

Analysis of Genetic Variations in *POLY* Gene Sequences in Dengue Virus 2 Using In-Silico RFLP

Afifatul Achyar, Alvenaya Hindayageni, Fadhila Humaira, Nurfadillatun Nisa Wijaya, Nur Aqsha, Zultsatunni'mah

Universitas Negeri Padang, Padang

afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id

Abstract. Dengue hemorrhagic fever (DHF) is a disease caused by Dengue virus transmitted to humans through infected *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. Dengue virus is classified into four serotypes, including DEN-1, DEN-2, DEN-3, and DEN-4. The four dengue viruses' genomes share about 65% similarities, and the rest is a genetic variation that differentiates between serotypes. Genetic variations also occur even within one serotype. This study aimed to analyze genetic variation in envelope protein E (*POLY*) gene sequences in Dengue Virus 2 NCBI PopSet 1760494694 using in-silico RFLP by free bioinformatics tools on the internet. The restriction enzymes used were *AfeI* and *ApaI*. The in-silico RFLP results in this study showed that there were genetic variations in the recognition site of the *AfeI* enzymes (A1 allele and A2 allele) and *ApaI* (B1 allele and B2 allele) in 18 DNA sequences of the *POLY* gene for Dengue 2 virus NCBI PopSet 1760494694.

Katakunci: Genetic variation, Dengue virus, in-silico RFLP.



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2021 by author.

1. PENDAHULUAN

Demam berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit yang banyak ditemukan di sebagian besar wilayah beriklim tropis dan subtropis, seperti Asia Tenggara, Amerika Tengah, Amerika dan Karibia. Agen penyebab DBD adalah virus Dengue (DENV) dan inang alamnya adalah sel manusia. Virus Dengue termasuk ke dalam famili Flaviridae dan genus Flavivirus, serta terdapat 4 serotipe diantaranya DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4. Keempat virus ini disebut serotipe karena masing-masing memiliki interaksi yang berbeda dengan antibodi dalam serum darah manusia. Virus ini ditularkan ke manusia melewati gigitan nyamuk betina yang terinfeksi, khususnya nyamuk *Aedes aegypti* dan *Ae. albopictus* yang ada hampir di seluruh pelosok Indonesia (Kurane, 2007).

Demam berdarah Dengue merupakan bentuk keparahan dari infeksi DENV diidentifikasi dengan hilangnya plasma yang menimbulkan gejala syok. DENV ini dapat memicu penyakit, mulai dari asimtomatik hingga DBD (Gubler, 1998). Keempat serotipe virus Dengue tersebut berpotensi menyebabkan DBD. Namun, penelitian di Asia Tenggara menunjukkan bahwa infeksi sekunder dengan virus Dengue serotipe 2 (DEN-2) lebih mungkin menyebabkan penyakit parah daripada serotipe lainnya (Armstrong & Rico-Hesse, 2003).

Virus Dengue serotipe 2 mempunyai genom berukuran 10.723 basa (NCBI Reference Sequence: NC_001474.2). Di dalam genomnya terdapat yang disebut *single open reading frame* (SORF) yang mempunyai peranan sebagai pengkode terhadap 2 macam protein yaitu protein struktural dan nonstruktural. Protein struktural terdiri atas protein C (capsid), protein M (membrane), protein Prm (premembrane) dan yang terakhir protein E (envelop). Protein non struktural sendiri terdiri atas 7 macam untuk yang pertama yaitu: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5. Seluruh protein di atas disebut poliprotein yang dikode oleh gen *POLY* atau gen polyprotein (Parera, 2009; Guzman *et al.*, 2010).

Struktur virus Dengue sendiri mempunyai peranannya masing-masing dan sangat penting. Fungsi utama protein yang dimiliki oleh virus adalah sebagai alat untuk mempermudah perpindahan asam nukleat pada virus ke sel inang atau ke sel inang yang lain. Protein ini juga berperan sebagai perlindungan gen virus terhadap inaktivasi oleh nukleus dan melengkapi partikel virus untuk mengintervensi sel yang rentan. Respon imunitas secara langsung akan melawan faktor antigen protein atau glikoprotein virus yang tidak terlindungi dari permukaan virus (Sudaryono, 2011).

