

Diagnosis Molekuler Human Papilloma Virus (HPV) Penyebab Kanker Serviks

Lipinwati

Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi

Email: drlipinwati@yahoo.co.id

ABSTRACT

Cervical cancer is still the one of major public health problem in the world whether an effective screening programs using the Papanicolaou test to detect precancerous lesions has reduced the number of cases of cervical cancer in the developed countries but not in developing countries. The sensitivity and specificity of the *Pap smear* depends on observer's skills to recognize and classify variations of abnormal cells.

Human Papilloma Virus (HPV) caused cervical cancer has been proved, In some study have found HPV DNA in 99.7 % of all cervical carcinomas. HPV has been found to be more than 100 genotypes , which are divided into high-risk HPV and low-risk HPV

The development of early diagnosis for the detection of HPV infection still has been a problem, where the cytology and colposcopy to identify lesions at an advanced stage, therefore the molecular engineering approach seems to be more successful in early diagnosing cervical cancer. This technique of molecular HPV DNA sequences are *Southern Blot Hybridization*, *Hybrid Capture II Assay*, *Polymerase Chain Reaction*, and *PCR - Reverse Line Blot*. The Accuracy of molecular diagnostic techniques is required to provide further information for patient how the management and maintenance of cervical cancer.

Keywords: Cervical cancer, HPV, screening, molecular techniques

ABSTRAK

Kanker Serviks masih merupakan salah satu masalah utama kesehatan masyarakat di dunia dan program skrining yang efektif menggunakan *Papanicolaou tes (Pap smear)* untuk mendeteksi lesi prekanker telah mengurangi jumlah kasus kanker serviks pada negara yang sudah berkembang tetapi tidak pada negara yang sedang berkembang. Sensitivitas dan spesifisitas dari *Pap Smear* tergantung pada keterampilan pengamat untuk mengenal dan mengklasifikasi variasi sel abnormal.

Human Papilloma Virus sebagai penyebab kanker serviks telah dibuktikan. Pada penelitian ditemukan HPV DNA pada 99.7% pada semua karsinoma serviks, dimana HPV yang telah ditemukan lebih dari 100 genotipe, yang terbagi menjadi HPV resiko tinggi dan resiko rendah

Perkembangan diagnosis dini untuk mendeteksi infeksi HPV telah menjadi masalah dimana pemeriksaan sitologi dan kolposkopi untuk mengidentifikasi lesi pada stadium lanjut, oleh karena itu pendekatan teknik molekuler menjadi lebih berhasil dalam mendiagnosis kanker serviks secara dini. Dimana teknik molekuler yang mengenai sekuens HPV DNA adalah *Southern Blot Hybridization*, *Hybrid Capture II Assay*, *Polimerase Chain Reaction*, *PCR - Reverse Line Blot*. Teknik molekuler diagnostik yang akurat diperlukan untuk memberikan informasi kepada pasien untuk managemennya dan perawatan lanjut.

Kata kunci: kanker serviks, HPV, skrining, teknik molekuler

PENDAHULUAN

Kanker serviks merupakan salah satu masalah utama kesehatan masyarakat di dunia dengan 231.000 kematian setiap tahun. Lebih dari 80% dari 500.000 kasus baru terdiagnosa kanker serviks pada negara berkembang. Program skrining yang efektif menggunakan papanicolaou tes untuk mendeteksi lesi prekanker telah mengurangi jumlah kasus kanker serviks pada negara yang telah berkembang akan tetapi tidak pada negara yang sedang berkembang. Sensitivitas dan spesifisitas dari *Pap smear* tergantung pada keterampilan pengamatan untuk mengenal dan mengklasifikasi variasi sel abnormal.

Human Papillomavirus sebagai penyebab kanker serviks telah dibuktikan. Pada penelitian ditemukan Human Papilloma Virus Deoksiribo Nukleic Acid (HPV DNA) pada 99.7% pada semua karsinoma serviks¹ dan tipe yang paling sering ditemukan adalah tipe 16, 18, 31 dan 45. Ini telah dibuktikan bawah infeksi oleh Human Papilloma Virus (HPV) resiko tinggi sangat penting dalam perkembangan kanker serviks dan menjadi alasan WHO untuk menetapkan bahwa HPV 16 dan HPV 18 menjadi agen karsinogen pada manusia.

