

## Laboratory Science

# Identification of A1286C Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism in Orbital Region Basal Cell Carcinoma Patients

Anisah Khairunnisa, Ibrahim

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Sriwijaya University  
Mohammad Hoesin Palembang, South Sumatera

## ABSTRACT

**Background:** The development of basal cell carcinoma (BCC) shows variations among individuals. The risk factor for development of BCC related to environmental factor especially exposure to ultraviolet radiation and individual factor. The one of internal risk factor contribute to basal cell carcinoma developmental is genetic instability include defects in folic acid synthesis or DNA synthesis. The critical enzyme that participate in the process is regulated by Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene.

**Method:** This study was descriptive observational with case study involved 10 orbital region basal cell carcinoma. The diagnosis was based on histopathologic examination of the tumor. Genotype frequencies of A1286C polymorphism were studied by Polymerase Chain Reaction (PCR), amplification and restriction fragment length polymorphism analyses using MboII enzyme.

**Result:** In the present study, from 10 subjects we found male was 7 people (70%) and female was 3 people (30%). Majority of subjects have history of having a job in the sunlight. The most common of the BCC is nodular (80%). There is one subject with recurrent case. Analysis result of A1286C MTHFR gene show wild type in all cases.

**Conclusion:** There's no A1286C substitution methylenetetrahydrofolate reductase gene were identified. The whole subjects are wild type.

**Keywords:** basal cell carcinoma, orbital region, folic acid, polymorphism, A1286C MTHFR gene, polymerase chain reaction (PCR), wild type

Karsinoma sel basal (KSB) adalah tumor ganas berasal dari sel *nonkeratizing* yang terletak pada lapisan basal epidermis dengan berbagai manifestasi klinis pada kulit dengan gambaran morfologi yang bervariasi dan perluasan tertentu.<sup>1</sup> Karsinoma sel basal merupakan yang tersering pada Kaukasia, yaitu lebih dari 80% dari seluruh neoplasia maligna.<sup>2</sup> Sekitar 90% KSB mengenai area yang sering terpapar sinar matahari seperti kepala dan leher, dimana 10% melibatkan palpebra.<sup>3</sup>

Faktor risiko untuk terjadinya karsinoma sel basal berhubungan dengan faktor lingkungan dan faktor individu itu sendiri.<sup>4,5</sup> Faktor lingkungan yang utama adalah paparan terhadap radiasi ultraviolet matahari, sedangkan faktor risiko interna yang dianggap berperan adalah adanya instabilitas genetik yang meliputi mutasi dalam gen repair DNA, defek dalam sintesis asam folat atau sintesis DNA.<sup>6</sup> Enzim yang terlibat dalam metabolisme asam folat adalah *methylenetetrahydrofolate reductase* (MTHFR).<sup>1,7,8</sup>

## MATERIAL AND METODE

Penelitian ini merupakan suatu studi observasional eksploratif dengan desain *case-study* untuk mengidentifikasi adanya polimorfisme gen MTHFR pada karsinoma sel basal regio orbita. Penelitian ini mirip dengan desain potong lintang, namun di sini tidak melibatkan kelompok kontrol.

Penelitian ini dilakukan di Poliklinik Subdivisi Tumor Departemen Mata FK Unsri/ Rumah Sakit dr. Mohammad Hoesin (RSMH), Poliklinik Mata rumah sakit jejaring (RSKMM Sumsel), dan Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi FK Unsri/RSMH dalam kurun waktu pelaksanaan dimulai bulan Februari 2013 sampai dengan Agustus 2013.

Pada penelitian ini didapatkan subjek penelitian sebanyak sepuluh orang. Diagnosis ditegakkan berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologi jaringan. Pada semua pasien yang memenuhi kriteria dilakukan pengambilan darah untuk dilakukan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Data dianalisis secara univariat untuk mengetahui frekuensi genotip A1286C gen MTHFR pada penderita karsinoma sel basal regio orbita.

