

PEMANFAATAN TEKNIK NUKLIR UNTUK DETEKSI HPV (*HUMAN PAPILLOMA VIRUS*) PENYEBAB KANKER SERVIKS SECARA MOLEKULER DAN PENGEMBANGAN SENYAWA *OCTADECATRIYNOIC ACID* SEBAGAI ANTIKANKER

Maria Lina R, Hendig Winarno, Ermin Katrin H dan Nanny Kartini

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi- BATAN
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Pasar Jumat, Jakarta Selatan
Telp.021-7690709; Fax: 021-7691607

ABSTRAK

PEMANFAATAN TEKNIK NUKLIR UNTUK DETEKSI HPV (*HUMAN PAPILLOMA VIRUS*) PENYEBAB KANKER SERVIKS SECARA MOLEKULER DAN PENGEMBANGAN SENYAWA *OCTADECATRIYNOIC ACID* SEBAGAI ANTI KANKER. Kanker serviks adalah kanker yang menduduki peringkat kedua tersering ditemukan pada wanita di seluruh dunia. Di Indonesia, kanker serviks menempati peringkat pertama penyebab kematian tertinggi pada wanita. Lebih dari 95% penyebab kanker serviks adalah infeksi HPV tipe onkogenik/*high risk* terutama tipe 16 dan 18. Diagnosis molekuler seperti PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan hibridisasi menggunakan pelacak berlabel merupakan teknik yang sesuai untuk deteksi HPV. Dalam penelitian ini sampel yang digunakan untuk deteksi HPV *high risk* (HPV 16 & HPV 18), adalah 61 *swab* mulut rahim dan 23 sampel biopsi jaringan. Sampel diekstraksi DNA-nya dengan menggunakan QIAamp DNA mini kit dan metode Boom. Proses PCR untuk mengetahui adanya infeksi HPV dilakukan dengan menggunakan primer MY09 dan MY11 merupakan bagian yang *conserved* dari gen L1 HPV, sedangkan sebagai kontrol internal digunakan primer GH20 dan PCO4 untuk deteksi β -globin. Hasil PCR dideteksi dengan teknik elektroforesis gel agarosa. Genotyping untuk menentukan tipe HPV 16 dan HPV 18 dilaksanakan dengan teknik hibridisasi dot blot menggunakan pelacak DNA berlabel biotin. Hasil PCR direkatkan pada membran selulosa kemudian dihibridisasi dengan pelacak DNA untuk HPV 16 dan 18 berlabel biotin kemudian dideteksi dengan ECL (*Enhance Chemiluminescens*) dengan dipaparkan pada hyperfilm. Hasil proses PCR dan elektroforesis gel agarosa untuk 61 sampel *swab* mulut rahim dan 23 biopsi yang menunjukkan hasil positif, masing-masing adalah 13 dan 4 sampel yaitu dinyatakan dengan adanya fragmen/pita DNA berukuran 450 bp (*base pair*). Berdasarkan hasil genotyping untuk penentuan tipe HPV menggunakan teknik PCR - hibridisasi dot blot dengan pelacak berlabel biotin, tipe HPV yang diperoleh dari 61 sampel *swab* serviks menunjukkan bahwa 11 sampel adalah HPV tipe 16 sedangkan 2 dari 13 sampel *swab* positif PCR menunjukkan hasil genotyping negatif. Demikian juga dari 23 sampel biopsi, 4 sampel positif PCR juga semuanya adalah HPV tipe 16. Penelitian dengan menggunakan teknik PCR dan hibridisasi dot blot dengan pelacak DNA berlabel biotin, dapat diterapkan sebagai teknik deteksi untuk HPV *high risk* khususnya HPV 16 dan 18 dari spesimen klinis sehingga sangat bermanfaat untuk deteksi dini kanker serviks. Selain itu juga dilakukan uji biodistribusi senyawa *octadeca-8,10,12 triynoic acid* yang merupakan senyawa berpotensi sebagai agen antikanker serviks secara *in vivo* pada mencit. Senyawa tersebut diperoleh dari isolasi benalu teh *Scurrula atropurpurea*

DISKUSI

ERIZAL

Terkait produk jaringan biologi, yang say athu salah satunya untuk mempercepat penyembuhan luka bakar dan banyak di TV iklan untuk menghilangkan keloid?

Apa produk yang dihasilkan dari kegiatan ini ada terkait ke penyembuhan keloid?

