

## Variasi Genetik Gen LMP-1 HHV 4 berdasarkan Analisis RFLP Secara *In silico*: Genetic Variation of LMP-1 HHV 4 Gene based on *In silico* RFLP Analysis

Rahma Windi Astuti<sup>1</sup>, Khoirunnisa<sup>2</sup>, Eka Resi Kurniawan<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Universitas Negeri Surabaya

rwa.rahmawindiastuti@gmail.com<sup>1</sup>

### ABSTRACT

Human Herpesvirus 4 (HHV-4), also known as Epstein-Barr virus (EBV), is a member of the herpes virus family that has significant genetic variation. Molecular studies show that this variation can occur in genes that code for capsid proteins, DNA-binding proteins, and transcription-regulating proteins. *In silico* methods are used to determine mutations and genetic variations. The purpose of this study was to explore genetic variability in the LMP-1 HHV 4 gene sequence from NCBI PopSet 2581709082 using RFLP *in silico*. Restriction enzyme screening using restriction enzyme digest of DNA sites. RFLP *in silico* using the Benchling site. Genetic variability using the MEGA 11 application. The results obtained in *in silico* screening of restriction enzymes and RFLP showed a relationship between PopSet 2581709082 genetic variation and HHV 4 LMP-1 genes, marked by the presence of five alleles, namely A1, A2, A3, A4, and A5.

**Keywords** : HHV-4 virus, *in silico*, genetic variability.

### ABSTRAK

HHV-4 adalah virus DNA beruntai ganda yang termasuk dalam keluarga Herpesviridae. Herpesvirus manusia 4 (HHV-4), juga dikenal sebagai virus Epstein-Barr (EBV), adalah anggota dari keluarga virus herpes yang memiliki variasi genetik yang signifikan. Studi molekuler menunjukkan bahwa variasi ini dapat terjadi pada gen-gen yang mengkode protein kapsid, protein pengikat DNA, dan protein pengatur transkripsi. Metode *in silico* digunakan untuk mengetahui mutasi dan variasi genetik. Tujuan penelitian ini untuk mengeksplorasi variabilitas genetik pada gen LMP-1 HHV 4 sekuen dari NCBI PopSet 2581709082 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 yang diperoleh pada skrining enzim restriksi dan RFLP secara *in silico* menunjukkan adanya hubungan variasi genetik PopSet 2581709082 dan HHV 4 gen LMP-1, ditandai keberadaan lima alel yaitu A1, A2, A3, A4, dan A5.

**Kata kunci** : virus HHV-4, *in silico*, variabilitas genetik.

### PENDAHULUAN

Human Herpesvirus 4 (HHV 4) atau disebut juga Epstein-Barr Virus (EBV) merupakan virus gamma herpesvirus yang menyerang sekitar 95% orang dewasa (Mentzer et al., 2022). Sebuah studi pada tahun 2017 mengenai kanker terkait EBV memproyeksikan bahwa beberapa penyakit, termasuk limfoma Burkitt, limfoma Hodgkin, karsinoma nasofaring, dan kanker lambung, tercatat sebanyak 1,44 juta kasus baru dan sekitar 973.000 kematian di seluruh dunia (Khan et al., 2020). Virus EBV dapat menimbulkan penyakit komplikasi mononukleosis menular yang berhubungan dengan epididimitis akut (Sako et al., 2022). Kunci dalam perkembangan beberapa penyakit tersebut adalah peran transformasi Latent Membrane Protein 1 (LMP-1) (Kimberlin et al., 2021).

*Latent Membrane Protein 1* (LMP-1) merupakan onkogen signifikan dari virus yang menyebabkan kanker EBV (Zheng *et al.*, 2007). LMP-1 mengandung 356 asam amino yang terdiri dari tiga domain: ekor terminal-N pendek (asam amino 1–23); enam domain transmembran (asam amino 24–186); dan ekor terminal-C sitoplasma panjang (asam amino 187–386) yang mengandung tiga domain fungsional berbeda, juga dikenal sebagai daerah aktivasi terminal-C 1, 2, dan 3 (Coffin *et al.*, 2001; Gires *et al.*, 1997). LMP-1 berperan sebagai peniru sinyal reseptor CD40 kostimulasi pada limfosit B yang terinfeksi EBV dengan meminta bantuan molekul pemberi sinyal seluler, seperti TRADD dan protein faktor terkait reseptor faktor nekrosis tumor (TRAF). LMP-1 memicu aktivasi jalur mitogen-activated protein kinase (MAPK), NF- $\kappa$ B, IRF7, fosfatidilinositol 3-kinase (PI3-K), dan STAT (Kieser & Sterz, 2015).

