

PENGEMBANGAN SISTEM DETEKSI HPV (*Human Papilloma Virus*) BERBASIS MARKA MOLEKULER PCR-RFLP



ELISA ERNI, SYUBABBANUL WATHON

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember

Jl. Kalimantan No. 37, Kampus Tegal Boto, Jember, 68121

Corresponding author : syubbanulwathon@unej.ac.id

1. Restriction Fragment Length Polymorphisms(RFLP)

Restriction Fragment Length Polymorphism

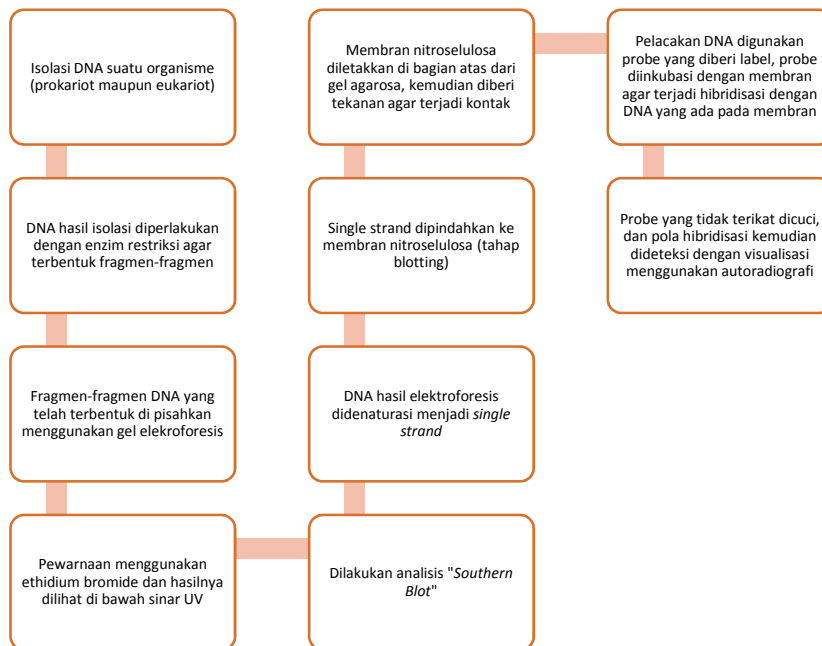
(RFLP) merupakan salah satu teknik yang banyak digunakan untuk mendeteksi adanya variasi

pada tingkat DNA. Deteksi

RFLP dilakukan berdasarkan adanya kemungkinan perbedaan panjang fragmen DNA target yang dihasilkan setelah proses pemotongan dengan suatu enzim restriksi. Perbedaan panjang fragmen DNA dapat diketahui setelah

dilakukan konfirmasi

melalui analisis elektroforesis, hibridisasi dan visualisasi. Aplikasi teknik RFLP digunakan untuk mendeteksi diversitas genetik, hubungan kekerabatan, spesiasi dan domestikasi, pemetaan genom, *tagging* gen, serta mengkonstruksi



Gambar 1. Metode analisis sekuens DNA menggunakan teknik RFLP

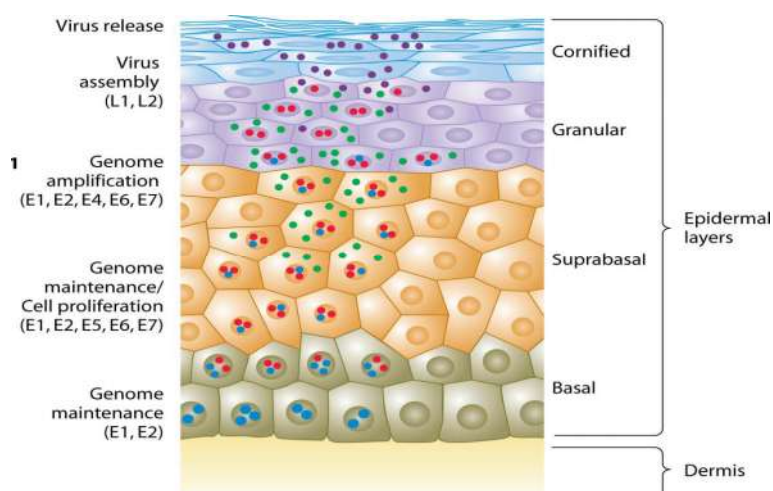
pustaka cDNA (Williams, 1989). Secara umum metode analisis sekuens DNA menggunakan teknik RFLP dapat dilihat pada Gambar 1:

