10, A11, A12 juga banyak diekspresikan pada beberapa jenis kanker, termasuk kanker paru. Oleh karena itu diperlukan perancangan primer universal yang mampu mengidentifikasi ekspresi gen MAGE A varian A1 sampai A12 pada kanker paru.

Tujuan umum penelitian ini adalah mendapatkan primer universal MAGE A1-12 untuk identifikasi mRNA MAGE A1-12 dari bahan *core* biopsi, *forcep* biopsi, dan *broncho alveolar lavage* (BAL) jaringan paru dalam upaya mengembangkan *marker* deteksi dini kanker paru. Bahan hasil *core* biopsi dan *forcep* ini merupakan masa jaringan kecil atau spesimen kecil, dimana bahan *core* biopsi mewakili kanker paru dengan lokasi di perifer dan bahan *forcep* biopsi mewakili kanker paru dengan lokasi di central. Bahan BAL mewakili sel epitel yang paru yang lepas dari jaringan dengan jumlah sel yang sangat sedikit. Tahun II dilakukan identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 dan diagnosis histopatologi pada bahan hasil *forcep* biopsi jaringan paru, kemudian dilakukan analisis perbandingan hasil pemeriksaan histopatologi dengan RT PCR mRNA MAGE A1-12.

Pasangan primer untuk mendeteksi ekspresi mRNA MAGE A1-10 pada penelitian ini yaitu GMF10/GMR10 pada first round dan GMF10/GMR12 pada second round. Primer untuk mendeteksi MAGE A11 yaitu GMF11/GMR11 untuk first round dan GMF11/GMR12 untuk second round. Primer untuk mendeteksi MAGE A12 yaitu GMF12/GMR10 untuk first round dan GMF12/GMR12 untuk second round.

Primer MAGE A1-10 dapat mendeteksi sel kanker yang mengekspresikan paling sedikit satu gen MAGE A dari 10 varian gen MAGE A. *Marker* molekuler ini mungkin dapat digunakan sebagai *tool* baru untuk mendeteksi ekspresi gen MAGE pada kanker. Pasangan primer tersebut adalah GMF10 yaitu 5'-GAAGAYCTGCCWGTGGGTC-3', GMR10 yaitu 5'-CTCCAGGTASTTYTCTGCAC-3', GMR12 yaitu 5'-CCAGYATTTCTGCCTTTGTGA-3', GMF11 yaitu 5'-GGAGGAGAACAAGTGCTGTGG-3', GMR11 yaitu 5'-CACCAGGTACTTTTCC TGCAC-3', GMF12 yaitu 5'-CCAAGCATC CAGGTT CTGAGG-3'

Ekspresi mRNA MAGE A1-12 dari sampel *forcep* biopsi yaitu MAGE A1-10 57.7%, MAGE A1-6 23.1%, MAGE A12 6.9%, MAGE A12 15.4%, MAGE A2, A3, dan A8 masing-masing 11.5%, MAGE A5 23.1%, MAGE A9 7.7%, dan MAGE A11 3.85%.

Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk mendeteksi ekspresi mRNA MAGE A1-12 dari sampel *core* biopsi dan *forcep* biopsi, sehingga masih perlu dilanjutkan untuk sampel dari hasil BAL. Selain itu juga bisa digunakan untuk mendeteksi ekspresi mRNA MAGE A1-12 pada jenis kanker yang lain, seperti kanker rongga mulut, kanker prostat, kanker payudara, kanker otak, dan jenis kanker yang lain.

Kata kunci: mRNA MAGE A, primer universal MAGE A1-12, deteksi dini kanker paru, RT PCR

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan berkah dan rahmatnya sehingga kegiatan penelitian yang berjudul: Perancangan Primer Universal Mage A-12 Untuk Identifikasi mRNA Mage A1-12 Dalam Upaya Mengembangkan Marker Deteksi Dini Kanker Paru, dapat terlaksana dengan baik dan masih akan berlanjut sesuai dengan tahapan penelitian. Kegiatan penelitian ini merupakan kegiatan tahun kedua dari rencana 3 tahun penelitian yang dibiayai oleh Direktorat Riset Dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset Dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, Dan Pendidikan Tinggi sesuai dengan Perjanjian Pendanaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Nomor: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018. Oleh karena itu kami mengucapkan terima kasih kepada pihak yang telah membantu pelaksanaan kegiatan penelitian ini ini, yaitu:

1. Direktorat Riset Dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset Dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, Dan Pendidikan Tinggi
2. Rektor Universitas Airlangga
3. Ketua dan staf LPI Universitas Airlangga
4. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
5. Ketua Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
6. Ketua dan staf Institute of Tropical Diseases Universitas Airlangga
7. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini

Kami menyadari bahwa dalam penyusunan laporan ini masih banyak kekurangan, sehingga kami menerima saran untuk menyempurnakan laporan ini. Akhir kata semoga kegiatan pengabdian kepada masyarakat ini dapat memberikan manfaat kepada kita semua.

Surabaya, November 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tinjauan tentang Kanker Paru	6
2.2 Tinjauan tentang MAGE.....	8
2.3 Hasil Penelitian Tahun Pertama	10
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	12
3.1 Tujuan Penelitian	12
3.1.1 Tujuan Umum	12
3.1.2 Tujuan Khusus	12
3.2 Manfaat Penelitian	13
3.2.1 Manfaat Teoris	13
3.2.2 Manfaat Praktis	13
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	14
4.1 Jenis Penelitian.....	14
4.2 Sampel Penelitian	14
4.3 Waktu dan Tempat Penelitian	14
4.4 Prosedur Penelitian.....	14
4.4.1 Tahun II	14
4.4.1.1 Identifikasi mRNA MAGE A1-12 Menggunakan Primer Universal MAGE A-12	14
4.4.1.2 Diagnosis dan Identifikasi Jenis Kanker Paru	15
4.4.2 Tahun III	15
4.5 Analisis Hasil Penelitian	15
4.6 Alur Penelitian.....	16
BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	18
5.1 Primer untuk Identifikasi MAGE A1-12	18
5.2 Pengumpulan Sampel dari Bahan Forcep Biopsi	18
5.3 Hasil PCR	20
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	19
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	27
DAFTAR PUSTAKA	28
Lampiran	31

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Pasangan primer untuk identifikasi mRNA MAHE A1-12	19
Tabel 5.2 Ekspresi MAGE A1-12 pada sampel bahan forcep biopsy kanker paru	21

DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.1. Hasil PCR identifikasi MAGE A1-10 dan MAGE A1-6	23
Gambar 5.2. Hasil PCR identifikasi individual MAGE A1, A2, dan A3.....	22
Gambar 5.3. Hasil PCR identifikasi individual MAGE A5, A8, dan A9.....	22
Gambar 5.4. Hasil PCR identifikasi individual MAGE A11 dan A12.....	23

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Draft Publikasi : A Molecular strategy for detecting the mRNA of MAGE A1-10 from core biopsy of lung cancer	31
Lampiran 2	Draft Publikasi : The Expression of MAGE A11 and A12 in lung cancer..	48

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker paru merupakan penyebab kematian pertama akibat kanker. Jumlah kasus kanker paru tahun 2012 sebanyak 1.825 juta yaitu 1.242 juta pada laki-laki dan 583 juta pada wanita. Angka kematian lebih 1.590 juta (sekitar 87%) (Ferlay *et al.*, 2015). Kanker paru di Amerika Serikat tahun diperkirakan terdapat 221.200 kasus kanker paru dan bronchial yaitu 115.610 kasus pada laki-laki dan 105.590 kasus pada wanita, dan terdapat 158.040 kematian (86.380 pada laki-laki dan 71.660 pada wanita) yang terjadi karena penyakit ini (Siegel R *Let al.*, 2015). Kejadian kanker paru di Indonesia merupakan insiden tersering kedua yaitu terdapat 25.322 kasus. Jumlah kematian 22.525 kasus yaitu 89% dari jumlah kasus (Ferlay J *et al.*, 2014). Diagnosis kanker paru meliputi pemeriksaan fisik yang kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan foto *rontgen* dadaran diperjelas dengan melakukan *computed tomography* (CT) *scan*. Pemeriksaan histopatologi diperlukan untuk menentukan jenis kanker paru berdasarkan klasifikasi histopatologi. Pemeriksaan ini berdasarkan pada perubahan sel dan struktur jaringan sehingga baru bisa mendeteksi kelainan setelah masa tumor berukuran besar dan mulai menimbulkan gejala. Saat ini diagnosis selalu terlambat karena penderita kanker paru biasanya memeriksakan diri ketika sudah muncul gejala, seperti batuk kronik, batuk darah, nyeri, dan lain lain. Gejala tersebut biasanya muncul saat kanker sudah mencapai stadium lanjut. Oleh karena itu prognosis kanker paru secara umum selalu buruk (PDPI, 2003). Diagnosis kanker paru biasanya pada stadium lanjut dan prognosis yang buruk dengan mortalitas masih tinggi sehingga masih diperlukan pengembangan deteksi dini kanker paru dengan menggunakan penanda molekuler yang spesifik untuk kanker. Hal tersebut menunjukkan masih diperlukan pengembangan metode diagnosis atau deteksi dini kanker paru.

Gen melanoma antigen (MAGE) MAGE disebut sebagai gen kanker testis antigen karena hanya diekspresikan pada sel kanker dan jaringan testis normal yaitu pada spermatid dan spermatogonia (De Plaen *et al.*, 1994; Van Baren N *et al.*, 1999, Jungbluth AA *et al.*, 2000, Luo G *et al.*, 2002). Sel somatik normal lain tidak mengekspresikan gen MAGE karena terjadi metilasi CpG pada regio promotor gen MAGE sehingga faktor transkripsi tidak bisa berikatan dengan *element promotor* yang menghasilkan hambatan ekspresi MAGE (*gene silent*). Gen MAGE menjadi aktif pada sel tumor sebagai hasil dari hipometilasi CpG pada 2 *element promotor* MAGE yaitu B' dan B yang terletak pada *up stream* -63 sampai dengan -46

sehingga faktor transkripsi Ets *binding* dengan *element promoter* B' dan B yang menyebabkan aktivasi transkripsi MAGE sehingga menghasilkan mRNA MAGE yang spesifik hanya tereksresi ketika sel mengalami transformasi menjadi sel kanker (De Smet C, *et al.* 1996; Xiao J, *et al.* 2005; Zhang J, *et al.*, 2004). Gen MAGE A diekspresikan pada banyak jaringan kanker. Gen MAGE A1 diekspresikan pada kanker lambung (Ries J, *et al.* 2005; Kim YM, *et al.* 2001; Chen XH, *et al.* 2004; Kong U, *et al.* 2004; Li J, *et al.* 1996), pada kanker *colorectal* (Li M, *et al.* 2005), *oral squamous carcinoma* (Chi SN, *et al.* 2002), kanker paru (Sakata M, 1996) dan kanker ginjal (Yamanaka K, *et al.* 1998). Gen MAGE A1, A2, A3, A4, A6, A10 dan A12 sering diekspresikan pada beberapa tumor seperti pada melanoma, *bladder carcinoma*, *non-small cell lung carcinoma*, *head and neck carcinoma*, *squamous cell carcinoma esophagus*, tetapi tidak diekspresikan pada jaringan normal kecuali pada testis (Van Baren N, *et al.* 1999). Sel kanker paru, baik pada *small cell lung cancer* (SCLC) atau *non small cell lung cancer* (NSCLC), mengekspresikan molekul MAGE A (Sugita M, *et al.*, 2002; Tajima K, *et al.*, 2003; Tsai JR, *et al.*, 2007, Kim YD, *et al.*, 2012; Shin KC, *et al.*, 2012; Karimi S, *et al.*, 2012). Gen MAGE A diekspresikan pada sel kanker NSCLC dan sel di sekeliling jaringan kanker yang secara histopatologi tampak normal (Karimi S, *et al.*, 2012). Sel epitel bronchial dari perokok juga mengekspresikan salah satu gen MAGE A (Jang SJ, *et al.*, 2001). Aktivasi transkripsi gen MAGE A menghasilkan mRNA MAGE A dapat diidentifikasi dengan teknik *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT PCR). Hal ini menunjukkan bahwa mRNA MAGE A dapat berguna untuk deteksi dini kanker paru dan juga untuk skrining kanker paru. Ekspresi gen MAGE A berpotensi sebagai *marker* molekuler untuk pengembangan *marker* deteksi dini kanker paru.

Gen MAGE A terdapat 12 variant yaitu MAGE A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12. Ekspresi gen MAGE A pada kanker paru dapat dideteksi dengan menggunakan primer universal MAGE A yaitu mampu mendeteksi MAGE A variant A1, A2, A3, A4, A5, A6 dengan teknik *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT PCR) *nested* PCR. Produk yang dihasilkan yaitu 831-855 *base pair* (bp) pada PCR *first round* PCR dan 469-493 bp pada *second round* PCR yang kedua (Park JW, *et al.*, 2002, Jheon S, *et al.*, 2004, Kim HR, *et al.*, 2009, Shin KC *et al.*, 2012). Penelitian Karimi S, *et al.*, (2012) dengan teknik RT PCR menunjukkan bahwa paling sedikit satu gen MAGE A variant A1, A2, A3/6, A4, atau A12 dapat ditemukan pada kanker paru jenis *squamous cell carcinoma* dan *adenocarcinoma*. Ekspresi gen ini bisa satu gen atau terjadi koekspresi yang artinya lebih dari satu variant gen MAGE A mengalami aktivasi transkripsi pada satu penderita kanker paru. Demikian juga dengan hasil penelitian lain yaitu mendeteksi 32 gen MAGE menunjukkan

bahwa MAGE A paling sering diekspresikan pada kanker paru secara berurutan yaitu MAGE A2, A7, A11, H1, B6, dan B2. Gen MAGE yang paling diekspresikan pada jenis *adenocarcinoma* paru secara berurutan yaitu A2, A7, A11, B6, D2, H1, sedangkan pada jenis *squamous cell carcinoma* secara berurutan yaitu A2, A8, A7, B2, A4, A11 (Tsai JR, *et al.*, 2007). Ekspresi MAGE A1, A3, A6, A12, 4b juga ditemukan pada *NCSLC* dan *SCLC* (Sugita et al, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa selain MAGE A1-6, juga masih ada variant MAGE A lain yaitu MAGE A7, A8, A9, A10, A11, A12, yang juga diekspresikan pada kanker paru, baik jenis *NSCLC* atau *SCLC*. Hal ini menjadi penting jika ekspresi MAGE A ini digunakan sebagai *marker* diagnosis atau deteksi dini. Semakin banyak variant gen MAGE A yang dapat diidentifikasi maka diagnosis bisa dilakukan lebih dini sehingga memberikan dampak prognosis yang lebih bagus. Primer universal yang ada saat ini hanya mampu mendeteksi ekspresi gen MAGE variant A1 sampai A6, padahal variant lain gen MAGE yaitu variant A7, A8, A9, A10, A11, A12 juga banyak diekspresikan pada beberapa jenis kanker, termasuk kanker paru. Oleh karena itu diperlukan perancangan primer universal yang mampu mengidentifikasi ekspresi gen MAGE A variant A1 sampai A12 pada kanker paru.

Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian eksplorasi laboratorik yang bertujuan untuk mendapatkan primer universal MAGE A1-12 untuk identifikasi mRNA MAGE A1-12 dari bahan core biopsi, forcep biopsi, *broncho alveolar lavage* (BAL) jaringan paru dalam upaya mengembangkan marker deteksi dini kanker paru. Bahan hasil core biopsi dan forcep ini merupakan masa jaringan kecil atau spesimen kecil, dimana bahan core biopsi mewakili kanker paru dengan lokasi di perifer dan bahan forcep biopsi mewakili kanker paru dengan lokasi di central. Bahan BAL mewakili sel epitel yang paru yang lepas dari jaringan dengan jumlah sel yang sangat sedikit. Tahun II dilakukan identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 dan diagnosis histopatologi pada bahan hasil forcep biopsi jaringan paru, kemudian dilakukan analisis perbandingan hasil pemeriksaan histopatologi dengan RT PCR mRNA MAGE A1-12. Tahun III dilakukan identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 dan diagnosis sitopatologi pada bahan hasil BAL dari jaringan paru, kemudian dilakukan analisis perbandingan hasil pemeriksaan sitopatologi dengan RT PCR mRNA MAGE A1-12. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai marker untuk deteksi dini kanker paru sehingga dapat menurunkan angka mortalitas akibat kanker paru.

Sesuai dengan target capaian Universitas Airlangga dalam peridode 2016-2020, dengan tema riset unggulan Kanker dan Autoimun, maka luaran penelitian ini adalah publikasi pada jurnal internasional bereputasi. Selama ini penelitian tentang deteksi ekspresi

MAGE A yang dipublikasi pada jurnal ilmiah internasional adalah hanya tentang deteksi MAGE A1-6. Gen MAGE A memiliki 12 famili yaitu MAGE A1 sampai MAGE A12. Deteksi ekspresi Gen MAGE sekaligus untuk MAGE A1 sampai MAGE A12 belum ditemukan. Untuk kepentingan diagnosis dan pengembangan marker deteksi dini, maka diperlukan kemampuan untuk mendeteksi ekspresi MAGE A1 sampai A12 sekaligus. Hasil penelitian ini pada tahun pertama baru menemukan deteksi ekspresi Gen MAGE A1 sampai 10, untuk A11 dan A12 tidak bisa dilakukan sekaligus dalam satu primer karena gen MAGE A11 dan A12 memiliki keragaman yang berbeda.

Hasil penelitian ini memiliki keunggulan dibanding hasil penelitian yang telah dipublikasi di jurnal internasional sebelumnya. Penelitian sebelumnya hanya bisa mendeteksi ekspresi MAGE A1 sampai A6, sedangkan hasil penelitian ini mampu mendeteksi MAGE A1 sampai 10. Untuk mendeteksi MAGE A11 dan A12, telah dilakukan design primer dengan kondisi PCR yang sama dengan primer MAGE A1 sampai A10 sehingga masih bisa dilakukan sekaligus dalam satu mesin PCR yang sama dan waktu bersamaan. Ekspresi gen MAGE A kadang diekspresi salah satu Gen MAGE A1 sampai A12, kadang juga bersamaan yaitu MAGE A1 dengan MAGE A yang lain. Jika menggunakan biomarker deteksi MAGE A1 sampai A6 saja kadang A8, A9, juga A10 juga diekspresikan sementara MAGE A1-6 tidak diekspresikan sehingga bisa menghasilkan negatif palsu, sehingga jika menggunakan primer hasil design pada penelitian ini, dapat mendeteksi ekspresi Gen MAGE yang lebih banyak sehingga hasil negatif palsu dapat dihindarkan dan hasil diagnosis menjadi lebih akurat.

Hasil penelitian dapat dipublikasi pada jurnal internasional bereputasi. Tahap pertama penelitian ini adalah menggunakan primer hasil design baru untuk mendeteksi kanker paru, baik dari jaringan hasil core biopsi yang mewakili kanker paru perifer, jaringan hasil forcep biopsi yang mewakili kanker paru sentral, dan sel yang lepas dari jaringan kanker paru hasil BAL. Tahap kedua dari penelitian ini menggunakan primer hasil design untuk mendeteksi ekspresi gen MAGE A1-10 pada kanker yang lain yaitu kanker prostat, kanker liver, kanker payudara, dan kanker lainnya. Selanjutnya dalam jangka panjang, hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai marker deteksi dini kanker.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah tahun II penelitian ini adalah

1. Bagaimanakah data identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 pada bahan hasil forcep biopsi jaringan paru?

2. Bagaimanakah hasil diagnosis dan identifikasi jenis kanker paru dengan pemeriksaan histopatologi pada bahan hasil forcep biopsi jaringan paru?
3. Bagaimanakah hasil analisis pemeriksaan histopatologi dibandingkan dengan data identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 pada bahan hasil forcep biopsi jaringan paru?

