

GEN L1 HPV 16 DAN 18 SEBAGAI DASAR DALAM DESAIN PRIMER UNTUK DETEKSI KANKER LEHER RAHIM DENGAN *IN-HOUSE MULTIPLEX PCR*

Tazkia Ayu Safitri¹, Dessy Nurul Jannah Patty², Henny Saraswati^{3*}

^{1,2,3}Prodi Bioteknologi-Universitas Esa Unggul

Jl. Arjuna Utara No.9, Kebon Jeruk, Jakarta Barat 11510

[*hennysaraswati@esaunggul.ac.id](mailto:hennysaraswati@esaunggul.ac.id)

Abstract

Cervical cancer generally caused by Human Papillomavirus (HPV) types 16 and 18 infection. This disease has high death rate in women all over the world. In HPV there are 2 capsid proteins, namely major capsid protein (L1) and minor (L2), where L1 protein is present on the surface of the virus and plays an important role in viral infection to the cervical epithelium while L2 protein plays a role in stabilizing the capsid. There is a genetic variation up to 10% in the L1 gene which can be used to distinguish HPV types. This study aims to design primers based on L1 gene in the detection of HPV types 16 and 18 infections, using the In-house Multiplex Polymerase Chain Reaction (Multiplex PCR) technique. Primers were designed with 'Primer BLAST' tool of NCBI website (National Center for Biotechnology Information) and its specificity was tested with the 'Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)' tool. Some of the primer candidates were then re-selected using several criteria, such as Tm temperature, %GC and self 3' complementary. The annealing temperature optimization was carried out with selected primers using HeLa cells. The result showed that designed primers specifically recognize HPV 16 and 18. In addition, the primer can be used in HPV 18 detection using multiplex PCR method with an optimal temperature of 58.9 °C.

Keywords : HPV 16, HPV 18, *in-house multiplex PCR*, L1 gene, cervical cancer

Abstrak

Kanker leher rahim merupakan penyakit kanker yang umumnya disebabkan oleh infeksi *Human Papillomavirus* (HPV) tipe 16 dan 18. Penyakit ini merupakan salah satu penyakit dengan tingkat kematian besar, sekitar 300.000 kematian pada wanita di seluruh dunia setiap tahun. Pada HPV terdapat 2 protein kapsid, yaitu protein kapsid mayor (L1) dan minor (L2), dimana protein L1 terdapat pada permukaan virus dan berperan penting dalam infeksi virus ke epitel serviks sedangkan protein L2 berperan dalam stabilisasi kapsid. Terdapat variasi genetik hingga 10% pada gen L1 yang dapat digunakan untuk membedakan tipe HPV. Penelitian ini bertujuan untuk membuat desain primer yang sesuai untuk gen L1 untuk deteksi infeksi HPV tipe 16 dan 18 menggunakan teknik *In-house Multiplex Polymerase Chain Reaction* (Multiplex PCR). Primer didesain menggunakan perangkat 'Primer Blast' yang ada di dalam website National Center for Biotechnology Information (NCBI) dan diuji spesifisitasnya dengan perangkat 'Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)'. Beberapa kandidat primer yang didapatkan kemudian diseleksi kembali dengan beberapa kriteria, seperti suhu Tm, %GC serta self 3' complementary. Optimasi suhu penempelan (*annealing*) dilakukan dengan primer terpilih menggunakan sel HeLa. Hasil yang didapatkan memperlihatkan primer yang didesain spesifik mengenali HPV 16 dan 18 yang menginfeksi manusia. Selain itu, primer dapat digunakan dalam deteksi HPV 18 dengan metode *multiplex PCR* dengan suhu optimal 58,9°C.

Kata kunci : HPV 16, HPV 18, *in-house multiplex PCR*, gen L1, kanker leher rahim

Pendahuluan

Kanker leher rahim merupakan penyakit kanker yang umumnya disebabkan oleh infeksi *Human Papillomavirus* (HPV). Penyakit ini merupakan salah satu penyakit dengan tingkat kematian besar pada wanita di seluruh dunia, sekitar 300.000 kematian tiap tahun. Tipe virus yang sering menyebabkan kanker leher rahim adalah HPV tipe 16 dan 18.