LMP-1 memiliki derajat polimorfisme yang tinggi sehingga dapat mempengaruhi aktivitas tumorigenik (Smatti *et al.*, 2018). Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa protein LMP-1 mempengaruhi jalur sinyal PI3K/AKT dalam proses onkogenesis, yang terkait dengan angiogenesis sehingga menyebabkan berkembangnya tumor pada kanker nasofaring dan limfoma Hodgkin (Luo *et al.*, 2021). Pada kasus limfoma Burkitt endemik (eBL) di Afrika, Amerika Selatan, dan Uganda ditemukan 4 varian urutan pada gen LMP-1 yaitu pola A hingga D, dengan pola A ditemukan pada 60,9% dari biopsi BL dan OR: 9,7 serta pola D dengan OR: 13,6 (Liao *et al.*, 2018). Selain itu, kasus di Kenya bagian barat varian baru gen LMP-1 ditemukan di 40,5% rangkaian eBL dan 25,0% dari kontrol sehat (Wohlford *et al.*, 2013).

Salah satu analisis variasi genetik adalah *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). RFLP merupakan metode untuk menentukan perubahan pola panjang fragmen DNA yang telah dipotong oleh enzim restriksi. RFLP memanfaatkan perbedaan individu dalam urutan DNA untuk menghasilkan variasi lokasi pemotongan enzim restriksi, yang menghasilkan potongan DNA dengan ukuran berbeda (Sen, 2024). Pemetaan genom, penandaan gen, perpustakaan cDNA, spesiasi dan domestikasi, hubungan keluarga, varian genetik, dan fenomena lainnya semuanya dapat ditemukan dengan metode RFLP (Erni & Wathon, 2019).

Berdasarkan penjelasan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis dan mengeksplorasi variasi genetik pada gen LMP-1 HHV 4 menggunakan analisis RFLP secara *in silico*, yang diharapkan dapat memberikan wawasan baru tentang diversitas genetik EBV dan implikasinya terhadap patogenesis dan terapi.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Sekuen gen LMP-1 HHV-4 yang digunakan untuk uji *in silico* diunduh dalam format FASTA dari NCBI dengan PopSet 2581709082 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OR393166.1>). Dalam PopSet tersebut terdapat 21 sekuen gen pengkode protein LMP-1 HHV-4 (*partial cds*) dengan *accession number* OR393146.1 - OR393166.1.