2. *Human Papillomavirus* (HPV)

Human Papilloma Virus (HPV) merupakan virus DNA yang menginfeksi jaringan epitel kulit, epitel anogenital dan mukosa mulut manusia. HPV dapat menyebabkan tumbuhnya kutil pada berbagai bagian tubuh manusia. Saat ini telah diketahui bahwa 100 jenis virus HPV telah menginfeksi manusia. Terdapat sekitar 60 jenis HPV penyebab kutil yang menginfeksi bagian-bagian tubuh seperti kaki dan tangan, sementara 40 jenis HPV lainnya memicu munculnya kutil pada organ kelamin. Infeksi HPV terjadi ketika virus tersebut masuk ke dalam sel epitel kemudian menginfeksi sel keratinosit yang masih muda pada lapisan basal epitelium. Sebagaimana siklus hidup virus pada umumnya, HPV tidak mensintesis enzim sendiri dan sangat tergantung pada siklus hidup hospesnya. Siklus hidup virus mengikuti

diferensiasi dari sel epitel yang terinfeksi (Wang, 2007). Protein virus terdiri dari protein *early* (E1-E8) dan protein *late* (L1 dan L2). Protein E1 dan E2 merupakan protein utama untuk memulai proses replikasi virus (Abraham, 2007). Protein E4 terlibat dalam reorganisasi komponen sitoskeleton sel,

mempengaruhi fungsi tumor suppressor (protein p53) dan protein retinoblastoma (pRb), sehingga dapat menghambat proses apoptosis sel yang pada akhirnya dapat menyebabkan terbentuknya sel tumor atau sel kanker. Jalur penetrasi virus HPV pada



Gambar 2. Jalur infeksi virus HPV pada manusia (Lazarczyk *et al.*, 2009)

sedangkan protein E6 dan E7 merupakan protein yang terdapat pada HPV yang bersifat onkogenik berfungsi pada proses transformasi sel hospes. Selama proses infeksi, DNA HPV terdapat pada sitoplasma, akan tetapi pada tipe onkogenik, DNA HPV terintegrasi pada genom hospes, sehingga melalui integrasi ini dapat terjadi ekspresi yang berlebihan dari protein E6 dan E7. Kadar protein E6 dan E7 yang tinggi ini akan

tubuh manusia dapat dilihat pada Gambar 2.

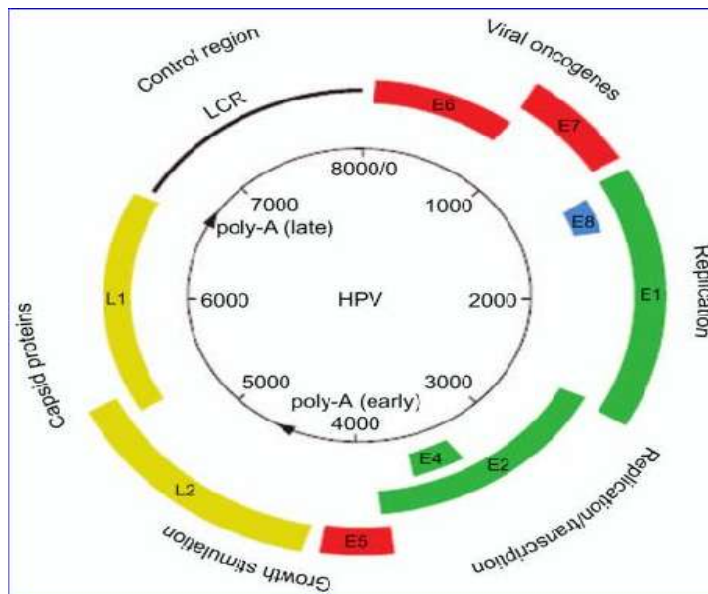
Beberapa penelitian menyebutkan bahwa dari seluruh wanita yang terinfeksi HPV, sekitar 25% diantaranya mengalami *Cervical Intraepithelial Neoplasia* (CIN). CIN merupakan pertumbuhan sel yang tidak normal di permukaan serviks yang berpotensi menyebabkan kanker. Lebih dari 100 tipe HPV

