Perbandingan *Abbott Real-time High-risk* HPV dan *Cobas* 4800 HPV *Test* untuk Deteksi Molekuler HPV pada Sampel Indonesia

Comparison of the Abbott Real-time High-risk HPV to Cobas 4800 HPV Test for Molecular Detection of HPV in Indonesian Sample

Holy Arif Wibowo*, Kindi Adam, Nanang Yunarto, Rosa Adelina, Natalie Laurencia, dan Rita Marleta Dewi
Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI, Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560, Indonesia
*Korespondensi Penulis: holyarif@gmail.com

Submitted: 05-07-2017, *Revised*: 22-11-2017, *Accepted*: 29-11-2017

DOI: http://dx.doi.org/10.22435/mpk.v27i4.7034.209-216

Abstrak

Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013, sebanyak 10,3% kematian wanita akibat kanker di Indonesia disebabkan oleh kanker serviks dengan infeksi *Human Papillomavirus* (HPV) menjadi faktor risiko terbesar yakni 99,7%. Kejadian kanker serviks dapat dicegah melalui deteksi awal infeksi virus HPV secara molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan teknik *Abbot Real-time High-risk* HPV (AR) dan *Roche Cobas* HPV (CB) dalam mendeteksi DNA virus HPV dari Bahan Biologi Tersimpan (BBT) Indonesia. Selanjutnya hasil dari kedua teknik tersebut dikonfirmasi dengan menggunakan metode *genotyping* menggunakan *Linear Array* (LA). Sebanyak 74 spesimen BBT usap serviks yang disimpan dalam media *Phosphate Buffered Saline* (PBS) diekstraksi menggunakan kit isolasi khusus dari *Abbott Real-time High-risk* HPV, *Cobas* 4800 *Human Papillomavirus Test,* dan *Linear Array*. Konsentrasi dan kemurnian hasil ekstraksi DNA virus HPV diukur dengan metode spektofotometri. Amplifikasi hasil ekstraksi dilakukan dengan menggunakan primer spesifik segmen gen L1 sebagai target untuk mendeteksi DNA virus HPV. Kualitas hasil ekstraksi DNA virus HPV menggunakan teknik AR rata-rata mencapai konsentrasi 10-30 ng/µL, hasil tersebut lebih tinggi bila dibandingkan dengan teknik CB yang hanya berkisar pada 10-20 ng/µL namun hasil menggunakan teknik LA rata-rata memiliki konsentrasi ≥ 30 ng/µL. Kemurnian hasil ekstraksi DNA virus HPV menggunakan teknik AR dan teknik CB kurang lebih sama. Hasil pemeriksaan dari 74 sampel ditemukan tipe HPV 16, HPV 18, dan HPV lainnya pada masing-masing teknik, yaitu teknik AR 14 positif (9; 4; dan 1), teknik CB 5 positif (3;2; dan 0), dan teknik LA 14 postif (8;4; dan 2). Teknik AR lebih akurat dan optimum dibandingkan dengan teknik CB dalam mendeteksi virus HPV dan mengidentifikasi tipe virus HPV. Tiap teknik AR dan CB memiliki keunggulan dan kekurangan sendiri, walaupun kedua teknik telah menggunakan sistem automatis dari tahap isolasi dan pembacaan analisa hasil. Dapat disimpulkan bahwa teknik AR memiliki performa yang lebih baik dalam mendeteksi virus HPV bila dibandingkan dengan teknik CB.

Kata kunci: HPV, serviks, deteksi molekuler

Abstract

Based on the results of 2013 National Basic Health Research (Riskesdas 2013), as many as 10.3% of female death due to cancer in Indonesia caused by cervical cancer of Human Papillomavirus (HPV) became the main risk factor that was 99.7%. The incidence of cervical cancer can be prevented through early detection of HPV infection moleculary. This study aims to evaluate the ability of Abbot Real-time High-risk HPV (AR) and Roche Cobas HPV (CB) techniques to detect HPV DNA from Indonesia's Stored Biology. Furthermore, the results from both techniques are confirmed by using genotyping method using Linnear Array (LA). A total of 74 speciment of stored biological materials (BBT) of cervical swabs stored