Human Papillomavirus (HPV) merupakan virus penyebab penyakit kanker leher rahim yang memiliki genom sirkular berupa DNA untai ganda. Pada HPV terdapat 2 protein kapsid, yaitu protein kapsid mayor (L1) dan minor (L2), dimana protein L1 terdapat pada permukaan virus dan berperan penting dalam infeksi virus ke epitel serviks sedangkan protein L2 berperan dalam stabilisasi kapsid. Terdapat variasi genetik hingga 10%

pada gen L1 yang dapat digunakan untuk membedakan tipe HPV.

Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mendeteksi infeksi HPV adalah dengan teknik PCR. *Polymerase chain reaction* (PCR) merupakan proses perbanyakan atau amplifikasi DNA, dimana salah satu komponen yang dibutuhkan untuk teknik PCR adalah primer. Primer merupakan sekuen nukleotida pendek yang berperan penting dalam proses PCR. Desain primer dilakukan untuk memperoleh primer yang dapat digunakan untuk amplifikasi DNA dengan teknik PCR. Primer untuk amplifikasi DNA HPV sudah banyak didesain untuk beberapa penelitian dengan tujuan yang beragam. Namun, desain primer HPV tetap perlu dilakukan untuk setiap penelitian. Hal ini dikarenakan setiap penelitian memiliki tujuan dan kondisi lingkungan kerja yang bervariasi. Menggunakan desain primer yang disesuaikan dengan kebutuhan masing-masing penelitian dapat mengurangi bias pada hasil penelitian. Selain itu dengan desain primer yang sesuai akan dapat menghemat waktu, menggunakan sampel seoptimal mungkin (Bustin, 2017).

Penelitian ini bertujuan membuat desain primer untuk gen L1 yang digunakan untuk deteksi infeksi HPV tipe 16 dan 18 menggunakan teknik *In-house Multiplex Polymerase Chain Reaction* (Multiplex PCR).

Metode Penelitian

Primer didesain menggunakan perangkat 'Primer Blast' yang ada di dalam website NCBI (National Center for Biotechnology Information) dan diuji spesifisitasnya dengan perangkat 'Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)'. Setelah terpilih kandidat primer, tahap selanjutnya adalah melakukan optimasi suhu *annealing* untuk kandidat terpilih primer terpilih menggunakan DNA yang diisolasi dari sel HeLa.

Desain Primer menggunakan situs NCBI

Sekuen yang digunakan untuk desain primer ini adalah sekuen gen L1 dari tipe HPV 16 dan 18 di wilayah asia. Sekuen gen L1 tersebut didapatkan dari situs NCBI yang bisa diakses melalui alamat <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Setelah itu masuk ke tools "Primer Blast" lalu masukkan sekuen gen L1 yang telah didapatkan sebelumnya. Pada tool ini dilakukan desain primer dengan primer3 kemudian dilanjutkan dengan BLAST untuk melihat spesifisitas dari primer yang berhasil di desain. Setelah menekan tombol 'get primer' maka akan keluar hasil 10 kandidat primer yang sesuai dengan sekuen gen L1 HPV. Pemilihan primer selanjutnya didasarkan pada kriteria primer yang baik untuk teknik PCR. Hasil dari seleksi ini adalah 1 kandidat

primer HPV 16 dan 18 yang selanjutnya akan digunakan untuk optimasi suhu penempelan pada PCR konvensional.

Optimasi Suhu Penempelan untuk PCR Konvensional

Optimasi suhu penempelan pada proses PCR perlu dilakukan untuk menemukan kondisi reaksi yang optimal untuk menghasilkan produk. Interval suhu yang digunakan untuk optimasi suhu penempelan adalah 55°C - 65°C. Perangkat yang digunakan untuk reaksi PCR konvensional adalah *MyTaq HS DNA Polymerase* (Bioline, Kanada). Campuran reaksi menggunakan rekomendasi dari manufaktur dengan beberapa modifikasi, yaitu 5x Taq Reaction Buffer = 5 ul, Primer HPV16 forward = 0,8 ul, primer HPV16 reverse = 0,8 ul, primer HPV18 = 0,8 ul, primer HPV18 = 0,8 ul, ddH₂O = 15,3 ul, MyTaq HS DNA polymerase = 0,5 ul dan template DNA = 1 ul.

