

Penggunaan Gen *E6* Sebagai Target Deteksi *Human Papillomavirus* Tipe 11 dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*

Mariana Wahjudi¹, Eko Setiawan^{2,3}, Elchemi N. Tofinastri¹

¹Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Surabaya, Indonesia, ²Departemen Farmasi Klinis dan Komunitas, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya, Surabaya, Indonesia, ³Pusat Informasi Obat dan Layanan Kefarmasian (PIOLK), Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya, Surabaya, Indonesia

Abstrak

Infeksi *Human Papillomavirus* (HPV) tipe 11 dapat menyebabkan penyakit *condyloma acuminata* yang merupakan salah satu faktor risiko terjadinya kanker anogenital. Sampai saat ini, proses deteksi dini HPV kelompok *low risk*, termasuk untuk tipe 11 didasarkan pada metode *polymerase chain reaction* (PCR) umumnya pada gen *L1*. Namun terdapat kelemahan deteksi berdasarkan gen *L1* yaitu tidak tersisipnya gen ini pada genom pasien yang terinfeksi dan laju mutasinya tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer berdasarkan urutan nukleotida gen *E6* dari HPV tipe 11 dan melakukan *pilot implementation* penggunaan primer pada spesimen apusan serviks pasien rawat jalan RSUD Bangil, Jawa Timur. Pembuatan primer untuk deteksi keberadaan virus HPV tipe 11 dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Primer3 Plus*, analisis dilakukan dengan *Oligoanalyzer 3.1* dan *BLASTn*, yang semuanya merupakan perangkat lunak *open source*. *Primer3 Plus* dan *BLASTn* dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sedangkan *Oligoanalyzer 3.1* dari *Integrated DNA Technologies*. Optimasi suhu penempelan (*annealing*) primer untuk identifikasi gen *E6* HPV tipe 11 dilakukan pada gradien suhu 44–63°C. Proses *pilot implementation* primer dilakukan selama satu bulan pada pasien rawat jalan baru yang diduga terinfeksi HPV. Pasangan primer E11(+)/E11(-) telah dirancang, dengan urutan 5'-GTA AAG ATG CCT CCA CGT CT-3' dan 5'-CTA CTG TAG GTG CAT ATG CAG C-3', yang menempel dan memperbanyak area pada basa ke 8 - 268 dari gen *E6*. Pasangan primer tersebut memenuhi syarat sebagai primer ideal untuk deteksi HPV tipe 11 ditinjau dari berbagai parameter. Pada reaksi PCR dihasilkan hanya satu pita DNA berukuran ~260 bp pada gradien suhu antara 44–63°C dengan menggunakan *template* dari DNA pasien positif terinfeksi HPV tipe 11. Total terdapat empat pasien yang dirujuk oleh dokter selama periode pengambilan data untuk ditentukan kemungkinannya terinfeksi HPV. Satu di antara keempat pasien tersebut (B1) terdeteksi positif mengandung gen *L1* dari HPV pada PCR menggunakan primer GP5(+)/GP6(+). Berdasarkan deteksi dengan pasangan primer E11(+)/E11(-), keempat sampel tersebut mengandung HPV tipe 11. Dapat disimpulkan bahwa primer E11(+)/E11(-) yang didasarkan pada gen *E6* dapat mendeteksi keberadaan HPV tipe 11 lebih akurat dibandingkan primer yang didasarkan pada urutan gen *L1*.

Kata kunci: HPV tipe 11, primer GP5(+)/GP6(+), primer E11(+)/E11(-)

The Use of *E6* Gene as a Target of *Human Papillomavirus* Type 11 Detection Using *Polymerase Chain Reaction*

Abstract

The *Human Papillomavirus* (HPV) type 11 infection, potentially trigger *condyloma acuminata*, which is a risk factor of anogenital cancer. Recently, the low risk HPV groups, particularly type 11, was detected on the *L1* gene by polymerase chain reaction (PCR) method. Meanwhile, the weakness of using the *L1* sequence include its high mutation rate and the facts that the gene was not inserted into the human genome during infection. Therefore, this study aims to design primer pair, based on nucleotide sequence of the *E6* gene for type 11 HPV, and to conduct their implementation using the cervical swabs samples from RSUD Bangil, East Java, Indonesia. The *Primer3 Plus* software was used to design the primers and further analysed them using both *Oligoanalyzer 3.1* and *BLASTn* from NCBI. The annealing temperature of PCR was optimized at the gradient ranging from 44–63°C. The pilot implementation of primer was conducted approximately a month for new outpatients suspected of being infected with HPV. The primers pair, such as E11(+)/E11(-), designed into the following sequences: 5'-GTA AAG ATG CCT CCA CGT CT-3' and 5'-CTA CTG TAG GTG CAT ATG CAG C-3' were presented in the 8 to 288 *E6* gene. These were the ideal primers for type 11 HPV in terms of various parameters. Meanwhile, only one band of ~260-bp size appeared at the end of PCR on the annealing gradient temperature between 44–63°C using the total DNA obtained from patients infected with type 11 HPV as a template. A total of four patients were referred by doctors during the data collection period to test for the possibility of HPV infection. However, one of them (code B1) was detected positively for having the *L1* gene on PCR using the GP5(+)/GP6(+) primers. Based on the detection of *E6* gene using E11(+)/E11(-) primer, all the patients' samples contained type 11 HPV. In conclusion, the *E6* gene based-primers, such as E11(+)/E11(-), detected the presence of type 11 HPV more accurately compared to the *L1* sequence.

Keywords: Type 11 HPV, primer E11(+)/E11(-), primer GP5(+)/GP6(+)

Korespondensi: Dr. Dra. Mariana Wahjudi, M.Si., Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Surabaya, Jawa Timur 60293, Indonesia, *email:* mariana_wahyudi@staff.ubaya.ac.id

Naskah diterima: 24 Maret 2020, Diterima untuk diterbitkan: 3 Agustus 2020, Diterbitkan: 29 September 2020

Pendahuluan

Human Papillomavirus (HPV) merupakan virus *deoxyribo nucleic-acid* (DNA) *non-enveloped* keluarga Papillomavirida yang pada umumnya menyebabkan kelainan medis pada daerah mucosal-genital.¹⁻³ Berdasarkan potensi dalam menyebabkan kanker serviks, HPV dapat dibagi menjadi dua kelompok besar yaitu *high-risk* HPV (antara lain tipe 16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 dan 70) dan *low-risk* HPV (antara lain tipe 6, 11, 42, 43 dan 44).^{1,4} Walaupun memiliki risiko rendah dalam menyebabkan kanker serviks, *low risk* HPV dapat menyebabkan penyakit lain yang mengganggu sistem reproduksi, antara lain *condyloma acuminata* atau yang secara umum dikenal dengan istilah “kutil kelamin”. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pasien dengan kelainan *condyloma acuminata* mempunyai risiko tinggi untuk dapat menderita kanker anogenital termasuk kanker vulva, vagina, penis dan anus.^{5,6} Data penyakit kanker di Amerika Serikat dari tahun 1999 hingga 2015 menunjukkan bahwa insiden *non-cervical* HPV setiap tahun mengalami peningkatan. Insiden *oropharyngeal* SCC meningkat 2,7% per tahun untuk laki-laki dan 0,8% per tahun untuk perempuan.⁷ Tanpa deteksi dan terapi sejak dini, potensi terjadinya peningkatan angka kejadian sangat dikhawatirkan, baik insiden maupun prevalensi, kanker anogenital akan semakin tidak terkendali.⁸⁻¹⁰ Sebagai konsekuensi dari peningkatan tersebut, kajian beban pembiayaan kesehatan dari beberapa negara menunjukkan besarnya kebutuhan anggaran untuk tatalaksana penyakit yang disebabkan oleh HPV.¹¹⁻¹³