BASRIL

Belum, usulan ini sangat menarik dan perlu dipertimbangkan ke depan.

memalui berbagai tahapan ekstraksi, fraksinasi kolom, dan pemurnian dengan HPLC menggunakan kolom semipreparatif dengan detektor refraktif indeks. Sebanyak 23 mg isolat dianalisis fisikokimia dengan alat spektrometer NMR (*nuclear magnetic resonance*) dan dipastikan bahwa senyawa yang diperoleh adalah senyawa target *octadeca-8,10,12 triynoic acid*. Selanjutnya senyawa tersebut dilakukan *labeling* menggunakan iodium-131 dengan cara seperti pada penelitian tahun sebelumnya. Senyawa berlabel I-131 diuji biodistribusinya pada mencit. Sekelompok mencit jantan dan betina yang telah diaklimatisasi, masing-masing terdiri dari 5 ekor tiap kelompok digunakan sebagai hewan coba. Senyawa berlabel I-131 diadministrasikan pada mencit, kemudian diamati semua organ. Hasil uji ini masih dalam evaluasi.

Kata kunci : HPV 16 dan 18, PCR, hibridisasi dot blot, biotin, kanker serviks, *octadecatriynoic acid*, iodium-131

PENDAHULUAN

Kanker serviks adalah kanker yang menduduki peringkat ke dua tersering ditemukan pada wanita di seluruh dunia [1]. Di dunia, tiap tahun terjadi hampir 500.000 kasus baru, dan 290.000 kasus mengakibatkan kematian, 80-90% kasus terjadi di negara berkembang [2]. Di Indonesia, kanker serviks menempati peringkat pertama penyebab kematian tertinggi pada wanita dengan 40.000 kasus per tahun [3]. *Human Papiloma Virus* (HPV) mempunyai lebih dari 100 tipe [4] dan kurang lebih 40 tipe di antaranya telah dideteksi menginfeksi saluran anogenitalia [5]. Berdasarkan sifat onkogeniknya, tipe HPV anogenital tersebut dikelompokkan dalam HPV resiko rendah (*low-risk*, LR HPV), yaitu tipe HPV yang tidak atau jarang berisiko menyebabkan kanker serviks dan HPV resiko tinggi (*high-risk*, HR HPV), tipe HPV yang mempunyai resiko berkembang menyebabkan kanker serviks. Beberapa peneliti melaporkan bahwa HPV 16 dan 18 merupakan tipe terbanyak penyebab kanker serviks, sedangkan di Indonesia, di samping kedua tipe tersebut juga ditemukan HPV 31, 45 dan 52 [5]. Saat ini, beberapa tipe HPV baru dilaporkan sebagai penyebab kanker serviks, termasuk HPV 33, 39, dan 58.

Uji diagnosis yang umum dan luas digunakan adalah teknik pap smear yang berdasarkan pada pemeriksaan sitologi secara mikroskopis untuk mengetahui keganasan sel serviks. Namun teknik ini tidak dapat mendeteksi penyebab lesi tersebut. Diagnosis molekuler merupakan teknik yang sesuai diaplikasikan untuk mengetahui tipe HPV. Beberapa teknik molekuler yang telah dikembangkan untuk deteksi tipe HPV seperti *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional, *real time* PCR [6, 7]. PCR konvensional kurang sensitif, sedangkan *real time* PCR lebih sensitif tetapi biayanya cukup mahal. Dalam kegiatan ini dikembangkan teknik molekuler seperti PCR dan

hibridisasi dot blot dengan menggunakan pelacak DNA berlabel biotin yang spesifik terhadap tipe HPV 16 dan 18. Teknik ini dapat diaplikasikan pada banyak sampel dalam sekali deteksi, oleh karena itu teknik ini sangat efisien digunakan untuk studi epidemiologi/ *surveillance*. Hasil pengembangan teknik ini akan diaplikasikan pada sampel klinis dari beberapa rumah sakit dan sangat bermanfaat untuk deteksi dini kanker serviks.

Tanaman benalu teh (*Scurrula atropurpurea* Bl, G. Dans) merupakan tanaman yang berpotensi sebagai antikanker, karena adanya senyawa aktif seperti *octadeca-8,10,12 triynoic acid*. Berdasarkan penelitian sebelumnya senyawa tersebut secara *in vitro* dinyatakan dapat menghambat invasi sel kanker MM1 dengan $IC_{50} = 2,7 \mu\text{g/ml}$ dan mempunyai aktivitas antiproliferasi terhadap sel serviks Hela, leukemia THPI, karsinoma paru A549, dan limfoma HUT78 masing-masing dengan $IC_{50} = 0,66; 0,86; 0,99; \text{ dan } 2,36 \mu\text{g/ml}$ [8-10]. Agar efektivitas senyawa *octadeca-8,10,12 triynoic acid* sebagai agen antikanker tersebut dapat diketahui dengan pasti, maka perlu dipelajari distribusi pada hewan coba. Dalam penelitian ini dilakukan penandaan senyawa *octadeca-8,10,12 triynoic acid* dengan I-131 dan uji biodistribusi untuk mempelajari kelakuan senyawa dalam tubuh hewan coba.

