

Deteksi Infeksi *Human papillomavirus* (HPV) *High Risk* 16/18 Pada Kanker Kepala dan Leher dengan *Nested* PCR

Nelsiani To'bungan^{1*}, Siti Hamidatul 'Aliyah², Nastiti Wijayanti³, Jajah Fachiroh⁴

1Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta

2 Program Studi Farmasi, STIKES Harapan Ibu Jambi

3 Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

4 Bagian Histologi dan Biologi Sel, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
(nelsiani_tobungan@mail.uajy.ac.id, 085299096019)

Abstrak. Badan Registrasi Kanker Nasional Indonesia menempatkan kanker kepala dan leher pada posisi keempat diantara sepuluh keganasan yang terjadi baik pada laki-laki maupun perempuan. Salah satu jenis kanker kepala dan leher adalah karsinoma skuamosa sel (KSS) rongga mulut dan lidah. KSS rongga mulut dan lidah erat kaitannya dengan konsumsi rokok dan alkohol, mutasi genetik dan infeksi *Human papillomavirus* (HPV) 16/18. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi ada tidaknya infeksi HPV 16/18 pada sampel jaringan segar KSS rongga mulut dan lidah dengan *nested* PCR. Jumlah sampel yang digunakan adalah 14 (13 sampel KSS rongga mulut dan lidah, 1 sampel limfadenopati *suspect* KSS). Tahapan *nested* PCR diawali dengan amplifikasi dengan primer L1, dilanjutkan dengan amplifikasi primer E6 HPV-16 dan HPV-18. Terdapat 14,2 % (2/14) sampel menunjukkan HPV-18 positif dan HPV-16 tidak terdeteksi.

Kata kunci : Kanker kepala dan leher, kss, Infeksi HPV 16/18

PENDAHULUAN

Kanker kepala dan leher adalah salah satu kelompok kanker yang insidensinya terus meningkat di dunia. Data IARC mengenai insiden kanker kepala dan leher tahun 2010, menempatkan Indonesia sebagai salah satu negara dengan kejadian kanker kepala dan leher yang cukup besar dengan angka kejadian 11,6 per 100.000 jiwa. Gejala awal kanker ini adalah terbentuknya lesi pada daerah bibir, rongga mulut, hidung, sinus paranasal, nasofarings dan orofarings (Chaudhary et al., 2009). Data distribusi kasus kanker berdasarkan histologis dari sepuluh keganasan terbanyak tahun 1993-2007 yang diperoleh dari Rumah Sakit Kanker Dharmas-Pusat Kanker Nasional, diketahui bahwa salah satu diantara kasus kanker yang tergolong memiliki keganasan terbesar adalah kanker nasofarings, yang tergolong ke dalam kanker kepala dan leher. Berdasarkan data tersebut juga diketahui bahwa tipe histologis kanker nasofaring yang paling banyak dari tahun 2003-2007 berturut-turut adalah carcinoma undifferentiated, carcinoma; neoplasma, malignan; dan squamosa cell carcinoma (karsinoma sel skuamosa) (Suzanna et al., 2012). Karsinoma sel skuamosa adalah salah satu neoplasma epitelium malignan yang berasal dari lapisan epitel mukosa dengan dua tipe yaitu karsinoma sel skuamosa berkeratin dan karsinoma sel skuamosa tidak berkeratin (Barnes et al., 2005).

Peluang terjadinya kanker kepala dan leher meningkat seiring dengan bertambahnya konsumsi alkohol dan tembakau serta adanya infeksi Human papillomavirus (HPV) (Poltenen et al., 2010). Berdasarkan penelitian-penelitian yang dilakukan beberapa tahun terakhir, banyak bukti yang mendukung bahwa HPV, muncul sebagai prognostik utama dan prediktif penanda di kasus kanker kepala dan leher (Venuti & Paolini, 2012). Keterlibatan HPV pertama kali dikemukakan oleh Syrjanen et al., 1983 dalam Venuti & Paolini (2012) dan kemudian didukung oleh penelitian-penelitian lain yang dilakukan setelahnya. Sehingga HPV tidak hanya berkaitan dengan kanker serviks tetapi juga kanker kepala dan leher. Hal tersebut didasarkan pada beberapa hal, antara lain kesamaan morfologi antara epitelial penyusun genitalia dengan orofaring, dideteksinya genotipe HPV pada beberapa sampel oral squamosa cell carcinoma, dan ditemukan bahwa HPV menginduksi immortalitas pada keratinosit mulut manusia secara *in vitro* (Venuti & Paolini, 2012).