Rumusan masalah tahun III penelitian ini adalah

1. Bagaimanakah data identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 dari bahan *broncho alveolar lavage* (BAL) jaringan paru.
2. Bagaimanakah hasil diagnosis dan identifikasi jenis kanker paru dengan pemeriksaan sitopatologi dari bahan *broncho alveolar lavage* (BAL) jaringan paru.
3. Bagaimanakah hasil analisis pemeriksaan sitopatologi dibandingkan dengan data identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 dari bahan *broncho alveolar lavage* (BAL) jaringan paru.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Kanker Paru

Insiden kanker paru di dunia merupakan insiden terbanyak ketiga setelah kanker payudara dan kanker prostat, namun merupakan penyebab kematian pertama akibat kanker. Kasus kanker paru pada laki-laki merupakan kanker terbanyak dan pada wanita merupakan kanker keempat setelah kanker payudara, kolorektum, dan kanker serviks. Jumlah kasus kanker paru tahun 2012 yaitu 1.825 juta (1.242 juta pada laki-laki dan 583 juta pada wanita) dengan angka kematian 1.590 juta (Ferlay *et al.*, 2015). Tahun 2015 di Amerika Serikat, kanker paru merupakan kanker kedua pada laki-laki setelah kanker prostat dan kanker kedua pada wanita setelah kanker payudara. Diperkirakan terdapat 221.200 kasus kanker paru dan bronchial yaitu 115.610 kasus pada laki-laki dan 105.590 kasus pada wanita, dan terdapat 158.040 kematian (86.380 pada laki-laki dan 71.660 pada wanita) yang terjadi karena penyakit ini (Siegel RL *et al.*, 2015). Insiden kanker paru di Indonesia merupakan insiden tersering kedua setelah kanker payudara, terdapat 25.322 kasus dan jumlah kematian 22.525 (89%) (Ferlay J *et al.*, 2014).

Kanker paru adalah salah satu jenis penyakit paru yang memerlukan penanganan dan tindakan yang cepat dan terarah. Penegakan diagnosis penyakit ini membutuhkan ketrampilan dan sarana yang tidak sederhana dan memerlukan pendekatan multidisiplin kedokteran. Penyakit ini membutuhkan kerja samayang erat dan terpadu antara ahli paru dengan ahli radiologi diagnostik, ahli patologi anatomi, ahliradiologi terapi dan ahli bedah toraks, ahli rehabilitasi medik dan ahli-ahli lainnya. Pengobatan ataupunatalaksanaan penyakit ini sangat bergantung pada kecekatan ahli paru untuk mendapatkan diagnosis pasti. Penemuan kanker paru pada stadium dini akan sangat membantu penderita, dan penemuandiagnosis dalam waktu yang lebih cepat memungkinkan penderita memperoleh kualitas hidup yang lebih baik dalam perjalanan penyakitnya meskipun tidak dapat menyembuhkannya. Pilihan terapi harus dapat segera dilakukan, mengingat buruknya respons kanker paru terhadap berbagai jenis pengobatan. Bahkan dalam beberapa kasus penderita kanker paru membutuhkan penanganan sesegera mungkin meski diagnosis pasti belum dapat ditegakkan. Kanker paru dalam arti luas adalah semua penyakit keganasan di paru, mencakup keganasan yang berasal dari paru sendiri maupun keganasan dari luar paru (metastasis tumor di paru). Dalam pedoman penatalaksanaan ini yang dimaksud dengan kanker paru ialah kanker paru *primer*, yakni tumor ganas yang berasal dari epitel bronkus atau karsinomabronkus (bronchogenic

carcinoma). Menurut konsep masa kini kanker adalah penyakit gen. Sebuah sel normal dapat menjadi sel kanker apabila oleh berbagai sebab terjadi ketidak seimbangan antara fungsi onkogen dengan gen tumor suppressor dalam proses tumbuh dan kembangnya sebuah sel. Perubahan atau mutasi gen yang menyebabkan terjadinya hipereksresi onkogen dan/atau kurang/hilangnya fungsi gen tumor suppressor menyebabkan sel tumbuh dan berkembang tak terkendali. Perubahan ini berjalan dalam beberapa tahap atau yang dikenal dengan proses *multistep carcinogenesis*. Perubahan pada kromosom, misalnya hilangnya heterogenitas kromosom atau LOH juga diduga sebagai mekanisme tidak normal pertumbuhan sel pada sel kanker. Dari berbagai penelitian telah dapat dikenal beberapa onkogen yang berperan dalam proses karsinogenesis kanker paru, antara lain gen myc, gen ras sedangkan kelompok gen tumor suppressor antara lain, gen p53, gen rb. Sedangkan perubahan kromosom pada lokasi 1p, 3p dan 9p sering ditemukan pada sel kanker paru (Anonim, 2003).

Penderita kanker paru biasanya memeriksakan diri ketika sudah muncul gejala, seperti batuk kronik, batuk darah, nyeri, penurunan berat badan, dan gejala lain yang biasa ditemukan pada penyakit paru. Data anamnesis berupa batuk kronik, batuk darah, sesak nafas, sakit dada, sulit menelan, benjolan di pangkal leher, sembab muka dan leher, kadang disertai gejala atau keluhan nyeri yang hebat, dan penurunan berat badan. Tidak jarang yang pertama terlihat adalah gejala atau keluhan akibat metastasis di luar paru, seperti kelainan yang timbul karena kompresi hebat di otak, pembesaran hepar atau patah tulang kaki. Gejala dan keluhan yang tidak khas seperti berat badan berkurang, nafsu makan hilang, demam hilang timbul, sindrom paraneoplastik. Pemeriksaan fisik untuk melakukan diagnosis kanker paru harus dilakukan secara menyeluruh dan teliti karena hasil yang didapat sangat bergantung pada kelainan saat pemeriksaan dilakukan. Tumor paru yang berukuran kecil dan terletak di perifer dapat memberikan gambaran normal pada pemeriksaan. Tumor dengan ukuran besar, terlebih bila disertai atelektasis sebagai akibat kompresi bronkus, efusi pleura atau penekanan vena kava akan memberikan hasil yang lebih informatif. Metastasis ke organ lain juga dapat dideteksi dengan perabaan hepar, pemeriksaan funduskopi untuk mendeteksi peninggian tekanan intrakranial dan terjadinya fraktur sebagai akibat metastasis ke tulang (PDPI, 2003). Setelah dilakukan pemeriksaan fisik maka perlu dilakukan pemeriksaan foto rontgen dada untuk mengetahui masa yang terdapat pada paru, pelebaran mediastinum, atelektasis, konsolidasi atau pneumonia atau efusi pleura. Diagnosis diperjelas dengan melakukan *computed tomography (CT) scan*. Pemeriksaan histopatologi diperlukan untuk menentukan jenis kanker paru berdasarkan klasifikasi histopatologi. Beberapa pemeriksaan tersebut baru bisa dilakukan setelah penderita memeriksakan diri. Penemuan dini penyakit

berdasarkan keluhan jarang ditemukan karena keluhan ringan yang muncul tersebut biasanya sudah mencapai stage II dan III. Oleh karena itu prognosis kanker paru secara umum selalu buruk dan penderita meninggal.

Kanker paru secara nyata baru terdeteksi pada stadium akhir dan mempengaruhi kelangsungan hidup penderita. Hambatan untuk mendeteksi awal yaitu lokasi tumor tidak terdeteksi. Beberapa pendekatan dilakukan untuk mendeteksi dini kanker paru, salah satunya yaitu pendekatan dengan memanfaatkan sifat biologis sel kanker. Berdasarkan sifat biologis dari sel kanker dapat dilakukan untuk mengidentifikasi kanker sebelum muncul gejala. Molekul unik yang diekspresikan atau yang diekspresikan pada kadar yang tinggi dibandingkan pada sel normal mungkin dapat berguna sebagai *biomarker* kanker paru (Sugita M 2002).

Small cell lung cancer (SCLC) terdapat pada sekitar 10 - 15% dari semua kanker paru. Ukuran sel kanker terlihat kecil dengan mikroskop. Nama lain untuk SCLC adalah oat sel kanker atau karsinoma sel gandum. Kanker ini jarang terjadi pada orang yang belum pernah merokok. SCLC sering dimulai di bronkus dekat pusat dada, dan cenderung menyebar secara luas. Non small cell lung cancer (NSCLC) terdapat sekitar 85 - 90% dari kasus kanker paru. Ada 3 subtype utama dari NSCLC yaitu squamous cell carcinoma (SCC) yaitu 25 -30%, adenocarcinoma yaitu 40%, dan large cell carcinoma yaitu 10-15%. Penatalaksanaan yaitu pendekatan pengobatan dan prognosis untuk ketiga kelompok kanker paru ini hampir sama.

2.2 Tinjauan tentang MAGE

Gen melanoma antigen (MAGE) termasuk gen kanker testis yang diekspresikan hanya pada sel kanker dan testis normal yaitu pada spermatid dan spermatogonia sehingga disebut dengan istilah gen kanker-testis untuk gen pengkode dan antigen kanker-testis untuk antigen (De Plaen *et al.*, 1994; van Baren N *et al.*, 1999, Jungbluth AA *et al.*, 2000, Luo G *et al.*, 2002). Gen kanker testis pertama kali diisolasi dari melanoma. Gen ini dikenal sebagai gen melanoma antigen (MAGE) (Kumar V, *et al.* 2005).

Saat ini telah ditemukan beberapa gen kanker testis seperti Superfamily MAGE, family SSX, GAGE, BAGE, SCP-1, NY-ESO-1, CTp11, dan HCA587 (Zhao L., *et al.*, 2004). Famili gen MAGE terdiri dari 17 gen yang dikategorikan menjadi tiga kelompok yaitu MAGE-A, MAGE-B, dan MAGE-C. MAGE-A beranggotakan 12 gen, termasuk MAGE-1 (yang juga dikenal dengan MAGE-A1) terletak pada regio Xq28. MAGE-B terdiri dari 4 gen yang terletak pada regio Xp21.3 dan MAGE-C1 baru dikenal terletak pada pita Xq26 (Kim YM, *et al.* 2001 dan Chen H, *et al.* 2000).

Gen kanker testis mempunyai beberapa kekhususan yaitu 1) terutama hanya diekspresikan oleh jaringan tumor tetapi tidak diekspresikan pada jaringan normal kecuali pada testis (Van Der Bruggen P, *et al.* 1991; Van Baren N, *et al.* 1999; Chen H, *et al.* 2000; Xiao J, *et al.* 2005; Lv J, *et al.* 2002). 2) gen yang mengkode antigen kanker testis terletak pada kromosom X sehingga ekspresi gen tersebut tidak tergantung pada jenis kelamin penderita (Zhao L, *et al.* 2004; Chen H, *et al.* 2000). mRNA MAGE-1 terdiri dari 1722, yang meliputi exon 1, 2, dan 3. Area koding (*CoDing Sequence/ CDS*) terletak pada exon 3 yaitu pada nukleotida 188 sampai 1117 mensintesis 309 asam amino (Strusberg RL, *et al.*, 2002).

Gen MAGE-1 menjadi aktif pada sel tumor sebagai hasil dari hipometilasi CpG dinukleotida. Mekanisme aktivasi gen MAGE-1 yaitu melalui proses hipometilasi pada 2 *element promoter* MAGE-1 yaitu B' dan B yang terletak pada *up stream* -63 sampai dengan -46. Dua *element promoter* MAGE-1 ini mempunyai sisi *binding* dengan faktor transkripsi Ets. CpG mengalami hipometilasi pada kultur sel tumor yang mengekspresikan MAGE-1, tetapi mengalami metilasi pada sel normal dan kultur sel tumor yang tidak mengekspresikan MAGE-1. Metilasi pada CpG menghambat *binding* faktor transkripsi dengan *element promotor* yang menghasilkan hambatan ekspresi MAGE-1 (*gene silent*). Hipometilasi CpG pada kultur sel yang mengekspresikan MAGE-1 menyebabkan faktor transkripsi Ets *binding* dengan *element promoter* B' dan B yang menyebabkan aktivasi transkripsi MAGE-1 (De Smet C, *et al.* 1996; 1999; 2004; Xiao J, *et al.* 2005; Zhang J, *et al.*, 2004) yang menghasilkan mRNA MAGE-1. Ekspresi MAGE-1 pada sel non tumor dapat diinduksi secara eksperimental dengan menggunakan *agent* yang bisa menyebabkan demetilasi DNA yaitu 5-aza-2'-deoxycytidine. Ini menunjukkan bahwa demetilasi pada CpG merupakan mekanisme umum yang menyebabkan ekspresi MAGE-1 (Van Baren N, *et al.* 1999).

Protein MAGE-1 terletak di sitoplasma kemudian sebagian ditranslokasi ke nukleus sel untuk mencegah transkripsi sehingga menghambat ekspresi gen. Sebagian disekresikan sebagai antigen bersama dengan MHC kelas I dan II (Laduron S, *et al.* 2004).

MAGE-1 menghambat ikatan SKIP dengan Notch1 untuk menekan transkripsi secara aktif dengan cara berikatan dengan *Ski Interacting Protein* (SKIP) melalui bagian C *terminal*. Hambatan interaksi SKIP dan Notch1 ini membutuhkan interaksi antara MAGE-1 dengan SKIP. MAGE-1 *binding* dan *recruiting histon deacetylase 1* (HDAC1) sehingga transkripsi tidak terjadi. Jadi peran MAGE-1 dalam menekan transkripsi gen yaitu dengan *binding* dengan SKIP dan *recruiting* HDAC1 (De Plaen, *et al.*, 2002; Laduron S, *et al.*, 2004).

Protein MAGE-1 mengandung peptida epitop yang dapat *binding* dengan tipe haploid HLA I termasuk molekul HLA-A1, B3701, A2.1, A3.2, Cw*1601, dan A24. Peptida yang binding dengan molekul HLA-A1, B3701, Cw*1601, dan A24 tampak diproses dan dipresentasikan pada permukaan sel sehingga dapat digunakan sebagai target potensial untuk imunoterapi spesifik (Chen H, *et al.* 2000). Kombinasi peptida antigen kanker testis dan *Human Leukosit Antigen* (HLA) ketika dipresentasikan oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) terhadap sel T citotoksik (CTL) mampu memicu respons imun seluler pada penderita kanker (Zhao L, *et al.* 2004).

Gen MAGE-A1, A2, A3, A4, A6, A10 dan A12 sering diekspresikan pada beberapa tumor seperti pada melanoma, *bladder carcinoma*, *non-small cell lung carcinoma*, *head and neck carcinoma*, *squamous cell carcinoma esophagus*, tetapi tidak diekspresikan pada jaringan normal kecuali pada testis (Van Baren N, *et al.* 1999). Gen MAGE-1 diekspresikan pada kanker lambung (Ries J, *et al.* 2005; Kim YM, *et al.* 2001; Chen XH, *et al.* 2004; Kong U, *et al.* 2004; Li J, *et al.* 1996), pada kanker colorectal (Li M, *et al.* 2005), oral squamous carcinoma (Chi SN, *et al.* 2002), kanker paru (Sakata M, 1996) dan kanker ginjal (Yamanaka K, *et al.* 1998).

2.3 Hasil Penelitian Tahun Pertama

Primer baru hasil perancangan pada penelitian ini yaitu primer universal MAGE A1-10 yang terdiri dari primer F10/R10 untuk first round PCR yang menghasilkan produk \pm 823-919bp dan F10/R12 untuk second round PCR dengan yang menghasilkan produk \pm 461-557bp. Primer untuk MAGE A11 yaitu F11/R11 untuk first round yang menghasilkan produk \pm 858bp dan F11/R12 untuk second round yang menghasilkan produk \pm 496bp. Primer untuk MAGE A12 yaitu F12/R10 untuk first round yang menghasilkan produk \pm 858 bp dan F12/R12 untuk second round yang menghasilkan produk \pm 496 bp. Sekuen F10 yaitu 5' GAAGAYCTGCCWGTGGGTC, R10 yaitu 5' CTCCAGGTASTTYTCCTGCAC, R12 yaitu 5' CCAGYATTTCTGCCTTTGTGA, F11 yaitu 5' GGAGGAGAACAAGTGCTGTGG, R11 yaitu 5' CACCAGGTACTTTTCCTGCAC, F12 yaitu 5' CCAAGCATC CAGGTTCTGAGG.

Master mix yang digunakan untuk PCR yaitu HotStar HiFidelity DNA Polymerase (Qyagen). Kondisi PCR yaitu 95⁰C 5 menit, 95⁰C 30 detik, 60⁰C 45 detik, 72⁰C 45 detik selama 30-40 siklus, final extension 72⁰C 10 menit. Hasil PCR digunakan untuk elektroforesis untuk mengetahui hasil positif atau negatif. Jumlah pasang basa produk PCR dapat diketahui dari Tabel 5.

Sampel dari core biopsi itu sangat sedikit yaitu sebesar benang rajut dengan panjang maksimal 1 cm sehingga dalam pelaksanaan penelitian perlu dilakukan seefisien mungkin. Ukuran sampel yang sangat kecil ini akan digunakan untuk PCR menggunakan pasangan primer untuk identifikasi MAGE A1-6, Mage Universal MAGE A1-10 hasil rancangan baru, MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE 6, MAGE A8, MAGE A9, dan MAGE A10.

Primer universal MAGE A1-10 setelah diujikan pada sampel jaringan testis menunjukkan pita sekitar 823-9191bp, sedangkan primer MMRP 1/MMRP2 menunjukkan pita sekitar 852bp. Uji optimasi selanjutnya yaitu uji dilusi total RNA. Kada total RNA yaitu 133,4 ng/ μ l. total RNA tersebut digunakan dilusi yaitu perbandingan 1:10, 1:100, 1:1000.

Ekspresi mRNA MAGE dari sampel core biosi yaitu dari 18 sampel, terdapat 12 sampel positif MAGE A1-10. Dari 18 sampel, terdapat 2 positif MAGE A1-6. Insiden kanker paru di dunia merupakan insiden terbanyak ketiga setelah kanker payudara dan kanker prostat, namun merupakan penyebab kematian pertama akibat kanker. Kasus kanker paru pada laki-laki merupakan kanker terbanyak dan pada wanita merupakan kanker keempat setelah kanker payudara, kolorektum, dan kanker serviks. Jumlah kasus kanker paru tahun 2012 yaitu 1.825 juta (1.242 juta pada laki-laki dan 583 juta pada wanita) dengan angka kematian 1.590 juta (Ferlay *et al.*, 2015). Tahun 2015 di Amerika Serikat, kanker paru merupakan kanker kedua pada laki-laki setelah kanker prostat dan kanker kedua pada wanita setelah kanker payudara. Diperkirakan terdapat 221.200 kasus kanker paru dan bronchial yaitu 115.610 kasus pada laki-laki dan 105.590 kasus pada wanita, dan terdapat 158.040 kematian (86.380 pada laki-laki dan 71.660 pada wanita) yang terjadi karena penyakit ini (Siegel RL *et al.*, 2015). Insiden kanker paru di Indonesia merupakan insiden tersering kedua setelah kanker payudara, terdapat 25.322 kasus dan jumlah kematian 22.525 (89%) (Ferlay J *et al.*, 2014).

BAB 2

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1 Tujuan Penelitian

2.1.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah mendapatkan primer universal MAGE A1-12 untuk identifikasi mRNA MAGE A1-12 dari bahan core biopsi, forcep biopsi, dan *broncho alveolar lavage* (BAL) jaringan paru dalam upaya mengembangkan marker deteksi dini kanker paru.

Tujuan Umum Tahun II penelitian ini adalah identifikasi mRNA MAGE A1-12 dari bahan forcep biopsi jaringan paru menggunakan primer universal MAGE A1-12 dalam upaya mengembangkan marker deteksi dini kanker paru.

Tujuan Umum Tahun III penelitian ini adalah identifikasi mRNA MAGE A1-12 dari bahan *broncho alveolar lavage* (BAL) jaringan paru dalam upaya mengembangkan marker deteksi dini kanker paru.

2.1.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus tahun II penelitian ini adalah

1. Mendapatkan data identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 pada bahan hasil forcep biopsi jaringan paru.
2. Diagnosis dan identifikasi jenis kanker paru dengan pemeriksaan histopatologi pada bahan hasil forcep biopsi jaringan paru.
3. Analisis hasil pemeriksaan histopatologi dibandingkan dengan hasil identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 pada bahan hasil forcep biopsi jaringan paru.

Tujuan khusus tahun III penelitian ini adalah

1. Mendapatkan data identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 dari bahan *broncho alveolar lavage* (BAL) jaringan paru.
2. Diagnosis dan identifikasi jenis kanker paru dengan pemeriksaan sitopatologi dari bahan *broncho alveolar lavage* (BAL) jaringan paru.
3. Analisis hasil pemeriksaan sitopatologi dibandingkan dengan hasil identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 dari bahan *broncho alveolar lavage* (BAL) jaringan paru.

