

## Tinjauan Pustaka

**Next-Generation Sequencing pada Kanker Paru**

Hana K.P. Faisal,\* Jamal Zaini, Faisal Yunus

Departemen Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi, Fakultas Kedokteran,  
Universitas Indonesia-Rumah Sakit Umum Pusat Persahabatan, Jakarta, Indonesia\*Penulis Korespondensi: hana.kp.faisal@gmail.com  
Diterima: 27 Januari 2020; Disetujui: 29 Agustus 2020  
DOI: 10.23886/ejki.8.11579.**Abstrak**

Kanker merupakan penyakit genetik, oleh sebab itu, tata laksana kanker didasarkan pada kelainan atau mutasi genetik yang terjadi pada masing-masing pasien kanker. Next-generation sequencing (NGS) adalah teknologi sekuensing gen dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi, yang dikembangkan untuk mendeteksi lebih dari satu kelainan genetik secara bersamaan dalam sekali pemeriksaan. Teknologi NGS tidak memerlukan banyak materi genetik untuk menghasilkan data besar. Diagnosis kanker paru ditegakkan berdasarkan temuan histopatologi pada sediaan biopsi yang umumnya diperoleh melalui prosedur bronkoskopi. Sediaan biopsi dari bronkoskopi relatif sedikit sehingga pemeriksaan mutasi genetik yang dapat dilakukan hanya terbatas pada mutasi yang sering (hotspot). Oleh sebab itu, teknologi NGS dapat menjadi metode yang lebih sesuai untuk mengetahui profil mutasi pasien agar tata laksana kanker paru dengan prinsip precision medicine dapat diterapkan.

**Kata kunci:** next-generation sequencing, deteksi genetik, precision medicine, profil mutasi, kanker paru

**Next-Generation Sequencing in Lung Cancer****Abstract**

Cancer is a genetic disease, hence, it is understandable that cancer management should be based on genetic alterations of each cancer patients. Next-generation sequencing is a high-sensitivity and specificity technology developed to detect multiple gene alterations in a single test that requires only a little amount of genetic materials and yet may generate big data. Lung cancer diagnosis is still based on histopathological findings on a limited biopsy specimen obtained during bronchoscopy. Consequently, genetic detection in lung cancer is often limited to hotspot mutations. Therefore, NGS can be a suitable method for genetic mutation profiling in order to apply precision medicine principle in lung cancer management.

**Keywords:** next-generation sequencing, genetic detection, precision medicine, mutation profiling, lung cancer

## Pendahuluan

Kanker adalah penyakit genetik yang menyebabkan akumulasi gangguan molekul yaitu inti pembentukan tumor (tumorigenesis) hingga akhirnya berkembang menjadi malignansi (kanker).<sup>1</sup> Gen yang berperan dalam pembentukan kanker (onkogenesis) disebut onkogen. Jika gen teraktivasi, akan merangsang proliferasi sel kemudian bertransformasi menjadi kanker. Gen yang menekan pembentukan tumor disebut *tumor suppressor*. Jika gen terinaktivasi maka tidak ada yang menghentikan proliferasi sel sehingga tumor dapat terbentuk. Mutasi pada onkogen meningkatkan kerja atau fungsi gen, sedangkan mutasi pada *tumor suppressor* menekan atau menghilangkan fungsi gen.<sup>2</sup> Mutasi dapat diturunkan secara genetic, namun lebih sering disebabkan kelainan replikasi DNA atau pajanan terhadap karsinogen (somatik). Oleh sebab itu, strategi pengobatan kanker harus ditentukan berdasarkan transformasi genomik.

Dari 25.000 gen dalam genom manusia, hanya sekitar 500 gen yang berkaitan dengan kanker termasuk gen *driver*.<sup>1</sup> Untuk menentukan gen spesifik yang berperan menyebabkan kanker (gen *driver*), dilakukan berbagai penelitian dan berkembanglah terapi kanker menggunakan gen yang disebut terapi target. Profil mutasi genetik pasien kanker sangat penting dan menjadi landasan tata laksana kanker sehingga pemeriksaan gen sebaiknya rutin dilakukan pada tata laksana kanker.

*Next-generation sequencing* (NGS) adalah metode sekuensing gen untuk mendeteksi lebih dari satu kelainan genom secara bersamaan dalam sekali pemeriksaan tanpa spesimen genetik dalam jumlah banyak, baik DNA maupun RNA banyak.<sup>3</sup> Sebelum NGS, metode untuk mendeteksi kelainan genetik pada pasien kanker adalah *polymerase chain reaction* (PCR), *Sanger sequencing* dan *fluorescent in situ hybridization* (FISH). Kekurangan metode tersebut adalah tidak mampu mendeteksi lebih dari satu kelainan genetik dalam sekali pemeriksaan sehingga dibutuhkan biaya besar untuk mendapatkan profil mutasi yang lebih menyeluruh. Tinjauan pustaka ini membahas kanker dan genom, cara kerja, metode, dan peran NGS pada tata laksana kanker paru, *precision medicine*, *liquid biopsy*, dan penapisan kanker paru.

