

Artikel Penelitian

Identifikasi Perbedaan Ekspresi hsa-miR-331-3p di Plasma Darah Kelompok Usia Tua dan Muda: Peran dalam Mekanisme Penuaan

Ana L. Ekowati,^{1*} Daniel A. Soeselo,² William,^{1,3} Iignes Nathania⁴

¹Departemen Biologi Kedokteran, ²Departemen Ilmu Bedah, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta

³Program Studi Andrologi, Departemen Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / RSUD Dr. Soetomo, Surabaya

⁴Program Studi Magister Biomedik, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta

*Penulis korespondensi: ana.lucia@atmajaya.ac.id

Diterima 15 Maret 2022; Disetujui 22 Mei 2022

<http://doi.org/10.23886/ejki.10.139.26>

Abstrak

Jumlah populasi lanjut usia (lansia) di Indonesia terus meningkat dan menyebabkan kerentanan terhadap kondisi terkait penuaan. MicroRNA (miRNA) telah diketahui mengatur berbagai proses biologi di manusia termasuk penuaan dan mungkin patogenesis penyakit terkait usia. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menganalisis secara *in silico* hsa-miR-331-3p di plasma darah yang diduga berperan dalam penuaan dan mungkin penyakit terkait usia tertentu. Penelitian ini bersifat deskriptif dengan metode potong-lintang dan analitik menggunakan pendekatan bioinformatika. Penelitian dilakukan pada Januari 2016 sampai Desember 2018 di Laboratorium Biomedis FK Unika Atma Jaya dan Laboratorium mirXES di Singapura. Plasma darah berasal dari dua pasang kakek-cucu laki-laki dengan usia kakek ≥ 65 tahun dan usia cucu 17-25 tahun. Setelah RNA plasma darah diekstraksi dan dilakukan profiling menggunakan metode RT-qPCR, diperoleh daftar 50 miRNA yang diekspresikan secara berbeda bermakna dalam dua kelompok umur (tua dan muda) dengan nilai Fold Change (FC) antara 1,4 – 10,7. Berdasarkan daftar tersebut, dipilih hsa-miR-331-3p, kemudian dilakukan analisis *in silico* untuk memprediksi gen target dan jalur persinyalan biologisnya. Hasil studi ini adalah hsa-miR-331-3p yang upregulated pada orang tua diduga mentarget kuat gen ERBB2 dan NRP2 yang mungkin berperan dalam mekanisme penuaan kronologis. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah hsa-miR-331-3p turut berperan dalam mekanisme penuaan maupun patogenesis penyakit kanker.

Kata kunci: microRNA plasma darah, hsa-miR-331-3p, penuaan.

Identification of Differences in Expression of hsa-miR-331-3p in Blood Plasma of Elderly and Young People: The Role in Aging Mechanisms

Abstract

The number of the elderly population in Indonesia continues to increase and causes vulnerability to age-related conditions. MicroRNAs (miRNAs) have been identified to regulate various biological processes in humans including aging and possibly the pathogenesis of age-related diseases. This study aims to identify and analyze hsa-miR-331-3p *in silico* in blood plasma that may engage in aging and/or certain age-related diseases. This is a descriptive study with cross-sectional and analytical methods with a bioinformatics approach. This research was conducted from January 2016 to December 2018 at the Biomedical Laboratory of the Atma Jaya Faculty of Medicine and the mirXES Laboratory Singapore. Blood plasma was obtained from two pairs of grandparents with grandfather age greater than or equal to 65 years and grandchildren age 17-25 years. After the blood plasma RNA was extracted and profiled using the RT-qPCR method, a list of 50 miRNAs expressed differently in two age groups (old and young) with a Fold Change value between 1.4 – 10.7 was obtained. Based on the list, hsa-miR-331-3p reported in previous studies related to cancer was selected, followed by *in silico* analysis for their target genes and biological pathways. The result of this study is that upregulated hsa-miR-331-3p in the elderly is thought to strongly target the ERBB2 and NRP2 genes that may influence the mechanism of chronological aging. Further research is needed to determine whether hsa-miR-331-3p plays a role as a biomarker in aging or cancer pathogenesis.

Keywords: blood plasma microRNA, hsa-miR-331-3p, aging.

Pendahuluan

Jumlah penduduk Indonesia pada tahun 2020 tercatat sebanyak 270 juta jiwa dan sekitar 10% di antaranya merupakan populasi lanjut usia (lansia).¹ Bertambahnya populasi lansia dapat menimbulkan masalah kesehatan, terutama berkaitan dengan angka kesakitan (morbiditas) yang cukup tinggi, berkisar 26,85%.^{2,3} Untuk mengatasi masalah tersebut, perlu dipahami mekanisme penuaan seluler yang dapat digunakan dalam aspek preventif maupun kuratif. Penuaan merupakan suatu proses kompleks dan multifaktorial. Menurut López-otín dkk.⁴, terdapat sembilan *hallmark* penuaan di mamalia, salah satunya adalah *cell senescence*.

