

Deteksi human papilloma virus (HPV) tipe 16 dan tipe 18 dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak DNA berlabel biotin

M.L. ROSILAWATI*

B. BELA**

J. INDARTI***

*Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi (PATIR), Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), Jakarta

**Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta

***Departemen Obstetri dan Ginekologi
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/
RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo
Jakarta

Tujuan: Menerapkan teknik PCR-hibridisasi *dot blot* dengan pelacak DNA berlabel biotin untuk mendeteksi HPV tipe 16 dan 18 pada spesimen *swab* dan biopsi jaringan serviks.

Rancangan/rumusan data: Penelitian ini bersifat deskriptif.

Bahan dan cara kerja: Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesimen *swab* dan biopsi serviks berjumlah 124 spesimen. Ekstraksi DNA sampel dilakukan dengan metode Boom dan *QIAAmp DNA Mini Kit* (Qiagen). Amplifikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan primer PGMY11 dan PGMY09, dilaksanakan untuk mendeteksi infeksi HPV. Tipe HPV-16 dan tipe 18 dideteksi dengan teknik hibridisasi *dot blot* dari produk PCR dengan pelacak DNA berlabel biotin.

Hasil: Dari 124 spesimen, 18 spesimen (15%), menunjukkan hasil PCR positif HPV dan dari hasil positif PCR tersebut, 7 spesimen menunjukkan hasil hibridisasi *dot blot* negatif sehingga dapat dinyatakan spesimen tersebut terinfeksi dengan tipe HPV risiko tinggi lainnya atau risiko rendah. Hasil positif hibridisasi *dot blot* terlihat pada 24 spesimen (19%) yaitu 20 spesimen (16%) terinfeksi HPV-16 dan 4 spesimen (3%) terinfeksi HPV-18. Dari 20 spesimen positif HPV-16, 9 spesimen memperlihatkan hasil PCR negatif sedangkan dari 4 spesimen positif HPV-18, 1 spesimen menunjukkan hasil negatif PCR. Hal ini membuktikan teknik PCR-hibridisasi *dot blot* lebih sensitif dibanding PCR-elektroforesis gel agarosa. Beberapa spesimen *swab* maupun biopsi pasien prakanker atau kanker memperlihatkan hasil negatif HPV-16 maupun 18. Kemungkinan faktor penyebabnya adalah selain adanya infeksi tipe HPV risiko tinggi dan virus lain juga terintegrasinya DNA HPV ke dalam DNA genom *host*. Berdasarkan kelompok umur, pasien dengan umur di atas 30 tahun lebih banyak terinfeksi HPV-16 maupun HPV-18.

Kesimpulan: HPV dari spesimen alat genitalia dapat dideteksi dengan teknik PCR menggunakan primer PGMY11 dan PGMY09. Deteksi tipe HPV terutama HPV-16 dan HPV-18 dapat dilakukan dengan teknik PCR yang dilanjutkan dengan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak DNA berlabel biotin yang merupakan metode cepat, sensitif, spesifik dan sangat efisien digunakan pada spesimen dengan jumlah banyak. Teknik ini dapat diterapkan sebagai metode deteksi dini kanker serviks secara molekuler.

[Maj Obstet Ginekol Indones 2007; 31-4: 218-25]

Kata kunci: PCR, hibridisasi *dot blot*, HPV-16, HPV-18

Objective: Implementing PCR *dot blot* hybridization with biotinylated labeled DNA probe techniques in order to detect HPV type 16 and 18 from the *swab* and biopsy of cervical tissues specimens.

Design/data identification: Descriptive.

Material and methods: Samples used in this research were 124 *swab* and biopsy of cervical tissues specimens. The DNA samples were extracted by means of Boom's method and *QIAAmp DNA Mini Kit* (Qiagen). DNA amplification by using PCR method with primer PGMY11 and PGMY09 was performed for detecting HPV infection. HPV type 16 and 18 were detected by the hybridization *dot blot* technique from the PCR product, with biotinylated labeled DNA probe.

Results: Of 124 specimens, 18 specimens (15%) were positive for HPV with PCR technique and from those positive results, 7 specimens showed negative *dot blot* hybridization. Positive results of PCR-*dot blot* hybridization showed that from 24 specimens (19%), 20 specimens (16%) were infected with HPV-16, while 4 specimens (3%) were infected with HPV-18. From 20 HPV-16 positive specimens and 4 HPV-18 positive specimens, revealed that 9 specimens and 1 specimen were negative PCR results, respectively. It can be noted that the PCR-*dot blot* hybridization was more sensitive than PCR- agarose gel electrophoresis techniques. The absence of HPV-16 or HPV-18 also occurred in several precancer or cancer specimens. Several factor that probably caused the undetected the HPV types mentioned above, were either the other types of HR-HPV and viruses but also the integration the HPV DNA into host genom DNA. Infection of HPV-16 or HPV-18 was highest among the patients above 30 years.

