

PERAN *miRNA-21* PENEKAN *GEN PTEN* PENSIYALAN *PI3K/AKT* PADA KANKER KOLOREKTAL

THE ROLE of *miRNA-21* in *PTEN* GENE SUPPRESSION FOR *PI3K/AKT* SIGNALING in COLORECTAL CANCER

Ismail Ismail^{1*}, Arisanti Pulio¹, Elvin Bura¹, Selfiana¹, Nur Mutmainnah¹

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar; Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 13,7 Daya Makassar Sulawesi Selatan

*Korespondensi: ismail.farm27@gmail.com

ABSTRAK

Kanker kolorektal merupakan salah satu penyakit penyebab kematian tertinggi didunia yang disebabkan oleh berbagai faktor seperti mutasi genetik, epigenetik, disregulasi oleh jalur sinyal komunikasi dan mikrobiota usus. Adanya mutasi genetik dan epigenetik menyebabkan hilangnya ekspresi dan fungsi dari PTEN (Phosphatase dan TENsin homolog) dimana aktivasi yang terus menerus dari kaskade pensinyalan intraseluler PI3K/Akt yang terlibat dalam karsinogenesis kolorektal. Penanganan masalah tersebut yaitu menggunakan miRNA-21 yang berperan penting dengan menekan gen PTEN pendana biologis yang berguna untuk diagnosis dan pengobatan pada kanker kolorektal. Penelitian bertujuan untuk menentukan pengikatan spesifik miRNA-21 dengan gen PTEN yang berperan dalam kanker kolorektal berdasarkan nilai ΔG hybrid dan Logistic Probability.

Sekuens lengkap gen PTEN diperoleh dari FASTA NCBI dan data CDS diperoleh dari Refseq. Prediksi pengikatan miRNA-21 matur dengan gen PTEN dilakukan menggunakan website StarMir Sfold 2.2.

Hasil prediksi pengikatan miRNA-21 dengan 1 target diperoleh 296 model pengikatan. Pengikatan spesifik dilihat dari ΔG hybrid -23,600 dan logistic probability 0,818 antara ikatan gen PTEN dengan has miR-21-5p pada CDS seedless posisi 3627-3653 dibuktikan dengan nilai ΔG hybrid paling rendah dari semua ikatan yang terjadi.

Kata kunci: miRNA-21, Kanker kolorektal, Gen PTEN, StarMir

ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the leading causes of death in the world caused by various factors such as genetic mutations, epigenetics, dysregulation of communication signaling pathways dan gut microbiota. In the presence of genetic, epigenetic mutations, there is a loss of expression dan function of PTEN (Phosphatase dan TENsin homologues) resulting in continued activation of the PI3K/Akt intracellular signaling cascade involved in colorectal carcinogenesis. The solution to this problem is to use miRNA-21. which plays an important role by suppressing the biological marker PTEN gene that is useful for diagnosis dan treatment in colorectal cancer. The aim of this study was to determine the specific binding of miRNA-21 with the PTEN gene that plays a role in colorectal cancer based on the ΔG hybrid dan Logistic Probability values.

Complete sequences of PTEN genes were obtained from FASTA NCBI dan CDS data were obtained from Refseq. Prediction of the binding of mature miRNA-21 with the PTEN gene was carried out using the StarMir Sfold 2.2 website.

The predicted results of miRNA-21 binding with 1 target obtained 296 binding models. Specific binding was seen from ΔG hybrid -23.600 dan logistic probability 0.818, there was a binding between PTEN gene binding dan miR-21-5p at seedless CDS position 3627-3653 as evidenced by the lowest ΔG hybrid value of all bindings that occurred.

Keywords: miRNA-21, Cancer Colorectal. *Gene PTEN*, StarMir

PENDAHULUAN

America Cancer Society melaporkan bahwa kanker kolorektal merupakan penyakit dengan kasus ketiga terbanyak dan kanker penyebab kematian ketiga terbanyak pada laki-laki dan wanita di Amerika Serikat (Padang dan Luciana, 2020). Umumnya kanker kolorektal berawal dari pertumbuhan sel yang tidak

ganas, dapat adenoma atau berbentuk polip. Adenoma atau berbentuk polip pada kanker kolorektal dapat ditingkat dengan mudah, hanya saja jarang menimbulkan gejala apa pun, sehingga tidak terdeteksi dalam waktu cukup lama hingga berkembang menjadi kanker kolorektal (Tamba, 2012).

