



Analisis Variasi Genetik Gen L1 HPV-52 Menggunakan RFLP secara *in Silico*

Wahyu Mustika Rani^{1*}, Rika Dea Puspita², Nadia Sefina³, Nailus Sa'adah⁴, Afifatul Achyar⁵

^{1,2,3,4} Jurusan Biologi, Departemen Biologi, Universitas Negeri Padang, Kota Padang, Indonesia.

*E-mail: wayawrani18@gmail.com

Article Info:

Received: 7 Desember 2023
in revised form: 29 Januari
2024

Accepted: 26 Februari 2024
Available Online: 10 Maret
2024

Keywords:

Gene L1;
Variation in genetics;
RFLP;
In silico

Corresponding Author:

Wahyu Mustika Rani
Jurusan Biologi
Departemen Biologi
Universitas Negeri Padang
Kota Padang
Indonesia
E-mail:
wayawrani18@gmail.com

ABSTRACT

Around the world, cervical cancer is fourth in the amount of deaths caused by cancer. The main risk factor of cervical cancer is a persistent oncogenic Human Papillomavirus (HPV) infection. According to DNA genotyping, HPV-52 and HPV-58 were the most prevalent oncogenic HPV types in China when it came about the prevalence of HPV-related cervical cancer infections. HPVs can be classified as low risk (LR-HPV), potential high risk (pHRHPV), and high risk (HR-HPV) based on their correlation with precursor lesions and cervical cancer. The homogeneity of the L1 main capsid protein and DNA sequences is the foundation for HPV classification. Variants in genetics and mutations can be identified by *in silico* techniques. This study used *in silico* RFLP to explore the genetic variation in the L1 HPV 52 gene sequence from NCBI PopSet 378724952. DNA sequences are digested by restriction enzymes for the purpose of screening. RFLP using the Benchling facility in *in silico*. Analyzing genetic variability with MEGA 11. The point mutation that resulted in the creation of A1 and A2 allele fragments was identified in the 5'-TCGA-3' restriction recognition site using *in silico* RFLP results obtained with the TaqI enzyme. The A1 allele is the result of mutations who change the A2 allele's nucleotide base. These genetic changes also impact the recognition of restriction sites and the length of DNA fragments that are released. *In silico* RFLP by Allele A1 estimated the variation in genetics within the Chinese population PopSet 378724952, whose percentage was 15%.



This open access article is distributed under a Creative Commons Attribution (CC-BY-NC-SA) 4.0 International license.

How to cite (APA 6th Style):

Rani,W.M., Puspita,R.D., Sefina,N., Sa'adah,, Achyar, A. (2024). *Analisis Variasi Genetik Gen L1 HPV-52 Menggunakan RFLP secara in Silico*. Indonesian Journal of Pharmaceutical (e-Journal), 4(1), 82-96.

ABSTRAK

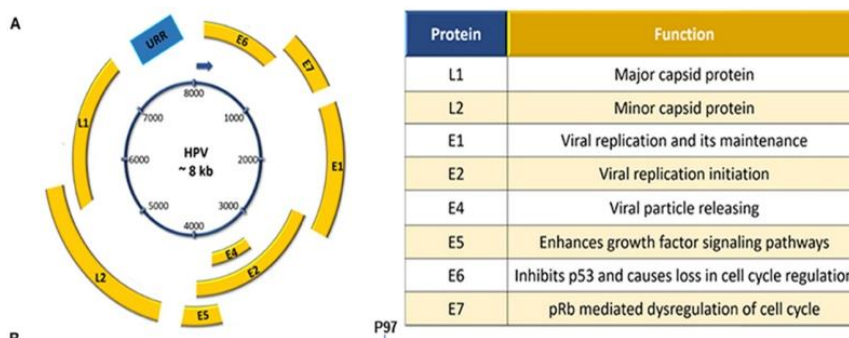
Kanker serviks adalah penyebab utama kematian keempat akibat kanker di seluruh dunia. Penyebab utama kanker serviks adalah infeksi persisten *Human Papillomavirus* (HPV) onkogenik. Prevelensi kasus infeksi kanker serviks yang disebabkan oleh HPV di China berdasarkan genotipe DNA ditemukan tipe HPV onkogenik paling umum adalah HPV-52 dan HPV-58. Berdasarkan hubungan mereka dengan kanker serviks dan lesi prekursor, HPV diklasifikasikan menjadi *low risk* (LR-HPV), *potential high risk* (pHRHPV), dan *high risk* (HR-HPV). Klasifikasi HPV berdasarkan pada tingkat homogenitas sekuen DNA dan protein kapsid major L1. Metode *in silico* digunakan untuk mengetahui mutasi dan variasi genetik. Tujuan penelitian ini untuk mengeksplorasi variabilitas genetik pada gen L1 HPV 52 sekuen dari NCBI PopSet 378724952 menggunakan RFLP secara *in silico*. Skrining enzim restriksi menggunakan situs *restriction enzyme digest of DNA*. RFLP secara *in silico* menggunakan situs *Benchling*. Variabilitas genetik menggunakan aplikasi MEGA 11. Hasil RFLP secara *in silico* menggunakan enzim TaqI situs pengenalan restriksi 5'-TCGA-3' menunjukkan adanya mutasi titik yang menghasilkan fragmen alel A1 dan A2. Alel A1 merupakan hasil perubahan susunan basa nukleotida dari Alel A2 akibat terjadinya mutasi turut merubah pengenalan *restriction sites* dan hasil panjang fragmen DNA. Keragaman genetik berdasarkan RFLP secara *in silico* oleh Alel A1 sebesar 15% pada populasi China PopSet 378724952.

Kata Kunci: Gen L1; Variasi genetik; RFLP; *In silico*

1. Pendahuluan

Menurut laporan data GLOBOCAN proyek dari *International Agency for Research on Cancer* (IARC), pada tahun 2020 diperkirakan 604.000 wanita didiagnosis menderita kanker serviks secara global yang diantaranya 342.000 wanita meninggal akibat penyakit tersebut. Kanker serviks adalah kanker yang sering ditemukan pada wanita dan penyebab utama kematian keempat akibat kanker setelah kanker payudara, kolorektal, dan paru-paru di seluruh dunia [1]. Penyebab utama kanker serviks adalah infeksi persisten dari HPV onkogenik yang ditularkan melalui kontak seksual. Negara China dan India memiliki lebih dari sepertiga kasus kanker serviks secara global (106.000 di China dan 97.000 di India) [2]. Tingginya prevelensi kasus kanker serviks pada negara berkembang dikarenakan terbatasnya akses skrining dan pengobatan akibatnya sebagian pasien sudah keadaan stadium lanjut [3].

