

Analisis Variasi Genetik Gen L1 Hpv (*Human Papillomavirus*) Tipe 16 Asal Sumatera Barat {Analysis Of Genetic Variation Of L1 Gene Hpv (Human Papillomavirus) Type 16 West Sumatera Origin}

Andre Prima Rahmadhana^{1*}, Marlina¹, Akmal Djamaan¹, Andani Eka Putra², Ifan Aulia Candra³

¹Universitas Andalas Padang, Indonesia, andre.primas@gmail.com

²Universitas Andalas Padang, Indonesia

³Universitas Andalas Padang, Indonesia

Abstrak

Variasi nukleotida gen L1 terhadap data terkait di *Gene Bank* dilakukan dengan menggunakan 5 isolat DNA tipe 16 asal sumbar dimana setelah di amplifikasi hanya 2 yang berhasil di amplifikasi dan dilanjutkan dengan tahap sekuensing yakni sampel 3 dan sampel 4. Analisis dilakukan menggunakan data sekuensing untuk kemudian dilakukan blast, konstruksi pohon filogenetik. Hasil analisis data sekuensing menunjukkan sampel 3 memiliki kekerabatan dengan sekuen L1 di Gene Bank KU.9551191.1 dan sampel 4 memiliki kekerabatan dengan sekuen L1 JX313706.1.

Kata Kunci: Gen L1, pohon filogenetik, primer BLAST, HPV 16, sekuensing.

Abstract

The nucleotide variation of the L1 gene with respect to the related data in Gene Bank was carried out using 5 type 16 DNA isolates from the source where after amplification only 2 were successfully amplified and followed by sequencing stages namely sample 3 and sample 4. The analysis was carried out using sequencing data to be blasted, the construction of phylogenetic trees. The results of the sequencing data analysis showed that sample 3 had a relationship with the L1 sequence in Gene Bank KU. 951191.1 and sample 4 had a relationship with the sequence L1 JX313706.1.

Keywords: *L1 Gene, Phyllogenetic tree, Primer BLAST, HPV 16, sekuencing*

PENDAHULUAN

Infeksi terus menerus dan berkelanjutan yang menyebabkan sejumlah 5% terjadi secara global yang diakibatkan oleh Human Papillomavirus (HPV) [10]. Penyebab kanker urutan ke empat terbesar pada wanita ini menimbulkan kanker serviks sebanyak setengah juta pada 2006 [8], dimana penyakit ini menyebabkan sejumlah kematian 266.000 dan peningkatan kasus baru sebanyak 528.000 pada tahun 2012 dan lebih dari 80% terjadi di Negara berkembang yang menyumbang 12% kanker segala usia pada wanita [18].

a-Papillomavirus mengakibatkan kanker serviks yang berkelanjutan dimana dua puluh tipe tergolong sebagai onkogenik dari 120 tipe yang teridentifikasi diantaranya HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52, dan 58 banyak ditularkan melalui sentuhan pada kulit dan hubungan seksual [16]. Secara filogenetik, HPV penyebab kanker serviks dikelompokkan dalam Human papillomavirus 16 (Alpha-9) atau Human Papillomavirus 18 (Alpha-7) yang merupakan termasuk tipe onkogenik atau beresiko tinggi [5].

HPV terdiri dari DNA untai ganda yang melingkar memiliki panjang 7900-8000 pasangan basa atau nukleotida dan tersusun atas tiga bagian yakni Upstream Regulatory Region yang mengontrol replikasi dan transkripsi virus, bagian early gene yang terdiri dari enam open reading frame (ORF) yang meliputi E1, E2, E4, E5, E6, dan E7 yang berfungsi dalam penggandaan dan proses intra seluler virus di sel inang meliputi transkripsi, transformasi, replikasi dan penyesuaian virus di lingkungan sel host serta bagian ke tiga adalah late gene yang terdiri dari gen L1 dan L2 yang berfungsi sebagai pembentuk protein struktur virus serta sebagai fasilitator pematangan bungkus virus. Kestabilan gen L1 dalam genomik virus dijadikan dasar untuk klasifikasi HPV pada pertemuan 'Nomenclature of Papillomaviruses' yang diadakan pada konferensi internasional *papillomavirus* ke 14 di Quebec pada Juli 1995 [3].

