

## Deteksi *High Risk Human Papilloma Virus* pada Jaringan Adenoma dan Adenokarsinoma Kolorektal di FKUI/RSCM

<sup>1</sup>Wiwiek Ernajanti, <sup>1</sup>Diah Rini Handjari, <sup>1</sup>Kusmardi, <sup>2</sup>Yusra

<sup>1</sup>Departemen Patologi Anatomi, <sup>2</sup>Departemen Patologi Klinik  
 Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia  
 Jakarta

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Karsinoma kolorektal merupakan tumor ganas ketiga di dunia. Sembilan puluh lima persen karsinoma kolorektal merupakan adenokarsinoma yang berasal dari lesi prekursor adenoma. Dilaporkan 15%-20% karsinoma terkait dengan infeksi virus. Virus yang diduga berhubungan dengan karsinoma kolorektal adalah *human papilloma virus* (HPV) dan tipe tersering adalah 16 dan 18. Hubungan antara HPV dan karsinoma kolorektal masih menjadi perdebatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan prevalensi infeksi HPV pada adenoma dan adenokarsinoma kolorektal di Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM Jakarta dengan menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR).

#### Metode

Pemeriksaan DNA HPV pada 33 kasus adenoma dan 33 kasus adenokarsinoma kolorektal dengan teknik *nested* PCR MY/GP dan elektroforesis. Pada kasus dengan hasil HPV positif, dilanjutkan PCR menggunakan primer spesifik HPV 16 dan HPV 18. Subjek penelitian berasal dari Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM.

#### Hasil

Satu dari 33 kasus (3,0%) adenoma dan 3 dari 33 kasus (9,1%) adenokarsinoma positif infeksi HPV. Satu kasus adenoma positif HPV bukan merupakan tipe 16 dan 18. Satu kasus adenokarsinoma dengan positif HPV merupakan tipe 16, 2 kasus merupakan gabungan tipe 16 dan 18.

#### Kesimpulan

Prevalensi infeksi HPV pada adenokarsinoma lebih tinggi dibandingkan adenoma kolorektal. Tipe HPV pada kasus adenokarsinoma kolorektal merupakan tipe 16 dan 18.

**Kata kunci:** adenokarsinoma, adenoma, HPV, kolorektal, PCR.

### ABSTRACT

#### Background

Colorectal cancer is the third malignant tumor in the world. Ninety-five percent of colorectal cancers are adenocarcinomas derived from precursor lesions adenoma. There are 15% -20% of cancers associated with viral infections. Virus are suspected associated with colorectal cancer is the human papilloma virus (HPV) and the most common types are 16 and 18. The relationship between HPV and colorectal cancer is still being debated. This study purpose to determine the prevalence differences of HPV infection in colorectal adenomas and adenocarcinomas in the Department of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine University of Indonesia/Cipto Mangunkusumo Hospital, Jakarta by using the polymerase chain reaction (PCR).

#### Methods

HPV DNA examination on 33 cases of adenoma and 33 cases of colorectal adenocarcinoma by nested MY/GP PCR technique and electrophoresis. In the cases with positive HPV results, continue by specific primers HPV 16 and HPV 18 PCR. The subject of the study came from the Department of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine University of Indonesia/Cipto Mangunkusumo Hospital.

#### Results

One (3.0%) adenomas and 3 (9.1%) adenocarcinoma from 33 cases adenoma and adenocarcinoma are HPV positive. One case of HPV positive adenomas are not types 16 and 18. HPV positive adenocarcinoma, 1 case was type 16, two cases are combination of types 16 and 18.

#### Conclusion

The HPV prevalence in adenocarcinoma was higher than colorectal adenoma. HPV types on positive colorectal adenocarcinoma cases are types 16 and 18.

**Key words :** adenocarcinoma, adenoma, colorectal, HPV, PCR.

## PENDAHULUAN

Karsinoma kolorektal merupakan tumor ganas ketiga di dunia dan setiap tahunnya diperkirakan terdapat 1.360.602 kasus baru serta menyebabkan 693.933 kematian.<sup>1</sup> Di Indonesia karsinoma kolorektal menempati urutan ketiga dengan perkiraan 27.772 kasus baru setiap tahunnya dan menyebabkan 18.398 kematian.<sup>1</sup> Lebih kurang 95% karsinoma kolorektal merupakan adenokarsinoma yang berasal dari lesi prekursor seperti adenoma dan displasia.<sup>2,3</sup>