Human papillomavirus (HPV) merupakan jenis virus yang tidak memiliki selubung luar (envelope) (Chouhy et al., 2010). Partikel HPV tersusun atas DNA sirkular dengan ukuran 8000 base pair, yang terbungkus dalam protein yang tersusun atas dua molekul L1 dan L2 (late phase), yang mengkode protein kapsid. Selain mengkode protein kapsid, genom HPV juga mengkode 6 early proteins (E1, E2, E4, E5, E6 dan E7). E6 dan E7 HPV jika berintegrasi dengan genom inang akan mengalami overekspresi dan akan mengganggu fungsi protein RB dan protein 53 yang merupakan protein supressor tumor. Akibatnya akan terjadi gangguan pada siklus sel seperti pada check poin, perbaikan DNA dan regulasi apoptosis. Peristiwa ini akan mengawali terbentuknya malignansi (Glazer et al., 2009).

Dengan adanya penelitian di negara-negara lain yang mengemukakan adanya kaitan antara infeksi HPV dengan kejadian kanker kepala dan leher, maka perlu dilakukan studi serupa di Indonesia untuk mengkonfirmasi hal tersebut. Penelitian ini akan mempelajari secara molekuler infeksi HPV 16/18 dengan metode menggunakan metode nested PCR.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Rumah sakit kanker Dharmas-Pusat Kanker Nasional, pada September 2013-Februari 2014. Sampel yang digunakan adalah sampel jaringan tumor segar karsinoma skuamosa sel rongga mulut dan lidah sebanyak 13 dan 1 sampel limfadenopati *suspect* arsinoma skuamosa sel. Sampel tersebut kemudian diisolasi DNA genomiknya dengan menggunakan kit ekstraksi DNA (Geneaid). DNA genomic yang berhasil diisolasi selanjutnya dikuantifikasi dengan menggunakan Nanodrop (Thermo Scientific), dan dikualifikasi dengan menggunakan teknik elektroforesis dan kemudian disimpan dalam suhu -20°C.

DNA sampel diamplifikasi untuk tujuan typing HPV 16/18 dengan menggunakan PCR dengan *consensus primer* HPV *Open Reading Frame* (ORF) universal untuk mengamplifikasi L1 *region* dari HPV tipe 6, 11, 16, 18 dan 33. Adapun Sekuen *forward primer* yaitu 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG -3' dan *reverse primer* 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC -3' (Manos *et al.*, 1995)⁸ dengan menggunakan program PCR yang telah dioptimasi sebelumnya, yaitu: Predenaturasi 95°C selama 4 menit, Denaturasi 95°C selama 30 detik, *Annealing* 55°C selama 30 detik, *Polimerasi* 72°C 1 menit 30 detik, *post polimerasi* 72°C 10 menit. Selanjutnya dilakukan PCR tahap kedua (*nested*) pada produk PCR dengan primer HPV-L1, dengan menggunakan primer HPV 16 maupun 18 untuk menentukan jenis HPV yang menginfeksi. Sekuen primer HPV 16 dan 18 merupakan bagian dari region HPV-L1. *Forward primer* untuk HPV 16 yaitu 5'- CATTGTGGGGTAACCAAC -3' dan *reverse primer* yaitu 5'- TAGGTCTGCAGAAAACCTTC -3' (Manos *et al.*, 1995).⁸ Sekuen *forward* dan *reverse primer* spesifik HPV tipe 18 berturut-turut yaitu 5'-TGTTTGCTGGCATAATCAAT-3' dan 5'-TAAGTCTAAAGAAAACCTTTTC -3' (Manos *et al.*, 1995).⁸ Program amplifikasi HPV 16 dan 18 meliputi, predenaturasi dengan suhu 95°C selama 4 menit, denaturasi pada 94°C, *annealing* 56,4°C selama 30 detik, *polimerisasi* 72°C selama 1 menit, 30 detik, *post polimerisasi* pada suhu 72°C selama 10 menit dan proses pendinginan pada suhu 4°C dengan lama waktu tak hingga. Produk PCR divisualisasikan menggunakan gel agarose 2 %. Dengan *running buffer* TBE 1X pH 8 dengan pewarna *Ethidium Bromide*. Hasil positif menunjukkan fragmen yang diamplifikasi masing-masing 450 bp, 412 bp dan 415 bp untuk HPV-L1, HPV 16 dan HPV 18.