Perbedaan antara subtype dan varian tipe HPV didasarkan pada titik pemotongan enzim restriksi metode lainnya dengan analisis penentuan pecahan sekuens DNA virus [4]. HPV 16 adalah tipe HPV yang paling banyak melibatkan menyebabkan karsinoma skuamosa serviks (>50% positif) [16] dimana HPV 16 dan 18 mayoritas terlibat pada pertumbuhan adenokarsinoma serviks yakni 50% dan 20% kasus kanker serviks di seluruh dunia berturut-turut [3]. Tipe HPV dapat dinyatakan berbeda apabila sekuens L1 memiliki perbedaan sekurang-kurangnya 10 %, sehingga dapat dinyatakan klasifikasi HPV didasarkan pada perbedaan nukleotida gen L1. [3,4]. *Alpha papillomavirus* yang menyerang manusia dapat dikelompokkan menjadi beberapa spesies diantaranya alfa-3 (HPV61), alfa-5 (HPV 26, 51, 69 dan 82), alfa-6 (HPV30, 53, 56, 66), alfa-7 (HPV18, 39, 45, 59, 68, 70, 85 dan 97), alfa-9 (HPV16, 31, 33, 35, 52, 58 dan 67), alpha-10 (HPV6 dan 11), alfa-11 (HPV34 dan 73) dan alfa-13 (HPV54) [4].

Saat ini ada dua buah vaksin yang telah memiliki lisensi peredaran yakni Cervarix (GSK) dan Gardasil (Merck) yang telah memberi perlindungan kekebalan terhadap HPV tipe 16 dan HPV tipe 18 setidaknya selama 10 tahun, dimana vaksin ini dibuat dari gen L1 HPV dan diproduksi secara massal dengan salah satu dari dua medium yakni sel serangga yakni *Baculovirus* [1] atau *Schizosaccharomyces cerevisiae* yang memungkinkan terbentuknya *Virus Like Particle* (VLP) secara otomatis pasca produksi [10].

Penelitian terkait HPV yang sedang dilakukan saat ini adalah untuk mengidentifikasi kemungkinan adanya varian atau jenis baru. Pada penelitiannya Chen *et al.*, 2011 [5] dalam penelitiannya berhasil mengkarakterisasi secara komprehensif sekitar 150 HPV, dimana 60 tipe terdeteksi di epitel dan termasuk dalam genus *Alphapapillomavirus*.

HPV tipe 16 termasuk tipe HPV yang menyebabkan kanker serviks pada masyarakat Indonesia. Pada penelitian ini dilakukan analisis variasi genetik pada gen L1 HPV tipe 16 sehingga dapat dianalisis untuk mengetahui profil virus HPV tipe 16 di Indonesia khususnya daerah Sumatera barat dan sekitarnya.

METODE PENELITIAN

Pengumpulan sampel

Sampel yang digunakan diambil dari koleksi DNA HPV 16 laboratorium molekular bagian mikrobiologi fakultas kedokteran Universitas Andalas yakni DNA HPV 16 sampel 53 (1), DNA

HPV sampel 53 (2), DNA HPV 16 sampel 54, DNA HPV 16 sampel 58, dan DNA HPV 16 sampel 60.

Amplifikasi gen L1 HPV 16

Primer yang digunakan adalah primer forward 5' CTA GTG AGC CCA CTG TCT ACTT-3' dan primer reverse 5' TCC CCA TGT CGT AGG TAC TCC TTA-3', komposisi cocktail Polymerase Chain Reaction mastermix 22,5 µl, primer Forward 0,5 µl, primer reverse 0,5 µl, DNA sampel 1,5 µl, dan memiliki total 25 µl. program PCR yang digunakan memiliki pengaturan denaturasi awal 94 °C, denaturasi 95°C 30 detik, annealing 56 °C 45 detik, ekstensi 72 °C 1 menit dan ekstensi akhir 72 °C 10 menit. Proses denaturasi, annealing, dan ekstensi dilakukan sebanyak 35 kali siklus.