Pada penuaan alami, *cell senescence* yang terakumulasi di berbagai jaringan dari waktu ke waktu menyebabkan hilangnya integritas fisiologi secara progresif dan menyebabkan ketidakseimbangan fungsi organ tubuh sehingga rentan terjadi penyakit.^{4,5} Kondisi ini disebut juga "*wear and tear damage*", yaitu keausan yang normal karena pemakaian secara wajar. Selain itu, faktor gaya hidup tidak sehat seperti merokok juga berperan terhadap kejadian *age-related diseases* karena dapat meningkatkan kejadian penuaan sel akibat pemendekan telomer dan kerusakan DNA.^{4,5} Salah satu upaya preventif adalah memahami mekanisme penuaan dengan tujuan mengembangkan biomarker yang valid dan non-invasif untuk menegakkan diagnosis berbagai penyakit yang termasuk *age-related diseases*.

Studi biologi sel dan molekuler penuaan pada dasawarsa terakhir ini telah menemukan keterkaitan *microRNA* (miRNA) dalam mekanisme penuaan manusia dan prospeknya sebagai biomarker penuaan dan *age-related diseases*. *MicroRNA* adalah *non-coding single stranded RNA* dengan panjang sekitar 17-25 (umumnya 22) nukleotida yang mengontrol ekspresi gen dan ditemukan baik dalam sel maupun cairan ekstrasel. Mekanisme kerja miRNA yaitu dengan berikatan pada ujung 3' daerah *untranslated regions* (UTRs) *messenger RNA* (mRNA) targetnya. Ikatan antara miRNA dan sebagian mRNA target akan menghambat proses translasi, namun jika bagian tersebut berikatan dengan sempurna, maka akan menyebabkan degradasi mRNA targetnya sehingga tidak terjadi translasi atau ekspresi gen.⁶⁻⁹

Secara teori, miRNA dapat berikatan dengan banyak mRNA target dan mengatur lebih dari 60% mRNA mamalia.⁶ MiRNA mengatur berbagai proses biologi di manusia seperti proliferasi dan diferensiasi sel, migrasi sel, apoptosis,

perkembangan, serta metabolisme. Perubahan ekspresi miRNA juga terbukti berasosiasi dengan usia (penuaan), transformasi fenotip individu, serta patogenesis beberapa *age-related diseases* pada manusia.⁶ Beberapa penelitian terdahulu telah mengidentifikasi hsa-miR-331-3p terkait dengan berbagai penyakit kanker, baik berperan sebagai *downregulated* (menghambat patogenesis kanker) maupun sebaliknya, *upregulated*.¹⁰⁻¹⁷ Untuk menyatakan peran miRNA tersebut terhadap penyakit kanker, masih perlu dilakukan banyak studi lebih lanjut.

Penelitian ini secara bertahap bertujuan untuk mendapatkan gambaran data profil perbedaan ekspresi miRNA plasma darah kelompok usia tua dan muda dari dua keluarga (famili) subjek suku Jawa yang memiliki kondisi kesehatan dan sifat demografi yang mendekati sama. Beberapa miRNA yang ekspresinya berbeda bermakna antara dua kelompok usia dan konsisten di kedua famili yang diteliti mungkin dapat diasumsikan sebagai miRNA yang memengaruhi penuaan alamiah dan terjadinya *age-related diseases* di manusia. Setelah diperoleh gambaran profil miRNA plasma darah, dilakukan identifikasi miRNA lain yang mungkin berperan dalam penuaan dan dipilih salah satu miRNA yang diduga terkait dengan *age-related diseases* untuk dianalisis secara *in silico* terkait prediksi fungsi dan gen targetnya terhadap penuaan dan penyakit tersebut. Selain dapat digunakan sebagai dasar penelitian lanjutan agar dapat memahami mekanisme penuaan lebih lengkap, hasil penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi untuk pengembangan biomarker penuaan dan *age-related diseases* yang valid dan bersifat non-invasif. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menganalisis secara *in silico* hsa-miR-331-3p dari profil miRNA penuaan yang diprediksi berperan terhadap penuaan alamiah serta probabilitas keterkaitannya dengan penyakit kanker.