Variasi genetik merupakan perubahan yang terjadi pada nukleotida, gen, kromosom, dan genom pada suatu organisme. Meskipun genom keempat virus Dengue memiliki kemiripan sekitar 65%, sisanya merupakan variasi genetik yang membedakan antar serotipe. Variasi genetik juga terjadi bahkan dalam satu serotipe, misalnya pada virus Dengue serotipe 2 (DEN-2). Variasi genetik pada suatu populasi akan berpengaruh terhadap kemampuan bertahan hidup suatu individu (Frankham *et al.*, 2002). Semakin tinggi variasi genetik yang terdapat pada suatu populasi, maka semakin baik kemampuan individu dalam beradaptasi terhadap perubahan lingkungan (Dunham, 2004).

Metode yang umum digunakan untuk analisis variasi genetik diantaranya *Restriction-Fragment Length Polymorphism* (RFLP), sekuensing DNA, dan pohon filogenetik. Variasi genetik dapat dikaji secara *in silico* menggunakan sekuen gen yang tersedia pada database genbank NCBI. Uji *in silico* adalah suatu istilah untuk percobaan atau uji yang dilakukan dengan metode simulasi komputer. Kegunaan uji *in silico* adalah untuk memprediksi, memberi hipotesis, memberi penemuan baru atau kemajuan baru dalam pengobatan dan terapi (Hardjono, 2013). Secara sederhana *in silico* dapat diterjemahkan sebagai metode untuk mengupayakan pendekatan kondisi nyata ke dalam simulasi berbasis komputer menggunakan program aplikasi atau software tertentu (Suharna, 2012; Johan, 2016). Studi *in silico* merupakan studi awal sebelum dilanjutkan dengan metode lain seperti *in vivo* dan *in vitro* untuk membantu memprediksi serta memberikan hipotesis tentang aktivitas suatu senyawa atau ligan karena proses dari keduanya terkadang sulit menjelaskan secara sederhana terjadinya mekanisme ligan dan target serta membutuhkan waktu yang lebih panjang dan biaya yang tidak murah (Hardjono, 2013).

Berdasarkan uraian di atas, maka studi ini bertujuan untuk menganalisis variasi genetik pada sekuen gen envelope protein E (*POLY*) pada virus Dengue 2 menggunakan *Restriction-Fragment Length Polymorphism* (RFLP) secara *in silico*.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan

Sekuen gen *POLY* virus Dengue 2 yang digunakan untuk uji *in silico* diunduh dalam format fasta dari NCBI dengan nomor identitas NCBI PopSet 1760494694 yang dikirimkan oleh Calvez, E., Somlor, S., Viengphouthong, S., Bounmany, P., Keosenhom, S. dan Grandadam dalam studinya yang berjudul *Genetic landscape of Dengue virus serotype 2 in Vientiane Capital, Lao PDR* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/1760494694>). Dalam PopSet tersebut terdapat 18 sekuen gen pengkode polyprotein virus Dengue 2, region protein selubung E (gen *POLY*) berukuran 1.485 bp (*partial cds*) dengan nomor identitas GenBank MN444605.1-MN444622.1. Calvez *et al.* (2019) mendeskripsikan bahwa sekuen tersebut diisolasi dari kultur sel 18 isolat virus Dengue 2 di Arbovirus and Emerging Viral Diseases Laboratory, Institut Pasteur du Laos, Vientiane, Laos.

2.2 Metode

2.2.1 Skrining kandidat enzim restriksi

Skrining kandidat enzim restriksi yang akan dipakai pada RFLP *in silico* dilakukan dengan *tools* pada situs <http://insilico.ehu.es/restriction/>. *Tools* ini akan membandingkan pola restriksi dari banyak sekuen DNA yang diuji serta enzim restriksi yang memotongnya. Pada situs tersebut, *tools* yang dipilih adalah “*compare restriction pattern of many sequences*”. Sekuen gen yang sudah diunduh dalam bentuk fasta, diunggah pada kolom yang disediakan. Pada langkah selanjutnya akan terlihat hasil *alignment* masing-masing sekuen dan sekuen yang sama akan dibuang untuk mempermudah analisis. Langkah selanjutnya, opsi “*only restriction enzymes with known bases (no N,R,Y...)*” dipilih agar mendapatkan enzim restriksi dengan sisi pengenalan restriksi yang pasti. Kemudian tombol “*get the list restriction enzyme*” dipilih untuk memperoleh kandidat enzim restriksi yang akan digunakan pada tahap berikutnya.

