

## Laporan Penelitian

**Filogenetik *Human papillomavirus (HPV)* tipe 6 dan tipe 11 pada penderita *recurrent respiratory papillomatosis***

**Lenny Buana Wuriningtyas, Dwi Reno Pawarti, Achmad Chusnu Romdhoni**  
Departemen/SMF Ilmu kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala dan Leher  
Fakultas kedokteran Universitas Airlangga-RSUD Dr. Soetomo  
Surabaya

**ABSTRAK**

**Latar belakang:** Papiloma saluran pernapasan berulang (*recurrent respiratory papillomatosis/RRP*) merupakan neoplasma jinak laring terbanyak akibat infeksi *HPV* tipe 6 dan tipe 11. *RRP* merupakan masalah terkait agresivitas dan terapi. Analisis genetik digunakan untuk membedakan varian *HPV* tipe 6 dan tipe 11. Filogenetik mengevaluasi evolusi *sequen DNA* virus. **Tujuan:** Penelitian bertujuan mengidentifikasi *sequen DNA* dan menganalisis pohon filogenetik *HPV* tipe 6 dan tipe 11 pada papiloma saluran pernapasan berulang. **Metode:** Penelitian merupakan observasional deskriptif *cross sectional*. Analisis menggunakan data pembandingan dari *GenBank*. Filogenetik disusun menggunakan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Didapatkan 15 sampel jaringan papiloma. Dilakukan pemeriksaan *PCR* dan analisis *sequen DNA*. **Hasil:** Dari 15 sampel penelitian (12 laki-laki, 3 perempuan) didapatkan 9 isolat *HPV* tipe 6 (8 varian dan 1 subtipe) dan 4 isolat *HPV* tipe 11 (3 varian dan 1 subtipe). Terdapat mutasi titik yang mengakibatkan munculnya varian dan subtipe *HPV* tipe 6 maupun tipe 11. **Kesimpulan:** *sequen DNA* sampel berasal dari *L1 ORF (Late 1 Open Reading Frame)* yang merupakan kapsid mayor virus. Proses mutasi level gen berupa substitusi, insersi, dan delesi. Subtipe *HPV* tipe 6 dan tipe 11 yang ditemukan diperkirakan sebagai subtipe baru dan belum pernah dilaporkan sebelumnya. Lima varian *HPV* tipe 6 membentuk satu cabang tersendiri pada nomenklatur filogenetik yang sudah ada sehingga diajukan sebagai sublineage baru (*sublineage C*). Seluruh isolat *HPV* tipe 11 membentuk cabang pohon tersendiri dan diajukan sebagai sublineage baru (*sublineage B*).

**Kata kunci:** *HPV* tipe 6 dan 11, variasi *sequen DNA*, pohon filogenetik *HPV* tipe 6 and 11.

**ABSTRACT**

**Background:** *Recurrent respiratory papillomatosis (RRP)* is the most common laryngeal benign neoplasm caused by infection of *HPV* type 6 and 11. *RRP* is still a serious problem related to agresivity and therapy. Genetic analysis used to determine the variant of *HPV* type 6 or 11. Phylogenetic tree used to evaluate the evolution of viral DNA squence. **Purpose:** This study aimed to identify DNA squences and analyse the phylogenetic tree of *HPV* type 6 and 11 in *RRP*. **Methods:** this was a descriptive observational cross sectional study. Data analysis used *GenBank* database and phylogenetic tree was constructed used UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). 15 papillomas biopsies from *RRP* patients subjected *HPV* typing using *PCR* dan DNA sequencing analysis. **Result:** From 15 patients with *RRP* (12 male, 3 female), there were 9 isolates *HPV* type 6 (8 variants, 1 subtype) and 4 isolates *HPV* type 11 (3 variants, 1 subtype). There was a point mutation in *HPV* type 6 and 11. **Conclusion:** *L1 ORF (Late 1 Open Reading Frame)* sequentials DNA samples was virus major capsid. There were mutational process at gene level (substitution, insertion, deletion). Subtype of *HPV*-6 and 11, might be new ones, and had not been reported yet. Five variants of *HPV* type 6 constructed a different lineage in phylogenetic and it is proposed to be C sublineage. All samples *HPV* type 11 proposed as B sublineage.

**Keywords:** *HPV* type 6 and 11, DNA sequences variations, phylogenetic trees *HPV* type 6 and 11.

**Alamat Korespondensi:** Lnywuri@yahoo.com

## PENDAHULUAN

Papiloma saluran pernapasan berulang (*RRP*) pertama kali ditemukan oleh Sir Morrell Mackenzie pada akhir tahun 1800. *Human Papillomavirus (HPV)* baru diketahui sebagai penyebab *RRP* pada tahun 1990-an. Infeksi *HPV* dapat terjadi pada saluran napas bagian atas dan sering berulang pada laring dan trakea.<sup>1</sup>

Papiloma saluran pernapasan berulang merupakan tantangan di bidang Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala dan Leher (THT-KL) karena penyakit ini sulit diprediksi. *RRP* mengalami regresi seiring waktu pada beberapa pasien sedangkan pasien lain mengalami agresivitas, berulang kali kambuh memerlukan tindakan operasi *debulking*. *RRP* memiliki potensi menyebar sampai trakea dan saluran pernapasan, menimbulkan obstruksi jalan napas, kemungkinan kematian, dan memberi dampak besar segi ekonomi berupa biaya pengobatan mahal karena diperlukan tindakan pembedahan berulang-kali serta belum ditemukan pengobatan kuratif definitif.<sup>1</sup> Kemungkinan degenerasi maligna pada *RRP* sangat jarang yaitu kurang dari 1%.<sup>1,2</sup>