Metode

Sampel Penelitian

Penelitian dilakukan pada Januari 2016 – Desember 2018 dan telah disetujui oleh Komite Etik di Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya (No. 12/08/KEP-FKUAJ/2018). Subjek sebagai donor sampel untuk *profiling* miRNA berasal dari 2 pasang kakek dan cucu laki-laki dari 2 keluarga. Kriteria inklusi subjek yaitu usia cucu antara 17-25 tahun dan usia kakek ≥ 65 tahun, etnik suku (keturunan) Jawa,

tidak merokok maupun mengonsumsi minuman beralkohol, Indeks Massa Tubuh dalam rentang normal, tidak memiliki riwayat penyakit metabolik dan kardiovaskular (berdasarkan anamnesis dan uji laboratorium klinik), serta bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini.

Setelah diberikan penjelasan yang adekuat dan menandatangani *informed consent*, dilakukan pengambilan sampel darah perifer sebanyak 10 ml di Rumah Sakit Atma Jaya Jakarta. Spesimen darah ditampung dalam tabung berisi *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) sebagai anti koagulan, kemudian segera disentrifugasi untuk memisahkan plasma selanjutnya plasma diambil dan disimpan di suhu -80°C sampai waktu dilakukan analisis lebih lanjut (isolasi RNA).

Isolasi RNA Total dari Sampel Plasma Darah

RNA total dari plasma darah diisolasi menggunakan *miRCURY™ RNA Isolation Kit-Biofluids* (Exiqon) mengikuti instruksi dari produsen Kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark). RNA dan DNA *spike in* adalah RNA dan DNA sintesis yang tidak diekspresikan di sampel biologis yang diuji (*non-human*) dan digunakan untuk memastikan kualitas ekstraksi RNA serta tahap-tahap proses RT-qPCR. *Spike in* ditambahkan ke sampel sebelum diisolasi dan dapat diukur kembali setelah isolasi RNA serta proses RT-qPCR. Digunakan tiga jenis *spike in* RNA dengan fungsi yang berbeda-beda. Pertama untuk mengontrol isolasi RNA yaitu UniSp2, UniSp4, UniSp5 (ditambahkan saat pemurnian untuk mendeteksi perbedaan efisiensi ekstraksi). Kedua adalah mengontrol sintesis cDNA, yaitu UniSp6 (ditambahkan dalam reaksi *reverse transcriptase* yang memberikan kesempatan untuk mengevaluasi reaksi RT). Terakhir adalah *spike in* DNA (UniSp3) yang ada di semua panel. *Spike in* DNA terdiri dari kombinasi campuran DNA dan primer yang telah dibuat sebelumnya. Penyimpangan dalam reaksi ini menunjukkan hambatan di tingkat qPCR. Setelah semua tahap selesai, tabung koleksi berisi RNA disimpan dalam *freezer* -80°C .¹⁸

Profiling miRNA Plasma Darah Menggunakan Real Time qPCR

Empat sampel dari 2 pasang kakek-cucu dari 2 famili digunakan untuk membuat profil miRNA plasma. *Profiling* miRNA plasma dilakukan dengan kit Exiqon menggunakan metode *Real Time qPCR microRNA*. Pembentukan *complementary DNA* (cDNA) dilakukan dengan cara reaksi *reverse transcriptase* (RT) menggunakan *miRCURY*

LNA™ Universal RT miRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit sesuai protokol *miRCURY LNA™ Universal RT PCR miRNA* (Exiqon). Sebagai kontrol untuk sintesis cDNA ditambahkan UniSp6 untuk mengevaluasi reaksi RT.

Setiap miRNA diuji sebanyak tiga kali (rangkap tiga) dengan *Real Time qPCR microRNA* kit yang siap pakai, *the Human panel I + II ExiLENT SYBR® Green master mix* yang mencakup 752 miRNA. Amplifikasi dilakukan di *Light Cycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche, Mannheim, Jerman) di *plate* yang terdiri dari 384 lubang. Kurva amplifikasi dianalisis menggunakan *Roche LC software* untuk menentukan baik C_q (dengan turunan metode kedua) dan *melting curve*. Untuk memantau hemolisis, menggunakan dua miRNA, satu yang diekspresikan dalam sel darah merah (miRNA-451) dan satu yang relatif stabil dalam serum dan plasma dan tidak terpengaruh oleh hemolisis (miRNA-23a). Sampel dengan rasio di atas 7,0 memiliki peningkatan risiko terpengaruh hemolisis. Sampel dengan rasio lebih rendah umumnya tidak terpengaruh oleh hemolisis. Rasio 7,0 telah divalidasi secara eksperimental hanya untuk manusia. Untuk normalisasi data, rata-rata pengujian yang terdeteksi di semua sampel ($n = 4$ sampel) digunakan karena ini adalah sebagai normalisasi paling stabil. Ekstraksi RNA dan profil miRNA dilakukan menggunakan Exiqon.¹⁸ Nilai *fold change* (FC) dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Fold change} = 2^{\Delta\Delta C_t}$$