2.2 Manfaat Penelitian

2.2.1 Manfaat Teoritis

Manfaat penelitian ini bagi perkembangan Ilmu Patologi Molekuler adalah memberikan informasi tentang primer universal MAGE A1-12 untuk identifikasi mRNA MAGE A1-12 yang dapat diaplikasikan pada bahan core biopsi yang mewakili kanker paru dengan lokasi di perifer, bahan forcep biopsi yang mewakili kanker paru dengan lokasi di central, dan bahan BAL yang mewakili sel kanker yang lepas dalam upaya mengembangkan marker deteksi dini kanker paru. Hasil penelitian ini dapat dipublikasi pada jurnal ilmiah nasional terakreditasi dan pada tahun terakhir penelitian akan dipublikasikan pada jurnal ilmiah internasional

2.2.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah menghasilkan primer universal MAGE A1-12 yang dapat digunakan untuk identifikasi mRNA MAGE A1-12 dari bahan core biopsi, forcep biopsi, dan BAL jaringan paru dari penderita kanker paru atau suspect kanker paru. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai marker untuk deteksi dini kanker paru sehingga dapat menurunkan angka mortalitas akibat kanker paru.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi laboratorik yang bertujuan untuk mendapatkan primer universal MAGE A1-12 untuk identifikasi mRNA MAGE A1-12 dari bahan core biopsi, forcep biopsi, dan BAL jaringan paru dalam upaya mengembangkan marker deteksi dini kanker paru.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada tahun II yaitu jaringan paru dari nodul suspect kanker paru hasil forcep biopsi. Tahun III yaitu sel epitel paru dari hasil BAL pada pasien suspect kanker paru.

4.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Instalasi Paru dan Patologi Anatomi RSUD Dr Soetomo Surabaya dan Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga. Penelitian dilakukan selama 3 (tiga) tahun dan masing – masing tahun anggaran dilakukan selama 6 (enam) bulan. Penelitian dilakukan setelah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik RSUD. Dr Soetomo Surabaya.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Tahun II

Hal yang dilakukan pada penelitian tahun II yaitu identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 dan diagnosis histopatologi pada bahan hasil forcep biopsi jaringan paru, kemudian dilakukan analisis perbandingan hasil pemeriksaan histopatologi dengan RT PCR mRNA MAGE A1-12. Prosedur yang dilakukan pada penelitian ini sama dengan prosedur pada tahun I.

4.4.1.1 Identifikasi mRNA MAGE A1-12 Menggunakan Primer Universal MAGE A1-12

Identifikasi mRNA MAGE A1-12 dilakukan menggunakan primer universal MAGE A1-12 pada jaringan kanker paru dengan specimen jaringan kecil dari hasil forcep biopsi kanker paru. Kontrol positif yaitu jaringan testis normal dan kontrol jumlah mRNA yang terdapat pada sampel yaitu konsentrasi RNA gen *housekeeping* (gen betha aktin atau gen

GADPH). Deteksi ekspresi gen MAGE A pada tahap ini dilakukan menggunakan teknik *Reverse Transcription PCR* (RT PCR).

Sampel dikumpulkan dengan teknik *constitutive sampling* yaitu semua penderita kanker tersebut selama 6 bulan waktu penelitiandigunakan untuk penelitian.Sampel kanker paru dari forcep biopsi digunakan pada penelitian ini.Sampel forcep biopsi dibagi menjadi dua bagian yaitu satu bagian dimasukkan ke dalam tabung berisi buffer formalin 10%, kemudian diposes untuk menjadi slide HE dan digunakan untuk diagnosis histopatologi. Satu bagian forcep biopsi dimasukkan ke dalam tube yang berisi guanidine isotiocyanate, kemudian segera dikirim ke laboratorium tempat pemeriksaan ekspresi gen MAGE A dan disimpan di suhu minus 70⁰C sampai digunakan untuk ekstraksi RNA

Proses ekstraksi RNA sampai RT PCR dilakukan menggunakan metode hasil penelitian pada tahap sebelumnya. RNA diekstraksi dari jaringan kanker, kemudian dilakukan sintesis cDNA dan *Reverse Transcription PCR*.Hasil PCR dielektroforesis dan didokumentasikan.Data yang terkumpul dianalisis secara statistikdan analisis bioinformatika, kemudian ditampilkan dalam bentuk gambar, grafik, dan tabel.

4.4.1.2 Diagnosis dan Identifikasi Jenis Kanker Paru

Diagnosis dan identifikasi jenis kanker paru dengan pemeriksaan histopatologi pada sampel hasil core biopsy dilakukan oleh Dokter spesialis Patologi Anatomi.Hasil core biopsy dimasukkan dalam tabung berisi buffer formalin 10%, kemudian diposes untuk menjadi slide HE dan digunakan untuk diagnosis histopatologi.Hasil pemeriksaan histopatologi dibandingkan dengan hasil identifikasi mRNA MAGE A1-12 menggunakan primer universal MAGE A1-12 untuk mengetahui teknik yang lebih akurat untuk deteksi dini kanker paru.

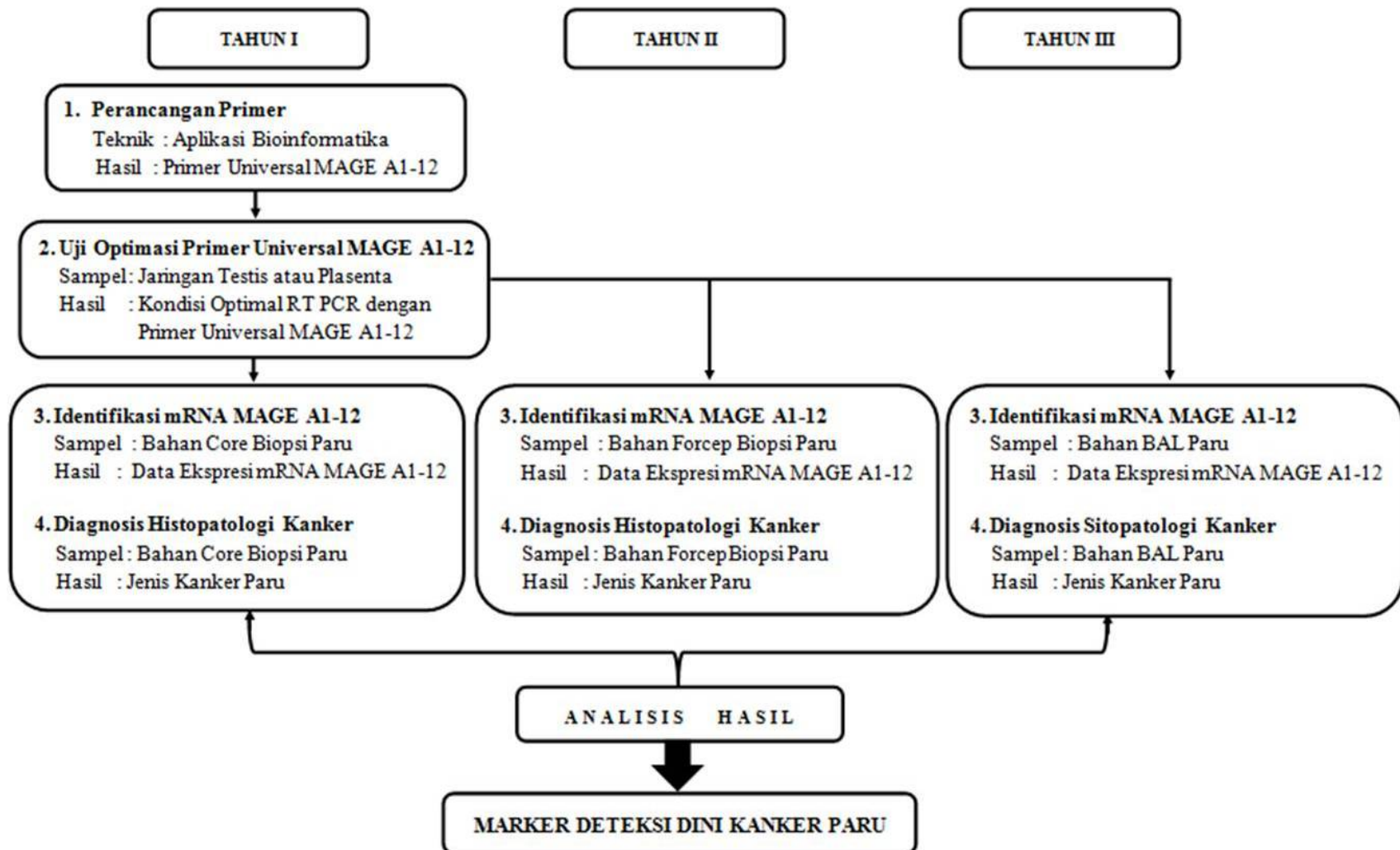
4.4.2 Tahun III

Hal yang dilakukan pada tahun III yaitu identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 dan diagnosis sitopatologi pada bahan hasil BAL paru, kemudian dilakukan analisis perbandingan hasil pemeriksaan sitopatologi dengan RT PCR mRNA MAGE A1-12. Prosedur yang dilakukan pada penelitian ini sama dengan prosedur pada tahun I.

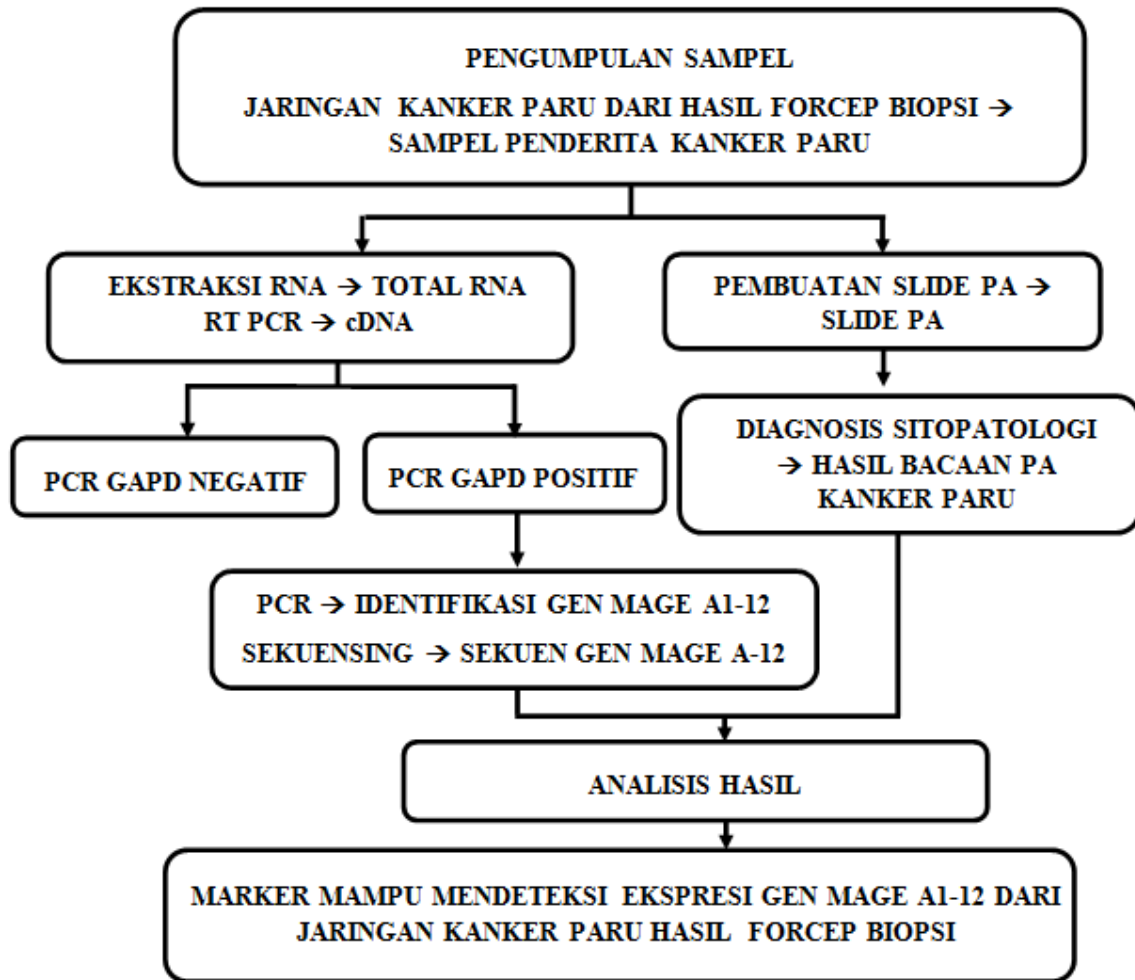
4.5 Analisis Hasil Penelitian

Data yang terkumpul dianalisis secara statistik dan analisis bioinformatika, kemudian ditampilkan dalam bentuk gambar, grafik, dan tabel.

3.6 Alur Penelitian



Alur Penelitian Tahun II



BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG ICAPAI

5.1 Primer untuk identifikasi MAGE A1-12

Tujuan Umum Tahun II penelitian ini adalah identifikasi mRNA MAGE A1-12 dari bahan forcep biopsi jaringan paru menggunakan primer universal MAGE A1-12 dalam upaya mengembangkan marker deteksi dini kanker paru.

Penelitian ini menggunakan 18 pasang primer. Pertama dilakukan PCR untuk mengetahui kuantitas sampel bahan forcep biopsi dengan melakukan PCR menggunakan primer GAPD. Hasil negatif berarti sampel kurang berkualitas untuk digunakan PCR karena jumlah sel dalam sampel terlalu sedikit sehingga sampel dengan hasil negatif ini tidak didiskualifikasi. Hasil positif menunjukkan bahwa sampel cukup berkualitas untuk digunakan PCR sehingga sampel ini dilanjutkan untuk PCR dengan primer selanjutnya. PCR kedua yaitu untuk identifikasi ekspresi gen MAGE A1-10 dan MAGE A1-6, serta MAGE A11 dan MAGE A12 dengan cara nested PCR. pPCR selanjutnya yaitu PCR untuk identifikasi individual MAGE A untuk semua mRNA MAGE A yaitu MAGE A1, A2, A3, A4, A5, A6, A8, A9, A10 dengan menggunakan pasangan primer yang sesuai (Tabel 5.1).

5.2 Pengumpulan Sampel dari Bahan Forcep Biopsi

Sampel yang digunakan pada tahun II yaitu jaringan paru dari nodul suspect kanker paru hasil forcep biopsi. Hasil forcep biopsi kemudian digunakan untuk identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 dan identifikasi jenis kanker paru dengan pemeriksaan histopatologi. Sampel dari bahan forcep biopsi ini sangat kecil yaitu hanya berupa serpihan kecil jaringan yang sebagai masa kecil atau cairan berdarah. Saat ini sudah terkumpul 28 sampel jaringan paru hasil forcep biopsi. Namun terdapat 7 sampel yang menunjukkan cairan bening tanpa serpihan sel atau masa jaringan sehingga tidak bisa digunakan untuk penelitian ini. Selanjutnya dari 21 sampel yang ada digunakan untuk optimasi PCR dari sampel dari bahan forcep biopsi. Berdasarkan hasil kumpulan sampel forcep biopsi pertama ini, dijadikan sebagai dasar untuk proses pengambilan sampel berikutnya.

Table 5.1 Pasangan primer untuk identifikasi mRNA MAGE A1-12

No	Nama Gen	Sekuen	Produk PCR
1	GAPD	GAPD-F = 5'TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC GTA3' GAPD-R = 5'CAA ATG AGC CCC AGC CTT CTC CA3'	320bp
2	MAGE A1-10	F10:5' GAAGAYCTGCCWGTGGGTC R10: 5' CTCCAGGTASTTYTCCTGCAC	823-919 bp 1 ST Round
3	MAGE A1-10	F10:5' GAAGAYCTGCCWGTGGGTC R12: 5' CCAGYATTTCTGCCTTTGTGA	461-557 bp) 2 nd Round
4	MAGE A 1-6	MMRP1 5'-CTG AAG GAG AAG ATC TGC C-3' MMRP2: 5'-CTC CAG GTA GTT TTC CTG CAC-3'	852 bp 1st Round
5	MAGE A1-6	MMRP3: 5'-CTG AAG GAG AAG ATC TGC CWG TG-3' MMRP4: 5'-CCA GCA TTT CTG CCT TTG TGA-3'	469-490 bp 2nd Round
6	MAGE A1	M1: 5'-CGG AAC AAG GAC TCC AGG ATA CAA-3',	377bp
7	MAGE A2	M2: 5'-GAA AGA AGT CCT GGC AAT TTC TGA G-3'	523
8	MAGE A3	M-3: 5'-CCA AAG ACC AGC TGC AAG GAA CT-3'	569
9	MAGE A4	M-4: 5'-CGT CAA TGC CAA AGA TCA TCT TCA G-3'	580
10	MAGE A5	M-5: 5'-CCT TTG TGA CCA GCT CCT TGA CTT A-3'	478
11	MAGE A6	M-6: 5'-CCA GGC AGG TGG CAA AGA TGT ACA C-3'	628
12	MAGE A8	MAGE8 = 5'CAC TTT CTC ATC AAG TGC TTC CC3'	419 bp
13	MAGE A9	MAGE9 = 5'CCT TCA ATT TCA GTG CTT CTT GG3'	407 bp
14	MAGE A10	MAGE10 = 5'TGG GTA AAG ACT CAC TGT CTG G3'	464 bp
15	MAGE A11	F11: 5' GGAGGAGAACAAGTGCTGTGG R11: 5' CACCAGGTACTTTTCCTGCAC	858 bp 1 st Round
16	MAGE A11	F11: 5' GGAGGAGAACAAGTGCTGTGG R12: 5' CCAGYATTTCTGCCTTTGTGA	496 bp 2nd Round
17	MAGE A12	F12: 5' CCAAGCATCCAGGTTCTGAGG R10: 5' CTCCAGGTASTTYTCCTGCAC	858 bp 1st Round
18	MAGE A12	F12: 5' CCAAGCATCCAGGTTCTGAGG R12: 5' CCAGYATTTCTGCCTTTGTGA	496 bp 2nd Round

Bahan forcep biopsi ini digunakan untuk ekstraksi RNA yang menghaikan total RNA kemudian dilanjutkan dengan sintesis cDNA dengan RT PCR. cDNA yang terbentuk digunakan untuk PCR. Pertama dilakukan PCR dengan primer GAPD. Hasil GAPD positif yaitu terdapat 15 sampel dan 6 sampel negatif sehingga 6 sampel tersebut tidak bisa digunakan untuk proses PCR selanjutnya.

Sampel dengan hasil PCR GAPD positif digunakan untuk PCR selanjutnya yaitu menggunakan pasangan primer untuk identifikasi MAGE A1-6, Mage Universal MAGE A1-10 hasil rancangan baru, MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE 6, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, dan MAGE A12. Hasil PCR dari 15 sampel tersebut yaitu terdapat 3 sampel positif MAGE A1-10 yaitu sampel no 12, 17, 23. dan 3 sampel positif MAGE A1-6. yaitu 9, 12, 13. Setelah dilakukan PCR untuk mendeteksi MAGE individual yaitu ditemukan positif untuk MAGE A1, A2, A3, A5, A8, A11, A12.

Hasil PCR dari bahan forcep biopsi ini masih belum bisa digunakan sebagai data hasil penelitian, namun hanya bisa digunakan sebagai data optimasi PCR dari bahan forcep biopsi. Hal ini disebabkan karena sampel hanya berupa serpihan jaringan yang sangat kecil atau beberapa lapisan sel. Hasil ini digunakan sebagai tolok untuk mengukur jumlah jaringan yang bisa diambil dari bahan forcep biopsi dan keberhasilan PCR sehingga dilakukan pengambilan sampel baru.

Selanjutnya dikumpulkan 22 sampel dari bahan forcep biopsi. Sampel kemudian digunakan untuk ekstraksi RNA sehingga diperoleh total RNA, kemudian digunakan untuk sintesis cDNA dan dilanjutkan dengan PCR GAPD. Hasil PCR GAPD menunjukkan bahwa terdapat 3 sampel yang negatif sehingga terdapat 18 sampel untuk PCR selanjutnya.

Total pengumpulan sampel pada penelitian ini yaitu sebanyak 50 sampel, baik termasuk sampel dengan hasil GAPD negatif dan positif. Dari sampel tersebut dipilih sebanyak 30 sampel untuk digunakan PCR lanjutan dalam kegiatan penelitian ini..