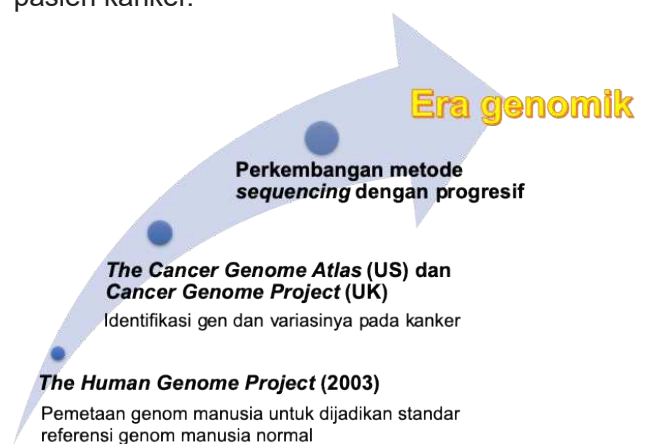
## Perkembangan Deteksi Genom pada Kanker dan Next-Generation Sequencing

Pada tahun 2003, *The Human Genome Project* melakukan studi besar berskala internasional untuk memetakan genom manusia normal. Peta genom

sangat penting untuk referensi standar urutan (sekuens) genom normal ketika mendeteksi kelainan genetik pasien kanker.<sup>4</sup> *The Human Genome Project* berlangsung >10 tahun dan menggunakan teknik *Sanger sequencing*. Untuk mengidentifikasi gen yang berperan sebagai onkogen dan gen *tumor suppressor* serta menemukan varian baru yang berkaitan dengan penyakit pada manusia, terus dilakukan penelitian. *The Cancer Genome Atlas* di Amerika Serikat dan *Cancer Genome Project* di Inggris, mendata sekuens gen dan varian gen yang secara spesifik berperan pada kanker.<sup>4</sup> Era genomik menyebabkan pesatnya perkembangan metode *sequencing* (Gambar 1).

Pada tahun 2004, diperkenalkan metode *paralleled sequencing* (sekuensing berbagai urutan gen secara bersamaan) yang disebut *pyrosequencing*.<sup>3</sup> Teknologi tersebut membuat sekuensing genom menjadi lebih cepat, praktis dan menurunkan biaya pemeriksaan secara bermakna dibandingkan *Sanger sequencing* yaitu metode sekuensing yang sangat populer pada saat itu. *Pyrosequencing* menggunakan teknik pengumpulan sekuensing data dengan *template* DNA yang mikroskopik dan terpisah, namun dilakukan secara bersamaan dan masif (*massive parallel sequencing*). Teknik tersebut menjadi dasar berkembangnya NGS.

Kelebihan NGS adalah hanya membutuhkan sejumlah kecil sampel DNA untuk menghasilkan sejumlah besar data, serta memiliki sensitivitas dan spesifisitas sangat tinggi. Selain itu, NGS dapat mendeteksi berbagai kelainan genetik, seperti *copy number variation* (CNV), *single nucleotide variant* (SNV) dan insersi-delesi (indel) secara bersamaan dalam sekali proses sekuensing. NGS dapat mendeteksi mutasi baru (*novel*) yang penting dalam mempelajari tumorigenesis dan terapi target pasien kanker.<sup>5,6</sup>



Gambar 1. Perkembangan Deteksi Genom dan Metode Sequencing hingga Era Genomik.<sup>4</sup>

Teknologi NGS berkembang hingga mencapai tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi bahkan mendeteksi mutasi dengan *variant allele frequency* (VAF) yang kejadiannya sangat rendah (*rare mutation*).<sup>7,8</sup> Pada tahun 2012, Forshew et al<sup>9</sup> T.Electronic dari *Cancer Research* di Cambridge, Inggris, mengembangkan teknik NGS yang dinamakan *tagged-amplicon deep sequencing* (Tam-seq). Metode itu berhasil mendeteksi mutasi dengan VAF 2% dan tingkat sensitivitas serta spesifisitas tinggi (>97%). Tahun 2018, Guibert et al<sup>6</sup> membandingkan metode deteksi genetik yang sangat sensitif, yaitu *droplet digital PCR* (ddPCR) dengan NGS dalam mendeteksi mutasi *epidermal growth factor receptor* (EGFR) *fusion gene anaplastic lymphoma kinase* (ALK) dan ROS1 pada pasien kanker paru bukan sel kecil (KPBSK). Diperoleh NGS dengan sensitivitas lebih tinggi (100%) dibandingkan ddPCR (87%) dalam mendeteksi mutasi tersering pada EGFR, yaitu L858R, delesi ekson 19 dan T790M. Newman et al<sup>8</sup> mengembangkan NGS dengan *integrated digital error suppression* yang disebut *cancer personalized profiling by deep sequencing* (CAPP-seq) yang mampu mendeteksi kelainan genetik dengan VAF 0,05-1,6%, sensitivitas 97% dan spesifisitas 96%. Tahun 2019, Yeom et al<sup>10</sup> memperlihatkan kemampuan NGS dalam deteksi mutasi dengan VAF sangat rendah (0,003%), dengan akurasi tinggi melalui proses bioinformatik *filtering* data NGS yang mampu membedakan *true mutation* dengan *sequencing error*.

### Cara Kerja Next-Generation Sequencing

Prinsip kerja NGS adalah melakukan *deep sequencing* terhadap genom berulang-ulang di tempat sama secara terus-menerus untuk meningkatkan ketepatan susunan basa nukleotida di tempat tersebut.<sup>3</sup> Tahapan proses NGS terdiri atas 3 fase, yaitu pembuatan *sequencing library*, sekuensing dan analisis data.

