

**PERKEMBANGAN PENELITIAN
RISET DISERTASI DOKTOR**



**ISOLASI, KARAKTERISASI DAN MODIFIKASI PROTEIN
ONKOGENIK HUMAN PAPILLOMAVIRUS SEBAGAI
PROTOTYPE VAKSIN TERAPEUTIK KANKER SERVIKS**

apt. Ayu Novita Trisnawati, M. Biotek

Promotor : Prof. apt. Marlina, MS, Ph.D
Co-Promotor 1 : Dr. Dr. Andani Eka Putra, M.Sc
Co-Promotor 2 : Prof. apt. Fatma Sri Wahyuni, Ph.D

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2020**

A. RINGKASAN

Human papilloamvirus (HPV) merupakan salah satu masalah kesehatan yang paling banyak dialami wanita. Infeksi HPV berkaitan dengan perkembangan kanker serviks. Di Indonesia tercatat 98.692 kejadian kanker serviks berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar tahun 2018. International Agency for Research on Cancer (IARC) memperkirakan pada tahun 2050 populasi wanita yang menderita kanker serviks mencapai tiga juta penderita.

Berbagai upaya untuk mencegah dan menanggulangi kanker serviks sudah banyak dikembangkan. Pencegahan dilakukan melalui program papsmear dan vaksinasi menggunakan vaksin profilaksis HPV. Sementara pengobatan kanker serviks yang telah dilakukan diantaranya radioterapi dan kemoterapi. Upaya tersebut belum mampu efektif menurunkan angka kejadian kanker serviks, sebab vaksin yang sudah ada tidak memiliki efek terapi pada pasien yang telah terinfeksi HPV dan pengobatan dengan kemoterapi menyebabkan penurunan kualitas hidup pasien. Untuk menanggulangi permasalahan ini, maka perlu dilakukan upaya baru untuk mengobati kanker serviks.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan prototipe vaksin terapeutik dengan menjadikan protein onkogenik HPV sebagai bahan dasar terapi kanker serviks. Pada penelitian tahun kedua ini, telah dilakukan analisis variasi gen E6 dari HPV 16 dan 18 dengan tahapan metode: amplifikasi Gen E6 HPV 16 dan 18 menggunakan primer spesifik untuk setiap tipe kemudian disekuensing, urutan nukleotida yang didapat dari hasil sekuensing dibandingkan dengan sekuens referensi yang tersedia di GeneBank, untuk mengetahui variasi nukleotida dan pola kekerabatannya menggunakan beberapa program bioinformatika. Kemudian berdasarkan data variasi gen E6 yang didapatkan dilakukan analisis molekuler secara in-silico untuk

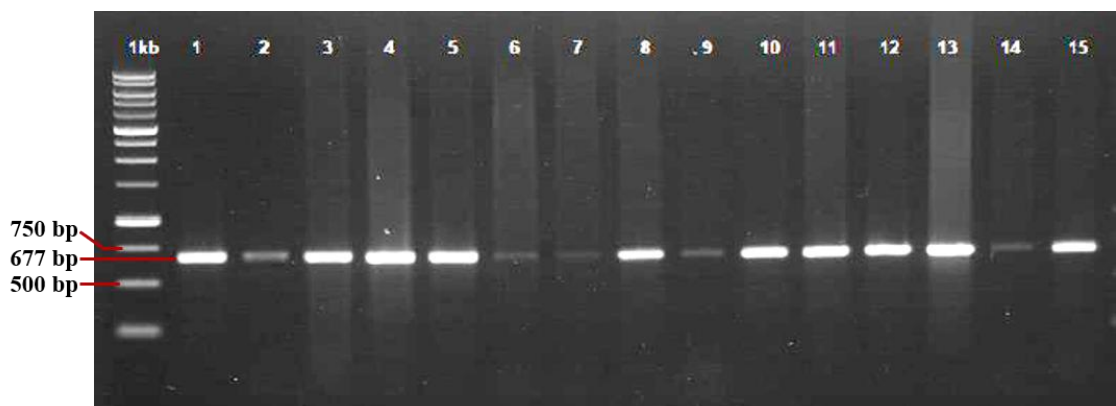
memodifikasi protein E6 agar dapat dijadikan bahan untuk mengembangkan prototipe vaksin terapeutik.

Hasil analisis menunjukkan 72,5 % HPV 16 dan 100% HPV 18 mengalami perubahan nukleotida. Ditemukan 13 titik mutasi pada gen E6 HPV 16, dimana 7 diantaranya termasuk missense mutation. Sampel INA18.HPV16 dan INA26.HPV18 merupakan varian baru dengan 9 titik mutasi. Pada gen E6 HPV 18 terdapat 5 titik mutasi, dimana 2 diantaranya termasuk missense mutation. Berdasarkan analisis pola kekerabatannya, 95% sekuens sampel HPV 16 pada penelitian ini termasuk ke dalam lineage A (Eropa-Asia) dan semua sekuens sampel HPV 18 termasuk ke dalam lineage A (Eropa-Asia). Hasil ini memberikan data tambahan mengenai variasi gen E6 HPV 16 dan 18 di Indonesia. Modifikasi E6 masih dalam tahap analisis *in silico*.

B. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN

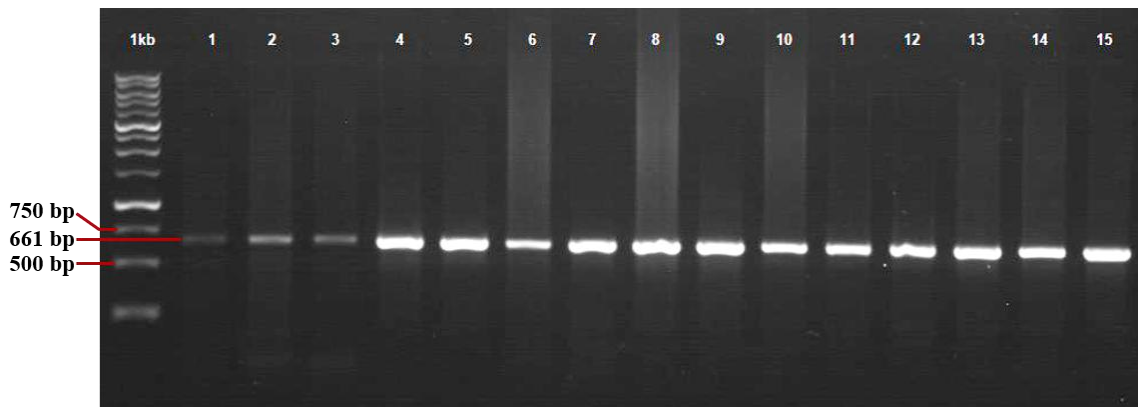
1. Amplifikasi Gen E6 HPV 16 dan 18

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis variasi gen E6 HPV tipe 16 dan 18 pada pasien kanker serviks. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 40 isolat DNA HPV tipe 16 dan 17 isolat DNA HPV tipe 18 yang merupakan koleksi Pusat Kajian HPV Universitas Andalas, Padang. Gen E6 dapat diamplifikasi dari semua isolat DNA HPV tipe 16 yang digunakan pada penelitian ini. Hasil amplifikasi gen E6 HPV tipe 16 dapat diamati pada Gambar 1, dimana pada ukuran 677 bp muncul pita DNA di semua *lane*, hal ini mengindikasikan gen target berhasil diamplifikasi.



Gambar 1. Hasil Amplifikasi Gen E6 *Human papillomavirus* Tipe 16
Keterangan: Elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8% pada tegangan 100V selama 30 menit; 1kb: DNA Ladder 1 kb; 1-15: sampel INA01.HPV16-INA15.HPV16.

Amplifikasi gen E6 HPV 18 juga berhasil dilakukan pada 17 isolat DNA HPV 18. Hasil amplifikasi gen E6 HPV 18 dapat diamati pada Gambar 2. Pada *lane* nomor 1 sampai 15 terlihat muncul pita DNA pada ukuran 661 bp. Hal ini menunjukkan bahwa reaksi perbanyakan gen target berhasil dilakukan, karena pita yang muncul pada foto elektroforesis sama ukurannya dengan produk primer yang digunakan. Pada Gambar 8 terlihat ketebalan dan intensitas pita yang muncul beragam, dimana pada *lane* 4 sampai 15 pita yang muncul tebal dengan intensitas yang tinggi, sedangkan pada *lane* 1 sampai 3 pita cenderung lebih tipis dan intensitasnya lebih rendah. Hal ini menandakan perbedaan konsentrasi DNA hasil amplifikasi. Amplikon yang memiliki konsentrasi DNA tinggi, pada gel agarosa akan berpendar dengan terang dan pita yang muncul lebih tebal [1].



Gambar 2. Hasil Amplifikasi Gen E6 *Human papillomavirus* Tipe 18
Keterangan: Elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8% pada tegangan 100V selama 30 menit; 1kb: DNA Ladder 1kb; 1-15: sampel INA01.HPV18-INA15.HPV18.

2. Analisis Variasi Nukleotida Gen E6 *Human papillomavirus* Tipe 16 dan 18

Analisis variasi genetik gen E6 HPV 16 dilakukan menggunakan 40 sekuens DNA sampel dengan sekuens NC001526.3 sebagai sekuens referensi dan analisis variasi genetik gen E6 HPV 18 dilakukan pada 17 sekuens DNA sampel dan sekuens NC001357.1 sebagai sekuens referensi. Hasil analisis menunjukkan

baik pada sekuens gen E6 HPV 16 maupun sekuens gen E6 HPV 18 terjadi perubahan nukleotida pada sekuens sampel jika dibandingkan dengan sekuens referensi.

Pada penelitian ini, diamati substitusi yang paling sering ditemui yaitu perubahan Adenin menjadi Guanin pada nukleotida posisi ke 276 (13 sampel) dan perubahan Timin menjadi Guanin pada nukleotida posisi ke 178 (10 sampel). Substitusi ini sering ditemui pada HPV 16 yang berasal dari daerah Asia, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Zhe *et al.* (2019) tentang variasi variasi genetik gen E6 dan E7 HPV 16 di Xinjiang, China [2].

Tabel 1. Varian Gen E6 HPV 16

| Varian | Perubahan Nukleotida | Jumlah (n) | Persentase (%) |
|-------------------|---|---------------|-------------------|
| <i>Wild Type</i> | - | 1 | 27,5 |
| 109C | T109C | | 5 |
| 178G | T178G | | 25 |
| | | 0 | |
| 214G | A214G | | 2,5 |
| 276G | A276G | | 32,5 |
| | | 3 | |
| 415G | T415G | | 2,5 |
| <i>New Varian</i> | T109C, G132T, C143G, G145T, G188C, T286A, A289G, C335T, A403G | | 5 |

Mutasi yang terjadi pada masing-masing sekuens sampel menyebabkan HPV 16 dikelompokkan menjadi 7 varian. Adapun varian yang muncul pada penelitian ini dapat diamati pada Tabel 1. Varian pertama adalah sampel yang memiliki sekuens nukleotida yang sama dengan sekuens referensi. Varian ini bisa juga disebut *wild type* karena tidak adanya mutasi yang terjadi pada sampel. Persentase varian *wild type* pada sampel cukup tinggi mencapai 27,5% (n=11) pada sampel penelitian. *Wild type* varian juga ditemukan dengan frekuensi yang cukup tinggi pada penelitian yang dilakukan Boer *et al.* (2004) pada tiga negara.