Upaya pencegahan dan terapi sejak dini perlu dioptimalkan untuk mencegah kejadian atau progresivitas penyakit yang lebih berbahaya. Keberadaan vaksin HPV terbukti dapat menurunkan angka kejadian terkait infeksi dan kanker HPV.¹⁴⁻¹⁶ Walaupun telah

terdapat kajian terkait implementasi vaksin HPV di Indonesia^{17,18}, namun sampai saat ini, besar kemungkinan program vaksinasi belum diimplementasikan secara optimal di seluruh wilayah Indonesia.¹⁹ Oleh karena itu, upaya deteksi dini infeksi HPV (termasuk infeksi HPV *low risk*) diharapkan mampu menjadi salah satu metode *early detection* yang akurat bagi infeksi HPV tipe 11. Beberapa studi terdahulu telah dilakukan oleh para peneliti untuk mendeteksi keberadaan HPV, di antaranya *Signal amplification assays*, *Microarray analysis*, *PapilloCheck®*, *Real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR), *Abbott real time PCR*, *COBAS® 4800 HPV test*, *HPV genome sequencing*, dan lain-lain.²⁰ Namun hingga saat ini, proses deteksi yang paling umum dilakukan yakni dengan menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Metode PCR merupakan metode yang sensitif, akurat, ekonomis dan cenderung mudah untuk dilakukan apabila dibandingkan dengan metode-metode yang lainnya. Deteksi keberadaan HPV dengan menggunakan PCR telah berhasil dilakukan dalam beberapa penelitian terdahulu, terutama dengan cara mendesain pasangan primer yang secara spesifik mampu mendeteksi gen pada HPV. Walaupun demikian, secara umum primer yang telah didesain memiliki target deteksi virus HPV golongan *high risk* dan/atau mendeteksi lebih dari satu tipe HPV dalam sekali proses PCR. Salah satu contoh primer yang termasuk *broad primer* adalah GP5(+)/GP6(+). Pasangan primer ini dirancang untuk mendeteksi area *L1* HPV berdasarkan urutan genom tipe 6, 11, 16, 18, 31 dan 33, dan terbukti dapat mendeteksi setidaknya 27 genotip HPV.²¹ Kelemahan primer ini adalah mendeteksi satu kelompok virus, khususnya tipe *high risk*. Kelemahan lainnya adalah gen *L1* ini memiliki laju mutasi yang tinggi dan pada saat DNA HPV menyisip di genom manusia, sehingga kemungkinan besar HPV kehilangan sebagian besar daerah gen *E1*,

E2, L1 dan L2.^{20,22,23}

Sampai saat ini, proses deteksi dini jenis HPV yang tergolong *low risk* belum banyak dikembangkan, termasuk untuk HPV tipe 11. Apabila hal tersebut tidak segera mendapat perhatian dari pemerintah dan akademisi, tidak menutup kemungkinan akan semakin banyak kasus infeksi HPV baru terdeteksi pada kondisi yang cenderung sudah parah. Lebih jauh, permasalahan ini dikhawatirkan akan semakin meningkatkan angka kejadian penyakit kanker di Indonesia.²⁴⁻²⁶ Peningkatan jumlah pasien kanker dapat menyebabkan peningkatan kebutuhan anggaran kesehatan di era implementasi sistem Jaminan Kesehatan Nasional (JKN) dengan mempertimbangkan harga kemoterapi yang tidak murah dan durasi terapi yang cukup panjang.²⁷⁻³⁰

Metode deteksi HPV tipe 11 yang ada pada saat ini didasarkan pada metode PCR pada gen *L1* dari HPV. Penggunaan gen *L1* dalam proses identifikasi HPV memiliki kelemahan, yaitu gen *L1* kemungkinan besar tidak menyisip di genom manusia setelah virus menginfeksi manusia dan laju mutasinya tinggi. Hal-hal tersebut dapat menyebabkan tidak terdeteksinya HPV dengan primer yang didasarkan pada gen *L1*,^{21,31,32} dan gen *E1*.³³

Gen *E6* HPV terdapat pada daerah *early region* dari genom HPV pada umumnya, termasuk tipe 11. Gen *E6* merupakan gen yang sangat dibutuhkan oleh HPV untuk bertahan hidup, sehingga dapat meningkatkan kemungkinan tingginya tingkat replikasi gen *E6* pada saat virus menginfeksi sel inang, termasuk manusia, dan meningkatkan potensi untuk teridentifikasi pada proses pemeriksaan laboratorium.³⁴⁻³⁶ Selain itu, gen ini juga merupakan gen yang memiliki kemungkinan mengalami mutasi yang rendah sehingga primer yang telah dirancang memiliki jangka waktu pakai yang lama.^{24,34} Beberapa gen lain pada genom HPV lebih rentan mengalami mutasi sehingga dapat meningkatkan risiko kegagalan identifikasi oleh primer yang telah

tersedia sebagai akibat tidak dikenalnya gen yang mengalami mutasi. Berdasarkan hal-hal tersebut maka gen *E6* merupakan gen yang berpotensi besar sebagai target deteksi bagi HPV. Namun demikian, deteksi gen *E6* HPV tipe 11 tidak dapat dilakukan dengan metode lain yang lebih cepat dari PCR biasa, misalnya dengan metode *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Urutan gen *E6* sebagai target deteksi tidak memiliki sisi pengenalan enzim yang dapat digunakan untuk deteksi cepat secara RFLP. Berdasarkan hal-hal di atas, maka perancangan primer yang sangat spesifik untuk reaksi PCR biasa menjadi sangat penting.

Sampai saat ini, belum ditemukan bukti penelitian terpublikasi di Indonesia yang mengidentifikasi HPV tipe 11 pada spesimen apusan serviks menggunakan gen *E6* sebagai target identifikasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendesain primer berdasarkan urutan nukleotida gen *E6* HPV tipe 11 dan melihat kemungkinan ditemukannya HPV tipe 11 pada spesimen apusan serviks pasien rawat jalan di RSUD Bangil, Jawa Timur.

Metode

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap, yaitu: desain primer untuk identifikasi gen *E6* HPV tipe 11 dan proses optimasi suhu penempelan (*Ta*) primer yang dilakukan di laboratorium Purifikasi dan Biologi Molekuler, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, serta *pilot implementation* pendeteksian HPV tipe 11 yang dilakukan di klinik rawat jalan RSUD Bangil, Jawa Timur.