in Phosphate Buffered Saline (PBS) media were extracted using a special isolation kit from Abbott Real-time High-risk HPV, Cobas 4800 Human Papillomavirus Test and Linear Array. Concentration and purity of HPV viral DNA extraction results were measured by spectophotometry method. The amplification of the extraction results was carried by using a specific primer segment of the L1 gene as a target for detecting HPV DNA. The quality of HPV DNA extraction results using AR technique was 10-30 ng/µL concentration in average, the result was higher when compared to the CB technique which only range from 10-20 ng/µL, but the results using the LA technique had a concentration ≥ 30 ng/µL in average. The purity of HPV DNA extraction using AR and CB technique was similar more or less. The examination of 74 samples had found HPV 16, HPV 18, and other HPV type in each technique, which were 14 positive (9, 4, and 1) in AR technique, 5 positive (3,2, and 0) in CB technique, and 14 positive (8, 4, and 2) in LA technique. AR technique is more accurate and optimal than CB technique in detecting HPV virus and identifying HPV virus types. Both AR and CB technique have their own advantages and disadvantages, although they have uses an automated system of isolation and readout results analysis. It could be concluded that AR technique has better performance in detecting HPV when compared to CB technique.

Keywords: HPV, cervix, molecular detection

Pendahuluan

Saat ini di negara maju maupun berkembang terjadi transisi penyebab kematian dari penyakit menular menjadi penyakit tidak menular (PTM). Pada tahun 2010-2011 lebih kurang 63% kematian disebabkan oleh PTM di seluruh dunia. Kematian akibat PTM yang paling banyak adalah penyakit kardiovaskular, diabetes melitus (DM) dan kanker.[1] Berdasarkan hasil dari Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 prevalensi penyakit nasional penderita kanker pada penduduk semua umur di Indonesia tahun sebesar 4,3 per 1000 penduduk. Pada wanita di Indonesia, kematian tertinggi akibat penyakit kanker disebabkan oleh kanker payudara (21,4%), diikuti kanker serviks (10,3%).[2] Kanker serviks juga merupakan kanker tertinggi pada perempuan di negara-negara Asia Tenggara lainnya seperti Vietnam dan Thailand.[3]

Kanker serviks adalah keganasan leher rahim yang disebabkan oleh infeksi *Human Papillomavirus* (HPV) dengan prevalensi sebesar 99,7%. Meskipun kanker serviks merupakan kanker dengan peringkat nomor dua di Indonesia setelah kanker payudara, namun merupakan kanker pembunuh nomor satu untuk wanita Indonesia.[4] Di Indonesia, pada tahun 2010 tercatat jumlah kasus kanker sebanyak 14.368 jiwa dan sekitar 7.297 jiwa mengalami kematian (50,7%). Kasus kanker serviks di Indonesia, diperburuk lagi dengan banyaknya (> 70%) kasus yang sudah berada pada stadium lanjut ketika datang ke rumah sakit.[5] Penanganan pencegahan kanker serviks dapat dilakukan melalui dua cara yaitu dengan pencegahan primer dan sekunder. Pencegahan primer dilakukan dengan mencegah terjadinya infeksi HPV melalui vaksinasi.[6]

Deteksi dini kanker serviks dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti pemeriksaan inspeksi visual aseta (IVA), pap smear, kolposkopi, dan pemeriksaan sitologi. Beberapa teknik skrining tersebut diketahui kurang efektif karena memiliki spesifitas dan sensitivitas yang rendah. Metode tersebut merupakan metode sederhana yang sudah mulai ditinggal di dunia karena metode tersebut dinyatakan kurang sensitif dan sangat ditentukan oleh kemampuan tenaga medis dalam menegakkan diagnosanya. Hal ini menyebabkan tingginya *false* negatif dan keterlambatan penanganan.[7] Adanya perkembangan teknik biologi molekular memudahkan deteksi banyak genotip HPV. Deteksi infeksi HPV meningkatkan sensitivitas maupun spesifisitas pemeriksaan hingga mendekati 100%. Subtipe HPV terbanyak pada berbagai populasi berbeda-beda. Penelitian oleh International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group menyebutkan subtipe HPV terbanyak pada pasien kanker serviks secara berurutan adalah 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, dan 35.[8] Persentase kanker serviks yang disebabkan infeksi HPV 16 dan 18 mencapai 76% di seluruh dunia.[9] Di Indonesia, pada populasi kanker serviks diketahui sub tipe HPV terbanyak adalah 16, 18, 52, dan 45.[10] Kanker serviks dianggap sebagai penyakit yang dapat dicegah karena memiliki waktu *pre-invasive* yang panjang sehingga penemuan kanker serviks pada stadium dini akan membuat pengobatan lebih berhasil dan lebih baik sehingga mampu menurunkan tingkat kematian.[11] Oleh karena itu, perlu adanya pengembangan teknik-teknik atau metode–metode lain yang diharapkan memiliki spesifitas dan sensitivitas yang tinggi dalam skrining dan *typing* virus HPV. *Real-time*