Perkembangan karsinoma kolorektal merupakan proses yang kompleks, bertahap dan *multistep* yang melibatkan faktor lingkungan, pola hidup, perubahan genetik dan infeksi virus.<sup>2,4-7</sup> Dilaporkan pula beberapa kelainan molekular termasuk mutasi onkogen seperti K-RAS, inaktivasi gen supresor tumor (APC, P53, DCC) dan gen yang berperan pada *microsatellite instability* (MLH1 dan MSH2).<sup>2,7-10</sup> Diketahui 20% penderita karsinoma kolorektal berhubungan dengan faktor genetik, sedangkan 75%-95% bersifat sporadik.<sup>8,11</sup>

Infeksi virus berperan dalam perkembangan karsinoma pada manusia dan 15-20% karsinoma terkait dengan infeksi virus.<sup>6,12</sup> Salah satu virus yang diduga berhubungan dengan karsinoma kolorektal adalah *human papilloma-virus* (HPV). HPV banyak dikaitkan dengan karsinoma serviks dan karsinoma anogenital lain serta karsinoma kepala dan leher.<sup>4,7,13-16</sup> Pada tahun 1990 Kirgan *et al*<sup>17</sup> pertama kali melaporkan adanya hubungan antara infeksi HPV dan neoplasma kolon. Penelitiannya menunjukkan antigen HPV positif pada 23% kolon normal, 60% adenoma dan 97% karsinoma kolon.<sup>10,17</sup>

Namun demikian hubungan antara HPV dan karsinoma kolorektal masih menjadi perdebatan.<sup>18</sup> Tipe HPV terbanyak pada jaringan karsinoma kolorektal adalah tipe 16 dan 18.<sup>6,7,18,19</sup> Penelitian yang telah dilakukan memperlihatkan prevalensi HPV pada karsinoma kolorektal berkisar antara 0% hingga 84%, sedangkan penelitian pada 415 adenoma kolorektal prevalensi HPV sebesar 5,1%.<sup>6,10,14</sup>

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbedaan prevalensi infeksi HPV pada adenoma dan adenokarsinoma kolorektal di Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM Jakarta menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR).

## METODE PENELITIAN

Tiga puluh tiga sampel berasal dari jaringan adenoma kolorektal serta 33 jaringan adenokarsinoma kolorektal dipilih secara *simple random sampling* dari pasien dengan diagnosis adenoma konvensional dan adenokarsinoma kolorektal yang diperiksa secara histopatologi di Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM sejak bulan Januari 2011 sampai dengan Desember 2014. Jaringan dengan kualitas blok yang tidak memadai untuk dilakukan PCR dan sediaan biopsi jaringan adenoma kolorektal berdiameter kurang dari 3 mm tidak diikutsertakan dalam penelitian.

Penilaian DNA HPV positif pada gel elektroforesis apabila sampel hasil *nested* PCR dengan primer MY09/MY11 dan GP5+/GP6+ menunjukkan pita pada panjang 450 bp dan atau 150 bp.<sup>20,21</sup> Dikatakan HPV tipe 16 bila sampel hasil PCR dengan primer spesifik HPV 16 menunjukkan pita pada panjang 119 bp. Serta HPV tipe 18 bila sampel hasil PCR dengan primer spesifik HPV 18 menunjukkan pita pada panjang 172 bp.<sup>20</sup> Penentuan berat molekul pada gel elektroforesis dibandingkan dengan marker *AccuRuler 100 bp DNA RTU Ladder* dari *Maestrogen* Cat. No. 02001-500 yang memiliki 11 pita dengan ukuran 100 bp hingga 1500 bp. Pita pada 500 bp dan 1500 bp memiliki intensitas yang lebih tinggi sebagai orientasi internal.

## Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA menggunakan *DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit* (50) dari *Qiagen*. Proses isolasi DNA mengikuti protokol dari *DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit* yang terdiri dari tahap deparafinasi, purifikasi DNA, *washing* dan elusi. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi diukur dan ditentukan kemurniannya dengan spektrofotometer. Selanjutnya DNA hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C sebelum dilakukan PCR.

## Nested PCR dan Elektroforesis

DNA HPV dideteksi dengan metode *nested* PCR menggunakan MY09/MY11 sebagai *outer primer* dan GP5+/GP6+ sebagai *inner primer* dari *Bioneer*, Korea.<sup>20</sup> Dilakukan pencampuran masing-masing primer dengan aquabidest sehingga diperoleh konsentrasi masing-masing primer 20 pmol/μL.