Elektroforesis dan visualisasi hasil amplifikasi PCR

Gel agarose 0,8 % yang telah diberi gel red diletakkan pada baki elektroforesis, TBE 1x dituangkan hingga merendam agar, kolom pertama di isi dengan campuran DNA ladder 1kb, kolom 2, 3, 4, 5, dan 6 di isi dengan campuran loading dye 6x dengan sampel DNA, lalu dilakukan prosedur elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 100 volt. Hasil elektroforesis dilihat dengan lampu uv dan didokumentasikan.

PCR untuk sekuensing

Proses sekuensing dilakukan prosedur PCR dengan prosedur yang sama dengan amplifikasi gen L1 HPV 16 dengan konsentrasi sebanyak dua kali lipat dan dikirim ke 1st BASE.

Membuat contig dan pohon filogenetik

Contig hasil sekuensing dibuat dengan aplikasi seq.man, edit.seq DNA star, kemudian menggunakan program bio edit untuk melakukan proses trim dengan sampel pembanding terlampir pada table 1. Sampel hasil contig dan sampel pembanding dari program bio edit dibuat pohon filogenetiknya dengan program Mega 6 dan file disimpan dalam bentuk PDF.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Selama proses amplifikasi sampel isolat DNA dari 5 sampel yang di uji hanya dua sampel yang berhasil di amplifikasi memberikan nilai positif yakni sampel 3 (tube 54) dan sampel 4 (tube 58) (gambar 1) menggunakan primer forward 5' CTA GTG AGC CCA CTG TCT ACTT-3' dan primer reverse 5' TCC CCA TGT CGT AGG TAC TCC TTA-3'. Kedua sampel yang positif dilanjutkan untuk prosedur sekuensing, hasil sekuensing menunjukkan bahwa kedua sampel memiliki urutan sekuen (nukleotida) lebih dari 1000 basepair dan masih dibawah 1500 bp, sampel 3 1077 bp dan sampel 4 1103 bp di mana Gen L1 utuh memiliki total panjang nukleotida 1516 bp (NCBI) sehingga kedua sampel yang berhasil di amplifikasi bersifat parsial atau tidak mengamplifikasi gen L1 utuh. Pada penelitian Latief et.al [11] 2018 berhasil mengamplifikasi gen L1 utuh dari dua tipe HPV yakni HPV tipe 16 dan HPV tipe 52 yang diisolasi dari sampel DNA berasal dari isolat daerah bandung. Pada gambar hasil elektroforesis dari lima sampel yang di amplifikasi hanya dua sampel yang memberikan nilai positif. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi PCR diantaranya primer forward dan primer reverse yang tidak membentuk "dimers", perbedaan melting temperature (T_m) antara tiap primer yang menyulitkan mencari titik annealing yang sesuai [14], kehadiran "DNA predator" dimana jika

DNA sampel yang hendak diamplifikasi berkonsentrasi lebih sedikit daripada DNA yang lebih dominan (DNA genomik) pada sampel karena memiliki konsentrasi lebih banyak sehingga DNA yang lebih dominan konsentrasinya ini disebut DNA predator. Solusinya adalah dengan menggunakan primer khusus pemblokir predator DNA yang dimodifikasi [17], faktor lain adalah rusaknya DNA target pada sampel atau konsentrasi DNA target terlalu sedikit [2].

Hasil analisis data filogenetik menggunakan program MEGA 6 menunjukkan bahwa kedua sampel (sampel 3 dan sampel 4) merupakan identik dan yang paling mendekati kedua sampel ini adalah JX313706.1 dan KU951191.1 (gambar 3). Gambar hasil filogenetik menunjukkan kedekatan sampel dengan data pembanding dari 3 sekuens asia yakni KU 951191.1, NC_001526.4 dan JX 313706.1 yang menunjukkan kedekatan pola sekuens sampel dengan daerah asia, khususnya asia tengah. Pada penelitian Latief *et.al* 2018 [11] dari bandung juga memiliki isolat yang mengarah ke asia barat daya dan isolatnya dekat dengan KU951191.1. menurut pendapat Chiesa *et.al* 2015 [6] cabang pohon filogenetik dari HPV 16 dibuat untuk memperlihatkan keberadaan asal lokasi geografis dari virus tersebut. Data pembanding pohon filogenetik dapat dilihat di (gambar 2).