Pada sampel yang berasal dari Belanda dan Suriname persentase *wild type* varian yang ditemukan adalah 40,74% dan 44,4%. Namun hasil yang berbeda ditemukan pada isolat sampel yang berasal dari RS Cipto Mangunkusumo Jakarta, Indonesia, dimana semua sekuens sampel mengalami mutasi pada Gen E6 [3].

Varian yang paling dominan ditemukan pada sampel penelitian ini adalah varian 276G. Pada varian ini terjadi substitusi nukleotida pada posisi ke 276 dari Adenin menjadi Guanin. Sebanyak 13 (32,5%) sekuens sampel termasuk ke dalam varian ini. Varian 276G ini, pertama kali dilaporkan oleh Boer *et al.* (2004) pada penelitiannya dengan sampel yang berasal dari pasien kanker serviks di RS Cipto Mangunkusumo, Jakarta. Boer *et al.* berpendapat bahwa varian ini sangat khas untuk populasi Jawa, sehingga ia juga menyebut varian ini sebagai varian Jawa. Varian Jawa ini ditemukan pada 56% sampel yang diteliti di Indonesia. Disamping itu, pada penelitian yang sama, varian Jawa ini juga ditemukan pada tiga sampel yang berasal dari Suriname. Hal ini diperkirakan karena adanya migrasi dari penduduk Jawa ke Suriname [3].

Varian ketiga dalam penelitian ini adalah varian 178G, dimana terjadi substitusi Timin menjadi Guanin pada nukleotida ke 178. Persentase varian T178 pada sekuens sampel yang diteliti adalah 25%. Varian ini merupakan varian yang khas untuk HPV Asia, sebab hampir semua penelitian variasi gen E6 HPV 16 di Asia melaporkan adanya variasi 178G. Beberapa negara tersebut adalah Jepang, Korea, China dan Thailand [4,5,6]. Zhe *et al.* (2019) melaporkan pada penelitian yang dilakukan terhadap pasien dengan lesi serviks di Xinjiang, China, frekuensi mutasi T178G sebesar 25,3% [2].

Pada penelitian ini, ditemukan varian baru yang sangat menarik, yaitu pada sampel INA.18.HPV16 dan INA.26.HPV16. Kedua sampel ini mengalami mutasi lebih dari 1 titik. Terdapat 9 titik mutasi yang terjadi yaitu T109C, G132T, C143G, G145T, G188C, T286A, A289G, C335T, A403G. Kombinasi 9 titik mutasi ini belum pernah dilaporkan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Varian HPV dengan titik mutasi yang lebih dari lima biasanya ditemukan pada sampel yang berasal dari Afrika, seperti penelitian yang dilakukan oleh Qmichou *et al.* (2013) pada DNA HPV yang diisolasi dari wanita dengan kanker serviks [7]. Penelitian tersebut juga melaporkan terdapat 9 titik mutasi pada 13 sampel. Adapun perubahan nukleotida yang terjadi yaitu T109C, G132T, C143G, G145T, C285G, T286A, A289G, C335T, dan A403G.

Analisis variasi gen E6 HPV 18 dilakukan terhadap 17 sampel DNA pasien kanker serviks. Semua isolat yang diteliti memiliki setidaknya satu perubahan nukleotida berupa substitusi. Analisis variasi gen E6 HPV 18 ini dilakukan dengan cara membandingkan sekuens DNA isolat yang diperiksa dengan *reference sequence* NC 001357.1. Adapun variasi nukleotida yang ditemukan dapat dilihat pada Tabel 2. Mutasi yang paling banyak ditemui yaitu substitusi nukleotida pada urutan ke 287, dimana Sitosin berubah menjadi Guanin (C287G) sebanyak 17 isolat. Titik mutasi lain yang terjadi adalah A338T, T485C, C549A, G550A.

Berdasarkan titik-titik mutasi yang terjadi sekuens sampel pada penelitian ini dikelompokkan menjadi 5 varian (Tabel 14), dimana tidak ditemukan varian *wild type* pada penelitian ini karena semua sampel mengalami setidaknya satu mutasi. Varian yang paling banyak ditemukan pada penelitian ini adalah varian 287G, dengan persentase 70,58%. Varian ini juga dilaporkan pada beberapa penelitian lain. Variasi gen E6 HPV 18 yang dilakukan di Spanyol, melaporkan bahwa semua sampel mengalami perubahan nukleotida Timin menjadi Sitosin pada posisi ke 287 [8]. Hasil yang sama juga dilaporkan pada penelitian yang dilakukan di Cina [9,10].

