

Frekuensi DNA *human papillomavirus* (HPV) pada penderita kanker leher rahim dari beberapa rumah sakit di Yogyakarta berdasarkan uji PCR

Titik Nuryastuti¹, Sofia Mubarika², Burham Warsito³

¹Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

²Bagian Biologi Tumor & Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

³Bagian Ilmu Penyakit Kandungan & Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada/ Rumah Sakit Dr. Sardjito Yogyakarta

ABSTRACT

Titik Nuryastuti, Sofia Mubarika, Burham Warsito - *The frequency of human papillomavirus (HPV) DNA on cervical cancer patients from several hospitals in Yogyakarta by PCR test.*

Background : Cancer of the uterine cervix (cervical cancer) is one of the most common malignant neoplasm in women in developing countries and remains a major public health problem worldwide. Several studies have proved the role of HPV as an agent STD (sexually transmitted disease), in the pathogenesis of Cervical cancer, beside the other risk factors.

Objective : The aim of this study was to know the frequency of HPV infection in Yogyakarta.

Material and Methods : 44 samples of Cervical cancer biopsies were collected from Sardjito General Hospital, Bethesda Hospital and private doctors, and stored frozen. DNA isolated from the biopsies of cervical cancer was amplified by PCR using consensus primer (CP I and CP IIG) from E1 ORF (188 bp) of HPV.

Result : HPV DNA was detected in 84.1 % of the samples. In CIN I, 20 % samples were infected with HPV, 100 % in Ca epidermoid, 66.4 % in adeno Ca and 0 % in Ca adenosquamosa

Conclusion : The frequency of HPV in cervical Ca biopsies of certain histopathological status in Yogyakarta by PCR method was proved to be very high.

Key words : HPV infection - cervical Ca - biopsy - PCR

ABSTRAK

Titik Nuryastuti, Sofia Mubarika, Burham Warsito - *Frekuensi DNA human papillomavirus (HPV) pada penderita kanker leher rahim dari beberapa rumah sakit di Yogyakarta*

Latar Belakang: Kanker leher rahim (KLR) merupakan jenis kanker yang paling banyak diderita oleh wanita di berbagai negara berkembang dan tetap menjadi masalah kesehatan utama di seluruh dunia. Beberapa penelitian membuktikan bahwa virus *human papilloma* (*Human Papilloma Virus/HPV*) sebagai salah satu agen penyakit menular seksual (PMS), berperan dalam patogenesis kanker leher rahim, di samping beberapa faktor risiko lainnya.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui frekuensi infeksi HPV pada kasus KLR dari beberapa rumah sakit di Yogyakarta dengan metode PCR.

Bahan dan Cara: Sampel yang digunakan adalah jaringan biopsi segar KLR dari RSUP Dr Sardjito, RS Bethesda, dan praktek dokter swasta sebanyak 44 sampel, selanjutnya disimpan pada -70°C kemudian dilakukan isolasi DNA dari jaringan tersebut. DNA hasil isolasi kemudian diamplifikasi dengan metode PCR dengan primer CPI/CPIIG dari ORF E1 genom HPV.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 44 sampel yang diperiksa 37 sampel (84,1 %) positif terinfeksi HPV. Infeksi HPV ditemukan pada 20 % kasus CIN I (Cervical Intraepithelial Neoplasia I), 100 % pada kanker epidermoid, 66,4 % pada kanker adenokarsinoma dan 0 % pada kanker adenoskuamosa.
Simpulan: Frekuensi HPV pada biopsi KLR status histopatologis tertentu terbukti sangat tinggi dengan pemeriksaan metode PCR

(B.I.Ked. Vol. 34, No.4: 201-206, 2002)

