

Metilasi DNA dan Mukosa Mulut

Nanan Nuraeny^{1*}, Dzulfikar DL Hakim², Fransisca S Susilaningih³, Dewi MD Herawati⁴, Dida A Gurnida²

¹Departemen Ilmu Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

²Departemen Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

³Departemen Keperawatan, Fakultas Keperawatan, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

⁴Departemen Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

E-mail: nanan.nuraeny@fkg.unpad.ac.id

Abstrak

Pengaruh lingkungan eksternal pada gen manusia akan berpengaruh pada patogenesis penyakit, dan hal ini dapat diturunkan. Studi tentang perubahan gen fenotip yang diwariskan yang tidak disebabkan oleh perubahan urutan DNA disebut epigenetik. Salah satu mekanisme epigenetik adalah metilasi DNA yang penting dalam mengatur ekspresi gen. Ulasan ini akan menjelaskan studi tentang metilasi DNA pada mukosa mulut. Metode pencarian sistematis Google Scholar dan Pubmed dilakukan untuk semua studi dalam sepuluh tahun terakhir. Hasil pencarian mendapatkan sebanyak tujuh artikel dengan ukuran sampel yang bervariasi, 16 hingga 177 sampel, sebagian besar studi kasus-kontrol pada *oral premalignant lesions* (OPL), *oral lichenoid disease* (OLD), mukositis oral pada *acute lymphoblastic leukemia* (ALL), dan *oral squamous cell carcinoma* (OSCC). Metilasi DNA pada kanker mulut menunjukkan bahwa terdapat hipermetilasi beberapa gen, walaupun status metilasi DNA dalam beberapa kasus belum menunjukkan perbedaan yang signifikan antara gen yang diperiksa. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa tidak ada korelasi antara metilasi DNA dan perkembangan mukositis oral pada ALL yang menerima terapi metotreksat (MTX). Mekanisme metilasi DNA pada sel malignan adalah dengan menambahkan gugus metil ke sitosin dinukleotida di CpG (*cytosine phosphate guanine*) pada daerah promotor oleh enzim DNA *methyltransferase* sehingga dapat menghambat ekspresi beberapa gen terkait pertumbuhan sel, perbaikan DNA, dan penghambat metastasis. Metilasi DNA adalah biomarker penting dalam perkembangan penyakit mukosa mulut.

Kata Kunci: Metilasi DNA, Mukosa Mulut

Abstract

The influence of external environment on human genes will effect on disease pathogenesis, this can be inherited. The study of heritable changes in phenotype of genes that are not due to changes in the sequence of DNA is called epigenetics. One of epigenetic mechanism is DNA methylation which is important in regulating gene expression. This review will describe studies about DNA methylation on several oral mucosal diseases. Systematic search of Google Scholar and Pubmed was conducted for all studies in the last ten years. Results: The results showed that from seven articles found with varied sample sizes, 16 to 177 samples, mostly case-control studies in oral premalignant lesion (OPL), oral lichenoid disease (OLD), oral mucositis in acute lymphoblastic leukemia (ALL), and oral squamous cell carcinoma (OSCC). DNA methylation in oral cancer have showed that there was hypermethylation of some gene, although the status of DNA methylation in some cases have not showed a significant differences between the genes examined. The results of other studies showed that there was no correlation between DNA methylation and the development of oral mucositis in ALL who received methotrexate (MTX) therapy. The mechanism of methylation DNA in malignant cell is by adding methyl groups to cytosine dinucleotides at CpG (*cytosine phosphate guanine*) in the promoter region by the DNA methyltransferase enzyme, then inhibit the expression of several genes related to cell growth, DNA repair, and metastasis inhibitors. DNA methylation is important biomarker in the development of oral mucosal diseases.