telah diidentifikasi, 40 tipe diantaranya menyebabkan infeksi anogenital pada wanita dan pria. Sebanyak 15 tipe HPV (tipe 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 dan 82) beresiko sangat tinggi dalam menyebabkan penyakit kanker serviks; 3 tipe HPV beresiko tinggi (tipe 26, 53, 66); dan 12 diantaranya mempunyai resiko rendah yaitu HPV tipe 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, dan 81. DNA virus HPV terdeteksi pada 90% penderita kanker serviks (Roden, 2003) dan sekitar 70% penyebabnya adalah HPV tipe 16 dan tipe 18 (Rouzier *et al.*, 2007). HPV tipe 16 dan 18 juga penyebab 80% kanker anus dan 30% kanker vulva. Susunan genom virus HPV dapat dilihat pada Gambar 3. HPV ditularkan melalui hubungan seks dan ketika seseorang terinfeksi HPV maka virus tersebut akan menjadi persisten dan menetap di dalam sel hospes (Urman dan Gottlieb., 2008).

3. Infeksi HPV dan Penanganannya

Kanker serviks selama dekade terakhir telah menjadi masalah kesehatan di dunia. Hal ini dikarenakan terdapat

sejumlah 231.000 16 dan HPV 18 menjadi



Gambar 3. DNA genom *Human Papillomavirus* (Kourpis dan Vourlidis, 2011).

kematian tiap tahunnya pada kasus penyakit tersebut. Lebih dari 80% pada 500.000 kasus baru terdiagnosa kanker serviks di negara berkembang. Agen patogen yang berperan penting dalam terjadinya penyakit kanker serviks adalah HPV. Pada beberapa penelitian terbaru telah ditemukan sekuens DNA dari HPV pada 99,7% kasus pada semua penderita kanker serviks stadium 1 dan tipe yang paling sering ditemukan adalah HPV tipe 16 dan 18. Infeksi HPV pada manusia memberikan resiko tinggi dalam perkembangan kanker serviks dan hal ini menjadi alasan WHO untuk menetapkan bahwa HPV

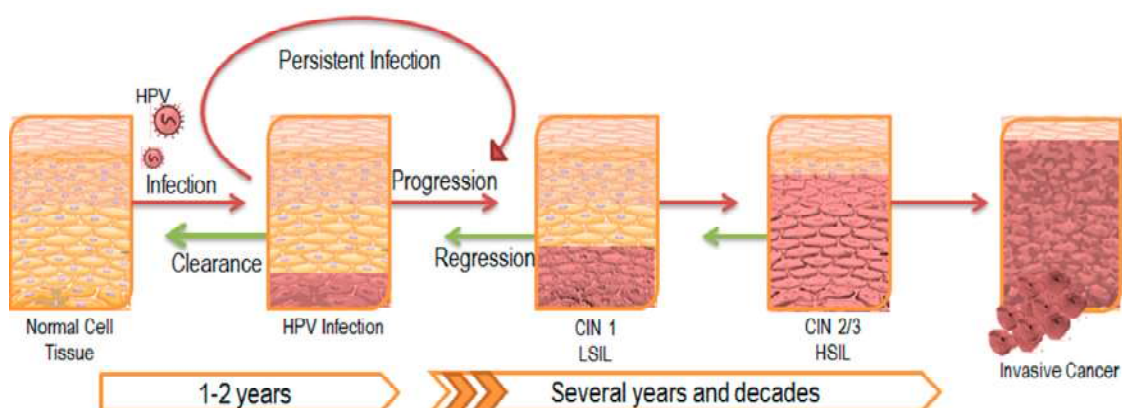
agen karsinogen pada manusia. Selain itu, kedua tipe HPV tersebut terbukti secara signifikan meningkatkan risiko kanker serviks, vagina, dan vulva pada wanita, serta kanker penis pada pria (Liaw *et al.*, 2001). Program skrining HPV yang dinilai efektif adalah menggunakan teknik *Papanicolaou Smear* (pemeriksaan kondisi serviks dengan pengambilan sampel sel epitelium yang dilanjutkan dengan pemeriksaan kondisi sel normal dan abnormal) untuk mendeteksi lesi pre-kanker telah mengurangi jumlah kasus kanker serviks pada negara-negara maju. Akan tetapi, teknik tersebut

