

Analisis Filogenetik Gen L1 *Human Papillomavirus* 16 pada Penderita Kanker Serviks di Bandung

Fitri Rahmi Fadhilah,¹ Edhyana Sahiratmadja,^{2,3} Ratu Safitri,¹ Ani Melani Maskoen,^{2,3} Herman Susanto^{2,4}

¹Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran, ²Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, ³Pusat Studi Onkologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, ⁴Departemen Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

Abstrak

Infeksi *human papillomavirus* (HPV) tipe *high risk* (hr) yang kronik dapat menyebabkan kanker serviks. Berbagai genotipe hrHPV telah teridentifikasi dan HPV-16 merupakan genotipe yang tersering menginfeksi serviks. Fragmen L1 HPV dapat digunakan untuk mengidentifikasi asal usul HPV. Tujuan penelitian ini adalah mengeksplorasi asal usul HPV-16 dengan membuat pohon filogenetik. Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif analisis. Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler Unit Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung pada Februari hingga Agustus 2013. Isolat biopsi dari pasien kanker serviks disumbangkan oleh Departemen Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung. Isolasi DNA dibuat dari biopsi jaringan kanker serviks dan fragmen L1 diamplifikasi dengan desain primer sendiri. Infeksi dengan HPV-16 dikonfirmasi dengan *Linear Array test* (Roche). Sekuens urutan basa kemudian dimasukkan dalam program filogenetik (MEGA5). Hasil konstruksi menunjukkan isolat pasien kanker serviks dari Bandung berada dalam satu subgrup dengan HPV asal Asia dan Asia Timur. Simpulan, *cluster* HPV Indonesia berada pada galur Asia dan Asia Timur. [MKB. 2015;47(3):174-78]

Kata kunci: Filogenetik, fragmen L1, *human papillomavirus* 16 (HPV-16)

Phylogenetic Analysis of Human Papillomavirus 16 L1 Gene from Cervical Cancer Patient in Bandung

Abstract

Chronic infection with high-risk (hr) human papillomavirus (HPV) can lead to cervical cancer. Various hrHPV genotypes have been identified and HPV genotype 16 is the most common genotypes that infect cervical cancer. HPV L1 fragment can identify the origin of HPV. The purpose of this study was to explore the origins of HPV-16 by making a phylogenetic tree. This study used analytical descriptive method and was conducted at the Laboratory of Molecular Genetics, Health Research Unit, Faculty of Medicine, Universitas Padjadjaran Bandung in the period of February to August 2013. Biopsy from cervical cancer patient was donated by the Department of Obstetrics, Faculty of Medicine, Universitas Padjadjaran, Bandung. Isolation of DNA was prepared from tissue biopsies of cervical cancer and L1 fragment was amplified with the specific primer. Infection with HPV-16 was confirmed by *Linear Array test* (Roche) design. The sequence then was constructed using the phylogenetic program (MEGA5). Results showed that the isolate from patient with cervical cancer from Bandung was in one subgroup with HPV from Asia and East Asia. In conclusion, cluster HPV of Bandung is in the same strain as the strain in Asia and East Asia. [MKB. 2015;47(3):174-78]

Key words: *Human papillomavirus* 16 (HPV-16), L1 fragment, phylogenetic

Korespondensi: Edhyana Sahiratmadja, dr., PhD, Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Jatinangor-Sumedang Km 21 Jatinangor, Sumedang, *mobile* 0816996309, *e-mail* edhyanas@yahoo.com

Pendahuluan

Kanker serviks merupakan penyakit kanker kedua tertinggi yang menyerang wanita setelah kanker payudara di seluruh dunia. Menurut GLOBOCAN pada tahun 2008, kasus kanker serviks di seluruh dunia tercatat sekitar 529.800 kasus baru dan 275.100 kematian yang terjadi setiap tahun. Hampir 80% kasus terjadi di negara berkembang dengan kasus 453.300 kasus baru dan 242.000 kematian.¹ Di Indonesia, kanker serviks merupakan kanker yang paling umum pada wanita, dengan kejadian diperkirakan 9.25 per 100.000 wanita per tahun.²

Human papillomavirus (HPV) merupakan penyebab kanker serviks. Telah ada beberapa studi molekular dan observasi klinik yang melibatkan HPV sebagai agen etiologi dalam berbagai kanker, termasuk serviks.³