*Human Papillomavirus* dianggap sebagai penyebab neoplasia tipe jinak maupun ganas pada kulit dan mukosa.<sup>3</sup> Tipe *HPV* yang sudah teridentifikasi sejumlah 120 tipe sehingga *HPV* merupakan salah satu virus dengan diversitas besar.<sup>4</sup> *Human Papillomavirus* tipe 6 dan tipe 11 tersering ditemukan pada *RRP*.<sup>1</sup> *Human Papillomavirus* menginfeksi jaringan melalui mikrotrauma dengan dugaan keterlibatan reseptor integrin dan heparin sulfat.<sup>5</sup>

Studi diversitas sekuen genom penting untuk menegakkan *database* yang bermanfaat dalam diagnostik dengan pendekatan *DNA*, studi genotip-fenotip, serta analisis filogenetik. Varian dan sub tipe *HPV* memegang peranan penting sebagai petunjuk memahami evolusi *HPV* dan untuk mengetahui genom *intermediate* yang berkaitan dengan perbedaan tipe. Variasi sekuen *DNA* pada studi epidemiologi digunakan

sebagai penanda untuk melacak pola penyebaran virus pada populasi dan melihat hubungan diversitas genom dengan diversitas fenotip, misalnya berupa perbedaan secara biologis maupun patologi. Penelitian *DNA* juga memberikan peluang untuk mengetahui hubungan variasi genom dengan tingkat keparahan penyakit.<sup>3</sup> Karakteristik molekuler dan penanda fungsional *HPV* dapat membantu memahami mutasi *DNA* bermakna, penegakan diagnosis dan terapi.<sup>6</sup> Kriteria tipe *HPV* terbukti stabil dan bermanfaat bagi penelitian dasar, klinisi, ahli bidang vaksinasi dan epidemiologi.<sup>7</sup>

Perkembangan nomenklatur *HPV* masih tertinggal tetapi saat ini sudah mulai diterapkan. Penelitian varian *DNA HPV* berkaitan dengan nomenklatur berdasarkan pohon filogenetik dan dapat digunakan untuk membedakan patogenitas seperti *HPV* tipe 16 pada populasi non Eropa lebih tinggi resiko kanker serviks dibanding varian pada populasi Eropa. Varian spesifik baru bersifat stabil yang muncul pada galur *HPV* berhubungan dengan perubahan polimorfisme genom.<sup>7</sup>

Tujuan penelitian adalah mempelajari sekuen *DNA* dan filogenetik *HPV* tipe 6 dan tipe 11 serta identifikasi perubahan genetik yang terjadi dan pola penyebaran kekerabatan isolat virus sehingga dapat digunakan sebagai dasar evaluasi patogenitas, pengembangan terapi dan vaksinasi.

## METODE

Rancangan penelitian adalah observasional deskriptif *cross sectional* untuk mengetahui susunan sekuen *DNA*, mutasi *DNA*, sub tipe serta filogenetik *HPV* tipe 6 dan tipe 11 diambil dari sampel spesimen papiloma penderita *RRP*. Penelitian dilakukan di Departemen/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya pada bulan Januari sampai Juli 2013. Sampel jaringan spesimen papiloma laring diperoleh melalui operasi bedah laring

mikroskopik (BLM) penderita *RRP* di Instalasi Bedah Pusat (IBP) RSUD Dr. Soetomo. Pemeriksaan *PCR* dan *HPV DNA sequencing* dilaksanakan di Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga.

Populasi penelitian adalah penderita *RRP* yang datang berobat ke URJ THT-KL RSUD Dr. Soetomo, dan menjalani (BLM) lebih dari 1 kali di IBP RSUD Dr. Soetomo. Berdasarkan perhitungan diperoleh besar sampel sebesar 15. Sampel penelitian diambil secara *consecutive sampling*. Variabel penelitian adalah sekuen *DNA HPV* tipe 6-tipe 11 dan filogenetik *HPV* tipe 6 dan tipe 11.

Sekuen *DNA* adalah amplifikasi urutan nukleotida yang diperoleh melalui teknik *PCR* konvensional *real time* dilanjutkan *DNA sequencing* melalui program *BlastN*. Primer *PCR* dan *DNA sequencing HPV* tipe 6 adalah 5'-TAG GGG ACG GTC CTC TAT TC-3' atau 5'-GCA ACA GCC TCT GAG TCA CA-3' dan untuk *HPV* tipe 11 adalah 5'-GAA TAC ATG CGC CAT GTG GA-3' atau 5'-AGC AGACGT CCG TCC TCG AT-3'. Primer *HPV* global (MY09/11) adalah 3'-CGT CCA CAA GAG GGA TAC TGATC-5' dan 3'-GCA CCA GGG ATC ATA ACT AAT GG-5'. Primer yang digunakan adalah sekuen regio L1 *ORF DNA HPV* sebagai pengkode kapsid mayor penanda tipe *HPV*. L1 *ORF DNA HPV* berada dalam nukleus dan menghasilkan protein L1. Protein L1 (55-60 kDa) berfungsi sebagai penyusun partikel protein kapsid mayor. Partikel protein kapsid mayor merupakan penentu tipe, sub tipe maupun varian *HPV*. Oleh sebab itu *L1 ORF DNA* yang teridentifikasi dapat dipergunakan untuk menentukan tipe *HPV* dengan membandingkan homologi variasi *DNA HPV* pada GenBank. Analisis homologi sekuen *DNA* disebut tipe lain apabila memiliki persentase 80-90%, sebagai sub tipe bila presentase 90-97% dan varian bila 98-100%.