PCR pertama menggunakan 2 μL DNA hasil ekstraksi jaringan adenoma dan adeno-

karsinoma kolorektal yang dicampurdengan 1 µL primer MY09, 1 µL primer MY11 dan 16 µL H<sub>2</sub>O ke dalam *AccuPower<sup>®</sup>PCR PreMix0.2 mL/20 µL reaction* dari *Bioneer*, Korea. *AccuPower<sup>®</sup>PCR PreMix0.2 mL/20 µL reaction* berisi 1 U DNA polymerase, 250 µM setiap dNTP (dATP, dCTP, dGTP, DTTP), 10 mM Tris-HCL (pH 9,0), 30 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, *stabilizer* dan *tracking dye*. Kontrol positif dengan mengganti 2 µL DNA jaringan dengan 2 µL DNA *HPV-18 viral DNA control* dari *Advanced Biotechnologies, USA*. Sedangkan kontrol negatif dengan mengganti 2 µL DNA jaringan dengan 2 µL aquabidest. Proses PCR pertama terdiri dari 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 40 siklus 94°C selama 30 detik, 45°C selama 60 detik, 72°C selama 60 detik. Proses diakhiri pada suhu 72°C selama 10 menit.<sup>20</sup>

PCR kedua menggunakan 2 µL DNA jaringan adenoma, adenokarsinoma, kontrol positif dan kontrol negatif hasil PCR MY09/MY11 yang dicampur dengan 1 µL primer GP5+, 1 µL primer GP6+ dan 16 µL H<sub>2</sub>O ke dalam *AccuPower<sup>®</sup>PCR PreMix0.2 mL/20 µL reaction* dari *Bioneer*, Korea. Proses PCR kedua terdiri dari 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 40 siklus 95°C selama 30 detik, 44°C selama 60 detik, 72°C selama 90 detik. Proses diakhiri pada suhu 72°C selama 10 menit.<sup>20</sup>

Selanjutnya dilakukan elektroforesis pada hasil *nested* PCR MY/GP menggunakan gel agarosa 2% yang diwarnai dengan ethidium bromida.

**PCR dan Elektroforesis Penentuan Tipe HPV**

Pada sampel jaringan adenoma dan adenokarsinoma dengan elektroforesis hasil *nested* PCR MY/GP positif HPV dilakukan PCR penentuan tipe HPV dengan menggunakan primer spesifik terhadap HPV tipe 16 dan 18 dari *Bioneer, Korea*.<sup>20</sup> Dilakukan pencampuran masing-masing primer dengan aquabidest sehingga diperoleh konsentrasi masing-masing primer HPV-16 Pr1, HPV-16 Pr2, HPV-18 Pr1, HPV-18 Pr2 20 pmol/µL.

Penentuan tipe HPV 16 dimulai dengan membuat campuran 2 µL DNA adenoma dan adenokarsinoma hasil PCR *nested* PCR MY/GP dengan 1 µL primer HPV-16 Pr1, 1 µL HPV-16 Pr2 dan 16 H<sub>2</sub>O ke dalam *AccuPower<sup>®</sup>PCR PreMix0.2 mL/20 µL reaction* dari *Bioneer*, Korea. Kontrol positif dengan

mengganti DNA jaringan adenoma/adenokarsinoma hasil *nested* PCR MY/GP dengan 2 µL hasil *nested* PCR MY/GP dari DNA HPV *HPV-16 viral DNA control* dari *Advanced Biotechnologies, USA*. Sedangkan kontrol negatif dengan mengganti DNA jaringan adenoma/adenokarsinoma hasil *nested* PCR MY/GP dengan 2 µL hasil *nested* PCR MY/GP dari aquabidest.

PCR penentuan tipe HPV 18 sama dengan penentuan tipe HPV-16, namun dengan mengganti 1 µL HPV-16 Pr1 dan 1 µL HPV-16 Pr2 dengan 1 µL HPV-18 Pr1 dan 1 µL HPV-18 Pr2. Kontrol positif menggunakan 2 µL hasil *nested* PCR MY/GP dari DNA HPV *HPV-18 viral DNA control* dari *Advanced Biotechnologies, USA*.

Proses PCR penentuan tipe HPV 16 maupun HPV 18 terdiri dari 94°C selama 5 menit dilanjutkan dengan 35 siklus 95°C selama 30 detik, 57°C selama 30 detik, dan 72°C selama 60 detik. Proses PCR diakhiri pada suhu 72°C selama 10 menit.<sup>20</sup>

Selanjutnya dilakukan elektroforesis pada hasil PCR dengan primer HPV-16 maupun HPV-18 dengan menggunakan gel agarosa 2% yang diwarnai dengan ethidium bromida.