Campuran PCR kemudian dimasukkan ke dalam thermal cycler (Labcycler 48, Sensoquest, Jerman) dengan siklus reaksi yang terdiri dari denaturasi awal : 95°C selama 1 menit, denaturasi lanjut : 95°C selama 15 detik, penempelan : gradien suhu 55-65°C selama 15 detik, dan elongasi : 72°C selama 15 detik. Siklus reaksi ini dilakukan hingga 30x pengulangan. Kemudian hasil optimasi dianalisis menggunakan elektroforesis agarosa dengan konsentrasi agarosa sebesar 1% , voltase 100V selama 25 menit. Pita DNA yang terbentuk dibandingkan dengan marker DNA 100 bp (Geneaid, Taiwan). Kemudian dilakukan pewarnaan pita DNA menggunakan Florosafe DNA Stain (1st BASE, Singapura) pada TAE 1x (Lonza, Swiss). Pewarnaan dilakukan selama 3 menit dan proses penghilangan warna non spesifik (*destaining*) dilakukan selama 30 menit. Hasil pewarnaan divisualisasikan dengan mesin dokumentasi gel (FireReader V10, Uvitec, Inggris) dan disimpan dalam bentuk *soft file*.

Hasil dan Pembahasan

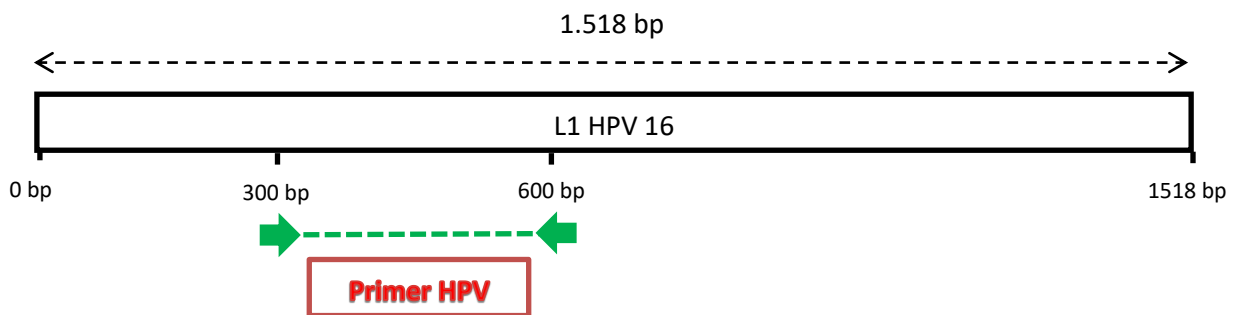
Desain Primer menggunakan situs NCBI

Berdasarkan hasil desain primer menggunakan tool 'primer blast' pada situs NCBI, didapatkan kandidat masing-masing 10 pasang primer gen L1 untuk HPV 16 dan 18. Beberapa kandidat primer yang didapatkan kemudian diseleksi kembali sesuai dengan kriteria primer yang baik untuk reaksi PCR (Sasmito, 2014), beberapa diantaranya seperti panjang primer, melting temperature (T_m), GC Content dan *self 3'complementary*. Panjang primer berkisar antara 18-30 basa, jika panjang primer lebih dari 30 basa maka primer menjadi tidak spesifik. Kemudian pasangan primer sebaiknya memiliki selisih T_m

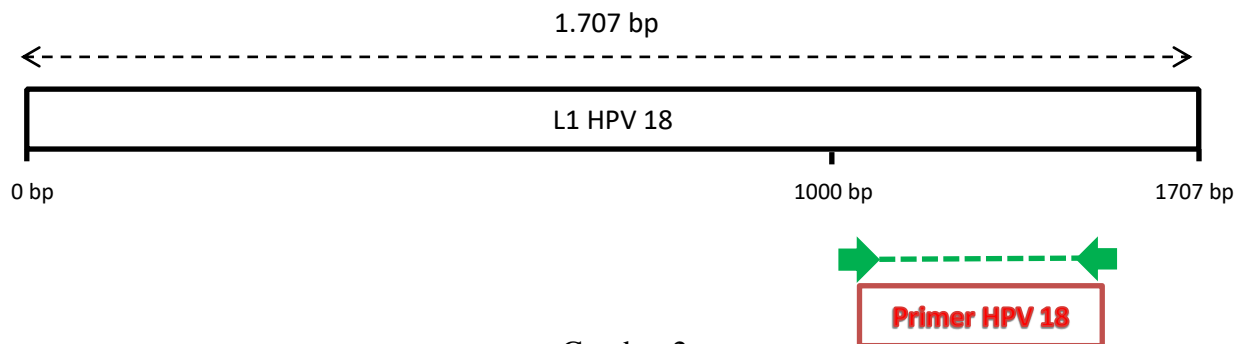
sekitar 5°C agar tidak terjadi penurunan proses amplifikasi. Persen basa G dan C pada primer yang baik sekitar 40%-60%. Lalu untuk kriteria primer yang baik, disarankan memiliki *self 3' complementary* yang rendah agar pasangan primer tidak berikatan dengan dirinya sendiri dan membentuk struktur *hairpin*.