Perancangan primer untuk identifikasi gen *E6* HPV tipe 11

Pembuatan primer untuk deteksi keberadaan virus HPV tipe 11 dilakukan menggunakan perangkat lunak *Primer3 Plus*³⁷ dan *Primer-blast*.³⁸ Primer HPV tipe 11 dirancang dengan berdasarkan kriteria umum primer ideal^{39,40},

yaitu: 1) memiliki urutan basa yang spesifik dengan panjang primer antara 17-28 basa; 2) memiliki komposisi G dan C sebanyak 50–60%; 3) memiliki titik leleh (T_m) antara 55–75°C dan perbedaan T_m antara kedua primer [E11(+) dan E11(-)] tidak lebih dari 5°C; serta 4) memiliki kemungkinan *hairpin*, *primer dimer* dan *mispriming* yang rendah. Urutan DNA gen *E6* HPV tipe 11 didasarkan pada genom lengkap HPV tipe 11 isolat 29, dengan nomer akses GenBank LN833189.1. Primer pada penelitian ini dipesan dari Operon.

Ekstraksi total DNA pasien

Ekstraksi DNA dari apusan serviks pasien dilakukan sesuai prosedur Kit Ekstraksi DNA *ExGene SV Clinic*™ (Cat.no. GA-108-101, GeneAll Biotechnology Co. Ltd., Seoul, Korea). Secara singkat, tahapan ekstraksi dilakukan sebagai berikut: ujung sikat atau kapas apusan dilepaskan dari tangkainya, dimasukkan ke tabung mikrosentrifuge yang berisi 400 μL *phosphate buffer saline* (PBS). Sebanyak 20 μL RNase A (20 mg.ml⁻¹), dicampur dengan vortex dan diinkubasi pada suhu kamar selama 2 menit. Ke dalam tabung ditambahkan 20 μL Proteinase K (20 mg.ml⁻¹) dan 400 μL Buffer BL dan diinkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit. Setelah itu sebanyak 400 μL etanol absolut ditambahkan ke dalamnya dan dicampur rata. Campuran dilewatkan kolom silika untuk mengikat DNA, kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada 6000g. Kolom dicuci dengan 600 μL Buffer BW dengan sentrifugasi selama 1 menit pada 6000g kemudian diikuti dengan pencucian kolom dengan 700 μL Buffer TW dan disentrifugasi kembali selama 1 menit pada 6000g. Elusi dilakukan dengan 200 μL Buffer AE. Kadar DNA genomik ditentukan melalui metode nano-spektrometer.

Reaksi *polymerase chain reaction* (PCR)

Reaksi PCR secara umum dilakukan dalam

10 μL campuran reaksi berisi 5 μL 2X *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 20 ng total DNA dan 1 μM masing-masing primer. Kondisi reaksi PCR diatur sebagai berikut: pre-denaturasi 94°C selama 5 menit, diikuti 30 siklus denaturasi 95°C selama 30 detik, suhu penempelan (T_a) sesuai hasil optimasi selama 30 detik dan pemanjangan rantai 72°C selama 1 menit. Reaksi disempurnakan dengan pemanjangan rantai akhir pada 72°C selama 10 menit. Proses PCR dilakukan pada mesin Labnet Multigene Optimax.

Kontrol untuk ekstraksi DNA dan reaksi PCR

Untuk memastikan bahwa sampel total DNA hasil ekstraksi mengandung DNA dengan kualitas yang baik untuk proses PCR, maka dilakukan reaksi PCR dengan primer NS1 dan primer 21. Primer ini menempel pada daerah 8S ribosomal N1 atau 45S pre-ribosomal N2 sel eukariot dengan produk ~590 bp. Reaksi PCR dilaksanakan dalam campuran reaksi PCR yang telah diuraikan di bagian sebelumnya dan dengan pengaturan kondisi PCR yang sama tetapi dengan suhu penempelan (T_a) 59°C sesuai hasil optimasi dengan primer tersebut.

Deteksi keberadaan HPV secara umum pada sampel DNA

Deteksi keberadaan HPV semua tipe dalam sampel total DNA hasil ekstraksi dilakukan dengan reaksi PCR menggunakan primer GP5(+)/GP6(+).^{21,41} Primer ini menempel pada daerah gen L1 semua tipe HPV. Reaksi PCR dilaksanakan dengan cara yang sama seperti di atas tetapi dengan suhu penempelan 51°C sesuai hasil optimasi yang telah dilakukan pada penelitian ini. Target mempunyai ukuran 150 pasang basa (pb).

Optimasi suhu penempelan PCR menggunakan pasangan primer hasil rancangan

Pada awalnya, dilakukan optimasi suhu penempelan (T_a) untuk mendapatkan kondisi

PCR menggunakan pasangan primer yang dirancang pada penelitian ini [primer E11(+) dan E11(-)]. Reaksi PCR dilakukan dalam campuran reaksi dan kondisi reaksi yang sama seperti telah diuraikan di atas. Optimasi suhu dilakukan pada gradien suhu antara 44°–63°C. Produk PCR memiliki kisaran ukuran 260 pb. Sebagai kontrol digunakan DNA dari sampel biopsy pasien yang positif mengidap HPV (kode K+1).

Pilot implementation deteksi adanya HPV tipe 11 pada apusan serviks pasien rawat jalan Pilot implementation identifikasi keberadaan HPV tipe 11 pada pasien rawat jalan baru yang diduga terinfeksi HPV dilakukan selama satu bulan periode pengumpulan sampel (14 Oktober–13 November 2016) dari RSUD Bangil. Penelitian ini dilaksanakan dengan persetujuan dari Direktur RSUD Bangil, Kabupaten Pasuruan, sesuai surat izin etik dengan nomor 445.1/2251/424.079/2016. Apusan serviks yang digunakan pada penelitian ini merupakan bagian dari sampel yang diambil dokter untuk pemeriksaan rutin. Dengan kata lain, tidak terdapat pengambilan sampel secara khusus untuk tujuan penelitian. Penentuan pasien dan proses pengambilan apusan serviks pasien dilakukan oleh dokter yang bertanggung jawab merawat pasien. Reaksi PCR dilakukan dalam campuran reaksi yang sama seperti di atas pada pengaturan reaksi PCR dengan Ta 57,6°C menggunakan pasangan primer hasil rancangan pada penelitian ini [E11(+) dan E11(-)]. Sebagai kontrol digunakan DNA hasil ekstraksi dari specimen yang berasal dari apusan bukal perempuan yang tidak terjangkit HPV (kode N1), dan dari biopsy pasien yang terinfeksi HPV (kode K+1).

Visualisasi produk PCR

Produk PCR ditentukan ukurannya dengan cara pemisahan fragmen DNA berdasarkan ukurannya pada elektroforesis gel agarosa.

Untuk produk PCR yang berukuran 150 pb dan 260 pb maka digunakan gel agarosa dengan konsentrasi 2% (b/v) dengan standar ukuran nukleotida *pre-stained* 100 pb (NEB), sedangkan produk PCR berukuran 590 pb, proses elektroforesis pada gel agarosa konsentrasi 1% (b/v) dengan standar ukuran nukleotida BenchTop DNA Markers (Promega).