Tabel 2. Varian Gen E6 HPV 18

| Varian | Perubahan Nukleotida | Jumlah (n) | Persentase (%) |
|----------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 287G | C287G | 12 | 70,59 |
| 287G /338T | C287G, A338T | 1 | 5,8 |
| 287G/550A | C287G, G550A | 1 | 5,8 |
| 287G/485C/549A | C287G, T485C, C549A | 2 | 11,76 |
| 287G/549A | C287G, C549A | 1 | 5,8 |

Penelitian yang dilakukan Boer *et al.* (2005) di tiga negara Belanda, Indonesia dan Suriname melaporkan semua sampel penelitian mengalami mutasi C287G [11]. Disamping itu, perubahan nukleotida pada posisi ke 419 dari Sitosin menjadi Timin juga dilaporkan. Penelitian variasi genomik pada HPV 18 di Slovenia juga diamati munculnya variasi C287G pada 95% sampel penelitian [12]. Hasil yang sama dilaporkan oleh Perez *et al.* (2014) dimana semua sampel pasien dengan lesi serviks mengalami mutasi C287G pada gen E6 HPV 18 [13].

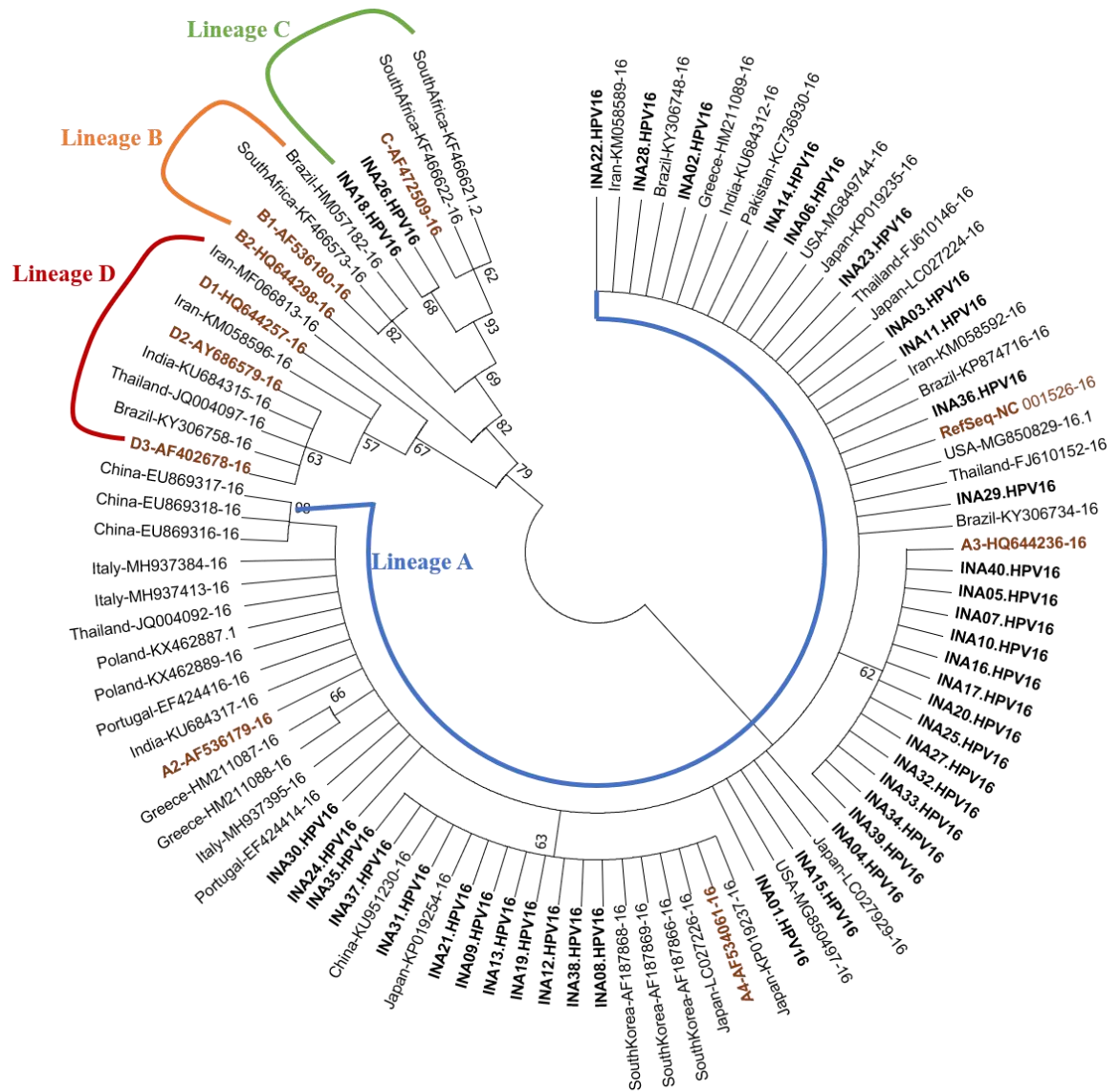
Varian lain yang ditemukan pada sekuens gen E6 HPV 18 merupakan varian dengan 2-3 titik mutasi yaitu varian 287G/338T pada sampel INA05.HPV18, varian 287G/550A pada sampel INA03.HPV18, varian 287G/485C/549A pada sampel INA10.HPV18 dan INA13.HPV18 dan varian 287G/549A pada sampel INA17.HPV18. Dua diantara varian diatas telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya. Penelitian yang dilakukan pada pasien kanker serviks di China melaporkan bahwa gen E6 HPV 18 pada isolat DNANYa mengalami mutasi pada 287G/485C/549A [6,9,10]. Varian 287G/338T dan varian 287G/550A pada gen E6 HPV 18 belum pernah dilaporkan pada penelitian sebelumnya, sehingga dapat dikatakan kedua varian ini merupakan varian baru yang ditemukan pada penelitian ini.