2.2.2 RFLP secara *in silico*

Restriction-Fragment Length Polymorphism (RFLP) secara *in silico* atau restriksi secara virtual dilakukan menggunakan *tools* pada situs <https://www.benchling.com/>. Situs ini gratis tetapi harus melakukan registrasi untuk membuat akun menggunakan email. Tahap awal yang dilakukan adalah melakukan *import* 18 sekuen DNA gen *POLY* yang sudah diunduh dari NCBI ke dalam folder *project* di situs Benchling. Restriksi *in silico* dilakukan dengan mengklik simbol gunting pada pojok kanan layar. Kemudian *tools* “*find enzyme*” dipilih dan

nama enzim restriksi yang sudah ditentukan sebelumnya pada saat skrining, diketikkan pada kolom yang tersedia. Selanjutnya, menu “*run digest*” diklik untuk melakukan restriksi. Adapun gambar elektroforegram diperoleh dengan mengklik menu “*virtual digest*”.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Skrining kandidat enzim restriksi

Berdasarkan output yang diperoleh dari skrining kandidat enzim restriksi pada situs <http://insilico.ehu.es/restriction/>, terdapat 48 sisi pengenalan enzim restriksi diantaranya AGC[^]GCT yang dikenali oleh enzim *AfeI* dan G[↓]TGCA[↑]C yang dikenali oleh enzim *ApaI*. Kedua sisi pengenalan ini dipilih karena menunjukkan variasi sisi pemotongan pada semua sekuen gen *POLY* virus Dengue 2 dalam PopSet 1760494694.

AfeI merupakan enzim restriksi yang berasal dari bakteri *Alcaligenes faecalis* T2774 (S.K. Degtyarev). Isoschizomer enzim ini adalah *Aor51H1* dan *Eco47III*. Ketiga enzim ini menghasilkan fragmen dengan ujung tumpul atau *blunt end*. Adapun *ApaI* pertama kali diisolasi dari bakteri *Acetobacter pasteurianus* (ATCC 12875). Isoschizomer enzim ini adalah *Alw44I* dan *VneI*. Ketiga enzim ini menghasilkan fragmen dengan ujung lengket atau *sticky end* (New England Biolabs, 2021).

3.2 RFLP secara *in silico*

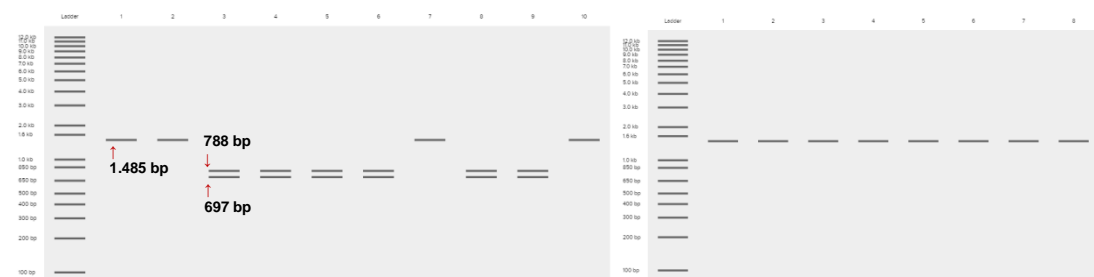
RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) adalah teknik yang umum digunakan untuk penentuan genotip (*genotyping*) melalui pemotongan sekuen DNA dengan enzim restriksi. Fragmen DNA hasil restriksi dipisahkan menggunakan elektroforesis dan divisualisasi menggunakan teknik *Southern Blotting* (Dai dan Long, 2015). Menurut Siti *et al.*, (2013) metode RFLP sebagai salah satu metode untuk mengetahui polimorfisme dalam mengkaji sejarah evolusi populasi manusia (garis keturunan/silsilah) dan untuk mengetahui adanya mutasi. 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).

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. Selain untuk prediksi, teknologi ini juga dapat dimanfaatkan untuk mengeksplor lebih lanjut sekuen DNA yang tersedia di database GenBank NCBI seperti yang dilakukan oleh Wei *et al.* (2007) dalam melakukan identifikasi sepuluh kelompok fitoplasma baru menggunakan analisis RFLP simulasi komputer dari gen 16S rRNA.