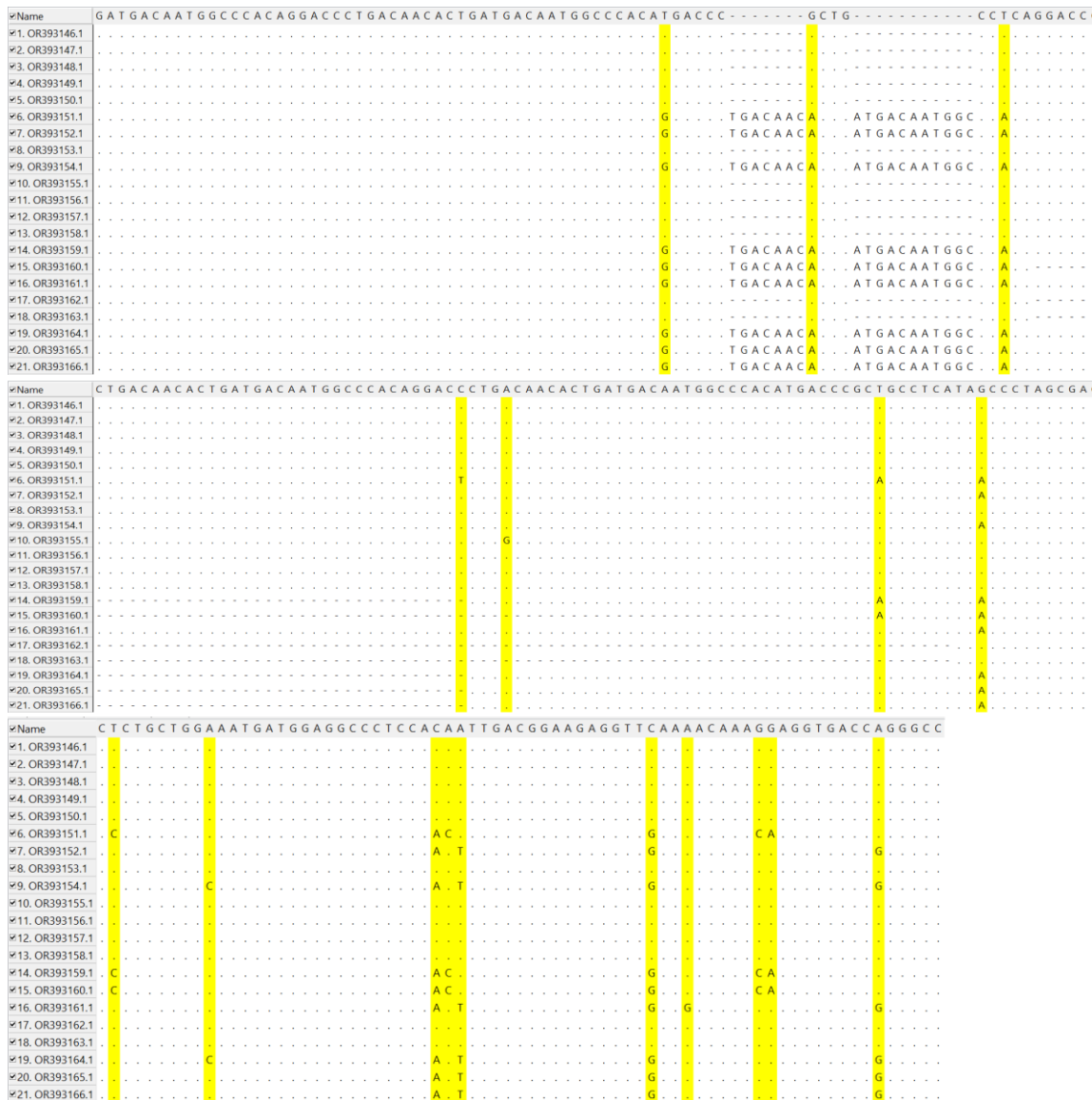
**Tabel 1.** Sekuen gen LMP-1 HHV-4 yang digunakan untuk uji *in silico*

<i>Accession number</i>	<i>Panjang DNA</i>
OR393166.1	302 bp
OR393165.1	302 bp
OR393164.1	302 bp
OR393163.1	236 bp
OR393162.1	236 bp
OR393161.1	335 bp
OR393160.1	269 bp
OR393159.1	302 bp
OR393158.1	317 bp
OR393157.1	317 bp
OR393156.1	317 bp
OR393155.1	317 bp
OR393154.1	335 bp
OR393153.1	317 bp
OR393152.1	335 bp
OR393151.1	335 bp
OR393150.1	317 bp
OR393149.1	317 bp
OR393148.1	317 bp
OR393147.1	317 bp
OR393146.1	317 bp

### **Skrining Kandidat Enzim Restriksi**

Skrining enzim restriksi yang akan digunakan pada RFLP *in silico* menggunakan situs (<http://insilico.ehu.es/restriction/>). Sekuen DNA yang sudah diperoleh dalam format FASTA dari data *GenBank* NCBI, kemudian diunggah di kolom yang sudah disediakan pada





**Gambar 1.** Hasil alignment sekuen gen LMP-1 HHV 4 menggunakan *software* Mega 11. Mutasi genetik terjadi pada urutan basa ke-1, 6, 7, 43, 44, 46, 47, 59, 169, 213, 246, 255, 266, 274, 293, 294, 295, 311, 314, 320, 321

**Tabel 1.** Frekuensi mutasi basa nukleotida

From/ To	A	T/U	C	G
A	-	3,50	7,88	16,15
T/U	6,86	-	11,95	6,37
C	6,86	5,30	-	6,37
G	17,39	3,50	7,88	-

<b>Total (%)</b>	<b>50,79</b>	<b>49,22</b>
------------------	--------------	--------------

Keterangan:

