

Conference Paper

Autentikasi Galur Sel kanker Dengan Metode *Short Tandem Repeat (STR)* pada Galur Sel Kanker Payudara MCF-7

Cell Line Authentication (CLA) using Short Tandem Repeat (STR) Method on Breast Cancer cell line MCF-7

Pendrianto^{1*}, Muhammad Samsul Mustofa^{1,2}, Silviatun Nihayah³

¹Telomere Research Center, YARSI University Research Institute, YARSI University, Jakarta

²Department of Anatomy, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

³YARSI University Research Institute, YARSI University, Jakarta

*Corresponding author:

E-mail: pendrianto@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian tentang penyakit pada manusia khususnya kanker secara umum diawali dengan studi secara *in vitro* menggunakan galur sel. Namun galur sel yang ditumbuhkan secara *in vitro* dapat terjadi kontaminasi silang atau bahkan kesalahan dalam proses identifikasi. Untuk itu diperlukan prosedur *cell line authentication (CLA)* atau autentikasi galur sel menggunakan pendekatan molekuler. Dalam proses ini, diperlukan analisis varian alel dari beberapa lokus untuk memastikan varian ini cocok dengan alel yang diharapkan. Metode STR dapat dimanfaatkan untuk autentikasi galur sel, karena dapat membandingkan profil alel dengan sampel galur sel standar yang diketahui, mampu memberikan "sidik jari" genetik sederhana, murah, dan sangat spesifik pada galur sel. Diperlukan autentikasi galur sel pada koleksi galur sel yang ada di Laboratorium Pusat Studi Sel Punca pada Lembaga Penelitian Universitas YARSI agar penelitian *in vitro* dan *in vivo* tentang antikanker, antioksidan, *ageing*, *longevity* yang melibatkan galur sel menghasilkan luaran yang valid. Metode penelitian adalah eksperimental laboratorium, galur sel kanker payudara MCF-7 ditumbuhkan pada media tumbuh mengandung serum dan antimikroba-antimikotik. DNA genomik diisolasi dengan Maxwell® RSC Whole Blood DNA Kit, Proses PCR menggunakan GlobalFiler™ PCR amplification Kit (Applied Biosystem) dan analisa fragmen dengan Genetic Analyzer 3500. Hasil sementara analisa fragmen pada dua galur MCF-7 yang berasal dari tempat yang berbeda menunjukkan bahwa galur tersebut tidak autentik. Kemungkinan disebabkan oleh kontaminasi silang selama aktivitas di dalam laboratorium. Hal ini menyebabkan dua galur sel tersebut tidak dapat digunakan sebagai bahan dalam penelitian *in vitro*. Terdapat limitasi pada penelitian ini karena hanya menganalisa pada 1 batch subkultur pada masing-masing galur sel. Diperlukan penelitian lanjutan untuk analisa fragmen pada keseluruhan batch subkultur galur sel yang ada Laboratorium Pusat Studi Sel Punca pada Lembaga Penelitian Universitas YARSI.

Kata Kunci: *In vitro*, CLA, STR, MC-7, kanker payudara, galur sel

ABSTRACT

Research on human diseases, especially in cancer begins with in vitro studies using cell lines. However, cell lines grown in vitro can occur cross-contamination or even miss-identification. This requires a cell line authentication (CLA) procedure using a molecular approach. In this process, analysis of allele variance from several loci is needed to ensure that this variant matches the expected allele. The STR method can

How to cite:

Pendrianto, Mustofa, M. S., & Nihayah, S. (2022). Cell Line Authentication (CLA) using Short Tandem Repeat (STR) method on breast cancer cell line MCF-7. *Basic and Applied Science Conference (BASC) 2021*. NST Proceedings. pages 6-11. doi: 10.11594/nstp.2022.1802