Human papillomavirus yang ditemukan di manusia terdiri dari lima genera yakni genus alpha, beta, gamma, Mu-papillomavirus, Nu-papillomavirus [7]. Doorbar *et.al* 2016 [7] juga menyatakan bahwa satu-satunya pengobatan infeksi HPV adalah tindakan operasi total pada jaringan yang terinfeksi. Beberapa penelitian yang menunjukkan kemiripan dengan hasil penelitian ini adalah lestari *et.al* [12] 2018 menunjukkan kekerabatan yang tinggi dengan sekuens dari cina (A4), Liu *et.al* 2017 [13] yang mengisolasi HPV tipe 16 dari pasien prekanker dan kanker kanker serviks wanita cina berasal dari subgaris keturunan A4 (asia) secara umum.

Saat ini berdasarkan keanekaragaman sekuensnya, HPV 16 dibagi menjadi empat garis keturunan filogenetik utama A,B,C,D serta garis keturunannya dirinci A1 (Eropa), A2 (Eropa), A3 (Eropa), A4 (Asia), B1 (Afrika-1a), B2 (Afrika-1b), C (Afrika-2a), D1 (Amerika utara 1), D2 (Asia-Amerika 2), D3 (Asia-Amerika 1), sementara untuk varian utama genetic HPV 18 membentuk pengelompokan tertutup dengan tiga garis keturunan A, B, dan C mencakup garis keturunan As/Ai (Asia-Amerika), E (Eropa), dan Af (Afrika) [9,15].

KESIMPULAN

Kedua sampel yakni sampel 3 dan sampel 4 mendekati populasi asal asia daerah Kunming, provinsi Yunan, Negara China, dari keterangan di NCBI.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dr. Andani Eka Putra dari Laboratorium Molekuler Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang telah memberikan sampel, bahan penelitian, alat penelitian dan pendanaan untuk sekuensing.

DAFTAR PUSTAKA

Abdoli, A., H. Soleimanjahi, F. Fotouhi, A. Teimoori, Sh. Pour Beiranvand, dan Z. Kianmehr. 2013. Human Papillomavirus Type16- L1 VLP Production in Insect Cells. Iran J Basic Med

Sci, 16: 891-895

- Arfiandi. 2016. Analisa Variasi Molekuler dan Filogenetik Gen E7 Isolat HPV 18 dari Penderita Kanker Serviks [Tesis]. Padang. Program Pascasarjana Universitas Andalas. 77 Hal.
- Burk, R.D., Z. Chen, dan K. Van Doorslaer. 2009. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics*, 12: 281-290.
- Burk, R. D., A. Harari, dan Z. Chen. 2013. Human Papillomavirus Genome Variants. *Virology*, 445 (0): 232-243.
- Chen, Z., M. Schiffman, R. Herrero, R. Desai, K. Anastos, M. Segondy, V.V. Sahasrabudde, P.E. Gravitt, A.W. Hsing, dan R.D. Burk. 2011. Evolution and Taxonomic Classification of Human Papilloma Virus 16 (HPV16)- Related Variant Genomes : HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 52, HPV 58, and HPV 67. *PLoS ONE*, 6 (5): e20183.
- Chiesa, I.J., M.S. Perez, G.G. Nuñez, dan D.A. Pirola. 2015. Genetic variability and phylogenetic analysis of partial L1 gene of human papillomavirus variants in Buenos Aires, Argentina. *VirusDis. (January-March 2016)* 27 (1): 41-47
- Doorbar J., N. Egawa, H. Griffin, C. Kranjec, dan I. Murakami. 2016. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol*, 25: 2-23
- Else, E.A., R. Swoyer, Y. Zhang, F.J. Taddeo, J.T. Bryan, J. Lawson, I.V. Hyfte, dan C.C. Roberts. 2011. Comparison of Real Time Multiplex Human Papillomavirus (HPV) PCR Assays with INNo-LiPA HVP Genotyping Extra Assay. *Journal of clinical Microbiology*, 49 (5): 1907-1912.
- Gurgel, A.P.A.D., B.S. Chagas, C.M. do Amaral, K.C.G. Nascimento, L.R.S. Leal, J.D.S. Neto, M.T.C. Muniz, dan A.C. de Freitas. 2015. Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV 16, HPV 31, and HPV 58 Found in North-East Brazil. *BioMed Research International*
- Jagu, S., K. Kwak, J.T. Schiller, D.R. Lowy, H. Kleanthous, K. Kalnin, C. Wang, H-K. Wang, L.T. Chow, W.K. Huh, K.S. Jaganathan, S.V. Chivukula, dan R.B.S. Roden. 2013. Phylogenetic Considerations in Designing a broadly Protective Multimeric L2 Vaccine. *Journal of Virology*, 87 (11): 6127-6136.
- Latief, M., I.A. Rini, G.W. Pradini, G.N.A. Winarno, E. Sahiratmadja, dan H. Susanto. 2018. Phylogenetic Analysis of Human Papillomavirus 16 and 52 L1 Gene from Cervical Cancer in Bandung. *The Indonesian Biomedical Journal* 10 (1): 40-45
- Lestari, V.A., I.A. Rini, G.W. Pradini, E. Sahiratmadja, dan H. Susanto. 2018. Phylogeny of HPV-16 and HPV-18 Multiple Infection of a Patient with Cervical Cancer from Dr. Hasan Sadikin General Hospital, Bandung; A Case Report. *The Indonesian Biomedical Journal*, 10 (3): 284-289
- Liu, Y.,Y. Pan, W. Gao, Y. Ke, dan Z. Lu. 2017. Whole-Genome Analysis of Human Papillomavirus Type 16, 18, and 58 Isolated from Cervical Precancer and Cancer Sample in Chinese Women. *Scientific Reports*, 7:263