Menurut WHO (World Health Organization) 2018, penyakit kanker kolorektal diperkirakan meningkat menjadi 18,1 juta kasus baru dan total 9,6% jumlah kematian. Negara berkembang, salah satunya Indonesia juga dilaporkan memiliki peningkatan insiden kejadian kanker kolorektal. Di Indonesia lebih muda pada pasien kanker kolorektal dinegara maju. Lebih dari 30% kasus didapat pada pasien yang berumur 40 tahun atau lebih muda, sedangkan di Negara maju, pasien yang umurnya dari 50 tahun hanya 2-8% saja (Sayuti dan Nouva, 2019).

Kanker kolorektal disebabkan oleh berbagai faktor seperti mutasi genetik, epigenetik, disregulasi oleh jalur sinyal komunikasi dan mikrobiota usus. Mutasi genetik pada karsinogenesis kanker kolorektal menyebabkan perubahan fungsi pada proses proliferasi, migrasi, diferensiasi, adhesi, kematian sel, dan stabilitas serta perbaikan deoxyribonucleic acid (DNA) (Rompis dan Ni Nyoman, 2019). PTEN (Phosphatase dan TENsin homolog) adalah satu-satunya fosfatase lipid yang diketahui menangkalkan jalur PI3K, dimana hilangnya fungsi PTEN yang mengakibatkan peningkatan PIP3 dan aktivitas terus menerus dari efektor PI3K memiliki efek dampak penting pada berbagai aspek perkembangan kanker seperti: proliferasi sel, resistensi apoptosis, angiogenesis, metabolisme regulasi, ketidakstabilan genom, pembaharuan diri sel induk, seluler penuaan, dan migrasi sel dan metastasis (Molinari dan Frattini, 2014).

Kehilangan fungsi PTEN yang memiliki efek dampak pada kanker maka dapat dikontrol oleh microRNA (miRNA). miRNA merupakan RNA kecil non coding (18-25 nukleotida) yang bergabung dengan daerah 3' tidak diterjemahkan (3'-UTR) spesifik pada mRNA untuk menginduksi degradasi mRNA dan menghambat translasi protein miRNA dapat memediasi aktivitas dan penghambatan transkripsi dari gen target (Iseki *et al.*, 2016). miRNA dapat memprioritaskan gen target secara signifikan untuk kelangsungan hidup, dan dapat dieksplotasi lebih lanjut dan dapat berpotensi berfungsi sebagai sumber daya untuk memilih target secara eksplisit untuk diagnosis, pengembangan obat, dan pengelolaan CRC (Fadaka *et al.*, 2019).

Berdasarkan laporan terbaru beberapa target signifikan miRNA-21 yang terkait dengan keganasan telah divalidasi secara eksperimental seperti PTEN. Protein PTEN dilaporkan sering dibungkam di CRC dan telah terbukti menekan pertumbuhan tumor dengan menghambat jalur PI3K/AKT (Sun *et al.*, 2015). miRNA-21 dapat bertindak sebagai organ penting dengan mengatur PTEN sebagai salah satu dari beberapa gen targetnya dengan demikian dapat menjadi pendana biologis yang berguna untuk diagnosis dan pengobatan di CRC (Wu *et al.*, 2017).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengikatan terbaik miRNA-21 dengan gen PTEN yang berperan pada kanker kolorektal berdasarkan nilai ΔG_{Hybrid} dan logistic probability.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras yang digunakan untuk studi in silico yaitu komputer pribadi (*personal computer*) dengan spesifikasi sebagai berikut Acer Aspire 4732 Z, Processor Intel® Pentium Inside, memori (RAM) 2 GB DDR2 667MHz, monitor 14', kapasitas HDD 250 GB, sistem operasi Windows® seven Pro. Perangkat lunak yang digunakan google chrome, paket program RefSeq untuk mengakses database FASTA gen target yang dapat diakses pada <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/> dan program StarMIR (<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmir.pl>) pada Sfold 2.2 untuk memprediksi pemodelan data miRNA-21 dengan gen PTEN.

Metode

Prediksi pengikatan miRNA-21 dengan gen PTEN dilakukan dengan mengakses website StarMir. Model yang digunakan dalam prediksi ini adalah *Homo sapiens*. Kemudian dimasukkan kode miRNA-21 matur pada manusia (hsa-miRNA-21) pada kolom microRNA sequenceID. Kolom Single Target Sequence bagian Manual Sequence Entry digunakan untuk memasukkan gen sitokin secara manual. Bagian Name dimasukkan kode gen PTEN dan sekuens yang dimasukkan berupa sekuens lengkap yang diperoleh dari FASTA NCBI. Data CDS diperoleh dari refseq. Data yang diperoleh berupa Logistic Probability dan ΔG_{Hybrid} serta model pengikatan miRNA dengan gen PTEN (Rennie *et al.*, 2014; Rennie *et al.*, 2016).