PENGANTAR

Di negara berkembang angka kejadian kanker leher rahim (KLR) adalah yang tertinggi di samping kanker payudara. Jumlah kedua kanker ini mencapai 1/3 dari seluruh kanker yang terjadi pada wanita. Kanker leher rahim merupakan jenis kanker yang paling banyak diderita oleh wanita di berbagai negara berkembang dan merupakan masalah kesehatan utama di seluruh dunia. Angka kejadian KLR di Indonesia diperkirakan 150 -180 per 100.000 penduduk.¹ Menurut data histopatologi Indonesia tahun 1988, dari semua jenis kanker pada wanita kanker leher rahim menduduki urutan pertama (18,2%).² Angka insidensi menurut umur (*age standardized incidence rate*) penderita KLR di DIY pada tahun 1992 adalah 7,69 tiap 100.000 penduduk, sedangkan di Kodya Yogyakarta sendiri mencapai 13,97 tiap 100.000 penduduk. Insidensi tertinggi terjadi pada wanita kelompok umur 25-49 tahun.³

Penelitian epidemiologis selama bertahun-tahun telah menunjukkan bahwa faktor risiko KLR antara lain adalah adanya riwayat penyakit menular seksual, kontak seksual pertama kali pada usia muda, dan multipartner. Faktor risiko yang lain misalnya adalah status sosial ekonomi yang rendah, penggunaan kontrasepsi oral, merokok, dan multiparitas.⁴ Penemuan lebih lanjut dalam biologi molekular menunjukkan bahwa virus *human papilloma* (HPV/*human papillomavirus*) berperan dalam patogenesis KLR, seperti yang dilaporkan oleh zur Hausen⁵ bahwa infeksi HPV dapat terdeteksi pada 80-90 % pasien displasia dan KLR.

Dalam studi lebih lanjut dibuktikan bahwa HPV yang menginfeksi mukosa anogenital dibagi dalam 3 grup : tipe *high risk oncogenic* (tipe 16, 18, 45, 56), tipe *intermediate risk* (tipe 31, 33, 35, 51, 52, 54) dan tipe *low risk oncogenic* (tipe 6, 11, 42, 43, 44).^{6,7} Menurut penelitian Bosch *et al*⁸ di Indone-

sia frekuensi infeksi HPV pada kasus kanker leher rahim adalah 95,7%.

Berdasarkan uraian di atas, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui frekuensi infeksi HPV pada kasus kanker leher rahim di DIY. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi masukan data untuk strategi pencegahan kanker leher rahim, misalnya untuk pengembangan vaksin dan penyuluhan kepada masyarakat tentang HPV sebagai agen penyebab penyakit menular seksual dan akibatnya.

BAHAN DAN CARA

Bahan utama penelitian adalah biopsi segar penderita kanker leher rahim dari Rumah Sakit Dr Sardjito, RS Bethesda, dan Praktek Dokter Swasta (44 sampel). Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 1999 sampai dengan bulan Desember 2000. Biopsi segar segera dibekukan pada -70°C untuk diproses lebih lanjut. SiHa *cell line* yang mengandung genom HPV -16 digunakan sebagai kontrol dalam PCR.

SiHa *cell line* yang mengandung DNA HPV 16 dikultur dalam media RPMI 1640 dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Kultur sel ini dipelihara sampai konfluen atau bila medium telah berubah warna menjadi kuning, sel dapat dipanen untuk selanjutnya diisolasi DNA-nya. Kultur sel dapat terus dibiakkan sebagai sumber DNA atau disimpan (*cryopreservation*) dalam nitrogen cair sampai suatu saat akan digunakan kembali (*thawing*).⁹

Isolasi DNA HPV dari biopsi segar kanker leher rahim diperlakukan sesuai dengan prosedur Smith.¹⁰ Sebelum mulai bekerja dibersihkan peralatan dengan etanol 70%. Dengan mata pisau skalpel, jaringan biopsi dipotong kira-kira 0,1 mm³ dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml. Ditambahkan *buffer extraction* DNA 300 µl dan