3. Filogenetik *Human papillomavirus* Tipe 16 dan 18 berdasarkan Gen E6

Analisis filogenetik dari 40 sekuens gen E6 HPV 16 yang berasal dari pasien kanker serviks di Rumah Sakit Arifin Ahmad Pekanbaru dilakukan dengan menambahkan 11 sekuens referensi untuk setiap *sublineage* HPV 16 dan 55 sekuens HPV 16 yang diambil dari *GeneBank*, menunjukkan bahwa 95% sampel pada penelitian ini termasuk ke dalam *lineage* A, yang merupakan garis keturunan Eropa-Asia. Sementara 2 sampel lainnya INA18.HPV 18 dan INA26.HPV 18 termasuk ke dalam kelompok garis keturuna Afrika (*Lineage C*). Kontruksi pohon filogenetik gen E6 HPV 16 dapat diamati pada Gambar 3. Berdasarkan pohon filogenetiknya, diketahui sampel HPV 16 pada penelitian ini memiliki kekerabatan yang dekat dengan kelompok HPV di daerah Eropa-Asia. Zhe *et al.*

(2019) melaporkan HPV 16 yang menginfeksi pasien kanker serviks di Xinjiang, China juga memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan HPV kelompok Eropa-Asia [2].

Lineage A (Eropa-Asia) memiliki kekerabatan yang paling dekat dengan 95% sampel HPV 16 pada penelitian ini. Dari 38 sampel yang termasuk *lineage A*, dikelompokkan lagi menjadi *sublineage A1, A2, A3 dan A4*. Beberapa sampel HPV 16 pada penelitian ini termasuk *sublineage A1*. *Sublineage A1* memiliki nama lain *sublineage Eropa*, sebab garis keturunannya berasal dari Eropa. Menurut Burk *et al.* (2013) *sublineage A1* merupakan *sublineage* yang paling banyak ditemui pada HPV 16 di dunia [14]. Penelitian yang dilakukan di Provinsi Xinjiang, Cina melaporkan bahwa 57 dari 75 sampel yang diteliti termasuk kedalam *sublineage Eropa* [2]. Penelitian lain yang dilakukan di Lithuania juga melaporkan 62,5% sampel pada penelitiannya termasuk *sublineage Eropa* [15].



Gambar 3. Konstruksi Pohon Filogenetik HPV 16 berdasarkan Gen E6.

Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metoda *Maximum likelihood* dan model Tamura-3-parameter menggunakan *software* MEGA v.7.0.26. Sekuens sampel ditandai dengan huruf hitam tebal dan sekuens referensi ditandai dengan huruf coklat tua tebal

Hubungan kekerabatan gen E6 HPV 18 ditentukan dan dianalisa dengan menggunakan 477 sekuens gen E6 dari 17 isolat sampel, 10 sekuens referensi dan 32 sekuens yang diambil dari *GeneBank*. Gambar 4 menunjukkan kontruksi filogenetik gen E6 HPV 18 pada semua sekuens. Berdasarkan pohon filogenetik yang telah dikonstruksi, gen E6 HPV 18 dikelompokkan menjadi 3 kluster utama yaitu *lineag* A, B dan C. Burk *et al.* (2013) menyatakan *lineage* A merupakan

kelompok garis keturunan Eropa-Asia sedangkan *lineage* B dan C merupakan kelompok garis keturuna Afrika [14].



Gambar 4. Konstruksi Pohon Filogenetik HPV 18 berdasarkan Gen E6.

Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metoda *Maximum likelihood* dan model Tamura-3-parameter menggunakan *software* MEGA v.7.0.26. Sekuens sampel ditandai dengan huruf hitam tebal dan sekuens referensi ditandai dengan huruf coklat tua tebal

Semua sekuens sampel dalam penelitian ini termasuk ke dalam kelompok *lineage* A. Terdapat 5 *sublineage* pada lineage A ini, yaitu *sublineage* A1, A2, A3, A4 dan A5. Masing-masing *sublineage* ini mewakili garis keturunan berdasarkan letak geografisnya. Menurut Burk *et al.* (2013), *Sublineage* A1 dan A2 merupakan kelompok Asia-Amerika sedangkan *sublineage* A3, A4, dan A5 merupakan kelompok Eropa [14]. Pada penelitian ini, 88,23 % sekuens sampel termasuk kedalam *sublineage* A1 dengan bootstrap 51%. Dari Gambar 17, terlihat bahwa memang sekuens yang termasuk ke dalam *sublineage* A1 didominasi oleh

sekuens yang berasal dari Asia, seperti Thailand dan China. Penelitian Xu *et al.* (2018) juga melaporkan varian HPV 18 *sublineage* A1 paling banyak ditemukan (85,2%) pada biopsi serviks pasien kanker serviks di daerah Taizhou, China [9].

Studi sebelumnya melaporkan bahwa resiko berkembangnya CIN secara signifikan lebih tinggi pada varian non-Eropa [16,17]. Xi *et al.* (2007) melaporkan bahwa varian Asia-Amerika/ varian Eropa secara statistik signifikan berkaitan dengan lesi *pra-invasive* dibandingkan dengan varian Afrika [18]. Sebaliknya, penelitian lainnya menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan dalam risiko lesi *pra-invasif* diamati antara varian garis keturunan (A, B, dan C) [19,20].

