

## KAJIAN PUSTAKA: METODE IDENTIFIKASI PENANDA BIOLOGIS FESES PADA KANKER KOLOREKTAL

Anton Sumarpo<sup>1\*</sup>, Penny Setyawati Martioso<sup>1</sup>, Fenny<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha

\*Email Korespondensi : anton.sumarpo@med.maranatha.edu

**Abstract: Methods For Identification of Biological Markers In Colorectal Cancer.** *Colorectal cancer is one of the leading causes of cancer deaths worldwide. Colorectal cancer is a type of malignancy with survival rates that are closely related to the momentum of diagnosis. Clinical findings supported by laboratory examination results can initiate suspicion of colorectal cancer and trigger suggestions for further examination, so identifying biological markers for appropriate early detection is important. This literature review will discuss various methods and research stages to identify candidate fecal biomarkers for colorectal cancer.*

**Keywords :** *Biological Marker, Colorectal Cancer, Proteomics*

**Abstrak: Metode Identifikasi Penanda Biologis Feses Pada Kanker Kolorektal.** Kanker kolorektal adalah salah satu penyebab kematian utama akibat kanker di seluruh dunia. Kanker kolorektal adalah jenis keganasan dengan tingkat kelangsungan hidup yang berkaitan erat dengan momentum penegakan diagnosis. Temuan klinis yang ditunjang dengan hasil pemeriksaan laboratorium dapat mengawali dugaan akan kanker kolorektal dan mencetus saran untuk pemeriksaan lanjutan, sehingga identifikasi penanda biologis untuk deteksi awal yang tepat menjadi penting. Tinjauan pustaka ini akan membahas mengenai berbagai metode dan tahapan penelitian untuk mengidentifikasi kandidat penanda biologis feses untuk kanker kolorektal.

**Kata Kunci :** Kanker Kolorektal, Penanda Biologis, Proteomik

### PENDAHULUAN

Kanker kolorektal (*colorectal cancer*, CRC) menempati peringkat keempat dalam jumlah kasus baru dengan angka kematian sebesar 6.7 per 100.000 penduduk Indonesia pada tahun 2020 menurut *Global Cancer Observatory* (Ferlay J et al., 2020). Mayoritas kasus kanker kolorektal terjadi secara sporadis pada individu yang tidak memiliki riwayat keluarga yang menderita kanker kolorektal atau mutasi genetik herediter yang meningkatkan risiko timbulnya kanker kolorektal (de Palma et al., 2019; Jaspersen et al., 2010; Keum & Giovannucci, 2019).

Sampel feses telah banyak digunakan sebagai spesimen biologis untuk mengidentifikasi berbagai penyakit pencernaan, salah satunya kanker kolorektal. Hal ini ditunjang oleh beberapa keuntungan penggunaan sampel feses, yaitu metode

pengumpulannya tidak invasif, dapat dilakukan di rumah, jumlahnya tidak terbatas, dapat mewakili seluruh bagian dalam dinding usus secara efektif, dan mudah dipindahkan (Ang et al., 2017).

Di satu sisi, pengumpulan sampel feses masih terasa kurang nyaman bagi pasien, sehingga diperlukan edukasi lebih lanjut (Lecky et al., 2014). Selain itu, perlu preparasi sampel yang tepat untuk menormalkan ukuran dan konsistensi sampel feses sebelum dapat dilakukan analisa (Jin et al., 2017). Metode ekstraksi protein yang mudah dan efisien juga penting untuk mendapatkan hasil yang jelas dan dapat dipercaya (Ang et al., 2017).

Sebagai metode skrining yang potensial, uji molekuler feses yang dilakukan harus seefektif mungkin untuk dapat menurunkan frekuensi pemeriksaan penunjang dengan kolonoskopi yang meskipun memiliki

selektifitas dan sensitifitas yang tinggi, namun bersifat invasif, mahal, memerlukan petugas terlatih serta memiliki resiko kesakitan dan kematian (Ang et al., 2017; Davies et al., 2005). Untuk itu, diperlukan marka biologis feses yang tepat untuk mendeteksi adanya kejadian kanker kolorektal, melalui proses optimisasi dan validasi terhadap target populasi yang dikehendaki (Jin et al., 2017).

Berbagai metode proteomik yang sensitif dan spesifik telah dikembangkan untuk menemukan dan memvalidasi marka biologis, misalnya penggunaan spektroskopi massa (*mass spectroscopy*, MS), elektroforesis berbasis gel ataupun tanpa gel, serta *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Alvarez-Chaver et al., 2014; Jin et al., 2017). Tahapan penelitian dan perbandingan metode proteomik akan dibahas pada kajian pustaka ini.