Rangkaian primer dan panjang pasang basa yang digunakan pada penelitian ini tercantum pada Tabel 1.<sup>20</sup>

Tabel 1. Rangkaian basa primer.<sup>4,6</sup>

Primer	Urutan basa	Pasang basa
MY09	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	450
MY11	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3	
Gp5+	5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3'	150
Gp6+	5'-GAAAAATAAACTGTAATCATATTC-3'	
HPV-16Pr1	5'-TCAAAAGCCACTGTGTCTCTGA-3'	119
HPV-16Pr2	5'-CGTGTCTTGTATGATCTGCAA-3'	
HPV-18Pr1	5'-CCGAGCACGACAGGAACGACT-3'	172
HPV-18Pr2	5'-TCGTTTTCTCTCTGAGTCGCTT-3'	

**Analisis Data**

Data subjek penelitian adenoma dan adenokarsinoma dikelompokkan berdasarkan data demografi. Selanjutnya dilakukan uji statistik *chi-square* untuk menilai perbedaan infeksi HPV antara adenoma dan adenokarsinoma dan tipe HPV dengan adenoma dan adenokarsinoma. Dilakukan pula uji statistik untuk melihat hubungan antara infeksi HPV dengan usia, jenis kelamin dan lokasi lesi. Uji statistik menggunakan program SPSS 17 dengan nilai signifikan bila p<0,05.

**HASIL**

**Analisis DNA HPV**

Hasil analisis pada sampel DNA adenoma dan adenokarsinoma kolorektal dengan *nested* PCR MY/GP diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan infeksi HPV pada adenoma dan adenokarsinoma kolorektal.

Lesi	Infeksi HPV		Jumlah
	Positif n (%)	Negatif n (%)	
Adenoma	1 (3,0)	32 (97,0)	33
Adenokarsinoma	3 (9,1)	30 (90,9)	33
Jumlah	4 (6,1)	62 (93,9)	66

Satu sampel adenoma (3,0%) positif infeksi HPV dan 32 kasus (97%) negatif. Tiga (9,1%) sampel adenokarsinoma kolorektal positif infeksi HPV dan negatif pada 30 (90,9%) sampel. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna adanya infeksi HPV pada adenoma dan adenokarsinoma kolorektal ( $p=0,613$ ).

Karakteristik sampel dengan infeksi HPV dan tanpa infeksi HPV ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik sampel dengan infeksi HPV dan tanpa infeksi HPV.

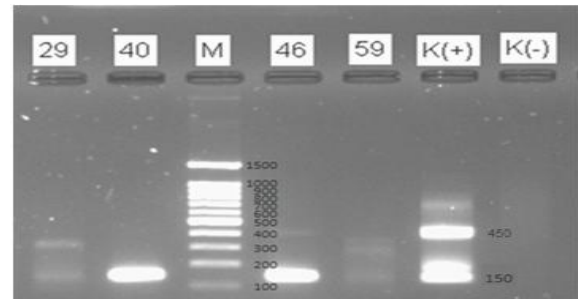
Variabel	HPV (+)	HPV (-)	
	n (%)	n (%)	
Jenis Kelamin			0,288
Laki-laki	4 (100)	38 (61,3)	
Perempuan	0 (0)	24 (38,7)	
Umur (tahun)			0,571
<50 tahun	0 (0)	14 (22,6)	
≥50 tahun	4 (100)	48 (77,4)	
Lokasi Lesi			0,684
Kolon proksimal	1 (25)	13 (21,0)	
Kolon distal	0 (0)	18 (29,0)	
Rektum	2 (50)	20 (32,3)	
Kolon, tidak spesifik	1 (25)	11 (17,7)	

Tidak terdapat perbedaan bermakna infeksi HPV antara laki-laki dan perempuan ( $p=0,288$ ). Tidak pula terdapat perbedaan bermakna antara infeksi HPV pada usia <50 tahun dan ≥50 tahun ( $p=0,571$ ). Serta tidak ada perbedaan bermakna antara lokasi lesi dengan adanya infeksi HPV dengan  $p=0,684$ .

Satu kasus adenoma dengan HPV positif berjenis kelamin laki-laki, berumur lebih dari 50 tahun (60 tahun) dan berlokasi di kolon proksimal. Pada adenokarsinoma, 3 kasus HPV positif semuanya laki-laki, berusia ≥50 tahun, dengan rata-rata usia 61 tahun. Dua kasus (66,7%) adenokarsinoma dengan HPV positif

berlokasi di rektum dan 1 (33,3%) di kolon ascenden hingga rektum.

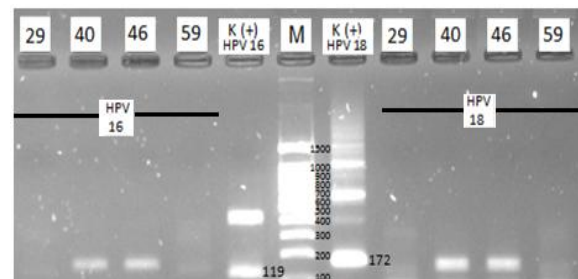
Hasil elektroforesis DNA hasil *nested* PCR MY/GP jaringan adenoma dan adenokarsinoma diperlihatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA hasil *nested* PCR MY09/MY11 dan GP5+/GP6+ pada sampel adenoma dan adenokarsinoma kolorektal. Sampel No. 29, 40, 46, 59 menunjukkan pita pada 450 bp dan atau 150 bp (positif DNA HPV). Penilaian positif adanya DNA HPV pada *nested* PCR menggunakan MY09/MY11 dan GP5+/GP6+ pada gel agarosa yaitu dengan adanya pita pada 450 bp yang merupakan produk MY09/MY11 dan atau adanya pita 150 bp yang merupakan produk akhir *nested* PCR.<sup>21</sup> Keterangan: 29, 40, 46, 59: no. sampel, K(+): kontrol positif, K(-): kontrol negatif, M: marker.