Substitusi transisi = tulisan bold

Substitusi transversi = tulisan italic

Berdasarkan Tabel 2. yang menunjukkan hasil frekuensi mutasi dapat dinyatakan bahwa perubahan basa nitrogen yang terjadi merupakan mutasi yang memiliki sifat substitusi transisi dan substitusi transversi. Mutasi titik disebut juga SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Nilai substitusi transisi sebesar 50,79% dan substitusi transversi sebesar 49,22%. Perubahan basa nitrogen didominasi oleh substitusi transisi. Perubahan basa nitrogen yang didominasi oleh substitusi transisi sering kali disebabkan oleh mutasi titik (Kim *et al.*, 2020)

Transisi lebih umum terjadi dibandingkan dengan transversi karena stabilitas strukturalnya (Dash *et al.*, 2024). Transisi adalah jenis mutasi titik di mana satu basa purin diganti dengan basa purin lainnya (adenin (A) diganti dengan guanin (G), atau sebaliknya) atau satu basa pirimidin diganti dengan basa pirimidin lainnya (sitosin (C) diganti dengan timin (T), atau sebaliknya). Setiap perubahan pada basa nukleotida dalam DNA dapat mempengaruhi karakteristik gen dan dapat menunjukkan variasi atau karakter pembeda (Hsieh *et al.*, 2021). Perubahan ini bisa berdampak pada berbagai aspek, termasuk ekspresi gen, fungsi protein, dan fenotip organisme (Murakami & Jaffery, 2022).

### Skrining Kandidat Enzim Restriksi

Berdasarkan hasil skrining enzim restriksi, didapatkan sisi pengenalan C<sup>^</sup>TA<sub>G</sub> yang disebut sebagai enzim BfaI. Enzim ini dipilih karena memperlihatkan variasi dalam pola pemotongan pada semua sekuens gen LMP-1 HHV4 dalam PopSet 2581709082. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2.

Restriction enzyme	Seq. 1	Seq. 2	Seq. 3	Seq. 4	Seq. 5	Seq. 6	Seq. 7	Seq. 8	Seq. 9	Seq. 10	Seq. 11	Seq. 12	Seq. 13	Seq. 14	Seq. 15	Seq. 16	Seq. 17	Seq. 18	Seq. 19	Seq. 20	Seq. 21
BfaI	35 240	35 240	35 240	35 240	35 240	35 258	35 258	35 240	35 258	35 240	35 240	35 240	35 240	35 225	35 192	35 258	35 159	35 159	35 225	35 225	35 225
C <sup>^</sup> TA <sub>G</sub>																					

**Gambar 2.** Skrining enzim restriksi secara *in silico*

Enzim BfaI merupakan enzim restriksi yang berasal dari bakteri *Bacteroides fragilis* (New England Biolabs, 2024). Isoschizomer enzim BfaI adalah MaeI dan XspXI. Ketiga enzim ini menghasilkan fragmen DNA dengan ujung yang tumpul (*blunt ends*) (Thermo Scientific, 2024).

### RFLP secara *in silico*

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) adalah teknik yang sering digunakan untuk menentukan genotip (*genotyping*) suatu organisme. Teknik ini melibatkan pemotongan urutan DNA menggunakan enzim restriksi. Setelah itu, fragmen-fragmen DNA hasil pemotongan dipisahkan menggunakan proses elektroforesis. Fragmen DNA yang terpisah akan divisualisasikan menggunakan metode *Southern Blotting* (Dai & Long, 2015). Sebelum melakukan proses RFLP di laboratorium, prediksi terhadap hasil *genotyping* dapat dilakukan secara *in silico*. Proses *in silico* ini melibatkan simulasi pemotongan sekuens DNA

dengan enzim restriksi dan visualisasi fragmen DNA yang terbentuk tanpa harus melakukan eksperimen secara fisik. Uji *in silico* dapat digunakan sebagai metode untuk memperkirakan kondisi yang akan terjadi secara nyata di laboratorium. Hal ini dilakukan dengan memanfaatkan program aplikasi atau perangkat lunak tertentu yang dapat melakukan simulasi berbasis komputer (Kanaya & Achyar, 2023).

