



Analysis of Genetic Variation of Measles Virus Genotype and Isolate M-F Intergenic Spacer Sequences PopSet: 2105287799 using Restriction-Fragment Length Polymorphism (RFLP) In Silico

Nurul Aulia, Cahaya Kamila Putri, Lisna Khairiyah,
Febby Athiyah Khairunnisa, Afifatul Achyar

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang
Jl. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar Barat, Kecamatan Padang Utara, Kota Padang
Email: nurulaulia1807@gmail.com

ABSTRAK

Virus Campak adalah anggota dari *Paramyxoviridae*, dalam genus *Morbillivirus*. Penyakit ini mudah menular melalui sistem pernapasan, terutama percikan ludah atau cairan yang keluar dari sistem pernapasan, seperti pada saat bersin, batuk, maupun berbicara. WHO saat ini mengenali 8 clade, yaitu A, B, C, D, E, F, G, dan H. Dalam clades ini, ada 23 genotipe yang dikenali, seperti A, B1, B2, B3, C1, C2, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, E, F, G1, G2, G3, H1, dan H2, dan 1 genotipe sementara, d11. Virus dengan urutan terkait dalam beberapa genotipe (misalnya, B3 dan H1) disebut sebagai cluster. WHO merekomendasikan bahwa 450 nukleotida yang mengkode terminal COOH 150 asam amino nukleoprotein (N - 450) adalah jumlah minimum data urutan yang diperlukan untuk menetapkan genotipe campak. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis variasi genetik pada sekuens gen genotipe virus campak dan isolat M-F intergenic spacer dengan nomor identitas PopSet NCBI 2105287799 menggunakan RFLP *in silico*. Enzim restriksi yang digunakan adalah *Plu*TI. Hasil dalam penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat variasi genetik dalam pengenalan situs Enzim *Plu*TI (Alel A1, A2, A3 dan A4). Berdasarkan hasil RFLP *in silico* terdapat variasi genetik dalam sisi pengenalan restriksi enzim *Plu*TI pada 28 sekuens gen genotipe virus campak dan isolat M-F intergenic spacer.

Kata Kunci: Variasi genetik, Virus Campak, RFLP in silico

PENDAHULUAN

Virus Campak adalah anggota dari *Paramyxoviridae*, dalam genus *Morbillivirus*. Penyakit ini mudah menular melalui sistem pernapasan, terutama percikan ludah atau cairan yang keluar dari sistem pernapasan, seperti pada saat bersin, batuk, maupun berbicara (Kemenkes RI, 2017a). Penyakit ini sangat menular dan akut. Penyakit campak adalah penyakit yang dapat sembuh dengan sendirinya. Namun, jika virus campak menginfeksi balita terutama anak-anak dengan gizi buruk dapat mengakibatkan komplikasi, seperti *bronchopneumonia*, *gastroenteritis*, dan otitis media. Ensefalitis jarang terjadi tetapi dapat berakibat fatal, yaitu kematian (Griffin DE, 2007).

WHO saat ini mengenali 8 clade virus campak, yaitu A, B, C, D, E, F, G, dan H. Dalam clades ini, ada 23 genotipe yang dikenali, antara lain A, B1, B2, B3, C1, C2, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, E, F, G1, G2, G3, H1, dan H2, dan 1 genotipe sementara, yakni d11. Virus dengan sekuens terkait dalam beberapa genotipe (misalnya,



B3 dan H1) disebut sebagai cluster. WHO merekomendasikan bahwa 450 nukleotida yang mengkode terminal COOH 150 asam amino nukleoprotein (N - 450) adalah jumlah minimum data sekuen yang diperlukan untuk menetapkan genotipe campak (Rota *et al.*, 2011).