Setelah menentukan pemilihan primer berdasarkan kriteria yang telah disebutkan

sebelumnya, terdapat 1 pasang primer L1 untuk HPV 16 dan 1 pasang primer L1 untuk HPV 18 seperti yang terdapat pada Tabel 1 dan 2. Posisi relatif dari primer dengan gen L1 dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1
Posisi relatif primer terhadap gen L1 HPV 16



Gambar 2
Posisi relatif primer terhadap gen L1 HPV18

Tabel 1
Pasangan primer HPV 16 yang berhasil didesain (20 basa)

	Primer HPV 16	T _m	%GC	Self 3'Complementary
Forward	TTTGGGCCTGTGTAGGTGTT	59,45	50	0
Reverse	AGTCCATAGCACCAAAGCCA	59,3	50	0

Tabel 2
Pasangan primer HPV 18 yang berhasil didesain (20 basa)

	Primer HPV 18	T _m	%GC	Self 3'Complementary
Forward	TTCTCCCTCTCCAAGTGGCT	60,18	55	1
Reverse	CACACGCTTGGCAGGTTTAG	59,76	55	0

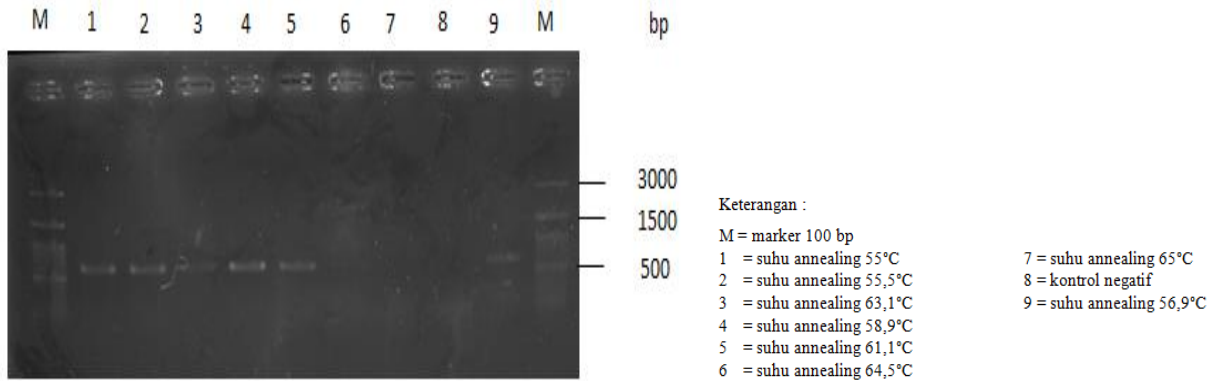
Optimasi Suhu annealing untuk PCR Konvensional

Primer HPV tipe 16 dan 18 yang sudah di desain akan digunakan untuk PCR konvensional tipe

multiplex, yaitu di dalam satu reaksi akan menggunakan 2 pasang primer secara bersamaan untuk menghasilkan pita DNA yang spesifik. Hal ini akan meminimalisasi biaya dan tenaga yang

dibutuhkan dibandingkan dengan menganalisis adanya pita DNA HPV 16 atau 18 secara terpisah. Optimasi suhu penempelan juga dilakukan pada

reaksi PCR konvensional untuk mengetahui pada suhu berapakah primer dapat menempel pada DNA cetakan.