Keterangan:

$\Delta C_t = (C_t \text{ miRNA plasma} - C_t \text{ rata-rata RG miRNA plasma})$

$\Delta\Delta C_t (\Delta C_t \text{ (miRNA plasma pada orang tua)} - (\Delta C_t \text{ (miRNA plasma pada orang muda}))$ relatif terhadap sampel referensi

RG: *Reference gene*

Prediksi Gen Target dari Kandidat miRNA Plasma Darah

Beberapa kandidat miRNA yang telah diidentifikasi dari spesimen plasma darah dianalisis secara *in silico* untuk memprediksi gen targetnya dan pengayaan fungsinya dalam *signaling pathway* yang berhubungan dengan proses atau mekanisme penuaan dan patofisiologi penyakit terkait penuaan. Program yang digunakan untuk

analisis menggunakan tiga *database* yang tersedia secara umum. Tiga *database* tersebut adalah: *miRTarBase 2022* (<http://miRTarBase.cuhk.edu.cn>), *miRTargetLink Human* (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/>), dan *Gene Cards - Human gene data base* (<https://www.genecards.org/>). Program *miRTarBase 2022* dan *miRTargetLink Human* digunakan untuk mengetahui potensial target gennya. Dari puluhan gen yang ditarget masing-masing miRNA yang terdaftar dalam *database*, dipilih gen-gen yang paling kuat memengaruhi penuaan dan penyakit yang terkait (dari daftar gen penuaan dengan *score* yang tersedia dalam program tersebut). Selain

itu, miRNA tersebut telah banyak diteliti serta dibuktikan dengan metode yang valid dan akurat. Selanjutnya masing-masing kandidat gen yang ditarget oleh miRNA yang teridentifikasi dianalisis fungsinya dalam *signaling pathway* yang berperan dalam penuaan dan patofisiologi penyakit penuaan menggunakan program *genecards.org*.

Hasil

Hasil *profiling* miRNA plasma darah sampel usia tua dan muda yang berasal dari dua famili suku Jawa dapat dilihat secara berurutan dari perbedaan tingkat ekspresi dan nilai FC terbesar ke terkecil di Gambar 1.