Conclusion: HPV from human genital organ could be detected by using PCR technique with primer PGMY11 and PGMY09. The PCR and *dot blot* hybridization with biotinylated labeled DNA probe techniques, could be used in detecting HPV type particularly on HPV-16 and HPV-18, since those methods are noted to be the fast, sensitive, specific and efficient for specimens in great quantity. These methods could be applied to early detection of cervical cancer in molecular basis.

[Indones J Obstet Gynecol 2007; 31-4: 218-25]

Keywords: PCR, *dot blot* hybridization, HPV-16, HPV-18

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan salah satu kanker paling

sering menyerang wanita di dunia dan menempati urutan kedua tertinggi setelah kanker payudara.^{1,2,3} Menurut Parkin *et al* yang dikutip oleh van Doorn⁴

et al dan Ferlay *et al* yang dikutip oleh Dharmawan³, di dunia tiap tahun terjadi hampir 500.000 kasus baru kanker serviks, 290.000 mengakibatkan kematian dan 80% - 90% kasus tersebut terjadi di negara berkembang. Saat ini di Indonesia kanker serviks menempati peringkat pertama kanker pada wanita. Setiap tahun terjadi 15.000 kasus baru dengan kematian 8.000 orang.⁵ Prevalensi kanker tersebut di Indonesia cukup tinggi yaitu berkisar 100 kasus tiap 100.000 orang jika dibandingkan prevalensi di Netherland yang hanya 9 kasus per 100.000 orang.³

Pencegahan kanker serviks dapat dilaksanakan apabila ditemukan pada stadium dini dan pada stadium tersebut, kemungkinan penyakit ini dapat disembuhkan 100%.² *Pap smear* merupakan salah satu tes skrining kanker serviks berdasarkan pemeriksaan sitologi secara mikroskopik untuk mengetahui keganasan sel serviks telah digunakan secara umum dan meluas.

Human Papillomavirus (HPV) adalah virus DNA yang mempunyai lebih dari 100 tipe^{6,7} dan kurang lebih 40 tipe di antaranya telah dideteksi menginfeksi saluran anogenitalia.^{4,8} Berdasarkan sifat onkogeniknya, tipe HPV *anogenital* tersebut dikelompokkan dalam HPV risiko rendah (*low-risk/LR HPV*), yaitu tipe HPV yang tidak atau jarang berisiko menyebabkan kanker serviks dan HPV risiko tinggi (*high-risk/HR HPV*), tipe HPV yang mempunyai risiko berkembang menyebabkan kanker serviks.⁶⁻⁸ DNA HPV telah terdeteksi dalam 90 - 99,7% jaringan kanker serviks^{9,10} dan adanya infeksi persisten oleh tipe HPV bersifat onkogenik, menunjukkan HPV tersebut sebagai penyebab kanker serviks.¹¹ Tipe HPV bersifat onkogenik yang paling banyak dan sering menginfeksi adalah tipe 16 dan 18.¹⁰⁻¹²

Diagnosis secara molekuler dapat digunakan lebih cepat mendeteksi HPV sebelum pertumbuhan sel abnormal diketahui melalui pemeriksaan sitologi, sehingga dapat dijadikan indikasi awal timbulnya penyakit. Pengembangan teknik biologi molekuler seperti *Hybrid Capture II* (teknik amplifikasi sinyal)^{13,14}, amplifikasi target DNA (PCR) -hibridisasi *Southern blot* dan *dot blot*, PCR-*reverse dot/line blot*, *real time PCR*¹⁵⁻¹⁸, telah banyak diterapkan untuk deteksi tipe HPV risiko tinggi. Berdasarkan hasil penelitian Bollman *et al*, Carozzi *et al*, dan Dalla Palma *et al*, yang dikutip oleh Carozzi *et al*¹⁴, dinyatakan tes DNA HPV risiko tinggi, lebih sensitif dari pada sitologi dan jika digunakan bersama dengan pemeriksaan sitologi merupakan tes skrining yang lebih baik untuk kanker serviks yang sangat bermanfaat untuk penanganan dan terapi pasien terinfeksi.

Pada penelitian ini teknik PCR-hibridisasi *dot blot* dengan pelacak berlabel biotin digunakan untuk mendeteksi tipe HPV-16 dan 18 dari sampel *swab* dan biopsi serviks.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan 124 sampel klinis yang terdiri dari 100 spesimen usapan Papanicolaou (*swab*) serviks dari pasien normal/tidak ada keluhan, pasien dengan keluhan keputihan (*fluor albus*), perdarahan dan nyeri perut. Spesimen dari pasien prakanker dan kanker serviks terdiri dari 13 spesimen *swab* dan 11 biopsi. Pengambilan sampel usapan Papanicolaou dilakukan dengan menggunakan *swab* kapas yang kemudian dimasukkan dalam larutan bufer fosfat saline, pH 7,2. Sampel dalam penelitian ini diambil dari tahun 2002 dan 2004 oleh Divisi Sitopatologi Departemen Obstetri dan Ginekologi, RSCM, Jakarta.

