

**Identifikasi Molekuler Virus Papilloma Genital Pada Dua Spesies Primata di Fasilitas
Penangkaran Pusat Studi Satwa Primata-Institut Pertanian Bogor**
**(Molecular Identification Genital Papillomavirus in Two Primates Species at The
Breeding Facilities of Primate Research Centre-Bogor Agricultural University)**

Isti Kartika Sari, Irma H Suparto & Diah Iskandriati

Mayor Primatologi Sekolah Pasca Sarjana IPB.

Jalan Lodaya II no 5 Bogor 161515 Email istiks2003@yahoo.com

Memasukkan: Juli 2013, **Diterima:** Agustus 2013

Kanker serviks merupakan salah satu jenis kanker yang paling sering menyerang wanita, dan merupakan penyebab kematian terbesar kedua pada wanita setelah kanker payudara. Angka kematian akibat serangan kanker serviks di seluruh dunia mencapai 50% (250 kematian dari 500 kejadian) dari seluruh kasus kanker serviks per tahun. Hampir 80% diantaranya dialami oleh para wanita di negara-negara berkembang. Sejauh ini telah diketahui bahwa kanker serviks pada manusia terutama disebabkan oleh virus papilloma manusia (*Human Papilloma Virus/ HPV*) (Wilyman 2011). Virus papilloma merupakan virus DNA yang tidak berselubung, berukuran 8000 pasang basa dan akan menginfeksi lapisan basal epitel kulit dan kelamin melalui mikro abrasi. Genom virus akan berinteraksi dengan genom inang dan menyebabkan meningkatnya proliferasi sel, mencegah apoptosis dan menyebabkan diferensiasi sel menjadi keratinosit, sehingga juga dapat menyebabkan terbentuknya berbagai jenis kutil pada tangan, kaki, lidah, mulut, dan bibir. Pada keadaan yang lebih ganas, HPV dapat menyebabkan kutil kelamin pada penis, vagina, dan dubur. Virus ini dapat menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak normal yang disebut displasia. Kelainan ini akan berkembang menjadi *anal intraepithelial neoplasia* (AIN), kanker serviks atau kanker penis (Thoma 2010).

Para peneliti di seluruh dunia masih terus melakukan penelitian mengenai virus papilloma

dalam kaitannya dengan penyakit kanker serviks, termasuk pengembangan vaksin untuk pencegahan dan obat-obatan untuk penyembuhannya. Berbagai penelitian sejauh ini menemukan bahwa virus papilloma manusia tidak mungkin diinfeksi pada hewan model karena sifat interaksi virus tersebut dengan genom inangnya, sehingga memiliki sifat yang sangat khas untuk masing-masing spesies (*species specific*). Oleh karena itu, untuk mengetahui mengenai perilaku dan serangan virus tersebut dalam tubuh manusia, maka diperlukan hewan yang merupakan induk semang alami dari virus papilloma, yang memiliki kemiripan tinggi dengan manusia, baik dari segi genetik, fisiologi maupun anatomi, termasuk gen kanker. Wood *et al.* (2007) menyatakan bahwa diantara semua hewan model HPV, satwa primata adalah satu-satunya hewan yang mengembangkan *CIN* (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*), yaitu pembentukan sel yang tidak normal akibat adanya perubahan sel epitel basal skuamosa sama seperti yang terjadi pada infeksi virus papilloma beresiko tinggi. Oleh karena itu, satwa primata merupakan hewan model yang paling ideal untuk mempelajari HPV.