Keseluruhan prevelensi kasus infeksi kanker serviks yang disebabkan oleh *Human Papillomavirus* di China adalah HPV-52 (4,3%), HPV-58 (3,5%), HPV-16 (2,2%) HPV-39 (2,0%), HPV-18 (1,2%), serta 1,0% untuk tipe HPV lainnya baik untuk perhitungan wanita ataupun pria. Tipe HPV onkogenik yang umum ditemukan pada wanita adalah HPV-52 (6,6%), HPV-58 (3,5%), HPV-16 (3,4%), sedangkan pada pria sering dijumpai HPV-58 (3,5%), HPV-52 (1,5%), HPV-39 (0,9%). Hasil meta analisis terhadap satu juta wanita di lima benua secara umum ditemukan HPV-16, HPV-18, HPV-52, sedangkan pada pria tipe yang paling sering dijumpai adalah HPV-58, HPV-52, dan HPV-39. Prevelensi HPV onkogenik lebih tinggi pada wanita dibandingkan pria yang kemungkinan disebabkan perbedaan riwayat alami HPV pada kedua jenis kelamin [4]. Hasil serupa ditemukan pada penelitian yang dilakukan oleh Mai *et al.* (2021), sub tipe HPV yang paling umum ditemukan adalah HPV-52 dan HPV-58 di wilayah timur Asia. Studi epidemiologis menemukan bahwa distribusi HPV tipe spesifik dapat berbeda antar belahan dunia. Hal ini dapat disebabkan oleh faktor demografi seperti etnis, status sosial ekonomi, kondisi kesehatan, dan tingkat pendidikan [5].



Gambar 1. Skema genom HPV (Freitas et al., 2021)

Human Papillomavirus (HPV) merupakan virus berukuran kecil dengan diameter 45-55 nm, memiliki genom sirkular dengan *double stranded* DNA dengan kapsid berbentuk *icosahedral* dan tidak memiliki selubung (*nonenvelop*) termasuk dalam famili Papovaviridae. Virus ini sangat spesifik jaringan dan menginfeksi kulit dan membran mukosa epitel [6]. Organisasi genom HPV terdiri dari 3 region yaitu *early gene* (E1-E7), *late gene* (L1 dan L2) dan *Upper Regulating Region* (URR). URR mempunyai tempat berikatan dari berbagai repressor dan aktivator pada saat terjadinya transkripsi. *Late gene* (L1 dan L2) berperan dalam mengkode protein kapsid virus selama stadium akhir virion terbentuk. *Early gene* (E1, E2, E4, E5, E6 dan E7) berperan untuk mengkode protein yang sangat penting untuk replikasi, transkripsi, transformasi, dan imortalisasi [7]. Dari berbagai penelitian, protein mayor L1 dan minor L2 berperan penting dalam proses perlekatan virus pada membran basal, menginisiasi infeksi, dan masuknya virus ke sel epitel kulit dan mukosa [8].

Berdasarkan urutan kapsid protein L1, lebih dari 200 jenis HPV yang berbeda telah diidentifikasi dan sekitar 30-40 dapat menginfeksi lapisan epitel saluran *anogenital* dan area mukosa lainnya pada tubuh manusia. Berdasarkan hubungan mereka dengan kanker serviks dan lesi prekursor, HPV dapat diklasifikasikan menjadi *low risk* (LR-HPV), *potential high risk* (pHR-HPV), dan *high risk* (HR-HPV). Terdapat beberapa HPV tipe *high risk* diantaranya HPV- 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 dan 82 beresiko dalam menyebabkan kanker serviks; dan beberapa HPV tipe *low risk* diantaranya HPV- 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, dan 81 [9] [10]. Klasifikasi HPV dilakukan berdasarkan pada tingkat homogenitas DNA. *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) mengelompokkan *Papillomavirus* ke dalam keluarga Papillomaviridae. Famili Papillomaviridae memiliki lebih dari 50 genus dimana hanya 5 diantaranya yang berhubungan dengan infeksi pada manusia, yaitu Alphapapilloma virus, Betapapilloma virus, Gammapapillomavirus, Mupapillomavirus, dan Nupapillomavirus. Namun yang paling sering ditemukan pada pasien adalah genus Alphapapillomavirus [10].

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis variasi genetik adalah *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). RFLP adalah teknik yang memanfaatkan enzim restriksi untuk memotong DNA pada lokasi spesifik yang disebut situs restriksi. Panjang fragmen DNA yang dihasilkan dari pemotongan enzim restriksi dapat digunakan untuk membedakan variasi genetik pada tingkat DNA. Perbedaan dalam urutan DNA homolog yang dapat dideteksi dengan adanya fragmen dengan panjang yang berbeda setelah pemotongan sampel DNA yang bersangkutan dengan endonuklease restriksi spesifik. RFLP, sebagai marker molekuler, spesifik untuk

kombinasi restriksi enzim/klon tunggal. Sebagian besar marker RFLP bersifat ko-dominan (kedua alel dalam sampel heterozigot akan terdeteksi) dan sangat spesifik lokus. Probe RFLP adalah urutan DNA berlabel yang hibridisasi dengan satu atau lebih fragmen sampel DNA yang dipotong setelah dipisahkan oleh elektroforesis gel, sehingga mengungkapkan karakteristik pola *blotting* unik untuk genotipe tertentu pada lokus tertentu. Klon DNA genom atau cDNA salinan pendek, tunggal atau rendah biasanya digunakan sebagai probe RFLP [11]. RFLP dapat digunakan untuk mendeteksi adanya variasi genetik, hubungan kekerabatan, spesiasi dan domestikasi, pemetaan genom, tagging gen, pustaka cDNA, dan lain-lain [9].

Variasi genetik merupakan perubahan yang terjadi pada nukleotida, gen, kromosom, dan genom pada suatu organisme. Variasi genetik pada suatu populasi akan berpengaruh terhadap kemampuan bertahan hidup suatu individu. Semakin tinggi variasi genetik yang terdapat pada suatu populasi, maka semakin baik kemampuan individu dalam beradaptasi terhadap perubahan lingkungan [12]. Variasi genetik dapat dikaji secara *in silico* menggunakan sekuen gen yang tersedia pada data *genebank* NCBI. Dalam konteks analisis variasi genetik, RFLP dapat dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan perangkat lunak atau alat bioinformatika untuk mensimulasikan pemotongan DNA dengan enzim restriksi tertentu. Variasi genetik pada protein mayor L1 dapat mempengaruhi sifat biologis dan epidemiologis virus serta respon imun inang terhadap infeksi HPV [13]. Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi dan menganalisis variabilitas genetik pada sekuen gen L1 HPV 52 menggunakan RFLP secara *in silico*.

2. Metode

Bahan

Sekuen gen L1 HPV 52 yang digunakan untuk uji *in silico* diunduh dalam format FASTA dari NCBI dengan PopSet 378724952 yang dikirimkan oleh Chen,Q., Luo,Z.-Y., Lin,M., Zheng,J.-K., Yang,L., Yang,L.-Y. and Ju,G.-Z dalam studinya yang berjudul "Evaluation of HPV 52 genetic variability in eastern Guangdong" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JN874436.1>). Dalam PopSet tersebut terdapat 21 sekuen gen pengkode protein L1 HPV 52 berukuran 1.590 bp (*complete cds*) dengan *accession number* JN874416.1 - JN874436.1. Chen *et al.* (2011), mendeskripsikan bahwa sekuen tersebut diisolasi dari sel serviks manusia berupa DNA genom di The Central Laboratory, Chaozhou Central Hospital, Guangdong, China.

