

LAPORAN

AKHIR TAHUN

PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



**ANALISA PROTEIN BCL-2 SEBAGAI PENANDA PROGNOSIS
(*PROGNOSIS MARKER*) KANKER LEHER RAHIM
DARI INFEKSI HUMAN PAPILOMA VIRUS (HPV) TIPE 16 DAN 18
DI INDONESIA**

TIM PENGUSUL :

Dr.Henny Saraswati, S.Si, M.Biomed (NIDN : 0328087802)

Aroem Naroeni, DEA, PhD (NIDN : 0329057204)

Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si (NIDN : 0323029101)

UNIVERSITAS ESA UNGGUL

NOVEMBER 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Analisa Protein Bcl-2 Sebagai Penanda Prognosis (Prognosis Marker) Kanker Leher Rahim Dari Infeksi Human Papilloma Virus Tipe 16 dan 18 di Indonesia

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr HENNY SARASWATI, S.S.I, M.Biomed.
Perguruan Tinggi : Universitas Esa Unggul
NIDN : 0328087802
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Bioteknologi
Nomor HP : 081281701911
Alamat surel (e-mail) : hennysaraswati@esaunggul.ac.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : AROEM NAROENI S.Si, D.E.A, PhD
NIDN : 0329057204
Perguruan Tinggi : Universitas Esa Unggul

Anggota (2)
Nama Lengkap : FEBRIANA DWI WAHYUNI S.Pd, M.Si
NIDN : 0323029101
Perguruan Tinggi : Universitas Esa Unggul

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 158,603,000
Biaya Keseluruhan : Rp 612,200,000

Mengetahui,
Dekan



(Dr. Aprilita Rinayanti Eff, Apt, M.Biomed)
NIP/NIK 215020572

D.K.I. JAKARTA, 8 - 11 - 2018

Ketua,

(Dr HENNY SARASWATI, S.S.I, M.Biomed.)
NIP/NIK 216040630

Menyetujui,
Ketua LPPM

(Dr. Hasyim, S.E, M.M, M.Ed)
NIP/NIK 0201040164

RINGKASAN

Kanker leher rahim merupakan salah satu kanker yang paling sering diderita kaum wanita. Menurut data dari Globocan, di Indonesia sendiri sampai tahun 2012 terdapat sekitar 9.000 kematian wanita akibat penyakit kanker leher rahim setiap tahunnya dan sekitar 20 ribu kasus infeksi baru. Penyebab kanker ini sebagian besar adalah adanya infeksi Human Papilloma Virus (HPV) tipe 16 dan 18. Untuk mengurangi angka morbiditas dan mortalitas kanker leher rahim, saat ini pemerintah giat melaksanakan uji deteksi dini kanker leher rahim pada wanita-wanita yang telah aktif secara seksual di pusat-pusat layanan kesehatan secara gratis. Perjalanan kanker leher rahim sendiri memerlukan waktu yang panjang. Dimulai dari lesi pre-kanker hingga kanker invasif. Prognosis atau prediksi perjalanan penyakit leher rahim pada penderita sangat diperlukan oleh klinisi untuk dapat memberikan terapi yang lebih baik sehingga dapat menurunkan angka kesakitan dan angka kematian pada penderita. Untuk keperluan ini maka diperlukan marker prognosis yang terbukti secara ilmiah mampu memberikan prediksi perjalanan penyakit kanker leher rahim. Protein Bcl-2 merupakan bagian dari famili protein Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) yang bersifat anti-apoptosis. Beberapa penelitian memperlihatkan bahwa perubahan pada protein Bcl-2 menyebabkan terjadinya gangguan dalam pengaturan proses apoptosis, sehingga berperan dalam patogenesis penyakit kanker. Ekspresi Bcl-2 terlihat berperan dalam kejadian kanker payudara, kanker kelenjar getah bening, kanker paru-paru dan kanker otak. Berdasarkan fungsinya dalam kejadian kanker tersebut, maka protein Bcl-2 juga berpotensi untuk dijadikan penanda prognosis dalam perjalanan penyakit kanker leher rahim. Sampai Agustus 2018 ini, kami telah berhasil melakukan desain primer Bcl-2 yang digunakan untuk proses penggandaan pita DNA Bcl-2. Primer ini akan digunakan dalam proses real time RT-PCR yang diperlukan untuk penghitungan tingkat ekspresi gen Bcl-2. Primer ini sudah kami optimasi dalam menentukan suhu *annealing*, sehingga dapat dihasilkan kondisi optimum RT-PCR. Hasil optimasi memperlihatkan reaksi RT-PCR dapat berlangsung dengan baik. Selain primer Bcl-2, kami juga telah berhasil mendesain primer HPV 16 dan 18 yang digunakan dalam proses multiplex PCR untuk mendiagnosis apakah subyek terinfeksi HPV 16 atau 18. Primer ini juga telah kami optimasi untuk suhu *annealing*-nya. Hasil amplifikasi menghasilkan pita DNA yang spesifik. Selain itu kami juga telah berhasil mendapatkan surat lolos kaji etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan no. 0688/UN2.F1/ETIK/2018 untuk dapat melakukan penelitian pada subyek penderita, dan saat ini dilanjutkan dengan perijinan ke bagian Penelitian RSCM/FKUI untuk dapat melakukan proses pengambilan sampel dari subyek. Hasil penelitian juga telah didaftarkan pada Jurnal Bioinformatics and Biology Insights (Libertas Academica), juga telah dipresentasikan secara oral pada Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas 2018 di Solo. Selain itu, hasil penelitian telah mendapatkan surat pencatatan Hak Cipta dari Kemenkumham dengan No. 000122210.

Kata kunci: Human Papilloma Virus (HPV), kanker leher rahim, protein Bcl-2, penanda prognosis

PRAKATA

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh,

Alhamdulillahirobbil 'alamin, rasa syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya. Sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan kemajuan penelitian yang berjudul “Analisa Protein Bcl-2 Sebagai Penanda Prognosis (Prognosis Marker) Kanker Leher Rahim dari Infeksi Human Papilloma Virus (HPV) Tipe 16 dan 18 di Indonesia”.

Penelitian ini dilakukan berangkat dari tingginya angka kesakitan kanker leher rahim di Indonesia. Meskipun telah dilakukan metode skrining awal yang tersedia di pusat layanan kesehatan, namun tidak serta merta dapat mengurangi angka kejadian kanker leher rahim. Kanker leher rahim merupakan salah satu penyakit yang memiliki angka kematian yang tinggi pada wanita. Sehingga beberapa pihak melakukan beberapa langkah untuk mengurangi angka kematian ini. Prognosis adalah salah satu cara yang dapat digunakan dalam tata laksana penanganan pasien dengan kanker leher rahim.

Dalam pelaksanaan penelitian ini tentu saja ada tantangan yang harus dihadapi. Namun, tim peneliti merupakan anggota-anggota yang handal dalam menangani hal ini, sehingga tantangan yang dihadapi dapat diatasi segera.

Demikian prakata dari penulis yang dapat disampaikan. Kurang dan lebihnya penulis mohon maaf yang sebesar-besarnya.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Jakarta, November 2018

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viiviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 TARGET DAN LUARAN	3
BAB 3 METODE PELAKSANAAN	4
3.1 Desain primer Bcl-2	4
3.2 Desain primer HPV 16 dan 18	6
3.3 Optimasi Reaksi qPCR untuk Suhu Annealing	6
3.4 Optimasi PCR Konvensional untuk Suhu Annealing	7
3.5 Isolasi DNA dari sel HeLa	7
3.6 Isolasi RNA	8
BAB 4 KELAYAKAN PERGURUAN TINGGI	10
BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	11
5.1 Persetujuan Etik Penelitian	11
5.2 Desain Primer Bcl-2	12
5.3 Desain Primer HPV 16 dan 18	14
5.4 Optimasi suhu annealing untuk real time RT PCR	18
5.5 Optimasi Reaksi PCR Konvensional untuk Suhu Annealing	19
5.6 Luaran Penelitian	20
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	21
6.1 Pengambilan sampel penelitian dari pasien	21
6.2 Uji efektivitas primer Bcl-2	21
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	22
7.1 Kesimpulan	22
7.2 Saran	22
DAFTAR PUSTAKA	23
Lampiran	26

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Rencana target capaian tahunan penelitian	3
Tabel 2. Pasangan primer Bcl-2.....	12
Tabel 3. Hasil Perbandingan Primer Bcl-2 dengan Beberapa Sekuen DNA	13
Tabel 4. Pasangan primer HPV 16 yang berhasil didesain.....	15
Tabel 5. Pasangan primer HPV 18 yang berhasil didesain.....	15
Tabel 6. Hasil analisis spesifisitas pasangan primer HPV 16 dengan perangkat lunak BLAST.....	16
Tabel 7. Hasil analisis spesifisitas pasangan primer HPV 18 dengan perangkat lunak BLAST.....	17

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Laman muka dari National Center for Biotechnology Information (NCBI)	4
Gambar 2. Laman muka dari perangkat lunak Primer-BLAST	5
Gambar 3. Laman muka perangkat lunak BLAST	6
Gambar 4. Posisi relatif primer Bcl-2 terhadap gen Bcl-2.....	12
Gambar 5. Organisasi genom Human Papillomavirus (HPV) (22)	14
Gambar 6. Posisi relatif primer HPV 16 terhadap gen L1	15
Gambar 7. Posisi relatif primer HPV 18 terhadap gen L1	15
Gambar 8. Hasil optimasi suhu annealing reaksi qPCR	18
Gambar 9. Hasil optimasi suhu annealing reaksi PCR konvensional.....	19

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik	268
Lampiran 2a. Bukti Pendaftaran Manuskrip pada Jurnal GPB.....	29
Lampiran 2b. Bukti Pendaftaran Manuskrip pada Jurnal BBI.....	30
Lampiran 3. Bukti Kepesertaan dalam SemNas Masyarakat Biodiversitas 2018	32
Lampiran 4. Foto-foto Kegiatan Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas 2018	32
Lampiran 5. Surat Pencatatan Hak Cipta dari Kemenkumham RI	33

BAB 1

PENDAHULUAN

Kanker leher rahim adalah kanker atau jaringan abnormal ganas yang terdapat pada leher rahim, suatu saluran yang menghubungkan vagina dengan rahim (uterus). Jenis kanker ini merupakan jenis kanker ketiga yang sering menyerang kaum wanita. Data dari World Health Organization (WHO) menyebutkan bahwa sampai tahun 2012, terdapat sekitar 270.000 kematian yang terjadi akibat kanker leher rahim, dimana 85% nya terjadi di negara-negara miskin dan berkembang (1). Di Indonesia sendiri, kanker leher rahim merupakan penyebab kematian nomor dua setelah kanker payudara pada wanita. Sampai tahun 2012, terdapat 20.928 kasus baru kanker leher rahim dan 9.498 kematian setiap tahun pada wanita usia 15-44 tahun. Hal ini menjadikan Indonesia merupakan negara ke-4 dengan angka kejadian kanker leher rahim tertinggi di kawasan Asia Tenggara (Institut Català d'Oncologia, 2016). Kanker leher rahim diakibatkan oleh virus HPV (Human Papilloma Virus) tipe 16 dan 18 yang menyerang sel epitel di leher rahim.