Ekstraksi DNA Sampel

DNA diekstraksi menggunakan 2 cara yaitu metode Boom dan *QIAAmp DNA Mini Kit* (*Qiagen*). Sel dari sampel dikumpulkan dengan mengocok-kocok *swab* kapas dalam larutan bufer fosfat. Larutan kemudian disentrifugasi dan pelet yang didapat diekstraksi DNANYA. Pada metode Boom, sel dilisis dengan menggunakan larutan bufer lisis yang terdiri dari Tris-HCl, guanidine tiosianat (GuSCN), EDTA, Triton X-100. DNA dijerat/diikat dengan suspensi diatom dan dipresipitasi dengan aseton, etanol 70% dingin dan dengan sentrifugasi kecepatan tinggi (12.000 rpm).

Ekstraksi DNA dengan menggunakan *QIAAmp DNA Mini Kit* (*Qiagen*) dilakukan dengan melisis sel sampel dalam larutan proteinase-K dan larutan bufer lisis. Pengikatan DNA sel dilakukan dengan memasukkan sel yang telah dilisis ke dalam *QIAAmp spin column* yang dilapisi dengan membran silica gel, ditambahkan etanol absolut selanjutnya disentrifugasi. DNA pada membran dicuci dengan bufer pencuci dan kemudian dielusi dengan bufer elusi. DNA yang diperoleh dapat langsung diamplifikasi atau disimpan pada suhu -20°C.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA sampel hasil ekstraksi dan klon plasmid HPV-16 dan HPV-18 sebagai kontrol positif, dilakukan dengan proses PCR. Primer yang digunakan adalah PGMY11 (5 sekuen) dan PGMY09

(13 sekuen) yang merupakan primer hasil *re-designed* primer MY11 (5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3') dan MY09 (5'-CGT CCM AAR GGA WAC TGA TC-3'): W=A+T, Y=C+T, M=A+C, R=A+G, berdasarkan daerah target penempelan primer yang sama apabila menggunakan primer MY09 dan MY11.¹⁹ Primer *consensus* MY09 dan MY11 ini saat itu, dirancang dari daerah yang *conserved* pada gen LI yang mengkode protein mayor HPV dari hanya dari sekuen genotype 5 tipe HPV genital. Sebagai kontrol internal, dilakukan koamplifikasi HPV dengan β -globin menggunakan primer PCO4 dan GH20. Campuran pereaksi PCR yang dipakai adalah buffer Tris-HCl + KCl, 4,0 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 10 pmol tiap sekuen primer dan *Taq polymerase (hot start, Qiagen)* 2,5 U/100 μ l. Proses PCR meliputi tahap denaturasi awal pada suhu 95°C, 15 menit 1 siklus, dilanjutkan dengan 40 siklus yang tiap siklus meliputi tahap denaturasi: 95°C, 1 menit, *annealing* 55°C, 1 menit dan *extension*, 72°C, 1 menit, diakhiri dengan *extended extension* pada 72°C, 5 menit, 1 siklus. Deteksi hasil amplifikasi untuk mengetahui ada tidaknya DNA HPV dilaksanakan dengan teknik elektroforesis gel agarosa (1,5%), yang dilanjutkan dengan pewarnaan gel dengan larutan etidium bromida dan visualisasi di bawah *UV transilluminator*.

Hibridisasi dot blot dan deteksinya

Proses hibridisasi dalam penelitian ini dilakukan untuk menentukan tipe HPV-16 dan HP-V18 pada hasil positif amplifikasi dengan primer untuk β -globin (PCO4 dan GH20). Proses hibridisasi dilakukan dengan cara sebelumnya²⁰ yang dimodifikasi. Untuk mendeteksi tipe HPV digunakan 2 macam pelacak oligonukleotida berlabel biotin yaitu MYB95 (5'-GAT ATG GCA GCA CAT AAT GAC-3') untuk tipe HPV-16 dan MYB130 (5'-GGG CAA TAT GAT GCT ACC AAT -3') untuk tipe HPV-18. DNA hasil PCR didenaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit kemudian dispotkan pada membran nilon, menggunakan *dot blotter*. Fiksasi DNA pada membran dilakukan dengan pemanasan pada 80°C selama 1-2 jam. Membran kemudian dihibridisasi dengan pelacak tersebut di atas dalam larutan 5x SSPE, 5x Denhardt, dan 0,5% SDS pada suhu 56°C selama 1 - 2 jam. Selanjutnya membran dicuci dengan larutan pencuci (2xSSPE, 0,1% SDS), 2 kali dan 1 kali pencucian akhir dalam 1 x SSPE, 10 - 30 menit pada suhu 56°C. Deteksi hasil hibridisasi dilakukan dengan menambahkan *streptavidin peroksidase* pada membran dalam larutan pencuci dan diinkubasi pada suhu ruang selama 45 - 60 menit.