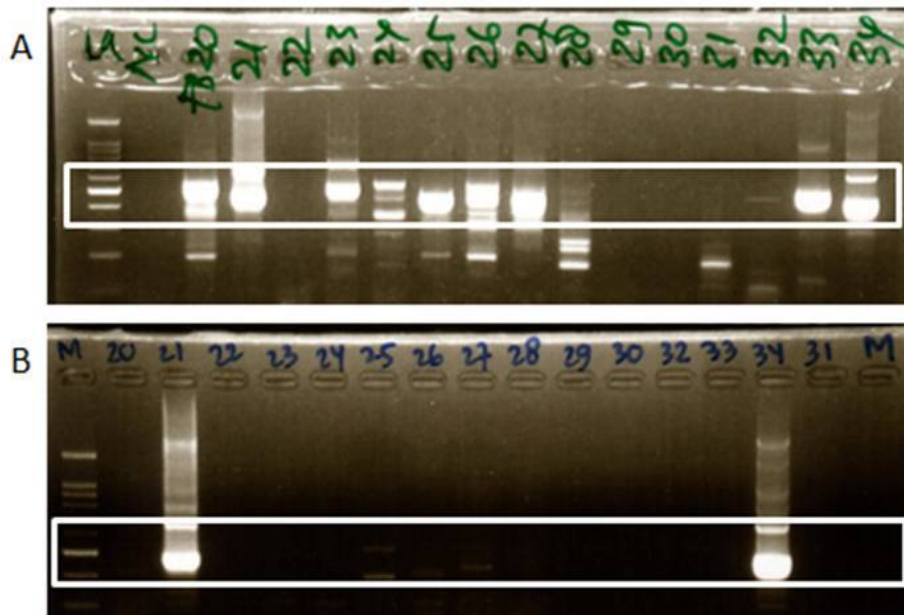
5.3 Hasil PCR

Hasil forcep biopsi tersebut kemudian digunakan untuk ekstraksi RNA menggunakan kit RNaeasy mini Kit (Qiagen). Hasil ekstraksi digunakan sebagai bahan untuk sintesis cDNA. Reverse Transcription PCR dengan kit ReverTraAce[®]qPCR RT Master mix with gDNA remover (Toyobo), kemudian dilanjutkan PCR dengan pasangan primer table 5.1. Master mix yang digunakan untuk PCR yaitu HotStar HiFidelity DNA Polymerase (Qiagen). Kondisi PCR yaitu 95⁰C 5 menit, 95⁰C 30 detik, 60⁰C 45 detik, 72⁰C 45 detik selama 30-40 siklus, final extension 72⁰C 10 menit. Hasil PCR digunakan untuk elektroforesis untuk mengetahui hasil positif atau negatif. Jumlah pasang basa produk PCR dapat diketahui dari Tabel 5.1.

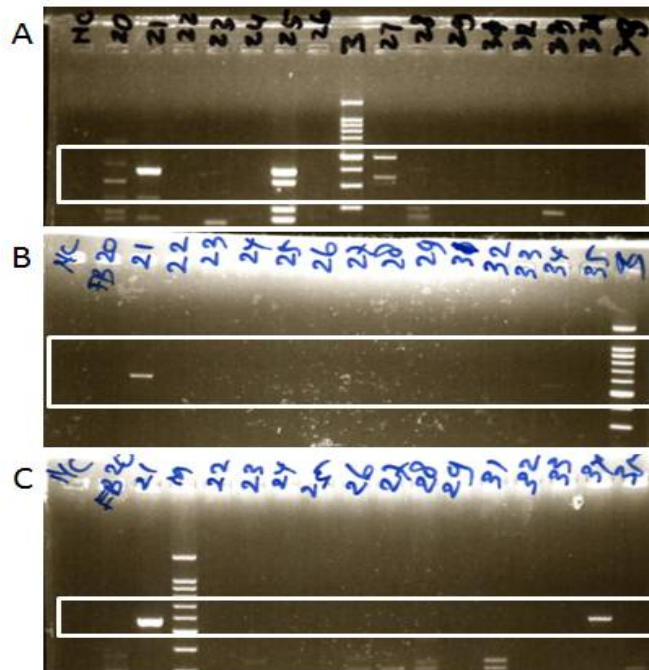
Hasil PCR untuk identifikasi ekspresi MAGE A1-10 menunjukkan bahwa terdapat 57.7% positif dan untuk MAGE A1-16 yaitu 23.1% (Tabel 5.2). Hasil PCR ditunjukkan pada Gambar 5.1, 5.2, 5.3.

Tabel 5.2 Ekspresi MAGE A1-12 pada sampel bahan forcep biopsi kanker paru

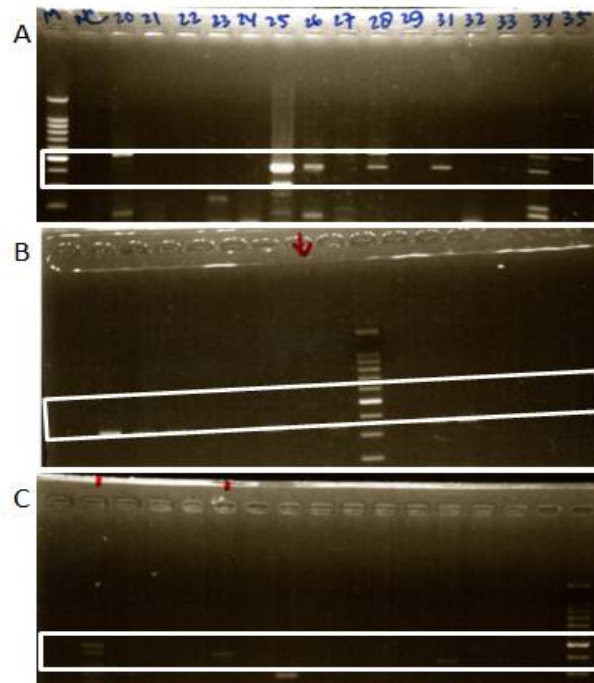
MAGE A	Jumlah Positif	Persentase
MAGE A1-10	15/16	57.7%
MAGE A1-6	6/26	23.1%
MAGE A1	7/26	26.9%
MAGE A2	3/26	11.5%
MAGE A3	3/26	11.5%
MAGE A4	-	-
MAGE A5	6/26	23.1%
MAGE A6	-	-
MAGE A8	3/26	11.5%
MAGE A9	2/26	7.7%
MAGE A10	-	-
MAGE A11	1/26	3.85%
MAGE A12	4/26	15.4%



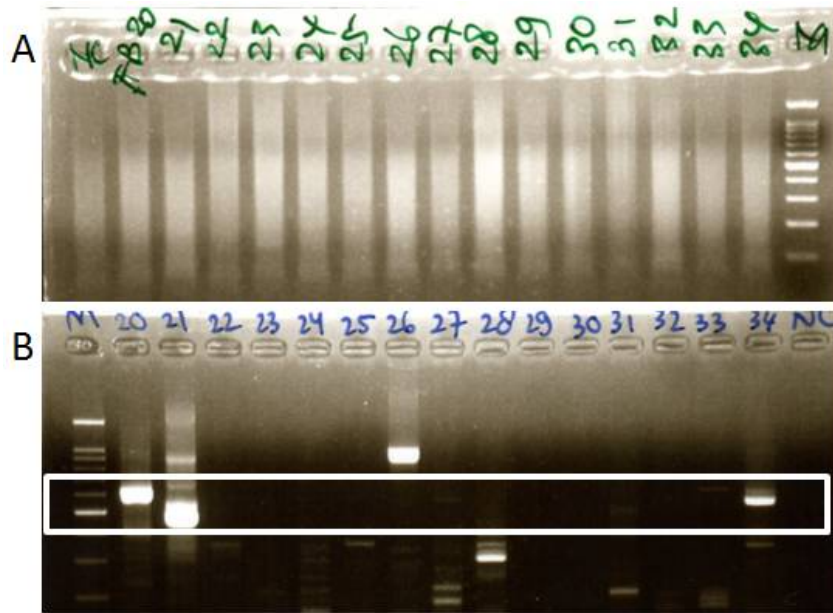
Gambar 5.1. Hasil PCR identifikasi MAGE A1-10 dan MAGE A1-6. A. Identifikasi MAGE A1-10, produk 461-557bp, hasil positif FB 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 33, 34; B. Identifikasi MAGE A1-6, produk 469-490bp, hasil positif FB 21, 34.



Gambar 5.2. Hasil PCR identifikasi individual MAGE A1, A2, dan A3. A. Ekspresi MAGE A1, product 377bp, hasil positif FB20, FB21, FB25, FB27, FB38 ; B. Ekspresi MAGE A2, product 523 bp, hasil positif FB21; C. Ekspresi MAGE A3, product 569 bp, hasil positif FB21, FB34



Gambar 5.3. Hasil PCR identifikasi individual MAGE A5, A8, dan A9. A. Ekspresi MAGE A5, product 478 bp, hasil positif FB25, FB26, FB28, FB31, FB34; B. Ekspresi MAGE A8, produk 419 bp, hasil positif FB26; C. Ekspresi MAGE A9, Produk 407bp, hasil positif FB20, FB24



Gambar 5.4. Hasil PCR identifikasi individual MAGE A11 dan A12. A. Ekspresi mRNA MAGE A11, produk 496bp, hasil negatif semua; B. Ekspresi mRNA MAGE A12, produk 496bp, hasil positif FB 21, 34.

Gen melanoma antigen (MAGE) termasuk gen kanker testis yang diekspresikan hanya pada sel kanker dan testis normal yaitu pada spermatid dan spematogoniasehingga disebut dengan istilah gen kanker-testis untuk gen pengkode dan antigen kanker-testis untuk antigen (De Plaen *et al.*,1994; van Baren N *et al*, 1999, Jungbluth AA *et al.*, 2000, Luo G *et al*, 2002).Gen kanker testis pertama kali diisolasi dari melanoma. Gen ini dikenal sebagai gen melanoma antigen (MAGE) (Kumar V, *et al.* 2005).

Saat ini telah ditemukan beberapa gen kanker testis seperti Superfamily MAGE, family SSX, GAGE, BAGE, SCP-1, NY-ESO-1, CTp11, dan HCA587 (Zhao L., *et al*, 2004). Famili gen MAGE terdiri dari 17 gen yang dikategorikan menjadi tiga kelompok yaitu MAGE-A, MAGE-B, dan MAGE-C. MAGE-A beranggotakan 12 gen, termasuk MAGE-1 (yang juga dikenal dengan MAGE-A1) terletak pada regio Xq28. MAGE-B terdiri dari 4 gen yang terletak pada regio Xp21.3 dan MAGE-C1 baru dikenal terletak pada pita Xq26 (Kim YM, *et al.* 2001 dan Chen H, *et al.* 2000).

Gen kanker testis mempunyai beberapa kekhususan yaitu 1) terutama hanya diekspresikan oleh jaringan tumor tetapi tidak diekspresikan pada jaringan normal kecuali pada testis (Van Der Bruggen P, *et al.* 1991; Van Baren N, *et al.* 1999; Chen H, *et al.* 2000; Xiao J, *et al.* 2005; Lv J, *et al.* 2002). 2) gen yang mengkode antigen kanker testis terletak

pada kromosom X sehingga ekspresi gen tersebut tidak tergantung pada jenis kelamin penderita (Zhao L, *et al.* 2004; Chen H, *et al.* 2000).

MAGE-1 termasuk antigen yang dikode oleh famili gen MAGE. Pertama kali diisolasi dari sel line melanoma manusia sebagai gen pengkode peptida antigen yang dipresentasikan pada klon sel T cytotoksik autologous oleh molekul HLA-A1. Ujung telomer dari semua famili gen ini terletak pada lengan kromosom X yang berdekatan, sehingga semua famili gen ini homolog (Van Baren N, *et al.* 1999).

mRNA MAGE-1 terdiri dari 1722, yang meliputi exon 1, 2, dan 3. Area koding (*CoDing Sequence/ CDS*) terletak pada exon 3 yaitu pada nukleotida 188 sampai 1117 mensintesis 309 asam amino (Strusberg RL, *et al.*, 2002). Sekuen mRNA MAGE-1 dapat diakses di *genbank* dengan *accession number* [M77481](#), [AY148486](#), [AF463515](#), [NM_004988](#), dan [BC017555](#). Sekuen DNA genom MAGE-1 dapat diakses di *genbank* dengan *accession number* [AC152005](#), dan [AC153070](#).

Gen MAGE-1 menjadi aktif pada sel tumor sebagai hasil dari hipometilasi CpG dinukleotida. Mekanisme aktivasi gen MAGE-1 yaitu melalui proses hipometilasi pada 2 *element promoter* MAGE-1 yaitu B' dan B yang terletak pada *up stream* -63 sampai dengan -46. Dua *element promoter* MAGE-1 ini mempunyai sisi *binding* dengan faktor transkripsi Ets. CpG mengalami hipometilasi pada kultur sel tumor yang mengekspresikan MAGE-1, tetapi mengalami metilasi pada sel normal dan kultur sel tumor yang tidak mengekspresikan MAGE-1. Metilasi pada CpG menghambat *binding* faktor transkripsi dengan *element promotor* yang menghasilkan hambatan ekspresi MAGE-1 (*gene silent*). Hipometilasi CpG pada kultur sel yang mengekspresikan MAGE-1 menyebabkan faktor transkripsi Ets *binding* dengan *element promoter* B' dan B yang menyebabkan aktivasi transkripsi MAGE-1 (De Smet C, *et al.* 1996; 1999; 2004; Xiao J, *et al.* 2005; Zhang J, *et al.*, 2004) yang menghasilkan mRNA MAGE-1. Ekspresi MAGE-1 pada sel non tumor dapat diinduksi secara eksperimental dengan menggunakan *agent* yang bisa menyebabkan demetilasi DNA yaitu 5-aza-2'-deoxycytidine. Ini menunjukkan bahwa demetilasi pada CpG merupakan mekanisme umum yang menyebabkan ekspresi MAGE-1 (Van Baren N, *et al.* 1999).

Protein MAGE-1 terletak di sitoplasma kemudian sebagian ditranslokasi ke nukleus sel untuk mencegah transkripsi sehingga menghambat ekspresi gen. Sebagian disekresikan sebagai antigen bersama dengan MHC kelas I dan II (Laduron S, *et al.* 2004).

Penelitian untuk mengungkap fungsi MAGE-1 diungkap dengan melihat interaksi MAGE-1 dengan SKIP. SKIP merupakan regulator transkripsi yang menghubungkan *DNA-binding protein* dengan protein yang berperan mengaktivasi atau menekan transkripsi yang

berhubungan dengan *signaling pathway* vitamin D, retinoic acid, estrogens, gluco corticoid, Notch1-1C, TGF β . SKIP berinteraksi dengan Notch1 dan Notch1 merekrut *histon acetyl transferase* (HAT) membentuk kompleks Notch1/HAT yang menyebabkan transkripsi berjalan (*on*). Namun jika SKIP berikatan dengan SMRT dan SMRT merekrut *histon deacetylase 1* (HDAC1) membentuk kompleks SMRT/HDAC1 maka transkripsi akan berhenti (*off*). HAT dan HDAC merupakan enzim yang berperan dalam *on/off* asetilasi untuk meregulasi transkripsi (Laduron S, *et al.*, 2004).

MAGE-1 menghambat ikatan SKIP dengan Notch1 untuk menekan transkripsi secara aktif dengan cara berikatan dengan *Ski Interacting Protein* (SKIP) melalui bagian C *terminal*. Hambatan interaksi SKIP dan Notch1 ini membutuhkan interaksi antara MAGE-1 dengan SKIP. MAGE-1 *binding* dan *recruiting histon deacetylase 1* (HDAC1) sehingga transkripsi tidak terjadi. Jadi peran MAGE-1 dalam menekan transkripsi gen yaitu dengan *binding* dengan SKIP dan *recruiting* HDAC1 (De Plaen, *et al.*, 2002; Laduron S, *et al.*, 2004).

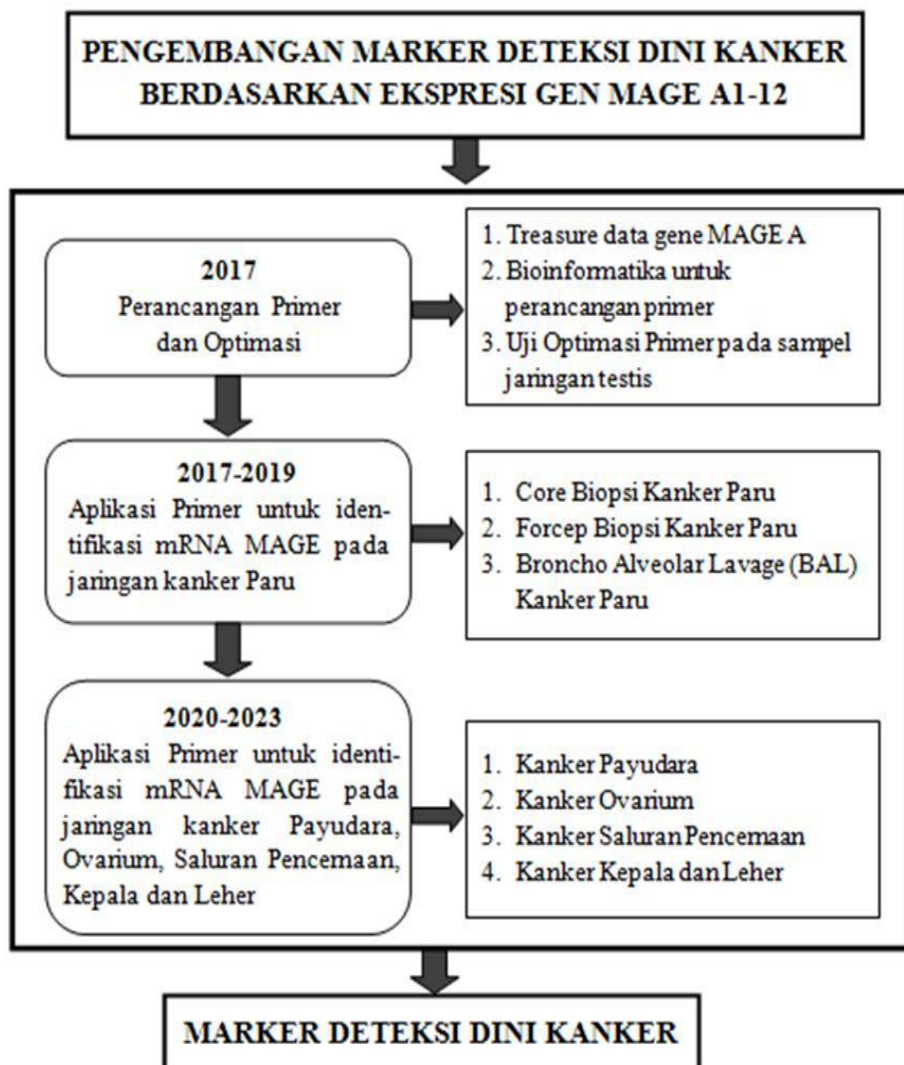
Protein MAGE-1 mengandung peptida epitop yang dapat *binding* dengan tipe haploid HLA I termasuk molekul HLA-A1, B3701, A2.1, A3.2, Cw*1601, dan A24. Peptida yang binding dengan molekul HLA-A1, B3701, Cw*1601, dan A24 tampak diproses dan dipresentasikan pada permukaan sel sehingga dapat digunakan sebagai target potensial untuk imunoterapi spesifik (Chen H, *et al.* 2000). Kombinasi peptida antigen kanker testis dan *Human Leukosit Antigen* (HLA) ketika dipresentasikan oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) terhadap sel T citotoksik (CTL) mampu memicu respons imun seluler pada penderita kanker (Zhao L, *et al.* 2004).

Gen MAGE-A1, A2, A3, A4, A6, A10 dan A12 sering diekspresikan pada beberapa tumor seperti pada melanoma, *bladder carcinoma*, *non-small cell lung carcinoma*, *head and neck carcinoma*, *squamus cell carcinoma esophagus*, tetapi tidak diekspresikan pada jaringan normal kecuali pada testis (Van Baren N, *et al.* 1999). Gen MAGE-1 diekspresikan pada kanker lambung (Ries J, *et al.* 2005; Kim YM, *et al.* 2001; Chen XH, *et al.* 2004; Kong U, *et al.* 2004; Li J, *et al.* 1996), pada kanker colorectal (Li M, *et al.* 2005), oral squamus carcinoma (Chi SN, *et al.* 2002), kanker paru (Sakata M, 1996) dan kanker ginjal (Yamanaka K, *et al.* 1998).