Dari genus paramyxovirus yang berbeda, hanya morbilliviruses, termasuk MeV (virus campak), dan henipavirus diketahui mengikat protein reseptor yang ditampilkan pada permukaan sel target untuk infeksi. Akibatnya, protein perlekatan virus- virus ini kekurangan aktivitas neuraminidase, sementara semua anggota lain dari Paramyxovirinae subfamili membawa perlekatan haemagglutinin-neuraminidase (HN). Protein dengan spesifisitas tinggi untuk oligosakarida atau glikolipid yang mengandung asam sialat. Secara khusus, semua hemagglutinin MeV (H) protein perlekatan yang dianalisis sejauh ini mampu berinteraksi dengan afinitas tinggi dengan sinyal molekul aktivasi limfosit (SLAM/CD150w). Protein H yang berasal dari protein yang dilemahkan strain vaksin Edmonston dan beberapa isolat juga mengikat pengatur aktivasi komplemen (CD46). Secara klinis, penyebaran sistemik dan viremia dapat didukung oleh MeV. Ketiga reseptor yang telah dihipotesiskan ada pada sel epitel. Protein perlekatan henipavirus (G) telah beradaptasi untuk mengikat ephrinB2 dan B3 sebagai reseptor (Plempner *et al.*, 2011).

Untuk mempelajari sekuen yang mengkode protein-protein di atas diperlukan ilmu bioinformatika. Bioinformatika adalah salah satu cabang baru ilmu biologi yang merupakan perpaduan antara biologi dan teknologi informasi. Menurut Durso (1997) bioinformatika adalah manajemen dan analisis informasi biologis yang disimpan dalam database (M Aprijani, 2004). NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) yang didirikan pada tahun 1988, merupakan suatu institusi yang memuat database yang dapat diakses oleh publik dan mengembangkan software penganalisis data genom. Database terus-menerus diperbarui sesuai dengan penemuan- penemuan terkini yang menyangkut DNA, protein, senyawa aktif dan taksonomi. NCBI merupakan salah satu bank data gen, protein dan literature khususnya dibidang kesehatan yang terlengkap dan diacu oleh para peneliti di dunia. NCBI dimaksudkan untuk membantu dalam memahami mekanisme molekuler yang mempengaruhi kesehatan manusia penyakit (Dhiantika, 2010).

Studi untuk mempelajari sekuen gen atau genom menggunakan *software* bioinformatik sering disebut sebagai studi *in silico*. Tahapan analisis *in silico* dimulai memprediksi, memberi hipotesis, memberi penemuan baru atau kemajuan baru dalam pengobatan dan terapi (Bare *et al.*, 2019). Studi *in silico* dengan teknik *molecular docking* merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk memprediksi bioaktivitas dari suatu senyawa sebelum dilakukannya analisa percobaan di laboratorium. Subangkit *et al* (2015) menyatakan metode ini memiliki keunggulan, diantaranya dapat mengurangi penggunaan alat dan bahan yang berlebihan serta dapat menghemat dalam pembiayaan



percobaan (Dona *et al.*, 2019). Selain itu, studi *in silico* juga digunakan untuk mendesain primer untuk teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) agar diperoleh pasangan primer yang ideal dalam mengamplifikasi gen target serta mensimulasikannya melalui PCR *in silico* (Achyar *et al.*, 2021).

Dengan bekal data sekuen gen yang terdapat di NCBI dan software bioinformatik, variasi genetik dari suatu populasi dapat dianalisis menggunakan *tools* restriksi sekuen nukleotida. Berdasarkan latar belakang di atas, maka studi ini bertujuan untuk menganalisis variasi genetik pada sekuen gen genotipe virus campak dan isolat M-F *intergenic spacer* menggunakan *Restriction-Fragment Length Polymorphism* (RFLP) secara *in silico*.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sekuen gen genotipe virus campak dan isolat M-F *intergenic spacer* dengan nomor identitas PopSet 2105287799 di unduh dalam format fasta dari NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/?term=2105287799>. Data tersebut dikirimkan oleh Vaidya, S.R., Kamble, M.B. dan Bhattad, D.R. tahun 2021 dalam studinya yang berjudul *Virus Repository, National Institute of Virology, 20-A, Ambedkar Road, Pune, Maharashtra 411001, India*. Popset tersebut terdapat 28 sekuen gen pengkode genotipe virus campak dan isolat M-F *intergenic spacer*. Gen tersebut berukuran 1012 bp dengan nomor identitas GenBank MW896797.1-MW896770.1. Organisme yang digunakan adalah virus campak genotip D8 yang bersumber dari urin.

