

## Ekspresi Protein Gen E7 Human Papilloma Virus (HPV) Tipe 16 Secara SDS-Page

Suzana Devi<sup>1</sup>, Yufri Aldy<sup>2</sup>, Andani Eka Putra<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Farmasi, Akademi Farmasi Prayoga Padang, Alamat Jl. Sudirman No.50 Padang

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Alamat Limau manis, Pauh, Padang

<sup>3</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Alamat Jl. Perintis Kemerdekaan, Jati

### Detail Artikel

Diterima Redaksi : 30 April 2018

Direvisi : 30 Oktober 2018

Diterbitkan : 31 Oktober 2018

### Kata Kunci

kanker servik; HPV tipe 16; ekspresi gen; SDS-PAGE

### Penulis Korespondensi

Suzana Devi

[suzanadevi@akfarprayoga.ac.id](mailto:suzanadevi@akfarprayoga.ac.id)

### ABSTRAK

Human Papillomavirus (HPV) berkaitan dengan penyebab terjadinya kanker serviks. Salah satu HPV yang beresiko tinggi adalah tipe 16. Protein virus yang beresiko tinggi yang menyebabkan karsinogen salah satunya gen E7. Dikarenakan tingginya tingkat kematian yang di sebabkan oleh kanker servik, salah satu cara untuk mengatasinya adalah dengan cara vaksinasi. Protein E7 merupakan target ideal untuk dapat dijadikan sebagai dasar dalam pembuatan vaksin. Dimana hasil ekspresi gen E7 HPV tipe 16 yang selanjutnya dapat dimanfaatkan dalam membuat antigen spesifik dari gen E7. Proses kloning gen E7 HPV tipe 16 dari peneliti sebelumnya, Isolasi plasmid menggunakan kit (Geneaid®), kultur bakteri yang telah ditumbuhkan pada plat yang mengandung antibiotik. Bakteri yang tumbuh merupakan bakteri yang telah mengandung gen sisipan.

Selanjutnya lakukan over ekspresi. Hasil over ekspresi di tambah IPTG kemudian hasilnya di visualisasikan dengan SDS PAGE. Over ekspresi dari gen E7 HPV tipe 16 berhasil dilakukan dengan terdapatnya pita dari protein dari gen E7 HPV tipe 16 dari hasil SDS-PAGE. Dari penelitian yang telah dilakukan di dapat hasil over ekspresi gen E7 HPV tipe 16 pada ukuran protein dengan kisaran 11,0 kDa. Pita yang didapat terlihat tipis dan samar-samar.

### PENDAHULUAN

Infeksi persisten dengan tipe onkogenik yang disebabkan oleh *Human Papillomavirus* (HPV) adalah penyebab 5% kanker yang terjadi di seluruh dunia. [Wang]. HPV merupakan penyebab kanker serviks pada wanita, diperkirakan sekitar lebih dari 265.000 kematian dan 528.000 kasus baru terjadi pada tahun 2012. Sekitar 85% kasus mayoritas terjadi secara global di negara berkembang, dimana terhitung hampir 12% pada kasus kanker yang terjadi pada wanita keseluruhan [WHO].

Peningkatan kejadian epidemiologi telah mengidentifikasi infeksi persisten yang berhubungan dengan *oncogenichuman a-papillomaviruses* sebagai agen penyebab dari kanker serviks. Dari sekitar 120 HPV yang telah teridentifikasi, hanya sebagian kecil virus (sekitar 20) yang dikategorikan sebagai *oncogenic types* (OT) yang memiliki potensi karsinogenik [Bouvard]. Dimana HPV types 16, 18, 31, 33, 45, 52, and 58 menunjukkan tingkat hubungan tertinggi dengan malignansi serviks. infeksi HPV secara umum ditularkan melalui sentuhan

kulit langsung atau kontak mukosa, dengan kemungkinan terbanyak diakibatkan dari setiap kontak seksua [Chen].

Dari studi eksperimen dan epidemiologi, jelas menunjukkan bahwa infeksi HPV yang beresiko tinggi berhubungan dengan onkogenik E 6 dan E 7 yang merupakan produk gen yang memainkan peranan penting dalam karsinogenesis serviks [Mirshabi].

