

## siRNA E6 sebagai Agen Terapi Kanker Leher Rahim Berbasis Inhibisi Telomerase dalam Proliferasi *HeLa Cell Line*

Genitri Indraswari\*, Yuyun Yueniwati Prabowowati Wadjib\*\*

\*Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

\*\*Laboratorium Radiologi Rumah Sakit Umum Daerah dr. Saiful Anwar

### ABSTRAK

Kanker serviks disebabkan oleh *Human Papilloma Virus (HPV)* terutama tipe 16 dan 18 yaitu virus yang mampu menginvasi sel skuamosa yang terdapat pada serviks atau leher rahim manusia. *HPV* yang menginfeksi serviks akan mengekspresikan berbagai macam protein, di antaranya adalah protein *E6* yang mampu menonaktifkan protein *p53*. *siRNA (small interfering ribonucleic acid) E6* merupakan suatu *RNA* yang mampu menghambat aktivasi protein *E6* di dalam tubuh secara spesifik. Mekanisme molekular yang terlibat dalam prevensi adalah inhibisi yang dilakukan oleh *siRNA E6* terhadap *mRNA E6* sebelum di translasi menjadi protein *E6* diharapkan mampu mengendalikan proliferasi sel kanker serviks dengan efek samping yang minimal pada sel normal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek *siRNA E6* pada kultur sel kanker serviks manusia (*HeLa Cell line*) dengan menghitung dosis optimal *siRNA E6* dalam menghambat proliferasi sel kanker serviks. Desain penelitian yang digunakan adalah mengonjugasikan *siRNA E6* dengan dosis 0 µg, 0,5 µg, 1 µg, dan 2 µg ke dalam sel *HeLa* menggunakan *Lipofectamine™2000*. Hasil perlakuan akan diamati menggunakan *MTT Assay*. Hasil *MTT Assay* menunjukkan penurunan proliferasi sel *HeLa* paling rendah pada dosis 1 µg. Setelah diberi perlakuan dengan *siRNA E6* dosis 1 µg, didapatkan presipitat ungu yang paling minimal, densitas sel *HeLa* yang rendah dengan nilai absorbansi terendah yang menunjukkan tingkat proliferasi sel kanker minimal. Kesimpulan dari penelitian ini adalah *siRNA E6* dosis 1 µg memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai absorbansi dan berpotensi menjadi metode alternatif terapi kanker leher rahim di masa depan.

**Kata kunci:** kanker serviks, *HPV*, protein telomerase, protein *E6*, *siRNA E6*

## E6 siRNA as Therapeutic Agent of Cervical Cancer Based on Inhibition of Telomerase in the Proliferation of HeLa Cell Line

Genitri Indraswari\*, Yuyun Yueniwati Prabowowati Wadjib\*\*

\*Medical Program Faculty of Medicine Brawijaya University

\*\*Radiology Laboratory of dr. Saiful Anwar District General Hospital

### ABSTRACT

Cervical cancer is caused by viruses that can invade squamous cells found in the cervix which are HPV particularly types 16 and 18. HPV that infect the cervix will express variety of proteins, including E6 protein that is able to inactivate p53 protein. E6 siRNA is RNA that can inhibit E6 protein activation in the body specifically. Molecular mechanisms involved in prevention is inhibition conducted by E6 siRNA against E6 mRNA before translation into E6 protein is expected to control proliferation of cervical cancer cells with minimal side effects on normal cells. This study aims to determine the effect of E6 siRNA in HeLa Cell line to calculate the optimal dose of E6 siRNA to inhibit proliferation of cervical cancer cells. The study design used is to conjugate E6 siRNA with doses of 0  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , and 2  $\mu\text{g}$  into HeLa cells using Lipofectamine™2000. The results of treatment will be investigated using MTT Assay. MTT Assay results showed a decrease in proliferation of HeLa cells at the lowest dose of 1  $\mu\text{g}$ . After being treated with E6 siRNA dose of 1  $\mu\text{g}$ , a purple precipitate obtained the most minimal, low density HeLa cells with the lowest absorbance value that indicates the minimum level of cancer cell proliferation. The conclusion is the E6 siRNA dose of 1  $\mu\text{g}$  had a significant influence on absorbance values and potential for alternative methods of treatment of cervical cancer in the future.