Skrinning Kandidat Enzim Restriksi

Situs <http://insilico.ehu.es/restriction/> digunakan untuk skrinning kandidat enzim restriksi. Situs tersebut menampilkan berbagai *tools*. Pada metode ini *tools* yang dipilih adalah *compare restriction pattern of many sequences*. Langkah selanjutnya memasukkan file sekuen yang sudah diunduh dalam bentuk fasta pada situs NCBI. Selanjutnya *Go to next step* diklik, lalu *Only restriction enzymes with known bases (no N, R, Y...)* di pilih untuk mendapatkan enzim restriksi yang biasanya benar-benar jelas tidak ada basa N, R atau Y. Langkah selanjutnya memilih *Get list of restriction enzymes* sehingga diperoleh kandidat enzim restriksi yang akan digunakan pada tahap selanjutnya.

RFLP secara *In Silico*

Situs <https://benchling.com/> digunakan untuk restriksi secara virtual atau *in silico*. Langkah pertama yaitu membuat akun menggunakan email agar situs tersebut digunakan secara gratis. Selanjutnya klik *create* untuk membuat *project* enzim restriksi. Selanjutnya klik tanda plus (+) pada pojok kanan layar lalu pilih *DNA Sequence* selanjutnya pilih *import DNA Sequences* lalu klik *or choose a file*. Selanjutnya memilih



file sekuen genotipe virus campak dan isolat M-F intergenic spacer yang sudah di *download* dalam bentuk fasta, setelah 28 sekuen genotipe virus campak dan isolat M-F intergenic spacer di *import* lalu klik *Upload done*. Langkah selanjutnya klik simbol gunting pada pojok kanan layar untuk restriksi *in silico*. Selanjutnya ketik nama enzim restriksi yang ditentukan sebelumnya pada *find enzyme*, lalu klik *run digest* untuk melakukan restriksi. Selanjutnya klik *virtual digest* untuk memperoleh gambar elektroforegram.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Skrinning Kandidat Enzim Restriksi

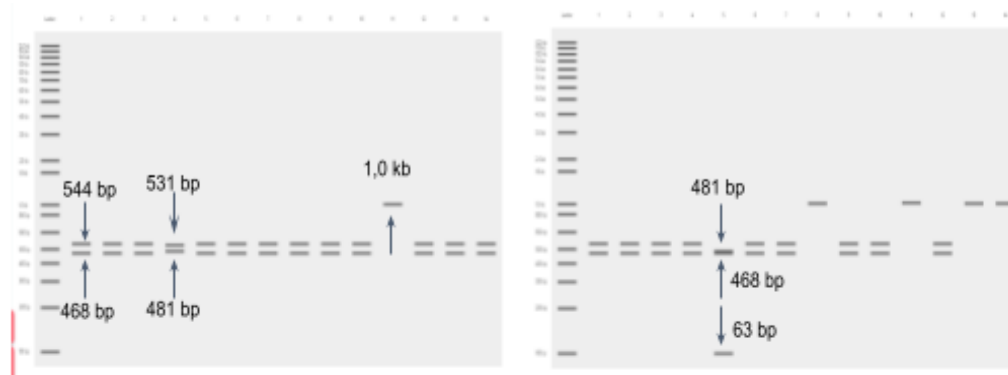
Hasil yang diperoleh dari skrinning enzim restriksi pada situs <http://insilico.ehu.es/restriction/> ditemukan 88 sisi pengenalan enzim restriksi. Salah satu enzim restriksi G_GCGC'C yang dikenali oleh enzim *PluTI*. Sisi pengenalan ini dipilih karena terdapat variasi pemotongan pada sekuen gen genotipe virus campak dan isolat M-F intergenic spacer dengan nomor identitas Popset 2105287799.