Filogenetik disusun menggunakan metode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)*. Analisis metode ini melalui perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)* versi 5.1 dan *GENETYX TREE* versi 10.0.

Data dasar diperoleh melalui lembar pengisian data berdasarkan rekam medis penderita selama berobat di URJ THT-KL RSUD Dr. Soetomo. Alat pemeriksaan *PCR* menggunakan mesin *PCR Thermal Cycler* dari Bioneer, primer *HPV reagen 2x PCR master mix* merek Intron.

## HASIL

Selama periode waktu penelitian didapatkan 15 sampel dengan distribusi jenis kelamin 12 laki-laki dan 3 perempuan. Sekuen *DNA* sampel berbentuk urutan pasangan basa nukleotida dilakukan homologi dengan referensi data GenBank (Referensi GenBank *HPV* tipe 6 melalui no. Akses FR751320-FR751338, JN252320.1, JN252322.1. Referensi *HPV* sub tipe 6a no. Akses L41216, *HPV* sub tipe 6b no. Akses X00203, dan *HPV* sub tipe 6vc no. akses AF092932. Referensi untuk *HPV* tipe 11 melalui no. Akses EF626589.1, FR872727.1, HE611271.1, HE574701-HE574705, JQ773412.1, FN870022.1, JN644142.1)

### Sekuen *DNA HPV*

Data urutan pasang basa yang diperoleh digunakan untuk menganalisis mutasi genetik. Mutasi genetik berupa insersi, delesi, maupun substitusi (transisi atau transversasi) menyebabkan variasi genetik *HPV*. Persentase homologi sekuen *DNA HPV* sampel penelitian disajikan pada tabel 1.

**Tabel 1. Homologi sekuen DNA HPV tipe 6 dan tipe 11 penderita RRP di Departemen/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya**

No. Sampel	Homologi sekuen DNA (%)	Perbedaan urutan pasang basa (%)	Tipe HPV	Klasifikasi
1	99	1	HPV tipe 11	Varian
2	99	1	HPV tipe 11	Varian
3	99	1	HPV tipe 6	Varian
4	84	16	HPV tipe lain	Tipe yang berkaitan dekat HPV tipe 6
5	99	1	HPV tipe 11	Varian
6	99	1	HPV tipe 6	Varian
7	97	3	HPV tipe 6	Subtipe
8	99	1	HPV tipe 6	Varian
9	100	0	HPV tipe 6	Varian
10	99	1	HPV tipe 6	Varian
11	98	2	HPV tipe 6	Varian
12	99	1	HPV tipe 6	Varian
13	99	1	HPV tipe 6	Varian
14	87	13	HPV tipe lain	Tipe yang berkaitan dekat HPV tipe 6
15	95	5	HPV tipe 11	Subtipe

**Tabel 2. Homologi HPV subtipe 6a, 6b dan 6vc penderita RRP di Departemen/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya**

No. Sampel	Homologi (%)			Perbedaan (%)		
	Subtipe 6a	Subtipe 6b	Subtipe 6vc	Subtipe 6a	Subtipe 6b	Subtipe 6vc
7	96	96	96	4	4	4

Data penelitian menunjukkan bahwa dari 15 sampel dengan hasil homologi sekuen DNA diketahui bahwa 8 sampel varian HPV tipe 6, 3 sampel varian HPV tipe 11, 1 sampel

HPV subtipe 6, 1 sampel HPV subtipe 11, 2 sampel tipe lain yang berdekatan dengan HPV tipe 6. Data homologi HPV subtipe 6a, 6b, dan 6vc disajikan pada tabel 2.

**Tabel 3. Jenis mutasi subtipe dan varian HPV tipe 6 penderita RRP di Departemen/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya**

No. Sampel	Jenis Mutasi Substitusi		Delesi		Inseri	
	Jumlah (bp*)	Letak (nt**)	Jumlah (bp*)	Letak (nt**)	Jumlah (bp*)	Letak (nt**)
3	3 bp (transisi 1 bp, transversi 2 bp)	9-28 nt, 69-128 nt	-	-	-	-
6	Transversi 3 bp	9-68 nt	-	-	-	-
7	Transversi 5 bp	6-65 nt, 66-125 nt, 126-185 nt	-	-	6	6-65 nt, 366-425 nt, 426-436 nt
8	Transversi 1 bp	6-65 nt	-	-	2	426-433 nt
9	-	-	-	-	-	-
10	2 bp (transisi 1 bp, transversi 1 bp)	3-62 nt	-	-	2	363-422 nt, 423-434 nt
11	3 bp (transisi 1 bp, transversi 2 bp)	10-69 nt, 430-436 nt	-	-	3	10-69 nt, 370-429 nt
12	2 bp (transisi 1 bp, transversi 1 bp)	29-88 nt	-	-	2	389-433nt
13	Transisi 1 bp	32-91 nt	-	-	2	-

\*bp: base pair ; \*\*nt: nukleotida

Homologi sekuen *HPV DNA* 1 sampel yang merupakan *HPV* subtype 6 (97% homolog *HPV* tipe 6) dengan subtype 6a, 6b dan 6vc pada referensi menunjukkan perbedaan sebesar >2%. Hal ini menggambarkan bahwa sampel

tersebut dapat merupakan suatu subtype tersendiri yang ditemukan pada penelitian. Jenis mutasi yang ditemukan pada sekuen *DNA HPV* tipe 6 sampel penelitian disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 4. Jenis mutasi subtype dan varian *HPV* tipe 11 penderita *RRP* di Departemen/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya**