Untuk keperluan riset biomedis berbagai penyakit pada manusia tersebut, satwa primata dari genus *Macaca* banyak dijadikan sebagai satwa model. Terdapat 21 spesies primata yang termasuk dalam genus *Macaca* (Voevodin dan Marx 2009), dan tiga jenis diantaranya menjadi primadona dalam penelitian biomedis, yaitu monyet rhesus (*Macaca mulatta*), monyet ekor

Sari dkk.

panjang (*M. fascicularis*), dan beruk (*M. nemestrina*). Dua jenis terakhir masih memiliki populasi yang cukup besar di kawasan Asia Tenggara, dan tidak termasuk ke dalam hewan yang dilindungi di Indonesia. Kedua jenis tersebut juga diketahui memiliki kedekatan anatomi dan fisiologi dengan manusia. Penelitian ini menggunakan jenis *M. fascicularis* dan *M. nemestrina* sebagai hewan model untuk menelusuri kekerabatan virus papilloma yang menginfeksi kedua spesies tersebut, melalui proses identifikasi yang dilakukan secara molekuler. Penggunaan jenis *M. nemestrina* sebagai hewan model pada penelitian ini merupakan yang pertama dan satu-satunya di dunia, karena sejauh ini jenis tersebut tidak pernah digunakan sebagai hewan model untuk riset virus papilloma manusia.

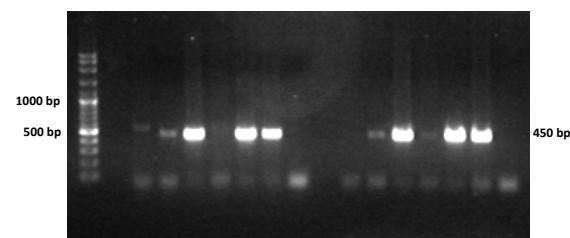
Sampel yang digunakan berasal dari ulasan serviks dari 238 *M. Fascicularis*/MEP dan 31 beruk betina dewasa berumur lebih dari M3/M3 atau lebih dari 6 tahun, dengan menggunakan *vaginal cytobrush* pada daerah serviks dan vagina. Pemilihan umur betina dewasa dilakukan berdasarkan pertimbangan bahwa hewan betina tersebut aktif secara seksual karena mikroabrasi pada dinding serviks biasanya terjadi saat aktivitas tersebut. Mikroabrasi mengakibatkan virus mudah masuk ke dalam lapisan basal epitel serviks. Aktivitas seksual juga mengakibatkan regenerasi sel epitel yang lebih cepat untuk menggantikan sel-sel epitel yang terbuang. DNA virus yang terdapat dalam sel epitel serviks diekstraksi dan diuji keberadaannya secara molekuler dengan teknik PCR. Sample tersebut disimpan dalam media TEN Buffer (2 ml Tris HCl 1M pH 7.5; 0.2 ml EDTA 0.5M; 0.2 ml NaCl 5M dan 97.6 ml akuades). DNA dari sampel dan kontrol positif diekstraksi dengan menggunakan QIAmp DNA Blood mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) sesuai dengan petunjuk perusahaan.

Selanjutnya dilakukan amplifikasi untuk region L1 dengan teknik PCR. Reagen mastermix PCR yang terdiri dari 1 μ l primer forward Mac26.

MY11 5' GCCCAAGGCCACAACAATGG3' dan reverse Mac26. MY09 5' CGACCCAAGGGA AACTGGTC3', 12,5 μ l Go *Taq green mastermix* (Taq DNA Polymerase, dNTP, MgCl dan bufer perekusi), 5,5 μ l *free nuclease water* dan 5 μ l DNA hasil ekstraksi. Amplifikasi dengan menggunakan mesin PCR Perkin Elmer tipe 9700. Hasil amplifikasi DNA divisualisasikan dengan gel agarosa 1,8% dan dibaca dengan mesin gel dock (Biorad). Hasil positif ditentukan dengan kontrol positif dari sel HeLa dan marker Vivantis 100 bp.

Gambar 1 menunjukkan bahwa berdasarkan hasil PCR pada daerah L1, sampel yang positif terhadap virus papilloma, baik MEP maupun beruk, dapat teramplifikasi dengan baik oleh primer Mac MY26 11 dan Mac MY26 09.