*Sequencing library* adalah fragmen urutan materi genetik yang dibuat berdasarkan *template* materi genetik (DNA atau RNA pasien) kemudian dikoneksikan dengan *sequencing adapter*. Sesudah *sequencing library* berikatan dengan *adapter* kemudian diamplifikasi menggunakan PCR. Pada *targeted sequencing* dengan panel gen, PCR menggunakan *primer* berdasarkan urutan nukleotida pada gen yang biasanya bermutasi pada kanker. Proses selanjutnya adalah sekuensing menggunakan mesin NGS. Teknologi NGS dibagi menjadi *read* panjang atau *read* pendek. *Read*

adalah fragmen urutan nukleotida yang disusun dan dipetakan terhadap referensi urutan nukleotida normal. NGS dengan *read* pendek lebih sering digunakan karena lebih murah dan lebih akurat dibandingkan *read* panjang.<sup>11</sup>

Setelah proses sekuensing, nukleotida yang tersusun dianalisis melalui alur kerja bioinformatika, menginterpretasi urutan nukleotida dan mentransformasi informasi secara klinis serta mengaitkannya dengan proses biologis kanker. Analisis NGS standar terdiri atas *base calling* (identifikasi basa nukleotida), *read alignment* (pemetaan *read* terhadap referensi sekuens DNA), identifikasi kelainan genetik seperti varian SNV dan indel, serta anotasi (Gambar 2). Proses anotasi bertujuan mengetahui apakah varian yang terdeteksi bermakna secara klinis atau tidak. Katalog mutasi genetik seperti *catalogue of somatic mutations in cancer* (COSMIC) membantu proses analisis dan interpretasi data NGS.<sup>12</sup>

### Metode Next-Generation Sequencing

Metode NGS terdiri atas metode untuk mendeteksi genomik (DNA), transkriptomik (RNA) dan epigenetik. Penerapan NGS dalam diagnosis dan tata laksana kanker paru lebih sering menggunakan metode berdasarkan deteksi genomik karena DNA relatif lebih mudah untuk diisolasi, lebih stabil dan tidak mudah rusak dibandingkan RNA. Tinjauan pustaka ini lebih memfokuskan pembahasan pada aplikasi NGS genomic, namun tetap membahas secara singkat metode NGS transkriptomik dan epigenetik.

### Genomik

Dalam mendeteksi kelainan genomik, NGS dapat mendeteksi varian DNA berupa SNV dan indel, variasi struktur (*gene rearrangement*) dan CNV.<sup>13</sup> Metode NGS untuk mendeteksi kelainan genomik terdiri atas *whole genome sequencing* (WGS), *whole exome sequencing* (WES) dan *targeted sequencing*. WGS memiliki keunggulan mampu mendeteksi seluruh kelainan genetik. WGS menyusun seluruh 3,3 milyar nukleotida (A, T, G, C) pada manusia, termasuk urutan kodon dan antikodon. Data yang dihasilkan WGS besar namun *coverage* sedikit. *Coverage* atau *depth* adalah jumlah sekuensing yang dilakukan secara berulang pada urutan nukleotida yang unik.<sup>3</sup> *Coverage* berkaitan dengan sensitivitas NGS dalam mendeteksi kelainan genetik. Makin besar *coverage*, makin tinggi sensitivitas NGS.<sup>5</sup> Metode WGS yang biasanya memiliki target *coverage* 30X

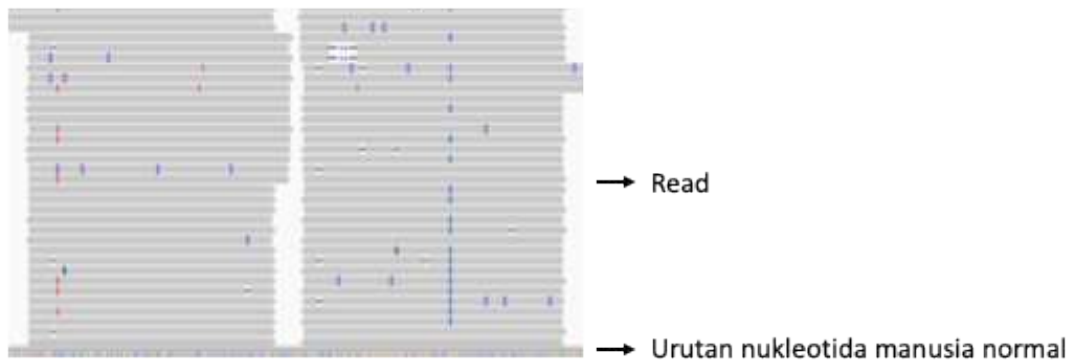
digunakan untuk deteksi varian *germline* di genom manusia, tetapi tidak cukup untuk mendeteksi mutasi somatik yang jarang terutama pada kanker.<sup>11</sup>

Kekurangan WGS lainnya adalah biayanya mahal dan proses analisisnya lama dibandingkan metode NGS lainnya.