**Analisis Penentuan DNA HPV**

Hasil elektroforesis penentuan tipe dengan primer HPV-16 maupun HPV-18 pada kasus dengan HPV positif ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA hasil PCR dengan primer HPV-16 dan HPV-18 pada adenoma dan adenokarsinoma kolorektal dengan HPV positif. Sampel No. 40, 46, 59 menunjukkan pita pada 119 bp (sesuai dengan HPV 16). Sampel No 40, 46 menunjukkan pita pada 172 bp (sesuai dengan HPV 18). Tampak pita non spesifik pada kontrol positif HPV 16 di luar 119 bp dan pada kontrol positif HPV 18 di luar 172 bp yang tidak mempengaruhi hasil PCR. Keterangan: 29, 40, 46, 59: no sampel, K(+): kontrol positif, M: marker. Sampel sebelah kiri marker merupakan hasil PCR dengan primer HPV-16,

Sampel sebelah kanan marker merupakan hasil PCR dengan primer HPV-18.

Hasil penentuan tipe HPV pada adenoma dan adenokarsinoma positif HPV diperlihatkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil penentuan tipe HPV pada adenoma dan adenokarsinoma kolorektal.

Tipe HPV	Lesi		Jumlah
	Adenoma n (%)	Adenokarsinoma n (%)	
16	0 (0)	1 (33,3)	1
18	0 (0)	0 (0)	0
16 dan 18	0 (0)	2 (66,7)	2
Non 16 dan 18	1 (100)	0 (0)	1
Jumlah	1 (100)	3 (100)	4

Satu kasus adenoma dengan HPV positif bukan merupakan HPV tipe 16 maupun 18. Sedangkan pada 3 kasus adenokarsinoma positif HPV, 1 kasus (33,3%) merupakan HPV tipe 16 dan 2 kasus (66,7%) merupakan gabungan infeksi HPV tipe 16 dan HPV tipe 18.

**Gambaran Histologik Adenoma dan Adenokarsinoma dengan HPV positif**

Adenoma dengan HPV positif merupakan adenoma tubulovilosum dengan displasia keras. Tiga adenokarsinoma dengan HPV positif, 2 kasus merupakan adenokarsinoma berdiferensiasi baik dan 1 kasus berdiferensiasi buruk. Dua kasus adenokarsinoma HPV positif dengan displasia keras, sedangkan 1 kasus dengan campuran displasia ringan dan keras serta tampak sel-sel goblet. Terdapat reaksi limfosit peritumoral yang keras pada seluruh kasus adenokarsinoma dengan HPV positif. Kasus adenokarsinoma dengan infeksi HPV 16 merupakan adenokarsinoma berdiferensiasi buruk, sedangkan 2 kasus dengan infeksi gabungan HPV 16 dan HPV 18 merupakan adenokarsinoma berdiferensiasi baik.

**DISKUSI**

**Analisis DNA HPV Adenoma dan Adenokarsinoma Kolorektal.**

Hasil penelitian ini didapatkan hasil satu dari 33 kasus (3,0%) adenoma dan 3 dari 33 kasus (9,1%) adenokarsinoma positif DNA HPV. Hasil ini cenderung sesuai dengan yang ditunjukkan oleh Baandrup *et al*<sup>14</sup> yang mendapatkan hasil prevalensi HPV pada adenoma sebesar 5,1%

dan prevalensi HPV pada adenokarsinoma sebesar 11,2%.<sup>14</sup>

Penelitian Cheng dkk di Taiwan dengan PCR menggunakan tipe spesifik dengan regio E6/E7 sebagai target mendapatkan hasil 29,7% adenoma dan 52,9% adenokarsinoma positif DNA HPV.<sup>22</sup> Prevalensi HPV pada adenokarsinoma bervariasi berdasarkan letak geografis. Prevalensi tertinggi di Amerika Selatan sebesar 45,1%, di Asia sebesar 39,2%, dan di Timur Tengah sebesar 32,2%.<sup>14</sup> Prevalensi HPV pada penelitian ini lebih rendah mungkin disebabkan karena jumlah sampel yang sedikit, menggunakan primer yang berbedaserta menggunakan jaringan yang telah diformalin dan diparafin. Penggunaan hanya primer L1 mungkin tidak dapat mendeteksi HPV yang terintegrasi, karena regio L1/L2 dan E1 hingga E5 dapat hilang pada saat integrasi sehingga penggunaan primer dengan E6/E7 sebagai target mungkin lebih baik.<sup>6</sup>