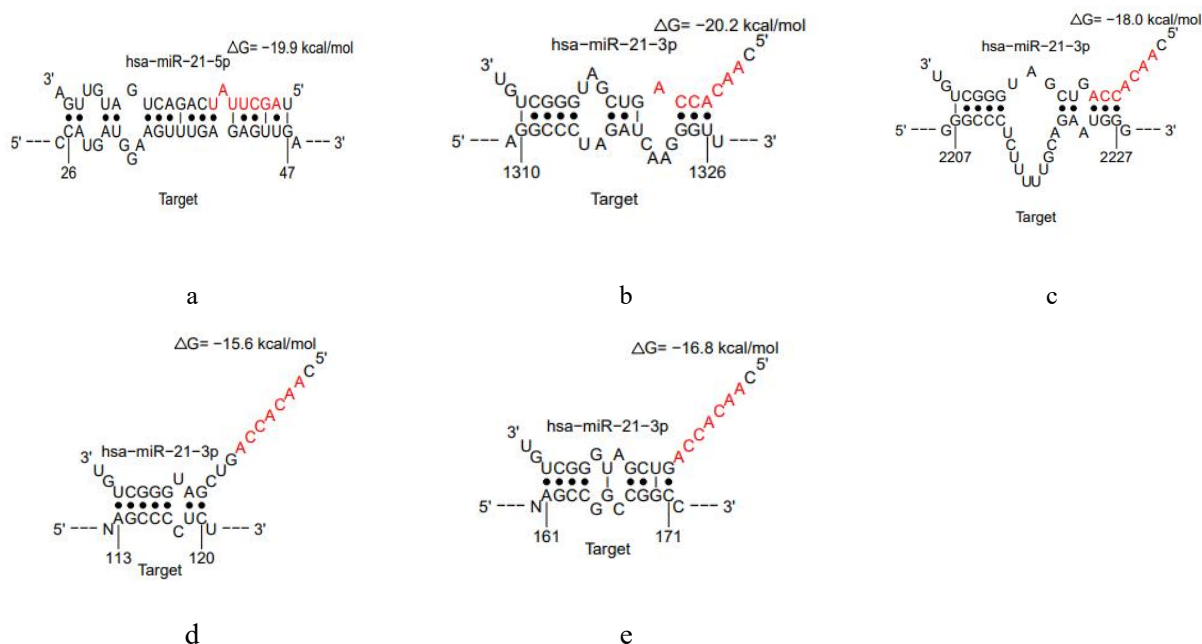
HASIL DAN PEMBAHASAN

Studi In Silico merupakan metode riset yang memanfaatkan teknologi komputasi dan database untuk mengembangkan penelitian lebih lanjut (Makatita *et al.*, 2020) dengan menggunakan website StarMir dilakukan untuk menentukan pengikatan terbaik miRNA dengan gen PTEN sehingga diperoleh prediksi pengikatan memungkinkan penekan gen PTEN dengan menghambat PI3K/AKT. Pada penelitian ini digunakan dua parameter yaitu *Logistic Probability* dan ΔG_{Hybrid} dalam prediksi pengikatan terbaik miRNA dengan gen PTEN. Nilai ΔG menunjukkan stabilitas pengikatan dan aksesibilitas ke daerah pengikatan miRNA dengan mRNA. StarMir memprediksi ikatan miRNA berdasarkan program RNAhybrid antara daerah seed dan seedless dengan stabilitas hybrid -15kcal/mol atau lebih rendah. Nilai Logistic Probability menunjukkan ukuran kepercayaan terhadap hasil prediksi berupa pengikatan yang baik antara miRNA dengan gen target. Secara umum nilai *Logistic Probability* 0,5 kemungkinan pengikatan yang baik antara miRNA dengan gen target. Nilai logistic probability dikatakan tinggi ketika mencapai 0,75 atau lebih tinggi (Rennie *et al.*, 2014; Rennie *et al.*, 2016).