Skrining Kandidat Enzim Restriksi

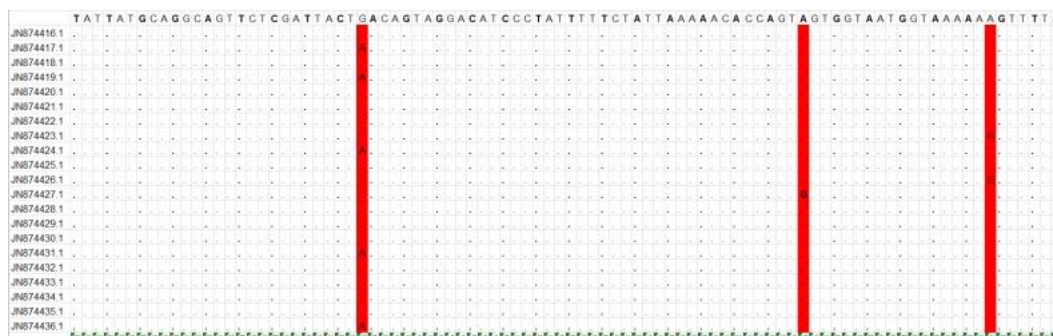
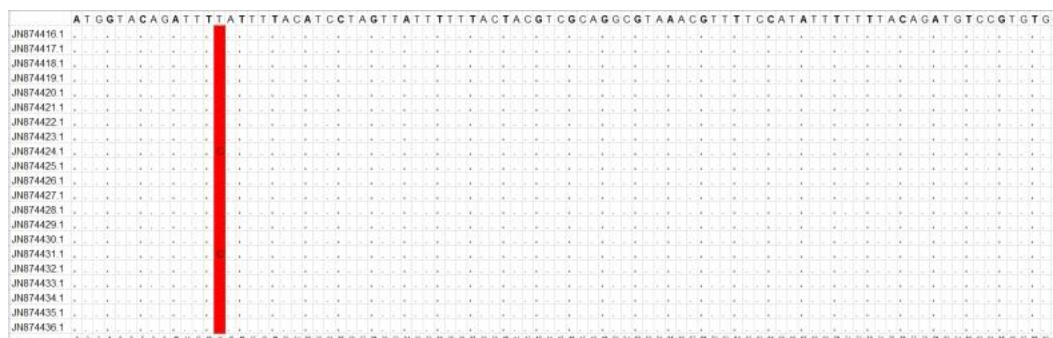
Skrining enzim restriksi yang akan digunakan pada RFLP *in silico* dengan menggunakan situs (<http://insilico.ehu.es/restriction/>). Situs ini dapat menampilkan perbandingan pola restriksi dari sampel sekuen DNA yang diuji. Sekuen DNA yang sudah diperoleh dalam format FASTA dari data *genebank* NCBI, kemudian diunggah pada slot yang sudah disediakan. Selanjutnya akan terlihat hasil alignment sekuen. Jika sekuen tersebut memiliki susunan dan panjang sekuen DNA yang sama, maka akan dibuang untuk mempermudah analisis. Langkah selanjutnya yaitu "only restriction enzymes with known bases (no N,R,Y...)" digunakan agar memperoleh kandidat enzim restriksi dengan sisi pengenalan yang pasti. Kemudian "get the list restriction enzyme" dipilih untuk memperoleh enzim restriksi yang akan digunakan.

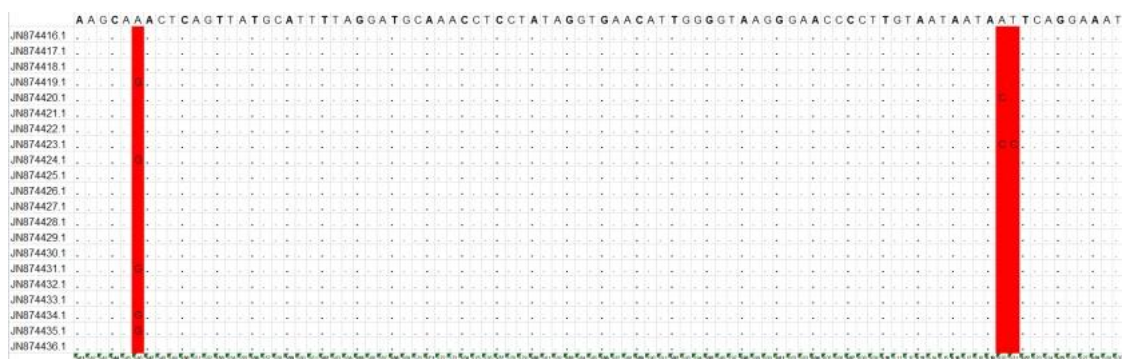
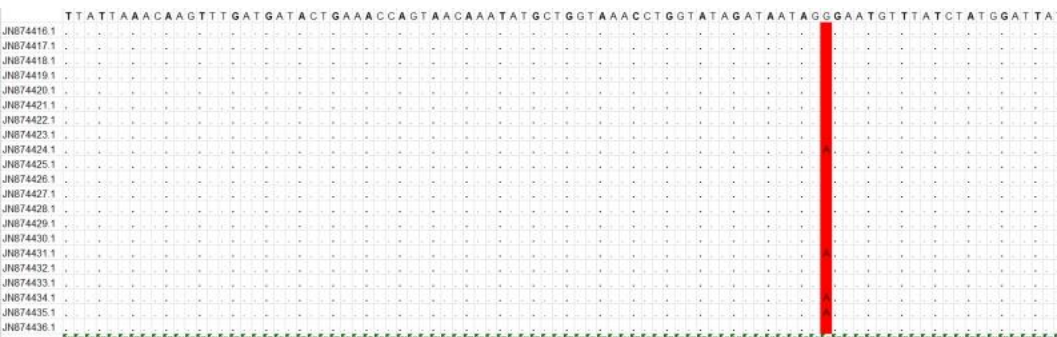
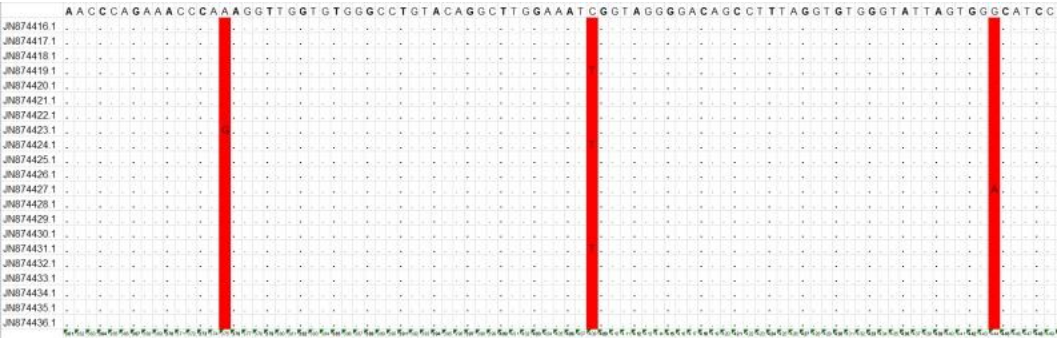
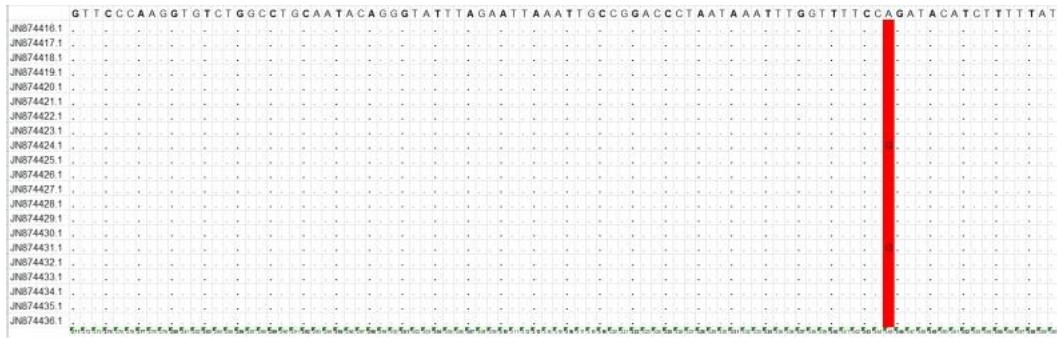
RFLP secara *in Silico*

