

OPTIMASI DETEKSI GEN E6 PADA HUMAN PAPILLOMAVIRUS RISIKO TINGGI DENGAN *POLYMERASE CHAIN REACTION*

I G A Aristi Dhika Pranani.¹, Made Agus Hendrayana², Komang Januartha P. Pinatih.³

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

^{2,3}Departemen Mikrobiologi Klinis Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Jalan PB Sudirman, Denpasar, Bali

Email: gustyadhip15@gmail.com

ABSTRAK

Kanker servik merupakan jenis kanker pada wanita dengan angka kejadian terbesar keempat di dunia. Infeksi oleh *human papillomavirus* (HPV) adalah salah satu faktor penyebab kanker servik. HPV memiliki gen E6 yang berperan dalam patogenesis kanker servik, sehingga dijadikan target deteksi. Maka dari itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi HPV secara cepat dan akurat secara molekular menggunakan teknik *polimerase chain reaction* (PCR). Metode yang digunakan adalah metode optimasi pada suhu penempelan DNA (*annealing*). Pada penelitian ini dilakukan optimasi deteksi pada gen E6 dari DNA HPV tipe 16. Optimasi dilakukan dengan menggunakan tiga variasi suhu *annealing*. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini yaitu suhu *annealing* optimal untuk mengamplifikasi gen E6 pada HPV tipe 16 adalah 55°C - 59°C. Hasil optimasi suhu *annealing* tersebut memberikan hasil pita yang tebal dan spesifik sebesar 476 bp sesuai dengan ukuran pita gen E6 pada HPV tipe 16.

Kata Kunci: deteksi, optimasi PCR, *Human Papillomavirus*, kanker servik

ABSTRACT

Cervical cancer is 4th largest cancer incidence rate in women in the world. One of the causing factor of cervical cancer is infected by *human papillomavirus*. The oncoprotein E6 of HPV has a role in the progression of cervical cancer, making it a target for detection. The goals from this reasearch is to detect of HPV rapidly and accurately by using *polymerase chain reaction* (PCR) technique. We use the method of optimization of PCR annealing temperature on E6 genes from DNA HPV type 16. Optimization was performed using three variations of the attached DNA temperature (*annealing*). The results obtained from this study are the most optimal annealing temperature to amplify the E6 gene on HPV type 16 is 55°C - 59°C. The optimization results give thick and specific band result of 476 bp according to the band size of E6 HPV gene.

Keywords: detection, PCR optimization, *Human Papillomavirus*, cervical cancer

PENDAHULUAN

Kanker servik merupakan salah satu penyakit yang termasuk pada penyakit menular secara seksual.¹ Di dunia, kanker berkontribusi sebagai penyebab mortalitas tertinggi kedua sebanyak 13% dari keseluruhan 22% mortalitas disebabkan penyakit tidak menular.² Diseluruh dunia, kanker servik adalah jenis kanker pada wanita dengan angka kejadian terbesar keempat. Sebanyak 527.624 kasus kanker servik baru ditemukan, dengan angka kematian sebanyak 265.672 kasus setiap tahunnya. Kasus kanker servik dengan angka kejadian tertinggi ditemukan di negara berkembang.³ Di wilayah Asia Tenggara, kasus kanker servik sebanyak 50.566, dengan angka kematian sebanyak 23.989 kasus

setiap tahunnya. Di negara berkembang, kanker servik merupakan kanker terbanyak kedua setelah kanker payudara dengan jumlah kasus sebanyak 445.000.⁴ Persoalan mengenai kanker di Indonesia adalah sekitar 70% pasien kanker servik merupakan pasien kanker stadium lanjut.² Infeksi *Human Papillomavirus* (HPV) merupakan penyebab utama kejadian kanker servik, disamping adanya ko-faktor yang lain, seperti : merokok, peningkatan jumlah pasangan seksual, dan penggunaan kontrasepsi secara oral.^{5,6}

Pada proses infeksi oleh HPV gen onkogen E6 berperan utama dalam patogenesis kanker. Onkogen E6 berperan dalam mengganggu siklus sel melalui inaktivasi *tumor*

suppressor protein, yaitu p53, serta memfasilitasi replikasi virus.⁷ Terjadi perubahan pada sel epitel servik dimana siklus sel normal terganggu dan menghasilkan sel yang abnormal yang mengandung materi genetik virus.⁸ Ekspresi berlebihan dari gen E6 sangat berkaitan dengan perkembangan kanker serviks.⁹ Karena perannya yang sentral dalam pathogenesis HPV, gen E6 sering digunakan sebagai target deteksi, terapi dan pengembangan vaksin.