Pemilihan miRNA didasarkan pada kemampuannya dalam regulasi proses tertentu di dalam tubuh. miRNA-21 dipilih karena dapat dianggap sebagai pendana yang berharga untuk diagnosis kanker kolorektal. Penelitian ini menggunakan 2 bentuk matur miRNA-21 yaitu hsa-miRNA-21-3p dan hsa miRNA-21-5p. Gen PTEN digunakan sebagai target karena bermutasi sehingga gen terdeteksi hanya dengan kanker kolorektal lanjut atau metastasis lokal. Data gen PTEN diperoleh dari RefSeq FASTA NCBI. Dari banyaknya model pengikatan yang didapatkan terdapat beberapa model pengikatan yang lebih spesifik pada kedua matur miRNA-21 yaitu hsa-miRNA-21-3p dan hsa-miRNA-21-5p dapat dilihat pada tabel I dan II.

Tabel I. Hasil Pengikatan miRNA-21 dengan Gen Target pada hsa-miRNA-21-3p

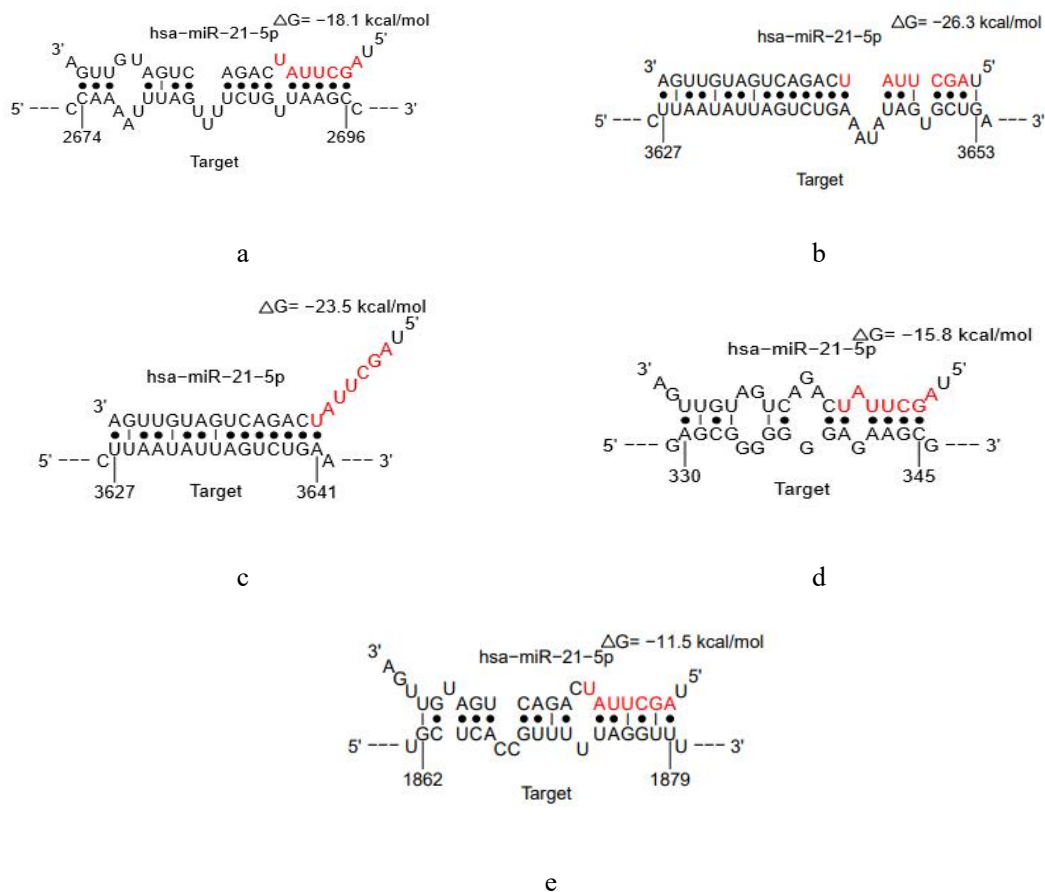
miRNA	Site_Position	Logit Probit	ΔG_{hybrid}	ΔG_{nuc}^*	$\Delta G_{\text{total}}^*$	Site_Location*	Binding area
hsa-miR-21-3p	2778-2800	0.793	-19.900	-1.316	-9.607	0.024	CDS-Seedless
hsa-miR-21-3p	1310-1326	0.751	-20.200	0	-5.985	0.01	CDS-Seedless
hsa-miR-21-3p	2207-2227	0.511	-18	0	11.503	0.019	CDS-Seedless
hsa-miR-21-3p	113-120	0.394	-15.600	-0.049	-0.901	0.348	5'UTR- Seedless
hsa-miR-21-3p	161-171	0.253	-16.800	-0.015	12.484	0.495	5'UTR- Seedless



Gambar 1. Model pengikatan miR-21-3p dengan PTEN (a,b,c,) merupakan model pengikatan spesifik dan model pengikatan miR-21-3p dengan PTEN pada gambar (d,e) merupakan model pengikatan non spesifik.