RFLP secara *in silico* pada 18 sekuen DNA gen *POLY* virus Dengue 2 NCBI PopSet 1760494694 dilakukan pada aplikasi Benchling menggunakan enzim restriksi yang telah dipilih

pada tahap skrining kandidat enzim restriksi, yakni enzim *AfeI* dan *ApaI*. Hasil RFLP *in silico* divisualisasikan dengan elektroforesis gel virtual seperti pada Gambar 1 untuk restriksi dengan enzim *AfeI* dan Gambar 2 untuk restriksi dengan enzim *ApaI*.

Restriksi dengan enzim *AfeI* pada 18 sekuen DNA gen *POLY* virus Dengue 2 menghasilkan dua variasi alel, yaitu alel A1 yang menghasilkan satu pita DNA berukuran 1485 bp dan alel A2 yang menghasilkan dua pita DNA berukuran 788 bp dan 697 bp (Gambar 1 dan Tabel 1). Hal ini karena alel A2 memiliki situs pengenalan restriksi *AfeI* (AGC[^]GCT) dan sisi pemotongan pada basa ke-788, sedangkan alel A1 tidak memiliki situs pengenalan restriksi *AfeI*. Alel A1 memiliki frekuensi alel lebih tinggi dibandingkan alel A2 karena memiliki persentase kehadiran fragmen 66,67% dari 18 sekuen pada NCBI PopSet 1760494694.



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

Kiri: Ladder Life 1 kb Plus, (1) MN444605.1, (2) MN444606.1, (3) MN444607.1, (4) MN444608.1, (5) MN444609.1, (6) MN444610.1, (7) MN444611.1, (8) MN444612.1, (9) MN444613.1, (10) MN444614.1; Kanan: Ladder Life 1 kb Plus, (1) MN444615.1, (2) MN444616.1, (3) MN444617.1, (4) MN444618.1, (5) MN444619.1, (6) MN444620.1, (7) MN444621.1, (8) MN444622.1



Gambar 2 Elektroforegram hasil restriksi dengan enzim *ApaI* secara *in silico*.

Kiri: Ladder Life 1 kb Plus, (1) MN444605.1, (2) MN444606.1, (3) MN444607.1, (4) MN444608.1, (5) MN444609.1, (6) MN444610.1, (7) MN444611.1, (8) MN444612.1, (9) MN444613.1, (10) MN444614.1; Kanan: Ladder Life 1 kb Plus, (1) MN444615.1, (2) MN444616.1, (3) MN444617.1, (4) MN444618.1, (5) MN444619.1, (6) MN444620.1, (7) MN444621.1, (8) MN444622.1

Adapun restriksi dengan enzim *ApaI* pada 18 sekuen DNA gen *POLY* virus Dengue 2 juga menghasilkan dua variasi alel, yaitu alel B1 yang menghasilkan dua pita DNA berukuran 622 bp dan 863 bp, serta alel B2 yang menghasilkan dua pita DNA berukuran 903 bp dan 582 bp (Gambar 2 dan Tabel 1). Hal ini karena alel B1 memiliki situs pengenalan restriksi *ApaI* (G[↓]TGCA[↑]C) dan sisi pemotongan pada basa ke-622, sedangkan alel B2 memiliki situs pengenalan restriksi *ApaI* dan sisi pemotongan pada basa ke-903. Alel B1 memiliki frekuensi alel lebih tinggi dibandingkan alel B2 karena memiliki persentase kehadiran fragmen 77,78%

dari 18 sekuen pada NCBI PopSet 1760494694.

Tabel 1. Frekuensi Alel Gen *POLY* Virus Dengue 2 Berdasarkan Hasil RFLP *In Silico*

Enzim Restriksi	Situs Pengenalan Restriksi	Ukuran fragmen (bp)	Alel	Jumlah kehadiran fragmen (N = 18)	Persentase kehadiran fragmen (%)	Frekuensi Alel
<i>AfeI</i>	AGC [^] GCT	1485	A1	12	66,67	0,67
		788 dan 697	A2	6	33,33	0,33
<i>ApaI</i>	G [↓] TGCA [↑] C	622 dan 863	B1	14	77,78	0,78
		903 dan 582	B2	4	22,22	0,22