Pada perkembangan kanker serviks perlu dipikirkan banyak faktor dimana HPV merupakan faktor penting. Penyakit hanya dapat berkembang bila adanya infeksi HPV yang persisten pada epitel serviks. Setiap lesi yang abnormal atau displasia dari serviks menjadi potensial maligna dan akan berkembang menjadi kanker serviks. Epitel serviks yang abnormal dapat dideteksi dengan *Pap Smear*.

Telah diketahui bahwa peran infeksi HPV pada perkembangan kanker serviks menginduksi respon humoral terhadap berbagai antigen virus, khususnya terhadap protein kapsid mayor L1. Pemeriksaan HPV menggunakan penanda untuk mendeteksi adanya virus pada lesi di serviks meskipun ini tidak mengindikasikan suatu infeksi yang produktif, uji tersebut masih sangat penting dalam pemeriksaan kanker serviks untuk mendeteksi tipe HPV. Lesi klinik dan perubahan sitologi menjadi teknik yang paling sering digunakan untuk mengidentifikasi lesi prakanker, dan beberapa dihubungkan dengan adanya infeksi HPV. Karena alasan tersebut, teknik molekuler dan *Pap Smear* sebaiknya dilakukan pada wanita dengan resiko terinfeksi HPV dengan tujuan untuk mencegah atau mengontrol perkembangan kanker serviks.

PEMBAHASAN

I. Human Papillomavirus (HPV)

HPV termasuk *Family Papillomaviridae*, dengan diameter 55 - 69 nm dan merupakan virus tidak berselubung, berstruktur ikosahedral. HPV mempunyai 2 protein kapsid (protein mayor dan protein minor) yang menginfeksi berbagai vertebrata termasuk manusia² dan DNA sirkuler rantai ganda dengan panjang genom sekitar 8000 bp. Viral genom mengandung *Open Reading Frame* (ORF) yang terbagi dalam 3 daerah, yaitu:

1. *Early region* (E) sekitar 45% dari genom, terdiri dari protein E1, E2, E4, E5, E6, E7. Protein E1 berperandalam kontrol replikasi episomal DNA, protein E2

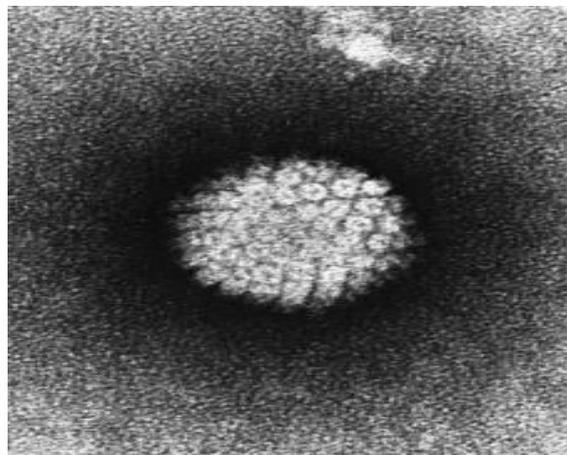
berperan dalam siklus hidup yang menekan atau mengaktifkan promotor virus, protein E4 terlibat dalam pematangan partikel virus, dan protein E5 bergabung dalam membran sitoplasma. Dua onkoprotein transformasi dihasilkan oleh E6 dan E7.²

2. *Late Region* sekitar 40% genom, yang mengkode protein kapsid, yang terdiri atas L1 (protein besar berukuran 54.000 da yang bersifat lestari untuk tipe HPV

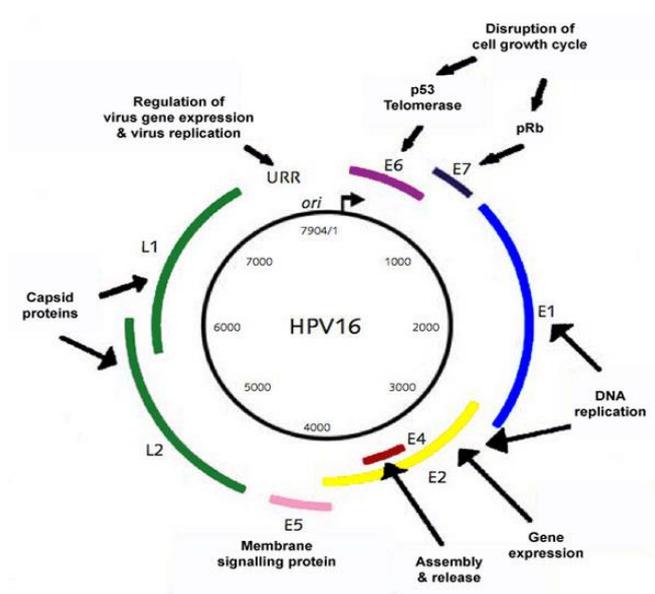
yang berbeda dan L2 (protein spesifik untuk tiap tipe virus).²

3. *Long Control Region* sekitar 15% dari genom virus yang mengandung promotor untuk memulai replikasi dan kontrol transkripsi.