Keywords: DNA Methylation, Oral Mucosal

1. Pendahuluan

Masalah kesehatan di dunia meliputi penyebaran penyakit menular (*communicable disease*) dan berkembangnya penyakit tidak menular (*non communicable disease*). Menurut *World Health Organization* tahun 2018 akibat penyakit tidak menular (PTM) pada tahun 2016 sebanyak 41 juta manusia meninggal dunia atau 71% dari 57 juta kematian.¹ Kondisi saat ini menunjukkan seseorang berusia 30 tahun sudah mengalami risiko tinggi untuk kematian sebelum mencapai usia 70 tahun yaitu akibat PTM yang dipengaruhi oleh faktor gaya hidup dan lingkungan meliputi kebiasaan merokok (tembakau), penyalahgunaan alkohol, kurang asupan buah dan sayur, aktivitas fisik yang kurang, dan mengkonsumsi obat-obatan. Kondisi tersebut dapat mempengaruhi terjadinya beberapa penyakit yang sebelumnya diketahui dipengaruhi oleh faktor genetik kemudian berkembang seiring perubahan lingkungan eksternal mengubah mekanisme faktor genetik, menjadi perubahan epigenetik yaitu perubahan ekspresi gen yang tidak melibatkan modifikasi urutan (*sequence*) basa DNA, sehingga terjadi perubahan fenotip tanpa perubahan genotip.² Perubahan epigenetik bersifat reversibel di dalam gen yang berhubungan dengan modifikasi di dalam struktur DNA, dapat diturunkan dan ditemukan pada beberapa generasi. Salah satu mekanismenya adalah metilasi DNA.³

Proses metilasi DNA berupa penambahan grup metil (-CH₃) yang berikatan dengan *Cytosine-Phosphate-Guanide* (CpG) dalam DNA, memegang peran dalam menghambat ekspresi gen

(*gene silencing*), juga penting dalam mengatur ekspresi gen, dan berperan dalam pertumbuhan, penuaan, serta penyakit. Metilasi DNA dapat mencegah transkripsi secara langsung dan menyebabkan perubahan struktur kromatin yang menghambat akses faktor transkripsi pada gen promoter.⁴

Belum ada ulasan mengenai peran metilasi DNA pada mukosa mulut, sehingga penulis tertarik untuk membuat ulasan terkait hasil penelitian yang telah dipublikasikan mengenai metilasi DNA dan mukosa mulut.

2. Metode

Pencarian sistematis Google Scholar dan Pubmed dilakukan untuk semua hasil penelitian dalam sepuluh tahun terakhir, dengan kata kunci berupa metilasi DNA dan mukosa mulut.

3. Hasil

Hasil pencarian mendapatkan sebanyak tujuh artikel dengan ukuran sampel yang bervariasi, 16 hingga 162 sampel, sebagian besar berupa studi kasus-kontrol. Penelitian dilakukan terhadap mukosa mulut sehat dan kondisi patologis berupa *oral premalignant lesions* (OPL), *oral lichenoid disease* (OLD), mukositis oral pada *acute lymphoblastic leukemia* (ALL), serta *oral squamous cell carcinoma* (OSCC). Sebuah hasil penelitian masuk dalam pencarian ini meskipun bukan penelitian terhadap kondisi patologis karena penulis ingin menunjukkan perbedaan hasil metilasi DNA pada kondisi normal, pre malignan, dan malignan.

Tabel 1. Hasil penelitian metilasi DNA pada mukosa mulut (Tahun 2011-2018)⁵⁻¹¹

No.	Judul artikel (Nama dan tahun Jurnal)	Nama Penulis	Metode	Disain Studi	Jumlah Pasien/ Kontrol	Usia (Tahun)	Sampel	Analisis statistik	Gen	Hasil
1	Global methylation in relation to methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia (<i>PLoS ONE</i> . 2018; 13(7):1-10)	Oosterom N, et al	Level S-Adenosyl-Methionine (SAM) dan S-Adenosyl-Homocysteine (SAH) plasma sebagai proksi untuk status metilasi seluler dan metilasi DNA LINE 1 sebagai proksi untuk status metilasi DNA global pada T0 dan T1.	kohort	82	1-18	Darah lengkap	SPSS versi 20.0.0.1	-	Tingkat SAM menurun secara signifikan selama terapi metotreksat (MTX). Tingkat SAM dan SAH tidak berkorelasi dengan status metilasi DNA LINE 1. Tidak ada hubungan antara penanda metilasi DNA dengan perkembangan mukositis oral.
2	New DNA methylation markers and global DNA hypomethylation are associated with oral cancer development (<i>Cancer Prev Res</i> . 2015;8 (11): 1027-35)	Foy JP, et al.	<i>Pyrosequencing</i> digunakan dalam kohort validasi 44 pasien untuk mengevaluasi tingkat metilasi AGTR1, FOX12, situs promotor PENK	kohort dengan sampling acak	162	tidak disebutkan	sample beku	GraphPad Prism version 5.00	AGTR1, FOX12, ZIC1, HOXA9, PENK, LINE1	hipometilasi AGTR1, FOX12, PENK dan LINE1 dapat dikaitkan dengan peningkatan risiko OSCC pada pasien dengan OPL
3	Global DNA methylation: uncommon event in oral lichenoid disease (<i>Oral Diseases</i> . 2014;20:821-6)	Bediaga NG, et al	Dua platform microarray Illumina yang berbeda, yaitu Goldengate Cancer Panel 1 dan analisis DNA HumanMethylation 27 BeadChip digunakan untuk menginterogasi profil metilasi. Gen peringkat teratas divalidasi oleh <i>pyrosequencing</i>	kasus kontrol	59/ 9	tidak disebutkan	hasil kumur rongga mulut	Kolmogorov-Smirnov test	ADORA 1, FBXO27, EML3, MGC40 178, LINE1	Frekuensi penyimpangan metilasi DNA jarang terjadi pada OLD, tetapi dengan terjadinya perubahan pola metilasi DNA pada lesi OLD dapat mengarah pada suatu transformasi
4	DNA methylation of PAX1 as a biomarker for oral squamous cell carcinoma (<i>Clin Oral Invest</i> . 2014;18:801-8)	Huang. YK, Peng BY, Wu CY, Su CT, Wang HC, Lai HC	polymerase chain reaction (PCR) metilasi kuantitatif menggunakan TaqMan probe. Status metilasi ditentukan menggunakan indeks metilasi.	kasus kontrol	31/40	mean= 57,3±1,9 (kasus) mean =56,6±2,0 (kontrol)	sel mukosa dari apusan	SAS version 8.2	SOX1, PAX1, and ZNF582	Tingkat metilasi SOX1, PAX1, dan ZNF582 secara signifikan lebih tinggi pada pasien kanker