Genom HPV terdiri atas satu molekul DNA beruntai ganda, melingkar yang berisi sekitar 7.200–8.000 *base pair*. Genom fungsional dibagi menjadi *long control region* terdiri atas 400–1.000 bp, *early protein open reading frame* (ORF) yaitu E1, E2, E4, E5, E6, dan E7, *late protein* L1 dan L2 untuk pembentukan kapsid virus. Amplop virus pada dasarnya tersusun atas 360 salinan protein L1, yaitu protein utama kapsid yang diatur dalam 72 subunit identik dikenal sebagai pentamers atau kapsomer. Kapsid minor yaitu protein L2 terletak di pusat kapsomer dan berkontribusi terhadap penularan HPV yang terlibat dalam replikasi virus dan onkogenesis.⁴

Sekuens gen L1 dapat digunakan untuk mengklasifikasikan isolat HPV tersebut.³ Komite Nomenklatur *Papillomavirus* telah menetapkan bahwa genom HPV diklasifikasikan menjadi varian molekular apabila mempunyai kesamaan lebih dari 98% terhadap urutan L1 prototipe gen.^{3,5} Secara evolusi, HPV diidentifikasi berasal dari Afrika.⁶

Tujuan penelitian ini adalah menelusuri asal usul HPV-16 isolat Bandung dengan membuat pohon filogenetik dan optimasi metode untuk menganalisis filogenetik tersebut.

Metode

Penelitian merupakan bagian dari penelitian *Working Group* Onkologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Sediaan biopsi kanker serviks yang telah disimpan dari penelitian sebelumnya dipergunakan untuk dibuat sediaan DNA. Secara singkat, penelitian diawali dengan preparasi sampel biopsi dari pasien kanker

serviks dari Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung. Sampel yang digunakan pada metode penelitian ini yaitu satu isolat. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Genetika Molekular Unit Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung pada Februari hingga Agustus 2013. Isolasi DNA sampel pasien kanker serviks menggunakan protokol yang berlaku (*linear array HPV genotyping test*). Izin etik untuk penelitian ini diberikan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Nomor 154/FKUP-RSHS/KEPK/Kep./EC/2010. Desain primer dilakukan dengan menggunakan data *genbank* dari www.ncbi.nlm.nih.gov/.

Isolat DNA HPV-16 yang telah teridentifikasi diamplifikasi menggunakan primer yang didesain sendiri untuk mendapatkan fragmen L1 HPV-16. Kondisi *Touchdown* PCR adalah denaturasi awal 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 57° (10 siklus), 57°C ke 47° (10 siklus), dan 47°C selama 30 detik (10 siklus) yang dilanjutkan dengan siklus ekstensi 72°C selama 2 menit, serta ekstensi akhir 72°C selama 10 menit. Pencitraan hasil PCR dengan elektroforesis dilakukan menggunakan alat elektroforesis pada gel agarosa 1%.

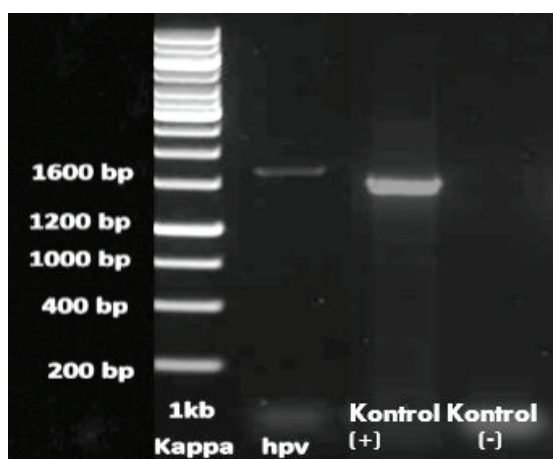
Hasil PCR diproses melalui proses sekuensing untuk mendapatkan sekuens urutan basa nitrogen dari DNA L1 HPV 16. Analisis data hasil sekuens menggunakan *software bioedit* (version 7.0.4.1), *nucleotide BLAST*, dan *CLC Main Workbench* 5.0. Untuk konstruksi filogenetik menggunakan *software* dan MEGA 5 sehingga dapat disusun pohon filogenetiknya. Pohon filogenetik yang dibuat mengacu kepada HPV 16 dan dianalisis hubungan kekerabatannya dengan membandingkan deretan basa nitrogen dari gen L1 HPV-16 isolat asal pasien kanker serviks Bandung dengan negara-negara lain.

