

Genetic variation analysis of the E6 HPV 16 gene using RFLP in silico

Analisis Variasi Genetik Gen E6 HPV 16 Menggunakan RFLP Secara *in Silico*

Silvy Annisa^{1*}, Atika Ayu Rahmawati¹, Nadira¹, Fidia Aura Khairani¹, Afifatul Achyar¹

¹ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

*Correspondence author: annisasilvy@gmail.com

Abstract

Cervical cancer is cancer that attacks epithelial cells or the outer surface layer of the cervix. This cancer is most commonly caused by the high risk type of Human Papillomavirus. The RFLP method uses restriction enzymes to cut certain nucleotide sequences at specific positions that produce fragments of different lengths. The purpose of this study was to determine the polymorphism that occurs in the E6 gene of the HPV 16 virus. This research was conducted using RFLP in silico. Virtual descriptive methods are used to analyze data and collect information about the object of study. The restriction enzyme *HpaII* was used in this study. The results showed that there were two alleles (A1 and A2) out of a total of 15 sequences of the E6 HPV 16 gene in Popset 636528409 indicating that there was a genetic variation in the gene.

Key words *Genetic variation, RFLP in silico, HPV 16*

Abstrak

Kanker serviks adalah kanker yang menyerang sel epitel atau lapisan permukaan luar leher rahim. Kanker ini paling umum disebabkan oleh Human Papillomavirus tipe *high risk*. Metode RFLP menggunakan enzim restriksi untuk memotong urutan nukleotida tertentu pada posisi tertentu yang menghasilkan fragmen dengan panjang yang berbeda. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui polimorfisme yang terjadi pada gen E6 virus HPV 16. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan RFLP secara *in silico*. Metode deskriptif virtual digunakan untuk menganalisis data dan mengumpulkan informasi tentang objek penelitian. Enzim restriksi *HpaII* digunakan dalam penelitian ini. Hasil penelitian menunjukkan ada dua alel (A1 dan A2) dari total 15 sekuen gen E6 HPV 16 dalam Popset 636528409 yang menandakan bahwa terdapat variasi genetik pada gen tersebut.

Kata kunci *Variasi genetik, RFLP in silico, HPV 16*

Pendahuluan

Salah satu virus penyebab infeksi menular seksual yang paling umum adalah Human Papillomavirus (HPV) genital. Human papillomavirus diklasifikasikan menjadi beberapa jenis, salah satunya adalah HPV 16 yang termasuk dalam jenis risiko tinggi dan terkait dengan beberapa kanker, seperti kanker serviks dan beberapa kanker lainnya. Kanker serviks adalah kanker yang muncul di epitel atau lapisan permukaan luar leher rahim. Sebesar 99,7% kanker serviks disebabkan oleh infeksi HPV (Novalia, 2023). Leher rahim berfungsi untuk menghubungkan rahim dengan vagina. Pertumbuhan sel yang tidak normal menyebabkan kerusakan atau tersumbatnya serviks, yang dikenal sebagai kanker serviks (Edianto, 2016).

World Health Organization (WHO) menyebutkan bahwa, pada tahun 2020, sebanyak 396,914 juta perempuan meninggal karena kanker serviks dan 234,511 juta perempuan di seluruh dunia meninggal akibatnya. Dengan 36,633 kasus, kanker serviks menempati urutan kedua dengan 9,2% dari semua jenis kanker. Di Asia, 312.990 kasus, atau setengah dari total kasus kanker serviks, dilaporkan, dan setengahnya

mengakibatkan kematian. Di Indonesia, hingga lima belas ribu kasus kanker serviks terjadi setiap tahunnya. Oleh karena itu, di Indonesia, kanker serviks dianggap sebagai penyebab kematian nomor satu. Dari setiap 40 perempuan di Indonesia yang mendapatkan diagnosis kanker serviks, 20 diantaranya meninggal akibat penyakit tersebut setiap hari. Data yang dikumpulkan oleh Kementerian Kesehatan RI pada tahun 2015 menunjukkan jumlah kasus kanker serviks yang terjadi di Indonesia (Sukmasari dkk., 2016).