5	The MTHFR C677T polymorphism and global DNA methylation in oral epithelial cells (<i>Genetics and Molecular Biology</i> . 2013)	Arruda ITS, Persuhn DC, Oliveira NFP	Polimorfisme MTHFR C677T menghasilkan enzim termolabil dengan aktivitas yang berkurang sehingga diperkirakan dapat mempengaruhi status metilasi DNA.	sampling convenience	tidak disebutkan	19-25	sel epitel mukosa mulut	Kruskal-Wallis test, ANOVA, student unpaired t-test	MTHFR C677T	Tidak ada perbedaan signifikan dalam metilasi DNA global antara genotipe MTHFR CC, CT, dan TT
6	Implication of DNA methylation profiling in oral epithelium for lung cancer screening (<i>International Scholarly Research Network ISRN Pulmonology</i> . 2012)	Harada H, et al	Profil metilasi DNA untuk GDNF, RARB, HS3ST2	kasus kontrol	16/32	tidak disebutkan	sel epitel mukosa mulut dari hasil penyikat an halus daerah mukosa bukal kanan dan kiri	Windows versi 9 <i>statistical software package</i> (SAS Institute, NC, USA) for Fisher's exact test and the X2 test software SPSS 16.0	GDNF, RARB, HS3ST2	GDNF, RARB, HS3ST2 dimetilasi lebih sering pada pasien kanker daripada kontrol
7	Hypermethylation of RUNX3 but not WIF1 gene and its association with stage and nodal status of tongue cancers (<i>Oral Diseases</i> . 2011;17:794-800)	Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K, Magic Z	metode PCR spesifik metilasi	<i>Convenience sample</i>	76	tidak disebutkan	sample beku		WIF1, RUNX3	RUNX3 dan WIF1 sering dimetilasi secara menyimpang dan metilasi promotor RUNX3 dapat dianggap sebagai penanda prognostik potensial dalam karsinoma lidah

4. Diskusi

Hasil metilasi DNA dari sel epitel mukosa mulut subjek sehat menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara genotip MTHFRCC, CT dan TT.⁹ Polimorfisme *methylenetetrahydrofolate reductase* (MTHFR C677T) diduga memicu hipometilasi dan mengaktifkan proto-onkogen, yang menjelaskan hubungan antara polimorfisme ini dengan beberapa kanker.¹² Efek lingkungan termasuk diet, konsumsi alkohol, penggunaan tembakau, paparan radiasi dan polusi udara pada metilasi DNA merupakan faktor perancuselain faktor penuaan, dalam menentukan hubungan antara polimorfisme dengan modifikasi profil metilasi DNA.⁹

Metilasi DNA pada kanker mulut menunjukkan bahwa terdapat hipermetilasi pada beberapa gen diantaranya SOX1, PAX1, ZNF582, *p16*, *DAPK*, *RASSF1A*, *APC*, *WIF1*, *RUNX3*, *MGMT*, dan *hMLH*, hal seperti ini menunjukkan status epigenetik dapat digunakan sebagai alat prognosis.^{3,8,11}