PCR merupakan metode deteksi molekuler yang cepat dan akurat.[12] Metode deteksi molekuler DNA HPV yang telah mendapatkan persetujuan FDA dan beredar di Indonesia diantaranya *Abbot Real-time High-risk* HPV (AR) dan *Cobas* 4800 *Human Papillomavirus test* (CB). Hingga saat ini belum ada penelitian yang membandingkan kedua metode tersebut menggunakan sampel dari Indonesia.

Tujuan penelitian ini untuk mengevaluasi kemampuan *Abbot Real-time High-risk* HPV dan *Roche Cobas* HPV dalam mendeteksi DNA HPV dari spesimen usap serviks yang diambil dari bahan biologi tersimpan (BBT) Indonesia. Selanjutnya hasil dari kedua teknik tersebut dikonfirmasi dengan menggunakan metode *genotyping* menggunakan *Linear Array*.

Metode

Desain penelitian ini adalah deskriptif dan observasi laboratorium. Sampel yang digunakan adalah 74 spesimen BBT HPV sekret serviks. Masing-masing spesimen disimpan dalam medium *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dan diuji deteksi molekular dengan menggunakan 3 metode yang berbeda yaitu, *Abbott Real-time High-risk* HPV, *Cobas* 4800 *HPV Test,* dan *Linear Array Typing Test.* Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2015 hingga Mei 2016 dan telah memperoleh persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Badan Litbangkes Nomor LB.02.01/5.2/KE 415/2015.

Spesimen pada penelitian ini adalah BBT berupa usap serviks dari wanita usia 25-64 tahun dengan kriteria inklusi sudah atau pernah menikah dan ekslusi yaitu sedang hamil, mengalami menstruasi (*menorrhea*), sakit berat dan sedang mengalami ganguan jiwa berat. Spesimen diambil menggunakan sikat serviks (*cervical brush*) tipe *broom* dengan medium presipitat berupa PBS dengan pH 7,4 dan kondisi dingin 2-8^{o}C. Spesimen telah disimpan dalam *deepfreezer* -20^{o}C selama 14 hari sejak hari pengambilan sampel. Spesimen diekstraksi dengan kit pada masing-masing *reagen Abbott Real-time High-risk* HPV, *Cobas* 4800 *HPV Test,* dan *Linear Array*. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian menggunakan metode spektrofotometri panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan alat *Nanodrop* (Thermo, USA). Konsentrasi DNA ditunjukkan dalam satuan ng/µL sedangkan kemurnian DNA ditunjukkan dengan rasio 260 nm/280 nm.

Penelitian ini menggunakan reagen *Abbot Real-time High-risk* HPV dengan mesin *Abbott* m2000SP bersama mesin PCR *Real-time* dan *reagen Cobas* 4800 *Human Papillomavirus Test* dengan mesin *Cobas* X 480 bersama mesin *Cobas* Z 480. Keduanya menggunakan metode bersifat *closed system* dengan sertifikasi *In Vitro Diagnostic Product* (IVD) dengan demikian dapat diperbandingkan secara sepadan. Prinsip metode ini adalah amplifikasi gen target dengan menggunakan primer spesifik untuk gen L1 untuk mendeteksi DNA HPV. Pembacaan hasil amplifikasi dengan menggunakan probe dengan menggunakan mesin *Real-time* PCR. Metode *genotyping* yang digunakan sebagai pembanding adalah *Linear Array* (LA), prinsip metode ini adalah ampflikasi segmen pada gen L1 dengan menggunakan alat PCR konvensional *Thermalcycler Biorad* C1000. Hasil amplifikasi dilakukan hibridisasi dengan label biotin dan dilakukan pembacaan visual pada membran nilon.[13]

Hasil

Kemurnian dan konsentrasi DNA setelah dilakukan isolasi DNA dilihat menggunakan spektrofotometri, ditunjukkan dalam Tabel 1. Volume sampel yang dibutuhkan pada teknik AR sebanyak 400 µL sedangkan pada teknik CB sebanyak 500 µL. Teknik AR dan CB diberikan cairan elusi dengan volume sampel yang sama namun teknik AR memiliki kualitas rata-rata *yield* lebih baik jika dibandingkan teknik CB, hal ini ditunjukkan dari konsentrasi *yield* yang diperoleh, pada teknik AR jumlah sampel yang memiliki konsentrasi DNA lebih tinggi lebih banyak jika dibandingkan teknik CB. Di sisi lain kemurnian hasil isolasi teknik AR dibanding teknik CB kurang lebih sama.