be used to authenticate cell lines, because it can compare allele profiles with a sample of known standard cell lines, and also able to provide simple, inexpensive, and very specific genetic "fingerprints" on cell lines. It is necessary to authenticate cell lines in collections of cell lines in the Central Laboratory for Stem Cell Studies at the YARSI University Research Institute, so that *in vitro* and *in vivo* studies on anti-cancer, antioxidants, aging, and longevity involving cell lines will produce valid outcomes in future research. The research method was laboratory experimental. breast cancer cell lines MCF-7, grown on growth media containing serum and antimicrobial-antimycotic. Genomic DNA was isolated by Maxwell® RSC Whole Blood DNA Kit. PCR process using GlobalFiler™ PCR amplification Kit (Applied Biosystem) and fragment analysis was analyzed with Genetic Analyzer 3500. The preliminary results of fragment analysis on two MCF-7 lines originating from two different places indicated that these cell lines were inauthentic. Possibly due to cross contamination during activity in the laboratory. This makes the two cell lines unusable as materials in *in vitro* studies. There are limitations to this study because it only analyzed 1 batch of subcultures for each cell line. Further research is needed in the entire batch of culture collection in the Central Laboratory for Stem Cell Studies at the YARSI University Research Institute.

Keywords: *In vitro*, CLA, STR, MCF-7, breast cancer, cell line

Pendahuluan

Penelitian tentang penyakit pada manusia khususnya kanker banyak dilakukan menggunakan galur sel yang dikultur secara *in vitro*, namun sel yang digunakan dalam penelitian tersebut dapat terkontaminasi dengan galur sel yang lain (kontaminasi silang) atau bahkan terjadi kesalahan dalam proses identifikasi (Lorsch *et al.*, 2016; Weinstein, 2012). Publikasi hasil penelitian dapat menyesatkan jika ternyata galur sel yang digunakan tersebut salah dalam identifikasi dan dapat menambah besarnya biaya penelitian (Capes-Davis *et al.*, 2010; He *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017). Ilmuwan dan organisasi penelitian telah melakukan upaya untuk mengatasi masalah ini. Pada tahun 2007, NIH mengeluarkan sebuah *Guide Notice* yang terkait dengan kesalahan identifikasi galur sel dan meminta mitra bestari (reviewer) pada hibah dan manuskrip untuk memberikan perhatian khusus pada masalah ini (Bravo & Gottesman, 2007).

Untuk mengatasi hal ini, diperlukan prosedur autentikasi galur sel (*cell line authentication*, CLA) dengan pendekatan molekuler. Dalam penetapan autentikasi galur sel, diperlukan analisis varian alel dari beberapa lokus dan memastikan varian ini cocok dengan alel yang diharapkan. Ada beberapa metode untuk menganalisis varian alel pada lokus, mulai dari analisis elektroforesis varian isozim menggunakan analisis *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP) dan *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP), hingga Next-Generation Sequencing (NGS) dan analisis menggunakan spektrometri massa MALDI-TOF. Sayangnya, metode tersebut di atas memiliki kekurangan antara lain proses yang rumit dan biaya yang sangat mahal.

Short Tandem Repeat (STR) adalah sekuen DNA pendek yang berulang (2-7 pasang basa) (Butler, 2012). Para peneliti menemukan bahwa STR relatif mudah untuk diukur dan dibandingkan antar individu sehingga metode ini teruji dan biasa digunakan dalam analisis forensik DNA untuk proses identifikasi individu manusia (Norrgard, 2008; Butler, 2012). Metode STR ternyata dapat dimanfaatkan untuk autentikasi galur sel. Hal ini karena metode STR dapat membandingkan profil alel yang ada pada lokus yang sangat bervariasi dengan sampel galur sel standar yang diketahui, sehingga memberikan keyakinan bahwa galur sel tersebut adalah autentik (Barallon *et al.*, 2010; Oostdik *et al.*, 2014). Disamping itu analisis STR mampu memberikan "sidik jari" genetik sederhana yang murah, dan sangat spesifik pada galur sel.

Laboratorium Pusat Studi Sel Punca (*Stem Cell*) pada Lembaga Penelitian Universitas YARSI memiliki beberapa koleksi galur sel kanker dan sel normal, termasuk beberapa sub-kultur dari galur-galur sel tersebut. Sampai saat ini belum pernah dilakukan autentikasi galur sel pada koleksi sel tersebut. Untuk itu, agar penelitian *in vitro* dan *in vivo* yang dilakukan oleh beberapa Pusat Studi terutama Pusat Studi Telomer di lingkungan Lembaga Penelitian Universitas YARSI tentang antikanker, antioksidan, *ageing*, *longevity* dan lain-lain yang melibatkan galur sel menghasilkan luaran yang valid dalam penelitian, maka akan dilakukan analisa STR untuk autentikasi galur sel. Pada penelitian ini, analisa STR akan dilakukan pada galur sel kanker payudara MCF-7 yang

tersimpan dalam tabung penyimpanan nitrogen cair yang dimiliki oleh Pusat Studi Sel Punca Lembaga Penelitian Universitas YARSI yang berasal dari dua tempat berbeda.