Tabel II. Hasil Pengikatan miRNA-21 dengan Gen Target pada hsa-miRNA-21-5p

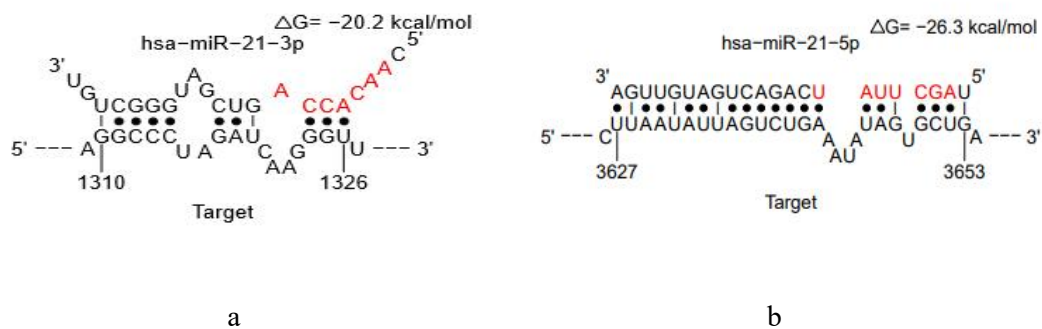
miRNA	Site_Position	Logit Prob [†]	ΔG_{hybrid}	ΔG_{nucl}^*	$\Delta G_{\text{total}}^*$	Site_Location*	Binding area
hsa-miR-21-5p	2674-2696	0.838	-18.1	-0.143	-4.289	0.023	CDS-Seedless
hsa-miR-21-5p	3627-3653	0.818	-26.3	-1.283	-12.088	0.033	CDS-Seedless
hsa-miR-21-5p	3627-3641	0.74	-23.5	-0.253	-5.2	0.033	CDS-Seedless
hsa-miR-21-5p	330-345	0.02	-15.8	-0.07	18.351	4.92E-05	CDS- Seedless
hsa-miR-21-5p	1862-1879	0.43	-11.5	-0.599	3.402	0.015	CDS-Seedless

**Gambar 2.** Model pengikatan miR-21-5p dengan PTEN (a,b,c) merupakan model pengikatan spesifik dan model pengikatan miR-21-5p dengan PTEN pada gambar (d,e).

Prediksi pengikatan miRNA-21 matur dengan gen target PTEN diperoleh model pengikatan sebanyak 296 pengikatan, setelah dilakukan analisis dipilih pengikatan terbaik dengan nilai ΔG_{hybrid} dan *logistic probability* sesuai standar yang ditetapkan. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel III.

Tabel III. Hasil Pengikatan miRNA-21 matur dengan Gen PTEN

miRNA	Gen target	Posisi pengikatan	Log probit	ΔG_{Hybrid}	Wilayah pengikatan
hsa-miR-21-3p	PTEN	1310-1326	0.751	-20.200	CDS-Seedless
hsa-miR-21-5p	PTEN	3627-3653	0.818	-26.300	CDS-Seedless



Gambar 3. Model pengikatan miR-21-3p dengan PTEN (a) dan pengikatan miR-21 5p dengan PTEN (b) yang spesifik, Model pengikatan miR-21-3p dengan PTEN (c) dan pengikatan miR-21-5p dengan PTEN (d) yang non spesifik.

Jenis interaksi miRNA dan gen target pada 4 model pengikatan yang terpilih terjadi secara *Partial complementary*. Gambar (a) dan gambar (b) merupakan model pengikatan spesifik dibuktikan dengan $\Delta G_{\text{hybrid}} -15\text{ kkal/mol}$ atau lebih rendah dan nilai *logistic probability* $>0,5$ atau nilai logistic probability dikatakan tinggi ketika mencapai 0,75 atau lebih tinggi. Pada gambar (c) dan gambar (d) merupakan model pengikatan non spesifik, hal tersebut disebabkan karena miRNA berinteraksi dengan gen PTEN pada daerah seedless yang tidak membentuk ikatan yang sempurna dengan miRNA (Wang *et al.*, 2019).