Gambar 3

Hasil optimasi suhu annealing reaksi PCR konvensional terdapat pada pita DNA nomor 4 (warna paling terang)

Pada hasil di atas memperlihatkan bahwa reaksi tidak terkontaminasi, yang dapat dilihat dari tidak terdapatnya pita DNA pada bagian kontrol negatif. Molekul DNA cetakan merupakan DNA yang diisolasi dari sel HeLa. Besarnya DNA target adalah 631 bp sesuai dengan prediksi panjang pita DNA yang terbentuk dari proses PCR menggunakan primer terpilih. Hasil yang didapat dari hasil elektroforesis memperlihatkan adanya pita DNA yang sejajar dengan penanda DNA antara 500 bp dan 700 bp. Pita DNA yang paling tebal terlihat pada reaksi dengan suhu annealing sekitar 58,9°C. Maka dapat diasumsikan bahwa suhu annealing yang paling optimal adalah sekitar 58,9°C. Selain itu, primer yang digunakan cukup spesifik mengenali HPV 18. Hal ini terlihat adanya pita DNA tunggal hasil amplifikasi.

Kesimpulan

Pada penelitian ini berhasil didapatkan masing-masing pasangan primer yang sesuai untuk HPV tipe 16 dan 18. Kemudian hasil desain primer tersebut dapat digunakan dalam deteksi HPV 18 dengan metode *multiplex PCR* dengan suhu optimal 58,9°C.

Daftar Pustaka

D.G, Pradnyaniti. I.N, Wirajana. S.C, Yowani. Desain primer secara *in silico* untuk amplifikasi fragmen gen *rpoB mycobacterium tuberculosis* dengan *polymerase chain reaction* (PCR). Jurnal Farmasi Udayana. 2013

Pradita, Anandayu. Sahiratmadja, Edhyana. Suhandono, Sony. Susanto, Herman. Sekuens Gen Protein Kapsid Mayor L1 *Human Papillomavirus* 16 dari Isolat Klinik Asal

Bandung. MKB, 46. 2014

Puspitasari, Agatha. Widodo. Konstruksi Protein *Transcription Activator-like Effector* (TALE) 1 dan 2 dengan Target Sekuen DNA strain HPV tipe 16 dan 18. Jurnal Biotropika, 3. 2014

Sasmito, Dinda. Kurniawan, Rahadian. Muhinnah, Izzati. Karakteristik Primer pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Sekuensing DNA: *Mini Review*. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed). 2014. 94-97

Setiawati, Dewi. *Human papilloma virus* dan kanker serviks. Al Sihah: *Public Health Science Journal*, 6. 2014.

WHO. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer Key facts How HPV infection leads to cervical cancer. 2018.

Burd E. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2003;16(1):1–17. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673607614160>

Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(1):11–22.

World HPV Information Center. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. *HPV Inf Cent Rep*. 2017;(Indonesia):60.

Pusat Data dan Informasi. Situasi Penyakit Kanker. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2015. 1-

35 p.

- Kemenkes RI. Panduan Penatalaksanaan Kanker serviks. Jakarta: Kemekes RI; 1-36 p.
- Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. 2008;27(50):6398–406.
- Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):47–59.
- Eimani B., Sanati M., Houshmand M, Ataei M, Akbarian F, Shakhssalim N. Expression and Prognostic Significance of Bcl-2 and Bax in The Progression and Clinical Outcome of Translational Bladder Cell Carcinoma. *Cell J*. 2014;15(4):356–64.
- Noordhuis MG, Eijsink JJH, Roossink F, De Graeff P, Pras E, Schuurin E, et al. Prognostic cell biological markers in cervical cancer patients primarily treated with (Chemo)radiation: A systematic review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;79(2):325–34.
- Yue Y, Yang H, Wu K, Yang L, Chen J, Huang X, et al. Genetic Variability in L1 and L2 Genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China. *PLoS One*. 2013;8(1).
- Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology* [Internet]. 2012;9(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-262>
- Xiao C-Y, Fu B-B, Li Z-Y, Mushtaq G, Kamal MA, Li J-H, et al. Observations on the expression of human papillomavirus major capsid protein in HeLa cells. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2015;15(1):53. Available from: <http://www.cancerci.com/content/15/1/53>
- Bustin, S and Jim Huggett. qPCR Primer Design Revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*. 14: 19-28