Dapat dikatakan bahwa perkembangan kanker serviks sebagai konsekuensi dari siklus virus yang menyebabkan siklus sel deregulasi pada berbagai tingkat tergantung pada jenis HPV onkogen.



Gambar 1. HPV dengan Mikroskop Elektron³



Gambar 2. Skema genom HPV⁴

Sampai saat ini telah diklasifikasikan sebanyak 118 genotipe HPV secara molekuler, dengan perbedaan sekuens pada L1 sebanyak 10% dari genotipe HPV yang telah diketahui. Klasifikasi subtipe HPV bila terdapat perbedaan maksimal 2% pada sekuens L1.⁵ Berdasarkan kemampuan menyebabkan kanker serviks, HPV telah diidentifikasi sebanyak 18 tipe HPV resiko tinggi, yaitu: HPV tipe 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82.

II. DETEKSI DINI KANKER SERVIKS

Kanker serviks dapat dicegah bila melakukan pemeriksaan lebih dini. Untuk melakukan deteksi dini kanker serviks diantaranya dengan melakukan *Pap smear*. *Pap smear* atau *Papanicolaou smear* yang merupakan pemeriksaan serviks. Pemeriksaan ini untuk mengetahui adanya kelainan sel serviks. *Pap smear* sebaiknya dilakukan 1 kali setiap tahun oleh setiap wanita yang sudah melakukan hubungan seksual.

Di negara maju, *Pap smear* telah terbukti menurunkan kejadian kanker serviks invasif sebesar 46 – 76% dan mortalitas kanker serviks sebesar 50 – 60%, namun di Indonesia tercatat hanya 5% penduduk wanita yang melakukan pemeriksaan *Pap Smear* secara rutin.⁶ Walaupun skrining pencegahan kanker serviks telah dilakukan, tetapi kanker serviks masih menyebabkan mortalitas dan morbiditas pada wanita. Di negara maju, skrining dengan sitologi mengalami penurunan kematian, dimana tujuan skrining dengan sitologi adalah untuk mendeteksi kanker dan lesi prakanker

dengan sensitivitas 30- 87% dan spesifisitas 68 – 100%.⁵

Teknik pengambilan spesimen untuk *Pap smear* didahului dengan pemeriksaan dalam, dengan menggunakan speculum untuk membuka liang vagina sehingga tampak serviks. Pemeriksa akan mengambil sel serviks menggunakan suatu alat yang disebut spatula, dioles pada objek gelas dan difiksasi dengan alkohol 95% kemudian dibawa ke laboratorium untuk diproses. Waktu yang diperlukan untuk proses sampai dengan pembacaan hasil secara mikroskopik oleh ahli patologi adalah sekitar sekira 3 – 7 hari. Berdasarkan hasil pemeriksaan bisa diketahui apakah sel-sel rahim yang tampak normal atau menunjukkan kelainan.

Pemeriksaan *Pap smear* menunjukkan angka negatif palsu yang tinggi, yaitu sekitar 5 – 50%, hal ini dikarenakan kegagalan dalam pengambilan usapan yang baik, pengambilan sel yang tidak cukup, sel abnormal sedikit, lokasi lesi tidak dapat dijangkau, lesi kecil, ada darah atau pembengkakkan sel menyembunyikan sel abnormal. Pemeriksaan *Pap smear* juga tidak dapat mendeteksi ada atau tidaknya HPV.

Dalam perkembangan kanker serviks, pendeteksian HPV secara molekuler merupakan faktor penting disamping pemeriksaan sel epitel serviks yang abnormal dengan metode *Pap smear*. Untuk mendeteksi kanker serviks secara dini sebaiknya dilakukan kombinasi pemeriksaan *Pap smear* untuk melihat lesi pada serviks dan pendeteksian HPV DNA untuk mengetahui tipe HPV.