Hasil

Dari hasil penelusuran program dalam membuat desain primer untuk L1 HPV-16, diperoleh tiga primer (Tabel 1). Dari hasil amplifikasi mempergunakan primer *forward* dan *reverse* didapatkan bahwa fragmen sepanjang 1.600 bp (Gambar 1). Fragmen L1 HPV-16 kemudian disekuens namun pada hasil *direct sequencing* hanya diperoleh panjang fragmen sepanjang 1.440 bp. Hasilnya dimasukkan dan diolah dalam program *CLC Main Workbench* 5.0 dan MEGA5. Hasil pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat DNA dari Bandung memiliki kekerabatan

Tabel 1 Primer untuk L1 HPV-16

Forward	5'-CAATTATTGCTGATGCAGGTGACT-3'
Nested-forward	5'-GTAGGTCGTGGTCAGCCATTA-3'
Reverse	5'-CTTACAGCTTACGTTTTTTTGCG-3'



Gambar 1 Gambaran Elektroforesis Hasil Produk *Polymerase Chain Reaction* L1 HPV 16

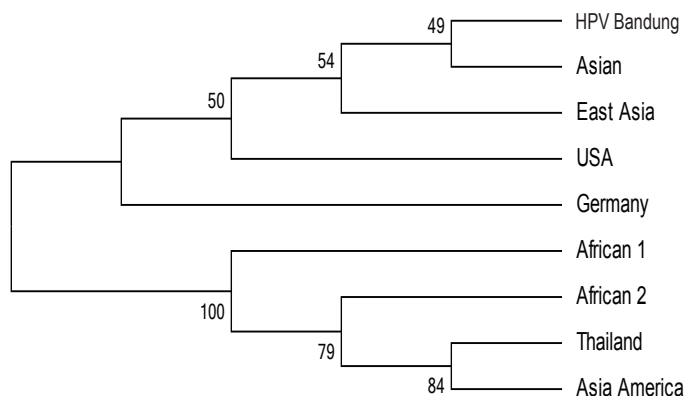
dalam subgrup Asia dan Asia Timur (Gambar 2).

Pembahasan

Dalam percobaan ini telah teridentifikasi berbagai genotipe HPV. Dari penelitian terdahulu HPV-16 adalah tipe yang paling sering menginfeksi pada kasus kanker serviks di Bandung, diikuti dengan HPV-18, HPV-45, dan HPV-52.⁷

Distribusi HPV di dunia berbeda-beda. Variasi HPV 16 dapat diklasifikasikan secara filogenetis dan terdistribusi di lima benua dan dalam kelompok etnis yang berbeda. Varian ini termasuk Eropa (**E**), Asia (**As**), Asia-Amerika (**AA**), yang juga mencakup varian Amerika Utara (**NA1**), varian jenis African 1 (**AF1**) dan jenis 2 (**AF2**).⁸ Untuk HPV 18, varian yang berbeda telah didefinisikan sebagai varian Asia-Amerika (**AA**), Afrika (**Af**), dan Eropa (**E**).⁹ Analisis variabilitas HPV ini telah digunakan sebagai alat penting dalam studi epidemiologi yang dirancang untuk menentukan pola penularan virus, persistensi virus, dan perkembangan lesi serviks klinis yang relevan. Sampai saat ini, masih belum banyak dipelajari data mengenai variasi gen *L1 HPV 16* terutama di Indonesia.

Di Indonesia, varian dalam urutan nukleotida HPV 16 asal Indonesia ditemukan sebagai varian Jawa karena berhubungan dengan penderita kanker serviks yang berasal dari etnis Jawa. Varian Jawa mengandung beberapa perubahan pada susunan nukleotida, yaitu pada C6828T (regio L1 ORF), G666A (regio E7 ORF), dan dalam jumlah proporsi yang cukup besar dijumpai A276G pada region E6. Variasi pada region E6 ini bahkan dapat menyebabkan perubahan asam amino yang dibentuknya, yaitu N58S.¹⁰ Penelitian varian HPV di Indonesia merupakan studi pertama dan terdapat kemungkinan besar



Gambar 2 Pohon Filogenetik Basa Nitrogen L1 HPV 16 dengan Metode *Neighbour-Joining Phylogenetic Tree* MEGA 5

varian ini akan dijumpai juga di daerah-daerah lain di Indonesia. Varian Jawa ini berdasarkan atas pembagian cabang filogenetik merupakan cabang dari varian Eropa (Mayor).

Pada studi ini, dilakukan penelitian mengenai L1 HPV 16 yang melibatkan pasien kanker serviks asal Bandung sebagai ibukota di Jawa Barat. Sampel pasien diperiksa secara diagnostik dan terbukti mengidap kanker serviks. Karena isolat berasal dari satu pasien, perlu dilakukan studi lanjutan untuk memperoleh distribusi variasi L1 itu berdasarkan etnik di seluruh Indonesia sehingga distribusi dapat dilihat asal usuhnya.