BAHAN DAN METODE

Sampel penelitian. Dalam penelitian ini sampel yang digunakan adalah 84 spesimen klinis yang terdiri dari 61 spesimen *swab* serviks dari pasien normal dan ada keluhan seperti nyeri perut, keputihan (*flour albus*) dan perdarahan. Sampel lain adalah 23 sampel biopsi jaringan serviks dari pasien pra kanker, kanker, dan bukan ke duanya. Sedangkan untuk uji biodistribusi digunakan senyawa *octadeca-8,10,12-triynoic acid* yang diisolasi dari benalu teh *Scurrula atropurpurea*.

Ekstraksi DNA sampel. DNA diekstraksi menggunakan kit *QIAamp* DNA Mini (Qiagen). Sel sampel baik *swab* maupun biopsi dilisis dengan larutan *proteinase-K* dan bufer. Pengikatan DNA sel dilakukan dalam *QIAamp* spin column dan etanol absolut, dicuci dengan bufer pencuci selanjutnya dielusi dengan bufer elusi. DNA yang diperoleh dapat langsung diamplifikasi sebagai DNA cetakan atau disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan. Ekstraksi dengan metode Boom dilakukan hanya untuk sampel *swab*. Larutan yang terdiri dari Tris-HCl, GuSCN (guanidin tiosianat) sebagai *chaotropic agent*, EDTA, dan triton-x-100, digunakan untuk melisis sel. Pengikatan dan presipitasi DNA dilakukan masing-masing dengan suspensi diatom (*Diatomaceous*

earth) dan aseton, etanol 70%. dingin. DNA selanjutnya dielusi dengan bufer TE (Tris-EDTA) 1x.. Larutan DNA yang diperoleh digunakan sebagai DNA cetakan pada proses PCR.

Proses PCR dan elektroforesis agarosa. Amplifikasi DNA sampel hasil ekstraksi dan klon plasmid kontrol dilakukan dengan teknik PCR. Primer yang digunakan pada proses tersebut adalah MY011 (5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3') dan MY09 (5'-CGT CCM AAR GGA WAC TGA TC-3') : W= A+T, Y= C+T, M= A+C, R=A+G. Primer *consensus* ini dirancang dari daerah yang *conserved* pada gen L1 yang menyandi protein mayor HPV dari sekuen genotipe 5 tipe HPV genital. Koamplifikasi HPV dan β globin menggunakan primer GH20 (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') dan PCO4 (5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-5') dilakukan sebagai kontrol internal. Untuk mengamplifikasi genom DNA virus dan β -globin, digunakan DNA cetakan yang dicampur dengan campuran pereaksi PCR yang terdiri dari air suling steril, 1x larutan bufer Tris-HCl + KCl, 4,0 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 10 pmol primer, dan 2,5 U/100 μ l enzim Taq *polymerase*. Amplifikasi DNA dilakukan dengan 3 tahap untuk setiap siklus meliputi tahap denaturasi awal 95°C, 1 menit; *annealing* 55°C, 1 menit, dan *extension* 72°C. 1 menit.. Jumlah siklus yang diperlukan adalah 40 siklus.

Setelah proses amplifikasi, DNA dideteksi dengan teknik elektroforesis 1,5% gel agarosa yang dilanjutkan dengan pewarnaan etidium bromida dan visualisasi di bawah *UV transilluminator*

Proses hibridisasi dot blot dan deteksinya. Teknik hibridisasi dilakukan sesuai dengan cara sebelumnya [11] yang telah dimodifikasi yaitu untuk menentukan tipe HPV dan dalam penelitian ini untuk tipe HPV 16 dan 18 yang merupakan HPV *high risk*. DNA hasil amplifikasi setelah didenaturasi, dispotkan pada membran nilon menggunakan *dot blotter* kemudian difiksasi pada membran dengan pemanasan. Proses hibridisasi dilaksanakan dengan memasukkan membran dalam larutan hibridisasi yang terdiri dari larutan 5x SSPE, 5x Denhardt, dan 0,5 % SDS pada suhu 56°C selama 2 jam menggunakan pelacak berlabel biotin MY95 (5'-GAT ATG GCA GCA CAT AAT GAC-3') untuk tipe H16 dan MYB130 (5'- GGG CAA TAT GAT GCT ACC AAT - 3') untuk tipe H18. Membran selanjutnya dicuci sebanyak 3 x dalam larutan 2 x SSPE dan 1 x SSPE, 0,1 % SDS selama 10 – 30 menit dalam suhu ruang dan 56°C. Deteksi hasil hibridisasi