Sebelum dilakukan tahap selanjutnya, konsentrasi DNA disamakan dengan cara diencerkan menjadi 5 ng untuk dijadikan *template* pada tahap selanjutnya. Hasil positif deteksi HPV menggunakan teknik AR dan CB dibandingkan dengan teknik LA sebagai pembandingnya ditunjukkan pada Tabel 2. Dari 74 jumlah sampel yang digunakan, sebanyak 14 sampel dideteksi positif dengan menggunakan teknik AR dan LA, sedangkan pada teknik CB sebesar 5 sampel. Teknik AR lebih sensitif dibandingkan dengan teknik CB dalam mendeteksi virus HPV termasuk tipe virus HPV yang diidentifikasi.

Tabel 1. Konsentrasi dan Kemurnian DNA setelah Dilakukan Isolasi dengan Teknik AR dan CB (n= 74)

Hasil Isolasi	Teknik AR	Teknik CB	Teknik LA
Konsentrasi DNA (ng/µL)			
1-10	5	6	0
10,1-20	23	52	6
20,1-30	35	10	26
≥ 30	11	6	42
Kemurnian DNA (260/280)			
1-1,8	66	65	66
≥ 1,8	8	9	8

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Deteksi HPV dengan Teknik AR dan CB Dibandingkan dengan LA

Hasil Pemeriksaan	Metode Pemeriksaan		
	Teknik AR	Teknik CB	Teknik LA
Sampel Positif	14	5	14
Sampel Negatif	60	69	60
HPV Tipe 16	9	3	8
HPV Tipe 18	4	2	4
HPV *High-risk* Lainnya	1	0	2

Pembahasan

Penelitian ini menggunakan metode deteksi molekuler berbasis amplifikasi dengan perbedaan pada desain primer, prosedur pengerjaan, dan cara pembacaan hasil. Tahap pertama adalah isolasi material genetik DNA. Pemeriksaan kualitas dan kuantitas hasil isolasi DNA pada riset ini diukur menggunakan alat spektrofotometer (Nanodrop™, USA). Konsentrasi DNA hasil isolasi menggunakan teknik AR lebih tinggi dibandingkan teknik CB. Pada teknik AR hasil konsentrasi DNA paling banyak terletak pada range 10-30 ng/µL sedangkan teknik CB terletak pada range 10-20 ng/µL. *Template* yang digunakan pada penelitian ini sebesar 5 ng untuk semua perlakuan.

Beberapa faktor yang mempengaruhi konsentrasi DNA hasil isolasi, yaitu kualitas spesimen, metode isolasi DNA, medium presipitasi, dan kandungan reagen isolasi yang digunakan. Teknik pengambilan spesimen dan penggunaan alat usap yang tepat akan menghasilkan sel epitel dengan jumlah optimal yang kemudian memberikan hasil kuantitas DNA yang tinggi. Penanganan spesimen yang kurang tepat akan mengakibatkan sel epitel mengalami lisis sehingga DNA akan terdegradasi oleh enzim-enzim lisosom sebelum dilakukan isolasi.[14] Faktor kedua adalah pemilihan metode isolasi, kedua metode baik AR dan CB menggunakan teknik yang sama yaitu *magnetic beeds*. Teknik *magnetic beeds* membuat DNA terikat pada *beeds* yang akan dimurnikan dengan *wash buffer* masing-masing agar mendapatkan DNA yang lebih murni.[15]

Faktor ketiga adalah pemilihan medium presipitasi. Penelitian ini menggunakan medium PBS dengan pH 7 dan ditambah dengan antibiotik berupa penisilin dan streptomisin.[16] Faktor keempat adalah penggunaan enzim dan senyawa kimia yang digunakan dalam kit isolasi DNA. Keduanya merupakan paten teknologi dari masing-masing produsen, sehingga tidak dapat disamakan. Pada riset ini penggunaan enzim dan komposisi senyawa kimia di dalam kit isolasi DNA yang digunakan merupakan satu-satunya faktor pembeda yang menunjukkan keunggulan dari produk AR dalam mengisolasi DNA HPV target.