**Keywords:** cervical cancer, HPV, telomerase protein, E6 protein, E6 siRNA



## PENDAHULUAN

Lebih dari 270.000 kematian terjadi setiap tahun akibat kanker leher rahim, di mana 85% di antaranya terjadi di negara berkembang<sup>1</sup>. Pada tahun 2012, sebanyak 12.042 orang perempuan di Amerika Serikat terdiagnosis menderita kanker leher rahim dan 4.074 orang di antaranya meninggal akibat kanker leher rahim<sup>2</sup>. Kanker leher rahim merupakan kanker nomor dua yang paling banyak terjadi pada perempuan usia 15-44 tahun dengan angka mortalitas sekitar 265.653 kasus kematian baru setiap tahunnya di dunia. Indonesia merupakan negara berkembang yang memiliki angka prevalensi kanker mencapai 1,4 per 1000 penduduk, sedangkan kanker leher rahim merupakan pembunuh nomor dua akibat keganasan dengan persentase sebesar 12,8% dari seluruh kanker di Indonesia.

Infeksi oleh *Human Papilloma Virus* (HPV) menghasilkan lesi morfologis pada leher rahim atau serviks yang berkisar dari lesi normal (secara sitologi pada perempuan normal) sampai dengan stadium yang berbeda pada lesi prekanker (CIN-1, CIN-2, CIN-3/CIS) dan kanker serviks invasif. Kasus kanker serviks yang paling sering terjadi adalah tipe karsinoma sel skuamosa diikuti dengan tipe adenokarsinoma<sup>2</sup>.

Prevalensi kanker leher rahim atau serviks meningkat seiring dengan bertambahnya tingkat keparahan lesi. HPV-16 dan HPV-18 berkontribusi sebagai etiologi kanker serviks hingga mencapai 70% dari seluruh kasus kanker serviks. Sejumlah kasus dengan persentase sekitar 41%-67% merupakan lesi serviks beresiko tinggi dan 16%-32% lainnya merupakan lesi serviks beresiko lebih rendah. Setelah HPV-16 dan HPV-18, enam tipe HPV terbanyak lainnya

adalah HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-45, HPV-52, dan HPV-58 yang menyebabkan sekitar 20% kasus kanker serviks di dunia.

*Human Papilloma Virus* (HPV) diketahui merupakan penyebab absolut dari kanker leher rahim. HPV mampu menginvasi jaringan epitel sel skuamosa yang terdapat pada leher rahim atau serviks manusia. HPV yang menginvasi sel serviks, akan mengekspresikan berbagai macam protein, di antaranya adalah protein E6. Protein E6 merupakan suatu protein yang mampu menonaktifkan aktivitas protein p53 sebagai regulator pembelahan sel dan meningkatkan ekspresi *hTERT* (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) yang menyebabkan sel kehilangan kemampuan apoptosisnya. Hal ini, menyebabkan gangguan respon penangkapan pada siklus sel dan deregulasi jalur untuk mengendalikan diferensiasi sel<sup>4,5</sup>. Protein E6 akan menyebabkan transformasi sel epitel skuamosa pada sel inang mereka menjadi tumorigenik<sup>6</sup>. Apabila regulasi protein E6 dapat ditekan, maka sifat-sifat patologis sel kanker diyakini akan menghilang, sehingga pembelahannya dapat dihambat dan diinduksi kematiannya.

Pengobatan kanker yang saat ini banyak diterapkan antara lain adalah kemoterapi, radioterapi, dan pembedahan. Akan tetapi, kemoterapi dan radiasi memiliki efek samping yang tinggi terhadap sel normal. Penyebaran jaringan kanker atau metastasis juga merupakan penyulit dalam pembedahan, sehingga pengangkatan seluruh organ genitalia kerap kali dilakukan. Hal ini mengindikasikan pentingnya suatu inovasi terapi yang mampu menghentikan perkembangan kanker serviks, namun memiliki efek samping yang minimal pada sel normal.