III. TEKNIK BIOLOGI MOLEKULER

Ada beberapa teknik molekular yang digunakan untuk deteksi HPV DNA. Teknik Molekular yang akan dibahas, yaitu:

1. Metode hibridisasi asam nukleat secara langsung (contoh: *Southern Blot hybridization*)

Southern Blot merupakan metode untuk menguji keberadaan dari suatu sekuens DNA dalam suatu sampel DNA. Metode ini ditemukan oleh seorang ahli biologi dari Inggris yang bernama Edward M. Southern yang mengembangkan prosedur ini pada tahun 1975 di Universitas Edinburgh.⁷ Metode ini mengkombinasikan proses elektroforesis jel agarosa untuk memisahkan DNA berdasarkan ukuran dengan fragmen DNA hasil elektroforesis yang ditransfer ke membran filter. Proses selanjutnya membran dihibridisasi dengan probe spesifik. Pada awal penelitian HPV, *Southern Blot* merupakan metode baku emas untuk analisis genom HPV.^{7,8}

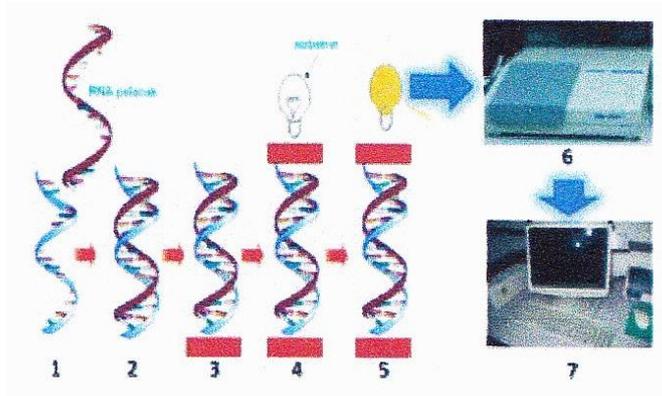
Proses perpindahan fragmen DNA yang terpisah dengan teknik elektroforesis jel ke membran seperti membran nitroselulosa dilakukan berdasarkan prinsip kapilaritas, dimana bufer yang merupakan fase gerak diasumsikan akan membawa fragmen DNA dari jel ke membran. DNA yang bermuatan negatif sedangkan membran bermuatan positif sehingga fragmen DNA akan menempel pada membran nitroselulosa.

Southern Blot mempunyai sensitivitas yang rendah untuk mendeteksi HPV pada

spesimen klinik maupun mengidentifikasi tipe HPV. Metode *Southern Blot* membutuhkan waktu yang lama, memerlukan DNA dalam jumlah banyak, dan membutuhkan tenaga teknisi yang terlatih. Metode *southern blot* tidak dapat dilakukan pada jaringan yang difiksasi dengan formalin dikarenakan DNA akan terdegradasi.^{8,9}

2. *Hybrid capture II assay (HC II)*

Hybrid Capture System (HC-II) adalah metode pemeriksaan hibridisasi dengan teknologi terbaru di bidang biologi molekuler.¹⁰ Teknik HC-II digunakan pada kondisi lebih awal yaitu kemungkinan seseorang terinfeksi HPV sebelum virus tersebut membuat perubahan pada serviks yang akhirnya dapat mengakibatkan terjadinya kanker serviks. HC-II telah diakui dunia serta disahkan oleh FDA (Food and Drug Administration) Amerika Serikat.¹¹ HC-II memiliki keakuratan yang tinggi dalam mendeteksi infeksi HPV karena mampu mendeteksi keberadaan DNA HPV dalam jumlah sangat kecil.¹⁰ Teknik HC-II adalah antibody capture/solution hybridization/signal amplication assay yang memakai deteksi kualitatif chemiluminescence terhadap DNA HPV. Secara umum HC-II adalah teknik berbasis DNA-RNA yang dapat mendeteksi secara akurat dan cepat dengan sensitivitas 98% dan spesifisitas 98%.¹¹



Gambar 3. Prinsip Kerja HC-II

Keterangan gambar: 1. DNA yang sudah terdenaturasi, 2. Hibridisasi DNA virus dengan probe RNA, 3. Hybrid DNA-RNA berikatan antibody spesifik, 4. Ikatkan antibody dengan hybrid DNA-RNA akan bereaksi dengan alkaline phosphatase, 5. Reaksi ini menghasilkan sinyal chemiluminescent, 6. Sinyal amplifikasi dalam bentuk emisi.