Penggunaan teknik LA pada riset ini digunakan sebagai pembanding karena teknik ini mampu melakukan deteksi skrining dan *genotyping* spesimen sampai dengan 30 tipe virus.[17] Teknik yang digunakan dalam LA yaitu amplifikasi dan hibridisasi. Teknik ini dipilih karena memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik karena pada teknik ini tidak hanya melakukan amplifikasi menggunakan primer-primer spesifik namun juga teknik hibridisasi yang melibatkan reaksi kimia antara produk *amplicon* dengan marker genetik berlabel.[18]

Hasil pemeriksaan deteksi HPV dengan

teknik AR dan CB dibandingkan dengan LA pada Tabel 2 menunjukkan bahwa spesimen positif pada teknik AR, CB, dan LA berturut-turut adalah 14 (18,92%), 5 (6,76%), dan 14 (18,92%). Berdasarkan pembacaan tersebut dapat dilihat bahwa teknik AR dan LA memiliki jumlah spesimen positif yang sama sedangkan teknik CB memiliki spesimen positif yang paling sedikit sehingga teknik CB memiliki sensitivitas lebih rendah jika dibandingkan dengan teknik AR. Dengan demikian teknik CB tidak dapat mendeteksi 9 (12,16%) sample positif HPV yang terdeteksi pada Teknik AR dan LA.

Jumlah spesimen positif pada teknik AR dan LA sebanyak 14 spesimen demikian juga pada tipe virus HPV 18 yaitu sama-sama mendeteksi 4 spesimen. Pada teknik AR didapatkan hasil virus HPV tipe 16 sebanyak 9 spesimen sedangkan pada teknik LA sebanyak 8 spesimen, hal ini kemungkinan dapat terjadi karena teknologi dan primer yang digunakan. Gen target yang digunakan untuk sistem deteksi pada teknik AR dan LA adalah gen L1. Gen tersebut berperan sebagai sintesis protein capsid. Perbedaan teknik deteksi pada AR menggunakan sistem deteksi *real-time* PCR sedangkan pada teknik LA menggunakan PCR konvensional dikombinasi dengan tahap *hybridisasi*. Teknologi *real-time* dan konvensional memiliki beberapa perbedaan, diantaranya adalah pada primer yang digunakan. Pada *real-time* PCR primer yang digunakan lebih pendek dengan penambahan *probe* (*dye*).[19] Hasil *real-time* PCR pada teknik AR memiliki panjang produk *amplicon* 150 bp. Di sisi lain PCR konvensional menggunakan primer lebih panjang dan hasil PCR konvensional pada teknik LA memiliki *amplicon* dengan panjang 450 bp. Berdasarkan Flori *et al* diketahui bahwa sensitivitas PCR konvensional dan *real-time* 100% namun spesifitas PCR konvensional lebih baik (87%) dibandingkan *real-time* (84,9%). Nilai *false* positif pada PCR *real-time* (14,5%) juga lebih tinggi dibandingkan PCR konvensional (12,9%).[20] Perbedaan hasil *genotyping* virus HPV tipe 16 pada teknik AR dan LA mungkin disebabkan oleh teknologi yang digunakan. Beberapa hal penting yang mempengaruhi spesifitas dalam teknik molekuler PCR yaitu desain primer dan enzim yang digunakan. Dalam hal ini LA menggunakan kombinasi PCR dan hibridisasi sehingga meningkatkan spesifitas dalam deteksi jika dibandingkan dengan AR, namun dapat juga didukung oleh desain primer dan enzim yang lebih optimal jika dibandingkan dengan AR. Faktor lain yang meningkatkan spesifitas pada teknologi LA adalah kombinasi antara teknik amplifikasi konvensional dan hibridisasi. Pada teknologi AR dan CB yang menggunakan teknologi PCR *real-time* kemungkinan menimbulkan hasil *false* positif atau menunjukkan *signal* yang lemah (negatif) dapat disebabkan oleh karena ada faktor penghambat atau faktor teknis pengganggu lainnya.