Virus Human Papilloma (HPV) merupakan virus DNA yang termasuk dalam famili Papillomaviridae. Sampai sekarang, tercatat sekitar 200 tipe HPV yang telah teridentifikasi. Virus HPV tipe 16 dan 18 merupakan penyebab kanker leher rahim (*cervical cancer*) yang banyak diderita oleh kaum wanita. Struktur genom dari Papillomavirus terdiri dari 8.000 pasang basa (8 kb) yang tersusun atas 3 daerah utama yaitu *early*, *late* dan daerah yang tidak ditranslasikan. Daerah *early* tersusun atas gen E1, E2, E4, E5, E6 dan E7 yang menyandi protein-protein yang berperan dalam proses perbanyak virus dan juga menginduksi terjadinya kanker. Sedangkan daerah *late* terdiri dari gen L1 dan L2 yang berperan pembentukan struktur virus. Virus HPV tipe 16 dan 18 akan menyerang sel-sel epitel saluran leher rahim wanita dan siklus hidupnya akan mengikuti diferensiasi sel epitel. Oleh karena itu sampai saat ini kultur virus HPV secara *in vitro* sangat sulit dilakukan. Hal ini menjadi salah satu tantangan dalam pembuatan vaksin kuratif maupun preventif kanker leher rahim.

Perjalanan penyakit kanker leher rahim memerlukan waktu yang lama. Setelah terinfeksi virus HPV, seorang wanita tidak serta merta langsung terkena kanker leher rahim. Namun, didahului dengan munculnya sel-sel epitel abnormal di daerah leher rahim. Respon imun seseorang umumnya bisa melawan infeksi virus HPV ini, kemudian mengalami kesembuhan tanpa terapi. Namun, terkadang sel-sel abnormal ini berkembang lebih ganas dan menjadi awal terjadinya kanker leher rahim. Perjalanan penyakit ini memakan waktu hingga ±

20 tahun. Setelah muncul sel-sel kanker, *staging* atau stadium kanker penderita didasarkan pada ukuran kanker dan pola penyebarannya. Saat ini penentuan derajat stadium kanker berdasarkan klasifikasi dari *International Federation on Gynecology and Obstetrics* (FIGO). Prognosis diperlukan untuk memperkirakan perjalanan penyakit kanker leher rahim pada penderita. Penanda prognosis merupakan suatu penanda biologis yang mampu digunakan dalam proses prognosis seorang penderita. Klinisi sangat memerlukan penanda prognosis ini dikarenakan akan membantu dalam memberikan terapi yang lebih baik bagi penderita.

Protein Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) merupakan salah satu protein dalam famili protein Bcl-2 yang bersifat *anti apoptotic*. Protein ini pada individu normal bersama-sama protein-protein *pro apoptotic* akan mengatur terjadinya apoptosis pada tubuh. Apoptosis merupakan kejadian alami pada tubuh yaitu berupa kematian sel yang terprogram. Hal ini penting dilakukan untuk menjaga keseimbangan antara sel-sel baru yang terbentuk dan sel-sel lama yang mati. Perubahan pada struktur dan fungsi protein Bcl-2 berperan dalam kejadian terganggunya proses apoptosis sel, sehingga menimbulkan sel abnormal yaitu sel kanker. Pada beberapa jenis kanker lain seperti kanker paru, payudara, kelenjar getah bening dan otak terlihat adanya hubungan antara ekspresi Bcl-2 dengan patogenesis kanker. Sehingga protein ini berpotensi dijadikan sebagai penanda prognosis. Untuk kanker leher rahim sendiri belum banyak penelitian yang menganalisis protein Bcl-2 ini sebagai penanda prognosis, terutama di Indonesia. Selain sebagai penanda, protein ini bisa dijadikan sebagai target bagi obat anti kanker baru. Sehingga akan memberikan terapi yang lebih baik bagi penderita.

Kanker leher rahim sebagian besar diderita oleh wanita-wanita di Negara-negara berkembang. Indonesia menjadi salah satu negara di Asia yang memiliki jumlah penderita kanker leher rahim terbesar. Diperlukan lebih banyak lagi penelitian mengenai kanker leher rahim dan penyebabnya yaitu HV tipe 16 dan 18, untuk membantu penurunan angka kejadian dan kematian di Indonesia. Selain itu, hal ini akan menjadi sumbangsih bagi perkembangan ilmu kedokteran atau bioteknologi di Indonesia sehingga menjadi sejajar dengan bangsa-bangsa lain yang telah lebih maju perkembangan teknologinya.

BAB 2

TARGET DAN LUARAN

Target dan luaran yang dihasilkan dari penelitian ini digambarkan melalui Tabel 1. Pada tabel ini diperlihatkan bahwa luaran yang dihasilkan dari penelitian ini berupa jurnal internasional bereputasi sebagai luaran wajib dan dihasilkan suatu hak cipta sebagai luaran tambahan. Tingkat TKT yang ditargetkan adalah TKT 2 pada tahun 2018 dan 3 pada 2019.

Tabel 1. Rencana target capaian tahunan penelitian.

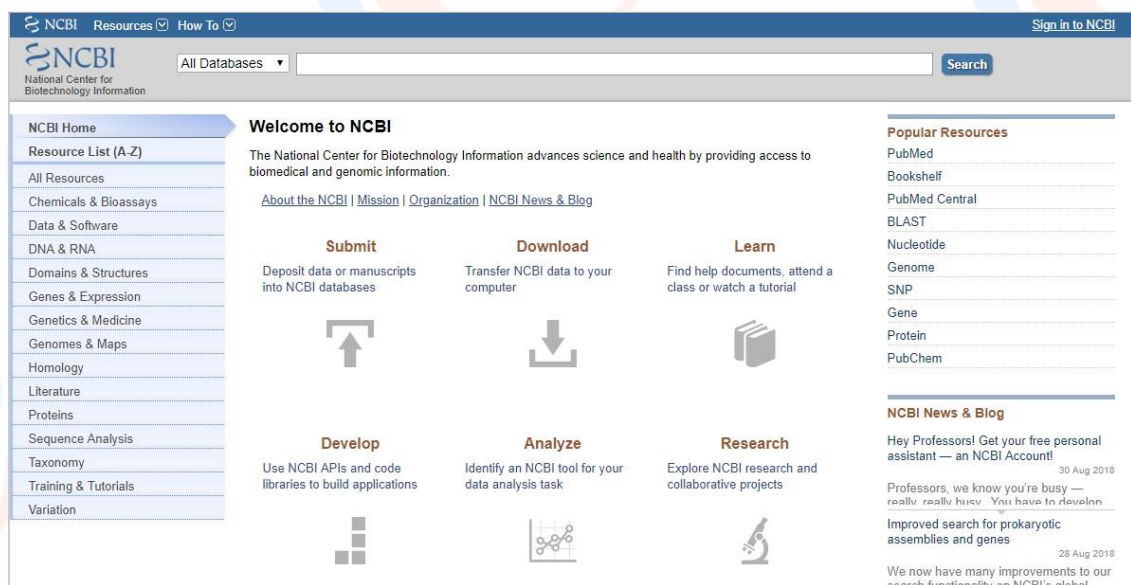
No.	Jenis luaran				Indikator Capaian	
	Kategori	Sub Kategori	Wajib	Tambahan	2018	2019
1	Artikel ilmiah dimuat di jurnal	Internasional bereputasi	√	-	<i>Draft</i>	<i>Submitted</i>
		Nasional Terakreditasi	-	-	Tidak ada	Tidak ada
2	Artikel ilmiah dimuat di prosiding	Internasional Terindeks	-	-	Tidak ada	Tidak ada
		Nasional	-	-	Tidak ada	Tidak ada
3	<i>Invited speaker</i> dalam temu ilmiah	Internasional	-	-	Tidak ada	Tidak ada
		Nasional	-	-	Tidak ada	Tidak ada
4	Visiting Lecturer	Internasional	-	-	Tidak ada	Tidak ada
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten	-	-	Tidak ada	Tidak ada
		Paten sederhana	-	-	Tidak ada	Tidak ada
		Hak cipta	-	√	<i>Submitted</i>	<i>Granted</i>
		Merk dagang	-	-	Tidak ada	Tidak ada
		Rahasia dagang	-	-	Tidak ada	Tidak ada
		Desain produk industri	-	-	Tidak ada	Tidak ada
		Indikasi geografis	-	-	Tidak ada	Tidak ada
		Perlindungan varietas tanaman	-	-	Tidak ada	Tidak ada
Perlindungan topografi sirkuit terpadu	-	-	Tidak ada	Tidak ada		
6	Teknologi Tepat Guna	-	-	Tidak ada	Tidak ada	
7	Model/purwarupa/desain/karya seni/rekayasa sosial	-	-	Tidak ada	Tidak ada	
8	Buku ajar (ISBN)	-	-	Tidak ada	Tidak ada	
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)	√	-	2	3	