### A. Read yang dihasilkan dari proses sequencing



### B. Pemetaan read sesuai dengan referensi standar urutan nukleotida manusia normal



### C. Identifikasi varian



Gambar 2. Tahapan Analisis NGS<sup>2</sup>

WES secara spesifik mengurutkan sekuens *coding* DNA saja. Area *coding* hanya meliputi 2% dari seluruh genom manusia. Karena sedikitnya jumlah target NGS maka *coverage* WES dapat ditingkatkan dibandingkan WGS. Dengan demikian WES lebih sensitif dalam mendeteksi mutasi jarang dibandingkan WGS.<sup>8</sup> WES lebih cepat dan lebih murah dibandingkan WGS dan untuk menganalisis kelainan genom, WES lebih sesuai dibandingkan WGS. Metode WES lebih sering digunakan untuk mengevaluasi *tumor mutation burden (TMB)* sebagai penanda hayati dalam mengevaluasi efektivitas imunoterapi anti-PD1 dan anti-PDL1 pada pasien kanker paru.<sup>14</sup>

*Targeted NGS* menggunakan prinsip *amplicon-based panel*. Urutan pendek DNA (*amplicon*) diamplifikasi menggunakan PCR berdasarkan

*primer* untuk mendeteksi gen yang sering bermutasi pada kanker. *Primer* gen tersedia dalam bentuk paket yang disebut panel gen; saat ini merupakan panel gen komersial dan panel gen yang dikembangkan masing-masing peneliti. Jumlah gen yang tercakup dalam panel bervariasi, mulai dari 22 gen hingga >400 gen.<sup>14</sup> Pada tahun 2017, Food and Drug Administration of the United States menyetujui dua panel gen NGS untuk mendeteksi kelainan genom pada kanker.<sup>15</sup> Panel pertama dikenal sebagai *integrated mutation profiling of actionable cancer targets (MSK-IMPACT)* meliputi 468 gen yang sering bermutasi pada kanker sedangkan panel lainnya adalah *FoundationOne CDx* yang meliputi 324 gen. Meskipun demikian, hingga saat ini belum ada pedoman resmi tata laksana kanker yang merujuk panel gen sebagai



panel yang direkomendasikan untuk mendeteksi kelainan genetik pada kanker paru.

Untuk deteksi mutasi, *targeted sequencing* adalah metode paling sesuai karena menggunakan panel gen spesifik untuk mendeteksi kelainan gen yang sering bermutasi pada kanker; meliputi area *coding* dan *noncoding* dengan sensitivitas/spesifitas tinggi.<sup>16,17</sup> Semakin sedikit jumlah gen yang dianalisis, semakin banyak jumlah *coverage* sehingga sensitivitas dapat lebih ditingkatkan. *Targeted sequencing* juga mendeteksi mutasi baru. Biaya *targeted sequencing* lebih murah dibandingkan WGS atau WES.<sup>10</sup>

### **Transkriptomik**

Transkriptom adalah seluruh transkrip dalam sebuah sel atau populasi sel pada kondisi fisiologis tertentu. Studi transkriptomik mempelajari apa yang terjadi di sel kanker setelah fase transkripsi DNA. *RNA-sequencing* (RNA-seq) adalah aplikasi NGS untuk menganalisis transkrip, mengukur ekspresi gen dan mendeteksi transkrip baru, fusi gen, SNV dan indel secara bersamaan. NGS diaplikasikan pada *small noncoding RNA* (ncRNA) yaitu urutan nukleotida pendek (~20 bp) yang tidak ditranslasi menjadi protein. *Small ncRNA* meliputi *transfer RNA* (tRNA), *ribosomal RNA* (rRNA), *micro RNA* (miRNA), *small interfering RNA* (siRNA) dan *piwi-interacting RNA* (piRNA). miRNA dan siRNA adalah *small ncRNA* yang paling sering diteliti karena perannya padaregulasi ekspresi gen pada sel kanker.<sup>11</sup>

### **Epigenetik**

Epigenetik mempelajari perubahan fungsi gen yang diturunkan secara mitotik atau meiotik tanpa perubahan urutan DNA. Metilasi DNA, modifikasi histon, perubahan interaksi DNA dan protein adalah kelainan epigenetik yang berkaitan dengan pembentukan dan perkembangan kanker. Sebelum NGS, penelitian epigenetik menggunakan *microarray*. Teknik NGS yang diaplikasikan pada penelitian epigenetik adalah *methylation sequencing* (*bisulfate sequencing*) dan *chromatin immunoprecipitation sequencing* (ChIP-seq).<sup>11</sup>

### **Next-Generation Sequencing dan Deteksi Kelainan Genetik pada Kanker Paru**

Deteksi mutasi titik pada kanker paru umumnya menggunakan *real time PCR* (RT-PCR) atau *Sanger sequencing*, sedangkan fusi gen pada ALK dan ROS1 *rearrangement* dideteksi dengan *fluorescence in situ hybridization* (FISH) atau imunohistokimia (IHK). Prosedur tersebut hanya

mendeteksi mutasi atau kelainan struktur tunggal dan biaya yang lebih besar untuk mendeteksi lebih dari satu kelainan genom. Teknologi NGS mengubah pemahaman biologi kanker dalam beberapa dekade terakhir. Dengan NGS, sekuensing genom pada berbagai tumor dapat dilakukan dan perubahan genetik serta epigenetik dalam tumorigenesis dapat diidentifikasi dan diklasifikasi.