Jumlah spesimen positif teknik CB dan AR memiliki perbedaan yaitu 14 spesimen dan 5 spesimen, demikian pula pada tipe virus HPV 16 (AR 9 spesimen, CB 3 spesimen) dan HPV 18 (AR 4 spesimen, CB 2 spesimen). Ada beberapa faktor yang mempengaruhi hasil diagnostik dalam teknik molekuler *real-time* yang digunakan oleh AR dan CB, yaitu desain primer dan *probe*, target gen, enzim yang digunakan, *marker probe* yang digunakan, sensitivitas detektor, dan faktor teknis lainnya. Faktor teknis diminimalkan dengan cara pengulangan uji sampel secara *duplo*, dan pengulangan ketiga dilakukan jika ada perbedaan pembacaan hasil *duplo* tersebut. Faktor *probe* dan detektor yang digunakan dalam penelitian ini dapat dikatakan relatif sama. Masing-masing metode menggunakan 4 *dye* terpisah yaitu *dye* untuk deteksi HPV tipe 16,18, semua tipe *high-risk* selain tipe 16 dan 18, serta kontrol internal.

Kedua metode baik AR dan CB masing-masing menggunakan mesin *real-time* PCR dengan kemampuan yang baik sehingga pada faktor ini dikatakan keduanya seimbang. Enzim yang digunakan pada kedua metode AR dan CB adalah sama yaitu enzim polimerase, hal ini dikarekan jenis *template* keduanya adalah DNA. Gen target yang digunakan pada metode AR dan CB adalah sama yaitu gen L1 pada virus HPV yang umum digunakan sebagai target deteksi molekuler HPV.[21,22] Gen L1 memiliki ukuran yang cukup besar dan terdapat daerah yang *conserved*. Gen tersebut berfungsi sebagai pembentuk protein kapsid pada virus HPV. Namun demikian, gen tersebut dilaporkan banyak yang telah mengalami mutasi delesi sehingga jika delesi terjadi pada *site* penempelan primer maka hasil *false* negatif dapat terjadi.[23,24] Pada metode AR dan CB terletak perbedaannya adalah pada desain primer dan *probe* sehingga menghasilkan hasil yang berbeda.

Aspek lain yang menjadi pertimbangan dalam penelitian ini terkait kedua metode deteksi molekular HPV AR dan CB adalah cara kerja, kemudahan pembacaan, volume sampel yang digunakan, waktu pengerjaan, dan unsur

biosafety.

Mekanisme dan waktu pengerjaan yang dibutuhkan dalam penegakan diagnostik memiliki sedikit perbedaan. CB memiliki waktu yang lebih singkat dalam preparasi sampel sekitar 5-10 menit jika dibandingkan dengan AR demikian juga dalam proses deteksinya CB lebih cepat 10-15 menit dibandingkan dengan AR. Metode CB lebih cepat dalam mendeteksi karena jenis reagen dan tahapan yang digunakan serta *ramp rate* dari *thermalcycler* yang lebih tinggi. *Ramp rate* merupakan kecepatan mesin *thermalcyler* dalam merubah suhu sesuai dengan protokol yang dilakukan.[25,26] Waktu pengerjaan menjadi parameter dalam riset ini dikarenakan jika waktu deteksi yang dibutuhkan lebih singkat tentu akan lebih efisien dalam menggunakan sumber daya baik konsumsi listrik maupun sumber daya manusia, jika dibandingkan dengan metode LA membutuhkan waktu pengerjaan yang lebih lama.[18]

Volume sampel yang didapatkan pada riset ini adalah 3.000 µL hal ini dimaksudkan agar seluruh permukaan *brush* dapat terbilas di medium presipitat. Volume sampel yang dibutuhkan jika menggunakan metode AR sebanyak 400 µL sedangkan metode CB membutuhkan 500 µL. Penggunaan volume sampel yang lebih sedikit tentunya lebih menguntungkan karena jika dibutuhkan masih dapat dilakukan pemeriksaan ulang.

Tahap analisis dari dua metode yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan perangkat lunak berbasis komputer yang sudah dikembangkan khusus untuk masing-masing teknik. Perangkat lunak ini menyambungkan perangkat robotik dan perangkat deteksi. Tampilan antar muka (*user interface*) yang digunakan pada masing-masing metode menjadi pertimbangan subjektif dalam penelitian ini. Semua anggota tim penelitian ini menyatakan bahwa tampilan antar muka pada metode AR lebih sederhana dan mudah dibandingkan metode CB.

Secara umum, keberadaaan darah dalam analisis molekuler dapat memberikan bias dalam mendeteksi genom target. Dalam penelitian ini, metode AR masih dapat memberikan hasil deteksi yang konsisten dari dua kali ulangan untuk setiap sampel yang diuji. Di sisi lain pada metode CB, keberadaan darah pada spesimen memberikan pengaruh dalam kemampuan deteksi DNA genom HPV. Dengan demikian, dibutuhkan pengulangan yang lebih banyak untuk dapat memberikan hasil deteksi yang konsisten.