Hasil

Desain primer untuk identifikasi gen *E6* pada HPV terdapat pada urutan 8-268 pb. Dari urutan basa tersebut, dipilih 20 urutan basa pertama yang kemudian digunakan sebagai primer E11(+), yaitu: 5'-GTA AAG ATG CCT CCA CGT CT - 3', dan 22 basa komplemen untuk digunakan sebagai primer E11(-), yaitu: 5'-CTA CTG TAG GTG CAT ATG CAG C -3'. Produk PCR diperkirakan akan memiliki ukuran sekitar 260 pb. Hasil analisis dengan menggunakan perangkat lunak BLASTn dari NCBI menunjukkan bahwa kedua primer tersebut dapat menempel pada daerah gen *E6* HPV tipe 11 (Tabel 1). Primer E11(+) dan E11(-) memiliki nilai *E-value* terendah 0,22 dan 0,022; dengan *percentage identity* dan *query cover* dari kedua primer tersebut sebesar 100%, sedangkan *gap value* 0. Nilai *E-value* merupakan nilai yang menunjukkan tingkat kemungkinan sekuen tidak sesuai dengan sekuen yang dianalisis, yaitu sekuen gen utuh *E6* HPV tipe 11 hasil pencarian perangkat lunak dari basis data. Semakin besar nilai *E-value* menunjukkan tingkat ketidaksesuaian antara sekuen primer dengan urutan target yang semakin besar. Pada analisis primer ini, nilai *E-value* tersebut tidak 0 disebabkan jumlah nukleotida yang dianalisis 20 dan 22 pb sedangkan urutan gen utuh *E6* HPV tipe 11 di basis data berukuran sekitar 452 pb.^{42,43} Selain itu, nilai dari *gap* yang rendah (*gap value*=0) mengindikasikan tidak terdapatnya *gap* di antara urutan basa

Tabel 1 Area Penempelan Primer pada Gen E6 HPV tipe 11

Nama Primer	Arah	Target	Sequence ID	Daerah Penempelan		
E11(+)/(-)	Forward	Gen E6 HPV tipe 11	LN833189.1	Query 1	GTAAAGATGCCTCCACGTCT	20
				Sbjct 8	GTAAAGATGCCTCCACGTCT	27
	Reverse			Query 1	CTACTGTAGGTGCATATGCAG	21
				Sbjct 268	CTACTGTAGGTGCATATGCAG	248
GP5(+)/GP6(+)	Forward	Gen L1 HPV	LC155240.1	Query 8	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC	30
				Sbjct 1	TTTGTACTGTGGTAGATACTAC	23
	Reverse			Query 9	GAAAAATAAACTGTAATCATATTC	33
				Sbjct 139	GAAAAATAAACTGTAATCATATTC	115
NS1/21	Forward	18s rDNA	NR003286.2	Query 6	CATATGCTTGTCTC	19
				Sbjct 24	CATATGCTTGTCTC	37
	Reverse			Query 1	AATATACGCTATTGGAGCTGG	21
				Sbjct 652	AATATACGCTATTGGAGCTGG	632

Keterangan:

- GP5(+)/GP6(+) : primer untuk identifikasi keberadaan HPV secara general
- NS 1/21 : primer untuk konfirmasi keberadaan DNA manusia secara umum

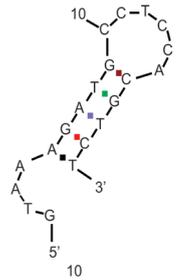
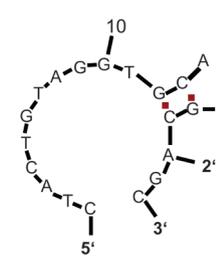
pada saat primer melekat pada gen E6 karena semua basa primer sama dengan urutan basa komplemennya pada gen E6 HPV tipe 11.⁴⁴ Nilai *percentage identity* dari kedua primer 100% menunjukkan kemiripan 100% antara sekuen basa primer dengan urutan gen E6 HPV tipe 11. Hasil analisis dengan perangkat lunak BLASTn menunjukkan persentase *query cover* yang tinggi yang artinya seluruh basa primer dalam penelitian ini sama dengan basa yang terdapat pada urutan basa tertentu gen E6 HPV tipe 11.

Hasil analisis kualitas primer dengan menggunakan program *OlygoAnalyzer 3.1* menunjukkan bahwa kandungan GC untuk primer E11(+) dan E11(-) masing-masing adalah 50%, sedangkan suhu leleh (*Tm*) untuk primer E11(+) dan E11(-) berturut-turut adalah 58,4°C dan 62,1°C. Hasil analisis terkait kemungkinan terjadinya struktur *hairpin* pada kedua primer tersebut menunjukkan struktur sekunder ini kemungkinan bisa terjadi pada *Tm* kurang dari 22,9°C untuk primer E11(+) dan kurang dari 42,8°C untuk primer E11(-) (Tabel 2). Kemungkinan terjadinya *self-dimer* dan *hetero-dimer* pada kedua primer

tersebut kurang dari 4, dan memenuhi syarat sebagai primer ideal. Analisis *mispriming* pada genom manusia dilakukan dengan BLASTn dari NCBI menggunakan basis data DNA yang terdapat pada *GenBank*. Hasil analisis menunjukkan bahwa primer E11(+) menunjukkan tidak terdapat *mispriming* dengan nilai kurang dari 40% sedangkan primer E11(-) antara 40–50%. Walaupun sebagian nukleotida dari masing-masing primer masih memiliki komplementasi pada genom manusia, namun lokasi penempelan tidak memungkinkan dihasilkannya produk nontarget selama proses PCR. Misalnya, penempelan kedua primer sangat berjauhan, arah pemanjangan rantai sejajar dan penempelan sebagian basa yang hanya terjadi pada *Tm* rendah.

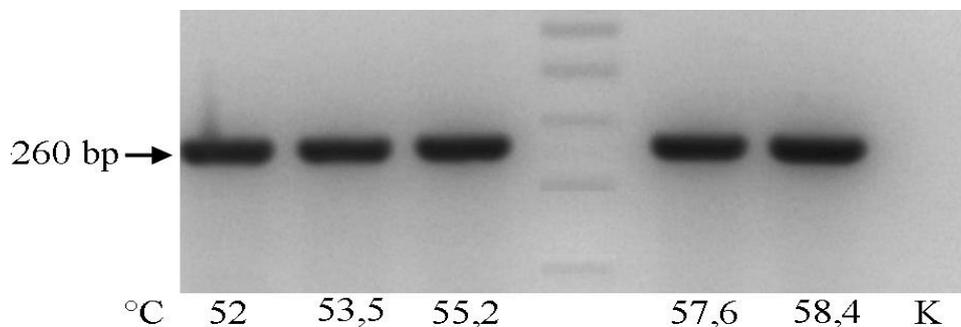
Optimasi suhu penempelan (*Ta*) reaksi PCR menggunakan pasangan primer E11(+) /E11(-) dilakukan pada beberapa variasi suhu penempelan (*Ta*). Pada awalnya, dilakukan skrining *Ta* pada rentang suhu yang lebar, di sekitar suhu *Tm* kedua primer, yaitu 58,4°C dan 62,1°C. Berdasarkan hasil optimasi, didapatkan *Ta* yang baik untuk menghasilkan