Sejauh ini vaksinasi merupakan salah satu cara mencegah infeksi HPV yang paling efektif [Rachmani]. Untuk pengembangan vaksin HPV lainnya diperlukan suatu rekayasa genetik salah satunya berasal dari protein E7 dari HPV tipe 16. Rekayasa genetik yang difokuskan pada penelitian ini yaitu suatu teknik DNA rekombinan dengan metoda cloning [Grompe].

Sebelumnya, penelitian *Human Papillomavirus* yang dilakukan dimulai tahun 2014 khususnya di Fakultas Farmasi UNAND dengan judul Deteksi *human papillomavirus* tipe 16 pada urin dan *flour albus* pasien wanita sebagai deteksi dini kanker serviks dengan metoda *polymerase chain reaction*. Dan tahun 2015 dengan judul Pengujian desain primer gen E6 HPV tipe 16 dan tipe 18 pada pasien kanker serviks dengan metoda *multiplex polymerase chain reaction* (MPCR) [Marlina].

Pada tahun 2015 penelitian *human papillomavirus* tipe 16 dilakukan kloning *high risk human papillomavirus* (HR-HPV) onkogen E7 tipe 16, pada penelitian tersebut didapatkan hasil bahwa metode kloning produk PCR E7 HPV tipe 16 ke plasmid pJET 1.2 telah berhasil dilakukan. Sehingga hasilnya dapat dijadikan sebagai pustaka genetik (*gene library*) yang dimanfaatkan sebagai kontrol positif [Fitri].

Oleh karena dari data-data penelitian yang sudah dilaksanakan oleh peneliti-peneliti sebelumnya, maka peneliti ingin meneruskan ke tahap over ekspresi, tujuan dilakukannya overekspresi gen tersebut untuk mendapatkan protein spesifik virus, sehingga bisa dianalisa untuk kemungkinan sebagai kandidat vaksin untuk dapat digunakan dalam pencegahan infeksi virus ini di masa mendatang khususnya pada masyarakat di Negara Indonesia.

## MATERIAL DAN METODE

### Isolasi Plasmid Hasil Cloning *E.coli* DH5 $\alpha$ dan deteksi fragmen

Isolasi plasmid bertujuan untuk mengisolasi plasmid rekombinan di dalam sel bakteri. Koloni tunggal bakteri (putih mengkilap) yang merupakan hasil transformasi dibiakkan dalam medium LB cair yang mengandung antibiotik, didiamkan semalaman pada shaker incubator. Isolasi plasmid dilakukan menggunakan kit Geneaid®, kultur bakteri yang telah ditumbuhkan dan dishaker diambil pelletnya. Plasmid hasil isolasi dapat diferifikasi dan disimpan pada suhu -20°C.

### Transformasi ke *E.coli* BL 21

Proses pengkompetenan sel dilakukan dengan menggunakan kit *Thermo*®. Proses kompeten dilakukan dalam larutan Prewarmed C pada suhu 37°C lalu di sentrifus, pellet ditambahkan larutan T solution dan inkubasi di dalam es, sentrifus kembali, pelet tambahkan T solution dan inkubasi, dan pindahkan ke dalam tabung mikro tube baru (inkubasi), selanjutnya campuran larutan tersebut di kultur pada media LB yang telah berisi antibiotik.

### Over ekspresi ke *E.coli* BL 21

Koloni tunggal yang tumbuh dari *E. coli* BL21, setelah diinkubasi diambil dan diinokulasikan kedalam media LB cair yang mengandung antibiotik, glukosa dan di shaker.

Untuk menginduksi ekspresi ditambahkan (isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactoside) IPTG ketika absorban OD mencapai 0,4 - 0,6 pada spektrofotometer.

### SDS-PAGE

Kegiatan SDS-PAGE diawali dengan gel cassette SDS-PAGE yang digunakan adalah membrane poliakrilamide (Invitrogen by Thermo®).

Lakukan proses running SDS-PAGE sampai selesai, maka gel diambil dengan cara melepaskan gel cassette secara hati-hati.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Kegiatan ini diawali dengan melakukan peremajaan bakteri, karena bakteri yang digunakan masih bersifat inaktif yang tersimpan dalam lemari pendingin. Cara peremajaan bakteri *E. coli* transforman DH 5 $\alpha$  dengan menggosok bakteri ke media LB padat dengan penambahan antibiotik.