Pendekatan dalam mendeteksi pajanan HPV adalah secara biologi molekuler menggunakan PCR. Pemeriksaan dengan PCR memiliki akurasi yang tinggi dan dapat menentukan sampai pada tingkat gen.¹⁰ Optimasi PCR pada gen E6 pada HPV tipe 16 dilakukan agar deteksi HPV dapat dilakukan dengan lebih cepat dan penanganan medis lebih lanjut dapat dilakukan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan sampel berupa DNA HPV tipe 16 yang terisolasi dari jaringan kanker servik. Pada proses PCR menggunakan PCR *mix* yang terdiri dari *Promega Master Mix*, primer E6 *forward*: 5'-GAA ACC GGT TAG TAT AAA AGC AGA C-3', primer E6 *reverse*: 5'-AGC TGG GTT TCT CTA CGT GTT CT-3'¹¹, H₂O, dan *template* DNA. Bahan untuk proses elektroforesis berupa gel agarosa 1,5%, TBE 1x dan *marker* berukuran 100 bp.

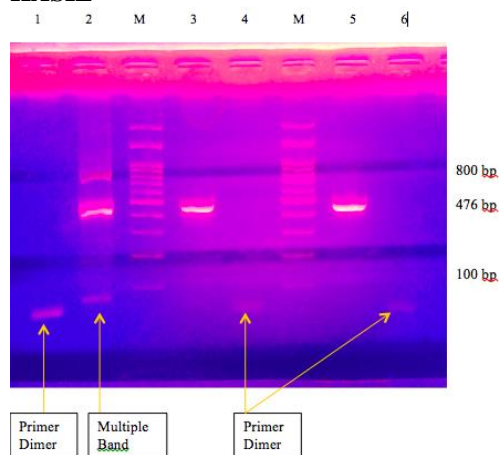
Amplifikasi Gen E6 HPV tipe 16

Pada amplifikasi gen E6, campuran PCR yang digunakan memiliki volume total 10 μ l. Formulasi PCR dilakukan dengan mencampurkan *Promega Master Mix* 5 μ l, masing-masing primer 0.5 μ l, DNA *template* 0.5 μ l, dan H₂O 3.5 μ l.

Proses optimasi PCR yang pertama dilakukan dengan tahap pra denaturasi suhu 95°C dalam 2 menit, denaturasi suhu 95°C dalam 1 menit, penempelan primer dalam 45 detik dengan suhu 53°C, pemanjangan primer (*extension*) suhu 72°C selama 1 menit, *final extension* suhu 72°C selama 5 menit. Pengulangan siklus dilakukan sebanyak 35 kali. PCR kedua menggunakan suhu penempelan primer (*annealing*) 55°C dengan proses lainnya sama dengan PCR pertama. PCR ketiga menggunakan suhu *annealing* 59°C dengan proses lainnya sama dengan PCR pertama. *Running* PCR menggunakan 2 *tube* : 9,5 μ l untuk *tube* 1 ditambahkan sample DNA 0,5 μ l dan 9,5 μ l untuk *tube* 2 sebagai kontrol negatif.

Hasil produk PCR divisualisasikan dengan menggunakan teknik elektroforesis untuk melihat keberhasilan dari amplifikasi gen. Elektroforesis dilakukan dengan gel agarosa 1,5% (dalam TBE 1x) yang diwarnai dengan *Gelred* 1 μ l. *Running* elektroforesis dilakukan dengan TBE *buffer* 0.5x pada tegangan 100 Volt selama 35 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan dengan *transiluminator ultra violet*. Produk PCR Gen E6 normal adalah berukuran 476 bp.