No. Sampel	Jenis Mutasi					
	Substitusi		Delesi		Insersi	
	Jumlah (bp*)	Letak (nt**)	Jumlah (bp*)	Letak (nt**)	Jumlah (bp*)	Letak (nt**)
1	-	-	-	-	3	376-435 nt
2	-	-	-	-	1	370-429 nt
5	-	-	-	-	2	365-403 nt
15	16 bp (transisi 7 bp, transversi 9 bp)	3-62 nt, 123-182 nt			2	423-437 nt

\*bp: base pair ; \*\*nt: nukleotida

Jenis mutasi sekuen *DNA HPV* tipe 6 sampel penelitian didapatkan berupa substitusi pada delapan sampel. Substitusi hanya jenis transisi terjadi pada satu sampel, hanya jenis transversi pada tiga sampel, dan kombinasi transisi-

transversi pada empat sampel. Jenis mutasi susunan nukleotida berupa insersi dijumpai pada enam sampel. Jenis mutasi sekuen *DNA HPV* tipe 11 disajikan pada Tabel 4.

**Tabel 5. Variasi HPV tipe 6 dan klinis pada penderita RRP di Departemen/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya**

No. Sampel	Klasifikasi tipe HPV	□ mutasi (bp)	Kategori RRP	Klinis			
				Total operasi	Frekuensi operasi terbanyak (per tahun)	Riwayat trakeotomi	Penyebaran RRP ekstralaringeal
<i>HPV</i> tipe 6							
3	Varian	3	<i>JORRP</i> (<3 tahun)	39	3	ya	+
6	Varian	3	<i>JORRP</i> (≥3 tahun)	49	3	ya	(sekitar stoma, trakea)
7	Subtipe	11	<i>JORRP</i> (≥3 tahun)	15	1	-	-
8	Varian	3	<i>JORRP</i> (≥3 tahun)	4	2	ya	-
9	Varian	-	<i>JORRP</i> (≥3 tahun)	5	2	ya	-
10	Varian	4	<i>JORRP</i> (<3 tahun)	13	6	ya	-
11	Varian	6	<i>JORRP</i> (≥3 tahun)	4	3	ya	-
12	Varian	4	<i>AORRP</i> (>12 tahun)	4	2	ya	+
13	Varian	3	<i>JORRP</i> (≥3 tahun)	17	3	ya	(sekitar stoma)
<i>HPV</i> tipe 11							
1	Varian	3	<i>JORRP</i> (<3 tahun)	120	4	ya	+
2	Varian	1	<i>JORRP</i> (≥3 tahun)	11	4	ya	(sekitar stoma, trakea, bronkus)
5	Varian	2	<i>JORRP</i> (≥3 tahun)	23	2	ya	-
15	Subtipe	18	<i>AORRP</i> (>12 tahun)	26	3	ya	-

Data jenis mutasi yang didapatkan yaitu insersi (1-3 bp) pada tiga sampel varian *HPV* tipe 11 dan kombinasi substitusi (transisi dan transversi) dengan insersi (2 bp) pada satu sampel yang merupakan *HPV* subtipe 11. Variasi *HPV* tipe 6 dan klinis penderita *RRP* disajikan pada tabel 5.

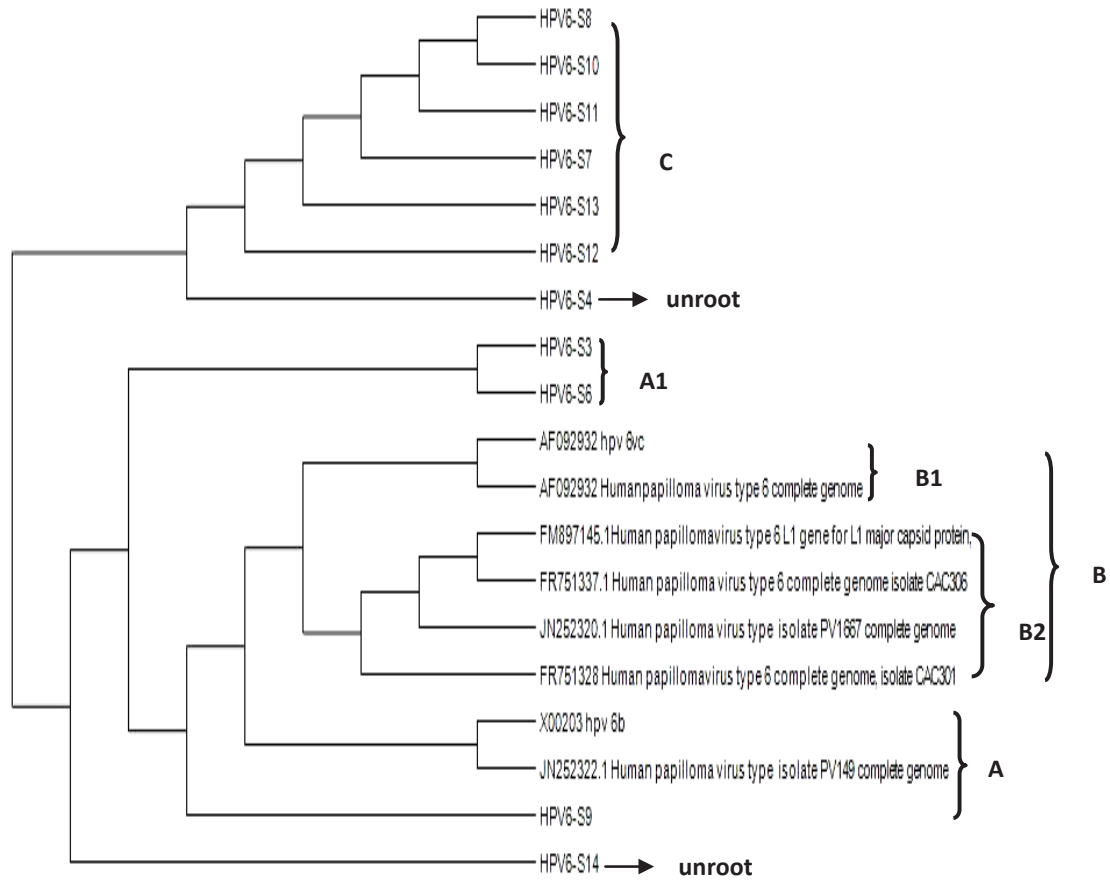
Hasil penelitian terkait data dasar dengan homologi sekuen serta klasifikasi *HPV* tipe 6 menunjukkan terdapat satu sampel yang dikategorikan sebagai subtipe *HPV*-6 yang memiliki klinis paling baik yaitu memiliki frekuensi operasi terkecil, tidak ada riwayat trakeotomi dan tidak ada penyebaran *RRP* ekstralaringeal. Pada delapan sampel dengan klasifikasi homologi sekuen sebagai varian *HPV* tipe 6 didapatkan diversitas klinis yang bervariasi. Evaluasi data dasar homologi