4. *Haplotype Network Human papillomavirus* Tipe 16 dan 18 berdasarkan Gen E6

Hubungan kekerabatan antara sekuens DNA juga dapat dianalisis berdasarkan *haplotype*. Pada penelitian ini, analisis *haplotype* dan pembuatan *haplotype network* dilakukan menggunakan dua *software* yaitu DNA Sequence Program (DnaSP) dan Network v.5.0. Data yang digunakan dalam analisis ini berupa sekuens gen E6 HPV 16 dan 18 yang telah disejajarkan dalam format Fasta (.fas). Tabel 2 menunjukkan keanekaragaman molekuler gen E6 HPV 16 dan 18.

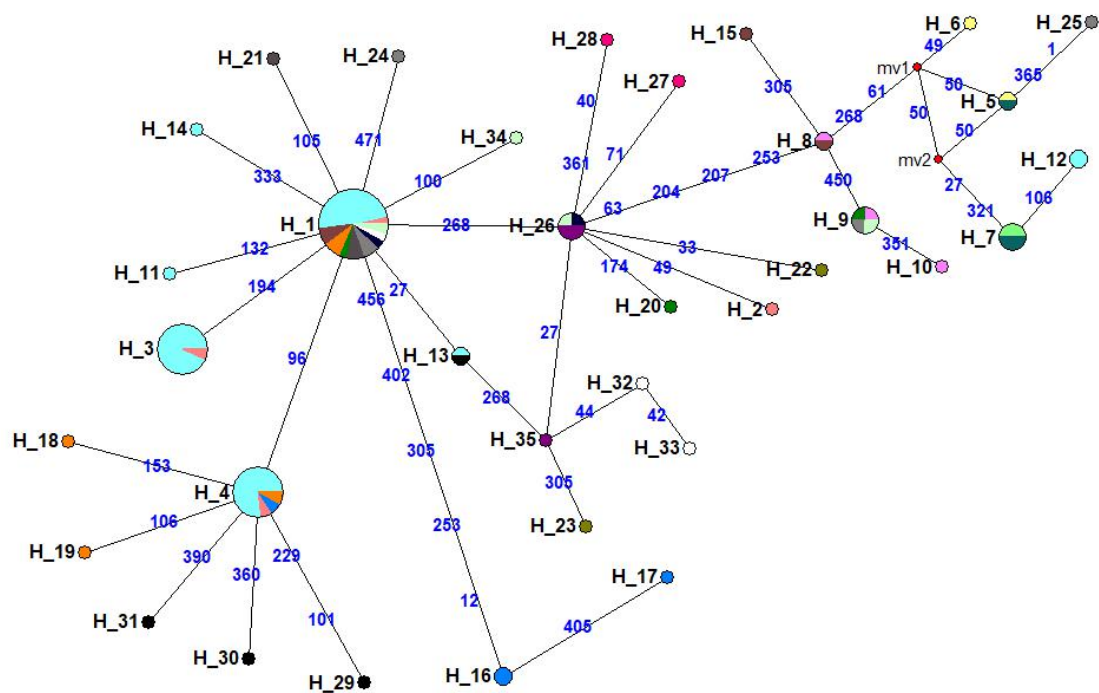
Tabel 16. Indeks Keanekaragaman Molekuler Gen E6 HPV 16 dan HPV 18

| | HPV 16 | | HPV 18 | |
|-----------------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
| | Semua sekuens | Sekuens Pekanbaru | Semua sekuens | Sekuens Pekanbaru |
| Jumlah sekuens | 98 | 40 | 57 | 17 |
| Jumlah <i>Haplotype</i> | 35 | 7 | 18 | 5 |
| <i>Haplotype diversity</i> | 0,896 | 0,7692 | 0,801 | 0,5074 |
| <i>Nucleotide diversity</i> | 0,008 | 0,0039 | 0,006 | 0,0016 |

Pada 40 sekuens HPV 16 yang dianalisis pada penelitian ini terdistribusi ke dalam 7 haplotipe dengan *haplotype diversity* 0,7692 dan *nucleotide diversity* 0,0039. Sedangkan pada 17 sekuens HPV 18 yang dianalisis pada penelitian ini terdistribusi ke dalam 5 haplotipe dengan *haplotype diversity* 0,5074 dan *nucleotide diversity* 0,0016. *Haplotype diversity* dan *nucleotide diversity* pada penelitian ini tidak terlalu

tinggi. Hal ini menandakan laju mutasi yang terjadi pada sampel HPV 16 dan 18 yang berasal dari Pekanbaru berjalan lambat. Penelitian yang dilakukan Vidal *et al.* (2016) melaporkan *haplotype diversity* 0,932 dan *nucleotide diversity* 0.084 untuk HPV 16 dan *haplotype diversity* 0,958 dan *nucleotide diversity* 0,01 [21]. Berdasarkan data tersebut, diketahui laju mutase HPV 16 dan 18 berbeda dari suatu daerah dengan daerah lain.

Haplotype network menggambarkan distribusi *haplotype* pada sampel. *Haplotype Network* dari Gen E6 HPV 16 dapat diamati pada Gambar 5. *Haplotype* dengan frekuensi yang paling besar ditemukan pada *haplotype* 1 (25 isolat sampel), *haplotype* 14 (14 isolat sampel), dan *haplotype* 4 (13 isolat sampel). Hasil analisis *haplotype network* ini menunjukkan data yang sejalan dengan analisis filogenetik gen E6 HPV 16. *Haplotype* 1 (H_1) yang terdiri dari 25 sekuens, 11 diantaranya sekuens sampel pada penelitian ini, termasuk ke dalam *sublineage* A1, sebab pada *haplotype* ini juga ditemukan sekuens referensi untuk A1 yaitu NC_001526.3. *Haplotype* 14 (H_14) terdiri dari 14 sekuens dimana 13 diantaranya adalah sampel yang berasal dari pekanbaru dan sampel lainnya adalah sekuens referensi untuk *sublineage* A4. Dengan demikian H_14 termasuk ke dalam *sublineage* A4. *Haplotype network* pada penelitian yang dilakukan oleh Vidal *et al.* (2016) pada pasien kanker serviks yang positif HPV 16 di Brazil menunjukkan dominasi *lineage* A pada sampel penelitiannya [21].