Bahan dan Metode

Penumbuhan sel

Bahan berupa galur sel kanker payudara MCF-7 dari salah satu *batch* sub kultur yang berasal dari dua sumber berbeda yaitu A dan B yang menjadi kultur koleksi dari Laboratorium Pusat Studi Sel Punca (*Stem Cell*) pada Lembaga Penelitian Universitas YARSI. Galur Sel MCF-7 ditumbuhkan dalam labu T-flask 75 cm² dalam jumlah 1×10^6 sel / labu menggunakan medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) rendah glukosa mengandung 10% FBS, 1% antibiotik-antimikotik dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂ (Sweeney *et al.*, 2018). Pemanenan sel dilakukan untuk mendapatkan lisat sel dan jumlah sel yang dipanen dalam bentuk lisat berjumlah 2×10^6 sel per tabung mikro 1.5mL untuk selanjutnya diisolasi total DNA genomik atau disimpan dalam -20°C.

Ekstraksi DNA genomik

Ekstraksi DNA genomik dari masing-masing sampel sel dilakukan dengan menggunakan protokol yang ada pada kit *Maxwell® RSC Whole Blood DNA Kit* (Promega). Jumlah sel yang diekstrak harus sebanyak 2×10^6 sel per reaksi untuk mendapatkan konsentrasi DNA di atas 100ng/μL. Sampel sel yang akan diekstrak, terlebih dahulu dilarutkan dalam *nuclease free water* sebanyak 300 μL.

Pengukuran kadar, kemurnian DNA genomik, dan normalisasi kadar DNA genomik

Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi diukur dengan *Tecan Infinite M200*. Kemurnian DNA diukur dengan rasio 260/280 dalam rentang 1,8-2,0 (Desjardins & Conklin, 2010). Sampel DNA genomik hasil ekstraksi yang sudah diukur konsentrasi dan kemurniannya, harus dinormalisasi dengan konsentrasi masing-masing 100ng/μL, dialiquote dalam beberapa tabung dan disimpan dalam -20°C.

Amplifikasi DNA dan analisa fragmen

Proses amplifikasi dengan metode PCR menggunakan *GlobalFiler™ PCR amplification Kit* (Applied Biosystem) dan analisa fragmen menggunakan *Genetic Analyzer 3500*. Pengujian pada kedua proses tersebut dilakukan di PUSLABFOR Polri, Sentul. Data yang diperoleh dianalisa menggunakan software *GeneMapperID-X v1.2* yang ada pada alat *Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer*. Untuk penentuan persentase kecocokkan, *The International Cell Line Authentication Committee* (ICLAC) (2012) telah memberikan pedoman dalam interpretasi hasil analisis yaitu: sel yang alelnya memiliki kemiripan dalam rentang 80-100% merupakan sel yang autentik atau sesuai, sementara persentase kemiripan alel dalam rentang kurang dari 50% maka bukan merupakan sel yang sesuai yang kemungkinan adalah karena kesalahan identifikasi atau terjadi kontaminasi silang. Sel yang autentik akan dijadikan sel rujukan untuk penelitian selanjutnya di lingkungan Lembaga Penelitian Universitas YARSI, sementara sel yang tidak autentik akan dilabel dengan identitas sel yang sesuai dengan profil STR nya atau dimusnahkan.

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi total DNA genomik pada Galur sel kanker payudara MCF-7 dari sumber pertama didapatkan 106,4 ng/μL, sementara sumber kedua didapatkan sebanyak 250,7 ng/μL. Kemudian dilakukan proses normalisasi konsentrasi DNA masing-masing untuk mendapatkan larutan stok 100 ng/μL dan larutan kerja 10 ng/μL yang dialiquote ke beberapa tabung mikro.

