

Analysis of Genetic Variations in *VP53* Gene Sequences cause *Broad bean wilt virus* in Chili (*Capsicum annuum*) NCBI Popset 2505221052 Using In-Silico RFLP

Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen *VP53* penyebab layu kacang panjang pada Cabai (*Capsicum annuum*) NCBI Popset 2505221052 Menggunakan RFLP Secara In Silico

Mutiara Ramadhani¹, Afifatul Achyar^{1*}

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

*Correspondence author: afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id

Abstract

Chilli is a plant that can be grown in a temperature range of 21°C - 27°C, so chilli can grow in lowland areas. The high-low temperature of chilli growth can cause plant growth to be disrupted. Chilli plants are often susceptible to diseases, one of which is long bean wilt disease caused by the *VP53* virus. How to detect genetic variation in chilli with RFLP. In this study, the gene sequence used was *VP53*. Screening of restriction enzyme candidates that will be used in silico. RFLP using benchling tools. RFLP results on 2 chilli *VP53* gene sequences were cut using the restriction enzyme *MslI*. Based on table 2, it is known that the total DNA bands amplified at fragment sizes of 1.3 kb, 989 bp, and 406 bp are as many as 4 DNA bands with each amplified fragment size. Based on the results it can be concluded that the genetic variation of the *VP53* gene by bringing up 2 DNA bands of the same size according to NCBI with popset number 2505221052.

Key words: *Chili, Genetic variation, RFLP, MslI, VP53.*

Abstrak

Cabai merupakan tanaman yang dapat ditanam berkisar suhu 21°C - 27°C, sehingga cabai dapat tumbuh di daerah dataran rendah. Temperatur pertumbuhan cabai yang tinggi-rendah dapat menyebabkan pertumbuhan tanaman terganggu. Tanaman cabai sering rentan terhadap penyakit salah satunya penyakit layu kacang panjang disebabkan virus *VP53*. Cara mendeteksi variasi genetik pada cabai dengan RFLP. Penelitian ini, sekuen gen digunakan adalah *VP53*. *Skrining* kandidat enzim restriksi yang akan dipakai in silico. RFLP menggunakan tools benchling. Hasil RFLP pada 2 sekuen gen *VP53* cabai dilakukan pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi *MslI*. Total pita DNA hasil restriksi pada ukuran fragment 1,3 kb, 989 bp, dan 406 bp adalah sebanyak 2 pita DNA. Berdasarkan hasil dapat disimpulkan bahwa variasi genetik gen *VP53* dengan memunculkan 2 pita DNA dengan ukuran yang sama sesuai NCBI dengan nomor popset 2505221052.

Kata kunci: Cabai, Variasi Genetik, RFLP, *MslI*, *VP53*

Pendahuluan

Cabai merah (*Capsicum annum* L.) merupakan salah satu jenis tanaman hortikultura penting yang dibudidayakan secara komersial, hal ini disebabkan selain cabai memiliki kandungan gizi yang cukup lengkap juga memiliki nilai ekonomis tinggi yang banyak digunakan baik untuk konsumsi rumah tangga maupun untuk keperluan industri makanan. (Nurlenawati et al., 2022).

Cabai merupakan tanaman yang dapat ditanam berkisar suhu 21°C - 27°C (Setiadi et al., 2003), sehingga cabai dapat tumbuh di daerah dataran rendah. Cabai dapat tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian 200 meter di atas permukaan laut. Temperatur pertumbuhan cabai yang terlalu tinggi dan terlalu rendah dapat menyebabkan pertumbuhan tanaman terganggu. Pengurangan resiko kerusakan pertumbuhan tanaman cabai dengan respons tanaman terhadap patogen dan cekaman suhu tinggi (HTS), yang memiliki komponensinyal yang berbeda.