RFLP secara *in silico* pada 21 sekuen DNA gen LMP-1 HHV 4 PopSet 2581709082 pada aplikasi Benchling menggunakan enzim restriksi yang telah dipilih pada tahap skrining kandidat enzim restriksi yaitu enzim BfaI. Hasil RFLP *in silico* divisualisasikan dengan elektroforegram seperti pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Hasil elektroforegram restriksi dengan enzim BfaI secara *in silico*

Kiri: Ladder, (1) OR393166.1, (2) OR393165.1, (3) OR393164.1, (4) OR393163.1, (5) OR393162.1, (6) OR393161.1, (7) OR393160.1, (8) OR393159.1, (9) OR393158.1, (10) OR393157.1, (11) OR393156.1, (12) OR393155.1, (13) OR393154.1, (14) OR393153.1, (15) OR393152.1, (16) OR393151.1, (17) OR393150.1, (18) OR393149.1, (19) OR393148.1, (20) OR393147.1, (21) OR393146.1

Restriksi dengan enzim BfaI pada 21 sekuen DNA gen LMP-1 HHV 4 menghasilkan lima variasi alel. Alel A1 menghasilkan dua pita DNA berukuran 190 bp dan 77 bp, alel A2 menghasilkan dua pita DNA berukuran 124 bp dan 77 bp, alel A3 menghasilkan dua pita DNA berukuran 223 bp dan 77 bp, alel A4 menghasilkan dua pita DNA berukuran 157 bp dan 77 bp, dan alel A5 menghasilkan dua pita DNA berukuran 205 bp dan 77 bp. Alel A5 memiliki frekuensi alel lebih tinggi dibandingkan dengan alel lain. Hal tersebut disebabkan alel A5 memiliki persentase kehadiran fragmen 48% dari 21 sekuen pada NCBI PopSet 2581709082.

**Tabel 3.** Frekuensi alel gen LMP-1 HHV 4 menggunakan enzim BfaI

Enzim Restriksi	Situs Pengenalan	Ukuran Fragmen	Alel	Jumlah Kehadiran Fragmen (N=21)	Persentase Kehadiran Fragmen	Frekuensi Alel
BfaI	C^TA_G	77 bp 190 bp	A1	4	19%	0,19
		77 bp 124 bp	A2	2	9%	0,09
		77 bp 223 bp	A3	4	19%	0,19

77 bp 157 bp	A4	1	5%	0,05
77 bp 205 bp	A5	10	48%	0,48

Berdasarkan hasil RFLP *in silico* diketahui terdapat variasi genetik dalam sisi pengenalan enzim restriksi BfaI pada gen LMP-1 HHV 4. Gen LMP-1 ini dapat menginfeksi dan mengaktifkan sel-sel darah putih yang disebut limfosit B, virus ini dapat mengubah sel tersebut menjadi sel limfoblastoid yang bersifat ganas atau kanker (Volaric *et al.*, 2024). Hal tersebut disebabkan gen LMP-1 memiliki laju mutasi yang relatif tinggi dan rentan mengalami mutasi dibandingkan varian lain, sehingga kemungkinan memiliki sisi pengenalan enzim yang dapat digunakan untuk mendeteksi cepat secara RFLP (Lorenzetti *et al.*, 2012).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada skrining enzim restriksi dan RFLP secara *in silico* menggunakan enzim BfaI (C<sup>A</sup>TA<sub>G</sub>) menunjukkan adanya hubungan variasi genetik dalam sisi pengenalan restriksi enzim antara PopSet 2581709082 dan HHV 4 gen LMP-1 yang ditandai keberadaan lima alel yaitu A1, A2, A3, A4, dan A5.

## DAFTAR PUSTAKA

- Barnett, E. D., Lynfield, R., Sawyer, M. H., Pediatrics, A. A. of, Pediatrics, A. A. of, & Diseases, C. on I. (n.d.). Red book: 2021-2024 report of the Committee on Infectious Diseases. (No Title).
- Coffin III, W. F., Erickson, K. D., Hoedt-Miller, M., & Martin, J. M. (2001). The cytoplasmic amino-terminus of the Latent Membrane Protein-1 of Epstein-Barr Virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxy-terminus and transmembrane domain. *Oncogene*, 20(38), 5313–5330.
- Dai, S., & Long, Y. (2015). Genotyping analysis using an RFLP assay. *Plant Genotyping: Methods and Protocols*, 91–99.
- Dash, M., Meher, P., Kumar, A., Satapathy, S. S., & Namsa, N. D. (2024). High frequency of transition to transversion ratio in the stem region of RNA secondary structure of untranslated region of SARS-CoV-2. *PeerJ*, 12, e16962.
- Erni, E., & Wathon, S. (2019). Pengembangan sistem deteksi hpv (Human Papilloma Virus) berbasis marka molekuler pcr-rflp. *Biotrends*, 9(2), 48–55.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., & Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *The EMBO Journal*.
- Hsieh, M.-H., Lu, H.-J., Lin, C.-W., Lee, C.-Y., Yang, S.-J., Wu, P.-H., Chen, M.-K., & Yang, S.-F. (2021). Genetic variants of lncRNA GAS5 are associated with the clinicopathologic development of oral cancer. *Journal of Personalized Medicine*, 11(5), 348.