Tabel 2 Karakteristik Primer E11(+) dan E11(-)

Karakteristik	Primer E11(+)	Primer E11(-)
Urutan basa	5'-GTAAAGATGCCTCCACGTCT-3'	5'-CTACTGTAGGTGCATATGCAGC-3'
Jumlah basa	20 pb	22 pb
Titik leleh (T _m)	58,4°C	62,1°C
% GC	50	50
<i>Hairpin</i>		
<i>Selfpriming</i>	Tidak ada, kurang dari 4	Tidak ada, kurang dari 4
<i>Primer dimer</i>	Tidak ada, kurang dari 3	Tidak ada, kurang dari 3
<i>Mispriming</i> pada genom manusia dan virus	Score <40% Posisi tidak memungkinkan terbentuknya produk nontarget	Score 40–50%

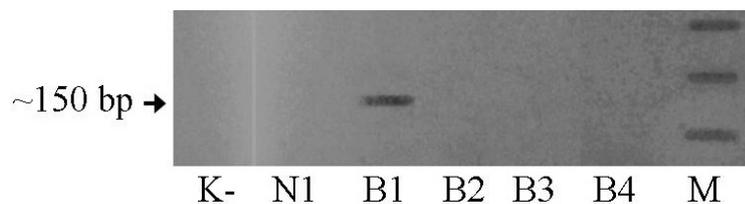
amplikon berkisar antara 52–61°C (data tidak disertakan). Lalu dilakukan penelusuran Ta optimum pada rentang suhu tersebut, yang disebar pada 12 posisi sampel di mesin PCR. Sebanyak lima tabung sampel diletakkan pada lima posisi berbeda di antara 12 suhu tersebut. Berdasarkan tampilan pada mesin PCR, kelima suhu dari posisi tabung tersebut adalah: 52°C; 53,5°C; 55,2°C; 57,6°C dan

58,4°C. Hasil visualisasi dapat dilihat pada Gambar 1 yang menunjukkan adanya satu pita tebal pada semua variasi suhu dengan ukuran yang sama yaitu sekitar 260 bp. Pada hasil visualisasi tersebut, semua pita memiliki ketebalan dengan intensitas yang relatif sama sehingga kemudian suhu 57,6°C digunakan sebagai suhu penempelan pada reaksi PCR yang menggunakan primer E11(+)/E11(-).



Gambar 1 Produk Hasil PCR Menggunakan Primer E11(+) dan E11(-) pada Beberapa Suhu Penempelan (52°; 53,5°; 55,2°; 57,6° dan 58,4°C) dan *Template* DNA Genomik dari Sampel Biopsy Pasien Terinfeksi HPV

Keterangan: M: *marker* 100 bp (NEB); K-: hasil PCR tanpa DNA *template*



Gambar 2 Produk Hasil PCR DNA Genomik dari Sampel Pasien Didiagnosis Terinfeksi HPV Menggunakan Primer GP5(+) dan GP6(+). Sampel B1 Menunjukkan Hasil Positif

Keterangan: K-: PCR tanpa DNA *template*; N1: sampel DNA orang sehat; B1, B2, B3 dan B4: sampel DNA dari apusan vagina pasien terdiagnosis HPV; M: *marker* 100 bp (NEB)

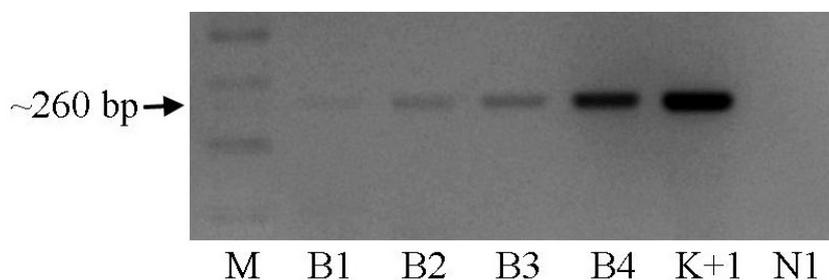
Total terdapat empat (4) pasien yang dirujuk oleh dokter selama periode pengambilan data untuk diidentifikasi kemungkinan terinfeksi HPV. Sampel dari pasien tersebut diberi kode B1, B2, B3, dan B4. Hasil analisis PCR menggunakan primer NS 1/21 menunjukkan bahwa DNA dari spesimen berhasil diekstraksi (gambar tidak ditampilkan) dan dalam kondisi baik untuk proses PCR. Deteksi keberadaan HPV secara umum dilakukan menggunakan primer GP5(+)/GP6(+). Dari hasil visualisasi (Gambar 2), diketahui bahwa hanya terdapat 1 pita yang berukuran ~150 bp dari ekstrak DNA spesimen B1. Selain spesimen B1, tidak terdapat pita DNA pada spesimen sampel yang lain. Hal ini mengindikasikan bahwa hanya sampel B1 yang kemungkinan positif mengidap HPV.

Hasil analisis PCR dengan menggunakan primer E11(+)/E11(-) menunjukkan adanya pita berukuran ~260 pb untuk seluruh sampel

(B1-B4) namun pita untuk sampel B1 tampak tidak terlalu jelas (Gambar 3), sedangkan untuk sampel orang sehat (N1) sama sekali tidak terdapat pita hasil PCR pada proses visualisasi. Hasil ini menunjukkan bahwa sampel dari keempat pasien (B1–B4) positif mengandung HPV tipe 11.

Pembahasan

Penelitian ini berhasil mendapatkan primer *forward* dan *reverse* [E11(+)/E11(-)] yang secara spesifik mampu mengidentifikasi area gen *E6* HPV tipe 11. Hingga saat ini deteksi HPV tipe 11 dilakukan menggunakan metode PCR yang pada umumnya menggunakan gen *L1* dari HPV sebagai target amplifikasi. Penggunaan gen *L1* dalam proses identifikasi HPV memiliki beberapa permasalahan. Salah satu masalah terpenting adalah gen *L1* kemungkinan besar tidak menyisip di genom



Gambar 3 Deteksi Keberadaan HPV Tipe 11 DNA Genomik dari Sampel Pasien secara PCR Menggunakan Primer E11(+) dan E11(-). Semua Sampel Pasien Terdiagnosis HPV Menunjukkan Hasil Positif

Keterangan: M: *marker* 100 bp (NEB); B1, B2, B3 dan B4: sampel DNA dari apusan vagina pasien terdiagnosis HPV; K+1: PCR dengan DNA dari sampel biopsy pasien HPV; N1: sampel orang sehat

manusia setelah virus menginfeksi manusia sehingga seringkali tidak teridentifikasi pada pasien. Permasalahan lain penggunaan gen *L1* ialah tingginya laju mutasi yang menyebabkan kemungkinan HPV menjadi tidak terdeteksi dengan primer yang telah dirancang dan digunakan.^{20,22,34,45}

Primer didesain untuk menempel pada 20 basa pertama dan 22 basa terakhir pada urutan 8-268 pb dari gen *E6* yang dimiliki oleh HPV tipe 11. Daerah target pada genom HPV tipe 11 ini dipilih sebagai area penempelan primer karena memiliki urutan yang unik sebagai primer.⁴⁶ Urutan kedua primer ini spesifik pada gen HPV tipe 11, tidak menempel pada DNA manusia (hasil sesuai analisis hasil pensejajaran dengan metode BLASTn³⁸ pada basis data *GenBank*; data tidak ditampilkan). Dengan demikian pasangan primer hasil desain ini ideal, yaitu penempelan hanya pada gen *E6* HPV tipe 11 dan kemungkinan terjadinya *false positive* selama reaksi PCR sangat kecil.