Metode HC II ini mempunyai akurasi sebesar 92 – 94% terhadap teknik pemeriksaan sitologi/histologi, memerlukan waktu pemeriksaan yang lebih singkat, tidak terdapat atau hanya sedikit kontaminasi dan dapat memperkirakan kuantitatif jumlah virus tanpa mengetahui genotipe HPV.^{12,13} Metode HC II menggunakan 2 jenis probe untuk mendeteksi HPV, yaitu probe HPV resiko tinggi (HPV tipe 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) dan probe HPV resiko rendah (HPV tipe 6, 11, 42, 43, 44).¹¹

3. Metode amplifikasi target (*Polimerase Chain Reaction/PCR*)

Amplifikasi target merupakan teknik analisis DNA yang paling fleksibel dan sensitif dibandingkan dengan teknik southern blot dan HC II. Teknik ini dapat digunakan untuk mendeteksi, menghitung viral load, DNA sekuensing, dan analisis mutasi.^{14,15} PCR atau reaksi berantai polimerase adalah suatu metode enzimatik untuk memperbanyak secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu secara invitro.³⁴

PCR pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1985.¹⁰ Metode PCR ini dapat dilakukan secara multipleks dimana target DNA multiple dan dapat dianalisis secara simultan. Sensitivitas metode target amplifikasi dapat ditingkatkan dengan sintesis sekuens DNA target yang spesifik.¹⁶ Cara kerja PCR adalah mengamplifikasi DNA hasil isolasi dengan 3 tahapan, yaitu denaturasi (linearisasi DNA terjadi pada suhu 95°C), annealing (penempelan primer pada DNA target yang akan diperbanyak), dan elongasi (polimerisasi). Hasil amplifikasi selanjutnya dapat dideteksi dengan teknik elektroforesis menggunakan alat elektroforesis jel agarosa. Teknik elektroforesis adalah teknik yang memisahkan molekul-molekul berdasarkan berat molekulnya dalam sebuah medan listrik pada medium padat atau semi padat.¹⁷ Metode PCR dapat diterapkan dengan sampel dan komponen dalam jumlah sedikit, PCR merupakan metode yang sensitif dan dapat mendeteksi tipe HPV khususnya HPV

resiko tinggi. Metode genotyping PCR memerlukan waktu yang lama, mahal, dan

memerlukan teknik laboratorium yang tinggi.

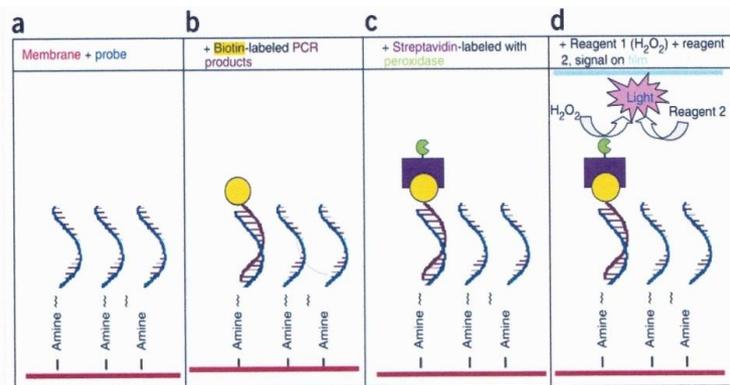


Gambar 4. Alat PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

4. PCR - Reverse Line Hybridization (contoh: Linear Array HPV Genotyping test)

PCR – Reverse Line Blot (RLB) merupakan metode modifikasi PCR, yaitu hasil amplifikasi PCR dideteksi menggunakan cara hibridisasi dengan oligonukleotida spesifik yang diimmobilisasi pada membran nitroselulosa. Teknik ini sangat sensitif dan dapat mendeteksi DNA sekitar 100 ag. Teknik ini dapat digunakan untuk mendeteksi genotipe HPV pada infeksi campuran.^{18,19}