BAB 6
RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana untuk tahun ketiga yaitu:

1. Melakukan identifikasi ekspresi gen MAGE A1-12 pada sampel bahan *broncho alveolar lavage* (BAL) dari penderita kanker paru. dengan primer universal MAGE A1-12.
2. Melakukan diagnosis dan identifikasi jenis kanker paru dengan pemeriksaan histopatologi pada bahan *broncho alveolar lavage* (BAL) dari penderita kanker paru.
3. Melakukan analisis hasil pemeriksaan histopatologi dibandingkan dengan hasil identifikasi mRNA MAGE A1-12 dengan menggunakan primer universal MAGE A1-12 pada bahan *broncho alveolar lavage* (BAL) dari penderita kanker paru.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini yaitu

1. Pasangan primer untuk mendeteksi ekspresi mRNA MAGE A1-10 pada penelitiannya yaitu GMF10/GMR10 pada first round dan GMF10/GMR12 pada second round. Primer untuk mendeteksi MAGE A11 yaitu GMF11/GMR11 untuk first round dan GMF11/GMR12 untuk second round. Primer untuk mendeteksi MAGE A12 yaitu GMF12/GMR10 untuk first round dan GMF12/GMR12 untuk second round.
2. Primer MAGE A1-10 dapat mendeteksi sel kanker yang mengekspresikan paling sedikit satu gen MAGE A dari 10 variant gen MAGE A. Marker molekuler ini mungkin dapat digunakan sebagai tool baru untuk mendeteksi ekspresi gen MAGE pada kanker. Pasangan primer tersebut adalah GMF10 yaitu 5'-GAAGAYCTGCCWGTGGGTC-3', GMR10 yaitu 5'-CTCCAGGTASTTYTCCTGCAC-3', GMR12 yaitu 5'-CCAGYATTTCTGCCTTTGTGA-3', GMF11 yaitu 5'-GGAGGAGAACAAGTGCTG TGG-3', GMR11 yaitu 5'-CACCAGGTACTTTTTCC TGCAC-3', GMF12 yaitu 5'-CCAAGCATC CAGGTT CTGAGG-3'
3. Ekspresi mRNA MAGE A1-12 dari sampel forcep biopsi yaitu MAGE A1-10 57.7%, MAGE A1-6 23.1%, MAGE A12 26.9%, MAGE A2, A3, dan A8 masing-masing 11.5%, MAGE A5 23.1%, MAGE A9 7.7%, dan MAGE A11 3.85%.

7.2 Saran

Penelitian ini masih merupakan penelitian awal yang dapat dikembangkan untuk semua jenis kanker. Hasil penelitian pada tahap penelitian ini, digunakan untuk mendeteksi ekspresi mRNA MAGE A1-12 dari sampel core biopsi dan forcep biopsi, sehingga masih perlu dilanjutkan untuk sampel dari hasil dari BAL. Selain itu juga bisa digunakan untuk mendeteksi ekspresi mRNA MAGE A1-12 pada jenis kanker yang lain, seperti kanker rongga mulut, kanker prostat, kanker payudara, kanker otak, dan jenis kanker yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Baylin, S. B., J. G. Herman, J. R. Graff, P. M. Vertino, And J. P. Issa. 1998. Alterations in DNA Methylation: A Fundamental Aspect of Neoplasia. *Cancer Res.* 72:141–196.
- Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, Schroeder I, Factor VM, Dan Thorgeirsson SS, 2007. Mechanistic and Prognostic Significance of Aberrant Methylation in The Molecular Pathogenesis Of Human Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Invest.* 117:2713–2722.
- Chen H, Cai S, Wang Y, Zhao H, Peng J, Du R, Wang Y, Vaughan H, Cebon J, Burgess AW, Chen W, 2000. Expression of the MAGE-1 Genes in Human Hepatocellular Carcinomas. *Chinese Medical Journal*, 13(12):1112-8.
- Chen XH, Liu BY, Zhang DQ, Zhang Y, Li JF, Zhu ZG, 2004. Expression of MAGE-1 and MAGE-3 Genes in Gastric Cancer and Gastric Tissue and Its Clinical Significance. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Za Zhi*, May; 20(3):310-3
- Chi SN, Cheung NK, Cheung IY, 2002. Expression of SSx-2 and SSX-4 Genes in Neuroblastoma. *Int J Biol Markers*, Oct-Dec; 17(4):219-23.
- De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T, 1996. The Activation of Human Gene MAGE-1 in Tumor Cells is Correlated With Genome-Wide Demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93;7149-53.
- De Plaen E, De Smet C, Loriot A, Kholmanskikh O, Blondiaux C, 2002. Genes Expresses in Cancer and Germline Cells. www.icp.ucl.ac.be/reports/2002/de_plaen.pdf.
- Dunn Bk, 2003, Epigenetics in Cancer Prevention: Early Detection and Risk Assessment Hypomethylation: One Side of A Larger Picture, *Ann N Y Acad. Sci.* 983: 28-42.
- Ehrlich M, 2002. DNA Methylation in Cancer: Too Much, But Also Too Little, *Oncogene*; 21: 5400 – 5413.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers S, Rebelo M, Parkin MD, Forman D, Bray F, 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, Mar 1; 136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9.
- Gruselle O, Coche T, Louahed J. Development of a Quantitative Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of MAGE-A3-Positive Tumors. *J Mol Diagn.* 2015 Jul; 17(4):382-91. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.03.008. Epub 2015 May 15.
- Jang SJ, Soria JC, Wang L, Hassan KA, Morice RC, Walsh GL, Hong WK, Mao L., 2001. Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001 Nov 1; 61(21):7959-63.
- Jheon S, Hyun DS, Lee SC, Yoon GS, Jeon CH, Park JW, Park CK, Jung MH, Lee KD, Chang HK. Lung cancer detection by a RT-nested PCR using MAGE A1--6 common primers. *Lung Cancer.* 2004 Jan; 43(1):29-37.
- Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, et al. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer* 2000; 85:460-5.
- Luo G, Huang S, Xie X, Stockert E, Chen Y, Kubuschok B, Pfreundschuh M, 2002. Expression of Cancer Testis Genes in Human Hepatocellular Carcinomas, cancer Immunity 2:11.

- Karimi S, Mohammadi F, Porabdollah M, Mohajerani SA, Khodadad K, Nadji SA. Characterization of melanoma-associated antigen-a genes family differential expression in non-small-cell lung cancers. *Clin Lung Cancer.* 2012 May;13(3):214-9. doi: 10.1016/j.clcc.2011.09.007. Epub 2011 Dec 3.
- Kim HR, Kim TH, Chung JH, Yoon HI, Lee CT, Kang CH, Jheon S, Sung SW, Kim JH, Jeon C. The detection of peripheral lung cancer by MAGEA1-6 RT-nested PCR in bronchial washings specimens. *Lung Cancer.* 2009 Aug;65(2):166-9. doi: 10.1016/j.lungcan.2008.11.001. Epub 2009 Jan 24.
- Kim YD, Park HR, Song MH, Shin DH, Lee CH, Lee MK, Lee SY. Pattern of cancer/testis antigen expression in lung cancer patients. *Int J Mol Med.* 2012 Apr;29(4):656-62. doi: 10.3892/ijmm.2012.896. Epub 2012 Jan 24.
- Kim YM, Lee YH, Shin SY, Kim EH, Choi YW, Lee KM, Park JH, Lee YU, Seel DJ, Kim MC, 2001. Expression of MAGE-1, -2 and -3 Genes in Gastric Carcinomas and Cancer Cell Lines Derived from Korean Patients. *J Korean med Sci*; 16:62-68.
- Kong U, Koo J, Choi K, Park J, Chang H., 2004. The Expression of GAGE Gene Can Predict Aggressive Biologic Behavior of Intestinal Type of Stomach Cancer. *Hepatogastroenterology.* Sep-Oct;51(59):1519-23.
- Li J, Yang Y, Fujie T, Baba K, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T, 1996. Expression of BAGE, GAGE and MAGE Genes in Human Gastric Carcinoma. *Clin Cancer Res*, Sep;2(9):1619-25.
- Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J, 2005. Expression Profile of Cancer Testis Genes in 121 Human Colorectal Cancer Tissue and Adjacent Normal Tissue. *Clin cancer res*, mar 1;11(5):1809-14.
- NCCN Guidelines Version 4.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Non-Small Cell Lung Cancer Version 4.2016. diakses di https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf tanggal 05/02/2016.
- NCCN Guidelines Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Lung Cancer Screening Version 2.2016. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/lung_screening.pdf diakses tanggal 05/02/2016.
- Park JW, Kwon TK, Kim IH, Sohn SS, Kim YS, Kim CI, Bae OS, Lee KS, Lee KD, Lee CS, Chang HK, Choe BK, Ahn SY, Jeon CH. A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. *J Immunol Methods.* 2002 Aug 1;266(1-2):79-86.
- PDPI, 2003. Kanker Paru Pedoman Diagnosis dan Penatalaksanaan di Indonesia. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2003.
- Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebil E, Wiltfang J, 2005. Investigation of the Expression of Melanoma Antigen-Encoding Genes (MAGE-A1, to A6) in Oral Squamous Cell Carcinomas to Determine Potential Targets for Gene-Based Cancer Immunotherapy. *Int J Oncol Mar*; 26:817-24.
- Sakata M, 1996. Expression of MAGE Gene Family in Lung Cancers. *Kurume Med J*, 43(1):55-61.
- Shin KC, Lee KH, Lee CH, Shin IH, Suh HS, Jeon CH. MAGE A1-A6 RT-PCR and MAGE A3 and p16 methylation analysis in induced sputum from patients with lung cancer and non-malignant lung diseases. *Oncol Rep.* 2012 Apr;27(4):911-6. doi: 10.3892/or.2011.1566. Epub 2011 Nov 29.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A, 2015. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 65(1):5-29. doi: 10.3322/caac.21254. Epub 2015 Jan 5.
- Sugita M, Geraci M, Gao B, Powell RL, Hirsch FR, Johnson G, Lapadat R, Gabrielson E, Bremnes R, Bunn PA, Franklin WA. Combined use of oligonucleotide and tissue

- microarrays identifies cancer/testis antigens as biomarkers in lung carcinoma. *Cancer Res.* 2002 Jul 15;62(14):3971-9.
- Tajima K, Obata Y, Tamaki H, Yoshida M, Chen YT, Scanlan MJ, Old LJ, Kuwano H, Takahashi T, Takahashi T, Mitsudomi T. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer.* 2003 Oct;42(1):23-33.
- Tsai JR, Chong IW, Chen YH, Yang MJ, Sheu CC, Chang HC, Hwang JJ, Hung JY, Lin SR. Differential expression profile of MAGE family in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2007 May;56(2):185-92. Epub 2007 Jan 17.
- van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Hames G, Ferrant A, Lehmann F, Andre M, Ravoet C, Doyen C, Spagnoli GC, Bakkus M, Thielemans K, Boon T., 1999. Genes Encoding Tumor-Specific Antigens are Expressed in Human Myeloma cells. *Blood.* Aug 15;94(4):1156-64.
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991 Dec 13;254(5038):1643-7.
- Xiao J, Chen HS, Fei R, Cong X, Wang LP, Wang Y, Jiang D, Wei L, and Wang Y, 2005. Expression of MAGE-A1 mRNA is Associated with Gene Hypomethylation in Hepatocarcinoma Cell Lines, *J Gastroenterol*, 40:716–721.
- Yamanaka K, Miyake H, Hara I, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S, 1998. Expression of MAGE Genes in Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Med.* Jul;2(1):57-60.
- Zhang J, Yu J, Gu J, Gao BM, Zhao YJ, Wang P, Zhang HY, Zhu DJ, 2004. A Novel Protein-DNA Interaction Involved with The CpG Dinucleotide At -30 Upstream Is Linked To The DNA Methylation Mediated Transcription Silencing Of The Mage-A1 Gene, *Cell Research*, 14 (4): 283-294.

Lampiran 1. Draf Publikasi

A molecular strategy for detecting the mRNA of MAGE A1-A10 from core biopsy of lung cancer

Gondo Mastutik^{1*}, Alphania Rahniayu¹, Isnin Anang Marhana², Nila Kurniassari¹, Mochamad Amin³ and Suhartono Taat Putra¹

¹Department of Anatomic Pathology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga Indonesia

²Department of Pulmonology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga Indonesia

³Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga Indonesia

*Correspondence: Gondo Mastutik, Department of Anatomic Pathology, Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya 60131, Indonesia. Jl. Prof. Dr. Moestopo No 47, Surabaya 60131, Indonesia Telp 62-31-5020251 ext 182, Fax 62-31-5026333, E-mail: gondomastutik@gmail.com, gondomastutik@fk.unair.ac.id

ABSTRACT

The melanoma antigen (MAGE) gene, expressed in cancer cells and in testicular tissue, consist of 12 variants that called MAGE A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 (pseudo gene), A8, A9, A10, A11, and A12. The mRNA MAGE A can be identified using the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The objective of this study was to develop the molecular strategy for detecting the mRNA of MAGE A1-A10 use the universal primer for MAGE A1-10 in the one tube. This research used testicular tissue from patients who had received the orchidectomy therapy at Dr Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. Identification of MAGE A1-A10 mRNA was performed by RT-PCR technique using the universal primer for MAGE A1-A10. MAGE A1, A2, A3, A4, A5, A6, A8, A9, and A10 variants mRNA were detected using primer set of GMF10/GMR10 for the first round and primer set of GMF10/GMR12 for the second round. Primer set of MMRP1/MMRP2 was used as a comparison for MAGE A1-6 mRNA identification. The mRNA from testicular tissue was extracted, followed by RT-PCR. The PCR result was electrophoresed with 2% agarose gel. The PCR products of primer pair GMF10/GMR10 ranging from 823-919 base pair (bp) whereas products of GMF10/GMR12 were 461-557bp in size depending on the variants of MAGE A1-A10. The next optimization test was RNA total dilution test. Total RNA concentration of 133.4 ng/ml was used for dilution with a ratio of 1:10, 1:100, 1:1000. The all of the MAGE A1-A10 mRNA can be detected together in the same tube PCR. This common primer can be used as a biomolecular tool for identification the all variants of MAGE A1-A10 mRNA in cancer cells.

Keywords: MAGE A1-A10 mRNA, common primer, testicular tissue, cancer testis antigen, RT-PCR

Introduction

Gen melanoma antigen (MAGE) MAGE disebut sebagai gen kanker testis antigen karena hanya diekspresikan pada sel kanker dan jaringan testis normal yaitu pada spermatid dan spermatogonia. Ada juga yang menyebutkan bahwa gen ini juga diekspresikan pada plasenta (De Plaen *et al.*, 1994; Van Baren N *et al.*, 1999, Jungbluth AA *et al.*, 2000, Luo G *et al.*, 2002). Sel somatik normal lain tidak mengekspresikan gen MAGE karena terjadi metilasi CpG pada regio promotor gen MAGE sehingga faktor transkripsi tidak bisa berikatan dengan *element promotor* yang menghasilkan hambatan ekspresi MAGE (*gene silent*). Gen MAGE menjadi aktif pada sel tumor sebagai hasil dari hipometilasi CpG pada 2 *element promotor* MAGE yaitu B' dan B yang terletak pada *up stream* -63 sampai dengan -46 sehingga faktor transkripsi Ets *binding* dengan *element promotor* B' dan B yang menyebabkan aktivasi transkripsi MAGE sehingga menghasilkan mRNA MAGE yang spesifik hanya terekspresi ketika sel mengalami transformasi menjadi sel kanker (De Smet C, *et al.* 1996; Xiao J, *et al.* 2005; Zhang J, *et al.*, 2004).

Gen MAGE tipe I yaitu MAGE A, MAGE B, MAGE C yang diekspresikan pada terbatas pada jaringan *germ* yaitu spermatosit, plasenta, dan beberapa stadium dalam perkembangan embrio. Gen MAGE tipe II yaitu MAGE D yang diekspresikan secara umum pada jaringan tubuh (Karimi S, *et al.*, 2012). Gen MAGE A diekspresikan pada banyak jaringan kanker. Gen MAGE A1 diekspresikan pada kanker lambung (Ries J, *et al.* 2005; Kim YM, *et al.* 2001; Chen XH, *et al.* 2004; Kong U, *et al.* 2004; Li J, *et al.* 1996), pada kanker *colorectal* (Li M, *et al.* 2005), *oral squamous carcinoma* (Chi SN, *et al.* 2002), kanker paru (Sakata M, 1996) dan kanker ginjal (Yamanaka K, *et al.* 1998). Gen MAGEA1, A2, A3, A4, A6, A10 dan A12 sering diekspresikan pada beberapa tumor seperti pada melanoma, *bladder carcinoma*, *non-small cell lung carcinoma*, *head and neck carcinoma*, *squamous cell carcinoma esophagus*, tetapi tidak diekspresikan pada jaringan normal kecuali pada testis (Van Baren N, *et al.* 1999). Sel kanker paru, baik pada *small cell lung cancer* (SCLC) atau *non small cell lung cancer* (NSCLC), mengekspresikan molekul MAGE A (Sugita M, *et al.*, 2002; Tajima K, *et al.*, 2003; Tsai JR, *et al.*, 2007, Kim YD, *et al.*, 2012; Shin KC, *et al.*, 2012; Karimi S, *et al.*, 2012). Gen MAGE A diekspresikan pada sel kanker NSCLC dan sel di sekeliling jaringan kanker yang secara histopatologi tampak normal (Karimi S, *et al.*, 2012). Sel epitel bronchial dari perokok juga mengekspresikan salah satu gen MAGE A (Jang SJ, *et al.*, 2001). Aktivasi transkripsi gen MAGE A menghasilkan mRNA MAGE A dapat diidentifikasi dengan teknik *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT PCR). Hal ini menunjukkan bahwa mRNA MAGE A dapat berguna untuk deteksi dini kanker paru dan

juga untuk skreening kanker paru. Ekspresi gen MAGE A berpotensi sebagai *marker* molekuler untuk pengembangan *marker* deteksi dini kanker paru.

Gen MAGE A terdapat 12 variant yaitu MAGE A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12. Ekspresi gen MAGE A pada kanker paru dapat dideteksi dengan menggunakan primer universal MAGE A yaitu mampu mendeteksi MAGE A variant A1, A2, A3, A4, A5, A6 dengan teknik *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT PCR) *nested* PCR. Produk yang dihasilkan yaitu 831-855 *base pair* (bp) pada PCR *first round* PCR dan 469-493 bp pada *second round* PCR yang kedua (Park JW, et al., 2002, Jheon S, et al., 2004, Kim HR, et al., 2009, Shin KC et al., 2012). Penelitian Karimi S, *et al.*, (2012) dengan teknik RT PCR menunjukkan bahwa paling sedikit satu gen MAGE A variant A1, A2, A3/6, A4, atau A12 dapat ditemukan pada kanker paru jenis *squamous cell carcinoma* dan *adenocarcinoma*. Ekspresi gen ini bisa satu gen atau terjadi coekspresi yang artinya lebih dari satu variant gen MAGE A mengalami aktivasi transkripsi pada satu penderita kanker paru. Demikian juga dengan hasil penelitian lain yaitu mendeteksi 32 gen MAGE menunjukkan bahwa MAGE A paling sering diekspresikan pada kanker paru secara berurutan yaitu MAGE A2, A7, A11, H1, B6, dan B2. Gen MAGE yang paling diekspresikan pada jenis *adenocarcinoma* paru secara berurutan yaitu A2, A7, A11, B6, D2, H1, sedangkan pada jenis *squamous cell carcinoma* secara berurutan yaitu A2, A8, A7, B2, A4, A11 (Tsai JR, *et al.*, 2007). Ekspresi MAGE A1, A3, A6, A12, 4b juga ditemukan pada *NCSLC* dan *SCLC* (Sugita et al, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa selain MAGE A1-6, juga masih ada variant MAGE A lain yaitu MAGE A8, A9, dan A10 yang juga diekspresikan pada kanker paru, baik jenis *NSCLC* atau *SCLC*. Hal ini menjadi penting jika ekspresi MAGE A ini digunakan sebagai *marker* diagnosis atau deteksi dini. Semakin banyak variant gen MAGE A yang dapat diidentifikasi maka diagnosis bisa dilakukan lebih dini sehingga memberikan dampak prognosis yang lebih bagus. Primer universal yang ada saat ini hanya mampu mendeteksi ekspresi gen MAGE variant A1 sampai A6, padahal variant lain gen MAGE yaitu variant A8, A9, dan A10, juga banyak diekspresikan pada beberapa jenis kanker, termasuk kanker paru. Oleh karena itu diperlukan perancangan primer universal yang mampu mengidentifikasi ekspresi gen MAGE A variant A1 sampai A10 pada kanker paru.