3 µl proteinase K 20 mg/ml ke dalamnya, kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 56°C selama 4 jam (atau 37°C semalam). Campuran tersebut diinkubasi lagi pada suhu 95°C selama 10 menit untuk menginaktivasi proteinase K. Selanjutnya tabung disentrifuse 10 menit, 12000 rpm dalam mikrosentrifuse. Ditambahkan 300 µl fenol/kloroform/isoamilalkohol (25:24:1) ke dalam tabung, dan divortex, disentrifuse 2 menit, 12 000 rpm dan lapisan atas (DNA) dipindah ke tabung baru secara hati-hati. Larutan yang berisi DNA tersebut diendapkan dengan menambahkan 30 µl 2,5 M Naasetat pH 5,2 dan 500 µl etanol absolut dingin. Inkubasi dilakukan pada suhu -20°C semalam. Disentrifuse 20 menit pada 40°C. Selanjutnya pellet dicuci 1x dengan etanol 70% dingin dan dikeringkan dalam vacuo. Kemudian pellet DNA dilarutkan dalam buffer TE (30-40µl).

Selanjutnya dilakukan amplifikasi DNA hasil isolasi dari jaringan biopsi dengan primer konsensus CP I dan CP IIG, yang diambil dari ORF E1 genom HPV, dan mengamplifikasi 188 bp (posisi nukleotida 1777 - 1964). Sekuen dari primer tersebut adalah :

Forward (5' PCR primer) : CP IIG : 5' ATG TTA AT(A/T) (G/C)AG CC(A/T) CCA AAA TT
Reverse (3'PCR primer) : CP I : 5'TTA TCA (T/A)AT GCC CA(T/C) TGT ACC AT

Kondisi dan campuran PCR sebagai berikut : Campurkan 23,8 µl *distillated water*, 5 µl 10 x bufer PCR *free Mg* (Promega), 4 ml 25 mM MgCl₂ (Promega), 5 ml BSA 10x 1mg/ml, 5 µl 2 mM dNTPs, 1µl primer CPI, 1ml primer CPIIG, 0,2 ml *Taq polymerase* konsentrasi 5U/µl dan 5 µl sampel DNA, sehingga total volume reaksi 50 µl.

Amplifikasi dilakukan dalam mesin PCR sebanyak 40 siklus, dengan diawali *jump start* pada suhu 95°C selama 5 menit. Setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit dan *elongation* selama 2 menit pada suhu 72°C, kemudian pada siklus terakhir *elongation* diperpanjang selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan elektroforesis produk PCR untuk memeriksa hasil amplifikasi fragmen yang diinginkan pada gel agarose 2% (w/v).¹⁰

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengumpulan Sampel Biopsi dan Isolasi DNA Genom

Dalam penelitian ini telah dikumpulkan sampel biopsi jaringan kanker leher rahim sebanyak 44 sampel, berasal dari pasien yang datang di poliklinik Onkologi Bagian Obstetri-Ginekologi RSUP Dr Sardjito (34 sampel), Poliklinik Ginekologi RS Bethesda (5 sampel) dan praktek dokter swasta (5 sampel). Berdasarkan hasil pemeriksaan histopatologinya, ternyata lima sampel menunjukkan CIN III (*cervical intraepithel neoplasia*). Hal ini disebabkan pengambilan sampel biopsi untuk penelitian ini tidak berdasarkan pada hasil pemeriksaan secara *frozen section*, tetapi berdasar pada kecurigaan klinis dan pemeriksaan kolposkopi penderita.