Langkah awal untuk melacak keberadaan gen spesifik L1 HPV 16 yaitu dengan melakukan optimasi primer. Primer yang digunakan pada penelitian ini yaitu primer hasil desain dengan menggunakan *software bioedit*. Berdasarkan hasil persentase GC dan *Tm* (suhu leleh) terbaik dipilih primer L1 HPV 16 dengan urutan: *forward* 5'-CAATTATTGCTGATGCAGGTGACT- 3' sebanyak 24 basa nukleotida dengan GC 41,7% serta *Tm* 55,8°C, kemudian *nested forward* 5'-GTAGGTCGTGGTCAGCCATTA - 3' sebanyak 21 basa nukleotida dengan GC 52,4% serta *Tm* 56,6°C dan *reverse* 5'-CTTACAGCTTACGTTTTTTGCG -3' sebanyak 22 basa nukleotida dengan GC 40,9% serta *Tm* 53°C. Dalam penelitian ini, digunakan 3 primer untuk mengamplifikasi panjang genom L1 HPV 16 yang berkisar 1.600 bp. Primer *forward* dibuat untuk mengamplifikasi ujung 5' dari gen L1, *nested forward* dibutuhkan untuk menghindari *missing* (kehilangan) gen di bagian tengah gen L1 ketika proses sekuensing, dan *reverse* untuk mengamplifikasi ujung 3' dari gen L1 sehingga diharapkan akan didapatkan gen yang *full length* (utuh) sebesar 1.600 bp.

Dari beberapa metode PCR, metode *touchdown* didapatkan *band* DNA yang diinginkan. Teknik *touchdown* PCR ini dengan PCR *gradient* yang hampir sama, yaitu dalam satu siklus PCR dimulai dari denaturasi, penempelan primer (*annealing*) dan elongasi, namun berbeda dalam *annealing*. Pada *touchdown* PCR terjadi beberapa kali *annealing*. Suhu penempelan yang dipilih merupakan *Tm* primer. Strategi ini membantu dalam memastikan bahwa peristiwa hibridisasi primer dan *template* DNA menghasilkan target amplicon.¹¹ Tujuan *touchdown* PCR ini adalah menghindari *priming* rendah *Tm* selama siklus sebelumnya, oleh karena itu sangat penting dilakukan modifikasi suhu. Modifikasi suhu yang digunakan yaitu dengan melihat *Tm* maksimum dan minimum dari primer yang digunakan, dalam hal ini yaitu primer kombinasi 1. Untuk

penelitian ini, digunakan 30 siklus PCR; 10 siklus dengan *annealing* 57°C (*Tm* maksimum+2), 10 siklus berikutnya dengan *annealing* 57° ke 47°C (*Tm* dugaan primer) dan 10 siklus terakhir dengan *annealing* 47°C (*Tm* minimum-6) dengan harapan gen yang dicari menempel di suhu *annealing* tersebut. Apabila gen spesifik dapat ditemukan maka diambil *Tm annealing* yang paling tinggi sebagai suhu optimal primer.

Berdasarkan hasil penelusuran asal usul L1 HPV-16 isolat dari pasien kanker serviks di Bandung dengan menggunakan MEGA5, terjadi pengelompokan kluster. Pada pohon filogenetik basa nitrogen, posisi isolat Bandung, *Asian*, *East Asia*, USA, dan Germany (*Europe*) berada dalam satu kluster, dan isolat *African1*, *African2*, *Thailand*, dan *Asia America* berada dalam kluster yang berbeda. Tiap kluster ada yang bercabang lagi membentuk grup dan subgrup. Pada kluster ke-1, terlihat isolat USA terpisah dari isolat Germany. Isolat HPV Bandung (Indonesia) bergabung dengan isolat HPV dari *Asian* dalam satu subgrup. Oleh karena itu, dapat didefinisikan bahwa isolat Bandung memiliki kekerabatan yang lebih dekat dengan Asia dan Asia Timur dibanding dengan USA dan Germany.

Hal ini membuktikan keterkaitan antara *host* (inang) dan patogen serta kluster HPV Indonesia berada pada galur Asia dan Asia Timur sehingga akan sesuai dengan keadaan inangnya.¹⁰ Dari hasil penelitian De Boer dkk.¹⁰ ditemukan varian spesifik dari sampel pasien asal Jakarta, yaitu varian *Javanese* pada regio C6826T, namun dalam kasus kanker serviks di Bandung ini tidak ditemukan varian *Javanese* oleh karena gen L1 yang diperoleh tidak *full length* (utuh), yaitu berkisar 1.440 bp. Untuk itu perlu didesain ulang primer yang dapat mencakup seluruh gen L1.