Sebanyak 5-10% pulau CpG menunjukkan penyimpangan metilasi pada kondisi patologi malignansi, menunjukkan terjadinya penghambatan (*silencing*) gen pengkode (*coding*) dan non pengkode (*non coding*) spesifik (contohnya: gen penekan tumor). Mekanisme metilasi DNA pada sel malignan adalah dengan menambahkan

gugus metil ke sitosin dinukleotida di CpG (*cytosine phosphate guanine*) pada daerah promotor oleh enzim DNA *methyl transferases (DNMTs)*, yang terdiri atas DNMT1, DNMT3A dan DNMT3B, sehingga dapat menghambat ekspresi beberapa gen terkait pertumbuhan sel, perbaikan DNA, dan penghambat metastasis.^{3,13} Hipermetilasi pulau CpG yang terjadi pada sel-sel malignan dimana apoptosis tidak dihasilkan, dan disertai inhibisi gen penekan tumor merupakan penyimpangan metilasi yang terjadi pada karsinogenesis.¹⁴

Hasil penelitian Oosterom, et al tahun 2018 menunjukkan bahwa tidak ada korelasi antara metilasi DNA dan perkembangan mukositis oral pada ALL yang menerima terapi metotreksat (MTX). Pemberian MTX menyebabkan hipermetilasi DNA diduga terkait dengan terapi lain pada ALL yaitu pemberian *folate rescue therapy* dan *6-Mercaptopurine*.⁵

Folat menyediakan grup metil untuk reaksi metilasi dan meningkatkan status metilasi DNA, sebaliknya *6-Mercaptopurine* menyebabkan hipometilasi DNA.⁵

Kondisi pre kanker seperti *oral lichenoid disease (OLD)* menurut studi yang dilakukan oleh Bediaga, et al tahun 2014 menunjukkan hipometilasi global regio promotor gen spesifik LINE 1 (*Long Interspersed Element*) pada 12 dari 160 sampel OLD (8%).³ Hasil penelitian serupa juga dilakukan oleh Foy et al tahun 2015 yang menunjukkan pada lokasi promotor CpG AGTR1, FOX12, PENK dan LINE1 mengalami hipometilasi yang dapat dikaitkan dengan peningkatan risiko OSCC pada pasien dengan OPL.²

5. Kesimpulan

Metilasi DNA adalah biomarker penting dalam perkembangan penyakit mukosa mulut. Pencegahan metilasi DNA

akan sangat berperan dalam mengurangi kejadian penyakit mukosa mulut, sehingga dapat merupakan suatu tata laksana terkini untuk penyakit mukosa mulut.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. World Health Statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Luxembourg: WHO Publication. p.1-400
2. Martin C, Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(3):266–72
3. Irimie AI, Ciocan C, Gulei D, et al. Current insight into oral cancer epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19:1-7
4. Lim DHK, Maher ER. SAC Review DNA Methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *The Obstetrician & Gynaecologist.* 2010;12:37-42
5. Oosterom N, Griffioen PH, Hoed MAH, et al. Global methylation in relation to methotrexate-induced oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia. *PLoS ONE.* 2018; 13(7):1-10
6. Foy JP, et al.. New DNA methylation markers and global DNA hypomethylation are associated with oral cancer development. *American Association for Cancer Research.* 2015;8 (11): 1027-35
7. Bediaga NG, et al. Global DNA methylation: uncommon event in oral lichenoid disease *Oral Diseases.* 2014;20:821-6
8. Huang. YK, Peng BY, Wu CY, Su CT, Wang HC, Lai HC. DNA methylation of PAX1 as a biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Invest.* 2014;18:801-8
9. Arruda ITS, Persuhn DC, Oliveira NFP. The MTHFR C677T polymorphism and global DNA methylation in oral epithelial cells. *Genetics and Molecular Biology.* 2013
10. Harada H, et al. Implication of DNA methylation profiling in oral epithelium for lung cancer screening. *International Scholarly Research Network*

Pulmonology. 2012;1-6

11. Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K, Magic Z. Hypermethylation of RUNX3 but not WIF1 gene and its association with stage and nodal status of tongue cancers. *Oral Diseases*. 2011;17:794-800)
12. Izmirli M. A Literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. *Mol Biol Rep*. 2013;40:625-37
13. Ramirez IG, Cuellar CG, Perez YS, et al. DNA Methylation in oral squamous cell carcinoma: molecular mechanism and clinical implications. *Oral Diseases*. 2011;17:771-8
14. Perez RD, Trapero JC, Sanchez JC, et al. Methylation in oral cancer and pre cancerous lesions (Review). *Oncology Reports*. 2011;25:1203-9