dilakukan dengan menambahkan *streptavidin peroksidase* kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Cairan ECL (*Enhance Chemiluminescens Liquid*) ditambahkan pada membran setelah membran dicuci sebanyak 4 kali kemudian dipaparkan pada hiperfilm/ film sinar-X dalam kaset selama 1 malam dalam ruang gelap. Film selanjutnya diproses dengan cairan *developer* 1 – 3 menit dan *fixer* 3 – 5 menit dan dicuci dengan air dan dikeringkan.

Ekstraksi, dan kolom fraksinasi. Sebanyak 3 kg serbuk benalu kering diekstraksi secara maserasi menggunakan etil asetat selama 2 hari, kemudian disaring. Residu dimaserasi ulang 3x, lalu filtrat dikumpulkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator in vacuo*, kemudian dikeringkan dalam desikator oven *in vacuo*. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya difraksinasi menggunakan kolom dengan eluen *n*-heksan-etilasetat-metanol secara landaian, sehingga diperoleh 4 fraksi yaitu Fr-1, Fr-2, Fr-3, dan Fr-4. untuk mendapatkan isolat *octadeca-8,10,12-triynoic acid*.

Pemisahan *octadeca-8,10,12-triynoic acid* dengan HPLC dan konfirmasi senyawa dengan NMR. Fraksi-3 yang merupakan fraksi aktif mengandung senyawa *octadeca-8,10,12-triynoic acid* dipisahkan dengan HPLC, kolom silika ukuran 250 x 20 mm, eluem *n*-heksan-etilasetat (5:1). Isolat yang diduga senyawa *octadeca-8,10,12-triynoic acid* ditampung, kemudian pelarut diuapkan, dikeringkan dan untuk memastikan bahwa isolat yang dipisahkan adalah senyawa target, maka dilakukan konfirmasi menggunakan spektrometer NMR (*nuclear magnetic resonance*).

Penyiapan iodium-monoklorida. Sebanyak 0,5 mL larutan kalium iodida 1 M dicampur dengan 0,5 mL larutan kalium iodat 0,5 M kemudian ditambah HCl 10 N sebanyak 1,5 mL. Campuran dikocok dalam corong pisah, ICl (iodium monoklorida) yang terbentuk dipisahkan dari I₂ (iodium) dengan jalan ekstraksi menggunakan kloroform. Ekstraksi dilakukan sampai fase kloroform tidak berwarna ungu lagi, dan fase air yang mengandung ICl disimpan dalam lemari pendingin untuk digunakan dalam proses penandaan.

Proses penandaan dan pemurnian. Ke dalam beberapa vial gelas 2 mL masing-masing dimasukkan larutan isolat benalu teh dengan berbagai macam kadar yaitu 50, 100, 500 dalam 50 µL dan 1000 µg dalam 100 µL etanol, kemudian ditambahkan ke dalamnya 250 µL kloroform,

100 μL larutan iodium-klorida dan 50 μL larutan radioisotop Na^{131}I . Vial gelas ditutup rapat dengan tutup karet dan *seal* aluminium, kemudian campuran diaduk dengan pengaduk vortex selama 5 menit. Setelah tercampur sempurna, dan campuran akan terdiri dari 2 lapis yaitu fase air dan kloroform yang berwarna agak *pink*, campuran tersebut diinkubasi dalam lemari pendingin pada suhu 4°C selama 15-20 jam untuk memberikan waktu agar proses penandaan berjalan sempurna. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,5 mL larutan natrium metabisulfit 0,1 N. Apabila fase kloroform masih berwarna *pink*, penambahan larutan natrium metabisulfit diulang sampai warna *pink* hilang. Setelah itu, ke dalamnya ditambahkan 500 μL kloroform, diaduk dan vial didiamkan dalam keadaan terbalik sampai pemisahan dua fase sempurna, kemudian fase kloroform dipisahkan dengan cara menyedotnya menggunakan *syringe*. Pekerjaan ini diulang dua kali, dan fase kloroform dicuci dengan 500 μL aquabidest dan air cucian dicampurkan dengan fase air yang diperoleh sebelumnya. Masing-masing fase air dan kloroform diukur aktivitasnya dengan alat *dose calibrator*. Dengan mengetahui aktivitasnya dapat dihitung besarnya efisiensi (*rendemen*) penandaan dengan rumus:

$$\text{Efisiensi (rendemen) penandaan} = \frac{\text{aktivitas fase kloroform}}{\text{aktivitas fase (kloroform + air)}} \times 100 \%$$

Ke dalam fase kloroform kemudian ditambahkan secukupnya Na_2SO_4 *exicatus* untuk menarik air yang terbawa dalam kloroform, setelah itu lapisan kloroform dipisahkan ke dalam vial lain dan diuapkan dengan cara ditiup memakai gas N_2 sampai kering. Sediaan yang telah kering dilarutkan kembali dengan 100 – 200 μL etanol absolut, dan disimpan pada temperatur rendah dalam lemari pendingin.