Kemudian dilakukan pembanyakatan pada sampel positif menjadi 150 μ l produk PCR, divisualisasikan kembali pada 1% gel agarosa. Setelah itu dilakukan pemotongan gel tepat pada bagian gel yang memiliki pita berpendar saat diradiasi oleh sinar UV. Potongan gel hasil amplifikasi kemudian dipurifikasi dengan menggunakan kit ekstraksi gel, sesuai dengan prosedur dari *QIAquick gel extraction kit* dari Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany). Hasil purifikasi produk PCR tersebut selanjutnya dirunutkan di Macrogen Inc, Korea. Peruntutan nukleotida adalah suatu proses penentuan susunan nukleotida pada suatu fragmen DNA yang bertujuan untuk mengetahui jenis virus papilloma yang menginfeksi kedua spesies satwa primata.



Gambar 1. Elektroforegram terhadap 8 dari 238 sampel *Macaca fascicularis* (Mf) dan 3 dari 31 sampel *Macaca nemestrina* (Mn). (1) marker Vivantis 100 bp; (2), (5), (8) sampel negatif Mf; (3), (4), (6), (7) sampel positif Mf; (9) sampel negatif Mn; (10), (11), (12) sampel positif Mn; (13), (14) kontrol positif sel HeLa; dan (15) kontrol negatif Mastermix.

Hasil runutan nukleotida dari daerah L1 berkaitan erat dengan perbedaan jenis dan tipe virus papilloma berdasarkan keragaman molekuler serta berperan dalam pembentukan pohon filogenetik. Pensejajaran sekuen nukleotida virus papilloma daerah L1 untuk membentuk pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Clustal W dan Mega 5.1. Pohon filogenetik dari virus papilloma dianalisis dengan metode *neighborjoining* dan menggunakan runutan DNA virus papilloma pembanding yang berasal dari bank gen.

Berdasarkan hasil identifikasi virus dengan menggunakan teknik PCR pada sampel ulasan serviks, angka kejadian infeksi virus papilloma pada *M. fascicularis* di fasilitas penangkaran PSSP-IPB adalah 32,7% (78/238). Hasil ini sejalan dengan beberapa penelitian lain yang menunjukkan bahwa infeksi virus papilloma genital pada *M. fascicularis* dan *M. mulatta* berkisar pada angka 25-35%. Identifikasi virus papilloma secara molekuler di fasilitas Wake Forest University menghasilkan angka sebesar 35% pada *M. fascicularis* betina dan 29% pada monyet rhesus betina (Wood *et al.*, 2007). Sementara itu, angka kejadian infeksi virus papilloma pada *M. fascicularis* betina dewasa yang diimpor dari Cina dan Indonesia adalah sebesar 24,9% (Chen *et al.* 2007). Deteksi molekuler pada *M. mulatta* juga menunjukkan hasil sebesar 29% yang terinfeksi (Ostrow *et al.* 1990).

Pada *M. nemestrina*, angka kejadian infeksi virus papilloma jauh lebih kecil dibandingkan dengan kedua jenis lainnya, yaitu hanya sebesar 12% (4/31). Sejauh ini belum ada penelitian lain yang dapat digunakan sebagai pembanding

Secara umum, perbandingan deduksi urutan asam amino dari L1 kapsid sampel virus papilloma menunjukkan kemiripan yang sangat tinggi, yaitu antara 76 - 100% dengan perbandingan pada virus papilloma yang menginfeksi sampel *M. nemestrina* Mn 5434 menunjukkan tingkat homologi sebesar 76% dengan HPV tipe 52, yang diketahui berisiko tinggi untuk menjadi kanker serviks. Informasi ini sangat penting karena selama ini penelitian untuk

vaksin dan pencegahan kanker serviks lebih banyak ditujukan pada HPV tipe 16 dan 18 yang banyak menyerang wilayah Asia, Afrika Utara, Eropa dan Amerika Utara; sementara kanker serviks yang

Tabel 1. Hasil pensejajaran daerah L1 sampel dibandingkan tingkat homologinya dengan tipe virus papilloma yang ada di Bank Gen.