Perbandingan pengikatan terbaik berdasarkan nilai ΔG_{hybrid} dan *logistic probability* antara miRNA-21 matur dengan gen PTEN menunjukkan pengikatan terbaik terjadi hsa-miR-21-5p pada CDS seedless posisi 3627-3653 dibuktikan dengan nilai ΔG_{hybrid} paling rendah dari semua ikatan yang terjadi yaitu sebesar -26,300 kkal/mol.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa pengikatan miR-21 matur dengan beberapa mRNA target diperoleh pengikatan terbaik terjadi pada ikatan antara ikatan PTEN dengan hsa-miR-21- 5p pada CDS seedless posisi 3627-3653 dibuktikan dengan nilai ΔG_{hybrid} paling rendah dari semua ikatan yang terjadi yaitu sebesar -26,300 kkal/mol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada KEMENDIKBUD yang telah memberikan bantuan dana untuk pelaksanaan riset ini, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar dan Pembimbing yang telah memberikan ruang dan bimbingan untuk pelaksanaan riset kami.

DAFTAR PUSTAKA

- Fadaka, A.O. Klein, A. Pretorius, A. 2019. In Silico identification of microRNAs as candidate colorectal cancer biomarker. *Tumor Biology*. 1-15
- Iseki, Y. Shibutani, M. Maeda, K. Nagahara, H. Fukuoka, T. Ikeya, T. Matsutani, S. Kimura, K. Toyokawa, T. Amano, R. Tanaka, H. Muguruma, K. Hirakawa, K. Ohira, M.. 2016. Prognostic significance of microRNA-21 expression in patients with Unresectable Metastatic colon cancer. *Anticancer Research* 36:5145-5152
- Makatita, FA. Wardhani, R. Nuraini. 2020. Riset in-Silico dalam Pengembangan Sains di Bidang Pendidikan, Studi Kasus: Analisis Potensi Cendana Sebagai Agen Anti-Aging. *Jurnal ABDI* Vol.2.
- Molinari, F. dan Frattini, M. 2014. Function dan regulation of the PTEN gene in colorectal cancer. *Frontiers in ONCOLOGY*. 3:326.
- Padang, M.S dan Rotty, L. 2019. Adnekarzinoma kolon: Laporan kasus. *e-Clinic*. 8(2):229-236
- Rennie, W., Liu C., Carmack, S., Wolenc, A., Kanoria, S., Lu, J., Long De., Ding Y. 2014. Starmir: A Web Server for Prediction of microRNA Binding Sites. *Nucleic Acid Research*, 42: 114-118
- Rennie, W., Kanoria, S., Liu, C., Mallick, B., Long, D., Wolenc, A., Carmack C.S., Lu J., Ding Y. 2016. STarMirDB: A Database of MicroRNA Binding Sites. *RNA Biology*. 13: 554–560

- Rompis, A. Y. dan Ni Nyoman. A. D. 2020. Aspek Genetik Kanker kolorektal. *Jurnal Sains Kesehatan*. 2(3)
- Sayuti, M dan Nouva. 2019. Kanker kolorektal. *Jurnal Averrous*, 5(2)
- Sun, Y., Yahong X., Jie X., dan Lu, J W. 2015. Role of TM4SF1 in regulating breast cancer cell migration dan apoptosis through PI3K/AKT/mTOR pathway. *International Journal of Clinical and experimental pathology*. 8 (8), 9081, 2015.
- Tamba,E. 2012. Karsinogenesis kanker Kolorektal, hubungannya dengan Diet dan Mikroflora usus. *Jurnal Kedokteran Meditek*. 18(48)
- WHO. 2018. Latest globl cancer data: Cancer burden rises to 18,1 million new cases dan 9,6 million cancer deaths in 2018.
- Wang, X., Tian, J., Cui, P., Mastriano, S., Zhang, D., Zhao, H., Lu H., Ding Ye, Lu J. 2019. microRNA Seedless Sites Attenuate Strong-Seed-SideMediate Target Repression. *BioRxiv*. <http://doi.org/10.1101/837682>
- Wu, Yiyi. Song, Yi. Xiong, Y. Wang, X. Xu, Ke. Han, Bi. Bai, Y. Li, L. Zhang, Y. Zhou, L. 2017. MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth dan Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer. *Cell PhysiolBiochem*, 43:945-958.