Tanaman cabai sering rentan terhadap penyakit salah satunya penyakit layu kacang panjang (*Broad bean wilt virus 1*) disebabkan oleh virus *VP53. Broad bean wilt virus 1* atau disingkat BBWV-1 merupakan anggota genus *Fabavirus* dari famili *Secoviridae* yang memiliki 81 spesies virus (Thompson et al., 2017). Anggota famili *Secoviridae* memiliki genom *monopartit* atau *bipartit* RNA beruntai tunggal dengan polaritas positif (ssRNA+) yang mengkode poliprotein yang diproses lebih lanjut menjadi polipeptida fungsional (Sanfaçon, 2015). BBWV-1 memiliki genom bipartit (RNA1 dan RNA2) yang dienkapsulasi menjadi virion dengan morfologi ikosahedral (Sanfaçon, 2015). RNA1 (c.5.8 kb) berisi open reading frame (ORF) yang menyandikan poliprotein yang membuat, setelah pembelahan proteolitik, kofaktor *protease* (PRO-CO), *helicase* (HEL), protein terkait genom *virus* (VPg), *protease* (PRO), dan *RNA-dependent RNA polimerase* (POL). RNA2 (c. 3,4 kb), seperti virus lain yang termasuk dalam genera *Fabavirus* dan *Comovirus* dalam keluarga *Secoviridae*, memiliki dua kodon inisiasi terjemahan berturut-turut dalam bingkai yang mengkodekan poliprotein alternatif yang hanya berbeda dalam panjang ekstensi N-terminalnya (Chen dan Bruening, 1992; Lekkerkerker et al., 1996; Qi et al., 2002; Lin et al., 2014; Xie et al., 2016).

Metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) adalah salah satu teknik yang digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuen DNA. Deteksi RFLP dilakukan berdasarkan adanya kemungkinan perbedaan panjang fragmen DNA target yang dihasilkan setelah proses pemotongan dengan suatu enzim restriksi. Perbedaan panjang fragmen DNA dapat diketahui setelah dilakukan konfirmasi melalui analisis elektroforesis, hibridisasi dan visualisasi (Fatchiyah et al., 2011).

Perkembangan ilmu pengetahuan mempermudah mendeteksi keragaman genetik suatu individu berbasis molekuler (Putri et al., 2021). Restriksi dan visualisasi fragmen hasil restriksi yang bertujuan untuk memprediksi hasil genotyping sebelum melakukan RFLP di laboratorium dapat dilakukan secara *in silico*. Uji *in silico* adalah suatu istilah untuk percobaan atau uji yang dilakukan dengan metode simulasi komputer. Menurut Hardjono (2013), Kegunaan uji *in silico* adalah untuk memprediksi memberi hipotesis, memberi penemuan baru. *In silico* dapat digunakan sebagai metode untuk mendekati kondisi nyata ke dalam simulasi berbasis komputer menggunakan program aplikasi atau perangkat lunak tertentu (Khaira et al., 2022).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendeteksi variasi genetik gen dari *VP53* yang terdapat pada tumbuhan cabai (*Capsicum annum* L.) PopSet 2505221052. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan marka molekuler RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). RFLP merupakan marka molekuler yang menggunakan enzim restriksi dalam mengidentifikasi sekuensi-sekuensi DNA. Restriksi dan visualisasi fragmen hasil restriksi yang bertujuan untuk memprediksi hasil genotyping sebelum melakukan RFLP di laboratorium dapat dilakukan secara *in silico*.

Bahan dan Metode

Pada penelitian ini sekuen gen pada cabai yang digunakan adalah Broad bean wilt virus 2 VP53 gene, partial cds. dengan nomor identitas PopSet 2505221052 dari Seo, J.-K. berasal dari Korea Selatan yang di unduh dalam format fasta dari NCBI >OP830832.1 Broad bean wilt virus 2 isolate AJ1 VP53 gene, partial cds. Popset tersebut memiliki 2 sekuen gen dengan acc number OP830832.1 dan OP830833.1.

Metode 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 dapat mendapatkan Restriction digest of DNA, Translate DNA to protein, *Palindromic sequences finder*, Coloured sequences for presentations, Discriminatory Power Calculator, *Multiple Sequence Alignment* (ClustalW), *Primer design* (Primer3), dsb. Metode 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 (Aulia et al., 2021).

Metode RFLP secara *in silico*

Pada RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dimana menggunakan tools dengan situs <https://www.benchling.com/>. Situs berikut gratis tetapi harus melakukan registrasi untuk membuat akun menggunakan email atau akun google. Tahap awal yang dilakukan adalah melakukan import 2 sekuen gen *VP53* yang sudah diunduh dari NCBI ke dalam folder project di situs Benchling. Selanjutnya melakukan *cutting* dan memilih "*find enzyme*" dan nama enzim restriksi yang sudah ditentukan sebelumnya pada saat skrining, diketikkan pada kolom yang tersedia. Selanjutnya, klik menu "*run digest*" untuk melakukan restriksi. Adapun gambar elektroforegram diperoleh dengan mengklik menu "*virtual digest*".