Beberapa parameter yang mengindikasikan hal tersebut adalah rendahnya nilai *E-value* dan *gap value* serta tingginya nilai *percentage identity* dan *query cover*. Nilai *E-value* primer E11(+) dan E11(-) dalam penelitian ini terbukti rendah. Terbukti bahwa keseluruhan sekuen primer berkomplemen dengan sekuen pasangannya pada gen *E6* dari HPV tipe 11. Selain itu, nilai *gap* yang rendah (*gap value*=0) mengindikasikan tidak terdapatnya *gap* pada saat primer melekat pada gen *E6* karena semua basa sama dengan urutan gen *E6* HPV tipe 11.³⁸ Nilai *percentage identity* menunjukkan kemiripan antara sekuen basa primer dengan urutan gen *E6* HPV tipe 11. Basa primer dalam penelitian ini mempunyai 100% kemiripan dengan urutan gen *E6* HPV tipe 11. Selain itu, hasil analisis dengan BLASTn menunjukkan persentase *query cover* yang tinggi yang artinya seluruh basa primer dalam penelitian ini sama dengan basa yang terdapat pada beberapa urutan nukleotida pada gen *E6* HPV tipe 11.

Panjang primer dibuat sebanyak 20 basa untuk E11(+) dan 22 basa untuk E11(-) dengan tujuan untuk menjaga agar primer memiliki urutan nukleotida yang mencukupi untuk mencapai tingkat spesifisitas primer yang tinggi dan persentasi GC yang sesuai untuk membantu kekuatan pengikatan primer ke DNA *template*. Perbedaan T_m di antara keduanya tidak terlalu besar sehingga pengaturan suhu T_m reaksi PCR bisa tepat. Nilai ΔG , ΔH dan ΔS pada analisis kemungkinan terjadinya *hairpin* menunjukkan angka yang mendekati angka nol. Hal tersebut menunjukkan kemungkinan terjadinya *hairpin* pada primer yang relatif rendah. Selain itu, semua kemungkinan bentuk *hairpin* dari primer yang dirancang pada penelitian ini memiliki nilai T_m yang jauh lebih rendah dari perkiraan suhu penempelan primer ke target gen. Dengan kata lain, primer ini masih tetap bisa digunakan pada suhu penempelan tanpa risiko terjadinya *hairpin*. Hasil analisis terkait kemungkinan *self-dimer* pada kedua primer menunjukkan nilai ΔG pada masing-masing primer memiliki nilai minus yang berarti kemungkinan terjadinya *self-dimer* masing-masing primer yang kecil. Parameter *hetero-dimer* yang diuji pada penelitian ini bertujuan untuk menunjukkan kemungkinan primer E11(+) ataupun primer E11(-) mampu menempel satu sama lain. Nilai ΔG berdasarkan hasil analisis *hetero-dimer* menunjukkan nilai rendah yang berarti kemungkinan terjadinya *hetero-dimer* sangat kecil. Berdasarkan parameter-parameter yang sudah dijelaskan, maka pasangan primer E11(+)/(-) tepat digunakan sebagai primer untuk deteksi HPV tipe 11.³⁸

Hasil analisis dengan menggunakan primer GP5(+)/GP6(+) menunjukkan bahwa hanya spesimen B1 yang mengandung HPV. Namun, setelah spesimen dideteksi menggunakan primer E11(+)/(-), diketahui bahwa seluruh sampel (B1–B4) positif mengandung HPV tipe 11. Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh adanya perbedaan primer

yang digunakan. Primer GP5(+)/GP6(+) merupakan primer yang mengamplifikasi sebagian kecil *open reading frame* (ORF) gen *L1* dari HPV^{21,41}, sedangkan primer E11(+)/(-) merupakan primer yang mengamplifikasi sebagian dari ORF gen *E6* pada HPV tipe 11. Pada saat HPV menginfeksi sel epitel dari serviks, kemungkinan besar HPV kehilangan sebagian besar daerah gen *E1*, *E2*, *L1* dan *L2*,^{20,22,23,34-36} sehingga terdapat kemungkinan bahwa setelah HPV menginfeksi sel manusia, gen-gen tersebut tidak dapat teramplifikasi melalui reaksi PCR. Hal inilah yang dapat menyebabkan *false negative* pada hasil deteksi keberadaan HPV yang menggunakan primer GP5(+)/GP6(+). Kemungkinan yang terjadi adalah pada pasien B2, B3 dan B4, DNA HPV telah menyisip pada genom pasien sedangkan pada pasien B1 proses invasi sedang terjadi. Dari hasil tersebut, terbukti kelemahan penggunaan primer yang menarget gen *L1* (primer GP5(+)/GP6(+)), yaitu dapat tidak dihasilkan ampikon jika DNA virus telah menyisip pada genom manusia. Dengan kata lain, hasil PCR dengan target gen *E6* ini memberikan hasil yang lebih akurat tentang keberadaan HPV tipe 11 jika dibandingkan menggunakan primer yang menarget gen *L1* untuk tujuan *early detection*. Hal ini perlu dibuktikan dengan ekspresi mRNA dari *E6* ini.