Gen E6 adalah onkogen yang menghentikan dan menghancurkan p53 penekan tumor. Kompleks protein gen E6 dengan enzim ligase biquitin disebut protein terkait E6 atau E6AP. Kompleks ini bekerja dengan berbagai molekul untuk mendorong pertumbuhan dan perkembangan sel tumor (Damara, 2017). Gen onkogen E6 dalam infeksi HPV bertanggung jawab atas perkembangan kanker melalui inaktivasi protein penekan tumor p53 dan mendorong replikasi virus. Perkembangan kanker serviks sangat terkait dengan ekspresi gen E6 yang berlebihan. Gen E6 banyak digunakan sebagai target deteksi (Pranani dkk., 2019), terapi, dan pengembangan vaksin karena peran pentingnya dalam patogenesis HPV.

Variasi genetik adalah perubahan pada nukleotida, gen, kromosom, dan genom suatu organisme. Sekuensing DNA, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), dan pohon filogenetik adalah beberapa teknik yang umum digunakan untuk menganalisis variasi genetik. Metode RFLP adalah teknik penentuan polimorfisme yang digunakan untuk mempelajari sejarah evolusi populasi manusia (garis keturunan) dan menemukan mutasi. Dengan menggunakan sekuen gen yang tersedia di database genbank NCBI, variasi genetik dapat dipelajari secara *in silico* (Achyar dkk., 2021; Siti dkk., 2013). Menurut Schurr (2000), metode RFLP menggunakan enzim restriksi untuk memotong urutan nukleotida tertentu pada posisi yang berbeda, menghasilkan fragmen dengan panjang yang berbeda.

Perkembangan ilmu pengetahuan memberi kemudahan dalam mendeteksi variasi genetik suatu spesies berbasis molekuler (Putri *et al.*, 2021). *In silico* secara sederhana berarti mengantisipasi kondisi dunia nyata dalam simulasi berbasis komputer dengan menggunakan program aplikasi atau perangkat lunak tertentu (Suharna, 2012; Johan, 2016). Metode RFLP, yang secara *in silico* sangat akurat, dapat mendeteksi paparan HPV melalui biologi molekuler. Metode ini diterapkan pada gen E6 HPV tipe 16 untuk memungkinkan diagnosis HPV lebih cepat dan pengobatan yang lebih baik. *In silico* dapat digunakan sebagai metode untuk mendekati kondisi nyata ke dalam simulasi berbasis komputer menggunakan program aplikasi atau perangkat lunak tertentu

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan menganalisis polimorfisme yang terjadi pada gen E6 HPV 16 menggunakan metode RFLP secara *in silico*.

Bahan dan Metode

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang dilakukan pada bulan November-Desember 2023. Penelitian dilakukan secara *virtual* dalam menganalisis data dan mengumpulkan informasi objek penelitian. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sekuen nukleotida gen E6 HPV 16 yang diunduh dari situs NCBI. Adapun metode penelitian yang dilakukan adalah skrining enzim restriksi dan RFLP *in silico*. Skrining kandidat enzim restriksi dilakukan untuk mendapatkan enzim restriksi yang nantinya akan digunakan pada RFLP *in silico*. Skrining dilakukan menggunakan situs <http://insilico.ehu.es/restriction/>. Situs ini mampu membandingkan pola restriksi dari sampel DNA yang diuji. Salah satu *tools* yang dimiliki situs ini ialah "*compare restriction pattern of many sequence*". Sekuen gen yang telah didapatkan dalam bentuk "FASTA", kemudian diunggah pada slot yang sudah disediakan. Hasil *alignment* sekuen akan terlihat setelahnya. Jika sekuen tersebut sama, maka akan dibuang untuk memudahkan dalam analisis data. Langkah selanjutnya ialah memperoleh kandidat enzim restriksi dengan sisi pengenalan yang pasti. Proses ini dilakukan menggunakan *tools* "*only restriction enzymes with known bases (no N, R, Y ...)*". Kemudian, "*get the list restriction enzyme*" dipilih untuk mendapatkan enzim restriksi yang akan digunakan (Aulia *et al.*, 2021).