Pada gel elektroforesis hasil *nested* PCR MY/GP (Gambar 1), sampel nomor 40 dan 46 memperlihatkan pita dengan intensitas yang cukup tinggi pada 150 bp yang mengindikasikan *viral load* yang tinggi.<sup>20</sup> Belum diketahui hubungan antara *viral load* dengan kejadian karsinoma.<sup>20</sup> Pada gel agarosa hasil *nested* PCR tersebut juga tampak sampel nomor 29, 46, 59 serta kontrol positif menunjukkan pita pada 450 bp dan 150 bp. Hal ini tidak mempengaruhi penilaian hasil PCR penentuan adanya HPV karena penilaian hasil *nested* PCR MY09/MY11 dan GP5+/GP6+ adalah berdasarkan adanya pita 450 bp dan atau 150 bp.<sup>21</sup> Adanya pita pada 450 bp merupakan produk amplifikasi oleh primer MY09/11 yang tidak tidak habis diamplifikasi oleh primer GP5+/GP6+.

Penelitian ini menggunakan jaringan yang telah diformalin dan diparafin. Prevalensi HPV pada adenokarsinoma akan lebih tinggi pada jaringan segar disebabkan pada jaringan yang telah diformalin dan diparafin sering terjadi degradasi DNA.<sup>10,14</sup> Damin *et al*<sup>13</sup> pada penelitiannya menggunakan jaringan segar yang disimpan pada suhu dingin sebelum dilakukan ekstraksi, dengan *nested* PCR MY/GP mendapatkan DNA HPV positif pada 63,9% (46 dari 72) kasus adenokarsinoma.<sup>13</sup>

Pada penelitian ini, tidak terdapat hubungan bermakna antara jenis kelamin dengan infeksi HPV pada adenoma dan adenokarsinoma kolorektal. Hasil ini tidak berbeda dengan

penelitian sebelumnya yaitu tidak terdapat perbedaan bermakna antara laki-laki dan perempuan dengan infeksi HPV pada adenokarsinoma kolorektal.<sup>14,19</sup> Damin dkk<sup>13</sup> dalam penelitiannya menggunakan jumlah sampel yang sama antara laki-laki dan perempuan, mendapatkan hasil DNA HPV positif pada 51,7% laki-laki dan 48,3% perempuan.<sup>13</sup>

Pada penelitian ini didapatkan hasil tidak terdapat perbedaan bermakna antara lokasi dengan infeksi HPV. Penelitian-penelitian oleh Damin dkk<sup>13</sup>, Ranjbar dkk<sup>5</sup> dan Cheng dkk<sup>22</sup> juga mendapatkan hasil yang sama, yaitu tidak terdapat perbedaan bermakna antara lokasi dengan infeksi HPV.<sup>5,13,22</sup> Mengingat jalur potensial masuknya HPV pada kolorektal adalah infeksi *ascending* dari area anogenital, diharapkan prevalensi HPV di rektum lebih tinggi dibanding kolon proksimal. Namun pada penelitian ini, adanya infeksi HPV pada lesi yang terletak pada kolon ascenden yang terletak jauh dari area anogenital tidak mendukung bahwa jalur masuknya HPV adalah *ascending* dari anogenital. Oleh karena itu, rute transmisi virus ke kolon masih belum dapat disimpulkan, walaupun ada peneliti yang menyimpulkan bahwa transmisi HPV mungkin melalui sirkulasi darah.<sup>2,5,13</sup>

Hasil penelitian ini menunjukkan prevalensi infeksi HPV pada adenoma lebih rendah dibanding prevalensi infeksi HPV pada adenokarsinoma kolorektal. Hasil ini cenderung sesuai dengan hasil metaanalisis dari 8 penelitian yang memperlihatkan prevalensi DNA HPV pada jaringan bebas tumor sebesar 1,6%, adenoma 5,1% dan adenokarsinoma 36,8% yang menunjukkan prevalensi DNA HPV pada adenoma lebih tinggi dari jaringan bebas karsinoma dan lebih rendah dari adenokarsinoma.<sup>14</sup> Damin *et al.* dalam penelitiannya mendapatkan hasil DNA HPV positif pada 63,9% adenokarsinoma, 50% pada jaringan proksimal tumor, 0% pada jaringan kontrol.<sup>13</sup> Hal ini mendukung keterlibatan HPV pada rangkaian adenoma adenokarsinoma dan menunjukkan bahwa adanya DNA HPV pada adenokarsinoma kolorektal bukan merupakan insidental tapi merupakan kofaktor potensial untuk berkembangnya penyakit.<sup>10,13,14</sup>