HASIL dan PEMBAHASAN

Hasil

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 14 sampel. Yang terdiri dari 8 pasien laki-laki dan 6 pasien perempuan. Data klinis pasien dapat dilihat pada Tabel 1. Dari data tersebut diketahui semua pasien merupakan pasien kanker kepala dan leher yang tergolong karsinoma skuamosa sel. Hasil kuantifikasi DNA sampel disajikan pada Lampiran Tabel 2. Hasil

Kuantifikasi DNA menunjukkan, konsentrasi DNA sampel yang digunakan ada pada rentang 12,9 – 156 ng/ μ l. Hal tersebut menunjukkan kuantitas DNA masih tergolong baik. Sementara Hasil kualifikasi DNA sampel dapat dilihat pada Gambar 1.

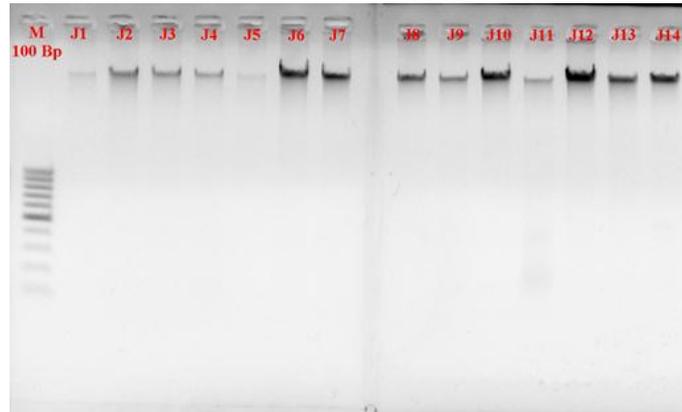
Tabel 1. Data Klinis Pasien

Kode Sampel	Jenis Kelamin	Usia	Marital Status	Diagnosis	Diagnosis PA
J1	L	48	Menikah	KSS	KSS berkeratin
J2	L	31	Menikah	KSS	KSS berkeratin
J3	L	42	Menikah	KSS	KSS
J4	P	41	Menikah	KSS	KSS
J5	P	44	Menikah	Susp. Ca Lidah	KSS berkeratin
J6	P	50	Menikah	KSS	KSS berkeratin
J7	L	27	Menikah	KSS	KSS
J8	L	60	Menikah	KSS	KSS
J9	P	35	Menikah	Tumor Lidah	KSS
J10	P	64	Menikah	KSS	KSS
J11	L	26	Belum Menikah	KSS	KSS berkeratin
J12	L	37	Menikah	Susp.KSS	Limfadenopati
J13	L	28	Belum Menikah	Ca Lidah	KSS
J14	P	45	Menikah	Susp. KSS	KSS berkeratin

Keterangan: KSS: Karsinoma sel skuamosa; Susp.: *Suspect*; Ca: Kanker.

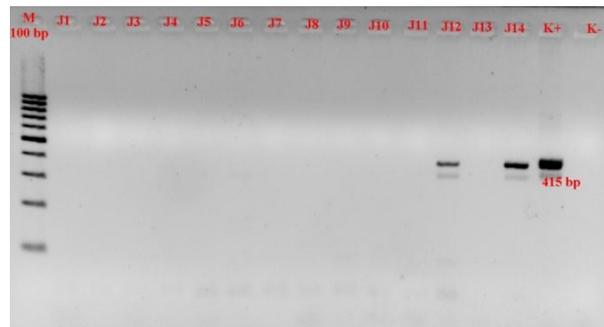
Tabel 2. Data kuantifikasi DNA Sampel Jaringan Segar