Perbandingan Ekspresi microRNA Plasma darah Kakek terhadap Cucu Famili I						Perbandingan Ekspresi microRNA Plasma darah Kakek terhadap Cucu Famili II					
No.	Nama microRNA	Kakek I (K I)	Cucu I (C I)	K I – C I (log FC)	Fold change (FC)	No.	Nama microRNA	Kakek I I (K II)	Cucu II (C II)	K II – C II (log FC)	Fold change (FC)
1	hsa-miR-301a-3p	-2.763	-6.181	3.418	10.689	1	hsa-miR-576-5p	-3.273	-6.499	3.226	9.357
2	hsa-miR-339-5p	-2.318	-4.623	2.305	4.942	2	hsa-miR-376c-3p	-1.456	-4.505	3.049	8.276
3	hsa-miR-328-3p	-1.23	-3.406	2.176	4.519	3	hsa-miR-574-3p	-0.743	-3.726	2.983	7.906
4	hsa-miR-106a-5p	3.318	1.213	2.105	4.302	4	hsa-let-7i-3p	-4.581	-7.522	2.941	7.679
5	hsa-miR-181a-3p	-3.94	-5.969	2.029	4.081	5	hsa-miR-133b	-2.151	-4.763	2.612	6.114
6	hsa-miR-663b	-5.171	-7.098	1.927	3.803	6	hsa-miR-376a-3p	-1.152	-3.725	2.573	5.950
7	hsa-miR-598-3p	-2.786	-4.629	1.843	3.588	7	hsa-miR-329-3p	-4.56	-7.059	2.499	5.653
8	hsa-miR-502-5p	-4.658	-6.422	1.764	3.396	8	hsa-miR-214-3p	-3.152	-5.63	2.478	5.571
9	hsa-miR-331-3p	-2.412	-4.166	1.754	3.373	9	hsa-miR-885-5p	-3.494	-5.92	2.426	5.374
10	hsa-miR-1249	-4.867	-6.445	1.578	2.986	10	hsa-miR-26b-3p	-4.296	-6.717	2.421	5.355
11	hsa-miR-197-3p	-1.071	-2.631	1.56	2.949	11	hsa-miR-195-5p	-1.21	-3.597	2.387	5.231
12	hsa-miR-376c-3p	-2.29	-3.791	1.501	2.830	12	hsa-miR-17-5p	-3.474	-5.701	2.227	4.682
13	hsa-miR-27a-5p	-4.88	-6.376	1.496	2.821	13	hsa-miR-193a-5p	-3.433	-5.466	2.033	4.093
14	hsa-miR-146b-5p	-3.882	-5.369	1.487	2.803	14	hsa-miR-17-3p	-2.029	-4.044	2.015	4.042
15	hsa-miR-193b-3p	-1.332	-2.756	1.424	2.683	15	hsa-miR-340-5p	-2.567	-4.508	1.941	3.840
16	hsa-miR-624-5p	-5.852	-7.268	1.416	2.668	16	hsa-miR-326	-3.049	-4.928	1.879	3.678
17	hsa-miR-26b-3p	-4.057	-5.46	1.403	2.645	17	hsa-miR-324-5p	-2.808	-4.633	1.825	3.543
18	hsa-miR-144-5p	-0.435	-1.773	1.338	2.528	18	hsa-miR-98-5p	-5.094	-6.901	1.807	3.499
19	hsa-miR-152-3p	-0.915	-2.244	1.329	2.512	19	hsa-miR-141-5p	-3.439	-5.171	1.732	3.322
20	hsa-miR-26a-5p	1.024	-0.293	1.317	2.491	20	hsa-miR-483-5p	-3.232	-4.962	1.73	3.317
21	hsa-miR-574-3p	-0.763	-2.018	1.255	2.387	21	hsa-miR-331-3p	-3.57	-5.161	1.591	3.013
22	hsa-miR-151a-5p	0.477	-0.646	1.123	2.178	22	hsa-miR-135a-5p	-3.994	-5.521	1.527	2.882
23	hsa-miR-493-5p	-4.209	-5.272	1.063	2.089	23	hsa-miR-551a	-4.546	-6.005	1.459	2.749
24	hsa-let-7f-5p	-1.633	-2.649	1.016	2.022	24	hsa-miR-551b-3p	-3.398	-4.774	1.376	2.595
25	hsa-miR-95-3p	-3.789	-4.778	0.989	1.985	25	hsa-miR-122-5p	0.514	-0.776	1.29	2.445
26	hsa-miR-214-3p	-3.704	-4.667	0.963	1.949	26	hsa-miR-548c-5p	-4.28	-5.564	1.284	2.435
27	hsa-miR-30c-5p	-0.12	-1.068	0.948	1.929	27	hsa-miR-181b-5p	-3.499	-4.758	1.259	2.393
28	hsa-miR-223-3p	6.014	5.068	0.946	1.927	28	hsa-miR-874-3p	-2.547	-3.798	1.251	2.380
29	hsa-let-7g-5p	2.043	1.128	0.915	1.886	29	hsa-miR-365a-3p	-1.479	-2.692	1.213	2.318
30	hsa-miR-199a-5p	-0.843	-1.728	0.885	1.847	30	hsa-miR-339-3p	-1.314	-2.455	1.141	2.205
31	hsa-miR-103a-3p	2.26	1.397	0.863	1.819	31	hsa-miR-33a-5p	-3.396	-4.484	1.088	2.126
32	hsa-miR-221-3p	1.235	0.432	0.803	1.745	32	hsa-miR-10b-5p	0.348	-0.7	1.048	2.068
33	hsa-miR-18b-5p	-0.587	-1.381	0.794	1.734	33	hsa-let-7f-2-3p	-4.639	-5.663	1.024	2.034
34	hsa-miR-20a-5p	4.111	3.328	0.783	1.721	34	hsa-miR-362-3p	-1.084	-2.053	0.969	1.957
35	hsa-miR-766-3p	-3.002	-3.784	0.782	1.720	35	hsa-miR-139-5p	-1.063	-2.025	0.962	1.948
36	hsa-miR-362-5p	-6.202	-7.079	0.777	1.714	36	hsa-miR-486-3p	-3.771	-4.702	0.931	1.907
37	hsa-miR-33b-5p	-5.076	-5.835	0.759	1.692	37	hsa-miR-133a-3p	-3.918	-4.835	0.917	1.888
38	hsa-miR-128-3p	-3.066	-3.818	0.752	1.684	38	hsa-miR-30d-5p	1.589	0.681	0.908	1.876
39	hsa-miR-185-5p	4.069	3.331	0.738	1.668	39	hsa-miR-376b-3p	-4.395	-5.298	0.903	1.870
40	hsa-miR-215-5p	-0.183	-0.919	0.736	1.666	40	hsa-miR-34a-3p	-2.194	-3.086	0.892	1.856
41	hsa-miR-199a-3p	0.553	-0.167	0.72	1.647	41	hsa-miR-146a-5p	1.081	0.216	0.865	1.821
42	hsa-miR-345-5p	0.102	-0.582	0.684	1.607	42	hsa-miR-126-3p	4.114	3.265	0.849	1.801
43	hsa-miR-150-5p	2.463	1.785	0.678	1.600	43	hsa-miR-532-5p	-0.615	-1.435	0.82	1.765
44	hsa-miR-374b-5p	-1.849	-2.499	0.65	1.569	44	hsa-miR-664a-3p	-5.456	-6.267	0.811	1.754
45	hsa-miR-140-3p	2.746	2.132	0.614	1.530	45	hsa-miR-421	-4.013	-4.813	0.8	1.741
46	hsa-miR-142-5p	0.226	-0.354	0.58	1.495	46	hsa-miR-345-5p	0.619	-0.159	0.778	1.715
47	hsa-miR-93-5p	2.73	2.156	0.574	1.489	47	hsa-let-7b-3p	-1.994	-2.77	0.776	1.712
48	hsa-miR-16-5p	9.396	8.84	0.556	1.470	48	hsa-miR-154-5p	-2.128	-2.895	0.767	1.702
49	hsa-miR-192-5p	1.038	0.507	0.531	1.445	49	hsa-miR-1913	-4.48	-5.216	0.736	1.666
50	hsa-miR-320c	-1.158	-1.684	0.526	1.440	50	hsa-miR-16-2-3p	0.954	0.223	0.731	1.660