BAB 3

METODE PELAKSANAAN

3.1 Desain primer Bcl-2

Primer merupakan nukleotida dengan panjang 1-24 pasang basa yang digunakan dalam mengawali proses pemanjangan pita DNA. Pada metode penggandaan/amplifikasi DNA berantai (*Polymerase Chain reaction/PCR*), primer digunakan untuk proses amplifikasi gen target. Beberapa kriteria diperlukan agar primer dapat dipakai dalam amplifikasi gen. Pertama, primer harus spesifik mengenali gen target. Artinya primer itu khusus untuk gen yang akan kita gandakan. Untuk mendapatkannya, kita harus mendesain primer unik berdasarkan database gen yang telah ada. Oleh karena itu, tahapan pertama yang dilakukan adalah mendesain primer Bcl-2. Primer ini akan digunakan untuk proses qPCR (*quantitative PCR*), beberapa ada yang menyebutnya dengan real time RT-PCR, yaitu suatu metode untuk menghitung tingkat ekspresi suatu gen berdasarkan proses penggandaan gen tersebut. Oleh karena penelitian ini akan menganalisis tingkat ekspresi gen Bcl-2, maka qPCR akan dilakukan untuk gen ini. Desain primer harus dilakukan berdasarkan database gen Bcl-2. Pada penelitian ini database yang diambil berasal dari National Center for Biotechnology Information (NCBI) yang bisa diakses melalui website <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Gambar 1).



Gambar 1. Laman muka dari National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Data dari NCBI merupakan salah satu database yang lengkap, yang memuat nuklotida, genom, sekuen gen, *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) dari beberapa makhluk hidup, baik prokariota maupun eukariota. Sekuen gen Bcl-2 yang didapatkan dari database ini merupakan gen Bcl-2 yang terdapat pada manusia (*Homo sapiens*). Sekuen yang didapatkan dari database

kemudian disejajarkan dengan perangkat lunak *Clustal W*, sehingga akan didapatkan sekuen konsensus. Sekuen kemudian disimpan dalam bentuk FASTA. Setelah itu dilakukan proses desain dengan software Primer-BLAST yang juga disediakan oleh NCBI (Gambar 2).

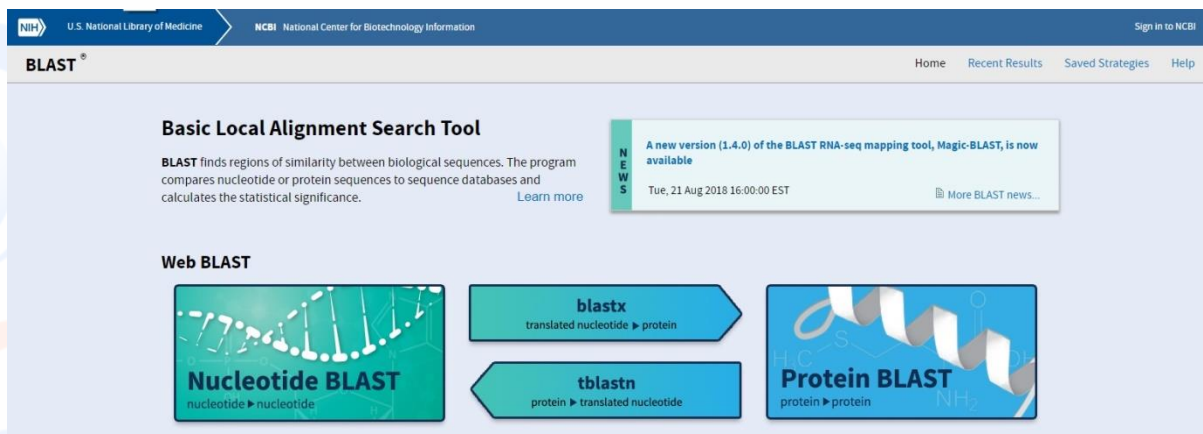
Gambar 2. Laman muka dari perangkat lunak Primer-BLAST

Pada Primer-BLAST ini dilakukan desain primer dengan Primer3 kemudian langsung dilanjutkan dengan BLAST untuk melihat spesifisitas dari primer yang berhasil didesain. Sekuen gen Bcl-2 yang telah kita dapatkan kemudian dimasukkan ke dalam software Primer-BLAST dalam bentuk fasta. Langkah selanjutnya tinggal menekan tombol “Get Primer” untuk mendapatkan primer-primer yang kita inginkan.

Setelah mendapatkan beberapa primer yang sesuai, dilakukan pemilihan berdasarkan kriteria tertentu. Selain spesifik, primer yang baik memenuhi beberapa kriteria tambahan seperti suhu T_m (*Melting Temperature*) antara primer di bagian *forward* tidak boleh lebih dari 5°C dengan primer bagian *reverse*. Selain itu juga terdapat %GC atau persentase sekuen GC antara 40-60%. Juga dipilih primer dengan sekuen yang tidak membentuk *primer dimer* juga *hairpin*.

Beberapa kandidat primer yang terpilih kemudian dibandingkan dengan sekuen-sekuen dari beberapa organisme untuk melihat apakah primer yang telah kita desain juga dapat mengenali sekuen gen dari organisme lain. Seandainya iya, hal tersebut menandakan bahwa primer kita tidak spesifik. Primer yang seperti ini tidak kita pilih untuk penelitian. Untuk membantu proses ini, digunakan software *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST). Karena yang akan dibandingkan adalah sekuen DNA, maka proses alignment (pensejajaran)

dilakukan dengan Nucleotide BLAST. Semuanya dilakukan bisa dilakukan dengan mengakses website <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Gambar 3).



Gambar 3. Laman muka perangkat lunak BLAST

Tingkat homologi primer yang didesain harus mendekati 100% dengan gen target kita, namun tidak dapat mengenali gen atau sekuen DNA yang lain. Setelah semua kriteria yang ditetapkan dapat terpenuhi oleh kandidat primer terpilih, barulah primer tersebut kita gunakan untuk proses real time RT PCR atau PCR konvensional.

3.2 Desain primer HPV 16 dan 18

Langkah-langkah yang dilakukan dalam desain primer kali ini sama dengan sebelumnya. Hanya saja sekuen-sekuen HPV 16 dan 18 yang digunakan dalam desain dipilih yang berasal dari kawasan Asia. Database sekuen HPV 16 dan 18 juga didapatkan dari NCBI. Primer HPV 16 dan 18 ini akan digunakan untuk proses PCR konvensional yang multiplex. Artinya di dalam satu reaksi akan digunakan 2 pasang primer untuk menghasilkan pita DNA spesifik. Hal ini memerlukan kriteria primer tertentu yang sedikit berbeda dengan primer yang digunakan dalam PCR konvensional. Dalam reaksi Multiplex PCR, perbedaan suhu T_m antara pasangan primer 1 dengan pasangan primer 2 tidak boleh lebih dari 5°C .

3.3 Optimasi Reaksi qPCR untuk Suhu Annealing

Optimasi merupakan langkah yang perlu dilakukan untuk mengetahui kondisi reaksi yang paling optimal untuk menghasilkan produk. Langkah-langkah yang dilakukan disesuaikan dengan rekomendasi dari perangkat real time PCR yang digunakan. Perangkat untuk proses real time PCR menggunakan *SensiFAST SYBR No-ROX One Step Kit* (Bioline, Kanada). Campuran reaksi yang dilakukan : 2x SensiFAST™ SYBR® No-ROX One-Step Mix = 10 ul, 10 uM Primer Forward = 0,8 ul, 10 uM Primer Reverse = 0,8 ul, Reverse Transcriptase = 0,2 ul, RiboSafe RNase Inhibitor = 0,4 ul, ddH₂O = 3,8 ul dan Template RNA = 4 ul.

Campuran reaksi ini dimasukkan ke dalam tabung 0,2 ul dan dicampurkan perlahan. Setelah itu tabung dimasukkan ke dalam mesin CFX Connect (BioRad, AS). Siklus suhu yang digunakan adalah 45°C selama 10 menit, 95°C selama 2 menit, 95°C selama 5 detik, gradasi suhu 55°C - 65°C selama 10 detik dan 72°C selama 5 detik. Hasil dari proses real time RT-PCR akan tampil selama reaksi berlangsung (*real time*).

3.4 Optimasi PCR Konvensional untuk Suhu Annealing

Proses PCR konvensional menggunakan perangkat reaksi *MyTaq HS DNA Polymerase* (Bioline, Kanada). Campuran reaksi menggunakan rekomendasi dari manufaktur dengan beberapa modifikasi. Campuran reaksi yang digunakan adalah 5x Taq Reaction Buffer = 5 ul, Primer HPV16 forward = 0,8 ul, primer HPV16 reverse = 0,8 ul, primer HPV18 = 0,8 ul, primer HPV18 = 0,8 ul, ddH₂O = 15,3 ul, MyTaq HS DNA polymerase = 0,5 ul dan template DNA = 1 ul. Campuran reaksi ini kemudian dimasukkan ke dalam thermal cycler (Labcyler 48, Sensoquest, Jerman) dengan siklus suhu 95°C selama 1 menit untuk denaturasi awal, dilanjutkan dengan suhu 95°C selama 15 detik untuk denaturasi lanjut, kemudian pada gradient suhu 55-65°C untuk *annealing*-nya selama 15 detik, dilanjutkan dengan proses elongasi pada suhu 72°C selama 15 detik untuk proses elongasi. Siklus suhu ini diulang hingga 30 kali. Hasil optimasi kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis agarosa. Konsentrasi agarosa yang digunakan adalah 1% dengan voltase 100V selama 25 menit. Pita DNA yang terbentuk dibandingkan dengan marker DNA 100 bp (Geneaid, Taiwan) Setelah itu, dilakukan pewarnaan pita DNA menggunakan Florosafe DNA Stain (1st BASE, Singapura) pada TAE 1x (Lonza, Swiss). Pewarnaan dilakukan selama 3 menit, sedangkan proses penghilangan warna non spesifik (*destaining*) dilakukan selama 30 menit. Hasil pewarnaan divisualisasikan dengan mesin dokumentasi gel (FireReader V10, Uvitec, Inggris) dan disimpan dalam bentuk *soft file*.