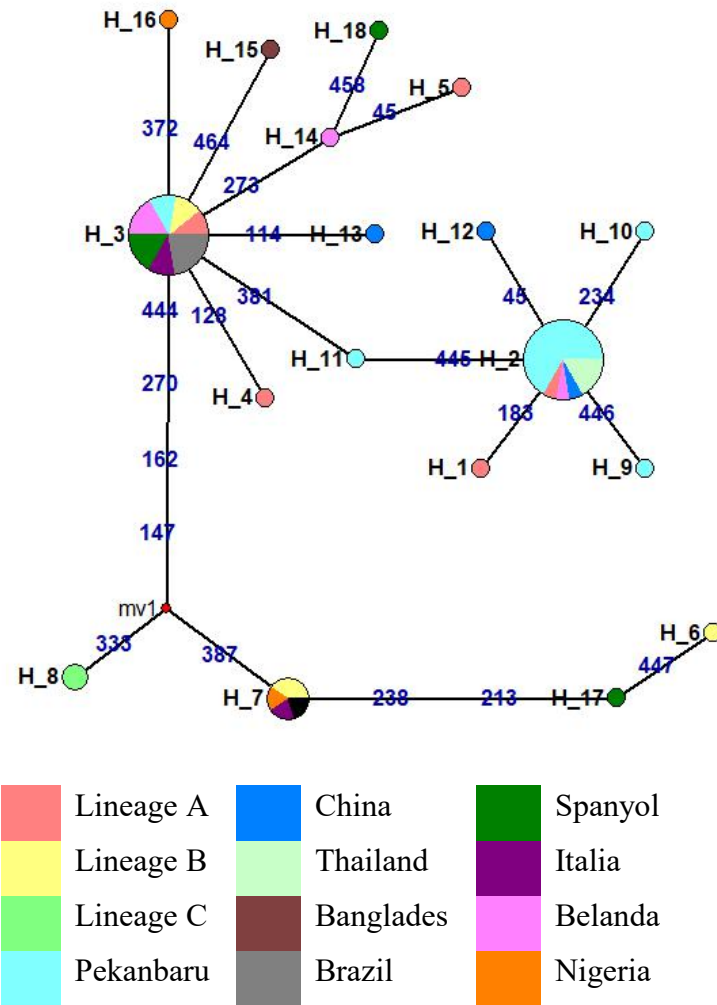




Gambar 5. *Haplotype Network* dari Gen E6 HPV 16

Untuk 2 sampel yang secara filogenetik termasuk ke *sublineage* C, dalam analisis *haplotype network* berada pada *haplotype* yang berbeda dengan sekuens referensi *sublineage* C. *Sublineage* C berada pada *haplotype* 7 sedangkan sampel INA18.HPV 16 dan INA26.HPV 16 termasuk dalam *haplotype* 12. Meskipun demikian kedua *haplotype* ini memiliki jarak yang dekat, dimana hanya ada satu nukleotida yang membedakan kedua *haplotype*.

Haplotype network untuk gen E6 HPV 18 dapat diamati pada Gambar 6. Berdasarkan *haplotype network* yang telah dibuat, diketahui bahwa ada dua *haplotype* dengan frekuensi yang paling tinggi, yaitu *haplotype* 2 dan *haplotype* 3. Distribusi sampel gen E6 HPV 18 yang berasal dari pekanbaru paling banyak ditemukan pada *haplotype* 2 dengan 12 sekuens sampel. Sedangkan lima sekuens sampel lainnya terdistribusi pada *haplotype* 3, 9, 10 dan 11. Semua *haplotype* ini termasuk kelompok Asia-Eropa. Hal ini sesuai dengan hasil analisis filogenetik yang telah dilakukan sebelumnya. Hasil yang sama juga dilaporkan Vidal *et al.* (2016), dimana *haplotype network* pada HPV 18 didominasi oleh kelompok Asia-Eropa [21].



Gambar 6. *Haplotype Network* dari gen E6 HPV 18

Pada *haplotype network* HPV 16 (*Haplotype* 1, 4 dan 26) dan *haplotype network* HPV 18 (*Haplotype* 2 dan 3) membentuk konfigurasi seperti bintang yang sebagian besar diantaranya dibedakan oleh satu nukleotida pengganti. Menurut Vidal *et al.* (2016) pola ini menunjukkan ekspansi populasi yang cepat dari *haplotype* HPV 16 yang berkaitan dengan kejadian kanker serviks atau dengan faktor selektif yang mendukung *haplotype* tertentu. Hal ini akan menyebabkan loncatan genetik (*genetic hitchhiking*) [21].