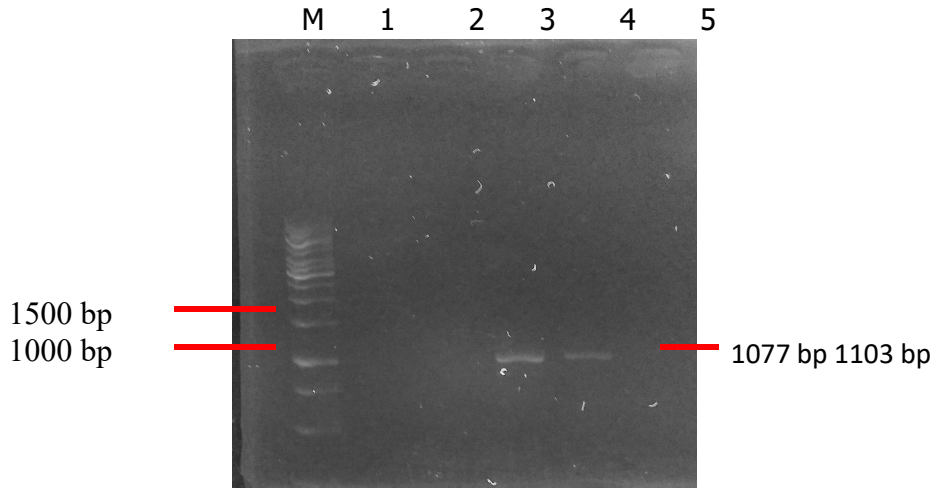
- Lorenz, T.C. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Trouble shooting and Optimization Strategies. *J.Vis. Exp.* (63): e3998
- Sait, K., R. Turki, A.M. Abuzenadah, O.H. Jiffiri, A. Bohmaidah, dan S.S. Sohrab. 2019. Genetic diversity and phylogenetic analysis of HPV 16 & 18 variants isolated from cervical specimens of women in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biomedical Science* 26: 317-324
- Van Doorslaer, K., dan R. D. Burk. 2010. Evolution of Human Papillomavirus Carcinogenicity. *Ads Virus Res*, 77: 41-62.
- Vestheim, H., S.N. Jarman. 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples- a case study on prey DNA in Antartic Krill stomach. *Frontiers in Zoology*, 5:12
- World Health Organization (WHO). 21 August 2015. Vaccine and Disease : Human Papillomavirus (HPV). <http://www.who.int/immunization/diseases/hpv/en/> di akses pada 19 Januari 2016