Penentuan kemurnian radiokimia senyawa *octadeca-8,10,12-triynoic acid* bertanda ^{131}I . Kemurnian radiokimia dari senyawa *octadeca-8,10,12-triynoic acid* bertanda ^{131}I ditentukan dengan metode kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis. Kromatografi kertas menaik menggunakan kertas Whatman 1 (1 x 10 cm) sebagai fase diam dan pelarut larutan amonium sitrat 0,02 N pH=9,0 sebagai fase gerak. Selain itu juga digunakan kromatografi lapis tipis menggunakan KLT silika gel (1 x 10 cm) dengan eluen kloroform - metanol (30:1). Selain itu metode

kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk menentukan jarak rambat (Rf) senyawa *octadeca-8,10,12-triynoic acid* bertanda ^{131}I dan Rf isolat murni yaitu pada 0,3-0,4 [8].

Kertas Whatman-1 dipotong-potong tiap cmnya kemudian masing-masing dicacah dengan alat pencacah saluran tunggal. Demikian pula halnya dengan kromatogram KLT silica gel yang tidak disemprot, tiap cm dipotong dan dicacah. Dari hasil cacahan dapat dihitung kemurnian radiokimia dari senyawa bertanda *octadeca-8,10,12-triynoic acid* bertanda ^{131}I , sedangkan pelat TLC silica gel dilihat secara visual setelah disemprot dengan penampak bercak serum sulfat.

Uji biodistribusi senyawa *octadeca-8,10,12-triynoic acid* bertanda dalam mencit. Dua kelompok mencit dengan jenis kelamin beda diberi larutan *octadeca-8,10,12-triynoic acid* bertanda secara oral dengan variasi dosis tertentu, kemudian organ tubuh meliputi ginjal, paru, jantung, otak, timus, saluran pencernaan, organ seks (testis atau ovarium), darah, dan karkas (sisa tubuh) dianalisis kandungan senyawa *octadeca-8,10,12-triynoic acid* bertanda dengan pencacah-beta atau pencacah sintilasi cair (LSC). Selain itu analisis morfologi dilakukan di bawah mikroskop setelah diwarnai dengan pewarna HE.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daerah pada gen L1 yang menyandi protein mayor HPV adalah target amplifikasi dalam penelitian ini. Hasil amplifikasi DNA spesimen dengan teknik PCR menggunakan primer MY11 dan MY09 untuk HPV dan primer GH20 dan PCO4 untuk β - globin dapat dilihat pada Gambar 1. Dari 84 spesimen *swab* serviks dan biopsi 17 (20,2%) sampel menunjukkan hasil PCR positif dinyatakan dengan adanya fragmen DNA berukuran 450 bp yaitu terlihat pada Gambar 1, lajur 2, 3, 5 (gel A), 2, 3 (gel B) untuk spesimen *swab* serviks dan lajur 4 (gel B) untuk spesimen biopsi jaringan serviks. Fragmen DNA 268 bp menunjukkan hasil positif amplifikasi β -globin sebagai kontrol internal spesimen (Gambar 1, gel A dan B lajur 1 s/d 5). Hasil PCR negatif dari 48 spesimen kemungkinan disebabkan beberapa hal antara lain karena pasien tidak terinfeksi HPV atau primer kurang sensitif karena adanya mutasi pada genom HPV sehingga tidak terjadi proses *annealing*. MUNOZ *et al* [12], menyatakan dari 1928 pasien yang melakukan kontrol ke rumah sakit hanya 259 (13,4%) pasien yang terinfeksi HPV dengan menggunakan teknik PCR seperti dalam penelitian ini. Peneliti lain menyatakan dari 174 pasien dengan pemeriksaan sitologi atau kolposkopi abnormal, hanya 69 pasien (39,6%) terinfeksi HPV setelah dideteksi dengan teknik

PCR menggunakan primer yang sama dengan penelitian ini. Penggunaan lebih dari 1 macam primer konsensus akan meningkatkan sensitivitas [13].