Membran selanjutnya dicuci 4 kali dengan larutan yang sama dan ditambah dengan cairan deteksi ECL (*Enhance Chemiluminescens Liquid*). Visualisasi dilaksanakan dengan memaparkan membran pada hiperfilm dalam kaset selama 1 - 3 jam dalam ruang gelap kemudian film diproses dalam cairan *developer* 1 - 3 menit dan cairan *fixer* 3 - 5 menit dan dicuci dengan air dan dikeringkan.

HASIL

Hasil PCR dengan primer PGMY11 dan PGMY09 dan primer untuk β -globin (GH20 dan PCO4) dan deteksinya menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2. Tabel 1 menunjukkan hasil positif HPV dengan teknik PCR, hasil positif hibridisasi *dot blot* dengan pelacak oligonukleotida HPV16 dan 18 berlabel biotin baik dari spesimen *swab* serviks maupun jaringan biopsi. Hasil PCR positif HPV dalam spesimen dan kontrol positif HPV, dinyatakan dengan munculnya fragmen DNA masing-masing berukuran 450 bp (*base pair*) pada gel agarosa (Gambar 1, lajur 2, 7, 8 dan Gambar 2 lajur 2, 6) sedangkan sebaliknya tidak adanya fragmen tersebut menunjukkan hasil PCR negatif HPV. Fragmen DNA 268 bp menunjukkan hasil positif amplifikasi β -globin sebagai kontrol internal (Gambar 1 dan 2 lajur 3 - 8). Dari 124 spesimen yang diteliti, semua spesimen menunjukkan hasil PCR positif β -globin sedangkan hanya 18 spesimen (15%), menunjukkan hasil PCR positif HPV. Fragmen DNA terlihat *smear* pada gel agarosa terlihat pada 2 sampel yaitu sampel 46-L dan 47-L (Tabel 1).

Metode PCR dan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak oligonukleotida berlabel biotin yang dilakukan dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui tipe HPV-16 dan HPV-18. Analisis hasil PCR-hibridisasi *dot blot* dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4 masing-masing untuk menentukan tipe HPV-16 dan HPV-18. *Dot* berwarna hitam pada film menunjukkan hasil positif, sedangkan tidak adanya *dot* berwarna hitam menunjukkan hasil negatif. Hasil PCR-hibridisasi *dot blot* dari 124 spesimen yang diteliti, 24 spesimen terinfeksi HR-HPV dan dari jumlah tersebut, 20 spesimen (16%) terinfeksi HPV-16 yang terdiri dari 18 spesimen *swab* dan 2 biopsi, sedangkan 4 spesimen (13%) yang terdiri dari 1 spesimen *swab* dan 3 biopsi, terinfeksi HPV-18 (Tabel 1). Dari hasil positif PCR pada 18 spesimen, 7 spesimen menunjukkan hasil hibridisasi negatif baik untuk HPV-16 maupun HPV-18, sebagai contoh sampel 25-L (Gambar 1, lajur 7, Gam-

bar 3, dot A5), 28-Br (Gambar 2, lajur 6, Gambar 3, dot C1). Fragmen DNA hasil PCR-elektroforesis gel agarosa dari 2 spesimen (46-L dan 47-L) terlihat *smear* (gambar tidak diperlihatkan), menunjukkan hasil hibridisasi positif untuk HPV-16 (Gambar 3. dot A8 dan A9). Hasil PCR HPV negatif akan tetapi hasil hibridisasinya positif untuk HPV-16 diperoleh pada 9 spesimen sedangkan 1 spesimen untuk HPV-18. Ketebalan pita DNA pada gel

agarosa dan *dot* DNA pada film menunjukkan jumlah virus. Makin tebal pita DNA atau *dot* makin banyak jumlah virus yang terdeteksi.

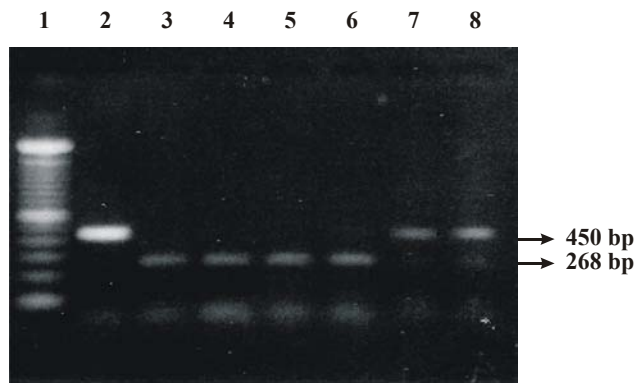
Infeksi HPV-16 dan HPV-18 pada pasien berdasarkan kelompok umur dapat dilihat pada Tabel 2. Infeksi terendah pada pasien dengan kelompok umur 20 - 29 tahun dan tertinggi pada kelompok umur 40 - 50 tahun dan > 50 tahun.