TABLE

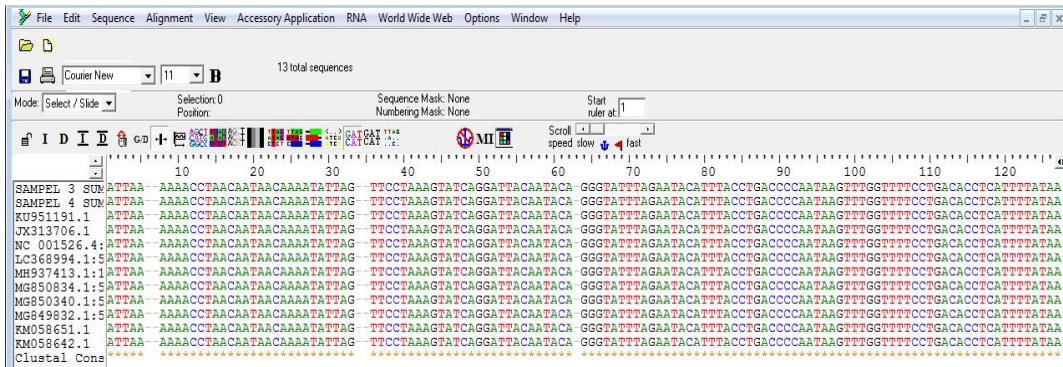
Tabel 1. Data genetik yang digunakan

No	Data Genetik	Asal
1	Sampel 3 (Sampel asal sumbar)	Sumatera Barat/Pekanbaru Riau
2	Sampel 4 (Sampel asal sumbar)	Sumatera Barat/Pekanbaru Riau
3	KU951191.1	Asia
4	JX313706.1	Asia
5	NC_001526.4 (4775-6292)	Asia
6	LC368994.1(5560-7155)	Jepang
7	MG850340.1 (5592-7109)	USA
8	MG850834.1 (5592-7109)	USA
9	MH937413.1 (1-1561)	Calabria/Italia
10	KM058651.1	Iran
11	MG849832.1 (5592-7109)	USA
12	KM058642.1	Iran

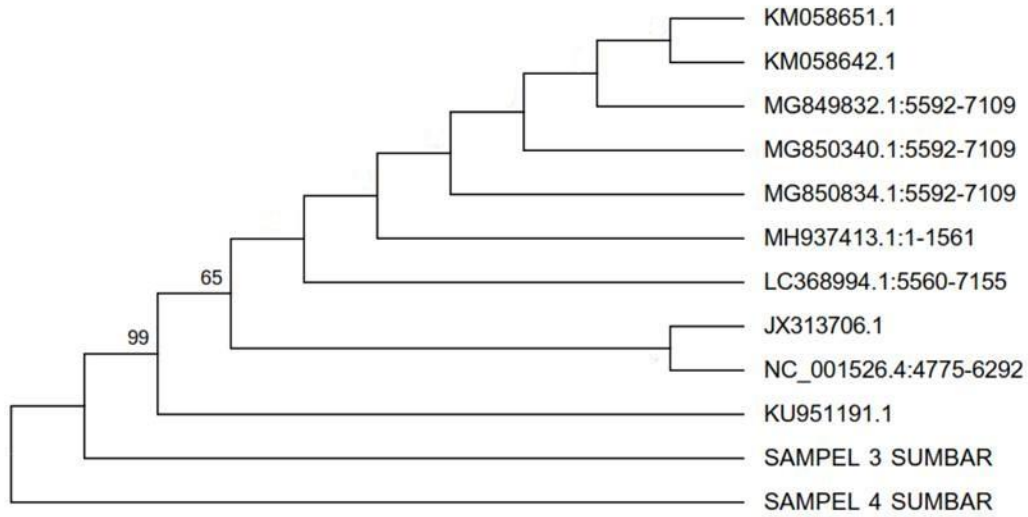
FIGURE



Gambar 1. Hasil elektroforesis sampel PCR gen L1
Keterangan : menggunakan Marker M: DNA Ladder 1 kb (sekuensing), 1: sampel 53 (1), 2: sampel 53 (2), 3: sampel 54, 4: sampel 58, 5: sampel 60 .



Gambar 2. Hasil pensejajaran DNA sampel dengan gen serupa di gen bank.



Gambar 3. Hasil pohon filogenetik sampel gen L1 HPV tipe 16 asal sumbar dibandingkan dengan data gen sampel di gen bank.