sekuen *DNA HPV* tipe 11 menunjukkan suatu variasi diversitas klinis antara sekuen dengan kategori varian maupun subtipe. Pada empat sampel penelitian tidak didapatkan perbedaan yang dominan antara data klinis dikaitkan klasifikasi *HPV* tipe 11.

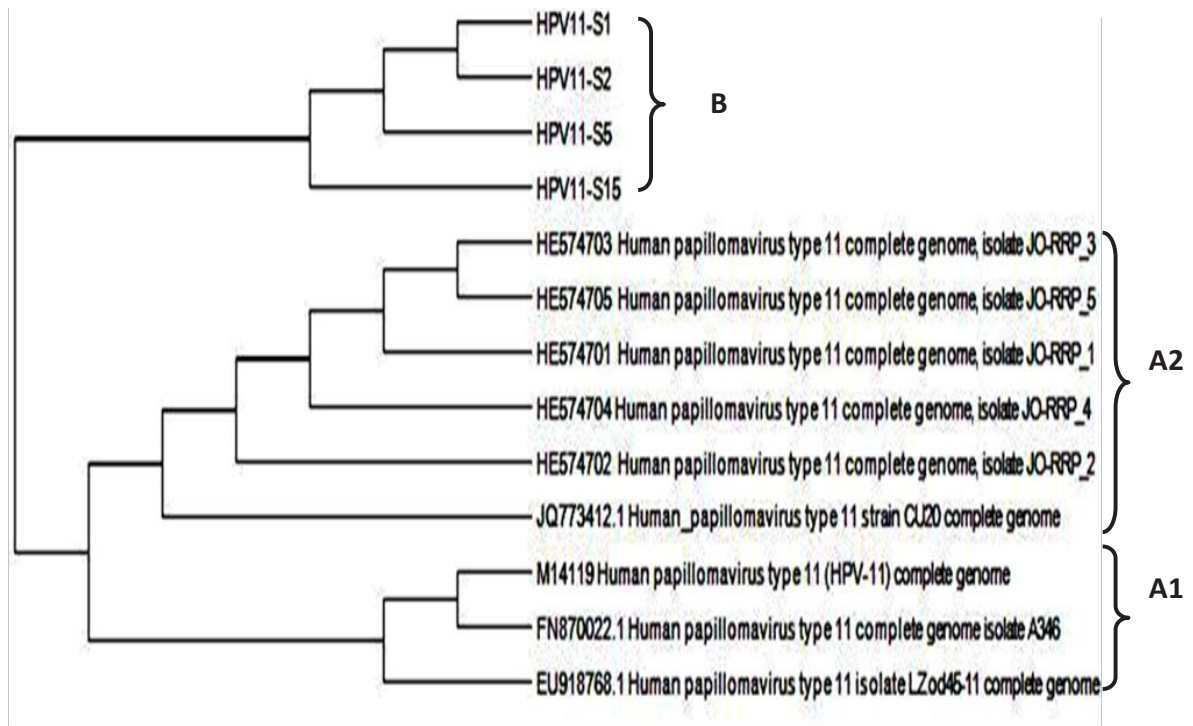
### Konstruksi filogenetik HPV tipe 6 dan tipe 11

Hasil konstruksi pohon filogenetik *HPV* tipe 6 (Gambar 1) diperoleh 6 sampel penelitian termasuk dalam satu *lineage* (C) tersendiri. Dua sampel yang lain (*HPV*6-S3 dan S6) masuk dalam *sublineage* tersendiri (A1) pada *lineage* yang sama dengan referensi data pembandingan dari GenBank (A,B). Nilai *mean distance dissimilarity lineage* C dengan *lineage* referensi berdasarkan perhitungan aritmatika