Enzim *PluTI* bersumber dari strain *E. coli* yang membawa gen *PluTI* cloning dari *Photorhabdus luminescens*. Pemotongan DNA genom mamalia diblokir oleh metilasi CpG dan memerlukan dua atau lebih situs untuk pembelahan situs potong: GGCGC/C (New England Biolabs, 2021).

RFLP secara *In Silico*

Dengan semakin berkembangnya teknologi perangkat lunak bioinformatika, restriksi dan visualisasi fragmen hasil restriksi dapat dilakukan secara *in silico* yang bertujuan untuk memprediksi hasil genotyping sebelum melakukan RFLP secara nyata di laboratorium (Achyar, *et al.*, 2021). RFLP secara *in silico* pada 28 sekuen sekuen gen genotipe virus campak dan isolat M-F intergenic spacer dilakukan pada situs Benchling <https://benchling.com/> kandidat enzim restriksi yang digunakan yaitu enzim *PluTI*. Hasil RFLP secara *in silico* dapat dilihat pada Gambar 1 yang merupakan elektroforegram hasil restriksi dengan enzim *PluTI*.

Restriksi menggunakan enzim *PluTI* pada 28 sekuen gen genotipe virus campak dan isolat M-F intergenic spacer menghasilkan empat variasi alel (Gambar 1). Alel A1 menghasilkan dua pita nukleotida dengan ukuran 544 bp dan 468 bp, alel A2 menghasilkan dua pita nukleotida dengan ukuran 531 dan 481 bp, alel A3 menghasilkan satu pita nukleotida dengan ukuran 1.0 kb, alel A4 menghasilkan tiga pita nukleotida dengan ukuran 481 bp, 468 bp dan 63 bp. Alel A1 memiliki frekuensi alel yang tinggi dari pada frekuensi alel A2, A3 dan A4 karena alel A1 memiliki presentase kehadiran fragmen 75% dari 28 sekuen gen genotip virus campak dan isolat M-F intergenic spacer (Tabel 1).



Gambar 1 Elektroforegram hasil restriksi dengan enzim *Plu*TI secara *in silico*.

Kiri Ladder Life 1 kb Plus, (1) MW896770.1, (2) MN896771.1, (3) MN896772.1, (4) MN 896773.1, (5) MN896774.1, (6) MN896775.1, (7) MN896776.1, (8) MN89677.1, (9) MN896778.1, (10) MN896779.1, (11) MN896780.1, (12) MN896781.1, (13) MN896782.1, (14) MN896783.1; kanan Ladder Life 1 kb Plus, (1) MN896784.1, (2) MN896785.1, (3) MN896786.1, (4) MN896787.1, (5) MN896788.1, (6) MN896789.1, (7) MN896790.1, (8) MN896791.1, (9) MN896792.1, (10) MN896793.1, (11) MN896794.1, (12) MN896795.1, (13) MN896796.1, (14) MN896797.1.

Diketahui hasil RFLP *in silico* terdapat variasi genetik dalam sisi pengenalan restriksi enzim *Plu*TI pada 28 sekuen gen genotipe virus campak dan isolat M-F intergenic spacer, sumber isolasi sekuen tersebut dari urin manusia (Vaidya, S. R *et al.*, 2021). RFLP (Botstein *et al.*, 1980) adalah penanda DNA pertama yang dihasilkan dari perbedaan sekuen nukleotida tanaman 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 sekuen DNA akan merubah tempat pemotongan (*restriction sites*) 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 sidik jari DNA (*DNA fingerprint*). Metode RFLP adalah metode analisis menggunakan enzim restriksi yang memotong urutan nukleotida khas pada lokasi tertentu yang berbeda sehingga dihasilkan fragmen yang panjangnya berbeda-beda (Theodore, 2000).