*siRNA* (*small interfering ribonucleic acid*) *E6* mampu mengenali secara spesifik *mRNA E6* sehingga dapat menghentikan proses translasi membentuk protein *E6*. Hal tersebut diyakini mampu menekan ekspresi protein *E6*, sehingga mengakibatkan penurunan proliferasi dan menginduksi kematian sel kanker serviks. Peningkatan protein *E6* hanya terjadi pada sel serviks yang terinfeksi oleh *HPV* sehingga *siRNA E6* hanya akan mengenali dan menyerang sel kanker dan tidak mengenali sel normal. Harapannya, terapi kanker serviks menggunakan *siRNA E6* dapat digunakan sebagai alternatif terapi kanker serviks yang adekuat dan memiliki efek samping yang minimal pada sel normal.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vitro* menggunakan rancangan *Randomized Group Post Test Only Design*. Sampel penelitian adalah sel kanker leher rahim dari kultur sel *HeLa*. Perhitungan besarnya pengulangan pemeriksaan pada kultur menggunakan rumus  $(t-1)(r-1) \geq 15$  ( $t$ : jumlah perlakuan,  $r$ : jumlah ulangan) didapatkan jumlah pengulangan sebanyak 6 kali<sup>7</sup>. Desain penelitian yang digunakan adalah mengonjugasikan *siRNA E6* dengan dosis 0  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , dan 2  $\mu\text{g}$  ke dalam sel *HeLa* menggunakan *Lipofectamine™2000*. Hasil perlakuan akan diamati menggunakan *MTT Assay* untuk mengukur banyaknya cahaya yang diserap oleh protein metabolit hasil pernapasan sel *HeLa* yang hidup setelah perlakuan.

**Perlakuan *siRNA E6* pada subkultur sel *HeLa*.** Melakukan subkultur sel sampai

confluent 70%-90% pada saat transfeksi (*plate 24-well*:  $0,5 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^5 = 1 \cdot 10^5$ ). Melakukan dilusi dengan 2,5  $\mu\text{L}$  *Lipofectamine™2000* ditambah dengan 5  $\mu\text{g}$  *DNA*. Menambahkan dilusi 50  $\mu\text{L}$  *DNA* ke dalam dilusi 50  $\mu\text{L}$  *Lipofectamine™2000* dengan rasio 1 : 1. Melakukan inkubasi selama 1 x 24 jam. Menambahkan kompleks *DNA-lipid* ke dalam sel (konsentrasi akhir *Lipofectamine™2000/well* = 2,5  $\mu\text{L}$ ) kemudian sel diinkubasi selama 1-3 hari dilanjutkan dengan analisis (*DNA/well* = 500 ng). Melakukan transfeksi *siRNA E6* yang sudah mengandung *Lipofectamine™2000*. Menunggu selama 5 menit, sambil mencuci sel *HeLa* menggunakan *buffer* kemudian diinkubasi selama 2 x 24 jam<sup>8,9</sup>.

**MTT Assay.** Menanam sel pada *plate 24-well*. Melakukan inkubasi selama 6-24 jam. Menambahkan 10  $\mu\text{L}$  reagen *MTT*. Melakukan inkubasi selama 2-4 jam sampai presipitat berwarna ungu terlihat. Menambahkan 100  $\mu\text{L}$  reagen Detergen. Mendinginkan pada suhu ruangan dalam kondisi gelap selama 2 jam. Merekam absorbansinya pada panjang gelombang 570 nm<sup>10</sup>.

**Analisis Data.** Hasil pengukuran nilai absorbansi *siRNA E6* dianalisis dengan menggunakan program statistik SPSS. Metode analisis menggunakan Uji *Shapiro-Wilk* ( $p > 0.05$ ) untuk mengetahui normalitas data, Uji *One-Way Anova* ( $p < 0.05$ ), Uji *Post-Hoc Tukey HSD* ( $p < 0.05$ ) sebagai lanjutan *One-Way Anova*.