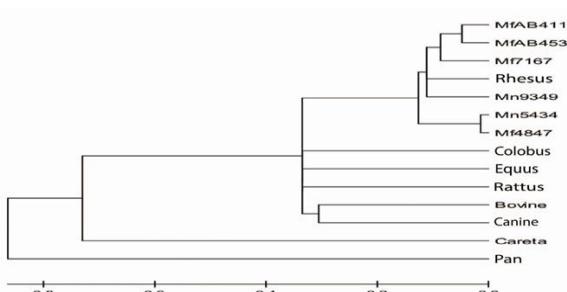
Sampel	(%)	Tipe Papilloma	Nomor Akses
Mf AB411	83	<i>M. fascicularis</i> papillomavirus tipe 7 Mac 18 genom lengkap	EF 558838.1
	84	Rhesus virus papilloma stran a-L1 partial CDS	U89656.1
Mf AB4847	99	<i>M. fascicularis</i> papillomavirus tipe 4 Mac 54 genom lengkap	EF 558841.1
	76	<i>M. fascicularis</i> papillomavirus tipe 52 Isolate QU07294	EF 558841.1
Mf 7616	100	<i>M. fascicularis</i> papillomavirus tipe 3 Mac 52 genom lengkap	EF 558839.2
	98	<i>M. fascicularis</i> papillomavirus tipe 36 Isolate MOC 171	EF 591299.1
Mf AB453	98	<i>M. fascicularis</i> papillomavirus tipe 9 Isolate Mac 592 genom	EU 490516.1
	87	<i>M. fascicularis</i> papillomavirus tipe 5 Mac 76 genom lengkap	EF 558843.1
Mn 9439	83	<i>M. fascicularis</i> papillomavirus tipe 5 Mac 76 genom lengkap	EF 558843.1
	82	<i>M. fascicularis</i> papillomavirus tipe 9 isolate genom lengkap	EU 490576.1
Mn 5434	99	<i>M. fascicularis</i> papillomavirus tipe 4 Mac 54 genom lengkap	EF 558841.1
	76	Human virus papilloma tipe 52 isolate 7294 genom lengkap	HQ 537751.1

Sari dkk.

disebabkan oleh HPV tipe 52 dan 58 lebih banyak terjadi di wilayah Asia Timur, meliputi Jepang dan Cina (Takehara *et al.* 2011). Di Hongkong dan Taiwan, misalnya, hasil penelitian pada 4.383 wanita menunjukkan tingkat kejadian infeksi HPV berisiko tinggi sebesar 63% disebabkan oleh tipe 52 dan 58, sementara tipe 16 dan 18 hanya menginfeksi 30% (ostrow *et al.* 2005). Dengan demikian, hasil penelitian ini membuka prospek pengembangan vaksin yang berasal dari HPV tipe 52 dan 58.

Hasil pembentukan pohon filogenetik menunjukkan bahwa seluruh sampel yang berasal dari fasilitas hewan PSSP-IPB berada dalam satu *cluster*, sehingga mereka dekat secara kekerabatan dan masih saling berhubungan. Berdasarkan data molekuler, seluruh sampel tersebut berada dalam Famili *Papillomaviridae*, Genus *Alpha papillomavirus*, yang merupakan genus terbesar dalam klasifikasi virus papilloma penyebab lesi/kutil pada lapisan epitel mukosa maupun kulit. Genus ini terdiri dari virus papilloma yang berisiko tinggi maupun rendah, termasuk didalamnya HPV tipe 16, 31, 33, 35, 52, 58 dan 67 yang merupakan penyebab kanker serviks pada manusia.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa secara molekuler, satwa primata, khususnya genus *Macaca*, dapat digunakan sebagai hewan model untuk penelitian penyakit kanker serviks pada manusia. Kemajuan teknik PCR telah memungkinkan penapisan dengan cepat untuk mendeteksi hewan yang terinfeksi atau tidak terinfeksi. Analisis hasil



Gambar 2. Pohon filogenetik virus papilloma dengan virus pembandingnya dari bank gen, angka pada garis horisontal menunjukkan persentasi jarak waktu perubahan genetiknya.