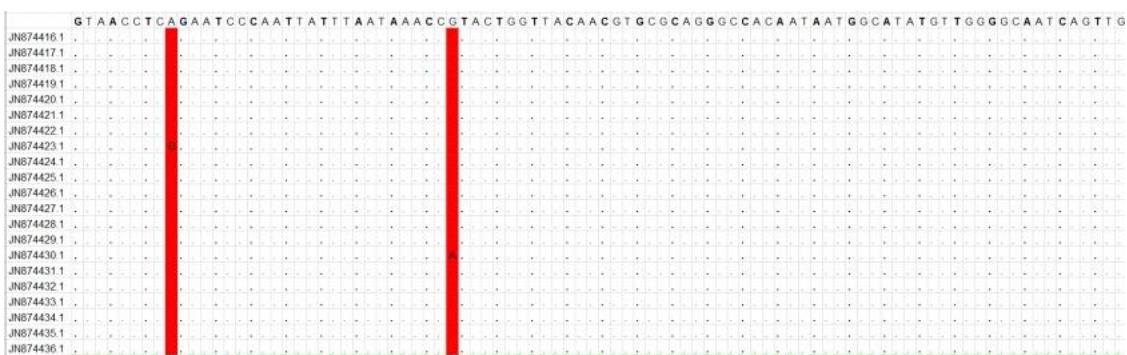
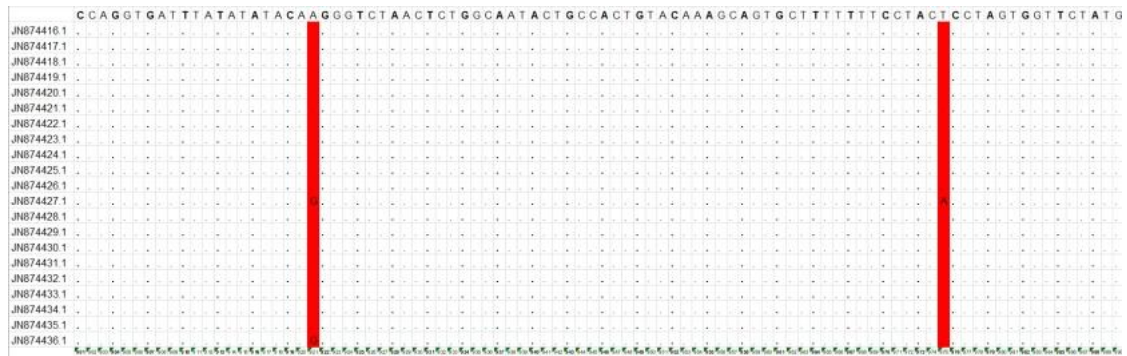
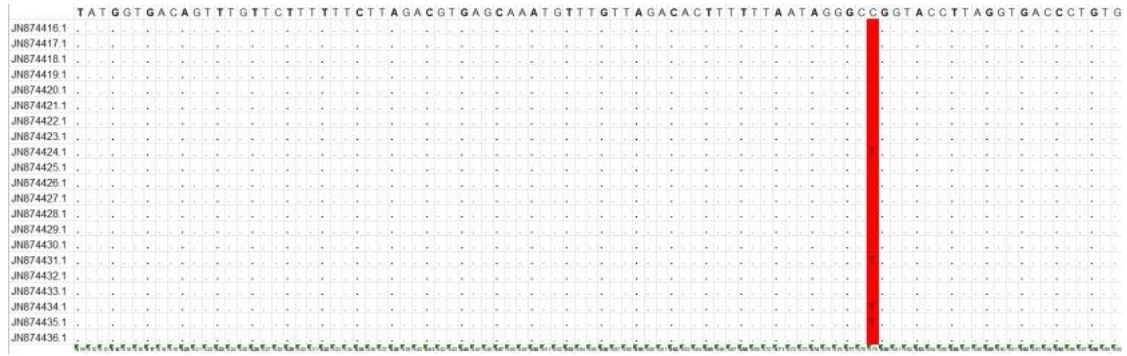
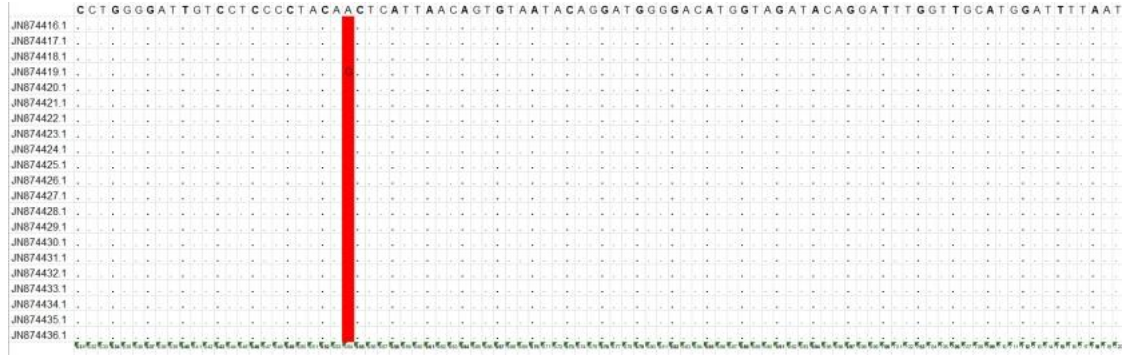
RFLP adalah metode analisis sekuen nukleotida menggunakan enzim restriksi tertentu sehingga diperoleh polimorfisme berupa perbedaan panjang fragmen hasil restriksi atau pemotongan. RFLP dilakukan secara *in silico* atau restriksi secara virtual menggunakan situs (<https://www.benchling.com/>). Tahap awal yang dilakukan adalah meng-impor sekuen DNA yang sudah diunduh dari NCBI ke dalam folder project di situs *Benchling*. Selanjutnya mengklik tanda gunting pada pojok kanan. Kemudian tools “find enzyme” dipilih dan nama-nama enzim restriksi yang sudah ditentukan sebelumnya pada saat skrining, diketik pada kolom. Selanjutnya, klik menu “run digest” untuk restriksi. Dengan tools “virtual digest” dapat melihat gambar elektroforegram.

