



Identifikasi Gen E7 Isolat Human Papillomavirus Tipe 18 (HPV18) dari Penderita Kanker Serviks

{Identification Of Human Papillomavirus Type 18 (HPV 18) E7 Gene From Cervical Cancer Patients}

Arfiandi^{1*}, Densi Selpia Sopianti¹, Dewi Gulyla Hari¹, Marlina¹, Yufri Aldi¹, Andani Eka Putra², Akmal Djamaan¹, Rustini¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat

²Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat

Keywords:
Cervical cancer, gene
E7, HPV 18

Kata Kunci:
Kanker serviks, Gen
E7, HPV18

ABSTRACT: One oncoprotein that is always expressed by HPV 18 in cervical cancer is the E7 gene. Persistent infection by the human papillomavirus (HPV) high risk is a major etiologic factor for cervical cancer and expression of E7 Oncoproteins suggested to be a potential marker for tumor progression. E7 will affect the activity of tumor suppressor pRB and bind and activate cyclin complexes that can cause cervical cancer. In this study will be identification of the isolates HPV18 E7 gene of patients with cervical cancer derived from M. Jamil Hospital in Padang, West Sumatra and Arifin Ahmad, Pekanbaru, Riau. The identification process was conducted using Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers specific for HPV18 E7 gene. Of the fifteen isolates HPV18 were amplified with specific primers HPV18 E7 gene, obtained ten E7 genes identified positive samples (66.6%), while five other samples were not identified. Infection cancer in patients with cervical cancer that come from the M. Jamil Padang and Arifin Ahmad, Pekanbaru, Riau hospitals mostly caused by HPV18 E7 gene so that it can be used as a potential marker for tumor progression for patients with cervical cancer in West Sumatra and Riau in particular and Indonesia in general.

ABSTRAK: Gen E7 HPV18 merupakan salah satu onkoprotein yang selalu diekspresikan oleh HPV pada sel yang terinfeksi. Infeksi persisten oleh *Human papillomavirus* (HPV) beresiko tinggi adalah faktor etiologi utama untuk kanker serviks dan ekspresi Onkoprotein HPV E7 disarankan untuk menjadi penanda potensial untuk perkembangan tumor. E7 akan mempengaruhi aktivitas pRB supresor tumor serta mengikat dan mengaktifkan kompleks cyclin sehingga dapat menimbulkan kanker serviks. Dalam penelitian ini akan dilakukan identifikasi terhadap Gen E7 isolat HPV18 dari penderita kanker serviks yang berasal dari RSUP M. Jamil Padang, Sumatera Barat dan RSUD Arifin Ahmad, Pekan Baru, Riau. Proses identifikasi dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik untuk gen E7 HPV18. Dari lima belas isolat HPV18 yang diamplifikasi dengan primer spesifik gen E7 HPV18, didapatkan sepuluh sampel positif teridentifikasi gen E7 (66,6%) sedangkan lima sampel lainnya tidak teridentifikasi. Infeksi kanker pada penderita kanker serviks yang berasal dari RSUP. M. Jamil, Padang dan RSUD. Arifin Ahmad, Pekan Baru, Riau sebagian besar disebabkan oleh gen E7 HPV18 sehingga hal ini bisa dijadikan penanda potensial untuk perkembangan tumor bagi penderita kanker serviks di Sumatera Barat dan Riau pada khususnya serta di Indonesia pada umumnya.

*Corresponding Author: Arfiandi (Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat)
email: arfiandiapt@yahoo.com

Article History:

Received: 18 May 2016

Published: 01 Nov 2016

Accepted: 24 May 2016

Available online: 24 Dec 2016

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan jenis kanker yang paling banyak diderita oleh wanita di berbagai negara berkembang dan merupakan masalah kesehatan utama di seluruh dunia. Telah banyak penelitian secara biologi molekuler yang menunjukkan bahwa Human Papilloma virus (HPV) berperan dalam patogenesis kanker serviks dan virus ini dapat ditularkan melalui hubungan seksual. Infeksi HPV dapat dideteksi pada 90% pasien kanker serviks dan 50% pada pasien karsinoma vulva. Infeksi HPV ini, terutama HPV tipe 16 dan tipe 18 dikenal sebagai penyebab utama kanker serviks [1].