Unsur *biosafety* adalah faktor penting dalam penelitian molekuler, khususnya jika berhubungan dengan agen infeksius seperti virus HPV. Walaupun HPV bukan virus yang menyebar dengan media droplet, namun aspek *biosafety* tetap menjadi hal yang penting. Dalam pengerjaan skala besar, penggunaan mesin robotik merupakan sebuah kelebihan untuk memberikan hasil yang konsisten dan juga akurat karena tidak dipengaruhi unsur subjektif dan kesalahan manusia (*human error*). Mesin robotik yang digunakan dalam deteksi HPV dengan metode AR lebih komprehensif dalam memberikan proteksi pada peneliti yang bekerja jika dibandingkan dengan metode CB. Hal ini dikarenakan mesin robotik AR memiliki penutup mesin yang lebih lengkap dibanding mesin robotik CB. Sehingga kemungkinan terbentuknya droplet aerosol dan unsur *human error* yang memungkinkan terjadinya kecelakaan kerja menjadi lebih terbuka pada mesin robotik CB.

Penelitian ini dilakukan sebagai referensi jika akan dilakukan pemeriksaan skrining HPV. Perbandingan kedua teknik AR dan CB ini dikarenakan keduanya memiliki metode deteksi yang sama atau seimbang sehingga layak untuk dilakukan uji perbandingan. Namun demikian jika dilihat dari beberapa parameter di atas terlihat bahwa teknik AR lebih unggul dibandingkan teknik CB. Beberapa hal yang perlu menjadi catatan adalah kedua teknik sebenarnya memiliki medium presipitasi yang direkomendasikan seperti PCR *Cell Collection Media* untuk teknik CB dan *Cervi-Collect* untuk teknik AR, tetapi pada penelitian ini menggunakan PBS sebagai medium presipitasi dengan tujuan menyamakan mediumnya dan ingin melihat kemampuan kedua teknik ini dalam melakukan deteksi dengan medium yang lain.

Pemilihan *site* primer kedua teknik sama-sama memilih gen L1 sebagai lokasi target namun demikian ada kemungkinan *site* penempelannya berbeda sehingga bisa dimungkinkan terjadinya perbedaan sensitivitas dan spesifitas. Parameter tersebut yang kemungkinan dianggap oleh peneliti sebagai titik kritis pada pemeriksaan menggunakan metode ini.

Kesimpulan

Tiap teknik memiliki keunggulan dan kekurangan masing-masing, diantaranya teknik AR dan CB telah menggunakan sistem otomatis dari tahap isolasi dan pembacaan analisa hasil. Teknik CB dalam skrining HPV memiliki

keunggulan dalam waktu pemeriksaan dan penggunaan volume yang lebih sedikit. Di sisi lain teknik AR dalam skrining HPV memiliki keunggulan dalam hal *yield* DNA hasil isolasi lebih banyak konsentrasinya dan lebih murni, memiliki hasil deteksi yang lebih sensitif dan spesifik jika dibandingkan dengan teknik CB, kemudian keunggulan lainnya adalah kemudahan pengerjaan, minim pengulangan sampel yang disebabkan adanya darah, dan lebih aman bagi pekerja laboratorium atau peneliti.