**Gambar 1. Cara peremajaan bakteri *E. coli* transforman DH 5 $\alpha$  dengan menggosok bakteri ke media LB padat dengan penambahan antibiotik**

Dari gambar terlihat bahwa bakteri transforman yang digores pada media didalam cawan petri dapat tumbuh dengan sempurna, dan sel bakteri tersebut positif mengandung plasmid dan gen target yang diinginkan, hal ini terlihat tumbuhnya koloni-koloni bakteri pada media. Peremajaan bakteri perlu dilakukan karena untuk mengaktifkan bakteri yang akan kita gunakan pada penelitian.

Setelah itu dilanjutkan pada proses ligasi yang dilakukan menggunakan KIT Thermo®.



**Gambar 2. Hasil ligasi kemudian di transformasikan ke dalam *E. coli* BL21**

Dari gambar terlihat bahwa proses ligasi pada *E. coli* BL21 berhasil dilakukan, hal ini terdapatnya satu koloni pada media. Proses ligasi merupakan proses memasukan sekuen DNA yang mengandung gen yang diinginkan [Grompe]. Pada tahap ini proses ligasi terlihat dengan tumbuhnya satu koloni bakteri yang sudah kita sisipkan gen yang kita inginkan tersebut pada

media dalam cawan petri. Bakteri transforman dapat hidup pada media yang mengandung antibiotik. Adanya IPTG dalam media LB padat akan menghasilkan koloni bakteri yang berwarna biru dan putih. Hanya koloni berwarna putih yang diisolasi karena di dalamnya mengandung plasmid rekombinan [Suharsono].

Deteksi fragmen sisipan di dalam plasmid dilakukan menggunakan teknik PCR. Tahapan PCR lanjutan terdiri dari denaturasi awal 94 °C selama 5 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 54°C selama 30 detik, ekstensi 72 °C selama 1 menit diakhiri dengan ekstensi akhir 72 °C selama 10 menit. Produk PCR dielektroforesis untuk visualisasi deteksi gen sisipan E7 HPV 16.



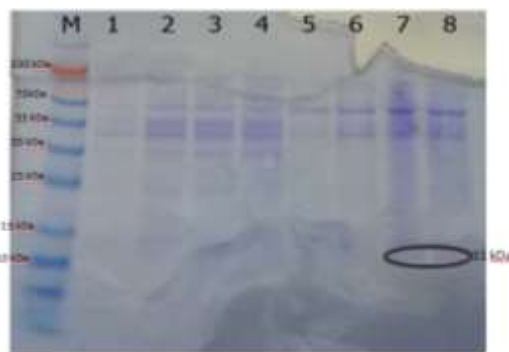
**Gambar 3 : Foto hasil elektroforesis gel agarosa pada isolat DNA hasil isolasi plasmid.**

**Keterangan:** Gel elektroforesis analisis PCR dalam deteksi E7 HPV tipe 16 menggunakan PCR BIO-RAD®

- M : merupakan Marker
- 1 : isolat DNA plasmid pada koloni pertama
- 2 : isolat DNA plasmid pada koloni kedua
- 3 : isolat DNA plasmid pada koloni ketiga
- 4 : isolat DNA plasmid pada koloni keempat
- 5 : isolat DNA plasmid pada koloni kelima

Produk PCR dielektroforesis pada gel agarosa pada gambar 3 visualisasi menunjukkan gen E7 HPV 16 terdeteksi pita pada ukuran sekitar 420 bp. DNA genom sebagian dicerna dengan EcoRI dan fragmen dalam kisaran 400-500 pasang basepare (bp) yang dimurnikan dengan gel elektroforesis [Novel].