Masih sedikit data mengenai infeksi HPV pada karsinoma kolorektal dengan mutasi atau inaktivasi p53. Buyru *et al.* mendapatkan hasil dengan pemeriksaan imunohistokimia terjadi overekspresi p53 pada karsinoma kolo-

rektal lebih dari 50%. Di sisi lain, mutasi p53 jarang terjadi pada karsinoma kolorektal dengan infeksi HPV, sehingga disimpulkan bahwa tidak terdapat korelasi antara mutasi p53 dengan infeksi HPV yang mengindikasikan inaktivasi p53 disebabkan oleh infeksi HPV yang mungkin berperan dalam patogenesis karsinoma kolon.<sup>7,23</sup>

Perez *et al.* pada penelitiannya dengan primer spesifik E2 memperlihatkan proporsi yang signifikan karsinoma kolorektal positif HPV yang memperlihatkan disrupsi gen E2.<sup>11</sup> Hal ini mengindikasikan adanya integrasi virus HPV pada karsinoma kolorektal yang akan menyebabkan tidak terkontrolnya E6 dan E7 yang akan memicu keganasan.<sup>11</sup>

### **Analisis Penentuan Tipe HPV**

Satu kasus adenoma positif HPV bukan merupakan tipe HPV 16 dan HPV 18. Sedangkan 3 kasus adenokarsinoma dengan HPV positif, 1 kasus merupakan HPV tipe 16 dan 2 kasus merupakan gabungan HPV 16 dan HPV 18. Hasil ini sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya, yang mendapatkan tipe HPV 16 dan 18 merupakan tipe tersering pada karsinoma kolorektal.<sup>2,4,5,13,24</sup>

Pada gel elektroforesis penentuan tipe HPV (Gambar 2) tampak pita-pita non spesifik di luar 119 bp pada kontrol positif HPV 16 dan di luar 172 bp pada kontrol positif HPV 18. Beberapa hal yang dapat menyebabkan adanya pita-pita tidak spesifik pada gel elektroforesis adalah terlalu banyak siklus pada program PCR, waktu ekstensi yang terlalu panjang, waktu *annealing* yang terlalu panjang dan temperatur *annealing* yang terlalu rendah yang akan meningkatkan amplifikasi non spesifik dan ikatan non spesifik.<sup>25</sup>

Belum semua tipe HPV pada adenoma dan adenokarsinoma dengan HPV positif pada penelitian ini teridentifikasi. Mengingat distribusi tipe HPV bervariasi berdasarkan area atau sistem organ pada tubuh, distribusi HPV pada karsinoma kolorektal akan berbeda dari area anogenital.<sup>26</sup> Tipe HPV lain pada karsinoma kolorektal adalah tipe 45 dan 31.<sup>2,4,5,23</sup>

### **Gambaran Histologik Adenoma dan Adenokarsinoma dengan HPV Positif.**

Adenoma dengan HPV positif merupakan adenoma tubulovilosum dengan displasia keras. Sedangkan 3 adenokarsinoma dengan HPV

positif, 2 kasus merupakan adenokarsinoma berdiferensiasi baik dan 1 kasus berdiferensiasi buruk. Hal ini cenderung sesuai dengan penelitian sebelumnya yang mendapatkan hasil adanya peningkatan infeksi HPV dengan makin beratnya displasia pada adenoma dan tidak terdapat hubungan yang bermakna antara diferensiasi histologik pada adenokarsinoma dengan adanya infeksi HPV.<sup>19,22,27</sup>

**KESIMPULAN**

Pemeriksaan DNA HPV dengan menggunakan *nested* PCR MY/GP didapatkan hasil DNA HPV positif pada 3,0% kasus adenoma dan 9,1% kasus adenokarsinoma kolorektal. Tidak terdapat hubungan antara infeksi HPV pada adenoma dan adenokarsinoma kolorektal dengan jenis kelamin, usia dan lokasi lesi. Tipe HPV pada kasus adenokarsinoma adalah tipe 16 dan 18, sedangkan pada adenoma bukan merupakan HPV tipe 16 dan 18. Diperlukan penelitian lanjutan dengan sampel yang lebih banyak dan menggunakan jaringan kontrol untuk mengetahui hubungan antara HPV dengan adenoma dan adenokarsinoma serta diperlukan pemeriksaan tipe HPV selain yang telah diperiksa pada penelitian ini. Untuk mengetahui patogenesis infeksi HPV pada adenoma dan adenokarsinoma kolorektal, diperlukan pemeriksaan antibodi E6 dan E7.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. World Health Organization. Globocan 2012. Lyon: IARC; 2015.
2. Yavuzer D, Karadayi N, Salepei T, Baloglu H, Dabak R, Bayramicli OU. Investigation of human papillomavirus DNA in colorectal carcinomas and adenomas. *Med Oncol*. 2011; 28: 127-32.
3. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012; 3: 153-73.
4. Giuliani L, Ronci C, Bonifacio D, Bonito LD, Favalli C, Pern CF, et al. Detection of oncogenic DNA viruses in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2008; 28: 1405-10.
5. Ranjbar R, Saberfar E, Shamsaie A, Ghasemian E. The aetiological role of human papillomavirus in colorectal carcinoma: an Iranian population-based case control study. *As Pac J Cancer Prev*. 2014; 15: 1521-5.