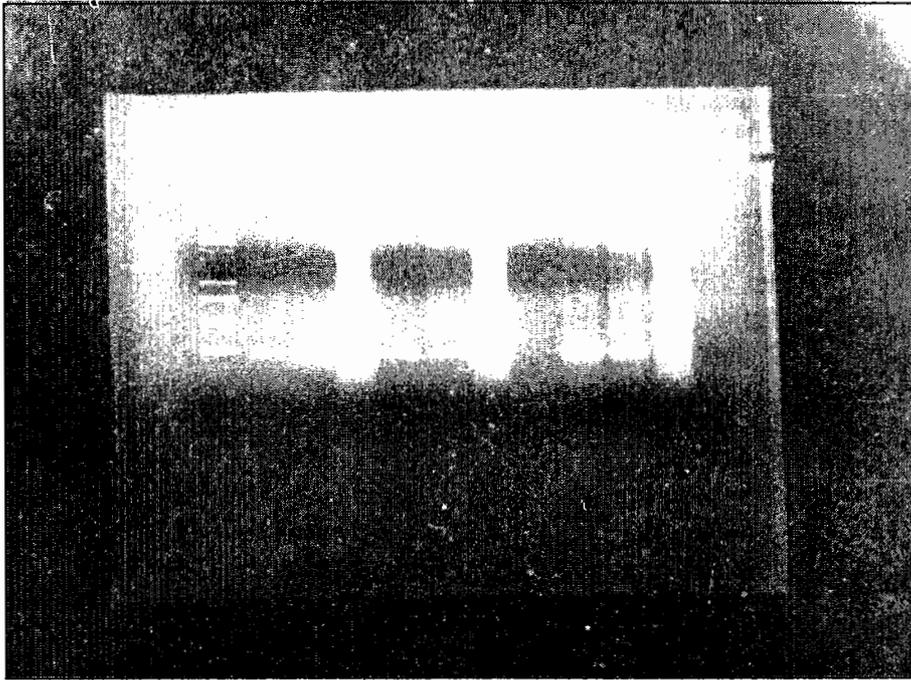
Jaringan biopsi kanker leher rahim tersebut segera disimpan pada -70°C dan kemudian diisolasi DNANYA dengan prosedur seperti yang dilaporkan Smits *et al.*¹⁰

Hasil Polymerase Chain Reaction

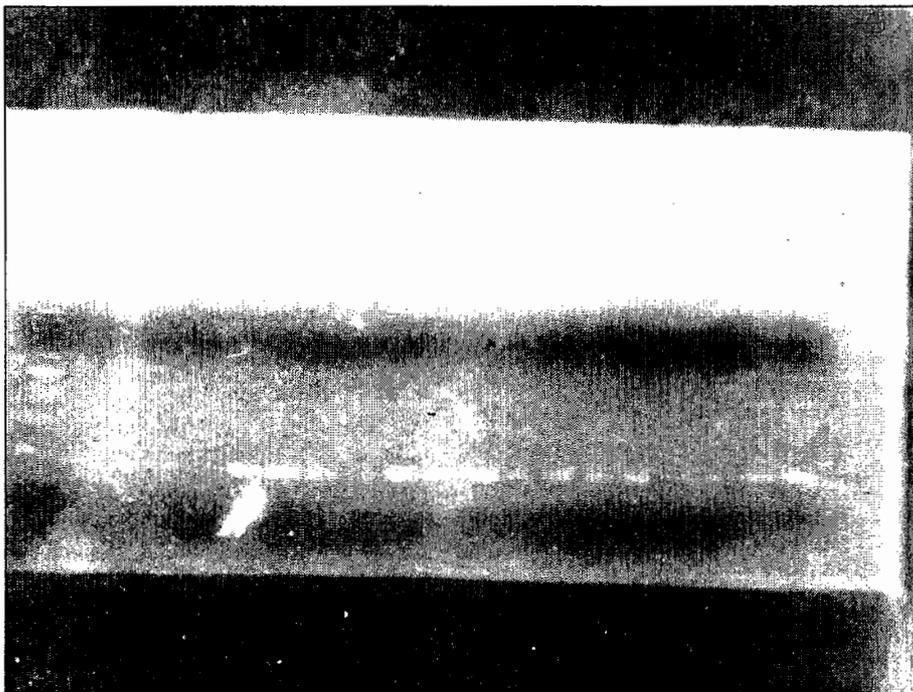
Polymerase Chain reaction dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah dalam sampel jaringan biopsi terdapat DNA virus *human papilloma* atau tidak. *Primer* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *primer* konsensus (CP I dan CP II) yang spesifik untuk daerah *open reading frame* (ORF) E1 virus *human papilloma* sepanjang 188 bp.