Gambar 1. Pohon filogenetik HPV tipe 6



Gambar 2. Pohon filogenetik HPV tipe 11

sebesar 0,04. Pohon filogenetik *HPV* tipe 6 pada penelitian ini didapatkan dua *clade* yaitu satu *clade* (*HPV6-S8* dan *S10*) pada *lineage C* serta satu *clade* (*HPV6-S3* dan *S6*) pada *sublineage A1*. Hasil konstruksi pohon filogenetik *HPV* tipe 11 diperoleh 4 sampel penelitian termasuk dalam satu *lineage* (B) tersendiri dibandingkan dengan data referensi sekuen *DNA* dari Genbank. Nilai *mean distance (dissimilarity)* antar *lineage* berdasarkan perhitungan aritmatika sebesar 0,302. Pada pohon filogenetik *HPV* tipe 11 didapatkan satu *clade* berisi dua sampel penelitian (*HPV11-S1* dan *S2*) dengan perbedaan *mean* 0,0012.

## DISKUSI

### Sekuen *DNA HPV* tipe 6 dan tipe 11

Data yang diperoleh menunjukkan delapan sekuen *DNA* sampel memiliki homologi persamaan antara 98-100% (selisih perbedaan susunan nukleotida <2%) dengan *HPV* tipe 6. Perbedaan sebesar <2% ini menunjukkan bahwa *HPV* tipe 6 pada delapan sampel penelitian merupakan varian dari data referensi. Satu sampel memiliki homologi sebesar 97% dikategorikan sebagai subtipe *HPV-6*. Data empat sampel termasuk dalam tipe 11 menunjukkan tiga sampel memiliki homologi >98% sehingga dikelompokkan menjadi varian *HPV* tipe 11. Satu sampel yang memiliki homologi 95% dengan referensi *HPV* tipe 11 (90-98%) sehingga dapat dianggap sebagai subtipe. Pada dua sampel penelitian diperoleh homologi dengan *HPV* tipe 6 sebesar 84% dan 87%. Kemungkinan sekuen *DNA HPV* dari dua sampel tersebut merupakan tipe lain yang berkaitan dekat dengan *HPV* tipe 6.

Virus dipandang sebagai varian atau *polimorf* apabila sekuen *DNA* menunjukkan homologi lebih besar dari 98% dan diklasifikasikan sebagai subtipe apabila memiliki persamaan homologi antara 90%-

98%. Penelitian oleh Burk<sup>7</sup> mendapatkan rentang nilai heterogenitas maksimum perbedaan sekuen antar varian dalam satu tipe *HPV* antara 0,6%-2,3%.<sup>4</sup> Tipe yang berkaitan dekat (80-90% identik) diklasifikasikan sebagai anggota spesies sama dan memiliki kemiripan *tissue tropism*, manifestasi penyakit dan patogenitas.<sup>8</sup>

Hasil pemeriksaan *DNA sequencing* 15 sampel penelitian menunjukkan 9 sampel (60%) merupakan *HPV* tipe 6, empat sampel (26,67%) lain tipe 11 dan dua sampel merupakan *HPV* tipe lain (13,33%). Hasil tersebut menunjukkan bahwa infeksi *HPV* tipe 6 lebih banyak terjadi dibanding tipe 11. Hal ini berhubungan dengan gambaran distribusi prevalensi *HPV* tipe 6 dalam populasi dikaitkan ukuran sampel. Transmisi virus *HPV* pada *RRP* berhubungan dengan infeksi *HPV* pada genital sehingga jumlah prevalensi *HPV* tipe 6 yang lebih banyak kemungkinan juga terkait dengan prevalensinya pada kondiloma akuminata genital.

Homologi satu sekuen yang dikategorikan sebagai subtipe *HPV-6* (homologi sebesar 97%) dibandingkan dengan *HPV* subtipe 6a, subtipe 6b, dan subtipe 6vc terdapat perbedaan homologi >2% dengan data referensi subtipe *HPV-6* Genbank, sehingga sampel tersebut bukan merupakan varian *HPV* subtipe 6a, subtipe 6b maupun subtipe 6vc. Isolat satu sampel tersebut kemungkinan merupakan subtipe jenis baru yang diketemukan pada penelitian. Hal ini memerlukan evaluasi lebih lanjut dengan pemeriksaan *whole genom* dari isolat tersebut.

Mutasi yang terjadi pada isolat sampel terdiri dari insersi dan substitusi. Besar jumlah nukleotida yang mengalami mutasi ini menyebabkan nilai homologi sekuen *DNA* sampel dengan referensi menjadi bervariasi. Mutasi berupa kombinasi insersi dan substitusi pasangan nukleotida terjadi



pada enam sekuen *DNA HPV* tipe 6 sampel penelitian. Mutasi jenis substitusi transversal paling banyak terjadi. Hasil penelitian berbeda dengan disebutkan, bahwa empat tipe transisi ( $A \rightarrow G$ ,  $G \rightarrow A$ ,  $C \rightarrow T$ ,  $T \rightarrow C$ ) lebih sering terjadi dibanding 8 tipe transversi ( $A \rightarrow C$ ,  $A \rightarrow T$ ,  $C \rightarrow G$ ,  $G \rightarrow T$ ), dan kebalikannya.<sup>9</sup>

Proses mutasi yang terjadi dapat mempengaruhi produk asam amino yang dihasilkan oleh *DNA* sehingga mengubah karakteristik dari virus. Mutasi yang terjadi pada tujuh sampel dengan klasifikasi varian *HPV* tipe 6 kemungkinan merupakan *silence mutation* karena hanya menghasilkan struktur kapsid yang diidentifikasi sebagai varian. Satu sampel subtipe *HPV* tipe 6 dengan homologi 97% mengalami mutasi transversal sebanyak 5 bp.