## METODE

Metode yang digunakan dalam dalam penulisan naskah ini adalah studi literatur. Penelusuran pustaka pendukung dilakukan menggunakan *online database* seperti PubMed, *Google Scholar*, dan *Web of Science* yang dipublikasikan dalam 10 tahun terakhir dengan kata kunci "*fecal biomarker identification methods*" dan "*colorectal cancer*".

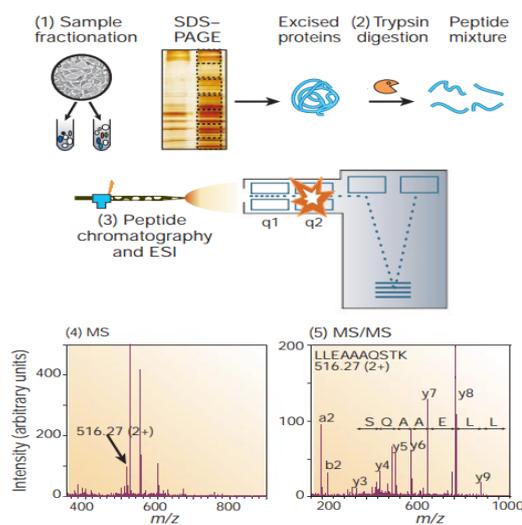
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Tahapan Penelitian Proteomik

Umumnya, penelitian proteomik terdiri dari lima tahap (Gambar 1). Pada tahap pertama, protein akan diisolasi dari sel atau jaringan menggunakan fraksinasi biokimia atau seleksi afinitas. Tahap ini umumnya diakhiri dengan penggunaan gel elektroforesis sehingga diperoleh '*sub-proteome*' untuk analisa selanjutnya. Pada tahap kedua, protein akan didegradasi menggunakan enzim menghasilkan campuran peptida menggunakan tripsin.

Pada tahap ketiga, peptida akan dipisahkan menggunakan satu atau lebih metode HPLC dan dielusikan melewati *electrospray ion source* menghasilkan droplet kecil yang bermuatan besar. Setelah dievaporasi, peptida bermuatan tersebut akan dilewatkan melalui spektroskopi massa, dimana pada tahap keempat akan menghasilkan spektrum massa dari peptida tersebut.

Tahap kelima menggunakan tandem MS/MS (*mass spectrometry/mass spectrometry*) untuk mengisolasi dan mengidentifikasi ion peptida atau fragmen peptida. Hasil akhirnya adalah identifikasi dari peptida dan protein tersebut (Aebersold & Mann, 2003).



**Gambar 1. Tahapan Penelitian Proteomik (Aebersold & Mann, 2003)**

## Metode Elektroforesis

Metode elektroforesis merupakan metode umum yang banyak digunakan untuk memisahkan dan menganalisis protein pada sampel biologis (Fritsch & Krause, 2003). Prinsip dari metode ini adalah pemisahan partikel bermuatan berdasarkan perpindahannya didalam medan listrik. Migrasi partikel bermuatan ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti ukuran partikel, bentuk, muatan serta suhu pemisahannya. Umumnya, pemisahan sampel protein menggunakan metode elektroforesis didasarkan pada perbedaan titik isoelektrik (*isoelectric point*) campuran protein dalam pH fase gerak yang stabil (Fritsch & Krause, 2003).

Elektroforesis dua dimensi tandem dengan spektroskopi massa juga dapat digunakan untuk mendeteksi ekspresi protein kompleks sampai dengan 10.000 protein, termasuk bentuk isoformnya (Jin et al., 2017). Pemisahan pada dimensi pertama memanfaatkan perbedaan titik isoelektrik protein, kemudian dilanjutkan pemisahan berdasarkan perbedaan berat molekulnya pada dimensi kedua (Jin et al., 2017).

Metode ini biasanya dikerjakan menggunakan SDS gel elektroforesis poliakrilamida (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS PAGE), yang kemudian dilanjutkan dengan pemotongan gel dan protein menjadi fraksi-fraksinya menggunakan LC-MS/MS (*liquid chromatography - mass spectrometry tandem mass spectrometry*) (Ang et al., 2017). Metode ini juga efisien untuk menganalisa protein yang memiliki muatan yang kuat.

Pendekatan lainnya adalah dengan menggunakan elektroforesis gel dua dimensi (2D) berfluoresensi, dimana sampel protein harus dimodifikasi terlebih dahulu menggunakan pewarna berfluoresensi dengan muatan dan massa yang telah disesuaikan (Jin et al., 2017). Metode ini dipercaya memiliki sensitivitas, akurasi dan reproduktibilitas yang baik,

namun relatif mahal dan memiliki keterbatasan untuk pemisahan gel-nya (Jin et al., 2017). Metode identifikasi dengan elektroforesis gel dua dimensi (2D) telah menghasilkan sejumlah kandidat penanda biologis feses untuk kanker kolorektal seperti S100A8 dan S100A9 (Kim et al., 2009; Ma et al., 2009).

## Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu teknik utama yang digunakan untuk menganalisa, memurnifikasi dan mengkarakterisasi beragam jenis molekul, termasuk protein dan peptida (Aguilar, 2004). Metode ini memiliki banyak kelebihan, seperti reproduktibel, mudah di modifikasi, memiliki tingkat perolehan kembali yang tinggi, serta resolusi yang baik untuk molekul-molekul yang serupa (Shiromizu et al., 2017).

Metode HPLC memisahkan campuran senyawa berdasarkan ukuran, sifat fisika-kimia, serta afinitas pengikatan sampel dengan fase diamnya atau interaksi antara sampel dengan fase diam dan fase gerak, dimana sistem elusi pada HPLC dapat dimodifikasi untuk memanipulasi interaksi tersebut (Jin et al., 2017). Waktu retensi setiap sampel menjadi berbeda berdasarkan komposisi molekuler dari bagian yang memiliki kontak dengan fase diam dan fase gerak. (Aguilar, 2004) Sedangkan untuk sampel protein dan polipeptida yang besar, proporsi bagian yang kontak hanyalah sebagian kecil dari luas permukaan total struktur sekunder atau tersiernya, sehingga sistem elusinya dapat dimodifikasi untuk menghasilkan orientasi molekul yang unik guna mencapai selektivitas yang diharapkan.

Beberapa teknik HPLC yang sering digunakan dalam pemisahan protein dan peptida adalah kromatografi fase terbalik (*Reversed Phase Chromatography*, RPC), *Ion-exchange Chromatography* (IEC), *Size Exclusion Chromatography* (SEC), serta

kromatografi afinitas (Aguilar, 2004). RPC dapat digunakan dalam pemisahan protein utuh berdasarkan interaksi antara bagian hidrofobik dari protein dengan fase diam non polar, seperti C4, C8 atau C18 (Ang et al., 2017), namun aplikasinya untuk isolasi protein jarang dilakukan, karena kondisi elusinya yang dapat menonaktifkan fungsi biologis protein (Aguilar, 2004). Oleh karena itu, SEC dan IEC lebih banyak dimanfaatkan dalam purifikasi protein, yang pemisahannya masing-masing didasarkan pada perbedaan ukuran dan muatan protein (Ang et al., 2017).

Proses purifikasi protein dari sampel biologis tentunya membutuhkan kombinasi beberapa teknik, dimana umumnya HPLC digunakan pada tahap lanjut setelah pemisahan awal dengan metode elektroforesis. Faktor kunci dalam pengembangan metode HPLC adalah kemampuan meretensi target molekul dan memisahkannya dari zat-zat pengotor lainnya (Aguilar, 2004).

### **Metode Mass Spectrometry**

*Mass spectrometry* (MS) merupakan salah satu teknik penting yang digunakan dalam proses identifikasi dan kuantifikasi protein (Jin et al., 2017). Prinsip dari spektroskopi massa adalah pemisahan analit terionisasi berdasarkan perbedaan rasio massa dan muatannya (*mass-to-charge ratio*;  $m/z$ ). Proses penguapan dan ionisasi analit umumnya menggunakan teknik *electrospray ionization* (ESI) dan *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI). Selanjutnya, analit terion akan dipisahkan berdasarkan rasio  $m/z$ -nya dan dianalisis menggunakan *mass analyzer*. Beberapa *mass analyzer* yang umum dipakai dalam analisis proteomik adalah *ion trap*, *time-of-flight* (TOF), *quadrupole* dan *Fourier transform ion cyclotron* (FT-MS) (Aebersold & Mann, 2003).

Metode yang banyak dipakai dalam proses identifikasi protein adalah *data dependent acquisition* (DDA) dan *data independent acquisition* (DIA), dimana awalnya metode DDA banyak

diaplikasikan, namun kurang reproduksibel dan akurat ketika digunakan untuk kohort yang besar. Sementara, metode DIA memiliki reproduksibilitas yang lebih baik dengan cakupan sampel yang lebih luas. (Jin et al., 2017).