Tahapan kedua adalah RFLP secara *in silico*. RFLP adalah metode analisis sekuen nukleotida menggunakan enzim restriksi tertentu sehingga diperoleh polimorfisme berupa perbedaan panjang fragmen hasil restriksi atau pemotongan. RFLP dilakukan secara virtual (*in silico*) menggunakan situs <https://www.bencling.com/>. Sebelum tahap RFLP dilakukan, sekuen DNA yang telah diunduh dari NCBI di-*multiple alignment* menggunakan aplikasi BioEdit. Kedua ujung masing-masing sekuen dipotong sehingga menghasilkan panjang sekuen DNA yang sama. Sekuen yang telah dipotong ini kemudian diimpor ke dalam

folder *project* di situs Benchling. Tahapan selanjutnya yaitu menekan tanda gunting pada pojok kanan. *Tools* "find enzyme" dipilih dan nama-nama enzim restriksi yang telah didapatkan pada tahapan sebelumnya diketikkan pada kolom yang tersedia. Selanjutnya, menu "run digest" ditekan untuk menjalankan proses restriksi. Gambar elektroforegam dapat dilihat dengan memakai *tools* "virtual digest" (Yeriska, et al., 2021)

Hasil dan Pembahasan

Skrining kandidat enzim restriksi

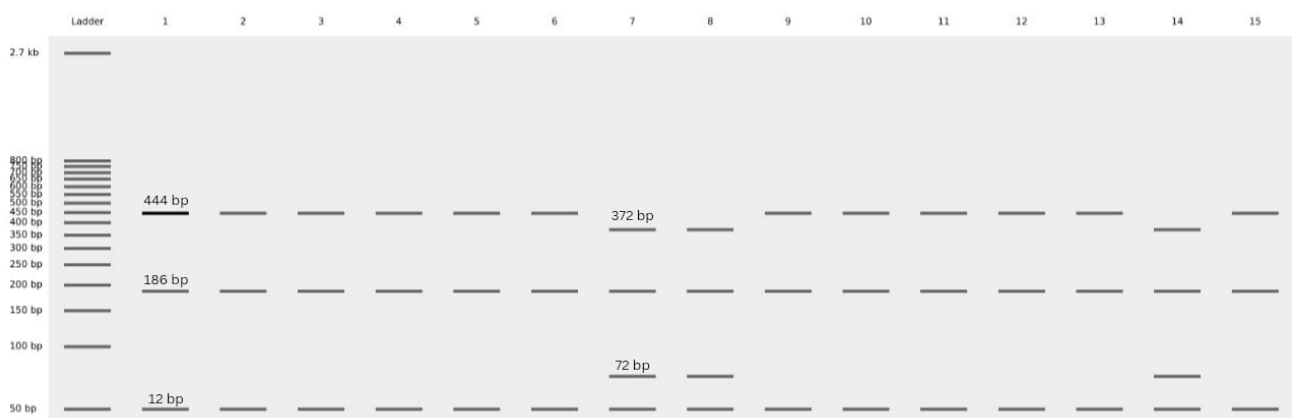
Berdasarkan hasil pencarian gen di situs NCBI, diperoleh sekuen gen E6 HPV 16 dengan nomor identitas NCBI Popset 636528409. Dalam Popset ini terdapat 15 sekuen gen pengode protein E6 HPV 16 dengan nomor identitas GenBank KJ543714.1 - KJ543728.1. Berdasarkan output yang diperoleh dari skrining kandidat enzim restriksi pada situs <http://insilico.ehu.es/restriction/>, terdapat 52 sisi pengenalan enzim restriksi diantaranya CJCG_G yang dikenali oleh enzim *HpaII*. Sisi pengenalan ini dipilih karena menunjukkan variasi sisi pemotongan pada semua sekuen gen E6 HPV 16.