Tabel 1 Frekuensi Alel gen genotipe virus campak dan isolat M-F intergenic spacer Berdasarkan Hasil RFLP *in silico*

Enzim Restriksi	Situs Pengenalan Restriksi	Ukuran Fragmen	Alel	Jumlah Kehadiran Fragmen (N=28)	Presentase kehadiran fragmen (%)	Frekuensi Alel
<i>Plu</i> TI	G_GCGC'C	544 bp dan 468 bp	A1	21	75	0.75
		531 bp dan 481 bp	A2	1	3.6	0.036
		1,0 kb	A3	5	17.8	0.178
		481 bp, 468 bp dan 63 bp	A4	1	3.6	0.036

PENUTUP

Berdasarkan hasil RFLP *in silico* terdapat variasi genetik dalam sisi pengenalan restriksi enzim *Plu*TI pada 28 sekuen gen genotipe virus campak dan isolat M-F intergenic spacer.

REFERENSI

- Achyar A, Atifah Y, Putri DH. *In silico* study of Developing a Method for Detecting Pathogenic Bacteria in Refillable Drinking Water Samples. *Journal of Physics: Conference Series*. 1940, 012061.
- Achyar *et al.* 2021. Analysis of Genetic Variations in POLY Gene Sequences in Dengue Virus 2 Using In-Silico RFLP. *Jurnal Bioscience*. Vol. 05. No. 1: 80-86.
- Bare *et al.*, 2019. Studi *in Silico* Prediksi Potensi 6-Gingerol sebagai inhibitor c-Jun N-terminal kinases (JNK). *Jurnal Jejaring Matematika dan Sains*. 1 (2):59-63.
- Dhiantika. 2010. *Pengenalan National Centre For Biotechnology Information (NCBI)*. Universitas gajah mada: yogyakarta.



- Dona *et al.* 2019. Studi In Silico, Sintesis, dan Uji Sitotoksik Senyawa P-Metoksi Kalkon Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 6(3): 243–249. Griffin DE. Measles Virus in: Knipe DM and Howley PM (eds). 2007. *Fields Virology, 5th Ed.* USA: Lippincot Williams & Wilkins.
- Griffin DE. *Measles Virus in: Knipe DM and Howley PM* (eds). *Fields Virology, 5th Ed.* USA: Lippincot Williams & Wilkins. 2007.
- Kemendes RI. (2017a). *Peraturan menteri kesehatan Republik Indonesia nomor 12 tentang penyelenggara imunisasi*. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.
- M Aprijani DA dan Abdushshomad Elfaizi. 2004. *BIOINFORMATIKA: Perkembangan, Disiplin Ilmu dan Penerapannya di Indonesia*. Universitas Gunadarma: Jakarta.
- New England Biolabs. 2021. PluTI. URL: <https://international.neb.com/products/r0713-pluti#Product%20Information>
- Plempner *et al.* 2011. Structural and Mechanistic Studies of Measles Virus Illuminate Paramyxovirus Entry. *PLoS Pathogens*. 7: 1-6.
- Rota *et al.* 2011. Global Distribution of Measles Genotypes and Measles Molecular Epidemiology. *The Journal of Infectious Diseases*. 204: 14-23.
- Subangkit, Mursinah, Bela, Budiman dan Fera Ibrahim. 2015. ANALISIS GEN HAEMAGGLUTININ PADA VIRUS CAMPAK LIAR. *Media Litbangkes*. Vol. 25 No. 1: 59 – 64.
- Theodore, G. Schurr. 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)*.
- Vaidya, S. R., Kamble, M. B. dan Bhattad, D. R. 2021. *Virus Repository, National Institute of Virology, 20-A, Ambedkar Road, Pune, Maharashtra 411001, India*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/?term=2105287799>. Diakses tanggal 4 November 2021.