Berdasarkan hasil RFLP *in silico* diketahui terdapat variasi genetik dalam sisi pengenalan restriksi enzim *AfeI* dan *ApaI* pada sekuen DNA gen *POLY* yang diisolasi dan diamplifikasi dari kultur sel 18 isolat virus Dengue 2 oleh Calvez *et al.* (2019) di Arbovirus and Emerging Viral Diseases Laboratory, Institut Pasteur du Laos, Vientiane, Laos. Mustafa *et al.* (2015) dalam penemuannya terhadap serotipe baru virus Dengue menyatakan bahwa co-sirkulasi beberapa serotipe virus Dengue ditambah dengan aktivitas manusia yang meningkat meningkatkan kemungkinan perubahan genetik, yang mengarah pada keragaman populasi virus. Rekombinasi genetik, seleksi alam dan kemacetan genetik telah diimplikasikan sebagai faktor yang dapat menyebabkan munculnya serotipe baru.

4. Kesimpulan

Hasil RFLP *in silico* pada penelitian ini menunjukkan adanya variasi genetik dalam sisi pengenalan restriksi enzim *AfeI* (alel A1 dan alel A2) dan *ApaI* (alel B1 dan alel B2) pada 18 sekuen DNA gen *POLY* virus Dengue 2 NCBI PopSet 1760494694.

DAFTAR PUSTAKA

- Armstrong, P. M., & Rico-Hesse, R. 2003. Efficiency of Dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 68(5): 539–544.
- Calvez, E., Somlor, S., Viengphouthong, S., Bounmany, P., Keosenhom, S. dan Grandadam. 2019. *Dengue virus 2 polyprotein, envelope protein E region, (POLY) gene, partial cds*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/?term=1760494694>. Diakses tanggal 7 Maret 2021.
- Dai S, Long Y. 2015. Genotyping analysis using an RFLP assay. *Methods Mol Biol*. 1245:91-9.
- Dunham, RA. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches*. USA: Department of Fisheries and Allied Aquacultures Auburn University Alabama.

- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University.
- Gubler DJ. 1998. Dengue and Dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol. Rev* 11(3):480-96.
- Guzman M. G. *et al.* 2010. Dengue: A continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*. 8: S7–S16.
- Johan, A. K. 2016. Uji In Silico Senyawa Genistein sebagai Ligan pada Reseptor Estrogen Beta. *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Hardjono S., 2013, *Sintesis dan Uji Aktivitas Antikanker Senyawa 1-(2- Klorobenzoiloksi) urea dan 1-(4-klorobenzoiloksi) urea, Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*. 2 (1), 1.
- Kurane I. 2007. Dengue Hemorrhagic Fever with Special Emphasis on Immunopathogenesis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease*. 30:329-340.
- Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. 2015. Discovery of fifth serotype of Dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in Dengue control. *Medical journal, Armed Forces India*. 71(1): 67–70.
- New England Biolabs. 2021. Afel. URL: <https://international.neb.com/products/r0652-afei#Product%20Information>. Diakses tanggal 7 Maret 2021.
- New England Biolabs. 2021. ApaLI. URL: <https://international.neb.com/products/r0507-apali#Product%20Information>. Diakses tanggal 7 Maret 2021.
- Perera R, Kuhn RJ. 2009. Structural proteomic of Dengue virus. *Curr Opin Microbiol*.11(4):377-96.
- Sekaran, Shamala Devi, Ew Cheng Lan, Kanthesh Basalingappa Mahesawarappa, Ramaprabha Apanna and Geetha Subramaniam. 2007. Evaluation of a Dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of Dengue. *J Infect Developing Countries*. 1(2): 182-188.
- Siti, Heli H.M., G. Gun G., Desy N., Achmad S. Noer. 2013. *Variasi Urutan Nukleotida Daerah D-Loop DNA Mitokondria Manusia pada Dua Populasi Asli Indonesia Tenggara*. P. 440-446.
- Sudaryono. 2011. *Perbedaan Manifestasi Klinis dan Laboratorium Berdasarkan Jenis Immunoglobulin pada Penderita Demam Berdarah Dengue*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Suharna. 2012. Studi In Silico Senyawa Turunan Flavonoid terhadap Penghambatan Enzim Tirosinase. *Skripsi*. Makassar: UIN Alauddin.
- 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).
- Wei, W., Davis, R.E., Lee, I.M., dan Zhao, Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasmata groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(8):1855-1867.