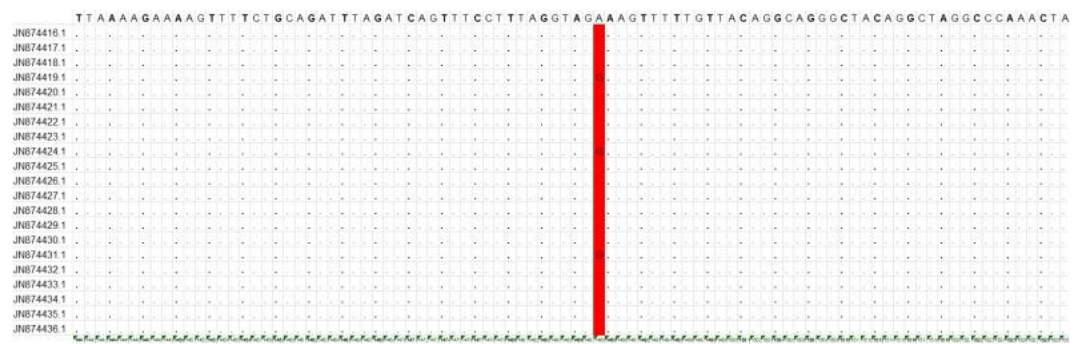
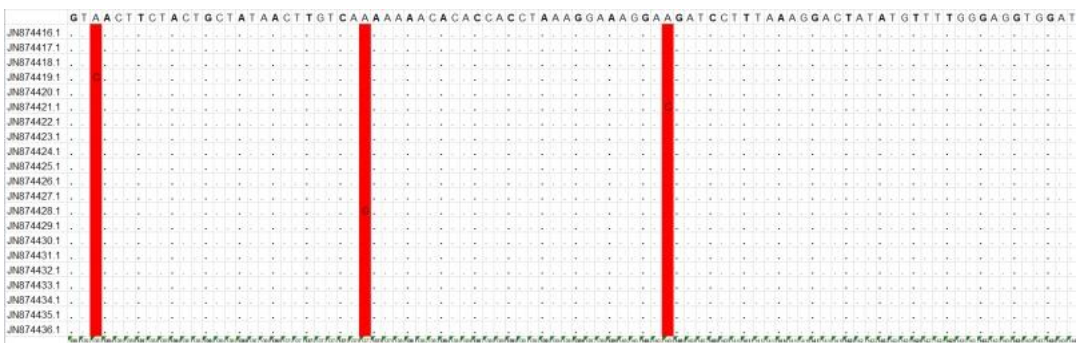
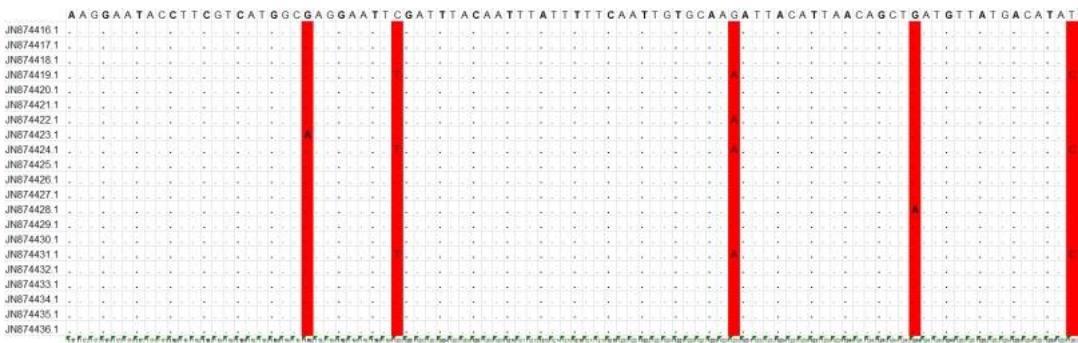
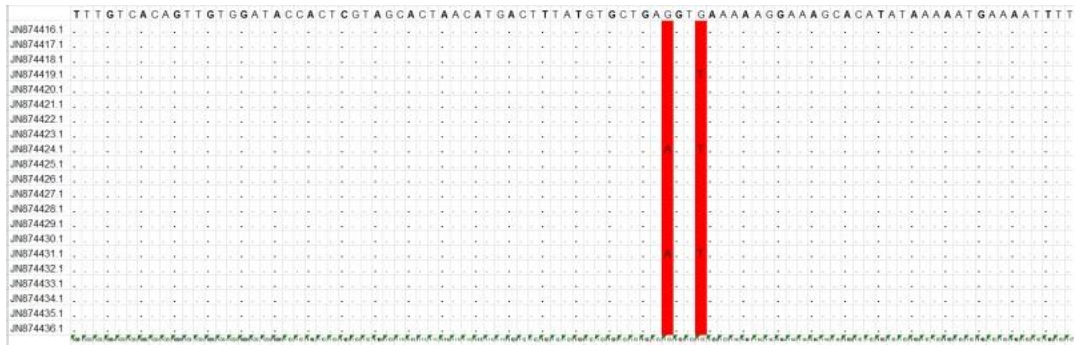
3. Hasil dan Pembahasan Alignment Sekuen DNA

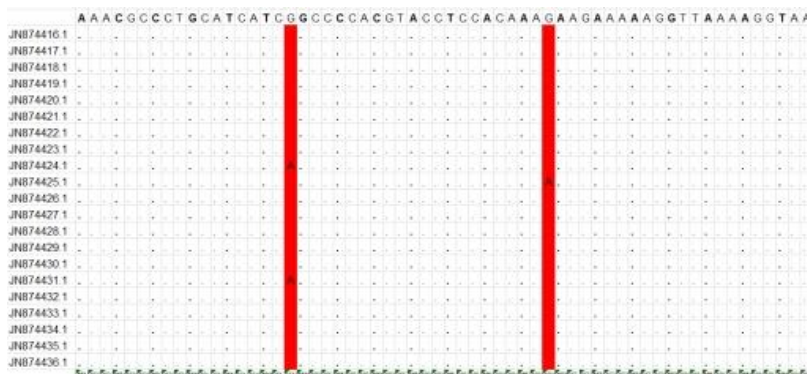
Semua sekuen DNA yang telah dikumpulkan dari genebank NCBI kemudian dialignment. Alignment sekuen DNA dilakukan menggunakan MEGA11 *software* CLUSTALW. Clustal adalah perangkat lunak yang digunakan untuk penyelarasan urutan ganda karena skalabilitas dan kemampuan untuk menangani keberpihakan skala besar secara efisien. Alignment diperlukan untuk mengetahui tingkat homologi, variabilitas genetik, dan identifikasi sekuen yang berpotensi sebagai barcode. Sekuen yang berpotensi sebagai DNA barcode adalah sekuen pendek yang unik dan berbeda dengan yang lain [14][15].