Gambar 1. Profil Ekspresi 50 miRNA Subjek Usia Tua (Kakek) dan Usia Muda (Cucu Laki-laki) dari Dua Famili Suku Jawa dan hsa-miR331-3p

Identifikasi miRNA yang kemungkinan berperan dalam penuaan dan *age-related diseases* dilakukan menggunakan data dari *list* profil 50 miRNA subjek usia tua (kakek) dibandingkan dengan subjek usia muda (cucu laki-laki) dua famili subjek penelitian. Penentuan identifikasi miRNA berdasarkan miRNA yang diekspresikan secara konsisten berbeda di dua kelompok sampel (usia tua dan muda) tersebut. Perbedaan ekspresi yang dapat mewakili adalah dengan nilai FC cukup tinggi, yaitu lebih dari 1,5. Salah satu dari beberapa miRNA yang memenuhi kriteria tersebut dan dipilih untuk dianalisis lebih lanjut secara *in silico* adalah hsa-miR-331-3p. Pemilihan ini terkait perannya dalam mekanisme penuaan dan patogenesis kanker.

Berdasarkan profil perbedaan ekspresi 50 miRNA antara subjek usia tua dan muda, dapat dilihat bahwa ekspresi hsa-miR-331-3p konsisten lebih tinggi pada subjek usia tua dibandingkan subjek usia muda di dua famili. Makna dari hasil *profiling* miRNA tersebut, hsa-miR-331-3p bersifat *upregulated* pada penuaan dan mekanisme kerja miRNA adalah *negative regulation* atau menekan gen tertentu/ targetnya. Hasil penelusuran menggunakan program *miRTarBase 2022* dan *miRTargetLink Human* mengungkapkan bahwa target hsa-miR-331-3p yang cukup kuat berdasarkan pembuktian dari berbagai penelitian terdahulu dengan beberapa metode yang valid adalah gen ERBB2 dan NRP2 (Gambar 2).



Gambar 2. Gen-gen yang Berasosiasi Kuat Ditarget oleh hsa-miR-331-3p (miRTarBase 2022, miRTargetLink Human)

Analisis *in silico* lebih lanjut menggunakan program *Gene Cards®: The Human Gene Database* (<https://www.genecards.org/>) untuk mengetahui fungsi dari gen-gen yang ditarget oleh hsa-miR-331-3p tersebut. Gen *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase* (ERBB2) terletak di kromosom 17q12 dan mengode protein faktor pertumbuhan epidermal, yang merupakan reseptor tirosin kinase dari famili *Erb-B2*.

Gen lain yang kuat ditarget oleh hsa-miR-331-3p adalah NRP yang terletak pada kromosom 2q33.3 dan mengode famili protein reseptor Neuropilin.

Diskusi

Berdasarkan hasil analisis bioinformatika, dua gen yang diprediksi menjadi target kuat oleh hsa-miR-331-3p yang bersifat *upregulated* terhadap penuaan pada dua keluarga subjek adalah gen ERBB2 dan

NRP2. Gen ERBB2 termasuk dalam kelompok gen (yang berperan dalam) penuaan dengan urutan ke-32 dan skor 33,05. Beberapa jalur persinyalan yang melibatkan gen ERBB2 yaitu apoptosis, mTOR, dan NF-κB, di mana ketiganya berperan dalam pengaturan regenerasi sel, metabolisme sel, serta respons peradangan, imun, dan stres dalam pemeliharaan sel. Apoptosis mengatur kematian sel terprogram yang terjadi selama perkembangan dan penuaan tanpa terjadi peradangan yang berperan dalam pergantian dan pembaruan sel. *The mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) Complex berperan dalam pengaturan seluler pusat metabolisme dan kelangsungan hidup seluler dan *Nuclear factor kappa B signaling* (NF-Kappa Beta/ NF-κB) berperan penting dalam peradangan dan respons imun dan stres.