## HASIL

Pada penelitian ini didapatkan subyek penelitian sebanyak sepuluh orang, yang mana jenis kelamin pria adalah sebanyak 7 orang (70%) sedangkan wanita sebanyak 3 orang (30%). Sebaran usia penderita karsinoma sel basal regio orbita pada penelitian adalah berkisar antara usia 47 hingga 77 tahun, dengan rerata usia 62 tahun. Tingkat pendidikan yang paling banyak pada penelitian adalah SD yaitu sebanyak 7 orang, SMP 2 orang, dan SMA 1 orang. Distribusi pekerjaan pada subyek penelitian ini adalah petani sebanyak 6 orang, buruh 2 orang, petani 1 orang, dan ibu rumah tangga 1 orang. Dari sampel ini didapatkan sebanyak 2 orang yang beralamat di dalam kota sedangkan 8 orang beralamat di luar kota. Tidak satupun penderita yang memiliki riwayat penyakit yang sama dalam keluarga. Semua penderita memiliki riwayat terpapar sinar matahari yang lama. Tipe karsinoma sel basal yang tersering pada penelitian ini adalah tipe nodular, yaitu sebanyak 80%, sedangkan sisanya adalah tipe campuran (*infiltrating-nodular* 10% dan adenoid kistik 10%).

**Tabel 1.** Data pasien karsinoma sel basal regio orbita

Data Pasien	n=10 pasien
Jenis kelamin	
Pria	7
Wanita	3
Tingkat pendidikan	
SD	7
SMP	2
SMA	1
Distribusi pekerjaan	
Petani	7
Buruh	2
Ibu rumah tangga	1
Tempat tinggal	
Dalam kota	2
Luar kota	8
Riwayat penyakit keluarga	0
Riwayat paparan sinar matahari lama	10
Tipe karsinoma	
Nodular	8
Infiltrating-nodular	1
Adenoid kistik	1

Pada penelitian ini, identifikasi polimorfisme substitusi A→C 1286 gen MTHFR menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Adanya produk PCR dideteksi

menggunakan elektroforesis, diwarnai dengan ethium bromide dan pita DNA divisualisasi dengan transiluminator ultraviolet. Adanya pita tunggal pada gel menunjukkan bukti yang baik terjadinya reaksi spesifik. Hasil elektroforesis PCR gen MTHFR terdapat pada pita 325 bp. Untuk mendeteksi A1286C gen MTHFR digunakan enzim Mbo II. Pada penelitian ini didapatkan visualisasi *base pair* seperti yang terlihat pada gambar 1.



**Gambar 1.** Hasil visualisasi produk PCR penelitian ini setelah direstriksi menggunakan enzim MboII, dihasilkan fragmen 30, 42, dan 253 bp.

## DISKUSI

Faktor risiko yang mempengaruhi terjadinya suatu KSB adalah multifaktor, yaitu dibagi atas faktor risiko lingkungan, predisposisi hereditas, perubahan genetik yang didapat, dan faktor imunologi.<sup>9,10</sup> Paparan sinar matahari terutama radiasi ultraviolet merupakan faktor risiko utama terjadinya karsinoma sel basal. Penelitian oleh Iannocce dkk mendapatkan bahwa baik paparan sinar ultraviolet yang bersifat kontinyu maupun intermiten dapat menyebabkan karsinoma sel basal.<sup>11</sup>

Paparan sinar matahari, khususnya UVB, menginduksi ikatan kovalen dalam DNA dekat pirimidin, menghasilkan *photoproduct* lesi dimer siklodipirimidin (TT) dan pirimidin yang mutagenik apabila tidak di-*repair*.<sup>10,12</sup> Selanjutnya, radiasi ultraviolet menyebabkan degradasi folat dalam proses fotolisis, yang akan menyebabkan defisiensi folat dalam serum dan selanjutnya akan menyebabkan gangguan dalam proses *repair* DNA genom yang dirusak oleh sinar ultraviolet. Adanya polimorfisme pada gen *repair* DNA dapat mengubah fungsi protein dan kapasitas individu untuk me-*repair* DNA sel

yang membelah secara cepat yang mengalami kerusakan. Sedangkan folat dibutuhkan untuk membawa kelompok satu karbon untuk reaksi metilasi dan sintesis asam nukleat.<sup>13,14,15</sup>