Greenmann et al<sup>18</sup> membagi mutasi menjadi mutasi *driver* dan *passenger*. Mutasi *driver* adalah mutasi somatik yang mendorong pertumbuhan kanker secara langsung atau tidak langsung. Mutasi *passenger* adalah mutasi di genom somatik kanker saat perkembangan kanker berlangsung dan tidak berkontribusi pada pertumbuhan kanker. Mutasi *driver* dapat menyebabkan adiksi onkogen yaitu perkembangan kanker karena satu *oncogenic pathway* atau protein dan banyak terdapat di kanker paru salah satunya gen EGFR. Terapi dipilih berdasarkan identifikasi mutasi *driver*. Deteksi mutasi *driver* adalah aplikasi utama NGS pada penelitian onkologi. Tantangan utama dalam studi translasional adalah membedakan mutasi *driver* dan *passenger*. Keunggulan NGS adalah mampu menyediakan anotasi yang disusun dengan teknik komputasi dan bioinformatika untuk memberikan informasi dan mendeskripsikan berbagai mutasi termasuk efek mutasi, frekuensi dan analisis jalur mutasi. Anotasi penting dalam menyaring mutasi somatik yang terdeteksi NGS.

### **Next-Generation Sequencing dan Precision Medicine pada Kanker Paru**

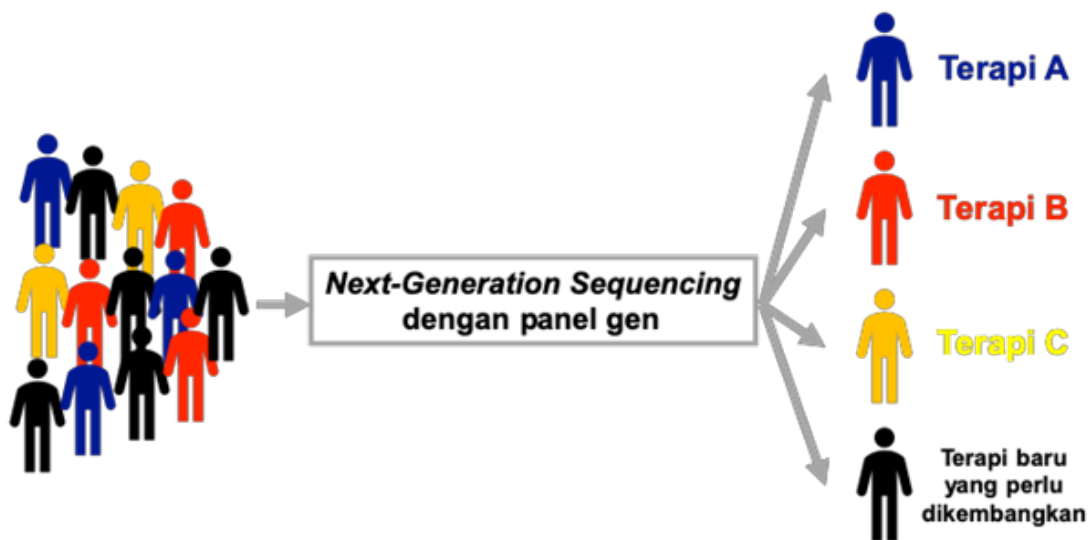
Pada era *precision medicine* dan berkembang pesatnya terapi target untuk kanker paru, *tumor mutation profiling* dan deteksi genetik seharusnya rutin dilakukan pada saat diagnosis kanker paru. Mutasi pada kanker paru tidak hanya pada satu gen, namun dapat di beberapa gen sekaligus. Dengan adanya NGS, pemeriksaan profil mutasi kanker paru dapat dilakukan pada awal diagnosis sehingga membantu klinisi membuat strategi terapi target yang disesuaikan dengan kondisi genetik pasien. Perencanaan tata laksana sejak awal diagnosis bertujuan agar pasien mendapat tata laksana paling tepat dan memprediksi respons terapi.

Pemberian EGFR *tyrosine kinase inhibitor* (EGFR-TKI) pada pasien kanker paru dengan mutasi gen EGFR meningkatkan kesintasan pasien.<sup>19</sup> Sebaliknya, kemoterapi menghasilkan respons terapi yang lebih baik pada pasien dengan EGFR *wildtype*.<sup>20</sup> Pasien dengan mutasi EGFR

dapat diberikan EGFR-TKI yang memiliki kelebihan dapat diberikan secara oral dan efek samping lebih ringan dibandingkan kemoterapi. Pasien dengan mutasi EGFR T790M tidak memberikan respons baik pada pemberian EGFR-TKI generasi pertama dan kedua sehingga sebaiknya diberikan generasi ketiga (osimertinib).<sup>6</sup> Informasi ada tidaknya mutasi dapat diketahui jika dilakukan deteksi genetik (Gambar 3).

Biopsi kanker paru umumnya menggunakan *transbronchial lung biopsy* (TBLB) saat bronkoskopi. Pada TBLB, jaringan yang diambil lebih sedikit dibandingkan *open biopsy* dengan

pembedahan sehingga materi genetik (DNA) yang dapat terisolasi dari jaringan tidak banyak. Spesimen biopsi yang disimpan dalam *formalin-fixed paraffin embedded* (FFPE) menyebabkan DNA yang terisolasi terfragmentasi dan berkualitas rendah. Deteksi mutasi genetik menggunakan metode PCR konvensional, RT-PCR atau Sanger *sequencing* membutuhkan DNA lebih banyak sehingga deteksi genetik dengan metode tersebut menjadi lebih sulit. Keterbatasan lain adalah informasi mutasi yang dapat terdeteksi karena keterbatasan spesimen biopsi, sensitivitas yang rendah dan biaya yang besar.