Hasil penelitian ini diharapkan menjadi langkah awal untuk mengatasi permasalahan terkait keberadaan alat yang memiliki tingkat akurasi yang baik untuk deteksi HPV *low risk*. Sebagaimana anjuran dari *World Health Organization* (WHO), kebijakan “*screen and treat*” perlu diupayakan di negara dengan penghasilan rendah dan menengah (*low-middle income countries*; LMICs), termasuk Indonesia, untuk menekan beban yang disebabkan oleh penyakit terkait HPV.^{24,27,47,48} Anjuran tersebut sangat perlu segera diimplementasikan di LMICs dengan mempertimbangkan bahwa pada *setting* tersebut sering kali ditemukan

masyarakat yang memiliki *health literacy* dan kewaspadaan yang rendah terkait penyakit HPV termasuk *condyloma acuminata* dan kanker anogenital.⁴⁹⁻⁵¹ Dengan adanya deteksi infeksi awal termasuk infeksi HPV *low risk* yang merupakan salah satu faktor risiko dari kanker serviks diharapkan dapat mempercepat inisiasi pemberian terapi dan mencegah temuan kanker serviks baru di Indonesia. Temuan primer yang berdasar pada urutan nukleotida gen *E6* HPV tipe 11 dalam penelitian ini dapat ditindaklanjuti melalui proses integrasi dengan sistem teknologi guna menghasilkan *point-of-care* untuk deteksi HPV yang cepat dan murah sehingga meningkatkan cakupan jumlah individu dan wilayah yang mendapat layanan *screening* infeksi HPV di Indonesia.^{17,52,53}

Salah satu keterbatasan penggunaan gen *E6* sebagai target identifikasi adalah keterbatasan pengujian tingkat ekspresi mRNA *E6* pada masing-masing pasien. Jumlah ekspresi ini diperlukan untuk menentukan infeksi HPV yang transien atau persisten.³⁴ Oleh karena itu, diperlukan metode PCR kuantitasi seperti *quantitative-real-time* PCR untuk dapat menjawab permasalahan tersebut. Selain itu, keterbatasan lainnya yaitu keterbatasan untuk deteksi apakah genom virus sudah berada pada posisi “menyisip” atau belum. Konsekuensi akibat keterbatasan tersebut adalah risiko ketidakmampuan identifikasi jenis HPV secara tepat yang berdampak pada pemberian terapi yang tidak tepat sepenuhnya. Dengan demikian, penelitian lebih lanjut terkait desain primer yang mampu membedakan virus secara akurat perlu dilakukan sebagai upaya untuk mengoptimalkan upaya identifikasi sedini mungkin di kemudian hari.

Simpulan

Melalui penelitian ini telah berhasil didesain primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk mendeteksi keberadaan *Human*

Papillomavirus (HPV) tipe 11. Primer tersebut juga telah berhasil mengidentifikasi adanya infeksi HPV tipe 11 pada empat pasien rawat jalan baru yang diduga terinfeksi HPV di RSUD Bangil, Jawa Timur. Primer hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk mengidentifikasi infeksi HPV tipe 11 pada sampel pasien yang lebih banyak lagi sebagai bentuk upaya identifikasi paparan sedini mungkin. Dengan demikian, upaya pencegahan yang tepat dan tindakan kuratif dapat dilakukan secara optimal.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan kepada pimpinan dan staff RSUD Bangil, khususnya direktur dan seluruh dokter di ruang klinik *Obstetrics and Gynaecology*.

Pendanaan

Penelitian ini tidak didanai oleh sumber hibah manapun.

Konflik Kepentingan

Seluruh penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

Daftar Pustaka

1. Fernandes JV, de Araújo JMG, Fernandes TM. Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Open Access J Clin Trials*. 2013;5(1):1–12. doi: 10.2147/OAJCT.S37741
2. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2016;25(S1):2–23. doi: 10.1002/rmv.1822
3. Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 6th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
4. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2013;382(9895):889–99. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60022-7
5. Cho CY, Lo YC, Hung MC, Lai CC, Chen CJ, Wu KG. Risk of cancer in patients with genital warts: A nationwide, population-based cohort study in Taiwan. *PLoS One*. 2017;12(8):1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0183183
6. Blomberg M, Friis S, Munk C, Bautz A, Kjaer SK. Genital warts and risk of cancer: A danish study of nearly 50000 patients with genital warts. *J Infect Dis*. 2012;205(10):1544–53. doi: 10.1093/infdis/jis228
7. Dyne EA Van, Henley SJ, Saraiya M, Thomas CC, Markowitz LE, Benard VB. Trends in human papillomavirus—Associated Cancers—United States, 1999–2015. *Weekly I*. 2018;67(33):918–24. doi: 10.15585/mmwr.mm6733a2
8. Duan R, Qiao Y, Clifford G, Zhao F. Cancer burden attributable to human papillomavirus infection by sex, cancer site, age, and geographical area in China. *Cancer Med*. 2020;9(1):374–84. doi: 10.1002/cam4.2697
9. Hartwig S, St Guily JL, Dominiak-Felden G, Alemany L, de Sanjosé S. Estimation of the overall burden of cancers, precancerous lesions, and genital warts attributable to 9-valent HPV vaccine types in women and men in Europe. *Infect Agent Cancer*. 2017;12(1):1–10. doi: 10.1186/s13027-017-0129-6
10. Stier EA, Sebring MC, Mendez AE, Ba FS, Trimble DD, Chiao EY. Prevalence of anal human papillomavirus infection and anal HPV-related disorders in women: A systematic review. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(3):278–309. doi: 10.1016/j.ajo

- g.2015.03.034
11. Ong KJ, Checchi M, Burns L, Pavitt C, Postma MJ, Jit M. Systematic review and evidence synthesis of non-cervical human papillomavirus-related disease health system costs and quality of life estimates. *Sex Transm Infect.* 2019;95(1):28–35. doi: 10.1136/sextrans-2018-053606
 12. Chesson HW, Ekwueme DU, Saraiya M, Watson M, Lowy DR, Markowitz LE. Estimates of the annual direct medical costs of the prevention and treatment of disease associated with human papillomavirus in the United States. *Vaccine.* 2012;30(42):6016–9. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.056
 13. Östensson E, Silfverschiöld M, Greiff L, Ascitto C, Wennerberg J, Lydryp ML, et al. The economic burden of human papillomavirus-related precancers and cancers in Sweden. *PLoS One.* 2017; 12(6):1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0179520
 14. Munoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(5):325–39. doi: 10.1093/jnci/dj p534
 15. Choi H. Can quadrivalent human papillomavirus prophylactic vaccine be an effective alternative for the therapeutic management of genital warts? An exploratory study. *Int Braz J Urol.* 2019; 45(2):361–8. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2018.0355
 16. Navarro-Illana E, López-Lacort M, Navarro-Illana P, Vilata JJ, Diez-Domingo J. Effectiveness of HPV vaccines against genital warts in women from Valencia, Spain. *Vaccine.* 2017;35(25):3342–6. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.04.080
 17. Agustina R, Dartanto T, Sitompul R, Susiloretni KA, Suparmi, Achadi EL, et al. Universal health coverage in Indonesia: concept, progress, and challenges. *Lancet.* 2019;393(10166):75–102. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31647-7
 18. Kosen S, Andrijono A, Ocviyanti D, Indriatmi W. The cost-effectiveness of quadrivalent human papillomavirus vaccination in Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(7):2011–7. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.7.2011
 19. Health Technology Assessment (HTA) and Pharmacoeconomics Research Center, Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada. Post-introduction evaluation of HPV vaccine programme in Indonesia, 2018. [Diunduh pada: 26 Juli 2020]. Tersedia dari: https://www.who.int/docs/default-source/searo/indonesia/hpv-evaluation-vaccine-programme-post-introduction-final-report-nov2018.pdf?sfvrsn=9b63f1e9_2
 20. Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. A review of methods for detect human papillomavirus infection. *Virol J.* 2012;9(1):1–9. doi: 10.1186/1743-422X-9-262
 21. de Roda Husman AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995;76(4):1057–62. doi: 10.1099/0022-1317-76-4-1057
 22. 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): 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0055204
 23. Xu J, Tan L, Wang T, Cui F, Ding X, Wan Q, et al. Genetic variability of human papillomavirus type 51 E6, E7, L1 and L2 genes in Southwest China. *Gene.* 2019;690:99–112. doi: 10.1016/j.gene.2018.12.032