Hasil genotyping yaitu dengan teknik hibridisasi dot blot menggunakan pelacak DNA berlabel biotin menunjukkan hasil positif terlihat pada 11 dari 13 sampel *swab* positif PCR dan 4 sampel biopsi positif PCR yang dinyatakan adanya dot hitam pada film (Gambar 2). Dua dari 13 sampel *swab* positif PCR menunjukkan hasil genotyping negatif kemungkinan yang menyebabkan adalah virus HPV yang terdeteksi bukanlah tipe 16, dan 18. Pasien mungkin terinfeksi tipe *high risk* yg lain seperti tipe HPV 31, 33, 35 45 dll. atau *low risk* seperti HPV 6, 11, 40, 42, 54 dll. [14]. Berdasarkan hasil hibridisasi menggunakan 2 pelacak untuk HPV tipe 16 dan 18 dalam penelitian ini, 11 sampel tersebut di atas semuanya adalah HPV tipe 16. Penelitian- penelitian terdahulu menyatakan prevalensi HPV 16 di beberapa negara seperti Philipina, Spanyol, Columbia, Brazil lebih banyak dari pada HPV 18, yaitu HPV 16 dan HPV 18 masing-masing adalah 43,9 – 72,4% dan 3,7 – 27,9% [12,13] sedangkan prevalensi di Jakarta, Indonesia 41,9 dan 37,8% dari 104 spesimen pasien yang dicurigai menderita kanker serviks yang diteliti pada tahun 2001 – 2002 [15]. Pada 23 spesimen biopsi, hanya 4 sampel positif HPV16 sedangkan 19 sampel lainnya negatif baik untuk tipe 16 maupun 18. Tidak terdeteksinya HPV pada sampel biopsi, kemungkinan disebabkan adanya infeksi virus lain atau DNA virus telah terintegrasi ke dalam sel serviks sehingga mempengaruhi genom virus terutama daerah target untuk primer yang digunakan dalam penelitian ini. Hal lain yang menyebabkan virus telah lisis dalam sel serviks. Hasil penelitian PRAYITNO [16], menunjukkan dari 19 sampel yang didiagnosis sebagai kanker serviks, 17 sampel terinfeksi HPV dan 13 sampel terinfeksi HPV dan epstein barr viruses (EBV).

Teknik PCR dan hibridisasi dot blot dengan pelacak DNA berlabel biotin dapat mendeteksi tipe HPV *high risk* dalam penelitian ini HPV 16 dan 18 dan dapat diterapkan untuk spesimen klinis dalam jumlah banyak sehingga efisien untuk studi *surveillance* maupun epridemiologi. Penelitian akan dikembangkan untuk meningkatkan sensitivitas dengan menggunakan lebih dari 1 macam primer konsensus dan juga penggunaan pelacak DNA berlabel radioisotop.

Hasil isolasi senyawa yang selanjutnya dikonfirmasi menggunakan spektrometer NMR menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh dapat dipastikan adalah *octadeca-8,10,12-triynoic acid*. Pada proses penandaan melalui proses iodium monoklorida diperoleh kemurnian radiokimia > 90% sedang efisiensi penandaan 25%. Hasil ini, memenuhi syarat untuk digunakan. Selanjutnya senyawa *octadeca-8,10,12-triynoic acid* bertanda tersebut digunakan untuk uji biodistribusi pada mencit. Hasil pengujian dalam proses evaluasi.

KESIMPULAN

Teknik PCR-hibridisasi dot blot dengan pelacak DNA berlabel biotin pada spesimen *swab* dan biopsi jaringan serviks dapat mendeteksi HPV high risk khususnya HPV 16 dan 18 dan efisien untuk spesimen dalam jumlah banyak.

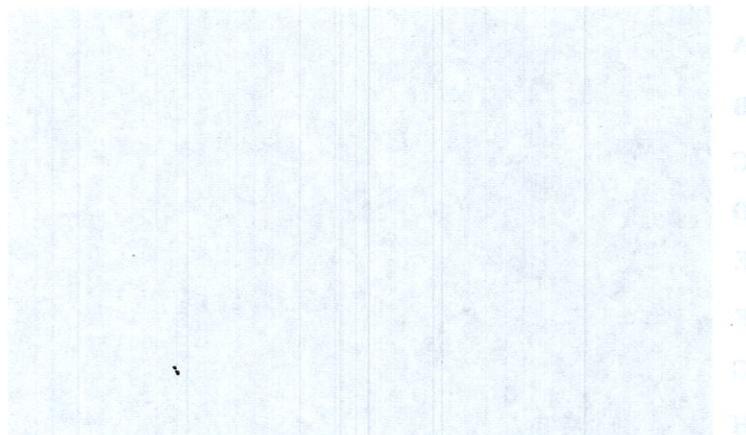
Teknik deteksi HPV *high risk* secara molekuler dapat diterapkan sebagai teknik deteksi dini kanker serviks.