Saran

Metode deteksi merupakan salah satu hal penting dalam sebuah penelitian, kesalahan metode deteksi dapat menyebabkan hasil yang tidak valid (*false* negatif atau *false* positif). Hal ini dapat mengakibatkan kesalahan dalam merumuskan rekomendasi kebijakan sehingga berakibat pada program penanggulanan kesehatan tidak ekonomis dan tidak tepat sasaran.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk metode deteksi dari berbagai macam teknik dan merek yang sudah terdaftar (registrasi), agar dapat diketahui metode deteksi yang tepat digunakan untuk Indonesia dengan mempertimbangkan keadaan geografis, ciri khas mikroorganisme Indonesia dan lain sebagainya.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, dr. Eva Sulistiowati dan tim Peneliti Puslitbang Sumber Daya dan Pelayanan Kesehatan. Penelitian ini didanai melalui DIPA Badan Litbangkes tahun 2015.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. A prioritized research agenda for prevention and control of non communicable diseases. Geneva, Switzerland; 2011.
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Riset Kesehatan Dasar Tahun 2013. Jakarta: Lembaga Penerbit Balitbangkes; 2013.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics, CA Cancer J Clin. 2011;61(2):69-90.
4. Rasjidi I. Epidemiologi kanker serviks. Indonesia Journal of Cancer. 2009;3(3):103-8.
5. Winarni SK. Deteksi dini kanker leher rahim dengan metode IVA di wilayah kerja Puskesmas Ngoresan Surakarta. Gaster. 2011;8(1):681-94.
6. Novel SS, Safitri R, Harijanto SH, Nuswantara. Perbandingan beberapa metode molekuler dalam uji DNA HPV (Human Papillomavirus). Cermin Dunia Kedokteran. 2011;38(5):356-58.
7. Mayrand MH, Franco ED, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et.al. Human papillomavirus DNA versus papanicolaou screening tests for cervical cancer. NEJM. 2007;357:1579–88.
8. Castle PE. Invited commentary: Is monitoring of human papillomavirus infection for viral persistence ready for use in cervical cancer screening? American Journal of Epidemiology. 2008;168(2):138-44.
9. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. International journal of cancer. 15 Feb 2011;128(4):927-35.
10. De Boer MA, Vet JNI, Aziz MF, Cornain S, Purwoto G, Van Den Akker BE, et.al. Human papillomavirus type 18 and other risk factors for cervical cancer in Jakarta, Indonesia. Int J Gynecol Cancer. 2006;16(5):1809-14.
11. Berek JS. Ovarian cancer: Novak's gynecology. 14th Edition. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
12. Castle PE, Sadorra M, Lau T, Aldrich C, Garcia FA, Kornegay J. Evaluation of a prototype real-time PCR assay for carcinogenic human papillomavirus (HPV) detection and simultaneous HPV genotype 16 (HPV16) and HPV18 genotyping. Journal of clinical microbiology. 1 Oct 2009;47(10):3344-7.
13. Park Y, Lee E, Choi J, Jeong S, Kim HS. Comparison of the Abbott realtime high-risk Human papillomavirus (HPV), Roche Cobas HPV, and Hybrid capture 2 assays to direct sequencing and genotyping of HPV DNA. Journal of clinical microbiology. 1 Jul 2012;50(7):2359-65.
14. World Health Organization. Human papillomavirus laboratory manual. Geneva; 2010.
15. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. BioMed Research International. 2009; p.1-10.
16. Olivier HM, Jenkins JA. Proper handling of animal tissues from the field to the laboratory supports reliable biomarker endpoints. Impacts of Oil Spill Disasters on Marine Habitats and Fisheries in North America. 2014;17:81.

17. Giuliani L, Coletti A, Syrjänen K, Favalli C, Ciotti M. Comparison of DNA sequencing and Roche Linear Array® in human papillomavirus (HPV) genotyping. Anticancer Research. 2006;26:3939-42.
18. Stevens MP, Garland SM, Tabrizi SN. Validation of an automated detection platform for use with the roche linear array human papillomavirus genotyping test. Journal of clinical microbiology. 2008;46(11):3813-16.
19. Abbott. Manual sample preparation using the ABBOTT sample preparation system DNA for Real-time High-risk HPV. List No. 03N92-01.
20. Flori P, Bellete B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, et.al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing pneumocystis jiroveci pneumonia from bronchoalveolar lavage spesimens. Journal of medical microbiology. 2004;53(7):603-07.
21. Lee SH. Detection of human papillomavirus (HPV) L1 gene DNA possibly bound to particulate aluminum adjuvant in the HPV vaccine Gardasil®. Journal of inorganic biochemistry. 2012;117:85-92.
22. Kalantari M, Osann K, Calleja-Macias IE, Kim S, Yan B, Jordan S, et al. Methylation of human papillomavirus 16, 18, 31, and 45 L2 and L1 genes and the cellular DAPK gene: considerations for use as biomarkers of the progression of cervical neoplasia. Virology. 2014;448:314-21.
23. De la Rosa GP, Monroy-García A, de Lourdes Mora-García M, Peña CG, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B, et al. An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice. Virology journal. 2009;6(1):2.
24. Jagu S, Kwak K, Garcea RL, Roden RB. Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or capsomeres to broaden protection against HPV infection. Vaccine. Jun 2010;28(28):4478-86.
25. Kelesidis T, Aish L, Steller MA, Aish IS, Shen J, Foukas P, et al. Human papillomavirus (HPV) detection using in situ hybridization in histologic samples. American journal of clinical pathology. 2011;136(1):119-27.
26. Dudding N, Crossley J. Sensitivity and specificity of HPV testing: what are the facts?. Cytopathology. 2013;24(5):283-8.