Kode Sampel	Konsentrasi Asam Nukleat		Unit	A260	A280	260/280
J1	82,2		ng/ μ l	1,645	0,899	1,83
J2	58,3		ng/ μ l	1,167	0,648	1,8
J3	82,5		ng/ μ l	1,65	0,893	1,85
J4	17,2		ng/ μ l	0,344	0,202	1,7
J5	66		ng/ μ l	1,321	0,729	1,81
J6	81,5		ng/ μ l	1,629	0,818	1,99
J7	12,9		ng/ μ l	0,257	0,157	1,64
J8	76,3		ng/ μ l	1,525	0,989	1,54
J9	58,9		ng/ μ l	1,179	0,647	1,82
J10	44,1		ng/ μ l	0,882	0,479	1,84
J11	41,1		ng/ μ l	0,823	0,457	1,8
J12	44,4		ng/ μ l	0,888	0,468	1,9
J13	67		ng/ μ l	1,341	0,74	1,81
J14	156		ng/ μ l	3,12	1,69	1,85

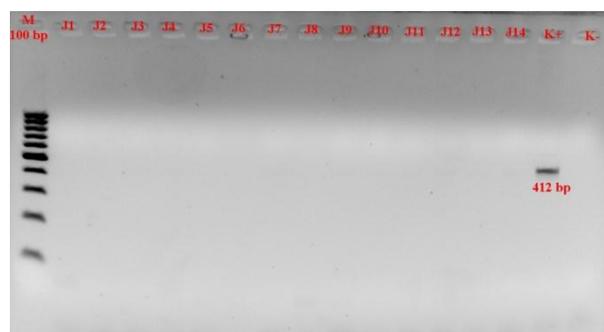


Gambar 1. Visualisasi Isolat DNA Sampel

Dari hasil typing HPV 16/18 dengan nested PCR menunjukkan ada 2 pasien yang menunjukkan HPV-18 positif dan tidak ada sampel yang menunjukkan HPV-16 positif. Adapun hasil visualisasi sampel yang terdeteksi HPV-18 dapat dilihat pada Gambar 2. Sementara hasil visualisasi sampel yang menunjukkan HPV-16 negatif dapat dilihat pada Gambar 3. Data hasil typing HPV 16/18 disajikan dalam Tabel 3.



Gambar 2. Hasil Typing HPV 18



Gambar 3. Hasil Typing HPV 16

PEMBAHASAN

HPV 16/18 merupakan tipe virus yang dapat mengakibatkan gangguan kesehatan pada manusia jika menginfeksi. HPV 16/18 biasa dikategorikan HPV *high-risk* (Faridi *et al.*, 2011). Selain kanker serviks, ternyata virus ini juga berkorelasi dengan kanker kepala dan leher jenis karsinoma

skuamosa sel rongga mulut yang insidensinya terus meningkat. HPV 16/18 adalah tipe virus yang paling sering dijumpai menginfeksi pada kanker kepala dan leher (Glazer *et al.*, 2009). Kasus kanker kepala dan leher yang disertai dengan infeksi HPV, awalnya ditemukan di negara-negara barat.

Berdasarkan hasil penelitian ini diperoleh informasi bahwa tipe virus yang menginfeksi pada sampel kanker kepala dan leher jenis karsinoma skuamosa sel rongga mulut dan lidah adalah HPV 18. Penelitian terdahulu menginformasikan bahwa terdapat variasi yang sangat beragam terkait lokasi kanker kepala dan leher yang disertai infeksi HPV. Tidak dijumpai infeksi HPV pada karsinoma mulut dan laringeal, sementara pada kasus karsinoma oropharingeal infeksi HPV mencapai 93% dan pada kasus karsinoma skuamosa rongga mulut 38,1% (Termine *et al.*, 2008).

HPV 18 merupakan salah satu tipe HPV yang tergolong *high-risk*. Berdasarkan beberapa penelitian terdahulu diketahui bahwa infeksi HPV 18 pada kasus kanker kepala dan leher menduduki peringkat ke-2 terbesar setelah infeksi HPV 16 (Ramshankar & Krishnamurty, 2012);(Lajer & Von Buchwald, 2010). Infeksi HPV 16 paling banyak ditemukan pada kasus karsinoma faring dan tonsil, dan paling sedikit menginfeksi pada kasus karsinoma rongga mulut dan laring (Hobs *et al.*, 2006). Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini, dengan hanya terdeteksinya infeksi HPV 18 karena sampel karsinoma rongga mulut dan lidah adalah sampel yang paling banyak digunakan. Sampel lain yang menunjukkan HPV 16/18 negatif tetap perlu dilakukan *typing* HPV dengan primer HPV *high-risk* lainnya. Hal tersebut penting untuk mengkonfirmasi jenis-jenis HPV *high-risk* lainnya, selain HPV 16/18 yang kerap menginfeksi pada kasus kanker kepala dan leher di Indonesia