Penandaan senyawa senyawa *octadeca-8,10,12-triynoic acid* dengan I-131 dapat dilakukan dengan hasil baik, dan selanjutnya senyawa bertanda ini dapat digunakan untuk mempelajari jelakuan senyawa tersebut dalam organ.

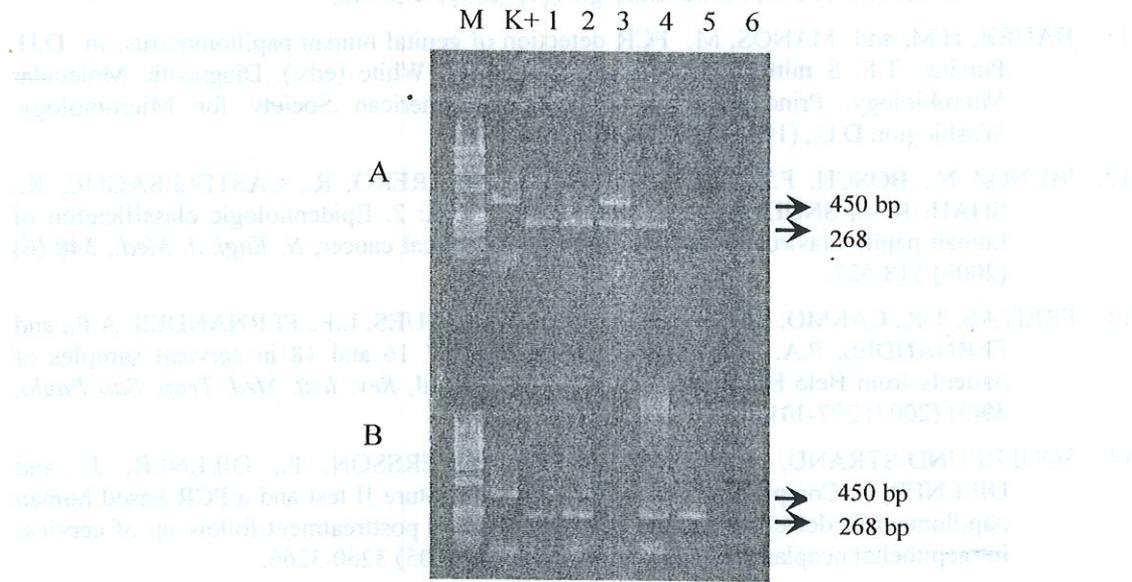
DAFTAR PUSTAKA

1. Van DOORN, L.J, MOLIJN, A., KLETER, B., QUINT, W., and CULAU, B. Highly effective detection of human papilloma virus 16 and 18 DNA by a testing algorithm combining broad- spectrum and type-spesific PCR, *J. Clin. Microbiol.*, **44** (2006) 3292-3298.
2. DHARMAWAN, T. Urging cervical cancer prevention program in RI. April 25, 2007. Available at: <http://www.thejakartapost.com/yesterdaydetail.asp?fileid=20070425.T01-39k>.
3. SUWIYOGA, I.K. Tes Human Papilloma Virus sebagai skrining alternative kanker leher rahim. *Cermin Dunia Kedokteran*, **151** (2006) 29-33
4. AMERICAN SOCIAL HEALTH ASSOCIATION NATIONAL HPV and CERVICAL CANCER RESOURCE CENTER Human Papilloma Virus. 2004. Available at: http://racocon.com/cgi-bin/dcforum/dcboard.cgi?forum=DCForumID15&mark=184&az=next_topic&archive=yes. 2004.
5. MUNOZ, N., BOSCH, F.N., de SANJOSE, S., HERRERO, R., CASTELLSAUGE, X., SHAH, K.V., SNIJDERS, F., and MEIJER, C.J.L.M. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical Cancer. N.
6. AZIS, E.A.N., dan RAUF, S. Deteksi human papilloma virus (HPV) tipe 16 dengan teknik polymerase chain reaction (PCR) pada kanker serviks uteri. *Majalah Obstetri dan Ginekologi Indonesia*, **29** (2005) 43-53.
7. BIEDERMANN, K., DANDACHI, N., TRATTNER, M., VOGL, G., DOPPEIMAYR., H, MORE, E., STAUDACH, A., DIETZE, O., and HAUSER-KRONBERGER. Comparison of real- time PCR signal-amplified in situ hybridization and conventional PCR for detection and quantification of human papillomavirus in archival cervical cancer tissue, *J. Clin. Microbiol.*, **42** (2004) 3758-3765.
8. OHASHI, K., WINARNO, H., MUKAI, M, INOUE, M., SRI PRANA, M., SIMANJUNTAK, P., AND SHIBUYA, H., Indonesian Medicinal Plants. XXV. Cancer cell invasion inhibitory effects of chemical constituents in the parasitic plant *Scurrula atropurpurea* (Loranthaceae), *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(3) (2003) 343-345.
9. OHASHI K, WINARNO H, MUKAI M, AND SHIBUYA H., Preparation and cancer cell invasion inhibitory effects of C₁₆-alkynic fatty acids, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(4) (2003) 463-466.