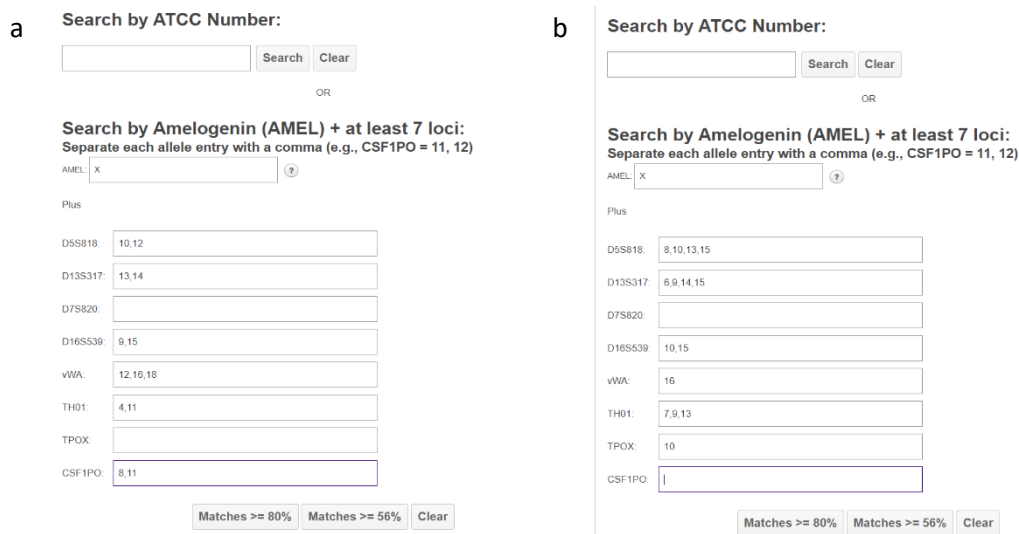
Amplifikasi DNA dengan metode PCR menggunakan *GlobalFiler™ PCR amplification Kit* (Applied Biosystem) menggunakan larutan kerja 10 ng/μL dengan mengikuti protokol standar dari manufaktur, yang dilanjutkan dengan analisa fragmen STR menggunakan *Genetic Analyzer 3500*.

Data yang diperoleh dianalisa menggunakan software GeneMapperID-X v1.2 yang ada pada alat Applied Biosystems 3500 *Genetic Analyzer* dan didapatkan hasil seperti yang ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Profil lokus galur sel kanker payudara MCF-7 pada sumber A dan B dibandingkan dengan profil standar dari ATCC

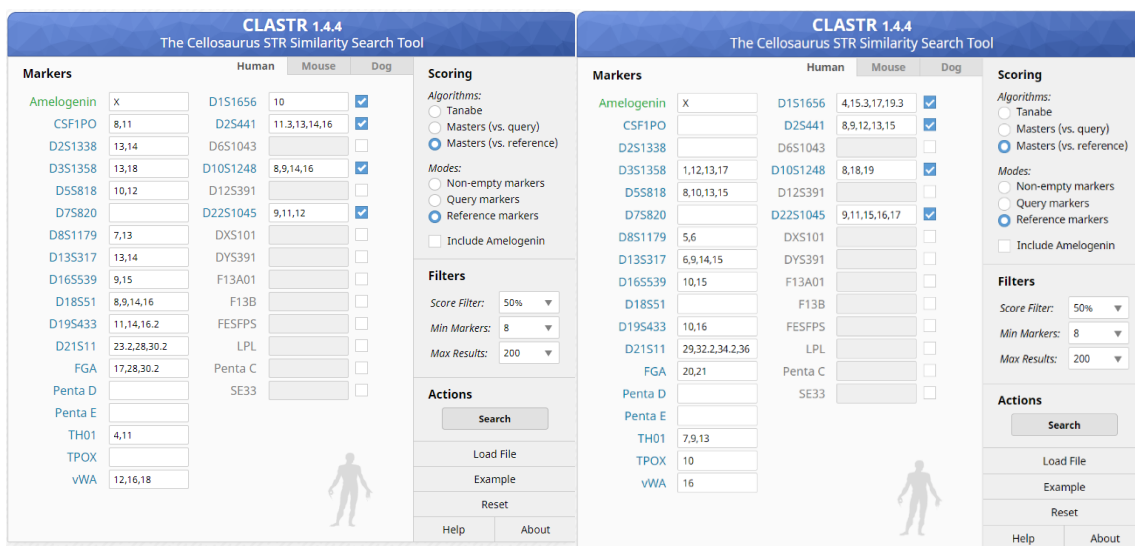
STR Loci	MCF7 (ATCC HTB-22)*	MLF 7 Sumber A	MLF 7 Sumber B
CSF1PO	10	8,11	
D13S317	11	13,14	6,9,14,15
D16S539	11,12	9,15	10,15
D5S818	11,12	10,12	8,10,13,15
D7S820	8,9		
TH01	6	4,11	7,9,13
TPOX	9,12		10
vWA	14,15	12,16,18	16
Amelogenin	X	X,X	X,X
D2S1338		13,14	
D21S11		23.2, 28, 30.2	27,29,32.2,34.2,36
D8S1179		7,13	5,6
D12S391			
SE33			24.2,25.2,35,37
D22S1045		9,11,12	9,11,15,16,17
DYS391			
D19S433		11,14,16.2	10,16
FGA		17,28,30.2	20,21
D3S1358		13,18	1,12,13,17
D1S1656		10	14,15.3, 17,19.3
D2S441		11.3, 13,14,16	8,9,12,13,15
D10S1248		8,9,14,16	8,18,19
D18S51			
Catatan:	* Standard profile from ATCC		