Gambar 2. Hasil alignment sekuen gen L1 menggunakan *software* CLUSTALW
 Mutasi genetik terjadi pada urutan basa ke-14, 207, 247, 264, 345, 375, 408, 444, 519, 546, 620, 621, 654, 879, 921, 975, 999, 1023, 1134, 1137, 1192, 1200, 1230, 1246, 1260, 1353, 1377, 1404, 1488, 1548, dan 1569

Hasil alignment merupakan pensejajaran urutan sekuen DNA. Homologi DNA ditunjukkan oleh tanda (.) dan bagian yang diblock merah merupakan mutasi titik (Gambar 2). Secara ringkas hasil alignment dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Frekuensi mutasi basa nukleotida

Basa Nukleotida	A	T	C	G
A	-	1,92	1,14	25,92
T	1,85	-	9,63	1,34
C	1,85	16,31	-	1,34
G	35,65	1,92	1,14	-
Total (%)		87,69		12,31

Keterangan:

Substitusi transisi = tulisan bold

Substitusi tranversi = tulisan italic

Source: Tamura et al., 2021

Berdasarkan hasil frekuensi mutasi yang ditunjukkan Tabel.1 bahwa perubahan basa nitrogen yang terjadi merupakan mutasi titik yang bersifat substitusi transisi dan substitusi tranversi. Mutasi titik dikenal juga *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP). Nilai substitusi transisi berkisar 87,69% dan substitusi tranversi berkisar 12,31% yang didominasi oleh mutasi substitusi transisi. Hal ini disebabkan ikatan hidrogen antara pasangan basa nitrogen yang lemah [16]. Substitusi transisi adalah perubahan basa nitrogen dari basa sejenis (purin-purin) atau (pirimidin-pirimidin). Substitusi tranversi adalah perubahan basa nitrogen berbeda jenis (purin-pirimidin) atau (pirimidin-purin). Menurut Ubaidillah dan Sutrisno (2009), setiap perubahan basa nukleotida dapat menunjukkan karakter pembeda dari spesies tersebut dan kemungkinan bersifat unik yang mengarah ke proses spesiasi. Pada saat pewarisan keturunan nenek moyang, terdapat sekuen DNA yang bersifat tetap (*conserve*) dan ada yang terpisah melalui perubahan basa nukleotida karena adanya mutasi [17].

Tabel 2. Parameter analisis variasi genetik sekuen gen L1

Sampel NCBI	Posisi basa ke-	Mutasi titik (SNP)	Implikasi	Missense mutation
JN874416.1	-	-	-	-
JN874417.1	207	G>A	<i>Synonymous substitution</i>	-
JN874418.1	-	-	-	-
JN874419.1	207; 408; 546; 654; 1137; 1200; 1230; 1260; 1353; 1488	G>A; C>T; A>G; A>G; G>T; C>T; G>A; T>C; A>C; A>G	<i>Synonymous substitution</i>	-
JN874420.1	620	A>C	<i>Missense mutation</i>	<i>Asparagine > Threonine</i>
JN874421.1	1404	A>C	<i>Missense mutation</i>	<i>Glutamic acid > Aspartic acid</i>
JN874422.1	1230	G>A	<i>Synonymous substitution</i>	-
JN874423.1	264; 375; 620; 621; 999; 1192	A>G; A>G; A>C; T>C; A>G; G>A	<i>Missense mutation;</i> <i>synonymous substitution</i>	<i>Asparagine > Threonine;</i> <i>Glutamic acid > Lysine</i>
JN874424.1	14; 207; 345; 408; 519; 546; 879; 1134; 1137; 1200; 1230; 1260; 1488; 1548	T>C; G>A; A>G; C>T; G>A; A>G; C>T; G>A; G>T; C>T; G>A; T>C; A>G; G>A;	<i>Missense mutation;</i> <i>synonymous substitution</i>	<i>Leucine > Serine</i>
JN874425.1	1569	G>A	<i>Synonymous substitution</i>	-
JN874426.1	264	A>G	<i>Synonymous substitution</i>	-
JN874427.1	247; 444;	A>G; G>A;	<i>Missense mutation;</i> <i>synonymous substitution</i>	<i>Serine > Glycine</i>

	921; 975;	A>G; T>A		
JN874428.1	1246; 1377	G>A; A>G	Missense mutation; synonymous substitution	Aspartic acid > Asparagine
JN874429.1	-	-	Synonymous substitution	-
JN874430.1	1023	G>A	Synonymous substitution	-
JN874431.1	14; 207; 345; 408; 519; 546; 879; 1134; 1137; 1200; 1230; 1260; 1488; 1548	T>C; G>A; A>G; C>T; G>A; A>G; C>T; G>A; G>T; C>T; G>A; T>C; A>G; G>A	Missense mutation; synonymous substitution	Leucine > Serine
JN874432.1	-	-	Synonymous substitution	-
JN874433.1	-	-	Synonymous substitution	-
JN874434.1	519; 546; 879	G>A; A>G; C>T	Synonymous substitution	-
JN874435.1	519; 546; 879	G>A; A>G; C>T	Synonymous substitution	-
JN874436.1	207; 921	G>A; A>G	Synonymous substitution	-
Total	65 mutasi titik		8 mutasi missense	

Keterangan:

Tulisan bold pada kolom ke-3 menggambarkan terjadinya mutasi missense

Mutasi titik sering terjadi pada sampel *accession number* JN874419.1, JN874424.1, dan JN874431.1. Mutasi tidak terjadi pada sampel JN874416.1, JN874418.1, JN874429.1, JN874431.1, dan JN874433.1. Dari total 65 mutasi titik, 8 diantaranya merupakan mutasi *missense* yang menyebabkan terjadinya perubahan translasi asam amino protein sebagaimana yang ditunjukkan oleh Tabel 2. Pada *accession number* JN874423.1 terjadi perubahan asam amino dari *Glutamic acid* menjadi *Lysine* sehingga partikel virus dapat berikatan pada reseptor primer sel penjamu (HSPGs dan non-HSPGs protein). Interaksi reseptor primer HSPGs yang bermuatan negatif dimediasi oleh *Lysine* pada permukaan kapsid L1 virus yang bermuatan positif yang menyebabkan terjadinya perubahan

konformasi dalam kapsid sehingga reseptor HSPGs menyalurkan transfer partikel virus ke reseptor sekunder yaitu integrin. Asam amino *Lysine* banyak ditemukan pada permukaan protein kapsid mayor L1 HPV yang diduga memiliki kaitan dalam proses pengikatan dengan reseptor primer heparin sulfat proteoglikan. Selain itu, protein mayor L1 memiliki region *conserve* yang tersusun dari *Cystein* dan *Lysine* yang juga berkaitan dalam proses pengikatan antara virion dan reseptor host. Hal ini dapat berimplikasi pada variabilitas genetik dan bagaimana respon imun sel penjamu terhadap virus [18][19].

Skrining Kandidat Enzim Restriksi

Berdasarkan output yang diperoleh dari skrining kandidat enzim restriksi pada situs (<http://insilico.ehu.es/restriction/>), terdapat banyak sisi pengenalan enzim restriksi kemudian dipilih salah satunya yaitu T'CG_A yang dikenal sebagai enzim TaqI. Enzim ini dipilih karena memiliki polimorfisme fragmen restriksi cukup tinggi, kodominan, dan hasil konsisten antar laboratorium. Hasil skrining enzim restriksi TaqI dapat memotong di dua urutan sekuen yaitu ke-198 dan 1199 pada gen L1 HPV-52 dapat dilihat pada Gambar 3.