- Kanaya, O. N. K. N., & Achyar, A. (2023). Analysis of Genetic Variations in PHT1 Gene Sequences in Rice (*Oryza sativa*) NCBI Popset 240028097 Using In-Silico RFLP. *Jurnal Serambi Biologi*, 8(1), 5–9.
- Khan, G., Fitzmaurice, C., Naghavi, M., & Ahmed, L. A. (2020). Global and regional incidence, mortality and disability-adjusted life-years for Epstein-Barr virus-attributable malignancies, 1990–2017. *BMJ Open*, 10(8), e037505.
- Kim, J.-S., Jang, J.-H., Kim, J.-M., Chung, Y.-S., Yoo, C.-K., & Han, M.-G. (2020). Genome-wide identification and characterization of point mutations in the SARS-CoV-2 genome. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 11(3), 101.
- Liao, H.-M., Liu, H., Lei, H., Li, B., Chin, P.-J., Tsai, S., Bhatia, K., Gutierrez, M., Epelman, S., & Biggar, R. J. (2018). Frequency of EBV LMP-1 promoter and coding variations in Burkitt lymphoma samples in Africa and South America and peripheral blood in Uganda. *Cancers*, 10(6), 177.
- Lorenzetti, M. A., Gantuz, M., Altchek, J., de Matteo, E., Chabay, P. A., & Preciado, M. V. (2012). Distinctive Epstein-Barr virus variants associated with benign and malignant pediatric pathologies: LMP1 sequence characterization and linkage with other viral gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 609–618.
- Luo, Y., Liu, Y., Wang, C., & Gan, R. (2021). Signaling pathways of EBV-induced oncogenesis. *Cancer Cell International*, 21(1), 93.
- Mentzer, A. J., Brenner, N., Allen, N., Littlejohns, T. J., Chong, A. Y., Cortes, A., Almond, R., Hill, M., Sheard, S., & McVean, G. (2022). Identification of host–pathogen-disease relationships using a scalable multiplex serology platform in UK Biobank. *Nature Communications*, 13(1), 1818.
- Münz, C. (2015). Epstein Barr virus volume 2: one herpes virus: many diseases (Vol. 391). Springer.
- Murakami, S., & Jaffrey, S. R. (2022). Hidden codes in mRNA: Control of gene expression by m6A. *Molecular Cell*, 82(12), 2236–2251.
- New England Biolabs. (2024). Bfal. URL: <https://us.vwr.com/store/product/11630113/bfai-restriction-enzymes-new-england-biolabs> . Diakses tanggal 28 Mei 2024.
- Sako, K., Kenzaka, T., & Kumabe, A. (2022). Epstein–Barr virus-associated infectious mononucleosis with acute epididymitis: a case report. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 147.
- Sen, S.K. (2024). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). URL: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism>. Diakses tanggal 27 Mei 2024.
- Smatti, M. K., Al-Sadeq, D. W., Ali, N. H., Pintus, G., Abou-Saleh, H., & Nasrallah, G. K. (2018). Epstein–Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: an update. *Frontiers in Oncology*, 8,211.
- Thermo Scientific. (2024). FspBI (Bfal) (10 U/μL). URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER1761> . Diakses tanggal 28 Mei 2024.

- Volaric, A. K., Saleem, A., Younes, S. F., Zhao, S., & Natkunam, Y. (2024). Epstein-Barr virus latency patterns in polymorphic lymphoproliferative disorders and lymphomas in immunodeficiency settings: Diagnostic implications. *Annals of Diagnostic Pathology*, 152286.
- Wohlford, E. M., Asito, A. S., Chelimo, K., Sumba, P. O., Baresel, P. C., Oot, R. A., Moormann, A. M., & Rochford, R. (2013). Identification of a novel variant of LMP-1 of EBV in patients with endemic Burkitt lymphoma in western Kenya. *Infectious Agents and Cancer*, 8, 1–9.
- Zheng, H., Li, L. L., Hu, D. S., Deng, X. Y., & Cao, Y. (2007). Role of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cell Mol Immunol*, 4(3), 185–196.