3.5 Isolasi DNA dari sel HeLa

Sel HeLa digunakan untuk proses isolasi DNA kali ini. Metode isolasi DNA dilakukan sesuai dengan rekomendasi dari manufaktur yang memproduksi perangkat isolasi DNA (*Quick DNA Miniprep Plus Kit*, Zymo Research, AS). Sel sebanyak $\pm 5 \times 10^6$ sel diendapkan (dibuat *pellet*) dengan sentrifugasi pada 1.000 xg selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang. Sel kemudian dicuci dengan larutan PBS 1x (1st BASE, Singapura) sebanyak 200 ul dan disentrifugasi pada 1.000 xg selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian juga dibuang. Larutan PBS sebanyak 200 ul kembali ditambahkan dan sel diresuspensi. Setelah itu ditambahkan 200 ul *BioFluid* dan *Cell Buffer* dan 20 ul Proteinase K, kemudian dicampurkan dengan cara vortex selama 10-15 detik. Setelah itu sel diinkubasi pada

suhu 55°C selama 5-10 menit agar proteinase K dapat bekerja. Langkah selanjutnya adalah menambahkan *Genomic Binding Buffer* dengan rasio volume 1:1, kemudian di-vortex selama 10-15 detik. Campuran larutan kemudian dipindahkan ke *Zymo Spin column IIC-XL* beserta collection tube-nya. Kolom kemudian disentrifugasi ≥ 12.000 xg selama 1 menit dan *flow through* yang terbentuk dibuang beserta collection tube. Tabung collection baru kemudian diletakkan bersama kolom. Larutan Pre Wash DNA buffer sebanyak 400 ul kemudian ditambahkan ke dalam kolom untuk mencuci DNA. Sentrifugasi dilakukan terhadap kolom pada kecepatan ≥ 12.000 xg selama 1 menit, *flow through* yang terbentuk dibuang. Setelah itu dilanjutkan dengan penambahan larutan gDNA Wash Buffer sebanyak 700 ul untuk mencuci DNA. Kolom kembali disentrifugasi pada ≥ 12.000 xg selama 1 menit, *flow through* yang terbentuk dibuang. Pencucian dengan gDNA Wash Buffer dilakukan kembali kali ini dengan volume 200 ul, *flow through* yang terbentuk kemudian dibuang beserta *collection tube*. Kolom dipindahkan ke tabung 1,5 ml yang baru. Larutan Elution buffer sebanyak 50 ul ditambahkan pada bagian tengah kolom sehingga dapat melarutkan semua DNA yang berhasil diisolasi. Setelah itu kolom diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Sentrifugasi kemudian dilakukan pada kecepatan tertinggi selama 1 menit. Molekul DNA hasil isolasi kemudian disimpan dan digunakan dalam optimasi PCR konvensional.

3.6 Isolasi RNA

Sel HeLa juga digunakan dalam isolasi RNA. Kegiatan ini menggunakan perangkat *Quick-RNA Miniprep Plus Kit* (Zymo Research, AS). Prosedur isolasi dilakukan sesuai rekomendasi dari manufaktur. Sebanyak $\pm 5 \times 10^6$ sel HeLa yang telah dikultur sebelumnya, dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml dan disentrifugasi pada kecepatan ≤ 500 xg selama 1 menit hingga terbentuk pelet sel. ditambahkan dengan 600 ul RNA Lysis Buffer. Larutan ini dicampurkan dengan cara vortexing selama 3 detik. Setelah itu, larutan dipindahkan ke Spin Away Filter dan disentrifugasi pada kecepatan 16.000 xg selama 1 menit. *Flow through* yang terbentuk kemudian diambil dan dicampurkan dengan etanol absolut dengan rasio volume 1:1 dengan up down pipetting. Setelah itu campuran dipindahkan ke dalam Zymo-Spin III CG Column dan dilakukan sentrifugasi pada 16.000 xg selama 1 menit. *Flow through* yang terbentuk kemudian dibuang. Setelah itu ditambahkan 500 ul RNA Wash Buffer ke dalam kolom dan disentrifugasi pada 16.000 xg selama 1 menit, kemudian *flow through* yang terbentuk dibuang. Sementara itu disiapkan campuran 5ul DNase I dan 75 ul Digestion Buffer, dimasukkan ke kolom dan diinkubasi pada 20-30°C selama 15 menit.

Protokol dilanjutkan dengan penambahan 400 ul RNA preparation buffer, dan dilakukan sentrifugasi pada 16.000 xg selama 1 menit. *Flow through* yang terbentuk kemudian dibuang, Larutan RNA Wash buffer kemudian ditambahkan sebanyak 700 ul ke dalam kolom dan disentrifugasi pada 16.000 xg selama 1 menit. *Flow through* yang terbentuk dibuang. Langkah pencucian diulangi kembali dengan volume 400 ul dengan cara yang sama. Langkah terakhir yaitu elusi RNA dengan menambahkan 100 ul DNA/RNase *free water* ke dalam kolom yang sudah diletakkan pada microtube 1,5 ul. Kolom disentrifugasi pada 16.000 xg selama 1 menit. Molekul RNA hasil isolasi disimpan pada -20°C dan digunakan dalam optimasi real time RT-PCR untuk *suhu annealing*.

BAB 4

KELAYAKAN PERGURUAN TINGGI

Universitas Esa Unggul merupakan institusi perguruan tinggi yang memiliki perhatian besar dalam bidang penelitian, selain bidang pengajaran yang menjadi kegiatan utama. Setiap tahun Universitas Esa Unggul mengirimkan proposal penelitian ke beberapa institusi yang menyelenggarakan hibah penelitian, termasuk juga diantaranya yang diselenggarakan oleh Kementerian Riset, Teknologi dan Perguruan Tinggi.

Saat ini, Universitas Esa Unggul termasuk dalam Kelompok Perguruan Tinggi Kelas Madya. Hal ini berarti bahwa institusi ini dapat mengelola dana hibah yang diberikan oleh Kemristekdikti melalui Skema Hibah Desentralisasi. Hal ini juga membuktikan komitmen institusi untuk terus mendorong adanya iklim penelitian yang kondusif, baik bagi dosen maupun mahasiswa.

Pada Pembukaan Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Tahun 2017 yang diadakan oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Dirjen Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi dan Perguruan Tinggi, Universitas Esa Unggul berhasil mendapatkan 88 proposal hibah penelitian yang didanai melalui beberapa skema, yaitu PDP, PDUPT, PTUPT dan PSNI. Jumlah ini merupakan yang tertinggi di antara universitas-universitas lain yang termasuk dalam wilayah LLDikti III (dulu Kopertis III). Hal ini tentu membanggakan namun di lain pihak menuntut kerja keras institusi untuk mempertahankan hal yang sama di tahun-tahun yang akan datang.

Selain beberapa kebijakan Universitas untuk mendukung iklim penelitian, institusi juga melengkapi dengan laboratorium-laboratorium yang diperlukan untuk kegiatan penelitian. Seperti Laboratorium Terpadu untuk menampung penelitian-penelitian di bidang kesehatan dan ilmu hayati, laboratorium computer dan keperawatan. Hal-hal inilah yang menjadikan Universitas Esa Unggul sangat cocok untuk melakukan riset dengan kualitas baik.

BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Persetujuan Etik Penelitian

Penelitian ini akan mengikutsertakan subyek manusia, sehingga diperlukan diperlukan kajian etik penelitian oleh Komite Etik Penelitian. Hal ini dilakukan untuk melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian. Oleh karena itu, peneliti berinisiatif untuk mengajukan Permohonan Kaji Etik kepada Komite Etik di tempat pengambilan sampel penelitian akan dilakukan. Pada awalnya, peneliti bermaksud akan mengambil sampel penelitian di RS Kanker Dharmais, Jakarta. Proses pengajuan penelitian dimulai sejak Januari 2018 dengan melakukan komunikasi dengan klinisi dan bagian Penelitian RS Kanker Dharmais. Namun, karena dirasakan proses birokrasi yang cukup panjang, akhirnya tim peneliti memutuskan untuk mengalihkan tempat penelitian di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo. Departemen yang akan dituju adalah di Departemen Medik Kebidanan dan Kandungan. Oleh karena itu sejak pertengahan bulan April 2018 mulai dilakukan diskusi dengan klinisi pada Departemen Medik Kebidanan dan Kandungan. Selain itu juga dimulai persiapan untuk permohonan kaji etik pada Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan Bagian Penelitian Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo.

Setelah melakukan beberapa kali diskusi dengan tim peneliti dan klinisi, maka sebulan kemudian Permohonan Kaji Etik Penelitian dikirimkan secara online, diikuti dengan pengiriman berkas kepada Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Tim peneliti selalu memperbaiki informasi ke bagian pendaftaran kaji etik untuk terus mengetahui perkembangan persetujuan etik. Dalam proses ini tim peneliti juga diminta melengkapi persyaratan yang masih kurang.

Pada bulan Agustus 2018, Keterangan Lolos Kaji Etik untuk penelitian ini dikeluarkan oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Indonesia dengan nomor 0688/UN2.F1/ETIK/2018 (Lampiran). Dengan surat ini maka tim peneliti telah disetujui untuk mengambil sampel dari subyek penelitian.

Langkah selanjutnya adalah meminta perijinan penelitian di RSCM melalui bagian Penelitian RSCM. Hingga saat ini, tim peneliti telah memasukkan semua persyaratan yang diperlukan ke bagian Penelitian RSCM. Terdapat permintaan perbaikan *Informed Consent* yang akan diberikan kepada calon subyek. Saat ini tim peneliti sedang melakukan perbaikan yang diminta.