6. Liu F, Mou X, Zhao N, Lin J, Teng L, Xiang C. Prevalence of human papillomavirus in chinese patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2011; 13: 865-71.
7. Buyru N, Tezol A, Dalay N. Coexistence of K-ras mutations and HPV infection in colon cancer. *BMC Cancer*. 2006; 6: 1-5.
8. Meshkat M, Meibodi NT, Sepahi S, Fadaee N, Salehpour M, Meshkat Z. The frequency of human papillomaviruses in colorectal cancer samples in mashhad, northeastern iran. *Turk J Med Sci*. 2014; 44: 501-3.
9. Lorenzon L, Ferri M, Pillozzi E, Torrisi MR, Ziparo V, French D. Human papillomavirus and colorectal cancer: evidences and pitfalls of published literature. *Int J Colorectal Dis*. 2011; 26: 135-42.
10. Damin DC, Ziegelmann PK, Damin Ap. Human papillomavirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2013; 15: 420-8.
11. Perez LO, Barbisan G, Ottino A, Pianzola H, Golijow CD. Human papillomavirus DNA and oncogene alterations in colorectal tumors. *Pathol Oncol Res*. 2010; 16: 461-8.
12. Morshed K, Gruszka DP, Szymanski M, Dacewicz MP. Human papillomavirus (HPV)-structure, epidemiology and pathogenesis. *Head Neck Surg Soc*. 2014; 68: 213-9.
13. Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartsmann G, Damin AS, Frazzon AP, et al. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2007; 33: 569-74.
14. Baandrup L, Thomsen LT, Olesen B, Andersen KK, Norrild B, Kjaer SK. The prevalence of human papillomavirus in colorectal adenomas and adenocarcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J C*. 2014; 50: 1446-61.
15. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006; 24: 1-10.
16. Shukla S, Bharti AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian J Med Res*. 2009; 130: 222-33.
17. Kirgan D, Manalo P, Hall M, McGregor B. Association of human papillomavirus and colon neoplasm. *Arch Surg*. 1990; 125: 862-5.

18. Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao SY, Costa MD, Palefsky JM, Zheng ZM. Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 2862-7.
19. Picanco OM, Oliveira ALT, Freire LTM, Bripto RB, Villa LL, Matos D. Association between human papillomavirus and colorectal adenocarcinoma and its influence on tumor staging and degree of cell differentiation. *Arq Bras Cir Dig.* 2014; 27: 172-6.
20. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, *et al.* Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Mikrobiol.* 1996; 34: 2095-100.
21. Berrada N, Al-Bouzidi A, Ameer A, Abbar M, El-Mzibri M, El-Hassani RA, *et al.* Human papillomavirus detection in Moroccan patients with bladder cancer. *J Infect Dev Ctries.* 2013; 7: 586-92.
22. Cheng JY, Sheu LF, Meng CL. Detection of human papillomavirus DNA in colorectal carcinomas by polymerase chain reaction. *Gut.* 1995; 37: 87-90.
23. Motlagh A, Azadeh P, Hashemi M, Molaei M, Sheibani KhM, Alidoosti A, *et al.* Human papillomavirus infection, p53 overexpression and histopathologic characteristics in colorectal cancer. *Govaresh.* 2007; 12: 126-33.
24. Lee YM, Leu SY, Chiang H, Fung CP, Liu WT. Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. *J Microbiol Immunol Infect.* 2001; 34: 87-91.
25. Bio-Rad Laboratories. PCR troubleshooting. 2015. Cited:<http://www.bio-rad.com/en-id/applications-technologies/pcr-troubleshooting#gel2>. 23 Juli 2015.
26. Berber U, Tanoglu A, Balta AZ. Human papillomavirus: a potential risk factor for colorectal carcinoma?. *Turk J Med Sci.* 2015; 45: 462-3.
27. Perez LO, Abba MC, Laguens RM, Golijow CD. Analysis of adenocarcinoma of the colon and rectum: detection of human papillomavirus (HPV) DNA polymerase chain reaction. *Colorectal Dis.* 2005;7:492-5.