

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

4.1.1. Gambaran sampel

Hasil penelitian berupa pengambilan jaringan: biopsi dan jaringan hasil operasi penderita Karsinoma serviks selama periode Oktober 2007- Februari 2008 di RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, diperoleh sebanyak 31 sampel jaringan segar dengan kecurigaan klinis sebagai Karsinoma serviks. Dari 31 sampel tersebut, ternyata hanya 22 sampel yang positif sebagai Karsinoma serviks yang ditegakkan berdasar pemeriksaan gambaran Histopatologik yang seluruhnya menunjukkan bahwa semua sampel yang positif Karsinoma serviks adalah jenis karsinoma yang invasif.

4.1.2. Isolasi DNA dan identifikasi gen penyandi protein E6 HPV tipe 16 dengan teknik PCR.

Isolasi DNA total dengan menggunakan *Tripure Isolation Reagent Kit (Roche Applied Science)* telah berhasil dilakukan pada duapuluh dua jaringan positif Karsinoma serviks dan DNA yang berhasil diisolasi memiliki konsentrasi DNA, kadar protein dan rasio yang bervariasi (Lampiran 2). DNA yang dapat diamplifikasi memiliki konsentrasi sekitar 19 – 1940 μ g/mL.

Berdasar hasil amplifikasi gen E6 HPV 16 pada posisi 53 – 575 bp dengan menggunakan primer spesifik tersebut diatas yang di elektroforesis pada gel Agarose 2%, dihasilkan suatu pita spesifik dengan ukuran pita fragmen sepanjang 522 bp baik DNA yang diisolasi dari kontrol positif (sel SiHa) maupun DNA yang berasal dari sampel yang positif E6 HPV 16.

Dari duapuluh dua sampel yang positif Karsinoma serviks berdasar Histopatologi tersebut, hanya empatbelas sampel yang terbukti positif gen E6 HPV tipe 16 .

4.1.3. Hasil sekuensing produk PCR gen penyandi protein E6 HPV tipe 16

Produk PCR sampel HPV 16 tersebut, lima diantaranya kemudian dilakukan sekuensing (sampel no 2,3,6,26,27). Alasan dilakukan sekuensing terhadap kelima sampel tersebut dipilih karena berdasar hasil amplifikasi dengan primer spesifik yang dielektroforesis pada gel agarose 2% menghasilkan pita yang spesifik tunggal dan tebal.

Produk PCR dari lima sampel tersebut telah berhasil di amplifikasi dan disekuensing sehingga dapat diketahui susunan nukleotida dan susunan asam amino gena penyandi protein E6 HPV 16 (Lampiran 7-8). Pada kelima sampel penelitian ini juga ditemukan struktur empat motif berulang *Cys-X-X-Cys* yang merupakan ciri khas dari struktur protein E6 (Sedman *et al.*, 1991; Myers and Androphy, 1995). Menurut Perez (2001), bagian gena penyandi protein E6 HPV 16 dimulai pada urutan nukleotida 83-559, sekuen pada sampel penelitian ini juga mencakup dari urutan nukleotida 83-559, kecuali untuk dua sampel yang tidak dimulai dari urutan nukleotida 83 (sampel no 26 dan 27).

4.1.4. Hasil *alignment* produk PCR gen penyandi protein E6 HPV tipe 16

4.1.4.1. Perbandingan antara sekuen sampel dengan sekuen referensi dari *Gene Bank*

Kelima sekuen sampel tersebut di *align* dengan sekuen yang terdaftar di *gene bank*. Sekuen dari *gene bank* ini dijadikan sebagai referensi, merupakan sekuen lengkap (*complete genome*) dari HPV 16 yang memiliki kemiripan dengan sekuen sampel. Sekuen referensi ini dipublikasikan oleh Seedorf *et al* (1985) yang merupakan sekuen HPV 16 secara umum dan

merupakan Eropa *lineage*. Menurut Giannoudis dan Herrington (2001), di kawasan *Southeast Asia*, termasuk Indonesia, Philipina dan Thailand, sekuen yang paling banyak dijumpai adalah sekuen varian Eropa sehingga sekuen varian Eropa ini dapat dipakai sebagai referensi pembanding dengan sekuen sampel. Sekuen ini juga dipakai sebagai referensi oleh peneliti Boer *et al* (2004) yang meneliti sekuen HPV 16 E6 pada Karsinoma serviks asal Indonesia (RSUP Dr.Cipto Mangunkusumo). Sekuen yang menjadi referensi ini dapat di akses dengan kode NC_001526 pada *gene bank*.