5.2 Desain Primer Bcl-2

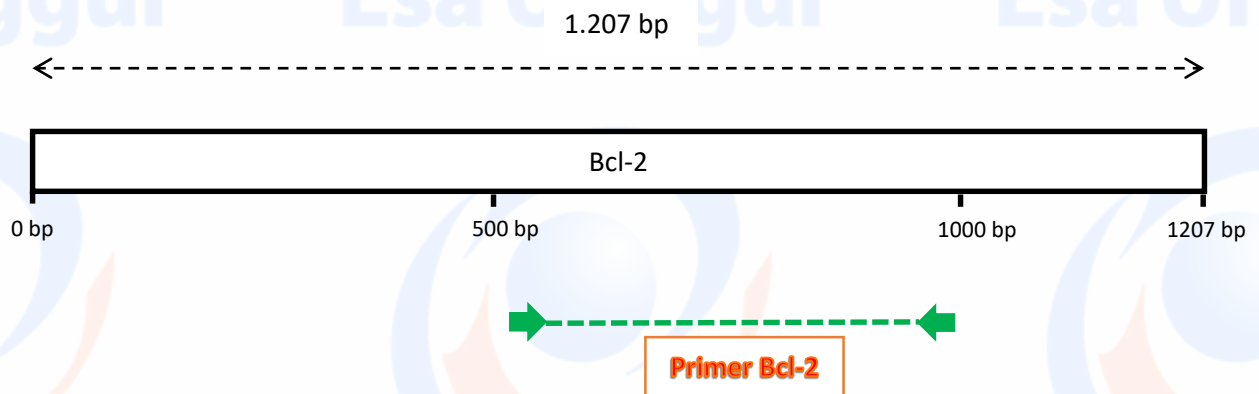
Primer didesain berdasarkan database yang ada pada National Center for Biotechnology Information melalui situs www.ncbi.nlm.nih.gov. serta dianalisa menggunakan software Primer-BLAST didapatkan 10 kandidat primer, sedangkan dengan software Primer Quest Tools didapatkan 5 kandidat primer yang bisa digunakan untuk proses real time RT PCR. Dari kelimabelas kandidat primer ini diseleksi kembali. berdasarkan suhu T_m , %GC dan banyaknya sekuen yang berkomplemen di daerah 3'. Hal terakhir juga merupakan kriteria yang harus dipertimbangkan. Karena bagian 3' merupakan daerah pemanjangan pita DNA, sehingga jika terdapat pasangan primer yang banyak mengenali sekuen antar mereka sendiri pada daerah ini maka pita DNA untai ganda akan sulit terbentuk. Justru mereka akan membentuk primer dimer, suatu istilah dimana pasangan primer akan membentuk DNA untai antar mereka sendiri. Tentu hal ini tidak diinginkan

Setelah diseleksi, didapatkan 1 pasang primer yang potensial untuk digunakan dalam reaksi qPCR nantinya. Karakteristik primer Bcl-2 terpilih diperlihatkan pada tabel 2.

Tabel 2. Pasangan primer Bcl-2

	Primer	T_m	%GC	Self 3'Complementary
Forward	CTGGGAGAACGGGTACGAT	61,4	60	2
Reverse	GACCCACCGAACTCAAAGA	59,6	55	1

Sedangkan posisi relatif dari pasangan primer ini dibandingkan gen Bcl-2 diperlihatkan pada Gambar 4. Panjang pita DNA yang nanti dihasilkan adalah sebesar 458 bp.



Gambar 4. Posisi relatif primer Bcl-2 terhadap gen Bcl-2

Pengujian terhadap primer terpilih masih dilanjutkan untuk mengetahui spesifisitas primer terhadap gen target. Apakah primer yang kita pilih hanya mengenali gen target yang kita inginkan atau juga dapat mengenali sekuen gen lain yang tidak kita inginkan. Tentu saja

diperlukan primer yang hanya mengenali gen target atau primer spesifik. Oleh karena itu digunakan salah satu perangkat lunak yang dapat membantu, yaitu Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Perangkat lunak ini disediakan oleh NCBI di dalam situsnya. Hasil BLAST-ing dari primer yang didapatkan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Perbandingan Primer Bcl-2 dengan Beberapa Sekuen DNA

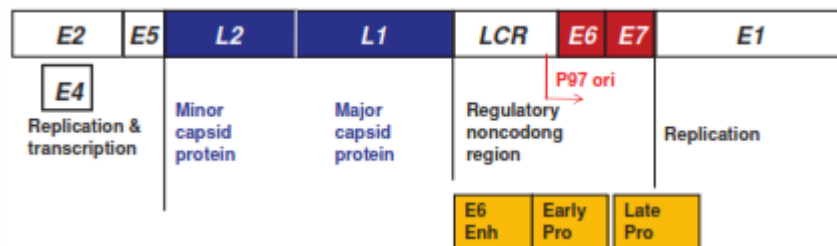
Primer	No. Akses	Sekuen	Tingkat Kesamaan	E-value
CTGGGAGAACGGGGTACGAT	KY098818.1	Homo sapiens isolate PB605 BCL2 (BCL2) gene, exon 2 and partial cds	100%	0,017
	KY098817.1	Homo sapiens isolate EP103 BCL2 (BCL2) gene, exon 2 and partial cds	100%	0,017
	KY098814.1	Homo sapiens isolate CB204 BCL2 (BCL2) gene, exon 2 and partial cds	100%	0,017
	KY098799.1	Homo sapiens isolate SV117 BCL2 (BCL2) gene, exon 2 and partial cds	100%	0,017
	KY098796.1	Homo sapiens isolate SV114 BCL2 (BCL2) gene, exon 2 and partial cds	100%	0,017
GACCCACCGAACTCAAAGA	KY098818.1	Homo sapiens isolate PB605 BCL2 (BCL2) gene, exon 2 and partial cds	100%	0,017
	KY098817.1	Homo sapiens isolate EP103 BCL2 (BCL2) gene, exon 2 and partial cds	100%	0,017
	KY098816.1	Homo sapiens isolate CB210 BCL2 (BCL2) gene, exon 2 and partial cds	100%	0,017
	KY098815.1	Homo sapiens isolate CB205 BCL2 (BCL2) gene, exon 2 and partial cds	100%	0,017
	KY098814.1	Homo sapiens isolate CB204 BCL2 (BCL2) gene, exon 2 and partial cds	100%	0,017

Dari hasil BLAST-ing terlihat bahwa primer terpilih hanya mengenali gen Bcl-2 yang berasal dari manusia dengan tingkat kesamaan 100%. Hal ini menunjukkan bahwa primer terpilih merupakan primer yang spesifik. Sehingga akan digunakan dalam proses qPCR.

5.3 Desain Primer HPV 16 dan 18

Untuk deteksi ada tidaknya DNA HPV 16 atau 18 dalam sampel, maka dilakukan PCR konvensional menggunakan primer HPV 16 atau 18. Jenis PCR yang akan digunakan adalah multiplex PCR, artinya dalam satu kali reaksi akan dilakukan deteksi HPV 16 dan 18 sekaligus. Sehingga sampel pasien akan diketahui apakah memiliki DNA HPV 16 atau 18 dalam satu kali reaksi. Hal ini akan meminimalisasi biaya dan tenaga yang dibutuhkan dibandingkan dengan menganalisis adanya pita DNA HPV 16 atau 18 secara sendiri-sendiri. Oleh karena itu perlu desain primer yang sesuai untuk kebutuhan ini.

Gen yang dipilih dalam proses deteksi DNA HPV ini adalah gen L1. Gen ini merupakan salah satu gen yang terdapat dalam genom HPV 16 dan 18 (Gambar 5).



Gambar 5. Organisasi genom Human Papillomavirus (HPV) (22)

Telah diketahui bahwa gen L1 merupakan gen yang menyandi protein kapsid HPV. Protein kapsid merupakan protein terluar pada struktur virus HPV dan digunakan sebagai target dalam pembentukan vaksin terhadap HPV. Protein ini dapat menstimulasi produksi antibodi dengan titer yang tinggi (23). Gen ini juga sering digunakan dalam deteksi HPV 16 atau 1 pada pasien, dikarenakan sekuennya yang cenderung lestari (tidak banyak mutasi) (24).

Pada penelitian kali ini, desain primer dilakukan sama seperti pada desain primer Bcl-2, dengan menggunakan perangkat lunak Primer-BLAST. Pada awalnya didapatkan beberapa database gen L1. Kemudian setelah dianalisis dengan perangkat lunak BioEdit akhirnya didapatkan sekuen konsensus gen L1 untuk HPV 16 dan HPV 18. Konsensus gen adalah sekuen gen yang didapatkan dari membandingkan beberapa database. Konsensus gen yang dipilih pada daerah yang paling lestari pada gen tersebut.

Didapatkan 10 kandidat primer L1 untuk HPV 16 dan 18. Proses seleksi selanjutnya mirip dengan primer Bcl-2, mempertimbangkan beberapa kriteria. Pada akhirnya terdapat 1

pasang primer L1 untuk HPV 16 dan 1 pasang primer L1 untuk HPV 18. Kriteria primer-primer tersebut dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5.