Tabel 1. Hasil positif analisis HPV dengan teknik PCR dan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak DNA berlabel biotin dari spesimen *swab* dan biopsi jaringan serviks

Kode Sampel	Hasil PCR		Hasil Hibridisasi <i>dot blot</i>		Keterangan
	β -globin	HPV	HPV-16	HPV-18	
11-L	+	+	+	-	Spesimen <i>Swab</i>
25-L	+	+	-	-	Idem
32-L	+	+	-	-	Idem
44-L	+	-	-	+ tipis	Idem
46-L	+	<i>smear</i>	+	-	Idem
47-L	+	<i>smear</i>	+	-	Idem
48-L	+	+	+	-	Idem
49-L	+	-	+	-	Idem
52-L	+	-	+ tipis	-	Idem
53-L	+	-	+ tipis	-	Idem
55-L	+	-	+ tipis	-	Idem
56-L	+	-	+	-	Idem
61-L	+	+	+	-	Spesimen Biopsi
63-L	+	+	-	+	Idem
64-L	+	+	+	-	Idem
69-L	+	+	-	+	Idem
70-L	+	+	-	-	Idem
71-L	+	+	-	+	Idem
18-Br	+	+	-	-	Spesimen <i>Swab</i>
20-Br	+	+	+	-	Idem
28-Br	+	+	-	-	Idem
40-Br	+	+ tipis	+ tipis	-	Idem
45-Br	+	-	+ tipis	-	Idem
46-Br	+	-	+ tipis	-	Idem
47-Br	+	+	+	-	Idem
49-Br	+	-	+ tipis	-	Idem
50-Br	+	+	-	-	Idem
51-Br	+	-	+ tipis	-	Idem
52-Br	+	-	+ tipis	-	Idem
53-Br	+	+ tipis	+ tipis	-	Idem
54-Br	+	+	-	-	Idem

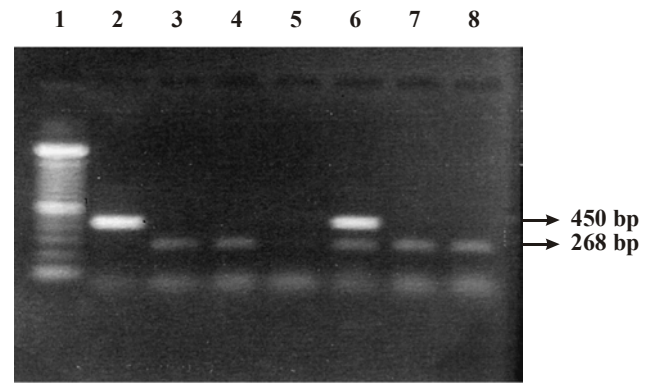
Tabel 2. Jumlah spesimen positif HPV, HPV-16, dan HPV-18 dari spesimen *swab* dan biopsi jaringan serviks berdasarkan kelompok umur berdasarkan hasil analisis dengan teknik PCR dan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak berlabel biotin.

Kelompok umur	HPV-16 dan HPV-18 positif	HPV-16 positif	HPV-18 positif
20 - 29 tahun	2	2	0
31 - 39 tahun	5	4	1
40 - 50 tahun	9	6	4
> 50 tahun	8	8	0
Jumlah	24	20	4



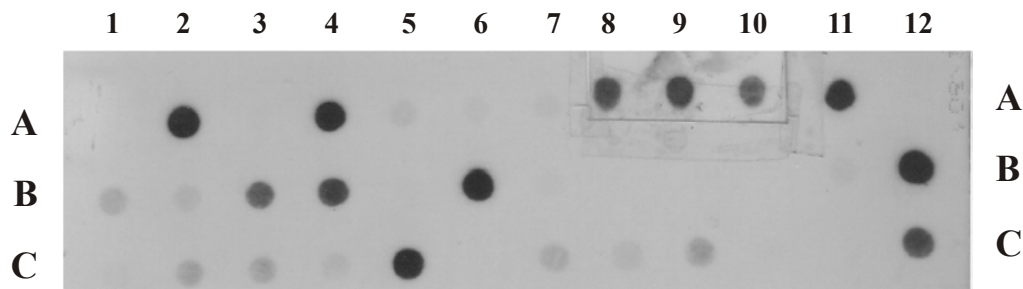
Gambar 1. Hasil PCR dan elektroforesis gel agarosa spesimen swab serviks

Lajur 1 : Marker DNA ladder 100 bp
 Lajur 2 : Kontrol positif (HPV-16)
 Lajur 3-5 : Spesimen 37-Br, 38-Br, 39-Br
 (β-globin +, HPV -)
 Lajur 6-8 : Spesimen 49-Br, 25-L, 48-L,
 (β-globin +, HPV +)