Tahap selanjutnya analisa profil protein dari gen virus E 7 HPV di lakukan menggunakan teknig SDS-PAGE, hasil SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4 : Pada gambar terdapat analisa profil protein dari gen virus E 7 HPV dilakukan menggunakan SDS-PAGE.**

**Keterangan:**

Sumur 1 : Leader

Sumur 6 : Protein dari gen E7 HPV 16 yang tidak di tambah IPTG yang merupakan kontrol

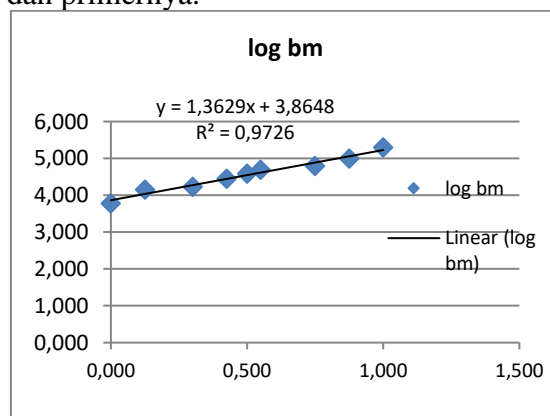
Sumur 7 &amp; 8: Protein dari gen E7 HPV 16 yang di tambah IPTG yang merupakan kontrol.

Pada tahap analisa profil protein gen E 7 HPV 16 dengan SDS-PAGE, *Escherechia coli* (*E. coli*) adalah bakteri gram negatif yang sering digunakan secara luas dalam ekspresi karyotik protein rekombinan. *E. Coli* adalah genom pertama yang telah diakui dan teruji skuensingnya, dan dapat meningkatkan produksi ekspresi gen [Marlina].

Poliakrilamid merupakan medium yang tepat untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran karena ukuran pori – pori kecil yang memungkinkan untuk memperlambat gerakan molekul. Setelah itu dilakukan staining dengan menggunakan Coomasie Brilliant Blue, setelah itu destaining agar band dapat diamati.

SDS-PAGE memisahkan protein berdasarkan berat molekul, sehingga berat molekul protein bisa diestimasi dengan cara merunning protein standar (marker) yang berat molekulnya telah diketahui [Sotlar]. Berat molekul protein diidentifikasi dengan menentukan kurva baku dari marker protein dengan menggunakan Log dari berat molekul dan RF (hasil bagi tracking band dan tracking total). Setelah diketahui persamaan dari kurva baku, maka persamaan tersebut dapat digunakan untuk menghitung berat molekul dari sampel protein yang kita running [Andani].

Visualisasi protein dapat dilakukan dengan beberapa metode pewarnaan, dan metode pewarnaan yang umum digunakan untuk SDS-PAGE adalah comassie blue [McGuigan]. Pada penelitian ini didapatkan Optical Density (OD) 0,4–0,6 yang merupakan tahap mid log untuk pertumbuhan *E.coli*, yaitu terdapat pertumbuhan terbaik bakteri [Rachmani]. Berat molekul dari protein pada gen E7 HPV 16 pada hasil penelitian ini didapatkan 11 kDa. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Amin Daemi dkk pada tahun 2008 secara in-vitro ekspresi protein gen E 7 HPV 16 dengan menggunakan metoda analisa Western blot, mendapatkan berat molekulnya 51 kDa, terjadinya perbedaan pada berat molekul protein gen E 7 HPV 16 yang dilakukan oleh peneliti dengan hasil penelitian ahli lain, hal ini karena perbedaan dalam penggunaan plasmid, kit dan primernya.



**Gambar 4.** Kurva regresi linier gel terlihat pada grafik dari perhitungan Rf dari pitanya

Pada gambar terdapat jarak pita dan log bobot molekul marker gel optimasi. Kurva regresi linier gel optimasi Regresi linier kurva diatas kemudian digunakan sebagai penentu bobot molekul pita pemisahan protein gen E 7 HPV 16.

Intrepetasi dari SDS-PAGE dapat dibaca dengan membuat persamaan regresi linier dari pita marker sebagai standart acuan. Didapatkan  $R^2 = 0,9726$ , semakin mendekati 1 maka persamaan regresi linier yang didapatkan semakin bagus. Semakin mendekati 1 menunjukkan bahwa persamaan tersebut makin menunjukkan kepastian dari berat molekulnya. Setelah mendapatkan persamaan regresi linier dari marker, kita dapat menghitung berat molekul dari sampel dengan cara memasukkan pada persamaan tersebut. Persamaan regresi linier dari marker :  $y = 1,3629x + 3,8648$ .