International Agency for Research on Cancer (IARC) telah memperkirakan pada tahun 2050 populasi perempuan usia 15 tahun ke atas yang menderita kanker serviks di seluruh dunia mencapai tiga miliar. Di Indonesia, menurut data pada tahun 2012, merupakan penyakit nomor dua paling umum yaitu sekitar 20.928 kasus kanker serviks baru per tahun dan 9.498 kasus di antaranya berakhir dengan kematian [2]. Tingginya kasus kanker serviks berhubungan dengan minimnya akses terhadap fasilitas kesehatan dan juga terbatasnya, pengetahuan tentang deteksi dini, faktor risiko, pencegahan, dan terapi terhadap lesi prakanker serviks [3].

Human papillomavirus tipe 18 (HPV 18) adalah genotipe yang paling umum kedua yang ditemukan pada kanker serviks [4]. HPV18 dapat ditemukan pada karsinoma sel skuamosa dan adenokarsinoma. Namun, HPV18 lebih sering ditemukan pada adenokarsinoma serviks dibandingkan jenis virus lainnya, sementara HPV16 lebih sering pada karsinoma sel skuamosa [5,6]. Gen awal (Early Gene) HPV 18 seperti E2, E4, E5, E6, dan E7 sangat penting dalam patogenesis kanker yang disebabkan oleh HPV, karena gen-gen tersebut mengatur beberapa sifat seperti replikasi dan transkripsi dari DNA virus serta proses immortalisasi dan transformasi sel yang terinfeksi. Onkoprotein E6 akan mempengaruhi aktivitas p53

yang berfungsi sebagai jalur kontrol pelindung yang penting dalam mencegah kerusakan genetik yang dapat menyebabkan kanker. Onkoprotein E7 akan mempengaruhi aktivitas pRB supresor tumor serta mengikat dan mengaktifkan kompleks cyclin [7]. Pekerjaan lebih lanjut telah menunjukkan bahwa E7 terletak di sitoplasma dan inti sel. Hal ini menunjukkan bahwa HPV18 E7 merupakan bagian integral dari banyak kompleks protein seluler di sitoplasma serta dalam inti dan memiliki beberapa fungsi biokimia dalam deregulasi jalur yang diperlukan untuk potensi onkogenik virus. Dengan demikian, Onkoprotein E7 dari jenis HPV karsinogenik bisa digunakan sebagai penanda spesifik untuk mendeteksi prakanker dan kanker serviks [8].

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen E7 HPV18 dari penderita kanker serviks dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) menggunakan primer spesifik untuk gen E7 HPV18.

METODE PENELITIAN

Pengumpulan sampel

Isolat HPV18 diperoleh dari Pusat Penelitian HPV Universitas Andalas, Sumatera Barat yang dikumpulkan dari penderita kanker serviks di RSUP. M. Jamil, Padang dan RSUD Arifin Ahmad, Pekanbaru, Riau.

Amplifikasi gen E7 isolat HPV18

Amplifikasi dilakukan dengan metoda PCR dimana komponen-komponen yang diperlukan yaitu: Masing-masing primer spesifik gen E7 HPV18 F540 5'CGA CAG GAA CGA CTC CAA CGA3'; R970 5'ATA AAA CCA GCC GTT ACA ACC CGT G3' sebanyak 0,5 µL, PCR mastermix (Promega®) 22.5 µL, DNA Template 1,5 µL dan Nuclease Free Water hingga volume total 25µL. Profil amplifikasi PCR yang digunakan yaitu: Denaturasi awal pada suhu 94° C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, annealing pada suhu 57°C selama 30 detik, elongation pada suhu 72°C selama 60 detik, final

extension pada suhu 72°C selama 10 menit. Proses ini dibuat untuk 35 siklus.