HASIL



Gambar 1. Produk PCR Hasil Amplifikasi Gen E6 HPV Tipe 16

Pada gambar 1 produk PCR gen E6 HPV tipe 16 menggunakan suhu *annealing* 53°C (1 sebagai kontrol negatif, 2 sebagai sampel), 55°C (3 sebagai sampel, 4 sebagai kontrol negatif), dan 59°C (5 sebagai sampel, 6 sebagai kontrol negatif) yang dielektroforesis pada 1,5% gel agarosa; M sebagai Marker DNA ladder 100bp. Pita DNA menunjukkan hasil yang positif pada ketiga variasi suhu yang digunakan, seperti ditunjukkan pada gambar 1 lane 2, 3, dan 5. Pada kondisi suhu 53°C, masih terdapat gambaran *multiple band* pada produk hasil PCR. Pada suhu 55°C, dan 59°C yang memberikan gambaran pita DNA tebal dan spesifik berukuran 476 bp. Pada lane 1, 4, dan 6 (kontrol negatif) dari masing masing suhu 53°C, 55°C, dan 59°C, memperlihatkan pita primer dimer pada produk hasil PCR.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil visualisasi produk PCR, pada suhu 53°C (lane2), masih terdapat gambaran *multiple band* DNA yang berukuran selain 476 bp. Hal ini disebabkan oleh suhu *annealing* yang rendah, sehingga primer menempel *template* DNA lainnya.¹² Pada lane 1,4, dan 6 terdapat produk pita tidak spesifik yang disebut primer dimer yang disebabkan oleh

tidak adanya DNA yang dicampurkan atau tingginya konsentrasi primer yang digunakan.¹²

Gambar 1 lane 3 dan 5 memperlihatkan visualisasi produk PCR pada suhu 55°C dan 59°C tampak sangat jelas dan memiliki ukuran pita yang sesuai. Hasil ini berkaitan dengan penelitian Pande yang menggunakan suhu *annealing* yang sama yaitu 55°C.¹¹ Pertimbangan lainnya adalah perhitungan suhu *annealing* berdasarkan suhu leleh (Tm) primer. Berdasarkan perhitungan Tm dengan rumus; $Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$ didapatkan Tm F sebesar 70°C dan Tm R sebesar 68°C. Tm akhir primer sebesar 69°C. Suhu *annealing* yang digunakan umumnya 10°C dibawah Tm primer yaitu 59°C.

Produk PCR yang menggunakan suhu *annealing* 55°C dan 59°C menunjukkan panjang basa berukuran 476 bp. Pada penelitian ini, hasil optimasi gen menunjukkan pada suhu 55°C - 59°C memberikan amplifikasi yang terbaik sehingga menghasilkan pita amplifikasi gen E6 HPV tipe 16 yang tebal dan spesifik.

SIMPULAN

Suhu *annealing* optimal untuk mengamplifikasi gen E6 pada HPV tipe 16 adalah 55°C - 59°C.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther* 2011; **11**: 295–306.
- 2 Oemiati R, Rahajeng E, Kristanto AY. Di Indonesia penyakit. *Badan Penelit dan Pengemb Kesehatan, Kementrian Kesehat Indones* 2011.
- 3 Human Papillomavirus and Related Diseases Report. *J Infect Dis* 2016; **202**: 1789–1799.
- 4 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M *et al*. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; **136**: E359–E386.
- 5 Gómez DT, Santos JL. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer : Pathogenesis and Epidemiology. *Appl Microbiol* 2007; : 680–688.
- 6 Wang SS, Zuna RE, Wentzsen N, Dunn ST, Sherman ME, Gold MA *et al*. Human papillomavirus cofactors by disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; **18**: 113–120.
- 7 Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Nguyen CL, Owens M, Huh K *et al*. Mechanisms of Human MINIREVIEW Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virol* 2004; **78**: 11451–11460.
- 8 World Health Organization. Comprehensive cervical cancer prevention and control : a healthier future for girls and women. *World Heal Organ* 2013; : 1–12.
- 9 Monsonego J, Cox JT, Behrens C, Sandri M, Franco EL, Yap PS *et al*. Prevalence of high-risk human papilloma virus genotypes and associated risk of cervical precancerous lesions in a large U.S. screening population: Data from the ATHENA trial. *Gynecol Oncol* 2015; **137**: 47–54.
- 10 Kocjan BJ, Bzhalava D, Forslund O, Dillner J, Poljak M. Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. *Clin Microbiol Infect* 2015; **21**: 808–816.
- 11 Pande S, Jain N, Prusty BK, Bhambhani S, Gupta S, Sharma R *et al*. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in North India. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 1060–1066.
- 12 Gonzalez-Martinez A, Rodriguez-Sanchez A, Rodelas B, Abbas BA, Martinez-Toledo MV, Van Loosdrecht MCM *et al*. 454-Pyrosequencing Analysis of Bacterial Communities from Autotrophic Nitrogen Removal Bioreactors Utilizing Universal Primers: Effect of Annealing Temperature. *Biomed Res Int* 2015; **2015**.doi:10.1155/2015/892013.