Berat molekul protein diidentifikasi dengan menentukan kurva baku dari marker protein dengan menggunakan Log dari berat molekul dan RF (hasil bagi tracking band dan tracking total). Setelah diketahui persamaan dari kurva baku, maka persamaan tersebut dapat digunakan untuk menghitung berat molekul dari sampel protein yang kita running [Rachmani].

## SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, dapat disimpulkan bahwa metode Ekspresi Protein pada gen E7 HPV tipe 16 telah berhasil dilakukan dengan menggunakan SDS PAGE. Hasil protein yang didapat dari gen E 7 HPV tipe 16 dapat dijadikan sebagai pustaka genetik (*gene library*) yang nantinya dapat dimanfaatkan untuk acuan awal pembuatan vaksin kanker serviks. Hasil over ekspresi dari gen E 7 HPV 16 didapat BM proteinnya 11 kDa.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima Kasih kepada Bapak Dr. Yufri Aldi, M. Si, Apt dan Bapak Dr. dr. Andani Eka Putra, MS, selaku pembimbing pada penelitian saya ini, Terima kasih atas semua bimbingannya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aldi, Y., Trisnawati, A.N., Putra, A.E., Djamaan, K., Marlina. (2015). Detection of hpv type 45 L2 gene in cervical cancer patients by polymerase chain reaction method. *Int. J. Phram and Pharmaceutical Sci.*
- Amin Daemi , Sahar Hosseinzadeh, Mehrdad Hashemi 5, Elnaz Agi 1, Azam Bolhassani 1. (2008), HPV16 E7-CT (gp96) fusion protein: Molecular cloning, expression and purification of a recombinant 6xHis-tagged protein in E. coli. *Journal of Paramedical Sciences (JPS) Spring. 2012, Vol.3, No.2 ISSN 2008-4978.*
- Amtarina R.(2009). Organisasi genom dan varian molekuler human Papillomavirus tipe 16 sebagai penyebab karsinoma serviks. *JIK, 3(1):6-13.*
- Andani E. P & Efrida, (2015). Kloning dan Overekspresi Protein P24-GAG HIV. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory.* Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik Vol. 22, No. 1 November 2015.
- Ahmad, A. (2014). Bioteknologi dasar. Makassar: Universitas Hasanuddin."Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities," *Gel Electrophoresis Principles and Basics.*

- Bouvard. (2009). Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics*, 12(5-6), 281–290.
- Campbell N., A. L., G., Mitchell, J., B., Reece, M., R., Taylor, E., J., Simon, (2006). *Biology*, 5th ed. Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City, England.
- Clarke MA, Wentzensen N, Mirabello L, Ghosh A, Wacholder S, Harari A, Lorincz A, Schiffman M, Burk RD. (2012). Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer.
- Chen, Z., Schiffman, M., Herrero. (2011). Evolution and Taxonomic Classification of Human.
- Daly, M., Hearn, K., Muratoğlu, H., and Nalçacıoğlu, R. (2004), Cloning and expression of chitinase A, B, and C (chiA, ChiB, ChiC) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities, *Turkish Journal of Biology*, 39(1), pp. 78–87. doi: 10.3906/biy-1404-31.
- Dawn, K. (2000). "Immediate Visualization of Proteins in Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels by Prestaining with Remazol Dyes," *Analytical Biochemistry*, pp. 402-4012.
- Fatchiyah, E.L., Arumingtyas S., Widyarti, & Rahayu, S. (2011). *Biologi molekuler prinsip dasar analisis*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Fitri.M., Marlina., Andani. (2015). Kloning high risk human papilloma virus (HR-HPV) onkogen E7 tipe 16. Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat.
- Gaffar, S. (2007). Penggunaan PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk deteksi Retrovirus HTLV (Human T-Cell Lymphotropic Virus). Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Glick, M.B. Pasternak, K., Klemsdal, V., Aalten, S., Sundheim, and V.G.H., Eijnsink, (2003), *Manuscript Recent Research Developments in Microbiology*.
- Grompe, M., Johnson W., and Jameson L. (1998). *Recombinant DNA and genetic technique In principle of molecular medicine*. Edited by J. Larry Jameson. New Jersey: Humana press inc.
- Groves MJ, (2006), *Pharmaceutical Biotechnology*, hal. 44-55 *Gene Cloning & DNA analysis*, hal. 3-6 dan 8-12; 54-80 dan 87-97.
- Hakim, L. (2010). *Biologi dan patogenesis Human papillomavirus*. Artikel RSU dr. Soetomo, p.164-180.
- Handoyono, D & Ari R . (2000). *Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR)*. Surabaya: Pusat Studi Bioteknologi Universitas Surabaya.
- Hasdianah, dkk. (2014). *Imunologi: Diagnosis dan teknik biologi molekuler*. Yogyakarta: Nuha Medika.