Penelitian eksplorasi laboratorik yang bertujuan untuk mengembangkan strategi molekuler untuk mengidentifikasi mRNA MAGE A1-A10 in one tube dari bahan core biopsi jaringan paru dalam upaya mengembangkan marker deteksi dini kanker paru.

Metode penelitian

Spesimen Penelitian

Spesimen yang digunakan pada penelitian ini yaitu jaringan testis yang diperoleh dari pasien mendapatkan terapi orchidectomi dan jaringan paru dari nodul suspect kanker paru dari hasil core biopsi paru dari Rumah Sakit Dr Soetomo Surabaya. Diperoleh 18 spesimen hasil core biospi dari pasien suspek kanker paru.

Design Primer

Perancangan primer universal MAGE A1-12 pada penelitian ini dilakukan berdasarkan pada sekuen mRNA gen target dengan memilih area antara exon 1, 2, dan 3. Area yang paling bervariasi pada gen MAGE yaitu area pada exon 1 dan 2, sedang exon 3 merupakan bagian *coding region* gen yang sekuennya hampir sama diantara semua *family* gen MAGE A. Jika dilakukan perancangan *primer* pada area exon 3 saja maka dikhawatirkan yang teramplifikasi bukan mRNA MAGE A tetapi gen MAGE A sehingga pada penelitian ini *primerforward* dirancang untuk menempel pada sekuen exon 1 bersama exon 2 dan *primerreverse* dirancang menempel pada exon 3 atau exon 2.

Sekuen gen MAGE dan mRNA MAGE diperoleh dari Genbank (NCBI) dan dilakukan analisis bioinformatika dan design primer. Varian gen MAGE A yaitu MAGE A1, A2, A3, A4, A5, A6, A8, A9, A10, A11, A12, sedangkan MAGE A7 merupakan pseudo gen dan tidak dianalisis dalam penelitian ini. Gen MAGE A11 dan A12 memiliki sekuen mRNA yang memiliki homology yang berbeda dengan sekuen gen MAGE A1-10 sehingga dalam hasil design primer MAGE A11 dan A12 tidak bisa dilakukan secara bersamaan dengan gen MAGE A yang lain. Hasil design primer pada penelitian ini yaitu untuk mendeteksi mRNA varian MAGE A1-10 menggunakan pasangan primer GMF10 dan GMR10 untuk first round dan GMF10 dengan GMR12 untuk second round (Tabel 1). Primer universal MAGE A1-10 hasil perancangan baru diuji dan dibandingkan dengan primer pembanding yang telah dipublikasikan. Primer pembanding yaitu untuk mendeteksi MAGE A1-6 seperti pada penelitian Park JW *et al.*, (2002). Teknik Nested RT PCR menggunakan pasangan *primer* MMRP1 dengan MMRP2 untuk *first round*, dan MMRP3 dengan MMRP4 untuk *second round* yang merupakan *primer common* untuk mendeteksi ekspresi gen MAGE A1-6 (Tabel 1).

Pasangan primer GMF10/GMR10 pada first round menghasilkan produk 823-919bp dan GMF10/GMR12 pada second round 461-557 bp tergantung pada jenis MAGE A (Tabel 2), digunakan untuk identifikasi ekspresi mRNA MAGE A1-10. Pasangan primer

MMRP1/MMRP2 pada first round menghasilkan produk 852 bp dan MMRP3/MMRP4 pada second round menghasilkan produk 469-490, digunakan sebagai pembanding untuk identifikasi ekspresi mRNA MAGE A1-6.

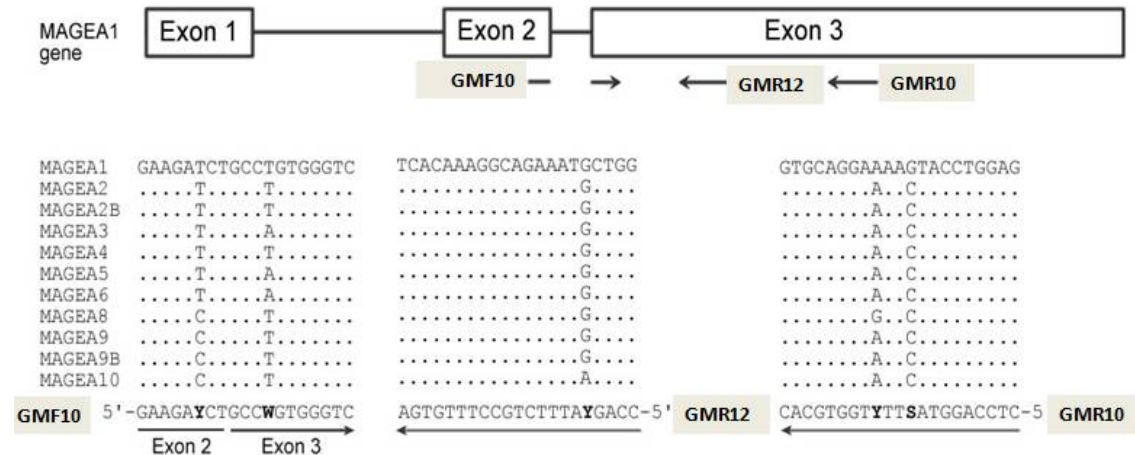


Figure 1. The primer position of primer MAGE A1-10

Tabel 1. The primer use for RT PCR of mRNA MAGE A1-10

Gene	Sequence of Primer (5'→3')	Tm (°C)	Amplicon Length (bp)
GAPD	GAPD-F = TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC GTA	60	320
	GAPD-R = CAA ATG AGC CCC AGC CTT CTC CA		
MAGE A1-10 (outer)	GMF10 = GAA GAY CTG CCW GTG GGT C	61-64	823-919
	GMR10 = CTC CAG GTA STT YTC CTG CAC		
MAGE A1-10 (inner)	GMF10 = GAA GAY CTG CCW GTG GGT C	61-64	461-557
	GMR12 = CCA GYA TTT CTG CCT TTG TGA		
MAGE A1-6 (outer)	MMRP1 = CTG AAG GAG AAG ATC TGC C	57-62	852
	MMRP2 = CTC CAG GTA GTT TTC CTG CAC		
MAGE A1-6 (inner)	MMRP3 = CTG AAG GAG AAG ATC TGC CWG TG	63-64	469-490
	MMRP4 = CCA GCA TTT CTG CCT TTG TGA		

GAPD = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, MAGE = melanoma-associated gene, F = forward, R = reverse, Tm = melting temperature, bp = base pair

Tabel 2. Primer for identification individual MAGE A

Gene	Sequence of Primer (5'→3')	Tm(°C)	Amplicon Length (bp)
MAGE A1	M1 = CGG AAC AAG GAC TCC AGG ATA CAA	64-65	377
MAGE A2	M2 = AA AGA AGT CCT GGC AAT TTC TGA G	63-64	523
MAGE A3	M3 = CCA AAG ACC AGC TGC AAG GAA CT	64-67	569
MAGE A4	M4 = CGT CAA TGC CAA AGA TCA TCT TCA G	64-64	580
MAGE A5	M5 = CCT TTG TGA CCA GCT CCT TGA CTT A	64-66	478

MAGE A6	M6 = CCA GGC AGG TGG CAA AGA TGT ACA C	64-69	628
MAGE A8	MAGE8 = 5'CAC TTT CTC ATC AAG TGC TTC CC3'	63	419
MAGE A9	MAGE9 = 5'CCT TCA ATT TCA GTG CTT CTT GG3'	62	407
MAGE A10	MAGE10 = 5'TGG GTA AAG ACT CAC TGT CTG G3'	63	464

MAGE = melanoma-associated gene, F = forward, R = reverse, Tm = melting temperature, bp = base pair.

Forward using MMRP3 5'-CTG AAG GAG AAG ATC TGC CWG TG-3' and reverse using M1, M2, M3, M4, M5, M6 for identify MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A6.

Forward using GMF10 5'- GAA GAY CTG CCW GTG GGT C-3' and reverse using MAGE 8, MAGE9, MAGE 10 for identify MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10.

Tabel 3. Produk PCR untuk first dan second round

Pasangan primer first round	Nama MAGE	Produk (bp)	Pasangan primer second round	Nama MAGE	Produk (bp)
GMF10/GMR10	MAGE A1	823	GMF10/GMR12	MAGE A1	461
	MAGE A2	844		MAGE A2	482
	MAGE A3	844		MAGE A3	482
	MAGE A4	847		MAGE A4	485
	MAGE A5	845		MAGE A5	482
	MAGE A6	844		MAGE A6	482
	MAGE A 8	851		MAGE A 8	489
	MAGE A9	841		MAGE A9	479
	MAGE A10	919		MAGE A10	557

Nested PCR

RNA dari jaringan testis dan jaringan paru hasil core biopsi diekstraksi menggunakan RNAeasy Plus Mini Kit berdasarkan instruksi pabrik sehingga diperoleh total RNA (Qiagen). Kadar RNA diukur dengan nanodrop (....). Total RNA kemudian disimpan pada -20⁰C sampai akan digunakan.

Reverse Transcription PCR dilakukan dengan kit ReverTraAce[®]qPCR RT Masater mix with gDNA remover (Toyobo, Japan). Total 14µl reaksi yang terdiri dari 4x DNA master mix yang sudah dicampur dengan gDNA remover 2µl, RNA template 6 µl 5xRT master mix II 3 µl, dan nuclease free water 3 µl. Reaksi mix diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 42⁰C selama 50 menit, stop reaksi

dilakukan pada suhu 98⁰C selama 5 menit. cDNA kemudian disimpan pada -20⁰C sampai akan digunakan.

Amplifikasi yang pertama dilakukan dalam 20 µl yang terdiri dari master mix 10 µl, primer forward 1 µl, primer reverse 1 µl, nuclease free water 5 µl, cDNA template 3 µl. Konsentrasi primer yaitu 10 pmoles/µl. Siklus PCR yaitu pre denaturasi 94⁰C selama 5 menit, denaturasi 94⁰C selama 30 detik, annealing primer 57⁰C selama 45 detik, extension 72⁰C selama 45 detik, dan final extension 72⁰C selama 7 menit. PCR dilakukan selama 40 siklus kemudian dielektroforesis dengan gel 2 %.

Hasil PCR dari sampel jaringan testis dikonfirmasi dengan sekuensing dan hasil dibandingkan dengan yang terdapat di Gen Bank NCBI

Identifikasi mRNA MAGE A1-10 dengan MAGE A primer universal

Identifikasi mRNA MAGE A1-12 dilakukan menggunakan primer universal MAGE A1-10 pada jaringan kanker paru dengan specimen jaringan kecil dari hasil *core biopsy* kanker paru. Kontrol positif yaitu jaringan testis normal dan kontrol jumlah mRNA yang terdapat pada sampel yaitu konsentrasi RNA gen *housekeeping* (gen GAPDH).

Sampel dikumpulkan dengan teknik *constitutive sampling* yaitu semua penderita kanker tersebut selama 6 bulan waktu penelitian digunakan untuk penelitian. Sampel kanker paru dari *core biopsy* digunakan pada penelitian ini. Sampel *core biopsy* dibagi menjadi dua bagian yaitu satu bagian dimasukkan ke dalam tabung berisi buffer formalin 10%, kemudian dipospos untuk menjadi slide HE dan digunakan untuk diagnosis histopatologi. Satu bagian *core biopsy* dimasukkan ke dalam tube dan dimasukkan box ice kemudian segera dikirim ke laboratorium tempat pemeriksaan ekspresi gen MAGE A dan disimpan di suhu -70⁰C sampai digunakan untuk ekstraksi RNA

Hasil dan Pembahasan

Sampel dari core biopsi itu sangat sedikit yaitu sebesar benang rajut dengan panjang maksimal 1 cm sehingga dalam pelaksanaan penelitian perlu dilakukan seefisien mungkin. Ukuran sampel yang sangat kecil ini akan digunakan untuk PCR menggunakan pasangan primer untuk identifikasi MAGE A1-6, Mage Universal MAGE A1-10 hasil rancangan baru, MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE 6, MAGE A8, MAGE A9, dan MAGE A10.

Primer universal MAGE A1-10 setelah diujikan pada sampel jaringan testis menunjukkan pita sekitar 823-9191bp, sedangkan primer MMRP 1/MMRP2 menunjukkan pita sekitar 852bp (Gambar 1). Uji optimasi selanjutnya yaitu uji dilusi total RNA. Kada tttotal RNA yaitu 133,4 ng/ μ l.total RNA tersebut digunakan dilusi yaitu perbandingan 1:10, 1:100, 1:1000. (gambar 2).

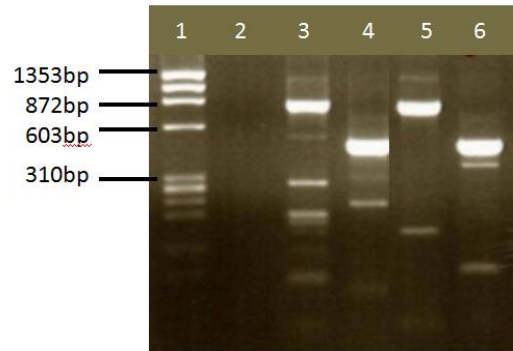


Figure 2. PCR product from testis tissue samples were tested using common primer for MAGE A1-10 and MAGE A1-6. 1=Marker BenchTop HaeIII, 2=Negative control. 3=MAGE A1-10 1Round 823bp, 4=MAGE A1-10 2 Round 461bp, 5=MAGE A1-6 1Round 852bp, 6=MAGE A1-6 2Round 469bp

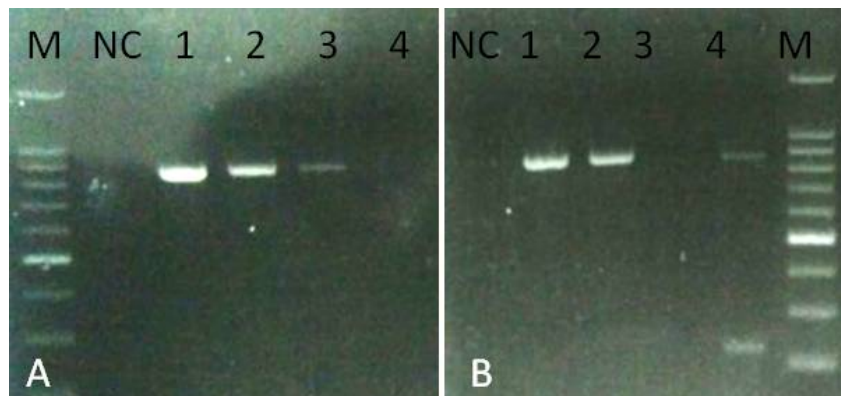


Figure 3. Dilution of sampel for detecting MAGE A1-10 compared with MAGE A1-6. A. Using the common primer MAGE A1-10 (A), Using the common primer MAGE A1-6 (B). M = marker, NC = negative control (no DNA), 1 = dilution 1:1, 2 = dilution 1:10, 3 = dilution 1:100, 4= = dilution 1:1000

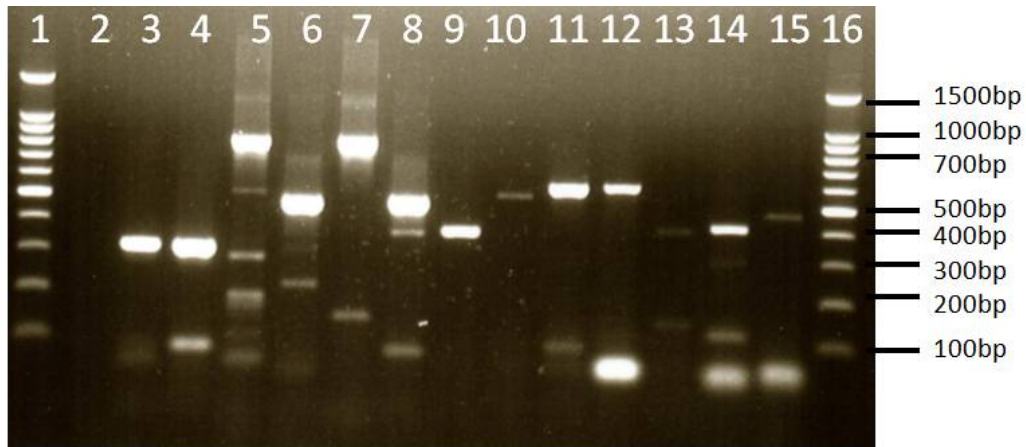


Figure 4. PCR product from testis tissue samples . 1=Marker 100bp, 2= Negative Control, 3=GAPD (+) 320bp, 4=MAGE A1-10 1st Round 823 bp (-), 5=MAGE A1-10 2nd Round 461bp (+), 6=MAGE A1-6 1st Round 852bp (+), 7=MAGE A1-6 2nd Round 469bp (+), 8=MAGE A1 377bp (+), 9=MAGE A2 523bp (+), 10=MAGE A3 569bp (+), 11=MAGE A4 580bp (+), 12=MAGE A5 478bp (+), 13=MAGE A8 419bp (+), 14=MAGE A9 407bp(+), 15=MAGE A10 464bp (+), 16=Marker 100bp

```

XM_005274676-X1      1  gtcacatcgctcttgagcagaggagtcaagcactgcaagcctgaagaaggccttgaggcccaggagaggccctgggctggtgggtgcg
XM_011531160-X2      1  gtcacatcgctcttgagcagaggagtcaagcactgcaagcctgaagaaggccttgaggcccaggagaggccctgggctggtgggtgcg
XM_006724818-X3      1  gtcacatcgctcttgagcagaggagtcaagcactgcaagcctgaagaaggccttgaggcccaggagaggccctgggctggtgggtgcg
MAGEA3-seq           1  gtcacatcgctcttgagcagaggagtcaagcactgcaagcctgaagaaggccttgaggcccaggagaggccctgggctggtgggtgcg

XM_005274676-X1     91  caggctcctgctactgaggagcaggaggctgcctcctcctcttctactctagt tgaagtcaccctggggagggtgcctgctgccgagtc
XM_011531160-X2     91  caggctcctgctactgaggagcaggaggctgcctcctcctccttctactctagt tgaagtcaccctggggagggtgcctgctgccgagtc
XM_006724818-X3     91  caggctcctgctactgaggagcaggaggctgcctcctcctccttctactctagt tgaagtcaccctggggagggtgcctgctgccgagtc
MAGEA3-seq           91  caggctcctgctactgaggagcaggaggctgcctcctcctccttctactctagt tgaagtcaccctggggagggtgcctgctgccgagtc

XM_005274676-X1    181  ccagatcctccccagagtccctcaggagcctccagcctccccactaccatgaactaccctctctggagccaatcctatgaggactccagc
XM_011531160-X2    181  ccagatcctccccagagtccctcaggagcctccagcctccccactaccatgaactaccctctctggagccaatcctatgaggactccagc
XM_006724818-X3    181  ccagatcctccccagagtccctcaggagcctccagcctccccactaccatgaactaccctctctggagccaatcctatgaggactccagc
MAGEA3-seq          181  ccagatcctccccagagtccctcaggagcctccagcctccccactaccatgaactaccctctctggagccaatcctatgaggactccagc

XM_005274676-X1    271  aaccaagaagaggaggggccaagcaccttccctgacctggagtcaggttccaagcagcactcagtaggaaggtggccgagttgggttc
XM_011531160-X2    271  aaccaagaagaggaggggccaagcaccttccctgacctggagtcaggttccaagcagcactcagtaggaaggtggccgagttgggttc
XM_006724818-X3    271  aaccaagaagaggaggggccaagcaccttccctgacctggagtcaggttccaagcagcactcagtaggaaggtggccgagttgggttc
MAGEA3-seq          271  aaccaagaagaggaggggccaagcaccttccctgacctggagtcaggttccaagcagcactcagtaggaaggtggccgagttgggttc

XM_005274676-X1    361  tttctgctcctcaagtatcgagccaggagccgggtcacaaagcagaaatgctggggagtgctgctggaaattggcagtatctcttcc
XM_011531160-X2    361  tttctgctcctcaagtatcgagccaggagccgggtcacaaagcagaaatgctggggagtgctgctggaaattggcagtatctcttcc
XM_006724818-X3    361  tttctgctcctcaagtatcgagccaggagccgggtcacaaagcagaaatgctggggagtgctgctggaaattggcagtatctcttcc
MAGEA3-seq          361  tttctgctcctcaagtatcgagccaggagccgggtcacaaagcagaaatgctggggagtgctgctggaaattggcagtatctcttcc

XM_005274676-X1    451  gtgatcttcagcaaaagcttccagttccttgcagctgggtctt
XM_011531160-X2    451  gtgatcttcagcaaaagcttccagttccttgcagctgggtctt
XM_006724818-X3    451  gtgatcttcagcaaaagcttccagttccttgcagctgggtctt
MAGEA3-seq          451  gtgatcttcagcaaaagcttccagttccttgcagctgggtctt