Konsep kompatibilitas inang-patogen itu didukung oleh data yang dapat menunjukkan suatu penyebaran preferensial tertentu garis keturunan populasi pasien dari daerah yang sama dibanding dengan daerah lain. Dalam kasus tuberkulosis dilaporkan penyebaran kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang menginfeksi daerah Jawa Barat dan daerah Kupang. Varian Beijing diketahui mampu menginfeksi penderita tuberkulosis di Jawa Barat. Hal ini menunjukkan asosiasi langsung antara karakteristik genetik pasien TB dan isolat *Mycobacterium*.¹² Untuk kasus kanker serviks ini, kemungkinan terdapat kompatibilitas inang-patogen antara asal daerah pasien dan virus yang menginfeksi. Isolat asal Bandung ternyata memiliki varian Asia Timur dan Asia mengingat Bandung dilalui jalur distribusi HPV yang ditularkan dari Asia.

Dari hasil penelitian ini, Bandung, Asia Timur, dan Asia memiliki tipikal gen L1 yang sama. Gen L1 dapat digunakan sebagai strategi untuk merancang vaksin sehingga dapat diasumsikan bahwa Indonesia dapat menggunakan vaksin yang sama dengan vaksin Asia Timur maupun Asia. Asumsi ini didasarkan oleh karakteristik gen L1 yang dimiliki hampir sama bila dibanding dengan isolat lainnya.

Thailand yang letaknya cukup dekat dari Indonesia tidak memiliki karakteristik gen L1 yang cenderung sama dengan Indonesia karena dilihat dari posisi filogenetiknya terbukti tidak berada dalam satu kluster dengan Indonesia, namun bergabung dengan grup *Asia America*, *African1*, dan *African2*. Hal ini dapat terjadi karena mobilitas virus HPV dari Amerika dan Afrika mengingat Thailand merupakan negara yang aksesnya terbuka sehingga sering dijadikan destinasi pariwisata.

Untuk selanjutnya, penelitian di bidang ini diharapkan dapat memberikan informasi penting mengenai signifikansi variabilitas genomik HPV yang pada akhirnya dapat digunakan untuk mengatasi pengendalian infeksi pada kanker serviks. Perubahan daerah L1 dari genom HPV mungkin penting dalam membedakan potensi menular dengan varian berbeda dari daerah E6, E7, dan L2, serta dalam mendefinisikan epitop yang relevan untuk merancang vaksin.

Simpulan, didapatkan variasi Asia dan Asia Timur yang mengacu kepada sekuens gen L1 HPV-16 dari isolat pasien kanker serviks di Bandung. Hal ini membuktikan bahwa kluster HPV Indonesia berada pada galur Asia dan Asia Timur.

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Ibu Supartini Syarif dari Dept. Biologi FMIPA Unpad dan Bapak Sony Suhandono dari SITH ITB atas diskusi dan sumbang sarannya. Penelitian ini didanai oleh Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Universitas Padjadjaran 2013.

Daftar Pustaka

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69–90.

2. Wahidin M, Noviani R, Hermawan S, Andriani V, Ardian A, Djarir H. Population-based cancer registration in Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(4):1709–10.
3. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17–27.
4. Handisurya A, Schellenbacher C, Kirnbauer R. Diseases caused by human papillomaviruses (HPV). *J Dtsch Dermatol Ges*. 2009;7(5):453–66.
5. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70–9.
6. Alvarez-Salas LM, DiPaolo JA. Molecular approaches to cervical cancer therapy. *Curr Drug Discov Technol*. 2007;4(3):208–19.
7. Panigoro R, Susanto H, Novel SS, Hartini S, Sahiratmadja E. HPV genotyping linear assay test comparison in cervical cancer patients: implications for HPV prevalence and molecular epidemiology in a limited-resource area in Bandung, Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(10):5843–7.
8. Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol*. 2005;79(11):7014–23.
9. Chen Z, DeSalle R, Schiffman M, Herrero R, Burk RD. Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97. *J Virol*. 2009;83(3):1443–55.
10. de Boer MA, Peters LA, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Vrede MA, dkk. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol Oncol*. 2004;94(2):488–94.
11. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1452–6.
12. Parwati I, van Crevel R, Sudiro M, Alisjahbana B, Pakasi T, Kremer K, dkk. Mycobacterium tuberculosis population structures differ significantly on two Indonesian Islands. *J Clin Microbiol*. 2008;46(11):3639–45.