Hasil dan Pembahasan

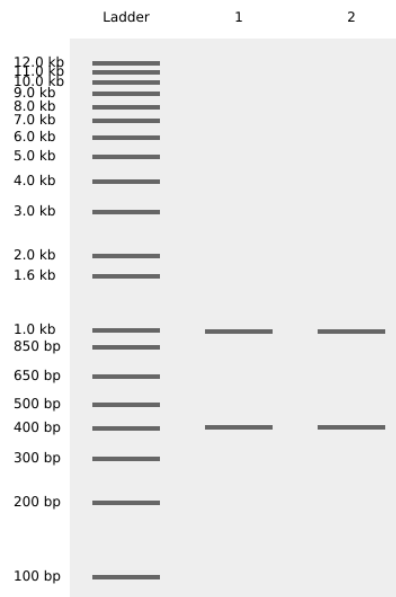
Skrining Kandidat Enzim Restriksi

Dari data sesuai accession number sekuen gen *VP53*, data yang diolah dengan insilico.ehu. Hasil yang diperoleh dari skrining enzim, didapatkan dan dipilih enzim restriksi *MslI* pada sisi pengenalan 5' - CAY' NNN' NRT' G - 3' dan 3' - GTR' NNN' NYA' C - 5'. Enzim restriksi ini dipilih karena terdapat variasi pemotongan pada sekuen gen *VP53* pada NCBI dengan nomor popset 2505221052. Enzim *MslI* ini menginaktivasi pada suhu 80°C dan inkubasi pada suhu 37°C. Enzim Restriksi *endonuklease* adalah enzim pemotong molekul DNA yang bekerja secara spesifik pada rangka gula-fosfat tanpa merusak basa. Setiap enzim mempunyai sekuens pengenalan yang unik pada utas DNA, biasanya sepanjang 4-8 urutan nukleotida (Fatchiyah *et al.*, 2011).

RFLP secara *in silico*

Berdasarkan data RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) diketahui terdapat variasi genetik dalam sisi pengenalan restriksi enzim *MslI* pada sekuen DNA dengan enzim restriksi (Achyar *et al.*, 2021). Pada proses awal yaitu proses screening enzim restriksi dan visualisasi fragmen hasil restriksi dapat dilakukan secara *in silico* yang bertujuan untuk memprediksi hasil genotyping sebelum melakukan RFLP secara nyata di laboratorium. 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).

Analisis RFLP adalah salah satu metode pertama yang banyak digunakan untuk mendeteksi variasi pada tingkat sekuens DNA, terjadi setelah pembelahan enzim restriksi pada DNA target/diferensiasi. Mutasi yang terjadi dari organisme dapat mempengaruhi molekul DNA dengan berbagai cara, menghasilkan fragmen-fragmen dengan panjang yang berbeda. Perbedaan panjang fragmen ini dapat dilihat setelah dilakukan elektroforesis pada gel, hibridisasi dan visualisasi (Fatchiyah *et al.*, 2011).



Gambar 1. Elektroforegram hasil restriksi sekuen *VP53* pada cabai menggunakan enzim restriksi *MslI* secara in silico. Ket: Kiri (Ladder Bioline hyperladder 1 kb), (1) OP830833.1, (2) OP830832.1

RFLP pada 2 sekuen gen *VP53* cabai sesuai PopSet 2505221052 dilakukan pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi *MslI*. Hasil elektroforegram RFLP dari restriksi dari cabai dapat dilihat pada Gambar 1. Restriksi dengan enzim *MslI* menghasilkan dua variasi alel dengan panjang yang sama. Alel yang pertama menghasilkan dua pita DNA pada 989 bp dan 406 bp yang terdapat pada isolat cabai sesuai Gambar 1. Alel kedua sama dengan alel yang pertama menghasilkan dua pita DNA pada 989 bp dan 406 bp. Hal ini dapat menunjukkan *monopartit* atau *bipartit*. Hasil yang didapatkan,

Tabel 2. Frekuensi Alel Gen VP53 secara RFLP in silico

Enzim Restriksi	Situs Pengenalan Restriksi	Ukuran Fragment (bp)	Alel	Jumlah Kehadiran Fragment (N = 2)	Persentase Kehadiran Fragment (%)	Frekuensi Alel
<i>MslI</i>	CAY'NNN'NRT' G	1,3 kb 402 dan 411 bp	0	0	0	0
			1	2	100%	1

Berdasarkan tabel 2, diketahui bahwa total pita DNA yang teramplifikasi pada ukuran fragment 1,3 kb, 989 bp, dan 406 bp adalah sebanyak 4 pita DNA dengan masing-masing ukuran fragment teramplifikasi. Berdasarkan hasil dapat disimpulkan bahwa variasi genetik gen *VP53* dengan memunculkan 2 pita DNA dengan ukuran yang sama sesuai NCBI dengan nomor popset 2505221052.