• AaNI, PsiI TTA' TAA		359 539	359 539	359 539	359 539	359 539	359 539	359 539	359 539	359 539
• PvuII CAG' CTG		1243	1243	1243	1243		1243	1243	1243	1243
• TaiI _ACGT'		44 59 843 1038 1557	44 59 843 1038 1557	44 59 843 1038 1557	44 59 843 1038 1557	44 59 843 1038 1557	44 59 843 1038 1557	44 59 843 1038 1557	44 59 843 1038 1557	44 59 843 1038 1557
• TaqI T'CG_A		198 1199	198 1199	198 1199	198 1199	198 1199	198 1199	198 1199	198 1199	198 1199

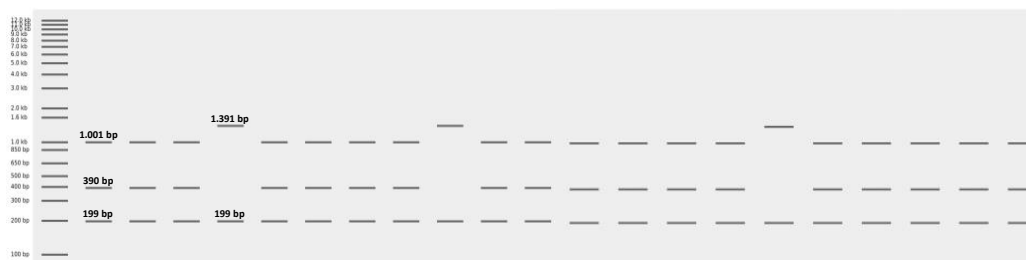
Gambar 3. Skrining enzim restriksi secara in silico

Enzim TaqI adalah restriksi endonuklease yang mengenali dan memotong DNA pada situs pengenalan spesifik yang terdiri dari sekuens nukleotida tertentu. TaqI mengenali sekuens 5'-TCGA-3'. Hasil pemotongan adalah potongan DNA dengan ujung tumpul (*blunt ends*) pada kedua ujungnya. Enzim restriksi TaqI sering digunakan dalam teknik analisis DNA, pemotongan DNA, analisis restriksi, dan teknik rekayasa genetika. Salah satu penggunaan paling terkenal dari enzim TaqI adalah dalam teknik PCR, di mana enzim TaqI DNA *polimerase*, yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* yang sama, digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA tertentu.

RFLP secara in Silico

RFLP adalah penanda DNA pertama yang dihasilkan dari perbedaan sekuens nukleotida yang berbeda. Perbedaan tersebut muncul karena mutasi yang terjadi pada waktu lalu dan dideteksi sebagai variasi (polimorfisme pada perbedaan fragmen restriksi). Mutasi yang terjadi seperti substitusi, delesi, insersi pada sekuens DNA akan merubah tempat pemotongan enzim endonuklease sehingga dapat merubah panjang fragmen DNA yang dihasilkan dan dideteksi sebagai penanda yang mewakili genotipe suatu individu. Variasi panjang fragmen DNA hasil pemotongan enzim restriksi dapat digunakan sebagai profil untuk identifikasi individu yang dikenal dengan DNA fingerprint [9]. Restriksi dan visualisasi fragmen hasil restriksi yang bertujuan untuk memprediksi hasil *genotyping* sebelum melakukan RFLP secara nyata di laboratorium dapat dilakukan secara *in silico*. Uji *in silico* dapat digunakan sebagai metode untuk mendekati kondisi nyata ke dalam simulasi berbasis komputer menggunakan program aplikasi atau perangkat lunak tertentu [20]. Aplikasi RFLP dapat dilakukan secara nyata

salah satunya penelitian yang dilakukan Af'idzatuttama et al. (2023), mengenai studi keragaman genetik karakter galur bakteri busuk hitam (*Xanthomonas campestris pv. campestris*) pada kubis berdasarkan gen 16S rRNA [21]. RFLP secara *in silico* pada sekuen ge9n L1 HPV 52 menggunakan enzim TaqI divisualisasikan dengan elektroforesis gel virtual seperti pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil elektroforogram restriksi dengan enzim TaqI secara *in silico*

Kiri: Ladder 1 kb, (1) JN874416.1, (2) JN874417.1, (3) JN874418.1, (4) JN874419.1, (5) JN874420.1, (6) JN874421.1, (7) JN874422.1, (8) JN874423.1, (9) JN874424.1, (10) JN874425.1, (11) JN874426.1, (12) JN874427.1, (13) JN874428.1, (14) JN874429.1, (15) JN874430.1, (16) JN874431.1, (17) JN874432.1, (18) JN874433.1, (19) JN874434.1, (20) JN874435.1, (21) JN874436.1

Restriksi dengan enzim TaqI pada gen L1 HPV-52 menghasilkan dua variasi alel, yaitu alel A1 menghasilkan dua pita DNA berukuran 199 bp dan 1.391 bp dan alel A2 menghasilkan tiga pita DNA berukuran 199 bp, 1.001 bp, dan 1.200 bp seperti yang ditunjukkan Tabel 3.

Tabel 3. Frekuensi alel gen L1 HPV-52 menggunakan enzim TaqI

Situs Pengenalan	Daerah Terpotong	Ukuran Fragmen (bp)	Alel	Jumlah Kehadiran Fragmen (N=21)	Persentase Kehadiran Fragmen (%)	Frekuensi Alel
T'CG_A	ke-199	199 bp 1.391 bp	A1	3	15%	0,15
	ke-199 ke-1.200	199 bp 390 bp 1.001 bp	A2	18	85%	0,85

Tingginya tingkat mutasi pada sampel *accession number* JN874424.1, JN874431.1, dan JN874419.1 tidak hanya mengakibatkan perubahan basa nukleotida tunggal, tetapi juga mempengaruhi pengenalan situs restriksi T'CG_A khususnya pada basa ke-1200. Akibatnya, sampel diatas menghasilkan dua pita DNA (alel A1), sedangkan pada sampel lainnya menghasilkan tiga pita DNA (alel A2). Hal ini menandakan adanya keragaman genetik pada alel A1 yang berpotensi terbentuknya sub tipe baru. Persentase variasi genetik menunjukkan tingkat keanekaragaman genetik suatu organisme yang juga menunjukkan kisaran toleransi organisme tersebut untuk beradaptasi dalam suatu populasi demi kelangsungan hidupnya. Organisme yang memiliki keanekaragaman tinggi lebih mudah beradaptasi dibandingkan organisme yang mempunyai keanekaragaman rendah [12]. Dari 21 sekuen fragmen yang dihasilkan, alel A1 memiliki persentase kehadiran fragmen 15% dan alel A2 memiliki persentase kehadiran fragmen 85%. Dengan adanya dominansi oleh alel A2 artinya

masih tinggi jumlah dan distribusi spesies origin HPV 52 di China.