24. Tjalma WAA, Depuydt CE. Cervical cancer screening: Which HPV test should be used-L1 or E6/E7? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;170(1):45–6. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.06.027
25. World Health Organization. Cancer country profiles: United States of America, 2014. [Diunduh pada: 25 Juli 2018]. Tersedia dari: http://www.who.int/cancer/country-profiles/usa_en.pdf?ua=1
26. Wahidin M, Noviani R, Hermawan S, Andriani V, Ardian A, Djarir H. Population-based cancer registration in indonesia. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2012;13(4):1709–10. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.4.1709
27. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Riset kesehatan dasar (Riskesdas); 2013. [Diunduh pada: 26 Juli 2020]. Tersedia dari: <https://www.kemkes.go.id/resources/download/genernal/HasilRiskesdas2013.pdf>
28. Pimenta JM, Galindo C, Jenkins D, Taylor SM. Estimate of the global burden of cervical adenocarcinoma and potential impact of prophylactic human papillomavirus vaccination. *BMC Cancer.* 2013;13:553. doi: 10.1186/1471-2407-13-553
29. Arbyn M, Castellsagué X, de sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol.* 2011;22(12):2675–86. doi: 10.1093/annonc/mdr015
30. Pendrith C, Thind A, Zaric GS, Sarma S. Costs of cervical cancer treatment: Population-based estimates from Ontario. *Curr Oncol.* 2016;23(2):e109–15. doi: 10.3747/co.23.2598
31. Carvalho N de O, del Castillo DM, Perone C, Januário JN, de Melo VH, Filho GB. Comparison of HPV genotyping by type-specific PCR and sequencing. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(1):73–8. doi: 10.1590/S0074-02762010000100011
32. Tao X, Zheng B, Yin F, Zeng Z, Li Z, Griffith CC, et al. Polymerase chain reaction human papillomavirus (HPV) detection and HPV genotyping in invasive cervical cancers with prior negative HC2 test results. *Am J Clin Pathol.* 2017;147(5):477–83. doi: 10.1093/ajcp/axx027
33. Suzhai K, Sandhaus E, Kolkman-Uljee SM, Lemaitre M, Truffert JC, Dirks RW, et al. A novel strategy for human papillomavirus detection and genotyping with sybrgreen and molecular beacon polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 2001;159(5):1651–60. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63012-X
34. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. 2010;10(8):550–60. doi: 10.1038/nrc2886
35. Zhang L, Yang B, Zhang A, Zhou A, Yuan J, Wang Y, Sun L, et al. Association between human papillomavirus type 16 E6 and E7 variants with subsequent persistent infection and recurrence of cervical high-grade squamous intraepithelial lesion after conization. *J Med Virol.* 2016;88(11):1982–8. doi: 10.1002/jmv.24541
36. Tomaić V. Functional roles of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced malignancies at diverse anatomical sites *Cancers.* 2016;8(10):95. doi: 10.3390/cancers8100095
37. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(2):71–4. doi: 10.1093/nar/gkm306
38. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134
39. Dieffenbach CW, Lowe TMJ, Dveksler GS. General concepts for PCR primer

- design. *Genome Res.* 1993;3:S30–7.
40. Hyndman DL, Mitsuhashi M. PCR primer design. *Methods Mol Biol.* 2003;226:81–8. doi: 10.1385/1-59259-384-4:81
41. Erhart SMM, Rivero ERC, Bazzo ML, Onofre ASC. Comparative evaluation of the GP5+/6+, MY09/11 and PGMY09/11 primer sets for HPV detection by PCR in oral squamous cell carcinomas. *Exp Mol Pathol.* 2016;100(1):13–6. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.11.024
42. Yuan H, Zhou D, Wang J, Schlegel R. Divergent human papillomavirus associated with recurrent respiratory papillomatosis with lung involvement. *Genome Announc.* 2013;1(4):2013. doi: 10.1128/genomeA.00474-13
43. Kocjan BJ, Gale N, Boltežar IH, Seme K, Komlos KF, Hosnjak L, et al. Identical human papillomavirus (HPV) genomic variants persist in recurrent respiratory papillomatosis for up to 22 years. *J Infect Dis.* 2013;207(4):583–7. doi: 10.1093/infdis/jis733
44. Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, et al. BLAST: A more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(W1):29–33. doi: 10.1093/nar/gkt282
45. Yu Y, Jin D, Hu S, Zhang Y, Zheng X, Zheng J, et al. A novel tuberculosis antigen identified from human tuberculosis granulomas. *Mol Cell Proteomics.* 2015; 14(4):1093–103. doi: 10.1074/mcp.M114.045237
46. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Memm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):1–12. doi: 10.1093/nar/gks596
47. Toliman PJ, Kaldor JM, Tabrizi SN, Vallely AJ. Innovative approaches to cervical cancer screening in low- and middle-income countries. *Climacteric.* 2018;21(3):235–8. doi: 10.1080/13697137.2018.1439917
48. Kunckler M, Schumacher F, Kenfack B, Catarino R, Viviano M, Tincho E, et al. Cervical cancer screening in a low-resource setting: a pilot study on an HPV-based screen-and-treat approach. *Cancer Med.* 2017;6(7):1752–61. doi: 10.1002/cam4.1089
49. Catarino R, Petignat P, Dongui G, Vassilakos P. Cervical cancer screening in developing countries at a crossroad: Emerging technologies and policy choices. *World J Clin Oncol.* 2015;6(6):281–90. doi: 10.5306/wjco.v6.i6.281
50. Parra S, Carranza E, Coole J, Hunt B, Smith C, Keahey P, et al. Development of low-cost point-of-care technologies for cervical cancer prevention based on a single-board computer. *IEEE J Transl Eng Heal Med.* 2020;8:8978694. doi: 10.1109/JTEHM.2020.2970694
51. Allen-Leigh B, Uribe-Zúñiga P, León-Maldonado L, Brown BJ, Lorincz A, Salmeron J, et al. Barriers to HPV self-sampling and cytology among low-income indigenous women in rural areas of a middle-income setting: A qualitative study. *BMC Cancer.* 2017;17(1):1–11. doi: 10.1186/s12885-017-3723-5
52. Jaspers L, Budiningsih S, Wolterbeek R, Henderson FC, Peters AAW. Parental acceptance of human papillomavirus (HPV) vaccination in Indonesia: A cross-sectional study. *Vaccine.* 2011;29(44):7785–93. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.107
53. Toh ZQ, Licciardi PV, Russell FM, Garland SM, Batmunkh T, Mulholland EK. Cervical cancer prevention through HPV vaccination in low- and middle-income countries in Asia. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2017;18(9):2339–43. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.9.2339