Dari 8 lokus utama ditambah dengan amelogenin, seperti profil STR standar galur sel kanker payudara MCF-7 dari ATCC (American Type Culture Collection), kedua sumber hanya menampilkan 6 lokus. Lokus D7S820 dan TPOX pada sumber A tidak tersedia, sementara sumber B tidak tersedia data dari lokus CSF1PO dan D7S820. Analisa kecocokkan melalui *matching algorithm* yang tersedia pada laman resmi ATCC (https://www.atcc.org/STR_Database.aspx) tidak dapat dilakukan karena tidak memenuhi persyaratan minimal di mana harus terdapat 7 profil lokus dan amelogenin untuk analisa tersebut (Gambar 1).



Gambar 1. Tampilan *random matching* pada laman ATCC. a adalah profil STR pada galur sel MCF-7 sumber pertama (A) dan b adalah sumber kedua (B)

Untuk itu diperlukan cara lain untuk analisa STR dari profil STR di tabel 1. Robin *et al.* (2020) pada tahun 2020 memperkenalkan CLASTR (*Cell Line Authentication using STR*), sebuah alat pencarian kemiripan STR dari Cellosaurus, yang bertujuan untuk menyediakan sebuah panel besar yang fungsional untuk memfasilitasi proses pencarian kemiripan dari profil STR. Informasi yang dirilis pada aplikasi versi 37 per Januari 2021 sudah memuat data galur sel sebanyak 126502 cell lines (sebanyak 95468 dari manusia, sebanyak 21235 dari mencit, dan tikus sebanyak 2190). Alat pencarian ini bisa diakses pada laman *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB) ExpASyweb server2 (<https://web.expasy.org/cellosaurus>). Data pada Cellosaurus ini diperbarui secara berkala dan pengguna dapat mencari pada pangkalan data dengan tiga format data. Dengan mengakses lama di atas dan memasukkan profil STR dari galur sel MCF-7 pada sumber A dan B maka didapatkan data seperti pada gambar 2.



Gambar 2. Tampilan CLASTR pada MCF-7 sumber A (kiri) dan B (kanan)

Hasil pencarian dengan data STR pada Gambar 2 kiri di dapatkan kecocokkan hanya berkisar 50% cocok dengan *lung adenocarcinoma* (galur sel kanker). Namun karena kemiripan di bawah 80% dan diperlukan analisa lanjutan untuk autentikasi maka sampel galur sel MCF-7 dari sumber A dianggap tidak valid (tidak autentik). Sementara, hasil pencarian dengan data STR pada Gambar 2 kanan, di dapatkan kecocokkan hanya berkisar 50% dengan sel dari penderita parkinson dengan kategori sel *induced pluripotent stem cell* dan 54,55% mirip dengan sel melanoma dari *lymph node* (galur sel kanker). Namun karena kemiripan di bawah 80% dan diperlukan analisa lanjutan untuk autentikasi maka sampel galur sel MCF-7 dari sumber B juga dianggap tidak valid (tidak autentik).