Tabel 1. Daftar variasi urutan nukleotida (sekuen) dari kelima sampel HPV16 isolat Yogyakarta dibanding dengan referensi.

Gen E6						
Urutan Nt	HPV 16 Ref	HPV16_2	HPV16_3	HPV16_6	HPV16_26	HPV16_27
109	T	C	---	C	C	---
116	C	---	---	---	---	A
124	G	---	---	---	A	---
132	G	---	---	T	T	---
143	C	---	---	G	---	---
144	A	---	---	---	G	---
276	A	---	---	---	---	G
286	T	---	---	A	A	---
289	A	---	---	G	G	---
335	C	---	---	T	T	---
403	A	---	---	G	G	---
489	G	---	---	---	C	---
491	G	---	---	---	T	---

Tanda (-) berarti sekuen nukleotida sama dengan referensi.

Hasil *alignment* menunjukkan adanya variasi urutan nukleotida pada posisi tertentu. Pada sekuen sampel HPV 16 nomor 6 terdapat variasi urutan nukleotida pada 7 posisi (nt 109, 132, 143, 286, 289, 335 dan 403). Untuk sampel HPV 16 nomor 26 ditemukan variasi pada 10 posisi (nt 109, 124, 132, 144, 286, 289, 335, 403, 489 dan 491).

Untuk sampel nomor 3, tidak ditemukan adanya variasi pada urutan nukleotida. Sekuen sampel nomor 3 homolog dengan sekuen referensi yang merupakan varian Eropa. Untuk sampel nomor 27 terdeteksi adanya 2 variasi yaitu pada urutan nukleotida 116 dan 276. Sampel nomor 2 hanya ada 1 variasi yaitu pada urutan nukleotida 109.

Sekuensing ini berhasil mendeteksi adanya polimorfisme dengan adanya perubahan pada urutan nukleotida tersebut menyebabkan perubahan asam amino *Proline* menjadi *Threonine* (P5T), *Arginine* menjadi *Isoleucine* (R10I), *Glutamine* menjadi *Aspartic Acid* (Q14D), *Glutamine* menjadi *Arginine* (Q14R), *Asparagine* menjadi *Serine* (N58S), *Histidine* menjadi *Tyrosine* (H78Y), *Arginine* menjadi *Threonine* (R129T), *Glycine* menjadi *Cysteine* (G130C).

Dari hasil pemeriksaan secara histopatologis menunjukkan bahwa sampel HPV 16 nomor 26 terdapat gambaran *Clear Cell Adenocarcinoma* dengan jaringan tumor epitelial tersusun solid, infiltratif ke stroma jaringan ikat. Sedangkan sampel HPV 16 nomor 6 menunjukkan Karsinoma Sel Skuamosa dengan keping kecil biopsi serviks tersusun atas proliferasi sel-sel ganas epitelial, bentuk pleomorfik, inti hiperkromatik, sebagian piknotik dengan anak inti prominen.

Bila dibandingkan dengan sampel HPV 16 nomor 2, 3 dan 27 yang hanya sedikit mengalami perubahan susunan asam amino dibanding kedua sampel lainnya, masing-masing menunjukkan gambaran Karsinoma Epidermoid differensiasi baik, Karsinoma Adenoskuamosa yang meluas ke kanalis serviks dan karsinoma jenis sel skuamosa.

4.1.4.2. Perbandingan sekuen sampel dengan sekuen gen E6 HPV 16 lainnya

Berdasarkan analisis urutan nukleotida antara kelima sampel tersebut yang telah disejajarkan dan dibandingkan dengan sekuen gen E6 HPV 16 lain yang terdaftar di *gene bank*. Sekuen-sekuen ini merupakan sekuen dari berbagai negara didunia yang mengandung banyak

variasi pada urutan nukleotidanya. Sekuen-sekuen tersebut berasal dari Cina, Afrika tipe 1 dan 2, Eropa (Jerman tipe 131), Vietnam, Australia dan Asia Timur. Daftar *Accession Number* dari masing-masing sekuen tersebut dapat dilihat pada lampiran 4. Hasilnya menunjukkan persamaan dan perbedaan beberapa urutan nukleotida maupun asam amino penyusunnya.