Disamping itu, terdapat pula metode *Selective Reaction Monitoring* (SRM) atau dikenal juga dengan *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) yang telah banyak digunakan dalam kuantitasi dan validasi berbagai panel marka biologis dan kandidat potensial marka biologis (Jin et al., 2017). Metode ini menggunakan *triple quadrupole* untuk memonitor massa peptida dan satu atau lebih fragmen ion yang spesifik dari peptida tersebut. Informasi mengenai waktu retensi, massa peptida dan massa fragmen dapat meningkatkan reliabilitas dan akurasi dari proses identifikasi dan kuantifikasi protein tersebut (Ang et al., 2017). Identifikasi penanda biologis feses untuk kanker kolorektal menggunakan metode *mass spectrometry* telah menghasilkan banyak kandidat karena dapat mendeteksi lebih dari 3000 protein yang mengalami peningkatan maupun penurunan ekspresi pada sampel kanker kolorektal (Kang et al., 2012; Mirnezami et al., 2014).

### **KESIMPULAN**

Penemuan penanda biologis baru untuk kanker kolorektal sangat penting untuk deteksi dini penyakit, karakterisasi perkembangan penyakit, dan prediksi respons terapi. Kemajuan terkini dalam teknologi proteomik memungkinkan analisis protein dalam skala besar untuk mengetahui profil ekspresi berbagai protein pada sampel feses pasien dengan kanker kolorektal yang dapat menjadi dasar untuk melakukan validasi untuk kandidat penanda biologis yang baru.

### **DAFTAR PUSTAKA**

Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003

- 422:6928, 422(6928), 198–207.
- Aguilar, M. I. (2004). HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 251, 3–8.
- Alvarez-Chaver, P., Otero-Estévez, O., Páez de la Cadena, M., Rodríguez-Berrocal, F. J., & Martínez-Zorzano, V. S. (2014). Proteomics for discovery of candidate colorectal cancer biomarkers. *World Journal of Gastroenterology*, 20(14), 3804–3824.
- Ang, C. S., Baker, M. S., & Nice, E. C. (2017). Mass Spectrometry-Based Analysis for the Discovery and Validation of Potential Colorectal Cancer Stool Biomarkers. In *Methods in Enzymology* (Vol. 586, pp. 247–274). Academic Press Inc.
- Davies, R. J., Miller, R., & Coleman, N. (2005). Colorectal cancer screening: Prospects for molecular stool analysis. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 5, Issue 3, pp. 199–209).
- de Palma, F. D. E., D'argenio, V., Pol, J., Kroemer, G., Maiuri, M. C., & Salvatore, F. (2019). The molecular hallmarks of the serrated pathway in colorectal cancer. *Cancers*, 11(7).
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, & Bray F. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. *International Agency for Research on Cancer*, 68(6).
- Fritsch, R. J., & Krause, I. (2003). ELECTROPHORESIS. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2055–2062.
- Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044–2058.
- Jin, P., Wang, K., Huang, C., & Nice, E. C. (2017). Mining the fecal proteome: from biomarkers to personalised medicine. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 14, Issue 5, pp. 445–459). Taylor and Francis Ltd.
- Kang, U.-B., Yeom, J., Kim, H.-J., Kim, H., & Lee, C. (2012). Expression profiling of more than 3500 proteins of MSS-type colorectal cancer by stable isotope labeling and mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, 75(10), 3050–3062.
- Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(12), 713–732.
- Kim, H.-J., Kang, H. J., Lee, H., Lee, S.-T., Yu, M.-H., Kim, H., & Lee, C. (2009). Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer. *Journal of Proteome Research*, 8(3), 1368–1379.
- Lecky, D. M., Hawking, M. K. D., & McNulty, C. A. M. (2014). Patients' perspectives on providing a stool sample to their GP: a qualitative study. *The British Journal of General Practice*, 64(628), e684.
- Ma, Y., Peng, J., Liu, W., Zhang, P., Huang, L., Gao, B., Shen, T., Zhou, Y., Chen, H., Chu, Z., Zhang, M., & Qin, H. (2009). Proteomics identification of desmin as a potential oncofetal diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 8(8), 1878–1890.
- Mirnezami, R., Spagou, K., Vorkas, P. A., Lewis, M. R., Kinross, J., Want, E., Shion, H., Goldin,

R. D., Darzi, A., Takats, Z., Holmes, E., Cloarec, O., & Nicholson, J. K. (2014). Chemical mapping of the colorectal cancer microenvironment via MALDI imaging mass spectrometry (MALDI-MSI) reveals novel cancer-associated field effects. *Molecular Oncology*, 8(1), 39–49.

Shiromizu, T., Kume, H., Ishida, M., Adachi, J., Kano, M., Matsubara, H., & Tomonaga, T. (2017). Quantitation of putative colorectal cancer biomarker candidates in serum extracellular vesicles by targeted proteomics. *Scientific Reports*, 7(1), 12782.