Hasil amplifikasi genom virus *human papilloma* ORF E1 dari 44 sampel biopsi dapat dilihat pada GAMBAR 2. Perbedaan konsentrasi stok DNA *template* memberi perbedaan intensitas pita DNA hasil amplifikasi.

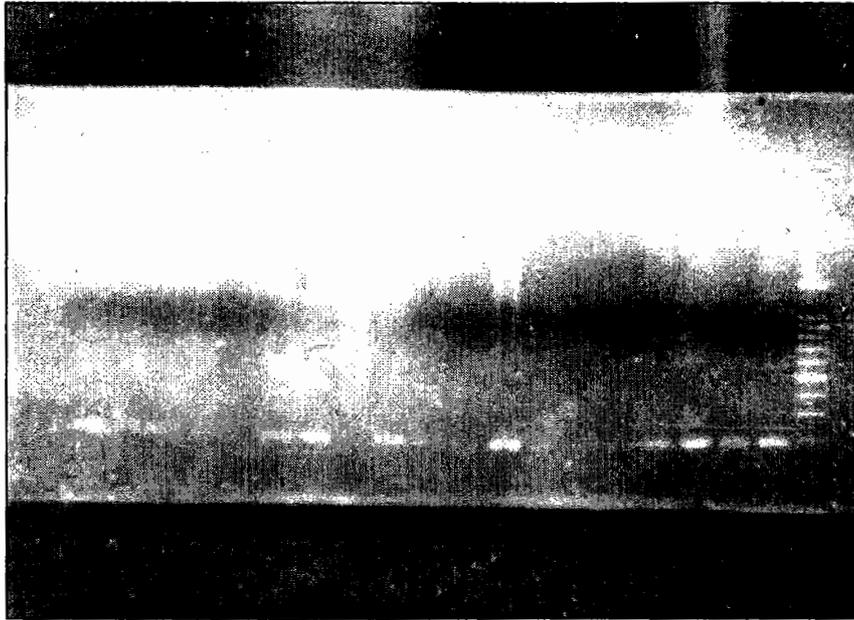
Dari hasil PCR 44 sampel biopsi, dilaporkan bahwa 37 (84,1%) sampel positif mengandung DNA HPV ORF E1, dengan munculnya pita DNA sepanjang 188 bp. Sedangkan 7 (15,9%) sampel lainnya tidak terdapat DNA *human papillomavirus*, karena tidak ada pita hasil amplifikasi sepanjang 188 bp. Ketidakmunculan pita hasil PCR pada sampel-sampel ini kemungkinan disebabkan, a) tidak adanya gen virus *human papilloma*, b). delesi ORF E1 genom HPV (ORF E1) pada sampel tersebut atau c). pengambilan sampel biopsi untuk isolasi DNA tidak tepat.



GAMBAR 1. Gambaran elektroforegram produk PCR penderita KLR pada agarose 2 %. M adalah marker 100 bp. K adalah kontrol positif (SiHa *cell line*), Lajur 1-9 adalah sampel penderita KLR no. 1-9. Tampak pita hasil amplifikasi sepanjang 188 bp pada sampel no.1-8, Sampel no. 9 negatif.



GAMBAR 2. Gambaran elektroforegram produk PCR penderita KLR pada agarose 2%. M adalah Marker 100 bp, K adalah kontrol positif (SiHa *cell line*), lajur 10-26 sampel no. 10-26. Semua sampel menunjukkan pita hasil PCR.



GAMBAR 3. Gambaran elektroforegram produk PCR penderita KLR pada agarose 2%. Lajur 27-44 adalah sampel no.27-44, K adalah kontrol positif (SiHa cell line), M adalah Marker 100 bp. Pita hasil PCR tampak pada no. 27,28,29,,32,,33,35,36,37,38,42,43,44.

Dari lima sampel penderita CIN III (sampel no. 1,5,9,30,31) ternyata hanya 2 sampel yang menunjukkan terinfeksi HPV (40%), sedangkan dari 39 sampel jaringan KLR 35 di antaranya dilaporkan terinfeksi HPV (89,7%). Hasil penelitian ini sesuai dengan yang dilaporkan Zur Hausen⁵ bahwa infeksi HPV dapat dideteksi dalam 80-90% pasien dengan displasia dan KLR. Bosch *et al*⁸ juga menyatakan bahwa DNA HPV terdapat pada 100% pasien KLR di Asia Tenggara dan 95,7% di Indonesia.