## HASIL PENELITIAN

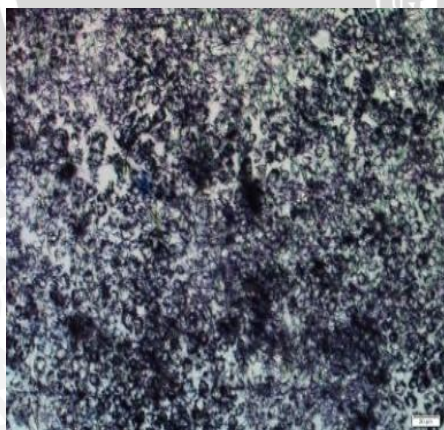
*MTT Assay* dilakukan setelah 6 hari perlakuan menggunakan *siRNA E6* yang telah terkonjugasi dengan



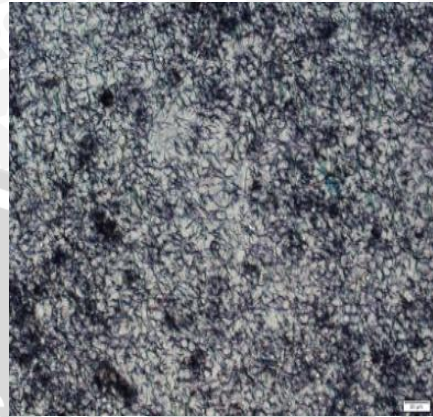
*Lipofectamine™2000*. Setelah itu, nilai absorbansinya diamati dengan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 570 nm. Respirasi atau pernapasan sel dapat diamati melalui banyaknya cahaya yang diserap oleh protein metabolit hasil pernapasan sel *HeLa* yang hidup setelah diberikan dosis perlakuan *siRNA E6*, yaitu 0 µg, 0,5 µg, 1 µg, dan 2 µg.

Hasil *MTT Assay* setelah diberi perlakuan menggunakan *siRNA E6* pada penelitian ini menunjukkan adanya penurunan proliferasi sel *HeLa* pada perlakuan dengan dosis 1 µg (Gambar 1). Setelah diberi perlakuan dengan *siRNA E6* dosis 1 µg dihasilkan presipitat ungu yang paling minimal, densitas sel *HeLa* yang rendah, dengan nilai absorbansi terendah yang menunjukkan tingkat proliferasi sel kanker yang minimal.

**Gambar 1. Proliferasi sel *HeLa* setelah perlakuan dengan *siRNA E6***



Kontrol



*siRNA E6* 0,5 µg



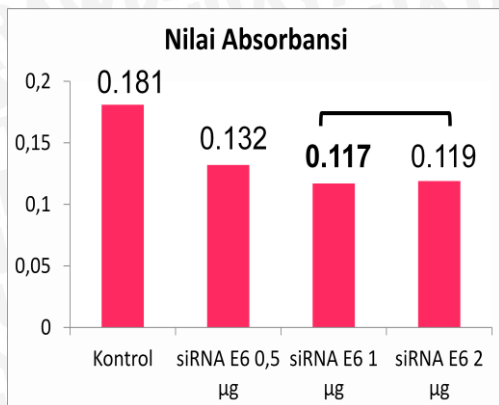
*siRNA E6* 1 µg



*siRNA E6* 2 µg



**Gambar 2. Perbandingan absorbansi siRNA E6**



Pada analisis data, untuk mengetahui normalitas digunakan uji *Shapiro-Wilk* dengan hasil pada kelompok kontrol (K)  $p = 0.769$ , kelompok perlakuan *siRNA E6* dosis 0,5 µg  $p = 0.620$ , kelompok perlakuan *siRNA E6* dosis 1 µg  $p = 0.942$ , dan perlakuan *siRNA E6* dosis 2 µg  $p = 0.056$ , sehingga dapat disimpulkan distribusi data normal ( $p > 0,05$ ). Pada uji homogenitas nilai absorbansi didapatkan  $p = 0.612$  ( $p > 0,05$ ), sehingga dapat dikatakan varians data homogen. Setelah itu, dilanjutkan dengan uji *One-Way Anova*, didapatkan  $p = 0.015$  ( $p < 0,05$ ), berarti terdapat perbedaan yang bermakna pada masing-masing kelompok perlakuan. Langkah terakhir adalah melakukan uji *Post-Hoc Tukey HSD*, didapatkan perbedaan nilai absorbansi kelompok perlakuan *siRNA E6* dosis 0,5 µg  $p = 0.052$ , kelompok perlakuan *siRNA E6* dosis 1 µg  $p = 0.018$ , dan kelompok perlakuan *siRNA E6* dosis 2 µg  $p = 0.022$  dibandingkan dengan kelompok kontrol (K). Hal tersebut menunjukkan terdapat perbedaan nilai absorbansi yang bermakna ( $p < 0,05$ ), antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok *siRNA E6* dosis 1 µg dan *siRNA E6* dosis 2 µg, sehingga *siRNA E6* dosis 1 µg dan *siRNA E6* dosis 2