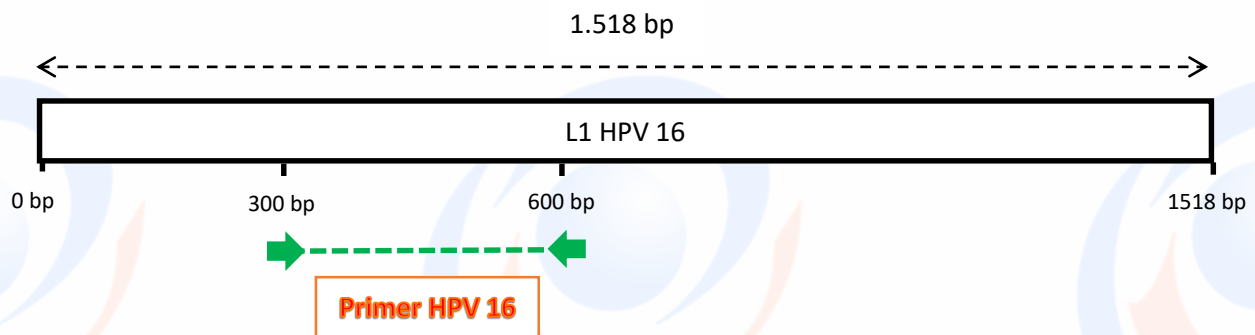
Tabel 4. Pasangan primer HPV 16 yang berhasil didesain

	Primer HPV 16	Tm	%GC	Self 3'Complementary
Forward	TTGGGCCTGTGTAGGTGTT	59,45	50	0
Reverse	AGTCCATAGCACCAAAGCCA	59,3	50	0

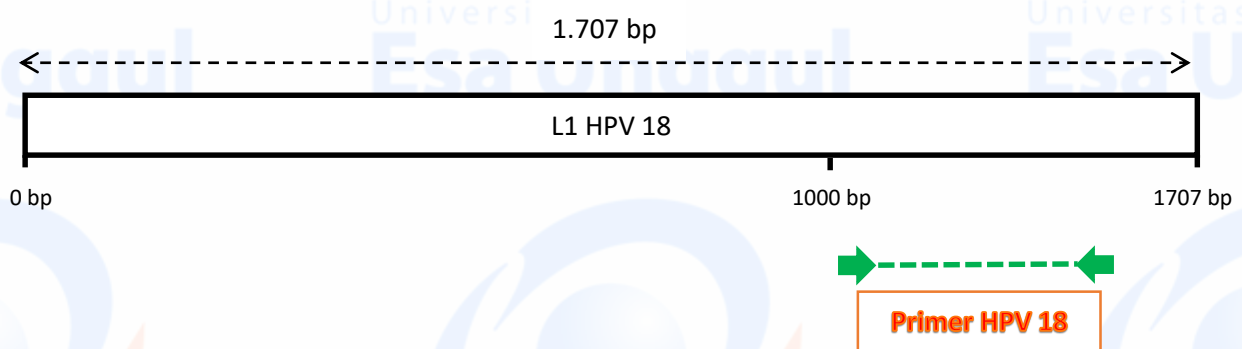
Tabel 5. Pasangan primer HPV 18 yang berhasil didesain

	Primer HPV 18	Tm	%GC	Self 3'Complementary
Forward	TTCTCCCTCTCCAAGTGGCT	60,18	55	1
Reverse	CACACGCTTGGCAGGTTTAG	59,76	55	0

Posisi relatif masing-masing primer terhadap gen L1 dapat dilihat pada gambar 6 dan 7.



Gambar 6. Posisi relatif primer HPV 16 terhadap gen L1



Gambar 7. Posisi relatif primer HPV 18 terhadap gen L1

Primer-primer ini kemudian dianalisis spesifisitasnya dengan perangkat lunak BLAST pada situs NCBI. Hasil analisis dapat dilihat pada tabel 6 dan 7.

Tabel 6. Hasil analisis spesifisitas pasangan primer HPV 16 dengan perangkat lunak BLAST

Primer HPV 16	No. Akses	Sekuen	Tingkat Kesamaan	E-value
TTTGGGCCTGTGTAGGTGTT	KY994539.1	Human papillomavirus type 16 isolate HN-LU-SCC-26, complete genome	100%	0,032
	LC368997.1	Human papillomavirus type 16 TK111 genomic DNA, complete genome	100%	0,032
	LC368996.1	Human papillomavirus type 16 TK138 genomic DNA, complete genome	100%	0,032
	LC368995.1	Human papillomavirus type 16 TK133 genomic DNA, complete genome	100%	0,032
	LC368994.1	Human papillomavirus type 16 TK121 genomic DNA, complete genome	100%	0,032
AGTCCATAGCACCAAAGCCA	KY994539.1	Human papillomavirus type 16 isolate HN-LU-SCC-26, complete genome	100%	0,032
	LC368997.1	Human papillomavirus type 16 TK111 genomic DNA, complete genome	100%	0,032
	LC368996.1	Human papillomavirus type 16 TK138 genomic DNA, complete genome	100%	0,032
	LC368995.1	Human papillomavirus type 16 TK133 genomic DNA, complete genome	100%	0,032
	LC368994.1	Human papillomavirus type 16 TK121 genomic DNA, complete genome	100%	0,032

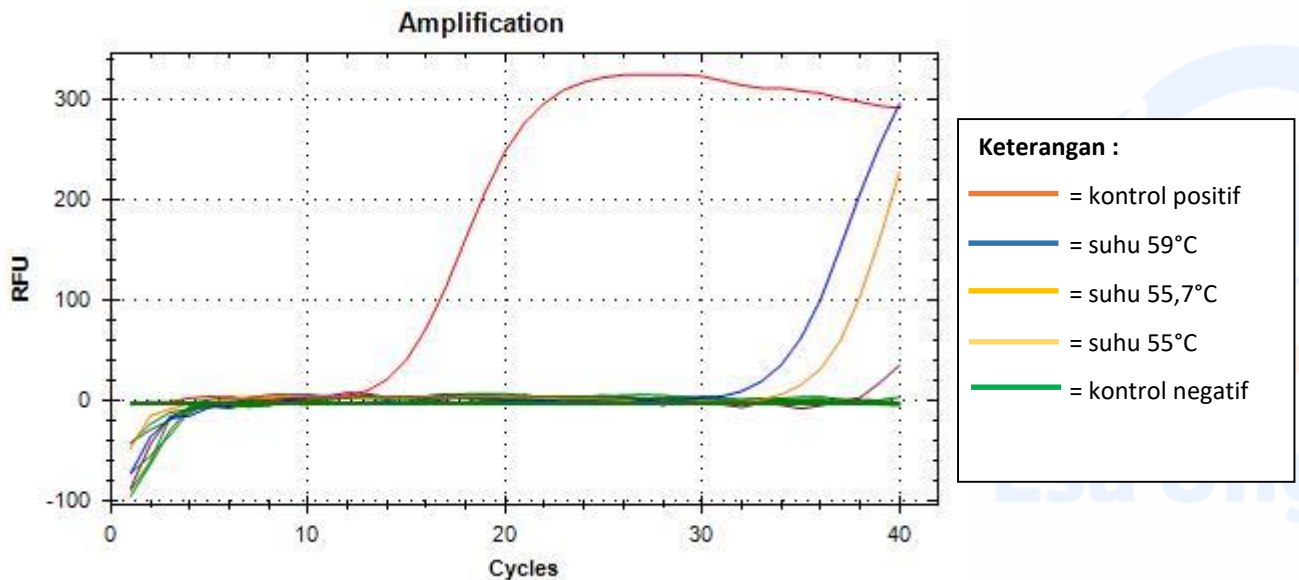
Tabel 7. Hasil analisis spesifisitas pasangan primer HPV 18 dengan perangkat lunak BLAST

Primer HPV 18	No. Akses	Sekuen	Tingkat Kesamaan	E-value
TTCTCCCTCTCCAAGTGGCT	MH196519.1	Human papillomavirus type 18 isolate T52 E4, E5, L2, and L1 genes, complete cds	100%	0,032
	MH196518.1	Human papillomavirus type 18 isolate T5 L1 gene, partial cds; E6 and E7 genes, complete cds; and E1 gene,	100%	0,032
	MF288727.1	Human papillomavirus type 18 isolate 1494573_N-P, complete genome	100%	0,032
	MF288726.1	Human papillomavirus type 18 isolate 1314304_N-P, complete genome	100%	0,032
	MF288725.1	Human papillomavirus type 18 isolate C451606_R3_1915584_(100w), complete genome	100%	0,032
AGTCCATAGCACCAAAGCCA	MH196519.1	Human papillomavirus type 18 isolate T52 E4, E5, L2, and L1 genes, complete cds	100%	0,032
	MH196518.1	Human papillomavirus type 18 isolate T5 L1 gene, partial cds; E6 and E7 genes, complete cds; and E1 gene,	100%	0,032
	MF288727.1	Human papillomavirus type 18 isolate 1494573_N-P, complete genome	100%	0,032
	MF288726.1	Human papillomavirus type 18 isolate 1314304_N-P, complete genome	100%	0,032
	MF288725.1	Human papillomavirus type 18 isolate C451606_R3_1915584_(100w), complete genome	100%	0,032

Dari hasil analisis terlihat bahwa primer 16 dan 18 cukup spesifik mengenali sekuen pada HPV 16 dan 18. Primer ini dapat digunakan untuk deteksi HPV 16 dan 18 dengan metode PCR konvensional.