Beberapa studi terkait infeksi HPV pada kanker kepala dan leher, mengaitkannya dengan adanya perilaku oral seks dan *open-mouthed kissing* (D'Souzha, 2009). Oral seks memungkinkan HPV turut menginfeksi mulut dan daerah sekitar farings dan orofarings, mengingat struktur morfologi epitelial penyusun genitalia, dan daerah sekitar mulut dan orofarings yang hampir sama. Penelitian yang dilakukan sebelumnya yang menganalisis 28 sampel kanker kepala dan leher, menemukan bahwa keseluruhan sampel positif HPV 16 (Wiest *et al.*, 2009). Hal yang tidak jauh berbeda juga dikemukakan dalam hasil penelitian di Baltimore yang menganalisis 59 sampel kanker di Baltimore, Maryland, ditemukan 20 dari 59 sampel (33,89%) kanker kepala dan leher positif HPV 16 (Chuang *et al.*, (2008). Sedangkan di India, ditemukan sekitar 22% infeksi HPV 16 dan 14% infeksi HPV 18 pada kasus kanker orofaring dan kanker mulut (Kulkarni, 2013)

Penelitian yang dilakukan di Rumah sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta meneliti jenis HPV yang terkait dengan kasus kanker serviks di Indonesia, mendapatkan bahwa infeksi HPV 16 dan 18 pada adenokarsinoma masing-masing 12,5 % dan 62,5%. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa distribusi HPV 18 di Indonesia cukup besar dibanding wilayah-wilayah lain di dunia. Besarnya distribusi tersebut akan mempengaruhi besarnya kemungkinan HPV 18 untuk menginfeksi baik pada genitalia maupun daerah mulut, farings dan orofarings (Schellekens *et al.*, 2004).

KESIMPULAN DAN SARAN

Tipe HPV yang menginfeksi sampel adalah HPV 18, dengan jumlah sampel yang terinfeksi adalah 2 (14,2%) dari total 14 sampel. Tidak ada sampel yang terinfeksi HPV 16. Penggunaan sampel yang lebih banyak pada penelitian-penelitian yang akan datang akan sangat membantu untuk mengkonfirmasi tipe HPV yang menginfeksi pada kasus kanker kepala dan leher yang terjadi di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnes, L., Eveson, W. J., Reichart, P., Sindransky, D. 2005. *Pathology and Genetics Head and Neck Tumours*. France: IARC Press.
- Cabelguenne, A., Blons, H., Waziers, D.I., Carnot, F., Houllier, A-M., Soussi, T., Brasnu, D., Beaune, P., Laccourreye, O., Laurent-Puig, P. 1999. p53 Alterations Predict Tumor Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Perspective Series. *Journal of Clinical Oncology* 18(7):1465- 1473.
- Cardesa, A., & Nadal, A. 2011. Carcinoma of The Head and Neck in The HPV era. *Acta Dermatoven APA* 20(3):161-173.
- Chaudhary, A.J., Singh M., Sundaram S., Mehrotra R. 2009. Role of Human Papillomavirus and Its Detection in Potentially Malignant and Malignant Head and Neck Lesions: Updated Review. *Head and Neck Oncology* 1(22):1-12.
- Chen, W., Turto, J.N., Tomalia, D.A. 2000. Using Ethidium Bromide to Probe the Interaction between DNA and Dendrimers. *Langmuir* 16(1):15-19.
- Chin, D., Boyle, G.M., Theile, D.R., Parsons, P.G., Coman, W.B. 2004. Molecular Introduction to Head and Neck Cancer (HNSCC) Carcinogenesis. *British Association of Plastic Surgeon* 57: 595-602.
- Chouchy, D., Gorosito, M., Sanchez, A., Serra, E.C., Bergero, A., Bussy, R.F., Giri, A.A. 2010. New Genetic Primer System Targeting Mucosal/genital and Cutaneous Human Papillomaviruses Leads to The Characterization of HPV 115, a Novel beta-Papillomavirus Species 3. *Virology* 397:205-216.
- Chuang, Y.A., Chuang, C.T., Chang, S., Zhou, S., Begum, S., Westra, H.W., Ha P.K., Koch, M.W., Califano, A.J. 2008. Presence of HPV DNA in Convalescent Salivary Rinses is an Adverse Prognostic Marker in Head and Neck Squamous Cells Carcinoma. *Oral oncology* 44: 915-919.
- D'Souza, G., Kreimer, A.R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W.M., Westra, W.H., Gillison M.L. 2007. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356:1944-1956
- Desen, W. 2013. *Onkologi Klinis*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Faridi, R., Zahra, A., Khan, K., Idrees, M. 2011. Oncogenis Potential of Human papillomavirus (HPV) and Its Relation with Cervical Cancer. *Virology Journal* 8(269):1-8.
- Glazer, C.A., Chang S.S., Ha P.K., Califano J.A. 2008. Applying the Molecular Biology and Epigenetics of Head and Neck Cancer in Everyday Clinical Practice. *Oral oncology* 45: 440-446.
- Hobbs, C.G., Sterne, J.A., Bailey, M., Heyderman, R.S., Birchall, M.A., Thomas, S.J. 2006. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Otolaryngol* 31:259-66