belum dapat dilakukan pada negara yang sedang berkembang karena biaya yang diperukan untuk melakukan teknik pemeriksaan tersebut cenderung mahal. Sensitivitas dan spesifisitas dari *Papanicolaou Smear* bergantung pada keterampilan pengamatan untuk determinasi dan klasifikasi variasi sel abnormal. Teknik *Papanicolaou Smear* kurang efektif dan terkadang bias. Hal ini dikarenakan sering ditemukan sel epitelium abnormal sehingga diduga sebagai kanker serviks, namun ternyata sel tersebut bukan terinfeksi HPV melainkan oleh mikroorganisme lain misalnya bakteri. Selain itu, pada saat pengamatan tidak ditemukan kelainan sel epitelium akan tetapi setelah diselidiki lebih

lanjut pasien tersebut terinfeksi HPV (Torpy *et al.*, 2007).

Studi yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa sekitar 70% dari infeksi HPV dapat dibersihkan secara spontan dalam kurun waktu 7–12 bulan setelah adanya infeksi awal dan 90% selanjutnya dibersihkan dalam waktu 2 tahun. Sisa 10% dari infeksi HPV berlanjut menjadi infeksi persisten (infeksi yang terjadi secara terus menerus). Infeksi persisten dengan satu genotipe HPV adalah yang paling banyak dan memiliki faktor risiko yang jelas dalam pengembangan displasia dan kanker serviks invasif (Schiffman *et al.*, 2011). Perkembangan infeksi virus HPV pada tubuh manusia dapat dilihat pada Gambar 4.

Infeksi HPV pada manusia yang berlangsung lebih dari 10 tahun akan berkembang menjadi kanker serviks. Oleh karena itu, deteksi dini HPV terutama infeksi persisten sangat diperlukan untuk pengobatan kanker serviks yang efektif. Sejauh ini belum ada deteksi spesifik dan akurat untuk mengetahui tipe-tipe virus HPV yang menginfeksi organ reproduksi wanita, sehingga penanganan yang dilakukan belum bisa terarah. Salah satu metode terbaru yang sedang dikembangkan adalah sistem deteksi berbasis marka molekuler yaitu dengan metode *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms* (PCR-RFLP). Metode RFLP pada awalnya tidak menggunakan teknik PCR,



Gambar 4. Perkembangan infeksi HPV pada bagian tubuh manusia (Shanmugasundaram and You, 2017).

sehingga dibutuhkan sampel DNA dengan konsentrasi yang tinggi. Namun, seiring dengan berkembangnya ilmu biologi molekuler, bioteknologi dan rekayasa genetik, deteksi suatu penyakit dapat dilakukan dengan menggunakan RFLP yang dikombinasikan dengan metode PCR.

4. Sistem Deteksi HPV Menggunakan PCR-RFLP

PCR-RFLP adalah salah satu pengembangan metode untuk analisis polimorfisme genetik dengan menggunakan teknik PCR. Isolasi DNA dengan jumlah yang banyak memerlukan waktu yang lama untuk analisis RFLP. Oleh karena itu, teknik PCR dapat digunakan untuk memperoleh sekuens DNA yang diinginkan dalam jumlah yang banyak dengan waktu yang lebih singkat (Mirhendi *et al.*, 2005). Metode PCR-RFLP disebut juga dengan istilah lain yaitu *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence* (CAPS). Prinsip dasar dari metode ini adalah "*Amplification – Digestion – Gel Separation*". Perbedaannya dengan metode RFLP konvensional adalah