5.4 Optimasi suhu annealing untuk real time RT PCR

Optimasi suhu *annealing* (penempelan) pada suatu reaksi RT-PCR diperlukan untuk mengetahui pada suhu berapakah primer dapat menempel pada RNA cetakan. Hal ini penting dilakukan dikarenakan untuk proses pembentukan pita DNA baru, primer harus dapat mengenali sekuen gen target dan juga dapat menempel pada sekuen tersebut. Apabila tidak dapat menempel, maka pembentukan pita DNA baru tidak dapat terbentuk. Proses penempelan ini dipengaruhi oleh suhu. Pada umumnya proses penempelan primer akan lebih mudah dilakukan pada suhu yang rendah. Namun, hal ini belum tentu terjadi, disesuaikan dengan desain masing-masing primer. Oleh karena itu, sebelum melakukan reaksi RT PCR pada sampel, umumnya dilakukan proses optimasi suhu *annealing* untuk mengetahui secara persis berapa suhu yang diperlukan oleh primer sehingga dapat menempel pada gen target. Hasil yang didapatkan pada optimasi kali ini dapat dilihat pada gambar



Gambar 8. Hasil optimasi suhu annealing reaksi qPCR

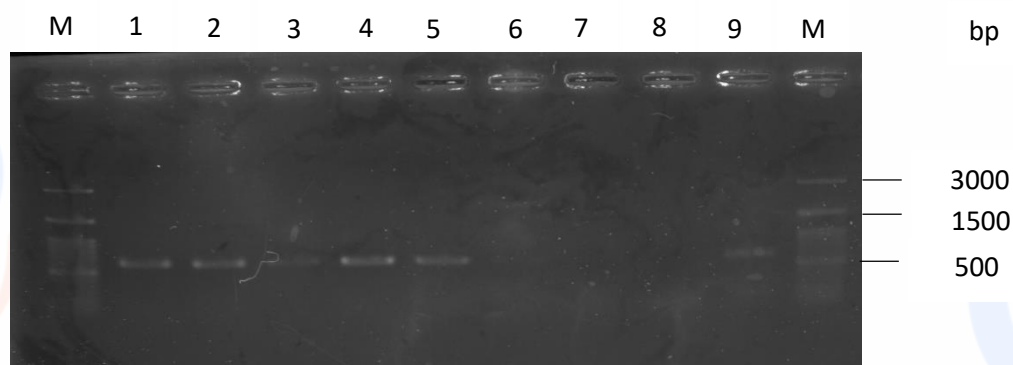
Pada hasil optimasi dengan suhu gradient terlihat bahwa kontrol positif berupa gen 18S teramplifikasi pada sekitar siklus ke-12, sedangkan gen Bcl-2 dapat teramplifikasi di atas siklus 30 (siklus ke-32-38). Hal ini bisa berarti bahwa mRNA yang dijadikan cetakan (template) untuk reaksi qPCR konsentrasinya tidak terlalu tinggi. Bisa diasumsikan bahwa isolasi RNA yang dilakukan hanya menghasilkan mRNA yang sedikit. Oleh karena itu, pada tahap selanjutnya akan dilakukan optimasi efektivitas reaksi dengan menggunakan metode two step RT PCR, sehingga diharapkan hasil qPCR akan lebih baik dan tidak bias.

Selain itu, dari hasil optimasi ini terlihat bahwa reaksi tidak mengalami kontaminasi. Hal ini terlihat dari adanya kontrol negatif yang tidak menghasilkan pita DNA baru, pada gambar hanya terlihat garis berwarna hijau yang stagnan sampai akhir siklus.

Ketika reaksi dilakukan pada suhu 59°C, amplifikasi DNA mulai terlihat pada sekitar siklus ke-31. Sedangkan pada reaksi dengan suhu 55,7°C dan 55°C mulai terlihat amplifikasi pada sekitar siklus ke 34 dan 38. Pada suhu 59°C amplifikasi lebih cepat dilakukan, sehingga suhu inilah yang menjadi suhu optimal untuk proses *annealing* dari primer yang digunakan.

5.5 Optimasi Reaksi PCR Konvensional untuk Suhu Annealing

Optimasi suhu annealing juga dilakukan pada reaksi PCR konvensional untuk deteksi HPV 16 dan 18. Tujuannya sama, yaitu untuk mengetahui pada suhu berapakah primer dapat menempel pada DNA cetakan. Hasil optimasi dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Hasil optimasi suhu annealing reaksi PCR konvensional

Keterangan :

M = marker 100 bp

- 1 = suhu annealing 55°C
- 2 = suhu annealing 56,9°C
- 3 = suhu annealing 61,1°C
- 4 = suhu annealing 58,9°C
- 5 = suhu annealing 63,1°C
- 6 = suhu annealing 64,5°C

7 = suhu annealing 65°C

8 = kontrol negatif

9 = suhu annealing 56,9°C

Pada hasil di atas memperlihatkan bahwa reaksi tidak terkontaminasi. Hal ini terlihat tidak terdapatnya pita DNA pada tabung kontrol negatif. Molekul DNA cetakan merupakan DNA yang diisolasi dari sel HeLa. Molekul DNA dari sel ini diketahui memiliki sisipan DNA HPV18 (25-26) sehingga dapat digunakan sebagai cetakan. Besarnya DNA target adalah 631 bp sesuai dengan primer yang digunakan. Hasil yang didapat dari hasil elektroforesis memperlihatkan adanya pita DNA yang sejajar dengan penanda DNA antara 500 bp dan 600 bp. Diasumsikan bahwa gen L1 dari HPV 18 berhasil didapatkan. Tebalnya pita DNA hasil PCR bervariasi

tergantung dari suhu annealing yang digunakan. Pita DNA yang paling tebal terlihat pada reaksi dengan suhu annealing sekitar 59°C. Pita DNA tidak teramplifikasi pada suhu 61-65°C. Disimpulkan bahwa suhu annealing yang paling optimal adalah sekitar 59°C. Selain itu, primer yang digunakan cukup spesifik mengenali HPV 18. Hal ini terlihat adanya pita DNA tunggal hasil amplifikasi.

5.6 Luaran Penelitian

1. Hasil penelitian telah didaftarkan ke Genomic, Proteomic and Bioinformatic (Elsevier BV) pada tanggal 31 Oktober 2018 (lampiran 2a). Namun mengalami penolakan sehingga pada tanggal 6 November didaftarkan kembali pada jurnal Bioinformatics and Biology Insights (Libertas Academica) dengan no.manuskrip BBI-2018-0033 (Lampiran 2b). Sekarang sedang dalam masa review.
2. Sebagian hasil penelitian diterima untuk dipresentasikan dalam Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas yang diselenggarakan pada tanggal 3 November 2018 di Solo, Jawa Tengah (Lampiran 3 dan 4).
3. Mendapatkan Surat Pencacatan Hak Cipta No. 000122210 dari Kemenkumham RI (Lampiran 5).
4. Hasil penelitian akan dimasukkan sebagai bahan ajar dalam Mata Kuliah Pengantar Bioinformatika pada institusi.

BAB 6

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Setelah melakukan beberapa kegiatan sampai akhir tahun 2018 ini, maka peneliti akan melanjutkan beberapa rencana kegiatan berikutnya :

6.1 Pengambilan sampel penelitian dari pasien

Surat Keterangan Lolos Kaji Etik dari Komite Etik Penelitian-FKUI merupakan modal besar untuk dapat melakukan proses pengambilan sampel pada sampel pasien. Kegiatan selanjutnya adalah pemohonan ijin kepada Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo untuk proses pengambilan sampel yang akan dilakukan pada Departemen Medik Kebidanan dan Kandungan. Perijinan dilakukan melalui Bagian Penelitian RSCM. Perkembangan terakhir, peneliti perlu memperbaiki informed consent sebelum melakukan pengambilan sampel. Rencana berikutnya adalah mendapatkan ijin untuk melakukan penelitian dari RSCM serta memulai pengambilan sampel pada pasien.

6.2 Uji efektivitas primer Bcl-2

Selain optimasi pada suhu annealing dalam proses qPCR, dilakukan uji efektivitas primer yang digunakan dalam reaksi ini. Hal ini sangat diperlukan dalam analisis tingkat ekspresi gen. Dalam suatu reaksi qPCR sangat mungkin mendapatkan konsentrasi RNA cetakan/template yang berbeda-beda. Hal ini tentu saja dapat mengakibatkan hasil yang didapatkan dari reaksi qPCR menjadi bias. Hal ini tentu sangat dihindari mengingat akan dilakukan penghitungan tingkat ekspresi gen. Oleh karena itu diperlukan metode standarisasi dalam reaksi qPCR. Analisis efektivitas primer ini dilakukan untuk melihat apakah reaksi dapat dilakukan dengan konsentrasi DNA cetakan yang berbeda-beda dibandingkan dengan kontrol positif.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Sampai akhir tahun 2018 telah berhasil dilakukan beberapa kegiatan antara lain :

1. Berhasil mendapatkan lolos kaji etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan-FKUI dengan nomor 0688/UN2.F1/ETIK/2018.
2. Berhasil dilakukan desain primer Bcl-2 yang dilakukan dengan beberapa perangkat lunak.
3. Berhasil dilakukan desain primer untuk HPV 16 dan 18 yang akan digunakan dalam deteksi DNA HPV 16 dan 18 menggunakan metode PCR multipleks.
4. Berhasil dilakukan optimasi suhu annealing reaksi qPCR menggunakan primer Bcl-2.
5. Berhasil dilakukan optimasi suhu annealing reaksi PCR multipleks menggunakan primer HPV 16 dan 18.
6. Hasil penelitian telah didaftarkan ke jurnal internasional bereputasi untuk dapat dipublikasikan.
7. Telah mendapatkan surat pencatatan Hak Cipta dari Kemenkumham dengan No. 000122210.
8. Hasil penelitian telah dipresentasikan secara oral pada Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas tanggal 3 November 2018 di Solo, Jawa Tengah.
9. Hasil penelitian akan dimasukkan sebagai bahan ajar pada Mata Kuliah Pengantar Bioinformatika.

7.2 Saran

Dikarenakan cukup panjangnya birokrasi penelitian kesehatan, perlu persiapan penelitian yang cukup lama.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer Key facts How HPV infection leads to cervical cancer. 2018.
2. Burd E. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2003;16(1):1–17. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673607614160>
3. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(1):11–22.
4. World HPV Information Center. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. *HPV Inf Cent Rep*. 2017;(Indonesia):60.
5. Pusat Data dan Informasi. Situasi Penyakit Kanker. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2015. 1-35 p.
6. Kemenkes RI. Panduan Penatalaksanaan Kanker serviks. Jakarta: Kemkes RI; 1-36 p.
7. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. 2008;27(50):6398–406.
8. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):47–59.
9. Eimani B., Sanati M., Houshmand M, Ataei M, Akbarian F, Shakhssalim N. Expression and Prognostic Significance of Bcl-2 and Bax in The Progression and Clinical Outcome of Translational Bladder Cell Carcinoma. *Cell J*. 2014;15(4):356–64.
10. Noordhuis MG, Eijssink JJH, Roossink F, De Graeff P, Pras E, Schuurung E, et al. Prognostic cell biological markers in cervical cancer patients primarily treated with (Chemo)radiation: A systematic review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;79(2):325–34.
11. Garcia-Saez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ*. 2012;19(11):1733–40.
12. Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* [Internet]. 2011;18(9):1414–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2011.17>
13. Cory S, Roberts AW, Colman PM, Adams JM. Targeting BCL-2-like Proteins to Kill Cancer Cells. *Trends in Cancer* [Internet]. 2016;2(8):443–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2016.07.001>
14. Eom YH, Kim HS, Lee A, Song BJ, Chae BJ. Breast Cancer BCL2 as a Subtype-Specific Prognostic Marker for Breast Cancer. 2016;19(3):252–60.