Gen NRP2 tidak terdaftar dalam kelompok gen penuaan atau mungkin termasuk dalam

gen penuaan namun dengan skor yang sangat kecil (dalam daftar gen penuaan terdapat 23182 gen). Namun, gen ini juga berperan dalam jalur persinyalan apoptosis seperti ERBB2 dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) R2 sebagai pengatur utama vaskulogenesis fisiologis dan patologis, angiogenesis, serta limfangiogenesis. Aktivitas biologis dari isoform VEGF yang berbeda dimediasi melalui pengikatan dan aktivasi reseptor tirosin kinase (VEGF R) yang terlokalisasi di membran. Tiga VEGF R yang telah diidentifikasi yaitu VEGF R1, VEGF R2, dan VEGF R3. Kaskade persinyalan hilir umum yang diprakarsai oleh perekrutan VEGF R2 dari molekul pensinyalan ini termasuk jalur ERK1/2 MAP Kinase, FAK, p38 MAP Kinase, Akt, dan Jak-STAT, yang menghasilkan aktivasi berbagai respons biologis yang mengatur angiogenesis, termasuk proliferasi sel endotel, kelangsungan hidup, adhesi, migrasi, permeabilitas vaskular, dan *Telomerase Components in Cell Signaling* yang berkaitan dengan aktivitas telomer dan berperan dalam penuaan sel.

Seiring bertambahnya usia seseorang, ekspresi serta aktivitas gen ERBB2 dan NRP2 sebagai target hsa-miR-331-3p mengalami penurunan. Dengan demikian, berbagai jalur persinyalan terkait hsa-miR-331-3p yang berperan dalam regenerasi sel, metabolisme sel, serta respons imun dan stres mulai menurun. Situasi dan kondisi tersebut menunjukkan dan kompatibel dengan kondisi penuaan kronologis.

Beberapa penelitian terdahulu telah memaparkan hubungan hsa-miR-331-3p dengan penyakit kanker. Epis dkk.¹⁴ menyatakan bahwa hsa-miR-331-3p dapat memengaruhi kejadian kanker secara *downregulated* dengan mentarget gen ERBB2 melalui jalur persinyalan PI3K/AKT. Penelitian lain pada kanker paru menemukan bahwa hsa-miR-331-3p mentarget gen ERBB2/VAV2 secara *downregulated* melalui jalur persinyalan Rac1/PAK1/ β -catenin.¹¹ Sementara itu, penelitian pada kanker kolorektal menunjukkan bahwa hsa-miR-331-3p mentarget gen HER2 dan NRP2 melalui jalur persinyalan PI3K/Akt, ERK1/2 dan bersifat *downregulated*.^{12,13} Laporan mengenai peran hsa-miR-331-3p pada kanker yang bersifat *upregulation* adalah pada kanker payudara dan kanker pankreas dengan mentarget gen ST7L melalui jalur persinyalan WNT/ β -catenin.^{15-17,19}

White dkk.²⁰ memaparkan bahwa *Kallikrein-related peptidases* (KLKs), suatu anggota famili serin protease, dapat berfungsi sebagai biomarker kanker dan bersifat *dysregulated* pada kanker prostat. Dengan melakukan metode transfeksi,

miR133-3p dan miR143 pada *cell line* sel kanker prostat dapat menurunkan ekspresi gen target KLK4 dan KLK10 serta penurunan pertumbuhan sel yang diamati.²⁰ Data ini menunjukkan bahwa miRNA dapat berkontribusi pada regulasi KLKs dan bersifat *upregulated* pada sel kanker prostat.²⁰ Interaksi miRNA-KLK memproyeksikan elemen baru dalam patogenesis kanker prostat yang mungkin memiliki implikasi terapeutik.

Berdasarkan hasil berbagai penelitian tersebut, dapat diprediksi bahwa miRNA dapat mengatur proliferasi sel, apoptosis, dan karsinogenesis dengan menargetkan mRNA atau gen terkait pada berbagai jenis kanker. Mekanisme kerja miRNA pada patogenesis kanker bervariasi karena dapat bersifat *downregulation* maupun *upregulation*. Hal ini disebabkan karena pengaturan gen yang diduga berperan dalam penyakit kanker hanya merupakan salah satu dari banyak faktor penyebab kanker. Selain itu, penelitian yang menjelaskan mengenai dinamika pengaturan miRNA terhadap mRNA targetnya memaparkan bahwa mekanisme kerja miRNA dalam mengatur gen targetnya dapat bervariasi, bergantung pada kondisi internal maupun eksternal.⁹