Dari hasil perbandingan sekuen sampel dengan sekuen Afrika tipe 2, menunjukkan bahwa juga terdapat perubahan asam amino penyusun yang sama dengan sekuen sampel nomor 6 yaitu pada kodon 10 dimana *Arginine* berubah menjadi *Isoleucine* (R10I). Kemudian kodon 14 dimana *Glutamine* menjadi *Aspartic Acid* (Q14D) dan kodon 78 dimana *Histidine* menjadi *Tyrosine* (H78Y). Pengecualian untuk sekuen Afrika tipe 1 terdapat substitusi asam amino yang berbeda dengan sekuen sampel nomor 6 yaitu kodon 10 dimana *Arginine* menjadi *Threonine* (R10T).

Pada perbandingan antara sekuen sampel dengan sekuen E6 HPV 16 dari Australia dan New Caledonia yang diteliti oleh Watts *et al* (HPV16E6CC15), menunjukkan adanya perbedaan pada susunan asam aminonya dengan susunan asam amino sekuen sampel. Namun ada varian asam amino protein E6 pada sekuen sampel yang juga ditemukan pada sekuen dari Australia ini. Varian tersebut dijumpai pada kodon 78 (H78Y). Untuk varian nukleotida pada urutan 350 yaitu terdapat perubahan nukleotida T menjadi G (T350G) yang mengakibatkan perubahan asam amino *Leucine* menjadi *Valine* (L83V) dijumpai pada sekuen HPV16E6CC15 (Australia) dan sekuen Eropa (Jerman tipe 131) tetapi varian ini tidak ditemukan pada semua sekuen sampel.

Untuk kodon 10, pada sekuen sampel terdapat perubahan *Arginine* menjadi *Isoleucine* (R10I), sedangkan pada sekuen Eropa (Jerman tipe 131G) justru menunjukkan hal yang berbeda. Pada kodon tersebut dijumpai perubahan *Arginine* menjadi *Glycine* (R10G).

Bila dibandingkan dengan sekuen VN-E6(Vietnam) dan Asia Timur (*East Asia*), tidak terlihat adanya perubahan pada kodon-kodon tersebut diatas seperti yang dialami oleh sekuen sampel. Isolat PWH-Q42 (*China*) memiliki kemiripan atau homolog dengan sekuen sampel nomor 3 yang merupakan varian Eropa.

4.2. Pembahasan

Berdasarkan data yang diperoleh, menunjukkan bahwa semua sampel yang positif Karsinoma serviks adalah jenis karsinoma yang invasif. Hal ini disebabkan karena rata-rata orang Indonesia yang datang ke Poliklinik sudah berada dalam stadium lanjut, sehingga sulit untuk menemukan lesi prekanker (CIN). Pengambilan sampel biopsi untuk penelitian ini tidak berdasarkan pada hasil pemeriksaan secara *frozen section*, tetapi berdasarkan pada kecurigaan klinis, sehingga tidak semua sampel (31 sampel) yang diduga sebagai penderita Karsinoma serviks memang benar-benar positif sebagai Karsinoma serviks sebelum akhirnya dilakukan pemeriksaan secara histopatologis pada jaringan yang diambil oleh dokter Spesialis Patologi Anatomi.

Dari hasil pengukuran konsentrasi DNA dengan menggunakan spektrofotometer menunjukkan nilai yang bervariasi. Rasio yang kurang dari 1.8 dan nilai konsentrasi DNA yang bervariasi ini menunjukkan kemungkinan pada saat preparasi DNA yang berat jaringannya kurang dari 50 mg dan kontaminasi dengan fenol maupun protein (Brown, 2003).

Berdasarkan hasil sekuensing urutan nukleotida terhadap kelima sampel tersebut menunjukkan bahwa pada 2 sampel terdapat panjang yang berbeda apabila dibandingkan dengan panjang nukleotida target. Menurut Perez *et al* (2001), bagian gen penyandi protein E6 HPV tipe 16 yang menyandi protein dimulai pada urutan nukleotida 83 – 559, sehingga target primer

dimulai dari 53-575. Namun pada kedua sampel penelitian ini (sampel nomor 26 dan 27), nukleotida yang bisa dipetakan masing-masing dimulai dari 88 dan 104. Hal ini menunjukkan pergeseran beberapa nukleotida yang cukup jauh dari target primer.

Proses isolasi dan purifikasi DNA yang tidak sempurna ataupun juga pada saat dilakukannya proses sekuensing dapat menjadi penyebab tidak terbacanya beberapa urutan nukleotida tersebut.