Mutasi transversal terjadi pada nukleotida urutan pertama dan kedua dari kodon akan menghasilkan suatu *missense mutation* yang mempengaruhi fenotip dari virus sebagai subtipe. Pada sampel *HPV* tipe 6, mutasi jenis transisi lebih sedikit terjadi dibandingkan transversal. Penelitian Danielewski<sup>10</sup> didapatkan bahwa pada *HPV* tipe 11 terjadi variasi nukleotida tunggal sebanyak 13 bp, 1 insersi, dan 3 delesi. Variasi ini berbeda dengan hasil penelitian tetapi tidak memiliki nilai bermakna oleh karena dilihat dari % perbedaan homologi diperoleh rentang yang sama yaitu <2%.

Perbedaan sekuen *DNA* antar tipe yaitu 80-90% menggambarkan bahwa sekuen tersebut merupakan anggota spesies yang sama dalam taksonomi.<sup>8</sup> *Human papillomavirus* tipe 6 merupakan anggota spesies 10 dari genus *alpha papillomavirus*. *Human papillomavirus* tipe lain yang memiliki sifat *low risk mucosal infection* serta merupakan anggota spesies 10 adalah *HPV* tipe 13, 44 dan 74.<sup>11</sup> Kemungkinan dua sampel penelitian dengan nilai homologi

rendah merupakan *HPV* pada spesies 10 genus *alpha papillomavirus*.

Data variasi *HPV* tipe 6 dengan klinis sampel penelitian diperoleh bahwa tingginya frekuensi operasi pada sampel ini kemungkinan lebih terkait dengan usia diagnosis dibandingkan dengan pengaruh varian sekuen *DNA HPV* tipe 6. Riwayat tindakan trakeotomi dipengaruhi progresifitas penyakit terkait dengan usia diagnosis sehingga keterlibatan subtipe sekuen *DNA HPV* tipe 6 masih memerlukan evaluasi lebih lanjut.<sup>12</sup> Pada dua sampel dengan diperoleh data penyebaran ekstralaringeal, kemungkinan bukan terkait klasifikasi varian *HPV* tipe 6 maupun usia diagnosis tetapi lebih dipengaruhi oleh mikrotrauma dan terbentuknya daerah *squamociliar junction*.<sup>13</sup>

Perubahan genotip tanpa disertai perubahan fenotip maupun produk asam amino dapat dikategorikan sebagai *silent mutation*.<sup>14</sup> Penelitian oleh Heinzel<sup>4</sup> mendapatkan data bahwa *silent mutation* pada varian *HPV* tidak merubah sekuen produk asam amino, sehingga terdapat sedikit keterkaitan mutasi fungsional bermakna dengan observasi epidemiologi. Terdapat korelasi yang kecil antara variasi genetik pada regio *LCR HPV* dengan patologi klinis penderita. Perbedaan fenotip dari varian *HPV* tipe 6 dan tipe 11 masih belum didukung oleh penelitian eksperimental maupun observasi klinis. Oleh karena penelitian pada tahap ini masih diperlukan pemeriksaan sekuen *whole genome* varian *HPV* untuk dapat mengidentifikasi perubahan mutasi fungsional. Korelasi keterkaitan subtipe terhadap pengaruh klinis penderita masih memerlukan penelitian lebih lanjut dengan melibatkan sampel yang lebih banyak. *Single nucleotide polymorfism* dapat terjadi pada seluruh regio genom *HPV*, sehingga diperlukan suatu sekuen *DNA* seluruh

regio untuk dapat mengevaluasi keterkaitan patologi klinis dengan variasi genetik *DNA HPV*.

### Filogenetik *HPV* tipe 6 dan tipe 11

Pohon filogenetik disusun menggunakan *tree inference method* jenis *clustering method*.<sup>15,16</sup> *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* merupakan metode agglomeratif sederhana atau *hierarchial clustering* pada bioinformatik untuk menyusun pohon fonetik (fonogram) dengan asumsi bahwa populasi penelitian memiliki rata-rata evolusi yang konstan. Saat ini metode *UPGMA* paling sering digunakan menyusun pohon filogenetik oleh karena algoritma rekonstruksi filogenetik yang dihasilkan sudah lebih modern.<sup>17</sup>

Pada pohon filogenetik *HPV* tipe 6 terdapat enam sampel penelitian termasuk dalam satu *lineage* tersendiri dibanding referensi. Berdasarkan nilai *mean distance* (0,04) maka *lineage* enam sampel penelitian tersebut diajukan sebagai *lineage* tersendiri (*lineage C*). Dua sampel penelitian diajukan termasuk dalam *sublineage* (A1) tersendiri dengan *mean distance similarity* dengan *lineage A* referensi sebesar 0,008. Pohon filogenetik *HPV* tipe 6 penelitian didapatkan dua *clade* yaitu *clade* pertama pada *lineage C* (*HPV6-S8* dan 10) dan *clade* kedua pada *sublineage A1* (*HPV6-S3* dan S6).