Daftar Pustaka

- Achyar et al. 2021. Analysis of Genetic Variations in POLY Gene Sequences in Dengue Virus 2 Using In-Silico RFLP.
- Aulia, N., Putri, C. K., Khairiyah, L., Khairunnisa, F. A., & Achyar, A. (2022, May). Analysis of Genetic Variation of Measles Virus Genotype and Isolate MF Intergenic Spacer Sequences PopSet: 2105287799 using Restriction- Fragment Length Polymorphism (RFLP) In Silico. In *Prosiding Seminar Nasional Biologi* (Vol. 1, No. 2, pp. 1139-1146).
- Chen, X. and Bruening, G. (1992) Nucleotide sequence and genetic map of Cowpea severe mosaic virus RNA 2 and comparisons with RNA 2 of other comoviruses. *Virology*, 187, 682-692.

- Fatchiyah, Arumingtyas, E. L., Widyarti, S., Rahayu, S. 2011. *Biologi Molekular, Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga.
- Hardjono S., 2013. *Sintesis dan Uji Aktivitas Antikanker Senyawa 1-(2- Klorobenzoiloksi) urea dan 1-(4- klorobenzoiloksi)* Jakarta. *Jurnal Bioscience*. Vol. 05. No. 1: 80-86.
- Khaira, A., Juniarti, L., Arini, N., Sari, R. M., & Achyar, A. (2022, September). Analisis variasi genetik Sapi (Bos Taurus) pada sekuen gen Cytochrome Oxidase Subunit 1 (COI) menggunakan RFLP in silico. In *Prosiding Seminar Nasional Biologi* (Vol. 2, No. 1, pp. 176-180).
- Lekkerkerker, A. , Wellink, J. , Yuan, P. , van Lent, J. , Goldbach, R. and Van Kammen, A.B. (1996) Distinct functional domains in the Cowpea mosaic virus movement protein. *Journal of Virology*, 70, 5658-5661.
- Lin, J. , Guo, J. , Finer, J. , Dorrance, A.E. , Redinbaugh, M.G. and Qu, F. (2014) The Bean pod mottle virus RNA2-encoded 58-kilodalton protein P58 is required in cis for RNA2 accumulation. *Journal of Virology*, 88, 3213-3222.
- Nurlenawati, N.A. Janah dan Nimih. 2010. Respon pertumbuhan dan hasil tanaman cabai merah (*Capsicum annum* L.) Varietas Prabu terhadap beberapa dosis fospat dan bokashi jerami limbah jamur merang. *Jurnal Agrika*, Vol 4(1): 9-20.
- Putri, K. H. A. , Kartika Puspita Sari, Khairunnisa, Monicha Yhuyhen Safitri, Afif Putra, Katon Agusdi, Fahrul Rozi Oktavian, & Afifatul Achyar. (2021). Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen Surface Glycoprotein (S) Pada SARS-CoV-2 Popset : 1843471817 Menggunakan RFLP Secara In-Silico. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 1(1), 44-52.
- Qi, Y. , Zhou, X. , Huang, X. and Li, G. (2002) In vivo accumulation of Broad bean wilt virus 2 VP37 protein and its ability to bind single-stranded nucleic acid. *Archives of Virology*, 147, 917-928.
- Sanfaçon, H. (2015) Secoviridae: a family of plant picorna-like viruses with monopartite or bipartite genomes. *eLS Press*. 10.1002/9780470015902.a0000764.pub3.
- Setiadi. 2008. *Bertanam Cabai*. Jakarta : Penebar Swadaya. 183 hal.
- Thompson, J.R. , Dasgupta, I. , Fuchs, M. , Iwanami, T. , Karasev, A.V. , Petrzik, K. et al (2017) ICTV virus taxonomy profile: Secoviridae . *Journal of General Virology*, 98, 529.
- urea*. Berkala Ilmiah Kimia Farmasi. 2 (1), 1.
- William, R.C. 1989. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). *Encyclopedia of Physical Anthropology*, 32, 159-184.
- Xie, L. , Shang, W. , Liu, C. , Zhang, Q. , Sunter, G. , Hong, J. et al (2016) Mutual association of Broad bean wilt virus 2 VP37-derived tubules and plasmodesmata obtained from cytological observation. *Scientific Reports*, 6, 21552.