```

Figure 5. The alignment MAGE A3 from patient with from gen bank data

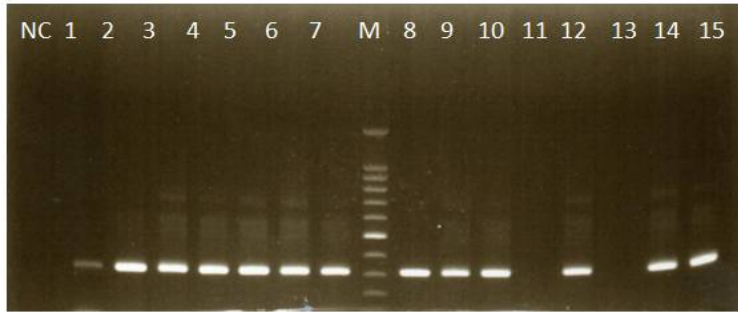


Figure 6. PCR GAPD from Core Biopsi Sampel of Lung Cancer Patients

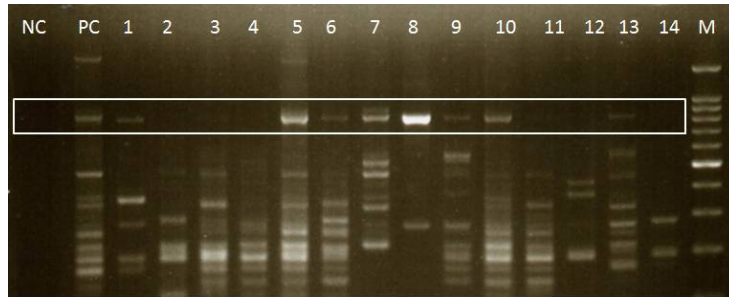


Figure 7. First Round PCR using the common Primer MAGE A1-10 from sampel Core Biopsi of Lung Cancer Patients

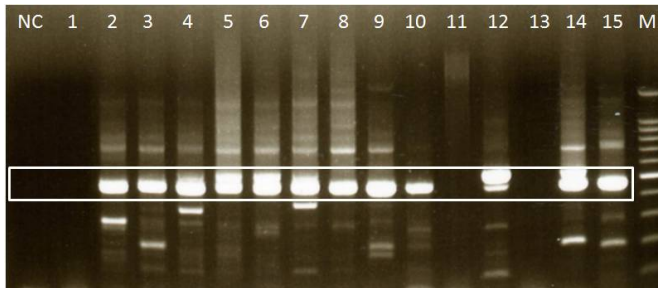


Figure 8. Second Round PCR using the common Primer MAGE A1-10 from sampel Core Biopsi of Lung Cancer Patients

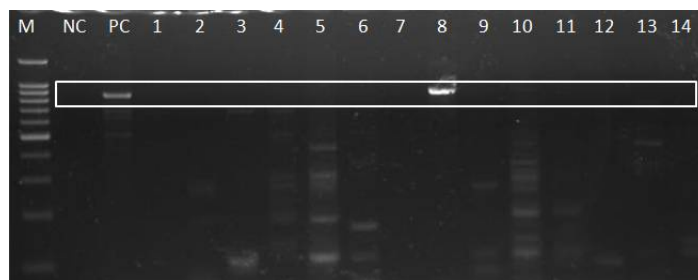


Figure 9. First Round PCR using the common Primer MAGE A1-6 from sampel Core Biopsi of Lung Cancer Patients

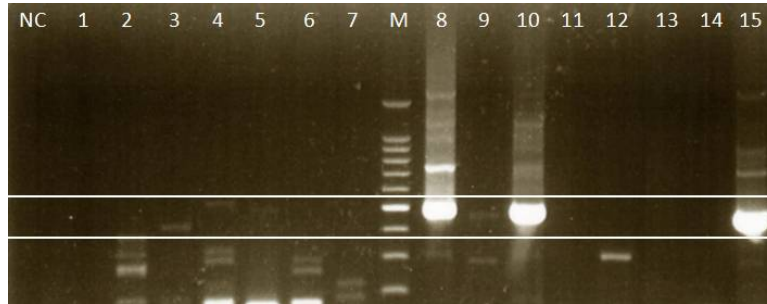


Figure 10. Second Round PCR using the common Primer MAGE A1-10 from sampel Core Biopsi of Lung Cancer Patients

Gen melanoma antigen (MAGE) termasuk gen kanker testis yang diekspresikan hanya pada sel kanker dan testis normal yaitu pada spermatid dan spermatogonia sehingga disebut dengan istilah gen kanker-testis untuk gen pengkode dan antigen kanker-testis untuk antigen (De Plaen *et al.*, 1994; van Baren N *et al.*, 1999, Jungbluth AA *et al.*, 2000, Luo G *et al.*, 2002). Gen kanker testis pertama kali diisolasi dari melanoma. Gen ini dikenal sebagai gen melanoma antigen (MAGE) (Kumar V, *et al.* 2005).

Saat ini telah ditemukan beberapa gen kanker testis seperti Superfamily MAGE, family SSX, GAGE, BAGE, SCP-1, NY-ESO-1, CTP11, dan HCA587 (Zhao L., *et al.*, 2004). Famili gen MAGE terdiri dari 17 gen yang dikategorikan menjadi tiga kelompok yaitu MAGE-A, MAGE-B, dan MAGE-C. MAGE-A beranggotakan 12 gen, termasuk MAGE-1 (yang juga dikenal dengan MAGE-A1) terletak pada regio Xq28. MAGE-B terdiri dari 4 gen yang terletak pada regio Xp21.3 dan MAGE-C1 baru dikenal terletak pada pita Xq26 (Kim YM, *et al.* 2001 dan Chen H, *et al.* 2000).

Gen kanker testis mempunyai beberapa kekhususan yaitu 1) terutama hanya diekspresikan oleh jaringan tumor tetapi tidak diekspresikan pada jaringan normal kecuali pada testis (Van Der Bruggen P, *et al.* 1991; Van Baren N, *et al.* 1999; Chen H, *et al.* 2000; Xiao J, *et al.* 2005; Lv J, *et al.* 2002). 2) gen yang mengkode antigen kanker testis terletak pada kromosom X sehingga ekspresi gen tersebut tidak tergantung pada jenis kelamin penderita (Zhao L, *et al.* 2004; Chen H, *et al.* 2000).

MAGE-1 termasuk antigen yang dikode oleh famili gen MAGE. Pertama kali diisolasi dari sel line melanoma manusia sebagai gen pengkode peptida antigen yang dipresentasikan pada klon sel T cytotoksik autologous oleh molekul HLA-A1. Ujung telomer dari semua famili gen ini terletak pada lengan kromosom X yang berdekatan, sehingga semua famili gen ini homolog (Van Baren N, *et al.* 1999).

mRNA MAGE-1 terdiri dari 1722, yang meliputi exon 1, 2, dan 3. Area koding (*CoDing Sequence/ CDS*) terletak pada exon 3 yaitu pada nukleotida 188 sampai 1117 mensintesis 309 asam amino (Strusberg RL, *et al.*, 2002). Sekuen mRNA MAGE-1 dapat diakses di *genbank* dengan *accession number* [M77481](#), [AY148486](#), [AF463515](#), [NM 004988](#), dan [BC017555](#). Sekuen DNA genom MAGE-1 dapat diakses di *genbank* dengan *accession number* [AC152005](#), dan [AC153070](#).

Gen MAGE-1 menjadi aktif pada sel tumor sebagai hasil dari hipometilasi CpG dinukleotida. Mekanisme aktivasi gen MAGE-1 yaitu melalui proses hipometilasi pada 2 *element promoter* MAGE-1 yaitu B' dan B yang terletak pada *up stream* -63 sampai dengan -46. Dua *element promoter* MAGE-1 ini mempunyai sisi *binding* dengan faktor transkripsi Ets. CpG mengalami hipometilasi pada kultur sel tumor yang mengekspresikan MAGE-1, tetapi mengalami metilasi pada sel normal dan kultur sel tumor yang tidak mengekspresikan MAGE-1. Metilasi pada CpG menghambat *binding* faktor transkripsi dengan *element promotor* yang menghasilkan hambatan ekspresi MAGE-1 (*gene silent*). Hipometilasi CpG pada kultur sel yang mengekspresikan MAGE-1 menyebabkan faktor transkripsi Ets *binding* dengan *element promoter* B' dan B yang menyebabkan aktivasi transkripsi MAGE-1 (De Smet C, *et al.* 1996; 1999; 2004; Xiao J, *et al.* 2005; Zhang J, *et al.*, 2004) yang menghasilkan mRNA MAGE-1. Ekspresi MAGE-1 pada sel non tumor dapat diinduksi secara eksperimental dengan menggunakan *agent* yang bisa menyebabkan demetilasi DNA yaitu 5-aza-2'-deoxycytidine. Ini menunjukkan bahwa demetilasi pada CpG merupakan mekanisme umum yang menyebabkan ekspresi MAGE-1 (Van Baren N, *et al.* 1999).

Protein MAGE-1 terletak di sitoplasma kemudian sebagian ditranslokasi ke nukleus sel untuk mencegah transkripsi sehingga menghambat ekspresi gen. Sebagian disekresikan sebagai antigen bersama dengan MHC kelas I dan II (Laduron S, *et al.* 2004).

Penelitian untuk mengungkap fungsi MAGE-1 diungkap dengan melihat interaksi MAGE-1 dengan SKIP. SKIP merupakan regulator transkripsi yang menghubungkan *DNA-binding protein* dengan protein yang berperan mengaktivasi atau menekan transkripsi yang berhubungan dengan *signaling pathway* vitamin D, retinoic acid, estrogens, gluco corticoid, Notch1-1C, TGF β . SKIP berinteraksi dengan Notch1 dan Notch1 merekrut *histon acetyl transferase* (HAT) membentuk kompleks Notch1/HAT yang menyebabkan transkripsi berjalan (*on*). Namun jika SKIP berikatan dengan SMRT dan SMRT merekrut *histon deacetylase 1* (HDAC1) membentuk kompleks SMRT/HDAC1 maka transkripsi akan berhenti

(off). HAT dan HDAC merupakan enzim yang berperan dalam *on/off* asetilasi untuk meregulasi transkripsi (Laduron S, *et al.*, 2004).

MAGE-1 menghambat ikatan SKIP dengan Notch1 untuk menekan transkripsi secara aktif dengan cara berikatan dengan *Ski Interacting Protein* (SKIP) melalui bagian C *terminal*. Hambatan interaksi SKIP dan Notch1 ini membutuhkan interaksi antara MAGE-1 dengan SKIP. MAGE-1 *binding* dan *recruiting* *histone deacetylase 1* (HDAC1) sehingga transkripsi tidak terjadi. Jadi peran MAGE-1 dalam menekan transkripsi gen yaitu dengan *binding* dengan SKIP dan *recruiting* HDAC1 (De Plaen, *et al.*, 2002; Laduron S, *et al.*, 2004).

Protein MAGE-1 mengandung peptida epitop yang dapat *binding* dengan tipe haploid HLA I termasuk molekul HLA-A1, B3701, A2.1, A3.2, Cw*1601, dan A24. Peptida yang *binding* dengan molekul HLA-A1, B3701, Cw*1601, dan A24 tampak diproses dan dipresentasikan pada permukaan sel sehingga dapat digunakan sebagai target potensial untuk imunoterapi spesifik (Chen H, *et al.* 2000). Kombinasi peptida antigen kanker testis dan *Human Leukosit Antigen* (HLA) ketika dipresentasikan oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) terhadap sel T sitotoksik (CTL) mampu memicu respons imun seluler pada penderita kanker (Zhao L, *et al.* 2004).

Gen MAGE-A1, A2, A3, A4, A6, A10 dan A12 sering diekspresikan pada beberapa tumor seperti pada melanoma, *bladder carcinoma*, *non-small cell lung carcinoma*, *head and neck carcinoma*, *squamous cell carcinoma esophagus*, tetapi tidak diekspresikan pada jaringan normal kecuali pada testis (Van Baren N, *et al.* 1999). Gen MAGE-1 diekspresikan pada kanker lambung (Ries J, *et al.* 2005; Kim YM, *et al.* 2001; Chen XH, *et al.* 2004; Kong U, *et al.* 2004; Li J, *et al.* 1996), pada kanker colorectal (Li M, *et al.* 2005), oral squamous carcinoma (Chi SN, *et al.* 2002), kanker paru (Sakata M, 1996) dan kanker ginjal (Yamanaka K, *et al.* 1998).

Kesimpulan

Primer MAGE A1-10 dapat mendeteksi kanker yang mengekspresikan paling sedikit satu gen MAGE A dari 10 variant gen MAGE A. Marker molekuler ini mungkin dapat digunakan sebagai tool baru untuk mendeteksi ekspresi gen MAGE pada kanker.

Conflict Interest Statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by a grant from the Ministry of Research Technology and Higher Education of the Republic of Indonesia at 2017 No Thanks for the Republic of Indonesia Government and Airlangga University.

References

- Baylin, S. B., J. G. Herman, J. R. Graff, P. M. Vertino, And J. P. Issa. 1998. Alterations in DNA Methylation: A Fundamental Aspect of Neoplasia. *Cancer Res.* 72:141–196.
- Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, Schroeder I, Factor VM, Dan Thorgeirsson SS, 2007. Mechanistic and Prognostic Significance of Aberrant Methylation in The Molecular Pathogenesis Of Human Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Invest.* 117:2713–2722.
- Chen H, Cai S, Wang Y, Zhao H, Peng J, Du R, Wang Y, Vaughan H, Cebon J, Burgess AW, Chen W, 2000. Expression of the MAGE-1 Genes in Human Hepatocellular Carcinomas. *Chinese Medical Journal*, 13(12):1112-8.
- Chen XH, Liu BY, Zhang DQ, Zhang Y, Li JF, Zhu ZG, 2004. Expression of MAGE-1 and MAGE-3 Genes in Gastric Cancer and Gastric Tissue and Its Clinical Significance. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Za Zhi*, May; 20(3):310-3
- Chi SN, Cheung NK, Cheung IY, 2002. Expression of SSx-2 and SSX-4 Genes in Neuroblastoma. *Int J Biol Markers*, Oct-Dec;17(4):219-23.
- De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T, 1996. The Activation of Human Gene MAGE-1 in Tumor Cells is Correlated With Genome-Wide Demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93;7149-53.
- De Plaen E, De Smet C, Loriot A, Kholmanskikh O, Blondiaux C, 2002. Genes Expresses in Cancer and Germline Cells. www.icp.ucl.ac.be/reports/2002/de_plaen.pdf.
- Dunn Bk, 2003, Epigenetics in Cancer Prevention: Early Detection and Risk Assessment Hypomethylation: One Side of A Larger Picture, *Ann N Y Acad. Sci.* 983: 28-42.
- Ehrlich M, 2002. DNA Methylation in Cancer: Too Much, But Also Too Little, *Oncogene*;21: 5400 – 5413.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers S, Rebelo M, Parkin MD, Forman D, Bray F, 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9.
- Gruselle O, Coche T, Louahed J. Development of a Quantitative Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of MAGE-A3-Positive Tumors. *J Mol Diagn.* 2015 Jul;17(4):382-91. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.03.008. Epub 2015 May 15.

- Jang SJ, Soria JC, Wang L, Hassan KA, Morice RC, Walsh GL, Hong WK, Mao L., 2001. Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001 Nov 1;61(21):7959-63.
- Jheon S, Hyun DS, Lee SC, Yoon GS, Jeon CH, Park JW, Park CK, Jung MH, Lee KD, Chang HK. Lung cancer detection by a RT-nested PCR using MAGE A1--6 common primers. *Lung Cancer.* 2004 Jan;43(1):29-37.
- Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, et al. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer* 2000; 85:460-5.
- Luo G, Huang S, Xie X, Stockert E, Chen Y, Kubuschok B, Pfreundschuh M, 2002. Expression of Cancer Testis Genes in Human Hepatocellular Carcinomas, cancer Immunity 2:11.
- Karimi S, Mohammadi F, Porabdollah M, Mohajerani SA, Khodadad K, Nadji SA Characterization of melanoma-associated antigen-a genes family differential expression in non-small-cell lung cancers. *Clin Lung Cancer.* 2012 May;13(3):214-9. doi: 10.1016/j.clcc.2011.09.007. Epub 2011 Dec 3.
- Kim HR, Kim TH, Chung JH, Yoon HI, Lee CT, Kang CH, Jheon S, Sung SW, Kim JH, Jeon C. The detection of peripheral lung cancer by MAGEA1-6 RT-nested PCR in bronchial washings specimens. *Lung Cancer.* 2009 Aug;65(2):166-9. doi: 10.1016/j.lungcan.2008.11.001. Epub 2009 Jan 24.
- Kim YD, Park HR, Song MH, Shin DH, Lee CH, Lee MK, Lee SY. Pattern of cancer/testis antigen expression in lung cancer patients. *Int J Mol Med.* 2012 Apr;29(4):656-62. doi: 10.3892/ijmm.2012.896. Epub 2012 Jan 24.
- Kim YM, Lee YH, Shin SY, Kim EH, Choi YW, Lee KM, Park JH, Lee YU, Seel DJ, Kim MC, 2001. Expression of MAGE-1, -2 and -3 Genes in Gastric Carcinomas and Cancer Cell Lines Derived from Korean Patients. *J Korean med Sci*; 16:62-68.
- Kong U, Koo J, Choi K, Park J, Chang H., 2004. The Expression of GAGE Gene Can Predict Aggressive Biologic Behavior of Intestinal Type of Stomach Cancer. *Hepatogastroenterology.* Sep-Oct;51(59):1519-23.
- Li J, Yang Y, Fujie T, Baba K, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T, 1996. Expression of BAGE, GAGE and MAGE Genes in Human Gastric Carcinoma. *Clin Cancer Res*, Sep;2(9):1619-25.
- Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J, 2005. Expression Profile of Cancer Testis Genes in 121 Human Colorectal Cancer Tissue and Adjacent Normal Tissue. *Clin cancer res*, mar 1;11(5):1809-14.
- NCCN Guidelines Version 4.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Non-Small Cell Lung Cancer Version 4.2016. diakses di https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf tanggal 05/02/2016.
- NCCN Guidelines Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Lung Cancer Screening Version 2.2016. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/lung_screening.pdf diakses tanggal 05/02/2016.