HpaII merupakan enzim restriksi yang diisolasi dari bakteri *Haemophilus parainfluenzae* ATCC 49669. Enzim ini menghasilkan fragmen hasil pemotongan dengan ujung lengket (*sticky end*). *Isoschizomers* adalah pasangan enzim restriksi yang mengenali urutan pengenalan yang sama. Enzim pertama yang ditemukan disebut prototipe dan semua enzim berikutnya yang mengenali urutan yang sama adalah *isoschizomer* dari prototipe. *Isoschizomers* enzim *HpaII* adalah *BstSI*, *HpaII*, dan *MspI*.

RFLP secara *in silico*

Kemajuan teknologi *software* bioinformatika telah memberikan kemudahan dalam analisis, diantaranya restriksi dan visualisasi sekuen hasil restriksi yang dapat dilakukan secara *in silico*. Hal ini bertujuan untuk memperkirakan hasil *genotyping* sebelum dilakukan RFLP secara nyata di laboratorium (Achyar et al., 2021)

Proses RFLP secara *in silico* pada 15 sekuen DNA gen E6 HPV 16 NCBI Popset 636528409 dilakukan di aplikasi Benchling menggunakan enzim restriksi yang telah dipilih pada tahapan sebelumnya, yaitu enzim *HpaII*. Hasil RFLP *in silico* divisualisasikan elektroforesis gel virtual seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram hasil RFLP dengan enzim *HpaII* secara *in silico*. Ladder Life 50 bp., (1) KJ543714.1, (2) KJ543715.1, (3) KJ543716.1, (4) KJ543717.1, (5) KJ543718.1, (6) KJ543719.1, (7) KJ543720.1, (8) KJ543721.1, (9) KJ543722.1, (10) KJ543723.1, (11) KJ543724.1, (12) KJ543725.1, (13) KJ543726.1, (14) KJ543727.1, (15) KJ543728.1,

Restriksi dengan enzim *HpaII* menghasilkan dua variasi alel, yaitu alel A1 (menghasilkan tiga pita DNA berukuran 12 bp, 186 bp, dan 444 bp) dan alel A2 (menghasilkan empat pita DNA berukuran 12 bp, 72 bp, 186 bp, dan 372 bp). Hal ini disebabkan oleh karena alel A1 memiliki 2 sisi pemotongan oleh enzim *HpaII*, yaitu pada

basa ke-186 dan 630. Adapun alel A2 memiliki 3 sisi pemotongan oleh enzim HpaI, yaitu pada basa ke-186, 258, dan 630 (Gambar 1). Alel A1 memiliki frekuensi alel lebih tinggi dibandingkan alel A2 karena memiliki persentase kehadiran fragmen 80% dari 15 sekuen pada NCBI PopSet 636528409 (Tabel 1).

Tabel 1. Frekuensi Alel Gen E6 HPV 16 Berdasarkan Hasil RFLP *In Silico*.

Alel	Sisi Pemotongan (basa ke-)	Ukuran Fragmen (bp)	Jumlah Kehadiran (N=15)	Persentase Kehadiran Fragmen (%)	Frekuensi Alel
A1	186 dan 630	12 186 dan 444	12	80	0,8
A2	186, 258, dan 630	12 72 186 dan 372	3	20	0,2

Berdasarkan hasil RFLP *in silico* diketahui bahwa terdapat variasi genetik dalam sisi pengenalan enzim HpaI pada sekuen DNA gen E6 HPV 16. Menurut Frankham et al., (2002), variasi genetik pada suatu populasi akan berpengaruh terhadap kemampuannya bertahan hidup. Adapun Dunham (2004), menambahkan bahwa semakin tinggi variasi genetik yang terdapat pada suatu populasi menandakan semakin baik kemampuan individu dalam beradaptasi terhadap perubahan lingkungan. Oleh sebab itu, populasi HPV 16 termasuk ke dalam populasi yang memiliki kemampuan bertahan hidup yang tinggi.

Penutup

Hasil RFLP *in silico* pada penelitian ini menunjukkan terdapat variasi genetik dalam sisi pengenalan enzim HpaI pada sekuen DNA gen E6 HPV 16 dengan jumlah alel sebanyak 13 dari total 15 sekuen dalam Popset 636528409.