Dari hasil ini maka untuk sampel sumber A dan B pada batch tersebut, maka sampel sel tersebut tidak dapat digunakan sebagai bahan penelitian selanjutnya di lingkungan Lemlit Univ. YARSI. Kemungkinan sel tidak autentik karena kontaminasi silang yang terjadi saat bekerja di dalam laboratorium atau salah dalam memberikan label (Lorsch *et al.*, 2016; Weinstein, 2012). Kemungkinan kedua, sel sudah tidak autentik saat kali pertama dibawa dari sumber A dan B.

Kesimpulan

Galur Sel MCF-7 yang berasal dari 2 tempat yang berbeda yaitu A dan B, memiliki profil yang jauh berbeda dengan profil asalnya yang sama dengan ATCC bahkan setelah dilakukan analisa STR lanjutan dengan *tool* CLASTR. Namun demikian, hasil penelitian ini memiliki limitasi hanya pada satu batch sub kultur dari galur sel kanker payudara MCF-7 pada kedua dumber di atas.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas YARSI atas bantuan penelitian ini melalui dana Hibah Internal 2019/2020.

Daftar Pustaka

- Barallon, R., Bauer, S. R., Butler, J., Capes-Davis, A., et al. (2010). Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, 46(9), 727-32. doi: 10.1007/s11626-010-9333-z. Epub 2010 Jul 8.
- Bravo, R. N., & Gottesman, M. (2007). Notice regarding authentication of cultured cell lines. Accessed <http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-OD-08-017.html>. Diakses pada Agustus 2019.
- Butler, J. M. (2012). *Short Tandem Repeat (STR) loci and kits*. In Butler JM, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. California: Academic Press, 99-100.
- Capes-Davis, A., Theodosopoulos, G., Atkin, I. et al. (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer*, 127(1),1-8. Doi:10.1002/ijc.25242.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J. Vis. Exp.*, 45, e2565. Doi:10.3791/2565
- He, Y., Chen, F., Cai, Y., & Chen, S. (2016). Retracted: Knockdown of tumor protein D52-like 2 induces cell growth inhibition and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Cell Biol Int.*, 39(3), 264-71. doi: 10.1002/cbin.10388.
- Huang, Y., Liu, Y., Zheng, C., & Shen, C. (2017). Investigation of cross-contamination and misidentification of 278 widely used tumor cell lines. *PLoS One*, 12(1), e0170384. doi: 10.1371/journal.pone.0170384.
- Lorsch, J. R., Collins, F. S., & Lippincott-Schwartz, J. (2016). Fixing problems with cell lines. *Science*, 6216, 1452-1453.
- Norrsgard, K. (2008). *Forensics, DNA fingerprinting, and CODIS*. *Nature Education* 1(1):35
- Oostdik, K., Lenz, K., Nye, J et al. (2014). Developmental validation of the PowerPlex® Fusion System for analysis of casework and referencesamples: A 24-locus multiplex for new database standards. *Forensic Sci. Int.-Gen.*, 12, 69-76.
- Robin, T., Davis, A. C., & Bairoch, A. (2020). CLASTR: The Cellosaurus STR similarity search tool - Apprecious help for cell line authentication. *Int. J. Cancer*, 146, 1299-1306.
- Sweeney, M. F., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2018). Characterization of MCF-12A cell phenotype, response to estrogens, and growth in 3D. *Cancer Cell Int.*, 18, 43. doi: 10.1186/s12935-018-0534-y
- The International Cell Line Authentication Committee (ICLAC). (2012). *Guide to Human cell line authentication: A simple and inexpensive step-by-step protocol*. http://standards.atcc.org/kwspub/home/the_international_cell_line_authentication_committee-iclac/Authentication_SOP.pdf
- Weinstein, J. N. (2012). Drug discovery: Cell lines battle cancer. *Nature*, 483(7391), 544-5.