PCR dari virus papilloma genital *M. fascicularis* betina menunjukkan bahwa spesies tersebut merupakan inang alami dari virus papilloma genital yang terkait dan memiliki keragaman genetik yang mirip dengan HPV Selain itu, *M. fascicularis* juga menunjukkan tanda-tanda penebalan sel epitel pada lapisan skuamosa serviks dan vagina yang dapat berkembang menjadi kanker/karsinoma serviks dan penis. Transmisi virus melalui hubungan seksual, seperti yang terjadi pada manusia, menunjukkan bahwa genus *Macaca* dapat menjadi model yang berharga untuk mempelajari HPV (Gardner dan Luciw 2008). Penelitian ini juga memberikan pengetahuan terbaru mengenai adanya kaitan yang erat antara virus papilloma yang menginfeksi manusia dengan virus yang menginfeksi satwa primata, khususnya HPV tipe 52 yang ditemukan pada sampel *M. nemestrina* MN 5434. Secara aplikatif, hasil penelitian ini juga membuka prospek pengembangan vaksin HPV tipe 52 yang banyak menyerang wanita di kawasan Asia Timur dengan menggunakan *M. nemestrina* sebagai hewan modelnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Chan, SY., HU. Bernard, M. Ratterree, A. Bikerbak, AJ. Faras, & RS. Ostrow. 1997. Genomic diversity and evolution of papillomaviruses in rhesus monkey. *J Virol* 71(7): 4938–4943.
- Chen, Z., M. Schiffman, R. Herrero, R. Desalle, & RD. Burk. 2007. Human papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses. *J Virol*. 360(2):447-53.
- Gardner, BM. & PA. Luciw. 2008. Macaque models of human infectious disease, *ILAR J.* 99 (2): 220-5.
- Lin, H., YY. Ma, JS. Moh, YC. Ou, YC. Shen, & CC. Chang Chien. 2006. High prevalence of genital human papillomavirus type 52 and 58 infection in women attending gynecologic

- practitioners in South Taiwan. *J Gynecol Oncol* 101:40 – 45.
- Ostrow, RS., MR. McGlennen, MK. Shaver, BE. Kloster, D. Houser, & AJ. Faras. 1990. A rhesus monkey model for sexual transmission of a papillomavirus isolated from a squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci*.87:8170-8174.
- Takehara, K., T. Toda, T. Nishimura, J. Sakane, Y. Kawakami, T. Mizunoe, M. Nishiwaki, & K.Taniyama. 2011. Clinical study human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in uterine cervical squamous lesions from Japanese women. *Pathology Research International*. Vol 2011, Article ID 246936. 7 pages. doi:10.4061/2011/246936.
- Thoma, SR. 2010 *Human Papillomavirus*. Jogjakarta (ID): Universitas Sanata Dharma Pr.
- Voevodin, AF. & PA. Marx. 2009. *Simian Virology*. New Delhi: Wiley-Blackwell
- Wood, CE., Z. Chen, JM. Cline, BE. Miller, & RD. Burk. 2007. Characterization and experimental transmission of an oncogenic papillomavirus in female macaques. *J Virol*. 81/12: 6339-6349.
- Wilyman, J. 2011 The Pathogenesis of Human Papillomavirus (HPV) in the development of cervical cancer [internet] BSEM March 2011. The Health Hazards of Disease Prevention [diunduh pada 2012 Sept 20] tersedia pada: <http://www.ecomed.org.uk/wp-content/uploads/2011/09/6-wilyman.pdf>.