15. Honma N, Horii R, Ito Y, Saji S, Younes M, Iwase T, et al. Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. *BMC Cancer* [Internet]. 2015;15(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1686-y>
16. Anagnostou V, Lowery F, Zolota V, Tzelepi V, Gopinath A, Liceaga C, et al. High expression of BCL-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non squamous histology. *BMC Cancer* [Internet]. 2010;10(1):186. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/186>
17. Tirapelli LF, Bolini PHNA, Tirapelli DPDC, Peria FM, Becker ANP, Saggiaro FP, et al. Caspase-3 and Bcl-2 expression in glioblastoma: an immunohistochemical study. *Arq Neuropsiquiatr*. 2010;68(December 2009):603–7.
18. Qiu B, Wang Y, Tao J, Wang Y. Expression and correlation of Bcl-2 with pathological grades in human glioma stem cells. *Oncol Rep*. 2012;28(1):155–60.
19. Kamaraddi S, U AN, Honnappa S, Swarup A. Expression of Bcl-2 marker in premalignant lesions of cervical cancer. 2016;5(4):965–9.
20. Saegusa M, Takano Y, Hashimura M, Shoji Y, Okayasu I. The possible role of Bcl-2 expression of tumors of the uterine cervix. *Cancer*. 1995;76(11):2297–303.
21. Pujani M, Shukla S, Dass J. P53 and Bcl2 Expression in Malignant and Premalignant Lesions of Uterine Cervix and Their Correlation With Human Papilloma Virus 16 and 18. *South Asian J Cancer* [Internet]. 2014;3(1):48. Available from: <http://journal.sajc.org/text.asp?2014/3/1/48/126524>
22. Park I-S, Chang X, Loyo M, Wu G, Chuang A, Kim MS, et al. Characterization of the Methylation Patterns in Human Papillomavirus Type 16 Viral DNA in Head and Neck Cancers. *Cancer Prev Res* [Internet]. 2011;4(2):207–17. Available from: <http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0147>
23. 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).
24. Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology* [Internet]. 2012;9(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-262>
25. Badal S, Badal V, Calleja-Macias IE, Kalantari M, Chuang LSH, Li BFL, et al. The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology*. 2004;324(2):483–92.

26. Xiao C-Y, Fu B-B, Li Z-Y, Mushtaq G, Kamal MA, Li J-H, et al. Observations on the expression of human papillomavirus major capsid protein in HeLa cells. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2015;15(1):53. Available from: <http://www.cancer-ci.com/content/15/1/53>

Lampiran

Lampiran 1. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik



UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO.Box 1358
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,
3922977, 3927360, 3153236
F. 62.21.3912477, 31930372, 3157288
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fk.ui.ac.id

Nomor : 0688 /UN2.F1/ETIK/2018

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berikut informasi yang diberikan kepada calon subjek yang berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol including the information given to the potential subjects entitled:

"Analisa Protein Bcl-2 sebagai Penanda Prognosis (Prognosis Marker) Kanker Leher Rahim dari Infeksi Human Papilloma Virus Tipe 16 dan 18 di Indonesia".

No. protokol: 18-07-0774

Peneliti Utama
Principal Investigator

: **Aroem Naroeni, DEA., PhD**

Nama Institusi
Name of the Institution

: **Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi-FKUI**

dan telah menyetujui protokol berikut informasi yang diberikan kepada calon subjek.
and approves the above mentioned protocol including the information given to the potential subjects.



16 JUL 2018

Ketua
Chairman

Prof. dr. Rita Sita Sitorus, SpM(K), PhD

* *Ethical approval* berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.

** Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.
2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical approval* harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan.
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*).
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum protokol penelitian mendapat lolos kaji etik dan sebelum memperoleh *informed consent* dari subyek penelitian.
5. Menyampaikan laporan akhir, bila penelitian sudah selesai.
6. Cantumkan nomor protokol ID pada setiap komunikasi dengan KEPK FKUI-RSCM.

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.
All procedure of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 2a. Bukti Pendaftaran Manuskrip pada Jurnal GPB

11/1/2018

Universitas Esa Unggul Mail - Submission Confirmation



Henny Saraswati <hennysaraswati@esaunggul.ac.id>

Submission Confirmation

1 message

Genomics Proteomics and Bioinformatics <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Reply-To: Genomics Proteomics and Bioinformatics <editor@big.ac.cn>
To: hennysaraswati@esaunggul.ac.id, hsaras78@gmail.com
Cc: dessypatty97@gmail.com, tazkia.ayu.safitri@gmail.com

Wed, Oct 31, 2018 at 9:31 AM

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Henny Saraswati,

We have received your article "SPECIFIC PRIMER FOR HUMAN Bcl-2-PROTEIN EXPRESSION ANALYSIS" for consideration for publication in Genomics, Proteomics & Bioinformatics.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://ees.elsevier.com/gpb/>
2. Enter these login details:
Your username is: hennysaraswati@esaunggul.ac.id
If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/gpb/automail_query.asp
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Please note: No additional authors will be added/removed post submission without the approval of the editorial office. Please refer Guide for Author for more information.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Genomics, Proteomics & Bioinformatics

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:
http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Lampiran 2b. Bukti Pendaftaran Manuskrip pada Jurnal BBI



Henny Saraswati <hennysaraswati@esaunggul.ac.id>

Bioinformatics and Biology Insights - BBI-2018-0033

1 message

SAGE Track <peerreviewssupport@sagepub.com>
Reply-To: peerreviewssupport@sagepub.com
To: hennysaraswati@esaunggul.ac.id

Tue, Nov 6, 2018 at 12:48 PM

Dear Author(s),

Your manuscript titled 'Specific Primer for Human Bcl-2 Protein Expression Analysis' has been successfully submitted online and is currently being given full consideration for publication in Bioinformatics and Biology Insights.

Your Manuscript ID is BBI-2018-0033.

The manuscript details are listed below for your reference.

BBI-2018-0033: Specific Primer for Human Bcl-2 Protein Expression Analysis
Authors: Dr. Henny Saraswati, Miss. Dessy Nurul Jannah Patty, Miss. Tazkia Ayu Safitri
Contact/Corresponding Author: Dr. Henny Saraswati

Please mention the Manuscript ID in any future correspondence regarding the manuscript.

You may view the status of your manuscript anytime by accessing your author desk at <https://peerreview.sagepub.com/>.

Thank you for submitting your manuscript to Bioinformatics and Biology Insights.

Sincerely,
Ms. Veronica Riss
Bioinformatics and Biology Insights Editorial Office
peerreviewssupport@sagepub.com

Lampiran 3. Bukti Kepesertaan dalam SemNas Masyarakat Biodiversitas 2018



**SEMINAR NASIONAL
MASYARAKAT BIODIVERSITAS INDONESIA &
UNIVERSITAS NEGERI SEBELAS MARET
SOLO, 03 NOVEMBER 2018 INDONESIA**

Hal: Undangan SN MBI SOLO (03 NOVEMBER 2018)

HENNY SARASWATI
Universitas Esa Unggul
Jl. Arjuna Utara No.9, Kebon Jeruk, Jakarta Barat 11510
+62-81281701911
hennysaraswati@esaunggul.ac.id

Yth. Bapak/Ibu,

Atas nama panitia, bersama ini disampaikan bahwa abstrak Bapak/ Ibu memenuhi syarat untuk dipresentasikan pada Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia yang akan diselenggarakan pada:

Tanggal : 03 November 2018
Pukul : 08.00-17.00 WIB
Lokasi : Lor In Syariah Solo
Jl. Adi Sucipto No. 47 Gonilan, Kartosuro
Sukaharjo, Jawa Tengah Telp. +62-271-711000

Jadwal kegiatan (Buku Abstrak dan Manual Program) serta invoice akan dikirimkan menyusul.
Semoga kita dapat segera berjumpa pada kegiatan tersebut.



SEKRETARIAT

Sekretariat Masyarakat Biodiversitas Indonesia, Kantor Jurnal Biodiversitas, Jurusan Biologi Gd. A, Lt. 1, FMIPA UNS, Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah. Tel./fax.: +62-271-663375. Email: biodiversity@gmail.com. Website: biodiversity.mipa.uns.ac.id/snmbi.html (Kontak: Indah K., M.Si. +62 897 6655 281)

Lampiran 4. Foto-foto kegiatan Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas 2018



Lampiran 5. Surat Pencatatan Hak Cipta dari Kemenkumham RI


REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan : EC00201849863, 17 Oktober 2018

Pencipta

Nama : **Aroem Naroeni, DEA, PhD, Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si, dkk**

Alamat : **Gd IASTH Lantai 8 , Komplek UI, Jln Salemba Raya No 4, Jakarta Pusat, Dki Jakarta, 10430**

Kewarganegaraan : **Indonesia**

Pemegang Hak Cipta

Nama : **Dr. Henny Saraswati, S.Si, M.Biomed**

Alamat : **Jl. Intisari I No.4, RT/RW 02/09, Kel. Kalisari, Kec. Pasar Rebo, Jakarta Timur, Dki Jakarta, 13790**

Kewarganegaraan : **Indonesia**

Jenis Ciptaan : **Laporan Penelitian**

Judul Ciptaan : **Analisa Protein Bcl-2 Sebagai Penanda Prognosis**

Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia : **16 Oktober 2018, di Jakarta**

Jangka waktu perlindungan : **Berlaku selama hidup Pencipta dan terus berlangsung selama 70 (tujuh puluh) tahun setelah Pencipta meninggal dunia, terhitung mulai tanggal 1 Januari tahun berikutnya.**

Nomor pencatatan : **000122210**

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL


Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001