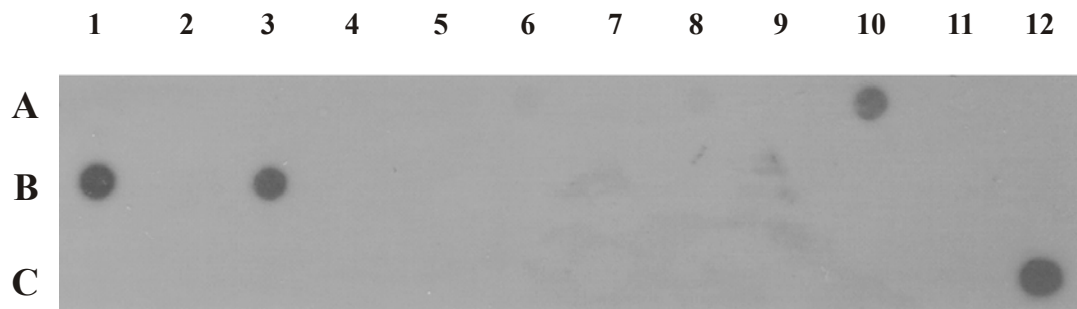
Gambar 2. Hasil PCR dan elektroforesis gel agarosa spesimen swab serviks

Lajur 1 : Marker DNA ladder 100 bp
 Lajur 2 : Kontrol positif (HPV-18)
 Lajur 3-5 dan 7-8: Spesimen 25-Br, 26-Br, 27-Br dan
 29-Br, 30-Br (β-globin +; HPV -)
 Lajur 6 : Spesimen 28-Br (β-globin +, HPV +)



Gambar 3. Hasil hibridisasi dot blot spesimen swab dan biopsi jaringan serviks dengan pelacak oligonukleotida HPV-16 berlabel biotin.

Dot A2, C12 = Kontrol positif (klon plasmid HPV-16)
 Dot A5 (25-L), A12 (32-L), B8 (70-L), B11 (18-Br), C1 (28-Br), C10 (54-Br) =
 Hasil PCR HPV+; HPV-16-
 Dot A4 (11-L), A11 (48-L), B4 (61-L), B6 (64-L), B12 (20-Br), C2 (40-Br), C5 (47-Br), C8 (50-Br), C9 (53-Br) =
 Hasil PCR HPV+; HPV-16+
 Dot A8 (46-L), A9 (47-L) = Hasil PCR HPV smear; HPV-16+
 Dot A10 (49-L), B1 (52-L), B2 (53-L), B3 (56-L), C3 (45-Br), C4 (46-Br), C7 (49-Br) =
 Hasil PCR HPV-; HPV-16+
 Dot yang lain = Hasil PCR HPV-; HPV-16-
 Dot C11 = Kontrol negatif



Gambar 4. Hasil hibridisasi dot blot spesimen swab dan biopsi jaringan serviks dengan pelacak oligonukleotida HPV-18 berlabel biotin.

Dot C12 = Kontrol positif (klon plasmid HPV18)
 Dot A10 (63-L), B1(69-L), B3(71-L) = Hasil PCR +; HPV-18+
 Dot C11 = Kontrol negatif

PEMBAHASAN

Dari 18 spesimen positif HPV dengan PCR menggunakan primer PGMY11 dan PGMY09, 7 spesimen menunjukkan hasil hibridisasi negatif baik untuk HPV-16 maupun HPV-18. Teknik PCR dengan primer tersebut hanyalah mengamplifikasi dan mendeteksi DNA HPV bukan tipe HPV dari spesimen alat genitalia, sehingga dapat dinyatakan 7 spesimen tersebut terinfeksi dengan tipe HPV risiko tinggi lainnya atau risiko rendah.

Saat ini telah dilaporkan infeksi tipe HPV yang mempunyai risiko berkembang menjadi kanker serviks (*high-risk HPV*) ada 15 tipe yaitu tipe 16, 18, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 68, 73, 82 dan 11 tipe *low-risk HPV* yaitu tidak mempunyai risiko berkembang menjadi kanker serviks seperti tipe 6, 11, 40, 42 dan lain-lain.²¹ Dari hasil PCR-hibridisasi *dot blot* 124 spesimen, 20 spesimen terinfeksi HPV-16 akan tetapi 9 spesimen di antaranya menunjukkan hasil negatif untuk PCR-elektroforesis gel agarosa, sedangkan pada 4 spesimen terinfeksi HPV-18, hasil tersebut hanya pada 1 spesimen. Hal ini disebabkan deteksi hasil PCR dengan hibridisasi *dot blot* berlabel biotin lebih sensitif dari pada pewarnaan etidium bromida. Deteksi DNA dengan elektroforesis gel agarosa menggunakan sinyal dengan pewarnaan etidium bromida mempunyai batas deteksi sekitar 10 ng²² sedangkan deteksi sinyal menggunakan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak fluoresens biotin yang merupakan *visible spectrum photon*, lebih sensitif.²³ Batas deteksi DNA virus dengan teknik hibridisasi *dot blot* dengan pelacak berlabel radioisotop dan non radioisotop berkisar 1 - 10pg (7500 - 75.000 kopi genom virus)²⁴ sedangkan dengan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak berlabel radioisotop mempunyai batas deteksi sekitar 1 pg.²⁵ Hasil penelitian Thon *et al* dalam International Atomic Energy Agency (IAEA) - TECDOC-1528²⁶ menyatakan sensitivitas pelacak DNA berlabel radioisotop untuk deteksi hepatitis B virus, 10 kali lebih tinggi dari pada pelacak berlabel biotin.