Polimorfisme terpenting gen MTHFR adalah C677T dan A1286C. Polimorfisme A1286C dimana terjadi substitusi glutamat ke alanin akan mengakibatkan penurunan aktivitas enzim.<sup>16</sup> Dari penelitian oleh Kang didapatkan bahwa mutasi gen MTHFR mencakup polimorfisme C677T dan A1286C akan menurunkan aktivitas enzim.<sup>17</sup> Varian homozigot C1286C hanya memiliki aktivitas enzim normal sebesar 40% dibandingkan A1286A. Sebagai akibatnya, terjadi akumulasi homosistein yang tidak dikonversi menjadi metionin, lalu akan menyebabkan defek pada sintesis metionin, metilasi DNA, dan sintesis dTMP.<sup>15</sup>

Dengan kata lain, paparan sinar ultraviolet dianggap sebagai faktor lingkungan utama yang berkontribusi dalam perkembangan karsinoma sel basal melalui beberapa jalur, di antaranya yaitu mutasi DNA dan degradasi folat akibat *photoproduct*.<sup>18</sup> Secara normal, kerusakan pada DNA sel-sel keratinosit akan mengalami *repair* melalui jalur *nucleotide excision repair*,<sup>19</sup> sedangkan pada kondisi polimorfisme gen MTHFR, diduga akan menyebabkan terjadinya hipometilasi promoter yang selanjutnya akan menyebabkan *repair* DNA melalui jalur ini akan terganggu dan akan berkembang menjadi karsinoma sel basal.

Pada penelitian ini, dilakukan analisis PCR A1286C gen MTHFR dan didapatkan bahwa semua sampel (100%) merupakan homozigot *wild type* (genotip AA), dimana pita yang terlihat adalah 253, 42, dan 32 bp. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Naskiewicz dkk sebelumnya.<sup>18</sup>

Pada penelitian Naskiewicz dkk, didapatkan bahwa visualisasi alel pada ekson 7, A1286C gen MTHFR terdiri dari alel A (genotip AA) bila terdapat 2 pita sebesar 253 dan 72 bp; alel C (genotip CC) bila terdapat pita sebesar 325 bp; alel A dan C (genotip AC) bila terdapat tiga pita sebesar 72, 253, dan 325 bp. Dari penelitian *case-control* yang dilakukan oleh Naskiewicz dkk yang mengikutsertakan 142 subyek pada masing-masing kelompok, didapatkan bahwa pada kelompok kasus homozigot AA (64 subyek) adalah sebesar 45%, *mutant type*

*homozigot* CC (11 subyek) adalah sebesar 7,7%, sedangkan bentuk *heterozigot* AC (67 subyek) adalah sebesar 47,2% dan didapatkan bahwa terdapat hubungan antara polimorfisme A1286C gen MTHFR dan risiko terjadinya karsinoma sel basal dengan *odds ratio* sebesar 4,24.<sup>18</sup>

Penelitian Han pada populasi Kaukasia di Amerika menyimpulkan bahwa tidak ada hubungan yang bermakna antara 2 polimorfisme (C677T dan A1286C) gen MTHFR dengan kejadian sel basal.

Polimorfisme terpenting gen MTHFR adalah C677T dan A1286C. Polimorfisme A1286C dimana terjadi substitusi glutamat ke alanin akan mengakibatkan penurunan aktivitas enzim.<sup>16</sup> Dari penelitian oleh Kang didapatkan bahwa mutasi gen MTHFR mencakup polimorfisme C677T dan A1268C akan menurunkan aktivitas enzim.<sup>17</sup> Varian *homozigot* C1268C hanya memiliki aktivitas enzim normal sebesar 40% dibandingkan A1286A. Sebagai akibatnya, terjadi akumulasi homosistein yang tidak dikonversi menjadi metionin lalu akan menyebabkan defek pada sintesis metionin, metilasi DNA, dan sintesis dTMP.<sup>3</sup>