Dari hasil sekuensing juga ditemukan bahwa sampel nomor 26 paling banyak terdeteksi varian nukleotida sebanyak 10 varian bila dibandingkan dengan sekuen sampel lain. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Bramantyas (*Unpublished data*), yang juga menggunakan sampel yang sama dengan peneliti menemukan bahwa ternyata sampel nomor 26 merupakan infeksi campuran antara HPV tipe 16 dan HPV tipe 18. Apakah hal ini juga ada kaitan antara infeksi HPV campuran dengan banyaknya varian asam amino yang ditimbulkannya juga merupakan bahasan yang menarik untuk diteliti pada penelitian berikutnya.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Boer *et al* (2004) terhadap jaringan Karsinoma serviks asal RSUP Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta ditemukan bahwa pada varian Jawa yang paling sering dijumpai adalah varian 276G. Varian ini juga dijumpai pada salah satu sekuen sampel penelitian ini (sekuen sampel nomor 27). Varian E6 yang diteliti oleh Boer *et al* itu menyebabkan perubahan asam amino N58S. Pada sekuen sampel penelitian ini juga ditemukan perubahan asam amino penyusun N58S.

Penelitian Boer juga menunjukkan adanya varian 276G pada Karsinoma serviks asal Suriname. Hal ini menimbulkan suatu perkiraan bahwa varian ini sama dengan varian asal RSUP Dr. Cipto Mangunkusumo mengingat banyaknya migrasi orang Jawa ke Suriname.

Penelitian Swan (2005) menunjukkan terdapat beberapa varian Eropa yaitu varian E-T109C (varian Eropa dimana terjadi perubahan pada urutan nukleotida 109 yaitu *Timine* menjadi *Cytosine*), Varian E-A131G dan varian E-T350G. Pada sekuen sampel penelitian ini yaitu sekuen sampel nomor 2 menunjukkan kemiripan dengan sekuen varian E-T109C.

Sekuen sampel nomor 6 menunjukkan kemiripan dengan sekuen Afrika tipe 2. Sekuen sampel nomor 26 menunjukkan campuran antara beberapa varian seperti sekuen Afrika tipe 1 dan 2 serta Australia.

Gambaran pemeriksaan Histopatologis dari sekuen sampel yang paling banyak mengandung varian nukleotida menunjukkan gambaran *Clear Cell Carcinoma*. Gambaran *Clear Cell Carcinoma* ini merupakan jenis *Adenocarcinoma* yang terdiri atas *Clear Cell* atau *Hobnail Cells* tersusun solid. Jenis tumor ini sangat jarang ditemukan (WHO, 2003).

Gambaran *Squamous Cell Carcinoma* ditemukan pada sekuen sampel dengan tujuh varian nukleotida. WHO (2003) menyatakan bahwa tipe *Adenocarcinoma* dan *Adenosquamosa* mempunyai prognosis lebih jelek dibanding *Squamous Cell Carcinoma*. Hal ini menimbulkan dugaan bahwa varian yang ditimbulkan lebih banyak dijumpai pada jenis *Adenocarcinoma* dan *Adenosquamosa* dibanding *Carcinoma Cell Squamous*. Dugaan ini tidak benar seutuhnya karena ternyata sekuen sampel nomor 3 yang menunjukkan gambaran *Adenosquamosa* sama sekali tidak ditemukan adanya varian pada nukleotidanya.

Adanya perbedaan gambaran histopatologis dan dijumpainya polimorfisme pada sampel uji ini merupakan hal yang menarik untuk dibahas lebih lanjut. Apakah ada kaitan atau tidak antara kedua hal tersebut dapat kiranya diteliti lebih lanjut pada penelitian berikutnya

Protein E6 merupakan protein onkogenik yang penting. Transkripsi protein E6 selalu terjadi pada Karsinoma serviks, menunjukkan bahwa protein ini memiliki peranan utama dalam

tumorigenesis HPV. Peranan E6 terutama yang penting adalah dalam menginaktivasi dan mendegradasi p53 (Gonzales *et al*, 2005).

Menurut Sichero *and* Villa (2006), pada populasi penderita Karsinoma serviks di Inggris, varian E6 HPV 16 (350G), sering dihubungkan dengan meningkatnya resiko persistensi penyakit dan progresifitas perjalanan penyakit. Namun hal ini tidak ditemukan pada penelitian yang dilakukan di negara lain di Eropa. Berdasarkan hal ini, bukan tidak mungkin varian yang dijumpai pada sekuen sampel pada penelitian ini dapat berpengaruh pada perjalanan penyakit. Sehingga hal ini dapat menjadi bahasan yang juga cukup menarik apakah ada hubungan antara perubahan susunan nukleotida yang menyebabkan berubahnya asam amino yang dibentuknya pada protein E6 pada sampel ini terhadap perjalanan penyakit baik differensiasi ataupun stadium (tingkat keparahan) penyakit.