- Kulkarni, M.R. 2013. Head and Neck Cancer Burden in India. *International Journal of Head and Neck Surgery* 4(1):29-35.
- Lajer, C.B. & Buchwald, C.V. 2010. The Role of Human papillomavirus in Head dan Neck Cancer. *The Authors Journal Compilation APMIS* 118: 510-519.
- Manos, M.M., Richmond, Bauer, H.M., Greer, C.E., Resnick, R.M., Ting, Y., Berkelay. 1995. Detection of Human papillomavirus by The Polymerase Chain Reaction. *United States Patent* 50: 1-65.
- Poltinen, J.K., Helppi, H.M., Pääkkö, P., Turpeenniemi-Hujanen, T., Vähäkangas, K.H. 2010. p53 in Head and Neck Cancer: Functional Consequences and Environmental Implications of TP53 Mutations. *Head and Neck Oncology* 2(36):1-10.
- Ramshankar, V., & Krishnamurthy, A. 2013. Human papillomavirus in Head dan Neck Cancer-Role and Relevance in Clinical Management. *Indian Journal Surgical Oncology* 4(1):59-66.
- Schellekens, M.C., Dijkman, A., Aziz, M.F., Siregar, B., Cornain, S., Kolkman, Uljee, S., Peters, L.A.W., Fleuren, G.J. 2004. Prevalence of Single and Multiple HPV Types in Cervical Carcinomas in Jakarta, Indonesia. *Gynecologic Oncology* 93:49-53
- Suzanna, E., Sirait, T., Rahayu, P.S., Shalmant, G., Anwar, R., Rizka, A., Harjati, Panigoro, S.S. 2012. Registrasi Kanker Berbasis Rumah Sakit di Rumah Sakit Kanker Dharmais-Pusat Kanker Nasional 1993-2007. *Indonesian Journal of Cancer* 6(4):181-205.
- Termine, N., Panzarella, V., Falaschini, S., Russo, A., Matranga, D., 2008. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988- 2007). *Ann Oncol* 2008;19:1681–90.
- Venuti, A. & Paolini, F. 2012. HPV Detection Methods in Head and Neck Cancer. *Head and Neck Pathology* 6: s63- s74.
- Weber A., Wittekind, C., Tannapfel, A. 2003. Genetic and Epigenetic Alterations of 9p21 Gene Products in Benign and Malignant Tumors of The Head and Neck. *Pathology Researches and Practice* 199: 391-397.
- Wiest, T., Schwart, E., Enders, C., Flechtenmacher, C., Bosch, F.X. 2002. Involment of Intact HPV 16 E6/E7 Gene Expression in Head and Neck Cancer with Unaltered p53 Status and Perturbed pRb Cycle Control. *Oncogen* 21:1510-1517.