Visualisasi Hasil Amplifikasi

Gel agarosa 1,5% yang telah diberi pewarna SYBR® Safe DNA *gel stain* diletakkan di dalam alat elektroforesis lalu ditambahkan larutan TBE 1X hingga seluruh bagian gel terendam. Disiapkan 3 µL loading dye pada lembaran parafilm. Ditambahkan 7 µL produk PCR kedalam loading dye dan dihomogenkan. Setelah homogen (ditandai dengan perubahan warna campuran menjadi biru tua), campuran larutan dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa. Dimasukkan 5 µL DNA Ladder 100 bp kedalam sumur gel agarosa yang terletak pada posisi paling kiri (sumur 1). Setelah itu tutup alat elektroforesis dan dilakukan proses elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 100 Volt. Setelah proses selesai, alat elektroforesis dimatikan. Dengan hati-hati gel dikeluarkan dan diletakkan diatas Gel Documentation. Gel Documentation dinyalakan dan pita DNA akan berpendar saat dikenai sinar UV. Hasil Penyinaran didokumentasikan dan dapat diamati pada layar komputer.

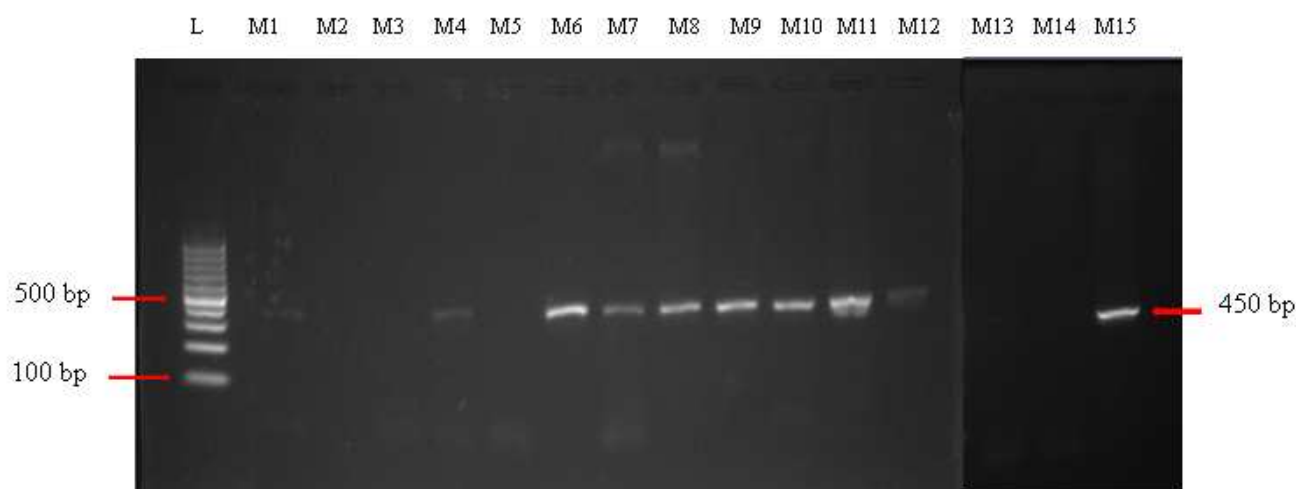
HASIL DAN DISKUSI

Selama periode waktu penelitian didapatkan

15 isolat DNA HPV18 yang positif Gen E7. Proses amplifikasi menggunakan primer spesifik Gen E7 HPV18, yaitu F540 5'CGA CAG GAA CGA CTC CAA CGA3' dan R970 5'ATA AAA CCA GCC GTT ACA ACC CGT G3'. Setelah dilakukan proses amplifikasi terhadap isolat sampel HPV18 dengan primer spesifik gen E7, didapatkan sepuluh isolat sampel HPV18 yang positif gen E7. Hal ini dapat dilihat dengan adanya bercak/pita pada ukuran 450 bp pada agar. Lima sampel tidak memperlihatkan bercak/pita pada agar, mungkin disebabkan karena konsentrasi DNA sampel terlalu rendah untuk terdeteksi pada dimer primer yang diamati sehingga tidak terbaca pada proses visualisasi menggunakan elektroforeris atau DNA target telah rusak. Foto produk amplifikasi isolat sampel Gen E7 HPV18 dapat dilihat pada Gambar 1.

Banyak penelitian yang telah memperlihatkan bukti bahwa Onkoprotein E7 HPV berisiko tinggi memainkan peran penting dalam karsinogenesis serviks [9]. Kehadiran terus menerus dari protein ini selama perkembangan karsinoma serviks menunjukkan bahwa protein ini mungkin penanda yang baik untuk perkembangan lesi prakanker dan kanker.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, sepuluh dari lima belas sampel (66,6%) yang positif HPV18 terdeteksi adanya



Gambar 1. Produk amplifikasi isolat sampel Gen E7 HPV18.