Hasil dalam penelitian ini menunjukkan infeksi HPV-16 lebih banyak daripada HPV-18 yaitu 16% untuk HPV-16 dan 3% untuk HPV-18 dari seluruh spesimen yang diteliti. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian-penelitian terdahulu yang menyatakan prevalensi HPV tipe 16 lebih tinggi daripada tipe 18^{9,10,27,28} seperti misalnya dari spesimen pasien kanker serviks hasil yang didapat 58% dan 12%²⁹, 73,9% dan 11,6%³¹ masing-masing untuk tipe 16 dan 18.

Berdasarkan kelompok umur infeksi *HR-HPV* dalam penelitian ini lebih banyak terjadi pada umur

30 tahun ke atas. Kanker serviks sangat jarang terjadi pada wanita di bawah 30 tahun. Pada sebagian besar wanita pada umur tersebut yang terinfeksi HPV, virus akan hilang karena respon imun yang baik sebelum terjadi proses transformasi sel serviks normal menjadi kanker.⁶ Infeksi *HR-HPV* persisten yang terjadi sangat umum pada wanita usia tua akan sangat besar berisiko berkembang menjadi *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN) atau kanker serviks¹³ dan 25% dari seluruh kanker serviks terjadi pada wanita lebih dari 65 tahun.³⁰ Menurut Lin *et al* yang dikutip oleh Azis *et al*,³¹ DNA HPV banyak ditemukan pada penderita NIS dan kanker serviks uteri pada wanita usia sekitar 50 tahun.

HPV-16 atau HPV-18 terdeteksi pada 9 spesimen di antara 13 spesimen *swab* dari pasien prakanker dan kanker serviks, demikian juga untuk spesimen biopsi hanya 6 spesimen di antara 11 spesimen. Tidak terdeteksinya HPV-16 maupun HPV-18 pada beberapa spesimen *swab* maupun biopsi, kemungkinan disebabkan infeksi tipe *HR-HPV* lain atau virus lain. Hasil penelitian Prayitno,²⁹ menyatakan dari 19 sampel yang didiagnosis sebagai kanker serviks, 17 sampel terinfeksi HPV dan 13 sampel terinfeksi HPV dan *epstein barr viruses* (EBV). Hal lain yang menyebabkan HPV-16 dan 18 tidak terdeteksi disebabkan DNA HPV telah berintegrasi ke dalam DNA genom tuan rumah/*host*^{11,32} dan integrasi DNA HPV lebih sering terjadi pada kanker serviks berkaitan dengan infeksi HPV-18 daripada HPV-16.¹¹ Menurut Riou *et al* yang dikutip oleh Biedermann *et al*¹⁸, tidak terdeteksinya HPV pada pasien kanker serviks stadium I menunjukkan risiko lebih tinggi untuk *relapse* dan metastasis berlanjut dibanding pasien dengan HPV positif. Teknik deteksi secara molekuler dengan PCR-hibridisasi *dot blot* dengan pelacak DNA berlabel biotin untuk deteksi dini tipe HPV, dapat diterapkan untuk spesimen dalam jumlah banyak sehingga sangat efisien untuk studi *surveillance*. Beberapa penelitian membuktikan penggunaan pelacak DNA berlabel radioisotop pada proses hibridisasi ternyata lebih sensitif dan prosedur yang digunakan lebih sederhana dibandingkan dengan pelacak DNA non isotop. Oleh karenanya, pada penelitian selanjutnya akan digunakan pelacak DNA berlabel radioisotop untuk deteksi tipe HPV terutama *HR-HPV*.

KESIMPULAN

- HPV dapat dideteksi dengan teknik PCR menggunakan primer PGMY11 dan PGMY09.
- Teknik PCR-hibridisasi *dot blot* dengan pelacak

DNA berlabel biotin merupakan metode cepat, sensitif dan spesifik untuk mendeteksi *HR-HPV* terutama HPV tipe 16 dan tipe 18 pada spesimen *swab* dan biopsi serviks dan dapat diterapkan untuk spesimen dalam jumlah banyak.

- Deteksi dini kanker serviks dapat dilakukan dengan metode deteksi secara molekuler sehingga sangat bermanfaat untuk pengendalian kanker serviks.