Gambar 3. Aplikasi NGS dalam *Precision Medicine* pada Pasien Kanker Paru.

Keterbatasan teknik deteksi PCR konvensional, RT-PCR dan Sanger *sequencing* untuk mendeteksi lebih dari satu mutasi secara bersamaan menyebabkan pemeriksaan genetik hanya terfokus pada mutasi tersering (*hotspot*) saja. Untuk gen EGFR, mutasi tersering yang diperiksa adalah ekson 21 L858R dan delesi ekson 19, namun Syahrudin et al<sup>21</sup> melaporkan mutasi EGFR yang tidak biasa termasuk G719X, T790M dan L861Q memiliki frekuensi tinggi pada populasi kanker paru di Indonesia. Data tersebut menegaskan pentingnya profil mutasi agar *precision medicine* dapat diterapkan pada pasien kanker paru. NGS dikembangkan untuk mendeteksi kelainan genetik secara simultan dalam sekali pemeriksaan menggunakan DNA yang lebih sedikit. Keunggulan NGS adalah mampu mendeteksi mutasi dengan *input* materi DNA sedikit dan kualitas rendah. Oleh sebab itu, NGS merupakan metode yang tepat untuk mengevaluasi profil mutasi pasien kanker paru.

Lebih dari 300 mutasi *non-synonymous* dapat dijumpai pada kanker paru, namun hanya sebagian kecil yang mendorong tumorigenesis dan mengakibatkan mutasi *driver*.<sup>11</sup> Terapi target untuk pengobatan kanker paru adalah untuk target gen EGFR, ALK, ROS-1, dan BRAF,<sup>22</sup> sedangkan terapi KRAS *inhibitor* masih dalam uji klinik fase 1 pada kanker paru karsinoma bukan sel kecil (KPKBSK). Pedoman tata laksana KPKBSK yang dikeluarkan oleh *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) merekomendasikan pemeriksaan rutin mutasi EGFR dan BRAF serta *rearrangement* gen ALK pada saat diagnosis ditegakkan.<sup>22</sup> NGS merupakan metode pemeriksaan yang direkomendasikan karena mampu mendeteksi lebih dari satu mutasi dan kelainan secara bersamaan dalam sekali pemeriksaan. Selain itu NGS memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi dalam mendeteksi mutasi titik dengan VAF rendah dan dalam mendeteksi *rearrangement* pada gen ALK,

NGS lebih superior dibandingkan pemeriksaan standar lainnya seperti FISH dan IHK.<sup>23</sup>

Dalam menggunakan NGS untuk mendeteksi kelainan genetik pada pasien KPKBSK, NCCN merekomendasikan panel gen yang digunakan paling tidak mencakup deteksi mutasi pada gen EGFR dan BRAF, serta kelainan struktur (*rearrangement*) pada gen ALK dan ROS1. Pada pasien kanker paru di Indonesia, negara dengan jumlah perokok aktif yang tinggi, mutasi KRAS banyak ditemukan.<sup>24</sup> Oleh sebab itu, perlu pemeriksaan mutasi KRAS pada saat menegakkan diagnosis kanker paru. NCCN juga merekomendasikan panel dengan sejumlah gen lainnya, namun sebaiknya mencakup gen dengan mutasi *driver* yang *rare* tetapi efektif dengan pemberian terapi target, seperti fusi gen *neurotrophic receptor tyrosine kinase* (NTRK), amplifikasi MET derajat tinggi, mutasi *skipping* MET ekson 14, RET *rearrangements*, mutasi ERBB2 (HER2) dan *tumor mutational burden* (TMB).<sup>22</sup> TMB adalah penanda hayati tumor untuk mengevaluasi efektivitas imunoterapi pada kanker paru.<sup>14</sup> TMB dikaitkan dengan ekspresi berbagai neoantigen pada sel kanker sehingga dapat digunakan untuk mengetahui kerja *immune check point inhibitor* dalam mengaktifasi imunitas melawan sel kanker. NGS adalah metode paling sesuai untuk mendeteksi TMB karena kemampuan NGS mendeteksi lebih dari satu mutasi dalam sekali pemeriksaan secara efektif. NGS juga membantu klinisi dalam mempelajari resistensi terapi target pada kanker paru.<sup>6</sup> Gen penyebab resistensi juga dapat diidentifikasi dengan membandingkan profil mutasi sebelum dan setelah terapi target; hal tersebut membantu klinisi dalam menentukan pengobatan selanjutnya.

### **Next-Generation Sequencing dan Liquid Biopsy pada Kanker Paru**

Kanker paru umumnya terdiagnosis pada stadium lanjut karena umumnya gejala baru dirasakan pasien pada stadium tersebut. Standar diagnosis kanker paru adalah berdasarkan temuan histopatologi dan untuk mengambil spesimen diperlukan tindakan invasif seperti bronkoskopi atau pembedahan yang sulit dilakukan jika kondisi pasien tidak memungkinkan dilakukan prosedur tersebut. Selain itu, tindakan invasif tidak nyaman, memiliki risiko tinggi dan komplikasi.