10. WINARNO, H. Antiproliferation activity of octadeca-8,10,12-triynoic acid on human cancer cell lines cervix HeLa, lung carcinoma A-549, lymphoma HUT-78, leukemia THP-1, and melanoma A-375, *Berita Biologi*, **9**(4) (2009) 343-348.
11. BAUER, H.M, and MANOS, M. PCR detection of genital human papillomavirus. In D.H. Persing, T.F. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White (eds.). *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington D.C., (1993) p. 407-413.
12. MUNOZ N., BOSCH, F.X., DE SANJOSE, S., HERRERO, R., CASTELLSAGUE, X., SHAH, K.V., SNIJDERS, P.J. and MEIJER, C.J.: 2. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer, *N. Engl. J. Med.*, **348** (6) (2003) 518-527.
13. FREITAS, T.P., CARMO, B.B., PAULA, F.D., RODRIGUES, L.F., FERNANDES, A.P., and FERNANDES, P.A. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **49**(5) (2007) 297-301.
14. SODERLUND-STRAND, A., RYMARK, P., ANDERSSON, P., DILLNER, J., and DILLNER, L. Comparison between the hybrid capture II test and a PCR-based human papillomavirus detection method for diagnosis and posttreatment follow-up of cervical intraepithelial neoplasia, *J. Clin. Microbiol.*, **43** (2005) 3260-3266.
15. SCHELLEKENS, M.C., DIJKMAN, A., AZIZ, M.F., SIREGAR, B., CORNAIN, S., KOLKMAN-ULJEE, S., PETERS, L.A., and FLEUREN, G.J. Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta, Indonesia, *Gynecol. Oncol.*, **93**(1) (2004) 49-53.
16. PRAYITNO, A. Cervical cancer with human papilloma virus and epstein barr virus positive, *J. Carcinogenesis*, **5** (2006) 13-20.

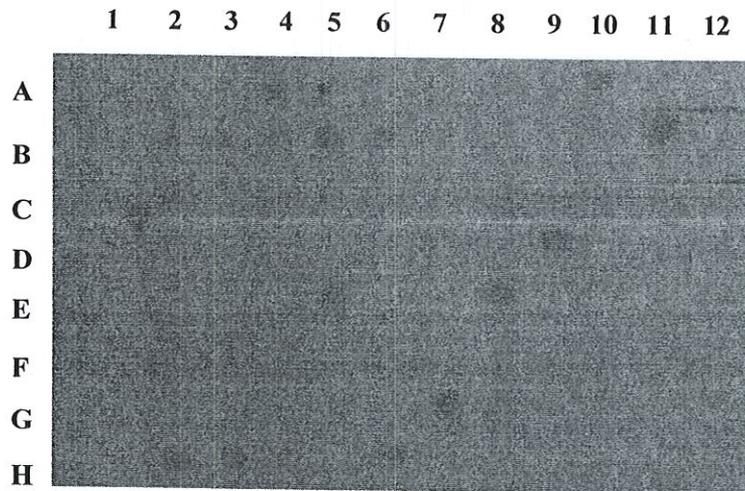


Lampiran:



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA (PCR) dan elektroforesis spesimen klinis

Lajur 2, 3, 5 (gel A), 2, 3 (gel B) ; Hasil PCR + dari spesimen *swab* mulut rahim Lajur 4 (gel B) : Hasil PCR + dari spesimen biopsi
Hasil PCR + : Ada pita DNA berukuran 450 bp



Gambar 2. Hasil Hibridisasi Dot blot Produk PCR dengan pelacak DNA (Oligonukleotida) Berlabel Biotin untuk tipe HPV 16

Keterangan : Dot hitam : Positif HPV 16
H2, H3, H4, H6 = Kontrol positif
H8 = Kontrol negatif
Dot lainnya = Sampel