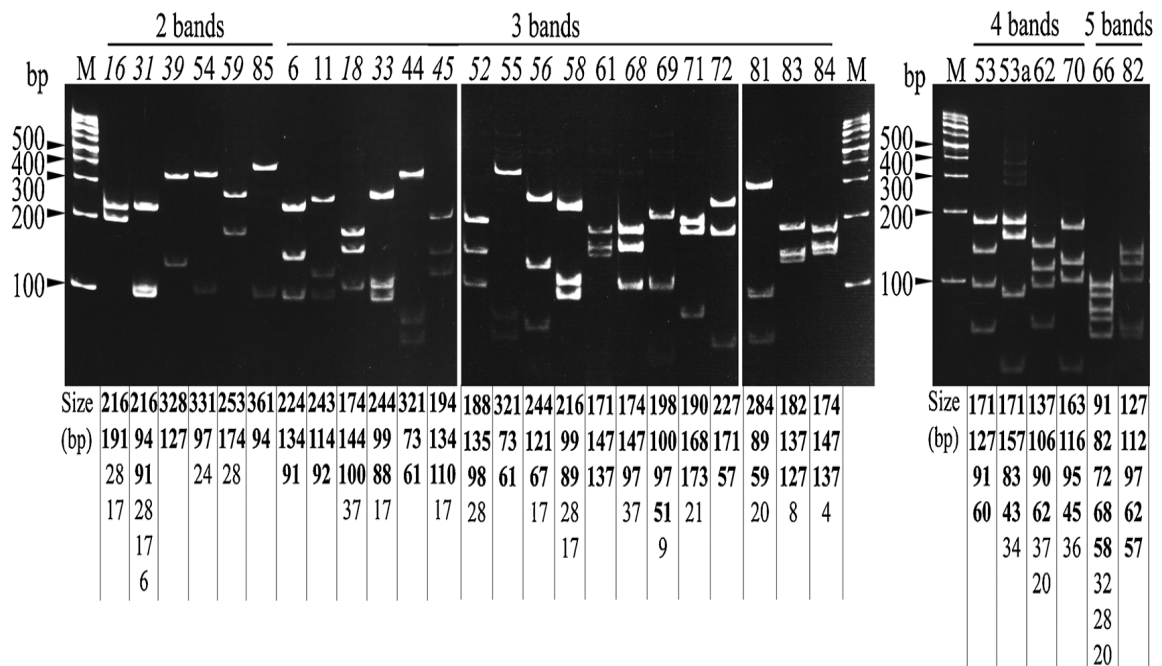
adalah tidak adanya analisis *Southern Blot*. Hal ini dikarenakan DNA target yang akan dianalisis sekuensnya telah teramplifikasi pada tahapan PCR dengan menggunakan primer spesifik. Teknik *Southern Blot* diketahui memiliki sensitivitas yang rendah untuk mendeteksi HPV maupun untuk mengidentifikasi tipe HPV pada pemeriksaan tingkat klinis. Selain itu, metode *Southern Blot* membutuhkan waktu yang lama, memerlukan DNA dalam jumlah banyak, dan membutuhkan tenaga teknis yang profesional (Sambrook dan Russel, 2001).

Tahapan metode PCR-RFLP dalam mendeteksi HPV penyebab kanker serviks adalah sebagai berikut :

1. Sampling sel/ jaringan
Mengoleksi sampel sel yaitu sel-sel epitelium pada serviks, selanjutnya disimpan.
2. Isolasi DNA
Isolasi DNA ini bertujuan untuk mengumpulkan DNA pada sampel sel.
3. Deteksi DNA HPV
Deteksi sekuens DNA dari virus HPV dilakukan

dengan mengambil bagian dari daerah L1 (daerah terkonservasi) dengan panjang ± 450 bp. Daerah tersebut diambil karena telah diketahui bahwa berperan dalam mekanisme infeksi HPV pada perkembangan kanker serviks yang menginduksi respon humoral terhadap berbagai tipe virus HPV, khususnya terhadap protein kapsid mayor L1. Deteksi DNA HPV dilakukan dengan cara mengamplifikasi sekuens DNA HPV menggunakan primer spesifik, yang biasa digunakan adalah primer MY09/11.

4. Sekuensing
Hasil dari produk PCR kemudian dilakukan analisis sekuensing dan pengolahan data hasil sekuensing menggunakan beberapa *software* dan analisis bioinformatik. Data hasil pengolahan hasil sekuensing kemudian dicocokkan (*blast*) dengan data pada *gene bank*. Hasil analisis akan menunjukkan bahwa genotip dari HPV berdasarkan sekuens homolog berukuran sekitar 400-500 bp.