C. DAFTAR PUSTAKA

1. Lee, P.Y., J. Costumbrado, J., C.Y. Hsu, dan Y.H. Kim. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiment* 62: e3923.
2. Zhe, X, H. Xin, Z. Pan, F. Jin, W. Zheng, H. Li, D. Li, D. Cao, Y. Li, C. Zhang. R. Shao dan Z. Pan. 2019. Genetic variations in E6, E7 and the long control region of human papillomavirus type 16 among patients with cervical lesions in Xinjiang, China. *Cancer Cell Int.* 19:65.
3. Boer, M.A., L.A.W. Peters, M.F. Aziz, B. Siregar, S. Cornain, M.A. M.A Vrede. 2004. Human Papillomavirus type 16 E6, E7 and L1 Variants in Cervical Cancer in Indonesia, Suriname and The Netherlands. *Gynecologic Oncology* 94: 488-494.
4. Matsumoto, K., H. Yoshikawa, S. Nakagawa, X. Tang, T. Yasugi, K. Kawana, S. Sekiya, Y. Hirai, I. Kukimoto, T. Kanda, Y. Taketani. 2000. Enhanced oncogenicity of human papillomavirus type 16 (HPV16) variants in Japanese population. *Cancer Letter* 156(2): 159-65.
5. Chopjitt, P., T. Ekalaksananan, C. Pientong, B. Kongyingyoes, P. Kleebkaow dan N. Charoensri. Prevalence of human papillomavirus type 16 and its variants in abnormal squamous cervical cells in Northeast Thailand. *International Journal of Infectious Diseases* 13: 212—219.
6. Yang, L., H. Yang, K. Wu, X. Shi, S. Ma, dan Q. Sun. 2014. Prevalence of HPV and Variation of HPV 16/HPV 18 E6/E7 Genes in Cervical Cancer in Women in South West China *Journal of Medical Virology* (86)11.
7. Qmichou, Z., M. Khyatti, M. Berraho, M.M. Ennaji, L. Benbacer, C. Nejari, N. Benjaafar, A. Benider, M. Attaleb dan M. El Mzibri. 2013. Analysis of mutations in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroccan women. *BMC Infectious Diseases* 13:378.
8. Perez, S., A. Cid, A. Inarrea, M. Pato, M. J. Lamas, B. Couso, M. Gil, M.J. Alvarez, S. Rey, I. L. Miragaya DAN S.M. Maria. 2014. Prevalence of HPV 16 and HPV 18 Lineages in Galicia, Spain. *PlosOne* 9(8): e104678.
9. Xu, H.H., L.Z. Zheng, A.F. Lin, S.S Dong, Z.Y. Chai dan W.H. Yan. 2018. Human papillomavirus (HPV) 18 genetic variants and cervical cancer risk in Taizhou area, China. *Gene* 647:192-197.
10. Sun, Z., J. Liu, G. Wang, W. Zhou, C. Liu dan Q. Ruan. 2012. Variant lineages of human papillomavirus type 18 in Northeast China populations characterized by sequence analysis of E6, E7, and L1 regions. *International Journal of Gynecology and Cancer* 22(6):930-6.
11. Boer, M.A., L.A.W. Peters, M.F. Aziz, B. Siregar., M.A. Vrede., E.S. Jordanova dan G.J. Fleuren. 2005. Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *International Journal of Cancer* 114: 422-425.
12. Bokal, V.E., B.J. Kocjan., M. Poljak., Ž. Bogovac and N. Janc̃ar. 2010. Genomic variants of human papillomavirus genotypes 16, 18, and 33 in women with cervical cancer in Slovenia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 36 (6): 1204-1213.
13. Perez, S., A. Cid, A. Inarrea, M. Pato, M. J. Lamas, B. Couso, M. Gil, M.J. Alvarez, S. Rey, I. L. Miragaya DAN S.M. Maria. 2014. Prevalence of HPV 16 and HPV 18 Lineages in Galicia, Spain. *PlosOne* 9(8): e104678.
14. Burk, R.D., A. Harari dan Z. Chen. 2013. Human papillomavirus genome variants. *Virology* 445(0): 232–243.
15. Gudlevičienė, Ž, A. Stumbrytė, G. Juknė, V. Simanavičienė, dan A. Žvirblienė. 2015. Distribution of human papillomavirus type 16 variants in Lithuanian women with cervical cancer. *Medicina* 51(6):328-35.

16. Van Duin, M., P.J.F. Snijders, M.T.M. Vossen, E. Klaassen, F. Voorhorst, R.H.M. Verheijen, T.J. Helmerhorst, C.J. L.M. Meijer dan J.M.M. Walboomers. 2000. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *Journal of General Virology* 81:317–325.
17. Arroyo, S.L., M. Basaras, E. Arrese, S. Hernáez, D. Andía, V. Esteban, K. Garcia, B.M. Jugo dan R. Cisterna. 2012. Human papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical manifestations of HPV related infections in Bilbao, Spain. *Virology Journal* 9: 258
18. Xi, L.F., N.B. Kiviat, A. Hildesheim, D.A. Galloway, C.M. Wheeler, J. Ho Dan N.B. Kiviat. 2007. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 16: 4–10.
19. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Anastos K, Segondy M. 2011. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PloS One*.6(5): e20183.
20. Schiffman, M., dan N. Wentzensen. 2013. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 22: 553–560.
21. Vidal, JCB., S.P. Felix, C.B.P. Chaves, P. Patury, V.F. Franco, E.A. de Morais. 2016. Diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian Patients with Invasive Cervical Cancer *Journal of Medical Virology* 88: 1279–1287

Padang, 6 Agustus 2020

Dekan Fakultas Farmasi

Ketua Peneliti

Prof. Apt. Fatma Sri Wahyuni, Ph.D
NIP. 19740413 200604 2 001

Prof. Apt. Marlina, MS, Ph.D
NIP. 19620311 198901 2 001