- Hemes, B.D.(1998).Gel Electrophoresis of proteins and Differentiation of Bovine and Porcine Gelatin Based on Spectroscopic and Electrophoretic Analysis Journal food pharmaceutical sciences. 68-73.
- Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T.(1999). Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomavirus types 16 and 6. J Virol 73: 6188-6190.
- Kurnia, E.L., Arumingtyas, S, Widyarti., dan S, Rahayu. 2012. Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis. Penerbit Erlangga.Malang. 191 hal.
- Koganesawa, W.E., Hinori, L.M., Muzikar, K.A. and Osheniba., 2012. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for the cyanine dyes SYBR Safe and thiazole orange. *The Journal of organic chemistry*, 77(23), pp.10967-10971.
- Marlina, Putra, A., E., & Arfinda F., 2015. Pengujian desain primer gen E6 HPV tipe 16 dan tipe 18 pada pasien kanker serviks dengan metoda multiplex polymerase chain reaction (MPCR). Unpublished.
- Marlina, Putra, A., E., & Putra R., P., 2014. Deteksi Human papilloma virus tipe 16 (HPV tipe 16) pada urin dan flour albus pasien wanita sebagai deteksi dini kanker serviks dengan metoda polymerase chain reaction (PCR). Unpublished.
- Marlina, Yufri. A., and Febby A., (2015). Application of MPCR primer for gene E6 HPV type 16 and 18 in cervical cancer patient. Unpublish.
- Marlina, Prima Ramadhani, Andani Eka Putra, Rustini, Yufri Aldi., (2015). Desain Primer Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Gen E6 HPV Tipe 45 dan HPV Tipe 52. Faculty of Pharmacy, and Faculty of Medicine Andalas University.
- Maryam, F. 2011. The Role of Human Papillomavirus in The Molecular Biology of Cervica Carcinogenesis. *Indian. J. Med. Sci* 50(1): 9-19.
- McGuigan M, Sharman M. 2006. Skeletal Muscle Structure and Function. Physiological Assessment of Human Fitness 2nd ed. USA: Sheridan Books.
- Mirshabi, Lawson, J.Roberts,C. (2006). Comparison of Real-Time Multiplex Human Papillomavirus (HPV) PCR Assays with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 1907–1912.
- Mizawarti. 2003. Seputar Teknologi Rekayasa Genetika. Pustaka Wirausaha Muda dan USESE Foundation, Bogor. hal.123. National Cancer Institute. 2015. what is cancer, <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>. Diakses pada 11 april 2016.
- Nomine,Y.,M.Masson, S.charbonnier,K.Zanier,T. ristriani, F Derycke re, A.p.sibler, D.Desplancq, R.A Atkinson, E Weiss, G Orfanoudkis, Bkieffer & G.Trave.,2006,



Structur and fungtion analisis of E7 oncoprotein;insights inmoleculer pathways of human papillomavirus mediated Phtogenesis. Molleculer cell 21; 665-678