Berdasarkan hasil RFLP *in silico* diketahui terdapat variasi genetik dalam sisi pengenalan restriksi enzim TaqI pada gen pengkode protein L1 yang diisolasi dan diamplifikasi dari swab sel serviks yang terinfeksi HPV 52 oleh Chen *et al.* (2011) di The Central Laboratory, Chaozhou Central Hospital, Guangdong, China. Gen L1 ini memiliki laju mutasi yang tinggi dan pada saat menginfeksi manusia kemungkinan DNA HPV tidak menyisip di genom manusia, sehingga kemungkinan besar HPV kehilangan sebagian besar daerah gen E1, E2, L1 dan L2. Beberapa gen pada genom HPV, salah satunya gen L1 lebih rentan mengalami mutasi sehingga kemungkinan memiliki sisi pengenalan enzim yang dapat digunakan untuk deteksi cepat secara RFLP [22]. Selain itu, dapat disebabkan oleh gaya hidup, geografis, dan faktor lingkungan manusia yang notabene merupakan sel penjamu dari virus. Hal ini sesuai dengan konsep kompatibilitas patogen-sel penjamu yang menunjukkan data bahwa suatu penyebaran preferensial tertentu garis keturunan populasi penjamu pada wilayah yang sama dibandingkan dengan wilayah lain sehingga terjadinya mutasi guna adaptasi lingkungan yang secara tidak langsung dapat keragaman populasi virus [13]. Variasi genom HPV intratipe spesifik berhubungan dengan infektivitas virus, patogenitas, potensi berkembang menjadi kanker serviks, perakitan partikel virus, dan respon imun penjamu [23].

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada screening enzim restriksi dan pelaksanaan RFLP secara *in silico* menggunakan enzim TaqI (T'CG_A) menunjukkan asosiasi antara karakteristik genetik penduduk populasi China PopSet 378724952 dan HPV 52 berdasarkan gen L1 yang ditandai keberadaan alel A1 dan alel A2.

Referensi

- [1] IARC, "Protection from a Single Dose of HPV Vaccine," *IARC Evid. Summ. Briefs*, no. 4, pp. 1-5, 2023, [Online]. Available: <https://www.iarc.who.int/evidence-summary-briefs-series/>.
- [2] Krakauer EL, Kwete X, Kane K, *et al.*, "Cervical Cancer-Associated Suffering: Estimating the Palliative Care Needs of a Highly Vulnerable Population," *JCO Glob. Oncol.*, no. 7, pp. 862-872, 2021, doi: 10.1200/go.21.00025.
- [3] Nurwijaya H, Andrijono, and Suheimi, *Cegah dan Deteksi Kanker Serviks*. Jakarta: Alex Media Komputindo, 2010.
- [4] Wei F, Yin K, Wu X, *et al.*, "Human papillomavirus prevalence and associated factors in women and men in south China: a population-based study," *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 5, no. 1, pp. 1-8, 2016, doi: 10.1038/emi.2016.118.
- [5] Mai Q, Yang X, Cheng H, Wu G, Wu Z, "Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus among women with cervical lesions in Shenzhen city, China," *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 17, no. 4, pp. 965-971, 2021, doi: 10.1080/21645515.2020.1805993.
- [6] Rusmana D, "Aspek Onkologi Human Papillomavirus," *Jkm*, vol. 9, no. 1, pp. 95-101, 2009.
- [7] Amtarina R, "Organisasi Genom dan Varian Molekuler Human," *J. Ilm. Kedokt.*, vol. Jilid 3, no. No.1, Maret 2009, pp. 6-13, 2017.
- [8] Gultom DA, "Patogenitas Human Papillomavirus (HPV) dalam Onkogenesis Kanker Serviks dan Pengembangan Vaksin Pencegahannya," *J. Pro-Life*, vol. 8, no. 2, pp. 134-147, 2021, doi: <https://doi.org/10.33541/jpvol6Iss2pp102>.

- [9] Erni E, Wathon S, "PENGEMBANGAN SISTEM DETEKSI HPV (Human Papilloma Virus) BERBASIS MARKA MOLEKULER PCR-RFLP ELISA ERNI, SYUBABBANUL WATHON," *BioTrends*, vol. 9, no. 2, pp. 48–55, 2018.
- [10] Evriarti PR, Yasmon A, "Patogenesis Human Papillomavirus (HPV) pada Kanker Serviks," *J. Biotek Medisiana Indones.*, vol. 8, no. 1, pp. 23–32, 2019, doi: 10.22435/jbmi.v8i1.2580.
- [11] Dai S, Long Y, "Genotyping Analysis using An RFLP Assay," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1245, pp. 93–99, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6_7.
- [12] Achyar A, Hindayageni A, Humaira F, Wijaya NN, Aqsha N, Zultsatunni'mah Z, "Analysis of Genetic Variations in Poly Gene Sequences in Dengue Virus 2 Using In-Silico RFLP," *Bioscience*, vol. 5, no. 1, pp. 80–86, 2021, doi: 10.24036/0202151111916-0-00.
- [13] Fadhilah FR, Sahiratmadja EK, Safitri R, Maskoen AM, Susanto H, "Analisis Filogenetik Gen L1 Human Papillomavirus 16 pada Penderita Kanker Serviks di Bandung," *Maj. Kedokt. Bandung*, vol. 47, no. 3, pp. 174–178, 2015, doi: 10.15395/mkb.v47n3.598.
- [14] Chenna R, "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3497–3500, 2003, doi: 10.1093/nar/gkg500.
- [15] Rohimah S, Mukarramah L, Sindiyah V, S. VY, K. GA, Su'udi M, "Eksplorasi Jenis dan Potensi DNA BARCODE ANGGREK *Thrixspermum* Secara In Silico," *J. Biodjati*, vol. 3, no. 2, pp. 50–58, 2018, doi: 10.15575/biodjati.v3i2.3409.
- [16] Mumtaz JR, "Studi Pendahuluan Gambaran Variasi Gen CYP2A6 pada Pasien Laki-laki Infertil," Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, 2020.
- [17] Ubaidillah R, Sutrisno H, *Pengantar Biosistemika: Teori dan Praktek*. Bogor: Museum Zoologi Bogoriensis-LIPI, 2009.
- [18] Knappe M, Bodevin S, Selinka HC, et al., "Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 38, pp. 27913–27922, 2007, doi: 10.1074/jbc.M705127200.
- [19] Dasgupta J, Bienkowska-Haba M, Ortega ME, et al., "Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 4, pp. 2617–2624, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.160184.
- [20] Kanaya ON, Achyar A, "Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen PHT1 pada Padi (*Oryza sativa*) NCBI Popset 240028097 Menggunakan RFLP Secara In Silico," *Serambi Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 5–9, 2023.
- [21] Af'idzatuttama, A. A. Nawangsih, and Giyanto, "Keanekaragaman Karakter Galur-Galur Bakteri Penyebab Busuk Hitam (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) pada Kubis terhadap Campuran Bahan Aktif Azoksistrobin dan Difenokonazol," *J. Fitopatol. Indones.*, vol. 19, no. 2, pp. 45–56, 2023, doi: 10.14692/jfi.19.2.45.
- [22] Wahjudi M, Setiawan E, Tofinastri EN, "Penggunaan Gen E6 Sebagai Target Deteksi Human Papillomavirus Tipe 11 dengan Metode Polymerase Chain Reaction," *Indones. J. Clin. Pharm.*, vol. 9, no. 3, p. 205, 2020, doi: 10.15416/ijcp.2020.9.3.205.
- [23] Yue Y, Yang H, Wu K, et al., "Genetic Variability in L1 and L2 Genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0055204.