µg memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai absorbansi ( $p = 0.000$ ). Namun, karena nilai proliferasi paling rendah didapatkan pada *siRNA E6* dosis 1 µg ( $p = 0.018$ ), sehingga dapat disimpulkan bahwa *siRNA E6* dosis 1 µg memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai absorbansi.

## PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan subyek penelitian sel kanker serviks pada kultur sel kanker serviks manusia (*HeLa cell line*). Sel *HeLa* yang telah disubkultur dalam *plate 24-well* kemudian dipaparkan dengan *siRNA E6* yang telah terkonjugasi dengan *Lipofectamine™2000* dengan dosis paparan *siRNA E6* sebesar 0 µg, 0,5 µg, 1 µg, dan 2 µg. Setelah *plate* diinkubasi selama 6 hari, kemudian dilakukan *MTT Assay*. Selanjutnya, dilakukan analisis statistik nilai absorbansi yang telah didapatkan dari *MTT Assay*.

Sel hidup memiliki mitokondria yang aktif memproduksi *mitochondrial succinate dehydrogenase* ke luar membran sel. Enzim tersebut akan mengubah pewarna 2,5-*diphenyl tetrazolium bromide* (*MTT*) yang digunakan sebagai reagen *MTT*. *Tetrazolium* (*MTT*) akan masuk ke dalam sel kemudian melewati mitokondria di mana ia akan diubah menjadi senyawa yang berwarna ungu gelap (*formazan*). Kemudian, *formazan* ini akan diukur kadarnya menggunakan spektrofotometri. Spektrofotometer akan mengonversi jumlah sinar yang diabsorpsi sampel menjadi nilai absorbansi. Reduksi dari *Tetrazolium* (*MTT*) hanya terjadi pada sel yang aktif bermetabolisme. Bila selnya hidup, maka akan didapatkan peningkatan presipitat warna ungu, sebaliknya bila selnya

mati akan didapatkan presipitat warna ungu yang lebih sedikit<sup>11</sup>.

*MTT Assay* dapat digunakan untuk mendapatkan data secara kualitatif maupun kuantitatif. Metode pengukurannya dapat menggunakan prinsip *Tetrazolium Reduction Assay* maupun menggunakan prinsip *ATP Assay*. Penelitian ini lebih berfokus pada pengambilan data secara kuantitatif menggunakan prinsip *ATP Assay* yang diukur dengan kalorimetri. Kalorimetri merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengukur kalor (energi) yang dihasilkan oleh sesuatu, dalam hal ini adalah sel *HeLa*. Bila sel yang diukur masih aktif bermetabolisme, maka presipitat ungu yang dihasilkan akan semakin banyak, karena mitokondria dalam sel aktif bekerja untuk menghasilkan energi (*ATP*)<sup>12</sup>.

Hasil uji *MTT Assay* menggunakan *siRNA E6* pada penelitian ini menunjukkan adanya penurunan proliferasi sel *HeLa* pada perlakuan dengan dosis 1  $\mu\text{g}$ . Setelah diberi perlakuan dengan *siRNA E6* dosis 1  $\mu\text{g}$  dihasilkan presipitat ungu yang paling minimal, densitas sel *HeLa* yang rendah, dengan nilai absorbansi terendah yang menunjukkan tingkat proliferasi sel kanker yang minimal. Hal tersebut membuktikan hipotesis penelitian yang menyatakan bahwa pemberian *siRNA E6* dengan tingkat dosis yang berbeda dapat mengurangi proliferasi kanker leher rahim manusia pada kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*).