Kesimpulan

Penelitian awal ini berhasil mengidentifikasi hsa-miR-331-3p yang diprediksi *upregulated* pada penuaan kronologis berdasarkan profil perbedaan ekspresi miRNA plasma darah pada orang tua dan orang muda dari dua keluarga subjek. Berdasarkan analisis *in silico*, hsa-miR-331-3p diduga mentarget gen ERBB2 dan NRP2 yang diprediksi berperan dalam mekanisme penuaan kronologis dan mungkin memengaruhi patogenesis kanker. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui peran hsa-miR-331-3p dalam mekanisme penuaan manusia dan patogenesis penyakit kanker.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya yang telah membantu dalam hal pendanaan sehingga penelitian ini dapat berlangsung.

Daftar Pustaka

1. Badan Pusat Statistik. Statistik Indonesia 2020. Jakarta: Badan Pusat Statistik; 2020.
2. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Gambaran Kesehatan Lanjut Usia di Indonesia. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2013.
3. Pusdatin Kemenkes Indonesia. InfoDATIN Situasi dan Analisis Lanjut Usia. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2014.

4. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153:1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
5. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*. 2015;21:1424-35. doi: 10.1038/nm.4000.
6. Liang H, Gong F, Zhang S, Zhang CY, Zen K, Chen X. The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014;5:285-300. doi: 10.1002/wrna.1208.
7. Harries LW. MicroRNAs as Mediators of the Ageing Process. *Genes*. 2014;5:656-70. doi: 10.3390/genes5030656.
8. Mancini M, Lena AM, Saintigny G, Mahé C, Di Daniele N, Melino G, et al. MicroRNAs in human skin ageing. *Ageing Res Rev*. 2014;17:9-15. doi: 10.1016/j.arr.2014.04.003.
9. Ni WJ, Leng XM. Dynamic miRNA-mRNA paradigms: New faces of miRNAs. *Biochem Biophys Rep*. 2015;4:337-41. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.10.011.
10. Li X, Zhu J, Liu Y, Duan C, Chang R, Zhang C. MicroRNA-331-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition by targeting ErbB2 and VAV2 through the Rac1/PAK1/ β -catenin axis in non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2019;110:1883-96. doi: 10.1111/cas.14014.
11. Zhang YH, Jin M, Li J, Kong X. Identifying circulating miRNA biomarkers for early diagnosis and monitoring of lung cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Disease*. 2020;1866:165847. doi: 10.1016/j.bbdis.2020.165847.
12. Zhao D, Sui Y, Zheng X. MiR-331-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting HER2 through the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2016;35, 1075–82. doi: 10.3892/or.2015.4450.
13. Zhang H, Wang R, Wang M. miR-331-3p suppresses cell invasion and migration in colorectal carcinoma by directly targeting NRP2. *Oncol Lett*. 2019;18:6501-8. doi: 10.3892/ol.2019.11029.
14. Epis MR, Giles KM, Barker A, Kendrick TS, Leedman PJ. miR-331-3p regulates ERBB-2 expression and androgen receptor signaling in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2009;284:24696-704. doi: 10.1074/jbc.M109.030098.
15. Papadopoulos EI, Papachristopoulou G, Ardavanis A, Scorilas A. A comprehensive clinicopathological evaluation of the differential expression of microRNA-331 in breast tumors and its diagnostic significance. *Clin Biochem*. 2018;60:24-32. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.07.008.
16. McAnena P, Tanriverdi K, Curran C, Gilligan K, Freedman JE, Brown J, et al. Circulating microRNAs miR-331 and miR-195 differentiate local luminal a from metastatic breast cancer. *BMC Cancer*. 2019;19:436-45. doi: 10.1186/s12885-019-5636-y.
17. ZhanT, ChenX, TianX, HanZ, LiuM, ZouY, et al. MiR-331-3p Links to Drug Resistance of Pancreatic Cancer Cells by Activating WNT/ β -Catenin Signal via ST7L. *Technol Cancer Res Treat*. 2020;19:1533033820945801. doi: 10.1177/1533033820945801.
18. Exiqon, 2014. miRCURY™ RNA Isolation Kit 1–44.
19. Chen X, Luo H, Li X, Tian X, Peng B, Liu S, et al. miR-331-3p functions as an oncogene by targeting ST7L in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2018;3:1006-15. doi: 10.1093/carcin/bgy074.
20. White NMA, Youssef YM, Fendler A, Stephan C, Jung K, Yousef GM. The miRNA-kallikrein axis of interaction: a new dimension in the pathogenesis of prostate cancer. *Biol Chem*. 2012;393:379-89. doi: 10.1515/hsz-2011-0246.