Daftar Pustaka

- Achyar A, Hindayageni A, Humaira F, Wijaya NN, Aqsha N, Zultsatunni'mah. 2021. Analysis of Genetic Variations in POLY Gene Sequences in Dengue Virus 2 Using In-Silico RFL. *Bioscience*, 5(1): 2541-5948.
- Aulia N, Putri CK, Khairiyah L, Khairunnisa FA, & Achyar A. 2022. Analysis of Genetic Variation of Measles Virus Genotype and Isolate MF Intergenic Spacer Sequences PopSet: 2105287799 using Restriction-Fragment Length Polymorphism (RFLP) In Silico. *InProsiding Seminar Nasional Biologi*, 1(2): 1139-1146.
- Damara FA. 2017. CRISPR/Cas9 dengan Dual-sgRNAs Bertarget Gen E6 dan E7 Virus HPV 16 Sebagai Inovasi Terapi Gen Upaya Menurunkan Angka Kanker Serviks Global. *Jurnal Scientific Pinisi*, 3(2), 98-103.
- Dunham RA. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches*. USA: Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn University Alabama.
- Edianto D. 2016. *Kanker Serviks Buku Acuan Nasional Onkologi Ginekologi*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawiroharjo.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University.
- Johan AK. 2016. Uji In Silico Senyawa Genistein sebagai Ligan pada Reseptor Estrogen Beta. *Skripsi*. Yogyakarta: Univesitas Sanata Dharma.
- Khaira A, Juniarti L, Arini N, Sari RM, & Achyar A. 2022. Analisis variasi genetik Sapi (Bos Taurus) pada sekuen gen Cytochrome Oxidase Subunit 1 (COI) menggunakan RFLP *in silico*. *InProsiding Seminar Nasional Biologi*, 2(1): 176-180.

- Novalia V. 2023. Kanker Serviks. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Mahasiswa Malikussaleh*, 2(1): 45-56.
- Pranani IAD, Hendrayana MA, Pinatih KJP. 2019. Optimasi Deteksi Gen E6 Pada Human papillomavirus Risiko Tinggi Dengan Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Medika Udayana*, 8(11).
- Putri KHA, Sari KP, Khairunnisa, Safitri MY, Putra A, Agusdi K, Oktavian FR, & Achyar A. 2021. Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen Surface Glycoprotein (S) Pada SARS -CoV-2 Popset: 1843471817 Menggunakan RFLP Secara In-Sillico. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 1(1): 44-52.
- Schurr TG. 2000. *Mitochondrial DNA and the Peopling of the New World Genetic variations among Native Americans provide further clues to who first populated the Americas and when they arrived*. American Scientist Online (The Magazine of Sigma XI, The Scientific Research Society).
- Siti HM, Gumilar GG, Natalia D, Noer AS. 2013. Variasi Urutan Nukleotida Daerah D-Loop DNA Mitokondria Manusia pada Dua Populasi Asli Indonesia Tenggara. P. 440-446.
- Suharna. 2012. Studi in Silico Senyawa Turunan Flavonoid terhadap Penghambatan Enzim Tirosinase. *Skripsi*. Makassar: UIN Alauddin.
- Sukmasari F, Safariyah E, Muslim N. 2016. Hubungan Pengetahuan Wanita Usia Subur tentang Infeksi Menular Seksual Dengan Perilaku Pencegahan Infeksi Menular Seksual di Kelurahan Baros Wilayah Kerja Puskesmas Baros. *UMMI: Jurnal Penelitian dan Pengembangan Sains dan Teknologi*, 12(3): 61-70.
- Yeriska F, Umar MZ, Hijriah NW, Fadhlurrohman R, & Achyar A. (2022). Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen Pengkode Protein Spike Virus MERS-CoV (PopSet: 1843801421) Menggunakan RFLP Secara *In Silico*. *InProsiding Seminar Nasional Biologi*, 1(2): 898-906.