Gambar 5. Visualisasi hasil analisis RFLP dengan menggunakan sel epitelium serviks manusia (Chen *et al.*, 2013)

5. Analisis RFLP

DNA HPV hasil dari PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel *polyacrilamide* dengan menggunakan enzim tertentu. DNA yang terpotong-potong membentuk fragmen DNA dapat divisualisasikan menggunakan UV Transiluminator untuk dilihat tipe HPV yang ada pada sel epitelium serviks tersebut, sehingga dapat diketahui ada tidaknya potensi timbulnya kanker serviks. Tipe HPV dapat diketahui dengan munculnya pita DNA pada masing-masing sampel yang diujikan.

Tiap tipe HPV memiliki jumlah dan ukuran pita DNA yang berbeda-beda (Chen *et al.*, 2013). Lungu *et al.*, (2009) menyatakan bahwa metode PCR-RFLP dapat memvisualisasikan fragmen-fragmen DNA berdasarkan berat molekulnya, sehingga selanjutnya dapat diketahui tipe HPV yang menginfeksi sel serviks yang bersangkutan. Contoh visualisasi hasil analisis PCR – RFLP dapat dilihat pada Gambar 5.

5. Kesimpulan

Berdasarkan uraian diatas dapat disimpulkan bahwa

metode PCR-RFLP dapat dijadikan metode deteksi untuk infeksi virus HPV yang dapat menyebabkan timbulnya kanker serviks. Metode PCR-RFLP memiliki berbagai keunggulan yaitu : tidak membutuhkan sampel DNA dalam jumlah yang banyak (sampel DNA dapat diperbanyak dengan metode PCR), biaya analisis yang relatif murah sehingga dapat dikembangkan di negara berkembang serta analisis dapat dilakukan dengan cepat dan memberikan hasil yang sangat sensitif. Dengan demikian, metode PCR-RFLP dapat menjadi acuan pengembangan sistem deteksi dini dan

model diagnostik molekuler HPV serta diharapkan dapat mengontrol epidemiologinya dengan mengetahui tipe virus HPV yang menginfeksi pasien.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham. 2007. An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. *Indian J Med Microbiol*; 25: 10-7.
- Chen, L., Watanabe, K., Haruyama, T., & Kobayashi, N. (2013). Simple and rapid human papillomavirus genotyping method by restriction fragment length polymorphism analysis with two restriction enzymes. *Journal of medical virology*, 85(7), 1229-1234.
- Golfetto, L., Alves, E. V., Martins, T. R., Sincero, T. C. M., Castro, J. B. S., Dannebrock, C., ... & Bazzo, M. L. (2018). PCR-RFLP assay as an option for primary HPV test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(5).
- Kroupis, C., & Vourlidis, N. (2011). Human papilloma virus (HPV) molecular diagnostics. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 49(11), 1783-1799.
- Lazarczyk, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y., & Favre, M. (2009). The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 348-370.
- Liaw, K. L., Hildesheim, A., Burk, R. D., Gravitt, P., Wacholder, S., Manos, M. M., ... & Anderson, S. M. (2001). A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *The Journal of infectious diseases*, 183(1), 8-15.
- Lungu, O., Wright Jr, T.C. and Silverstein, S., 1992. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Molecular and cellular Probes*, 6(2), pp.145-152.
- Mirhendi, H., Makimura, K., Zomorodian, K., Yamada, T., Sugita, T., & Yamaguchi, H. (2005). A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *Journal of microbiological methods*, 61(2), 281-284.
- Narayanan, S. (1991). Applications of restriction fragment length polymorphism. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 21(4), 291-296.
- Roden R, TC Wu. 2003. Preventative and therapeutic vaccines for cervical cancer.

- Expert Rev Vaccines*; 2: 495-516.
- Rouzier R, C Uzan, P Collinet. 2007. HPV vaccination: Principles, results and future perspectives. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*; 36: 13-8.
- Sambrook J, dan Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. 2011. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 103:368–383.
- Shanmugasundaram, S. and You, J., 2017. Targeting persistent human papillomavirus infection. *Viruses*, 9(8), p.229.
- Torpy, J. M., Burke, A. E., & Glass, R. M. (2007). Human papillomavirus infection. *JAMA*, 297(8), 912-912.
- Urman CO, AB Gottlieb. 2008. New viral vaccines for dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol*; 58: 361-70.
- Wang KL. 2007. Human papillomavirus and vaccination in cervical cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol*; 46: 352-62.
- Williams, R. C. (1989). Restriction fragment length polymorphism (RFLP). *American Journal of Physical Anthropology*, 32(S10), 159