Pada analisis data, didapatkan perbedaan nilai absorbansi yang bermakna ( $p < 0,05$ ) antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok *siRNA E6* dosis 1  $\mu\text{g}$  dan *siRNA E6* dosis 2  $\mu\text{g}$ , sehingga *siRNA E6* dosis 1  $\mu\text{g}$  dan *siRNA E6* dosis 2  $\mu\text{g}$  memberikan pengaruh yang signifikan

terhadap nilai absorbansi ( $p = 0,000$ ). Namun, karena nilai proliferasi paling rendah didapatkan pada *siRNA E6* dosis 1  $\mu\text{g}$  ( $p = 0,018$ ), sehingga dapat disimpulkan bahwa *siRNA E6* dosis 1  $\mu\text{g}$  memberikan pengaruh yang signifikan terhadap nilai absorbansi. Hal tersebut membuktikan hipotesis penelitian yang menyatakan bahwa terdapat hubungan antara pemberian *siRNA E6* dengan tingkat dosis yang berbeda terhadap tingkat proliferasi kanker leher rahim manusia pada kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*).

Hasil penelitian tersebut juga membuktikan hipotesis penelitian yang menyatakan bahwa peningkatan aktivitas protein telomerase yang diregulasi oleh protein *E6* dapat ditekan menggunakan *siRNA E6* yang memiliki target kerja spesifik pada *mRNA E6*. *siRNA E6* dapat menghentikan proses translasi dan menghentikan ekspresi protein *E6* di dalam sel kanker. Bila ekspresi protein *E6* dapat ditekan, maka aktivitas protein telomerase juga akan menurun sehingga menyebabkan menurunnya proliferasi kanker leher rahim pada kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*).

Sesuai dengan hasil penelitian ini, maka *siRNA E6* merupakan kandidat metode alternatif dalam terapi kanker leher rahim menggunakan pengamatan pada kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*).

## KESIMPULAN

1. *siRNA E6* mampu menginduksi kematian sel kanker serviks manusia melalui pengamatan metabolit sel kanker serviks pada kultur sel kanker serviks manusia



- (*HeLa cell line*) dengan dosis optimal 1 µg.
2. *siRNA E6* dosis 1 µg mampu menurunkan proliferasi sel kanker serviks dengan optimal pada kultur sel kanker serviks manusia (*HeLa cell line*).
  3. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai *siRNA E6* sebagai pendekatan terapi kanker leher rahim secara *in vivo* dan *clinical trial*.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. 2014. *Prevention and Control for Cervical Cancer*, (Online), (<http://www.who.int/reproductivehealth/topics/cancers/hpv-vaccination/en/>), diakses 20 Oktober 2015).
2. Centers for Disease Control and Prevention. 2012. *Cervical Cancer Statistic*, (Online), (<http://www.cdc.gov/cancer/cervical/statistics/>), diakses 20 Oktober 2015).
3. Arends MJ., Buckley CH., Wells M.. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998;51:96-103.
4. Radaeli, A. et al. 2010. Fowlpox virus recombinants expressing HPV-16 E6 and E7 oncogenes for the therapy of cervical carcinoma elicit humoral and cell-mediated responses in rabbits. *J of Translational Med* (8) :40.
5. Morandell, Dieter. et al. 2012. *The Human Papilloma Virus Type 16 E7 Oncoprotein Targets Myc-Interating Zinc-Finger Protein-1*. *Virology*(422(2)) : 242-253.
6. Roman, Ann., et al. 2013. *The Papillomavirus E7 Proteins*. *Virology*(445) : 138-168.
7. Hanafiah. 2005. *Statistik Kedokteran*. Jakarta: Bumi Cipta.
8. Dharmacon. 2014. *Basic siRNA Resuspension*.
9. Dharmacon. 2014. *DharmaFECT™ Transfection Reagents*.
10. ATCC. 2014. *MTT Cell Proliferation Assay*.
11. Ola Germaniuk. 2016. *MTT Assay*, (Online), (<http://groups.molbiosci.northwestern.edu/morimoto/research/Protocols/II.%20Eukaryotes/E.%20Cell%20Growth/Death/2.%20MTT.pdf>), diakses 20 November 2016).
12. Terry LR., Richard AM., Andrew LN., Sarah D., Hélène AB., Tracy JW., Lisa M. 2016. *Cell Viability Assay*, (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>), diakses 20 November 2016).