### Temuan Baru pada Penelitian Ini

Pada penelitian ini telah dilakukan analisis PCR A1286C gen MTHFR sesuai dengan penelitian sebelumnya, namun pada hasil akhir elektroforesis, didapatkan fragmen yang berbeda dengan penelitian sebelumnya. Pada populasi penelitian di tempat lain (Polandia), pita yang tervisualisasi adalah 72 *base pair* (bp), sedangkan pada penelitian ini terjadi mutasi tambahan yaitu menjadi 42 dan 30 bp. Hal ini mungkin terjadi karena ketiadaan data mengenai polimorfisme A1286C gen MTHFR pada populasi Asia serta tidak adanya kelompok kontrol sebagai pembanding maka belum dapat disimpulkan secara pasti apakah fragmen *base pair* yang terlihat pada penelitian ini merupakan mutasi yang berlaku secara umum atau hanya terjadi pada kelompok kasus karsinoma sel basal saja.

### Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah jumlah sampel yang masih minim, tidak adanya kelompok

kontrol untuk membandingkan perbedaan dengan individu normal sehingga belum dapat ditarik suatu kesimpulan adanya peranan polimorfisme A1286C gen MTHFR terhadap kejadian karsinoma sel basal. Keterbatasan lain penelitian ini adalah tidak memasukkan data kadar asam folat dalam plasma sebagai data pendukung penelitian ini.

### KESIMPULAN

Keseluruhan subyek dalam penelitian ini adalah *wild type*. Perlu penelitian lanjutan dengan jumlah sampel yang lebih besar dan desain kasus kontrol untuk membandingkan dengan individu normal.

### REFERENSI

1. Vantuchoya Y, Curik R. Histological types of basal cell carcinoma. *Scripta Medica* 2006;79 (5-6), 261-70.
2. Lacour JP. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol* 2002;146(Suppl 61):17-19.
3. Duong HQ, Copeland R. Basal cell carcinoma, eyelid. *Emedicine*, 2001.
4. Lear W, Dahlke E, Murray CA. Basal cell carcinoma: review of epidemiology, pathogenesis, and associated risk factors. *J Cutan Med Surg*. 2007;11(1):19-30.
5. Tilli CML, Steensel MAM, et al. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology* 2005;152:1108-24.
6. Lacour JP. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol* 2002;146(Suppl.61):17-9.
7. Kim Y I. cancer Epidemiology Biomarker. *Prev* 2004; 13:511-9.
8. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:849-53.
9. Lesiak A et al, an enhanced risk of basal cell carcinoma is associated with particular polymorphism in the VDR and MTHFR genes, experimental. *Dermatology* 2011;20:200-4.
10. Festa F, Kumar R, Sanyal S, et al. Basal cell carcinoma and variants in genes coding for immune response, DNA repair, folate and iron metabolism. *Mutat Res* 2005;574:105-11.
11. Iannocine MR et al, Patterns and timing of sunlight exposure and risk of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin – a case-control study, *BMC Cancer* 2012;12:1-11.
12. Branda, RF et al, Skin Color and nutrient photolysis: an evolutionary hypothesis. *Science*;201:625-6.
13. Friso S, Choi SW, Gene-Nutrient Interactions and DNA methylation. *American Society for Nutritional Science* 2002;132:2382-2387.
14. Kim YI. Folate and Carcinogenesis. Evidence, mechanisms and implications. *Journal Nutritional Biochemical*, 1999;10; 66-88.

15. Weisberg et al. A second genetic polymorphisms in MTHFR associated with decreased enzyme activity. *Mol genet Metabolims* 1998;64:169-172.
16. Festa F, Kumar R, Sanyal S, et al. Basal cell carcinoma and variants in genes coding for immune response, DNA repair, folate and iron metabolism. *Mutat Res* 2005;574:105-11.
17. Marks R. an overview of skin cancers: incidence and causation. *1995;75:607-12.*
18. Naskiewicz et al, Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with basal cell carcinoma development, *Post Dermatol Alergol*, vol 28, 1, hal 1-5, 2007.
19. Milstone EB, Helwig EB, Basal cell carcinoma in children. *Arch Dermatology* 1973;108:523-7.