- Park JW, Kwon TK, Kim IH, Sohn SS, Kim YS, Kim CI, Bae OS, Lee KS, Lee KD, Lee CS, Chang HK, Choe BK, Ahn SY, Jeon CH. A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. *J Immunol Methods*. 2002 Aug 1;266(1-2):79-86.
- PDPI, 2003. Kanker Paru Pedoman Diagnosis dan Penatalaksanaan di Indonesia. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2003.
- Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebil E, Wiltfang J, 2005. Investigation of the Expression of Melanoma Antigen-Encoding Genes (MAGE-A1, to A6) in Oral Squamous Cell Carcinomas to Determine Potential Targets for Gene-Based Cancer Immunotherapy. *Int J Oncol Mar*; 26:817-24.
- Sakata M, 1996. Expression of MAGE Gene Family in Lung Cancers. *Kurume Med J*, 43(1):55-61.
- Shin KC, Lee KH, Lee CH, Shin IH, Suh HS, Jeon CH. MAGE A1-A6 RT-PCR and MAGE A3 and p16 methylation analysis in induced sputum from patients with lung cancer and non-malignant lung diseases. *Oncol Rep*. 2012 Apr;27(4):911-6. doi: 10.3892/or.2011.1566. Epub 2011 Nov 29.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A, 2015. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 65(1):5-29. doi: 10.3322/caac.21254. Epub 2015 Jan 5.
- Sugita M, Geraci M, Gao B, Powell RL, Hirsch FR, Johnson G, Lapadat R, Gabrielson E, Bremnes R, Bunn PA, Franklin WA. Combined use of oligonucleotide and tissue microarrays identifies cancer/testis antigens as biomarkers in lung carcinoma. *Cancer Res*. 2002 Jul 15;62(14):3971-9.
- Tajima K, Obata Y, Tamaki H, Yoshida M, Chen YT, Scanlan MJ, Old LJ, Kuwano H, Takahashi T, Takahashi T, Mitsudomi T. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer*. 2003 Oct;42(1):23-33.
- Tsai JR, Chong IW, Chen YH, Yang MJ, Sheu CC, Chang HC, Hwang JJ, Hung JY, Lin SR. Differential expression profile of MAGE family in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2007 May;56(2):185-92. Epub 2007 Jan 17.
- van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Hames G, Ferrant A, Lehmann F, Andre M, Ravoet C, Doyen C, Spagnoli GC, Bakkus M, Thielemans K, Boon T., 1999. Genes Encoding Tumor-Specific Antigens are Expressed in Human Myeloma cells. *Blood*. Aug 15;94(4):1156-64.
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991 Dec 13;254(5038):1643-7.
- Xiao J, Chen HS, Fei R, Cong X, Wang LP, Wang Y, Jiang D, Wei L, and Wang Y, 2005. Expression of MAGE-A1 mRNA is Associated with Gene Hypomethylation in Hepatocarcinoma Cell Lines, *J Gastroenterol*, 40:716–721.
- Yamanaka K, Miyake H, Hara I, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S, 1998. Expression of MAGE Genes in Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Med*. Jul;2(1):57-60.

Zhang J, Yu J, Gu J, Gao BM, Zhao YJ, Wang P, Zhang HY, Zhu DJ, 2004. A Novel Protein-DNA Interaction Involved with The CpG Dinucleotide At -30 Upstream Is Linked To The DNA Methylation Mediated Transcription Silencing Of The Mage-A1 Gene, Cell Research, 14 (4): 283-294.

Lampiran 2. Draf Publikasi

The expression of MAGE A11 and A12 in lung cancer

Gondo Mastutik^{1*}, Alphania Rahniayu¹, Isnin Anang Marhana², Irmu Syafaah², Mochamad Amin³ and Suhartono Taat Putra¹

¹Department of Anatomic Pathology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga Indonesia

²Department of Pulmonology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga Indonesia

³Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga Indonesia

*Corresponding author:

Dr. Gondo Mastutik, Department of Anatomic Pathology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga Indonesia.

E-mail: gondomastutik@fk.unair.ac.id; gondomastutik@gmail.com

ABSTRACT

The melanoma antigen (MAGE) gene, expressed in cancer cells and in testicular tissue, consist of 12 variants that called MAGE A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 (pseudo gene), A8, A9, A10, A11, and A12. The mRNA MAGE A can be identified using the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

The objective of this study was to develop the molecular strategy for detecting the mRNA of MAGE A1-A10 use the universal primer for MAGE A1-10 in the one tube. This research used testicular tissue from patients who had received the orchidectomy therapy at Dr Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. Identification of MAGE A1-A10 mRNA was performed by RT-PCR technique using the universal primer for MAGE A1-A10. MAGE A1, A2, A3, A4, A5, A6, A8, A9, and A10 variants mRNA were detected using primer set of GMF10/GMR10 for the first round and primer set of GMF10/GMR12 for the second round. Primer set of MMRP1/MMRP2 was used as a comparison for MAGE A1-6 mRNA identification. The mRNA from testicular tissue was extracted, followed by RT-PCR. The PCR result was electrophoresed with 2% agarose gel. The PCR products of primer pair GMF10/GMR10 ranging from 823-919 base pair (bp) whereas products of GMF10/GMR12 were 461-557bp in size depending on the variants of MAGE A1-A10. The next optimization test was RNA total dilution test. Total RNA concentration of 133.4 ng/ml was used for dilution with a ratio of 1:10, 1:100, 1:1000. The all of the MAGE A1-A10 mRNA can be detected together in the same tube PCR. This common primer can be used as a biomolecular tool for identification the all variants of MAGE A1-A10 mRNA in cancer cells.

Keywords: MAGE A1-A10 mRNA, common primer, testicular tissue, cancer testis antigen, RT-PCR

Introduction

Gen melanoma antigen (MAGE) disebut sebagai gen kanker testis antigen karena hanya diekspresikan pada sel kanker dan jaringan testis normal yaitu pada spermatid dan spermatogonia. Ada juga yang menyebutkan bahwa gen ini juga diekspresikan pada plasenta (De Plaen *et al.*, 1994; Van Baren N *et al.*, 1999, Jungbluth AA *et al.*, 2000, Luo G *et al.*, 2002). Gen MAGE tipe I yaitu MAGE A, MAGE B, MAGE C yang diekspresikan pada terbatas pada jaringan *germ* yaitu spermatosit, plasenta, dan beberapa stadium dalam perkembangan embrio. Gen MAGE tipe II yaitu MAGE D yang diekspresikan secara umum pada jaringan tubuh (Karimi S, *et al.*, 2012). Gen MAGE A diekspresikan pada banyak jaringan kanker. Gen MAGE A1 diekspresikan pada kanker lambung (Ries J, *et al.* 2005; Kim YM, *et al.* 2001; Chen XH, *et al.* 2004; Kong U, *et al.* 2004; Li J, *et al.* 1996), pada kanker *colorectal* (Li M, *et al.* 2005), *oral squamous carcinoma* (Chi SN, *et al.* 2002), kanker paru (Sakata M, 1996) dan kanker ginjal (Yamanaka K, *et al.* 1998). Gen MAGEA1, A2, A3, A4, A6, A10 dan A12 sering diekspresikan pada beberapa tumor seperti pada melanoma, *bladder carcinoma*, *non-small cell lung carcinoma*, *head and neck carcinoma*, *squamous cell carcinoma esophagus*, tetapi tidak diekspresikan pada jaringan normal kecuali pada testis (Van Baren N, *et al.* 1999). Sel kanker paru, baik pada *small cell lung cancer* (SCLC) atau *non small cell lung cancer* (NSCLC), mengekspresikan molekul MAGE A (Sugita M, *et al.*, 2002; Tajima K, *et al.*, 2003; Tsai JR, *et al.*, 2007, Kim YD, *et al.*, 2012; Shin KC, *et al.*, 2012; Karimi S, *et al.*, 2012). Gen MAGE A diekspresikan pada sel kanker NSCLC dan sel di sekeliling jaringan kanker yang secara histopatologi tampak normal (Karimi S, *et al.*, 2012). Sel epitel bronchial dari perokok juga mengekspresikan salah satu gen MAGE A (Jang SJ, *et al.*, 2001). Aktivasi transkripsi gen MAGE A menghasilkan mRNA MAGE A dapat diidentifikasi dengan teknik *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT PCR). Hal ini menunjukkan bahwa mRNA MAGE A dapat berguna untuk deteksi dini kanker paru dan juga untuk skrining kanker paru. Ekspresi gen MAGE A berpotensi sebagai *marker* molekuler untuk pengembangan *marker* deteksi dini kanker paru.

Gen MAGE A terdapat 12 variant yaitu MAGE A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12. Ekspresi gen MAGE A pada kanker paru dapat dideteksi dengan menggunakan primer universal MAGE A yaitu mampu mendeteksi MAGE A variant A1, A2, A3, A4, A5, A6 dengan teknik *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT PCR) *nested PCR*. Gen MAGE yang paling diekspresikan pada jenis *adenocarcinoma* paru secara berurutan yaitu A2, A7, A11, B6, D2, H1, sedangkan pada jenis *squamous cell carcinoma* secara berurutan yaitu A2, A8, A7, B2, A4, A11 (Tsai JR, *et al.*, 2007). Ekspresi MAGE A1, A3, A6, A12, 4b juga ditemukan pada NSCLC dan SCLC (Sugita *et al.*, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa selain MAGE A1-6, juga masih ada variant MAGE A lain yaitu MAGE A8, A9, dan A10 yang juga diekspresikan pada kanker paru, baik jenis NSCLC atau SCLC. Hal ini menjadi penting jika ekspresi MAGE A ini digunakan sebagai *marker* diagnosis atau deteksi dini. Semakin banyak variant gen MAGE A yang dapat diidentifikasi maka

diagnosis bisa dilakukan lebih dini sehingga memberikan dampak prognosis yang lebih bagus. Primer universal yang ada saat ini hanya mampu mendeteksi ekspresi gen MAGE variant A1 sampai A6, padahal variant lain gen MAGE yaitu variant A8, A9, dan A10, juga banyak diekspresikan pada beberapa jenis kanker, termasuk kanker paru. Oleh karena itu diperlukan perancangan primer universal yang mampu mengidentifikasi ekspresi gen MAGE A variant A1 sampai A10 pada kanker paru. Penelitian eksplorasi laboratorik yang bertujuan untuk identify the expression of MAGE A11 and A12 in lung cancer

Metode penelitian

Spesimen Penelitian

Spesimen yang digunakan pada penelitian ini yaitu jaringan testis yang diperoleh dari pasien mendapatkan terapi orchidectomy dan jaringan paru dari nodul suspect kanker paru dari hasil core biopsi paru dari Rumah Sakit Dr Soetomo Surabaya. Diperoleh 18 spesimen hasil core biospi dari pasien suspek kanker paru.

Design Primer

Perancangan primer universal MAGE A11 dan A12 pada penelitian ini dilakukan berdasarkan pada sekuen mRNA gen target dengan memilih area antara exon 1, 2, dan 3. Area yang paling bervariasi pada gen MAGE yaitu area pada exon 1 dan 2, sedang exon 3 merupakan bagian *coding region* gen yang sekuennya hampir sama diantara semua *family* gen MAGE A. Jika dilakukan perancangan *primer* pada area exon 3 saja maka dikhawatirkan yang teramplifikasi bukan mRNA MAGE A tetapi gen MAGE A sehingga pada penelitian ini *primerforward* dirancang untuk menempel pada sekuen exon 1 bersama exon 2 dan *primerreverse* dirancang menempel pada exon 3 atau exon 2.

Gen MAGE A11 dan A12 memiliki sekuen mRNA yang memiliki homology yang berbeda dengan sekuen gen MAGE A1-10 sehingga dalam hasil design primer MAGE A11 dan A12 tidak bisa dilakukan secara bersamaan dengan gen MAGE A yang lain. Hasil design primer pada penelitian ini yaitu untuk mendeteksi mRNA varian MAGE A1-10 menggunakan pasangan primer GMF10 dan GMR10 untuk first round dan GMF10 dengan GMR12 untuk second round (Tabel 1).

Pasangan primer GMF10/GMR10 pada first round menghasilkan produk 823-919bp dan GMF10/GMR12 pada second round 461-557 bp tergantung pada jenis MAGE A (Tabel

2), digunakan untuk identifikasi ekspresi mRNA MAGE A1-10. Pasangan primer MMRP1/MMRP2 pada first round menghasilkan produk 852 bp dan MMRP3/MMRP4 pada second round menghasilkan produk 469-490, digunakan sebagai pembanding untuk identifikasi ekspresi mRNA MAGE A1-6.

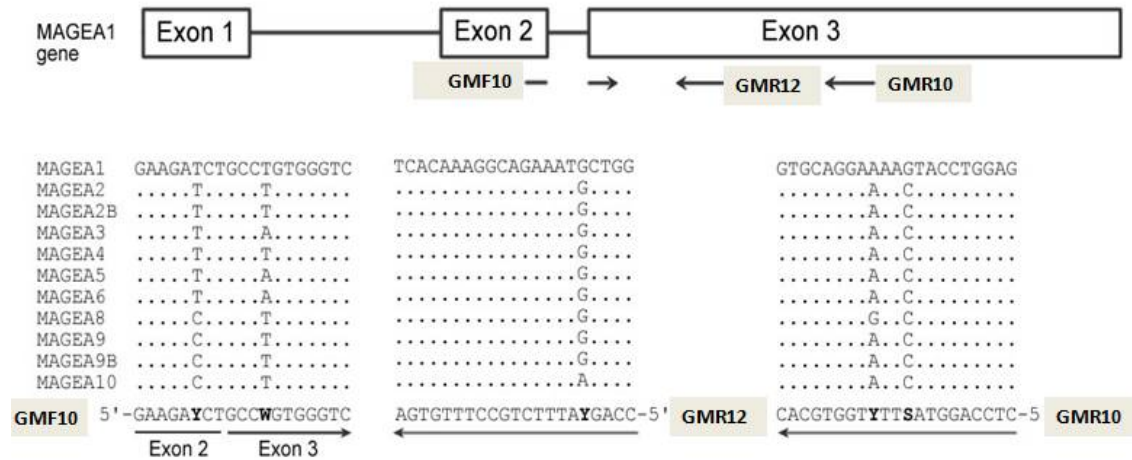


Figure 1. The primer position of primer MAGE A11 dan A12

Tabel 1. The primer use for RT PCR of mRNA MAGE A11 and A12

Gene	Round	Primer pair	Amplicon Length (bp)	Tm(°C)	Sequence of Primer (5'→3')
GAPD	First	GAPD-F vs GAPD-R	320	60	GAPD-F: TCGGAGTCAACGGATTTGGTCGTA GAPD-R: CAAATGAGCCCCAGCCTTCTCCA
MAGE A11	First	GMF11 vs GMR11	858	63-64	GMF11: GGAGGAGAACAAGTGTCTGTTG GMR11: CACCAGGTACTTTTCTGCAC
MAGE A11	Second	GMF11 vs GMR12	496	63-64	GMF11: GGAGGAGAACAAGTGTCTGTTG GMR12: CCAGYATTTCTGCCTTTGTGA
MAGE A12	First	GMF12 vs GMR10	858	62-64	GMF12: CCAAGCATCCAGGTTCTGAGG GmR10: CTCCAGGTASTTYTCTGCAC
MAGE A12	Second	GMF12 VS GMR12	496	63-64	GMF12: CCAAGCATCCAGGTTCTGAGG GMR12: CCAGYATTTCTGCCTTTGTGA

GAPD = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, MAGE = melanoma-associated gene, Tm = melting temperature, bp = base pair

Nested PCR

RNA dari jaringan testis dan jaringan paru hasil core biopsi diekstraksi menggunakan RNAeasy Plus Mini Kit berdasarkan instruksi pabrik sehingga diperoleh total RNA (Qiagen). Kadar

RNA diukur dengan nanodrop (...). Total RNA kemudian disimpan pada -20°C sampai akan digunakan.

Reverse Transcription PCR dilakukan dengan kit ReverTraAce[®]qPCR RT Masater mix with gDNA remover (Toyobo, Japan). Total 14 μl reaksi yang terdiri dari 4x DNA master mix yang sudah dicampur dengan gDNA remover 2 μl , RNA template 6 μl 5xRT master mix II 3 μl , dan nuclease free water 3 μl . Reaksi mix diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 42°C selama 50 menit, stop reaksi dilakukan pada suhu 98°C selama 5 menit. cDNA kemudian disimpan pada -20°C sampai akan digunakan.

Amplifikasi yang pertama dilakukan dalam 20 μl yang terdiri dari master mix 10 μl , primer forward 1 μl , primer reverse 1 μl , nuclease free water 5 μl , cDNA template 3 μl . Konsentrasi primer yaitu 10 pmoles/ μl . Siklus PCR yaitu pre denaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, annealing primer 57°C selama 45 detik, extension 72°C selama 45 detik, dan final extension 72°C selama 7 menit. PCR dilakukan selama 40 siklus kemudian dielektroforesis dengan gel 2 %.

Hasil PCR dari sampel jaringan testis dikonfirmasi dengan sekuensing dan hasil dibandingkan dengan yang terdapat di Gen Bank NCBI

Identifikasi mRNA MAGE A1-10 dengan MAGE A primer universal

Identifikasi mRNA MAGE A1-12 dilakukan menggunakan primer universal MAGE A1-10 pada jaringan kanker paru dengan specimen jaringan kecil dari hasil *core biopsy* kanker paru. Kontrol positif yaitu jaringan testis normal dan kontrol jumlah mRNA yang terdapat pada sampel yaitu konsentrasi RNA gen *housekeeping* (gen GADP).

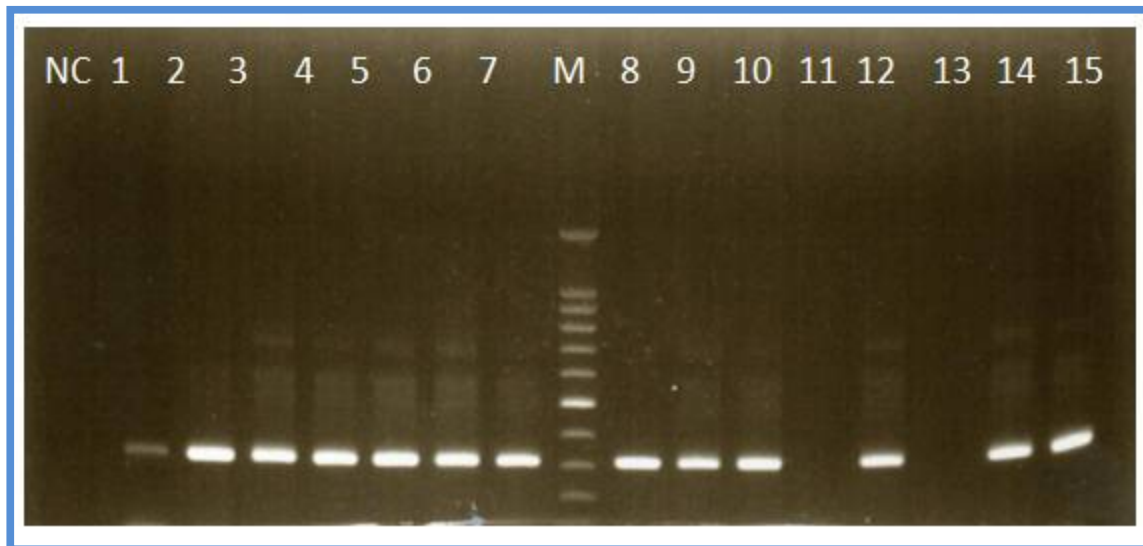
Sampel dikumpulkan dengan teknik *constitutive sampling* yaitu semua penderita kanker tersebut selama 6 bulan waktu penelitiandigunakan untuk penelitian. Sampel kanker paru dari *core biopsy* digunakan pada penelitian ini. Sampel *core biopsy* dibagi menjadi dua bagian yaitu satu bagian dimasukkan ke dalam tabung berisi buffer formalin 10%, kemudian diposes untuk menjadi slide HE dan digunakan untuk diagnosis histopatologi. Satu bagian *core biopsy* dimasukkan ke dalam tube dan dimasukkan box ice kemudian segera dikirim ke laboratorium tempat pemeriksaan ekspresi gen MAGE A dan disimpan di suhu -70°C sampai digunakan untuk ekstraksi RNA

Hasil dan Pembahasan

Sampel dari core biopsi itu sangat sedikit yaitu sebesar benang rajut dengan panjang maksimal 1 cm sehingga dalam pelaksanaan penelitian perlu dilakukan seefisien mungkin. Ukuran sampel yang sangat kecil ini akan digunakan untuk PCR menggunakan pasangan primer untuk identifikasi MAGE A1-6, Mage Universal MAGE A1-10 hasil rancangan baru, MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE 6, MAGE A8, MAGE A9, dan MAGE A10.

Primer universal MAGE A1-10 setelah diujikan pada sampel jaringan testis menunjukkan pita sekitar 823-9191bp, sedangkan primer MMRP 1/MMRP2 menunjukkan pita sekitar 852bp (Gambar 1). Uji optimasi selanjutnya yaitu uji dilusi total RNA. Kada total RNA yaitu 133,4 ng/ μ l. total RNA tersebut digunakan dilusi yaitu perbandingan 1:10, 1:100, 1:1000. (gambar 2).

PCR GAPD from Core Biopsi Sampel of Lung Cancer Patients



Hasil:

Primer yang digunakan..gambar posisi primer

Hasil PCR primer tersebut dari sampel testis utk second round MAGE A11 dan Mage A12 → gambar ELP nya dan gambar sekeuning nya

Hasil PCR pada sampel lung cancer... 18 sampel dijejer utk MAGE A12.

Karakteristik pasi