RUJUKAN

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Vaksin HPV untuk perangi kanker serviks. 2 Januari 2007. Available at: <http://www.depkes.go.id/index.php?option=newsBtask=viewarticle&sid=2386>
2. Seksfile. Kanker rahim bisa dicegah. 27 Mei 2007. Available at: seksfile.wordpress.com/2007/05/-29k
3. Dharmawan T. Urging cervical cancer prevention program in RI. April 25, 2007. Available at: <http://www.thejakartapost.com/yesterdaydetail.asp?fileid=20070425.T01-39k>
4. Van Doorn LJ, Molijn A, Kleter B, Quint W, Culau B. Highly effective detection of human papillomavirus 16 and 18 DNA by a testing algorithm combining broad-spectrum and type-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3292-8
5. Kompas, Jakarta. Deteksi dini kanker. IVA untuk program nasional. Available at: www.kompas.com/kompas-cetak/0704/19/humaniora/3466699.htm-48k
6. American Social Health Association National HPV and Cervical Cancer Resource Center. Human Papilloma Virus. 2004. Available at: http://racocon.com/cgi-bin/dforum/dcboard.cgi?forum=DCForumID15&mark=184&anz=next_topic&archive=yes. 2004
7. Wikipedia, the free encyclopedia. Human papillomavirus. Available at: http://en.wikipedia.org/wiki/Human_papillomavirus. Accessed: 15 February 2006
8. Kornegay JR, Shepard AP, Hankins C, Franco E, Lapointe N, Richardson H, et al. Nonisotopic detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens using a consensus PCR and a generic probe mix in an enzyme-linked Immunosorbent assay format. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3530-6
9. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2001; 357: 1831-6
10. Mortazavi SH, Zali MR, Raoufi M, Nadji M, Kowsarian P, Nowroozi A. The prevalence of human papillomavirus in cervical cancer in Iran. *Research Communication. Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*. 2002; 3: 69-72
11. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Vilanueva SL, Maruo T. The role of human papilloma virus in molecular biology of cervical carcinogenesis. *Minireview. Kobe J Med Sci* 2004; 50: 9-19
12. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9
13. Soderlund-Strand A, Rymark P, Andersson P, Dillner J, Dillner L. Comparison between the hybrid capture II test and a PCR-based human papillomavirus detection method for diagnosis and posttreatment follow-up of cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3260-6
14. Carozzi F, Bisanzio S, Sani C, Zappa M, Cecchini S, Ciatto S, et al. Agreement between the AMPLICHOR human papillomavirus test and the hybrid capture 2 assay in detection of high-risk human papillomavirus and diagnosis of biopsy-confirmed high-grade cervical disease. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 364-9
15. Chang CH, Chen TH, Hsu RC, Chou PH, Yang JJ, Hwang GY. The prevalence of HPV-18 and variants of E6 gene isolated from cervical cancer patients in Taiwan. *J Clin Virol* 2005; 32: 33-7
16. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3020-7
17. Van Hamont Dennis, van Ham Maaik APC, Bakkers Judith MJE, Massuger Leon FAG, Melchers Willem JG. Evaluation of the SPF10-INNO LIPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the Roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3122-9
18. Biedermann K, Dandachi N, Trattner M, Vogl G, Doppelmayr H, More E, et al. Comparison of real-time PCR signal-amplified in situ hybridization and conventional PCR for detection and quantification of human papillomavirus in archival cervical cancer tissue. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3758-65
19. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 357-61
20. Bauer HM, and Manos M. PCR detection of genital human papillomavirus, 1993 p. 407-413. In D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White (eds.). *Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington DC.
21. Munoz N, Bosch FN, de Sanjose S, Herrero R, Castellsaue X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical Cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27
22. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989
23. Coursey BM. Needs for radioactivity standards and measurements in the life sciences. *Appl Radiat Isot* 2000; 52: 609-14
24. Croen KD, Ostrove JM, Straus SE. Detection of varicella-zoster, herpes simplex, and enteric adenoviruses using nucleic acid hybridization. In: Tenover FC, editor. *DNA probes for infectious diseases*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc; 1989: 177-91
25. Clewley JP. The application of DNA hybridization to the understanding of human parvovirus disease. In: Tenover FC, editor. *DNA probes for infectious diseases*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc; 1989: 211-20

26. IAEA-TECDOC-1528. Organization of a radioisotopes based molecular biology laboratory. Vienna, Austria: IAEA; 2006
27. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65
28. Castle PE, Sadorra M, Garcia F, Holladay EB, Kornegay J. Pilot study of a commercialized human papillomavirus (HPV) genotyping assay: Comparison of HPV risk group to cytology and histology. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3915-7
29. Thomas RJ. Early detection of cervical cancer. New diagnostic identify HPV. Available at: pubs.acs.org/hotartcl/mdd/00/jul/Thomas.html. 19-K
30. Azis EAN, Rauf S. Deteksi human papilloma virus (HPV) tipe 16 dengan teknik polymerase chain reaction (PCR) pada kanker serviks uteri. *Maj Obstet Ginekol Indones* 2005; 29: 43-53
31. Prayitno A. Cervical cancer with human papilloma virus and epstein barr virus positive. *J Carcinogenesis* 2006; 5: 13-9
32. Nelson JH, Hawkins GA, Edlund K, Evander M, Kjellberg L, Wadell G, *et al.* A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 688-95