Dalam beberapa tahun terakhir, diperkenalkan *liquid biopsy* sebagai alat untuk membantu diagnosis, evaluasi pengobatan serta menentukan

prognosis kanker paru dengan cara tidak invasif.<sup>25,26</sup> Keunggulan lain *liquid biopsy* adalah dapat dilakukan pada pasien kanker paru stadium apapun.

*Liquid biopsy* adalah biospesimen dari sel kanker, bersirkulasi di tubuh manusia dan memiliki informasi genetik yang berasal dari sel kanker sehingga dapat digunakan sebagai penanda hayati kanker paru.<sup>27</sup> Selain itu, *liquid biopsy* menggambarkan heterogenitas intratumor. *Liquid biopsy* yang dapat diisolasi dari pembuluh darah adalah *cell-free DNA* (cfDNA), *circulating tumor cell* (CTC), *circulating RNA*, *circulating miRNA*, dan eksosom.<sup>27</sup> Pada kanker, para peneliti lebih memfokuskan studi *liquid biopsy* menggunakan cfDNA dan CTC. Meskipun secara umum *liquid biopsy* berasal dari biomaterial yang berasal dari pembuluh darah, cfDNA juga ditemukan di berbagai cairan tubuh antara lain cairan pleura, urin, *bronchoalveolar lavage*, dan cairan serebrospinal.

Salah satu tantangan dalam menganalisis spesimen *liquid biopsy* adalah sedikitnya materi genetik yang dapat diisolasi. Selain itu, cfDNA yang berasal dari proses nekrosis atau apoptosis sel kanker atau disekresi sel kanker yang aktif biasanya terfragmentasi sehingga sulit untuk mendeteksi kelainan genetik pada cfDNA.<sup>27</sup> NGS dapat digunakan untuk menganalisis *liquid biopsy* karena tidak membutuhkan *input* materi genetik yang besar. Tantangan lain dalam analisis cfDNA adalah mutasi *rare* dengan VAF yang sangat kecil. Deteksi mutasi *rare* sulit dibedakan dengan positif palsu akibat kesalahan dalam proses *sequencing*. Kinde et al<sup>5</sup> mengembangkan teknologi NGS bernama *safe sequencing system* (*Safe-SeqS*) yang menggunakan *unique identifiers* (UID) sebagai *barcode* molekuler ke *sequencing library* untuk meningkatkan sensitivitas dan Penggunaan UID mampu meningkatkan akurasi mendeteksi mutasi *rare*. Untuk meningkatkan jumlah *coverage* dan meningkatkan sensitivitas NGS dapat dilakukan pengurangan jumlah target gen pada panel gen.

Saat ini belum ada pedoman untuk pemeriksaan *liquid biopsy* untuk diagnosis kanker paru. Dalam pedoman NCCN untuk KBKBSK *liquid biopsy* boleh digunakan sebagai alat deteksi mutasi EGFR T790M untuk mengevaluasi resistensi EGFR-TKI.<sup>22</sup> Metode yang diakui oleh FDA dan direkomendasikan NCCN untuk mendeteksi mutasi adalah RT-PCR.<sup>22</sup>

## Next-Generation Sequencing dan Penapisan Kanker Paru

Kanker paru masih merupakan masalah kesehatan di seluruh dunia dan merupakan penyebab kematian terbanyak di antara kanker lainnya. Karena kanker paru biasanya terdiagnosis pada stadium lanjut dengan angka kesintasan rendah, maka penting untuk dilakukan penapisan kanker paru terutama pada kelompok pasien risiko tinggi. Analisis spesimen *liquid biopsy* menggunakan NGS dapat membantu penapisan kanker dalam berbagai stadium. Terdeteksi atau tidaknya cfDNA pada pasien kanker dipengaruhi oleh stadium dan status metastasis serta ada tidaknya metastasis kelenjar limfe.<sup>25</sup> Dengan metode deteksi yang sangat sensitif, yaitu *ddPCR*, angka deteksi cfDNA lebih tinggi pada pasien dengan stadium lanjut.<sup>25</sup> Oleh sebab itu, penapisan kanker paru pada stadium awal menggunakan teknik *liquid biopsy* memiliki tantangan tersendiri karena jumlah dan angka deteksi yang rendah pada stadium tersebut. Phallen et al<sup>17</sup> melaporkan NGS dapat mendeteksi cfDNA pada pasien kanker paru stadium awal (I atau II) dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi.<sup>17</sup> *Targeted sequencing* menggunakan panel gen tervalidasi dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi dapat digunakan dalam penapisan kanker paru atau deteksi kanker paru pada stadium awal.

### Keterbatasan Next-Generation Sequencing

NGS belum memiliki standar baku sebagai modalitas untuk mendeteksi kelainan genetik pada kanker paru. Belum ada panel gen dan alur kerja bioinformatik untuk analisis data NGS yang direkomendasikan sebagai metode terbaik untuk kanker paru. Jumlah gen yang tercakup dalam panel gen memengaruhi jumlah *read* yang tersusun pada tiap gen target. Semakin banyak target gen, semakin sedikit *coverage* yang dihasilkan, dan sedikitnya jumlah *coverage* menurunkan sensitivitas NGS. Untuk menghasilkan *coverage* luas diperlukan biaya lebih besar, sehingga pemilihan panel gen yang disesuaikan dengan target *coverage* penting dalam aplikasi NGS. Pada pemilihan panel gen, perlu dipertimbangkan apakah panel digunakan untuk pemberian terapi target sehingga hanya memerlukan deteksi gen yang sering bermutasi pada kanker paru atau untuk mengevaluasi respons imunoterapi sehingga membutuhkan panel gen yang mencakup banyak jumlah gen. Keterbatasan NGS lainnya adalah akurasi rendah pada deteksi mutasi *rare*. Prinsip kerja NGS masih