Pada *clade* kedua terdapat *taxa HPV6-S3* dan *HPV6-S6* (nilai aritmatik *mean distance* 0,000150). *Clade* kedua ini terpisah dari kelompok referensi *HPV* tipe 6 GenBank. Satu sampel (*HPV6-S9*) memiliki *root* yang sama dengan referensi data GenBank dan memiliki kekerabatan dekat terhadap *clade* yang terdiri dari referensi *taxa HPV* subtype 6b (X00203) dan *HPV* tipe 6 (JN252322) (nilai aritmatik *mean distance* sebesar 0,004020). Hasil filogenetik *HPV* tipe 6 penelitian yang dilakukan menunjukkan

kedekatan secara filogenetik isolat sampel *HPV6-S3* dan *HPV6-S6* dengan referensi (AF092932) dan isolat sekuen dari Eropa (Slovenia, FM897145) serta satu isolat sampel *HPV6-S9* dengan isolat yang berasal dari Afrika (JN252322.1).

Pada pohon filogenetik *HPV* tipe 11 sekuen *DNA* penelitian didapatkan 4 sampel penelitian dengan homologi 90-100% berada pada satu *root lineage* tersendiri (*lineage B*) dibandingkan data referensi. Pada pohon filogenetik *HPV* tipe 11 didapatkan satu *clade* yang terdiri dari *taxa HPV11-S1* dan *HPV11-S2*. Nilai aritmatik *mean distance similarity* antara dua *taxa* tersebut adalah 0,001849. Sekuen *DNA HPV11-S5* memiliki kekerabatan lebih dekat dengan sekuen *DNA* pada *clade* dibandingkan dengan *HPV11-S15*. Sekuen *DNA HPV11-S15* memiliki *similarity* yang lebih jauh dari *clade* dengan nilai aritmatik *mean distance* 0,304009. Hal ini disebabkan berdasarkan homologi sekuen *DNA HPV11-S15* merupakan suatu subtype.

Pada pohon filogenetik *HPV* tipe 11, didapatkan bahwa seluruh sampel penelitian memiliki kedekatan lebih besar dengan isolat dari Eropa (Hungaria, HE574701-HE574705) dibandingkan dengan isolat sampel dari Asia (Cina, EU918768.1 dan Thailand JQ773412.1).

Penelitian Heinzl<sup>3</sup> menunjukkan suatu korelasi minor antara varian *HPV* dengan asal geografi dan etnis karena masih belum dapat dipastikan penyebab penyebaran varian virus terjadi selama proses evolusi atau terkait mobilitas etnis manusia ke seluruh benua. Penelitian lain di Australia oleh Danielewski,<sup>10</sup> juga menunjukkan sebaran isolat *HPV* dengan filogenetik yang tidak terbatas pada letak geografi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan yaitu bahwa sebaran geografi memiliki kedekatan filogenetik yang rendah

terhadap varian *HPV*. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan Sichero dan Villa<sup>4</sup> yang membagi isolat *HPV* ke dalam nomenklatur berdasarkan letak geografi yaitu bahwa isolat Cina dan Jepang spesifik hanya di benua Asia.

Sebagai kesimpulan, penelitian yang telah dilakukan ini menghasilkan suatu data referensi sekuen *DNA* dan filogenetik *HPV* tipe 6 dan 11 beserta varian dan subtipe nya, yang terjadi oleh karena proses mutasi titik pada tingkat gen. Perubahan urutan basa L1 ORF akibat mutasi ini menyebabkan terbentuknya suatu subtype baru pada *HPV* tipe 6 maupun tipe 11. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pola penyebaran evolusi *HPV* tidak terkait dengan letak geografi. Mutasi pada tingkat gen yang terjadi apabila dikaitkan terhadap klinis dari masing-masing sampel tidak menunjukkan hubungan sebab akibat yang kuat, sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui keterlibatan variasi genetik terhadap klinis *RRP*.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Larson DA, Derkay CS. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS* 2010;118:450-4.
- Wiatrak BJ. Recurrent respiratory papillomatosis. In: Graham JM, Scadding GK, Bull PD, editors. *Pediatric ENT*. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg; 2007. p. 255-65
- Heinzel PA, Chan SY, Ho L, O'connor M, Balaram P, Campo MS, et al. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J clin microbiol* 1995; 33(7): 1746–54.
- Sichero L, Villa LL. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39(6):707-17.
- Goon P, Sonnex C, Jani P, Stanley M, Sudho H. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265:147–51.
- Chansaeroj J, Theamboonlers A, Junyangdikul P, Supiyaphan P, Poovorawan Y. Whole genome analysis of human papillomavirus genotype 11 from cervix, larynx and lung. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2012; 13:2619-23.
- Burk RD, Chen Z, Harari A, Smith BC, Koejan BJ, Maver PJ, et al. Classification and nomenklatur system for human alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV 6 and HPV 11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatoven APA* 2011; 20(3):113-23.
- Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS* 2010; 118:422-49.
- Brinkman FS, Leipe DD. Phylogenetic analysis. In: Baxevanis AD, Oullette BFF, editors. *Bioinformatics: a practical guide to analysis of gene and proteins*. 2<sup>nd</sup> ed. Canada: John wiley & sons, 2001. p.323-58
- Danielewski JA, Garland SM, McCloskey J, Hillman RJ, Tabrizi SN. Human papillomavirus type 6 and 11 genetic variants found in 71 oral and anogenital epithelial samples from australia. *PLoS ONE* 2013; 8(5):1-9.
- Dahlgren L. Studies on the presence and influence of human papillomavirus (HPV) in head and neck tumors. Stockholm: Reproprint AB, 2005. p.1-68
- Lee JH, Smith RJ. Recurrent respiratory papillomatosis: pathogenesis to treatment. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 13:354-9.
- Derkay CS, Wiatrak B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *Laryngoscope* 2008; 118:1236-47.