Keterangan: L = Ladder; M1-M15 = Isolat Sampel Gen E7 HPV18.

Gen E7. Dapat ditarik kesimpulan bahwa kanker serviks yang dialami oleh pasien yang berasal dari RSUP. M. Jamil, Padang dan RSUD. Arifin Ahmad, Pekanbaru adalah sebagian besar disebabkan oleh infeksi HPV18 terutama karena aktivitas onkogenik gen E7 HPV18. Hasil ini mendukung penelitian yang telah dikerjakan sebelumnya mengenai identifikasi tipe-tipe HPV yang berasal dari kedua rumah sakit tersebut, dimana ditemukan 40,4% merupakan HPV tipe 18 dan 28,5% merupakan HPV tipe 16 [10]. Diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap varian gen E7 HPV18 ini, karena beberapa penelitian menyebutkan bahwa varian yang berbeda dari gen E7 HPV18 dapat memberikan aktivitas onkogenik yang berbeda pula terhadap kanker serviks yang ditimbulkannya [11] sehingga nantinya bisa dirancang jenis vaksin yang sesuai untuk penderita kanker serviks di wilayah Sumbar dan Riau khususnya dan Indonesia pada umumnya.

KESIMPULAN

Kanker serviks yang dialami oleh pasien yang berasal dari RSUP. M. Jamil, Padang dan RSUD. Arifin Ahmad, Pekanbaru adalah sebagian besar disebabkan oleh infeksi HPV18 terutama karena aktivitas onkogenik gen E7 dari virus tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami berikan kepada RSUP. M. Djamil, Padang dan RSUD. Arifin Ahmad, Pekanbaru untuk menyediakan sampel serviks biopsi jaringan kanker dan apusan serviks. Selain itu kami juga mengucapkan terima kasih kepada Hibah penelitian unggulan perguruan tinggi dari Kementerian Penelitian, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia, dalam mendukung penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jastreboff A M, Cymet T, (2002). Role of the Human Papilloma Virus in The Development of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Malignancy. *Postgrad Med. J*, 78, 225-228.
2. Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Serrano, B., Brotons, M., Cosano, R., Muñoz, J., & Castellsagué, X. (2014). Human papillomavirus and related diseases report. L'Hospitalet de Llobregat: ICO Information Centre on HPV and Cancer.
3. Kepmenkes. (2013). Pusat Data dan Informasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
4. Cerqueira DM, Raiol T, Vírás NM, von Gal Milanezi N, Amaral FA, de Macedo Brígido M, Martin CR, (2008). New variants of human papillomavirus type 18 Identified in Central Brazil. *Virus Genes*, 3, 282-287.
5. Bulk S, Berkhof J, Bulkman NW, Zielinski GD, Rozendaal L, Van Kemenade FJ, Snijders PJ, Meijer CJ, (2006). Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to woman with normal cytology in the Netherlands. *Br J Cancer*, 94, 171-175.
6. Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Britton LA, Kurman RJ, Barnes WA, Greenberg MD, Hadjimichael OC, Fu L. (2003). Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res*, 63, 7215-7220.
7. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55, 244-65.
8. Dreier, K., Scheiden, R., Lener, B., Eehalt, D., Pircher, H., Mzller-Holzner, E., ... & Lechner, S. (2011). Subcellular localization of the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein in CaSki cells and its detection in cervical adenocarcinoma and adenocarcinoma in situ. *Virology*, 409(1), 54-68.
9. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384:335-344.
10. Marlina, Densi Selpia Sopianti, Dewi Gulyla Hari, Arfiandi, Yufri Aldi, Andani Eka Putra, Akmal Djamaan & Rustini (2016). Identifikasi Tipe Human Papillomavirus (HPV) Pada Penderita Kanker Serviks (belum dipublikasi).
11. Boumba, L. M. A., Assoumou, S. Z., Hilali, L., Mambou, J. V., Moukassa, D., & Ennaji, M. M. (2015). Genetic variability in E6 and E7 oncogenes of Human papillomavirus Type 16 from Congolese cervical cancer isolates. *Infectious Agents and Cancer*, 10(1), 15.