- Novel, S. S., Sri, H. H., & Sukma N. 2012. Human papillomavirus (HPV). Mikrobiologi, 39(5):351 -354. Perbandingan beberapa metode molekuler dalam uji DNA HPV (Human Papillomavirus). CDK, 38 (5).
- Pradipta, B. & Saleha, S. 2007. Penggunaan vaksin Human papilloma virus dalam pencegahan kanker serviks. Majalah Kedokteran Indonesia, 57(11):391-396.
- Pratiwi, R. 2001. Mengenal metode elektroforesis. Oseana, 26(1):25-31 & Mengenal Metode Elektroforesis. Oseana. Volume XXVI. Nomor 1. Balitbang Biologi Laut, Puslitbang Osenologi LIPI, Jakarta.
- Rachmani, B. Shaluhiah, Z., & Cahyo, K. 2012. Sikap remaja perempuan terhadap pencegahan kanker serviks melalui vaksinasi HPV di kota Semarang. Media Kesehatan Masyarakat Indonesia, 11(1).
- Raddy and S. Nates, 2002 "Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities," Gel Electrophoresis Principles and Basics, pp. 1-14.
- Rusmana, D. 2009. Aspek onkologi Human papillomavirus. JKM, 9(1):95-101.
- Sambrook, S, S., Russell, T., Basu. 2001. Mechanism of artificial transformation of E. coli with plasmid DNA-clues from the influence of ethanol. Journal of Current Science 83:1376-1380.
- Sarkar, S, S., Chaudhuri, T., Basu. 2002. Mechanism of artificial transformation of E. coli with plasmid DNA-clues from the influence of ethanol. Journal of Current Science 83:1376-1380.
- Sopianti, D, Aldi, Y, Putra, A. Molecular variation of E5 gene human papillomavirus (HPV) from cervical cancer. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 7(5):1695-1701 · January 2016.
- Sisilia, R., T. 2010. Human Papilomma virus. Makassar: Universitas Hassanudin.
- Sjamsuddin, S. 2001. Pencegahan dan deteksi dini kanker serviks. Cermin Dunia Kedokteran, 133:8-13.
- Smith.L.,Barrionuevo-Rosas,L.,Serrano,B.,Brotons,M.,Albero, G. 2007.Human papilloma virus and Related Diseases Report in Indonesia. Barcelona: ICO Information Center on HPV and Cancer. website. <http://www.cancer.org>, diakses pada 22 Februari 2016 pukul 20.17.

- Smrihatmadja, and Herman Susanto (2014) Cloning, Expression and Bioinformatic Analysis of Human Papillomavirus Type 52 L1 Capsid Gene from Indonesian Patient. *Mikrobiologi Indonesia* Vol.8, No.3, September 2014, p 94-102 DOI: 10.5454/ mi.8.3.2
- Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *J. Clin Microbiol* 2004; 42: 3176-3184.
- Suharsono, S. B, Fatchiyah, Rahayu, Widyarti, dan Arumningtyas. 2011. Teknik-Teknik Dasar Analisis Protein dan DNA. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Malang.
- Syukur, G, Endang, Y. 2013. Purifikasi N-asetil-D-glukosamina Hasil Sintesa Secara Enzimatis Untuk Bahan Obat dan Pangan Fungsional. Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Bogor.
- Tsen. 2002. Natural plasmid transformation in *Escherichia coli*. *Journal of Biomedical Science* 9:246-252.
- Valdovinos and Torres, M Orozco, 2008. Different Isoforms of HPV-16 E7 Protein are Present in Cytoplasm and Nucleus. Research Center of Infectious Diseases, National Institute of Public Health, Cuernavaca, Morelos, Mexico.
- Wang, T.P., Doshi, N.R. 2000. Cervical Cancer. *Am Fam Physician* 61(5): 1369-76.
- Westemeier, 2004, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, hal. 47-89 dan 101-110
- WHO. 2012. Human papillomavirus and Related Disease. Summary Report 2014. Available on : [www.who.int/hpvcentre](http://www.who.int/hpvcentre). Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS ONE*, 6(5), e20183.
- Williams H.G., M.J., Day, J.C., Fry. 1996. Use of EDTA to prevent spontaneous cell-to-cell transformation provides a more accurate estimation of gene transfer frequencies. *Biology Techniques* 10:941-946.
- Wilson, 2004. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice*. New-Jersey, John Wiley & Sons inc.
- Yusuf, Z. K., 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Saintek, 5(6). Teori dan aplikasi PCR. Yogyakarta.
- Zhang, H., Z., Zhang, J., Li, and S., Cai. 2007. Effects of  $Mg^{2+}$  on Supported Bilayer Lipid Membrane on a Glassy Carbon Electrode during Membrane Formation. 2, pp. 788–796.