TABEL 1 menunjukkan bahwa frekuensi DNA *Human papillomavirus* pada kanker epidermoid (96,9 %) lebih tinggi daripada jenis kanker yang lain. Hal ini berbeda dengan pendapat Bosch *et al*⁸ yang menyatakan bahwa di Asia Tenggara DNA

HPV yang ditemukan pada kanker epidermoid, adenokarsinoma dan kanker adenoskuamosa mempunyai frekuensi sama besar yaitu 100%. Walaupun frekuensi DNA HPV pada berbagai status histopatologi berbeda, tetapi secara statistik tidak ada perbedaan yang bermakna, sehingga tidak ada hubungan antara frekuensi DNA HPV dengan status histopatologi jaringan KLR.

SIMPULAN

1. Dengan metode PCR didapatkan frekuensi HPV pada penderita kanker leher rahim dari beberapa rumah sakit di Yogyakarta adalah sebesar 89,7%.

TABEL 1. - Distribusi DNA HPV pada berbagai status histopatologis (HPA) KLR

Jenis HPA	Kelompok	Kasus	HPV +	
			N	%
	CIN I	5	2	20
	Ca epidermoid	32	31	96,9
	Adeno Ca	6	4	66,7
	Ca Adenoskuamosa	1	0	0

2. DNA HPV ditemukan pada 40% kasus CIN I, 96,9% pada kanker epidermoid, 66,7% pada kanker adenokarsinoma dan 0% pada kanker adenoskuamosa.

SARAN

Penelitian lanjutan untuk menentukan tipe HPV, misalnya menggunakan enzim restriksi, PCR, hibridisasi atau sekuensing perlu dilakukan, mengingat bahwa tipe HPV dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan pendekatan pembuatan vaksin. Juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pola agresivitas tumor dengan melihat ekspresi gen p53 dan pRb secara imunohistokimiawi

KEPUSTAKAAN

1. Pusat Data Kesehatan, Profil Kesehatan Indonesia 1995. Departemen Kesehatan RI, Jakarta, 1996.
2. Suhatno. Palliative Care in Cervical Cancer, MOGI, Surabaya, 1996.
3. Soeripto. Epidemiology of The Uterine Carcinoma. Presented in Part : Development of Vaccination for Cancer and Viral Disease : An Approach to Molecular Biology As Prevention and Therapy Conference. Inter University Center for Biotechnology, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia, 1998.
4. Sekiya S. *Human papillomavirus* and cervical cancer, *Asian Med.J*, 1996; 39(12): 652-56.
5. Zur Hausen H. *Human papillomavirus* in the Pathogenesis of anogenital cancer, *Virology*, 1991; 184: 9-13.
6. Tieben LM, ter Schegget J, Minnaar RP, Bouwes Bavinc JN, Berkhout BJ, Vermeer BJ, *et al*. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical amples by PCR using consensus primers, *J Virological Methods*, 1993; 42: 265-80.
7. Howley PM & Shah KV. Papillomaviruses in Bernard N. Fields BN. Knippe DM and Howley PM (eds): *Field Virology 3 rd ed.*, Lipincott Raven Publ., Philadelphia, 1996.
8. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM., Peto J, *et al*. Frequence of *Human papillomavirus* in Cervical Cancer : a Wordwide Perspective. *J. Natl Cancer Inst*, 1995; 87(11): 796-802.
9. Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 2*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S, 1989.
10. Smits HL, Bollen LJM, Tjong-A-Hung SP, Jan Vong, Velden J., Ten Kate FJW, *et al*. Intermethod Variation in Detection of *Human papillomavirus* DNA in Cervical Smears, *J Clin Microbiol*, 1995; Okt: 2631-36.