menggunakan PCR dalam pembuatan *sequencing library*, sehingga untuk menghasilkan *coverage* yang besar kemungkinan munculnya *sequencing error* juga semakin besar. Oleh sebab itu, alur kerja bioinformatika dalam analisis data NGS perlu dilakukan dengan baik untuk menghindari positif palsu. Program bioinformatika dan metode yang memodifikasi alur kerja NGS banyak yang sedang dikembangkan untuk meningkatkan akurasi hasil tanpa mengurangi sensitivitas dan spesifisitas NGS, namun belum ada rekomendasi baku alur kerja NGS standar pada tata laksana kanker paru.

### Kesimpulan

NGS adalah metode yang dapat mendeteksi berbagai kelainan genetik dalam sekali pemeriksaan dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi serta tidak memerlukan *input* genetik yang yang besar. Aplikasi NGS dapat untuk studi genomik, transkriptomik dan epigenetik. Pada kanker paru, NGS digunakan untuk penapisan, diagnosis, dan tata laksana dengan prinsip *precision medicine* serta memprediksi prognosis.

### Daftar Pustaka

1. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339:1546-58.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
3. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17:333-51.
4. Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Kameyama H, Takabe K, Okuda S, et al. Next generation sequencing-based gene panel tests for management of solid tumors. *Cancer Sci*. 2019;110:6-15.
5. Li BT, Janku F, Jung B, Hou C, Madwani K, Alden R, et al. Ultra-deep next-generation sequencing of plasma cell-free DNA in patients with advanced lung cancers: results from the Actionable Genome Consortium. *Ann Oncol*. 2019;30:597-603.
6. Guibert N, Hu Y, Feeney N, Kuang Y, Plagnol V, Jones G, et al. Amplicon-based next-generation sequencing of plasma cell-free DNA for detection of driver and resistance mutations in advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2018;29:1049-55.
7. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:9530-5.
8. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014;20:548-54.



9. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DW, Kaper F, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med*. 2012;4:136ra68.
10. Yeom H, Lee Y, Ryu T, Noh J, Lee AC, Lee HB, et al. Barcode-free next-generation sequencing error validation for ultra-rare variant detection. *Nat Commun*. 2019;10:977.
11. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, D'Amico P, Viale G, Trapani D, et al. Complexity of genome sequencing and reporting: next generation sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real life. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;133:171-82.
12. Forbes SA, Tang G, Bindal N, Bamford S, Dawson E, Cole C, et al. COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(Database issue):D652-7.
13. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, Savitch SL, Fan R, Balli D, et al. Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next-generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res*. 2016;22:5772-82.
14. Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden. *N Engl J Med*. 2018;378:2093-104.
15. Allegretti M, Fabi A, Buglioni S, Martayan A, Conti L, Pescarmona E, et al. Tearing down the walls: FDA approves next generation sequencing (NGS) assays for actionable cancer genomic aberrations. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37:47.
16. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanche H, et al. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res*. 2014;20:4613-24.
17. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 2017;9(403).
18. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007;446:153-8.
19. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol*. 2013;31:3327-34.
20. Tomasini P, Brosseau S, Mazieres J, Merlio JP, Beau-Faller M, Mosser J, et al. EGFR tyrosine kinase inhibitors versus chemotherapy in EGFR wild-type pre-treated advanced nonsmall cell lung cancer in daily practice. *Eur Respir J*. 2017;50(2).
21. Syahrudin E, Wulandari L, Sri Muktiati N, Rima A, Soeroso N, Ermayanti S, et al. Uncommon EGFR mutations in cytological specimens of 1,874 newly diagnosed Indonesian lung cancer patients. *Lung Cancer (Auckl)*. 2018;9:25-34.
22. Ettinger DS, Aisner DL, Wood DE, Akerley W, Bauman J, Chang JY, et al. NCCN guidelines insights: non-small cell lung cancer, version 5.2018. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2018;16:807-21.
23. Lin C, Shi X, Yang S, Zhao J, He Q, Jin Y, et al. Comparison of ALK detection by FISH, IHC and NGS to predict benefit from crizotinib in advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2019;131:62-8.
24. Masykura N, Zaini J, Syahrudin E, Andarini SL, Hudoyo A, Yasril R, et al. Impact of smoking on frequency and spectrum of K-RAS and EGFR mutations in treatment naive Indonesian lung cancer patients. *Lung Cancer (Auckl)*. 2019;10:57-66.
25. Faisal HKP, Horimasu Y, Hirano S, Yamaoka E, Fukazawa T, Kanawa M, et al. Cell-free DNA analysis of epithelial growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma patients by droplet digital PCR. *Hiroshima Journal of Medical Sciences*. 2019;68:1-6.
26. Zaini J, Syahrudin E, Yunus M, Andarini SL, Hudoyo A, Masykura N, et al. Evaluation of PCR-HRM, RFLP, and direct sequencing as simple and cost-effective methods to detect common EGFR mutations in plasma cell-free DNA of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Reports*. 2019;2(4).
27. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32:579-86.