Cara kerja PCR - RLB adalah sebagai berikut: Probe oligonukleotida dengan tipe HPV spesifik diimmobilisasi pada membran kemudian dihibridisasi dengan produk PCR berlabel biotin yang sebelumnya telah didenaturasi dalam kondisi basa. Setelah proses hibridisasi, membran kemudian dicuci. Hasil hibrid dapat dideteksi dengan penambahan streptavidin – peroksidase dan substrat yang akan menghasilkan warna pada garis-garis probe dan diinterpretasi secara visual.²⁰



Gambar 5. Mekanisme *Reverse Line Blot*

Keterangan gambar: (a) Probe terikat secara kovalen dengan amine, membran dengan muatan negatif. (b) Amplikon yang berlabel biotin hibridisasi dengan probe. (c) Streptavidin yang dilabel dengan peroxidase diinkubasi pada membran dan terikat dengan afinitas tinggi pada produk pcr yang berlabel biotin. (d) Penambahan substrat menghasilkan cahaya.

KESIMPULAN

HPV telah diketahui sebagai penyebab kanker serviks, maka diagnosis HPV berhubungan dengan pemeriksaan DNA virus pada sampel pasien berperan penting dalam mengetahui perkembangan kanker serviks yang disebabkan oleh HPV resiko tinggi. Metode biologi molekular menjadi

sangat sensitif dalam pendeteksian HPV DNA pada kasus infeksi baru ataupun infeksi lama. Namun teknik molekular ini membutuhkan keterampilan teknik yang tinggi. Untuk mendeteksi dini kanker serviks sebaiknya dilakukan kombinasi pemeriksaan Pap Smear dan pemeriksaan HPV DNA.

DAFTAR PUSTAKA

1. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, kummer JA, Shah K. V, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol* 1999;189:12 - 19
2. Steenbergen RDM, de Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF, Meijer CJLM. HPV-Mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol*. 2005;32S:25-33.
3. http://www.redorbit.com/education/reference_library/health_1/viruses/2583960/human_papillomavirus/
4. <http://www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html>
5. de Villers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hansen H. Clasification of papillomavirus. *Virology*. 2004;324:17-27
6. Hoyo C, Yarnall KSH, Skinner CS, Moorman PG, Sellers D, Reid L. Pain predicts non-adherence to pap smear screening among middle-aged African American women. *Prev Med*. 2005;41:439-45.
7. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol*. 1975; 98:503 – 517.
8. Ausubel FM. Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods From Current Protocols in Molecular Biology. Fourth Edition. New York, NY.Wiley.1999.
9. Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor, NY:Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
10. Nuswantara S. Seminar Deteksi dini dan PEnangan Terkini Kanker Leher Rahim: Deteksi Human Papiloma Virus Dalam Pencegahan Dini Kanker Leher Rahim. Bandung. Santosa Bandung International Hospital. 2008.
11. Castle PE, Lorinz AT, Lohnas IM, Scott DR, Glass AG, Sherman ME, et al. Result of Human Papillomavirus DNA Testing with the Hybrid Capture II Assay are Reproducible. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):1088-90.
12. Novel RSS, Safitri SH, Harijanto S, Nuswantara. Perbandingan beberapa Metode Molekuler dalam Uji DNA HPV. *CDK* 186. 2011;38;5.
13. Yuwono T. Teori dan Aplikasi PCR. Penerbit Andi. Yogyakarta. 2006.
14. A quantitative polymerase chain reaction-enzyme immunoassay for accurate measurements of human papillomavirus tupe 16 DNA levels ini cervical scraping. *Br. J. Cancer*. 1999; 81:114-121.

15. Meyer T, Arndt R, Stockfleth E, Flammann HT, Wolf H, Reischl U. Strategy for typing human papillomaviruses by RFLP analysis of PCR products and subsequent hybridization with a generic probe. *Biotechniques*. 1995;19:632-9.
16. Hubbard RA. Human Papillomavirus Testing Methods. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127(8):940-5.
17. Brown, Terry A. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. Wiley-Blackwell. 2010: 35-36.
18. Bekkers RLM, Melchers WJG, Bakkers JMJE, Hanselaar AGJM, Quint WGV, Boonstra H, et al. The role of genotype-specific human papillomavirus detection in diagnosing residual cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer*. 2002;102:148-51.
19. Perrons C, Kleter B, Jelley R, Quint W, Tedder R. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA by SPF 10 and MY 09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic. *J Med Virol*. 2002;67:246-52.
20. Kong F, Gilbert LG. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)- a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nat protoc*. 2006:2668-80.