

# Analysis of Genetic Variation of the Voltage-gated Sodium Channel Gene Sequence in *Aedes albopictus* NCBI PopSet 2222555040 Using RFLP In Silico

## Analisis Variasi Genetik Tsel Sekuen Gen Voltage-gated Sodium Channel pada *Aedes albopictus* NCBI PopSet 2222555040 Menggunakan RFLP secara In Silico

Aisyah Fadillah Putri<sup>1</sup>, Inayatul Fatia<sup>1</sup>, Syahrul Ramadanil<sup>1</sup>, Afifatul Achyar<sup>1</sup>, Rijal Satria<sup>1</sup>, Dwi Hilda Putri<sup>1</sup> \*

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

\*Correspondence author: [aisyahfadillahputri@gmail.com](mailto:aisyahfadillahputri@gmail.com)

### Abstract

The aim of this research is to analyze the genetic variation of *Aedes albopictus* using RFLP in silico. The method used in this research is screening of candidate restriction enzymes that will be used in silico RFLP using tools on the website <http://insilico.ehu.es/restriction/>. This tool will compare the restriction patterns of many DNA sequences tested as well as the restriction enzymes that cut them, and Restriction-Fragment Length Polymorphism (RFLP) in silico or virtual restriction is carried out using tools on the site <https://www.benchling.com/>. The results of this study are that the *Aedes albopictus* genome is the largest of any mosquito species sequenced to date, varying from 174 Mb for *Anopheles darlingi* to 540 Mb and 1,376 Mb for *Culex quinquefasciatus* and *Ae. aegypti*. Genome size variation is also observed among different populations of *Ae. albopictus*. Analysis of 47 geographic isolates from 18 countries showed a 2.5-fold variation in haploid genome weight range from 0.62 pg in a population on Koh Samui (Thailand) to 1.66 pg. Inter- and intraspecific variation in genome size among mosquitoes appears to be caused primarily by changes in the number and organization of DNA repeats. Increased abundance of all classes of DNA repetitive sequences correlated linearly with total genome size.

**Key words:** *Aedes albopictus*, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Analysis of genetic variation

### Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis variasi genetik pada *Aedes albopictus* menggunakan RFLP secara *in silico*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 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, dan Restriction-Fragment Length Polymorphism (RFLP) secara *in silico* atau restriksi secara virtual dilakukan menggunakan tools pada situs <https://www.benchling.com/>. Hasil dari penelitian ini adalah Genom *Aedes albopictus* adalah yang terbesar dari setiap spesies nyamuk diurutkan sampai saat ini, yang bervariasi dari 174 Mb untuk *Anopheles darlingi* menjadi 540 Mb dan 1.376 Mb untuk *Culex*

*quinquefasciatus* dan *Ae. aegypt*. Variasi ukuran genom juga diamati di antara berbagai populasi *Ae. albopictus*. Analisis terhadap 47 isolat geografis dari 18 negara menunjukkan Variasi 2,5 kali lipat dalam rentang bobot genom haploid dari 0,62 pg dalam populasi di Koh Samui (Thailand) menjadi 1,66 pg. Inter dan intraspesifik variasi dalam ukuran genom antara nyamuk tampaknya disebabkan terutama oleh perubahan jumlah dan organisasi berulang DNA. Peningkatan kelimpahan semua kelas DNA berulang urutan berkorelasi secara linier dengan ukuran genom total.

**Kata kunci:** *Aedes albopictus*, *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, Analisis variasi genetik

## Pendahuluan

Genetika populasi adalah salah satu cabang ilmu genetika yang mempelajari variasi genetik dalam suatu populasi. Cabang ilmu genetika ini banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang, khususnya kesehatan, pemuliaan, dan konservasi. Genetika populasi mengenali arti penting dari sifat kuantitatif, karena cara menentukan penyebaran alel tersebut dilakukan secara matematis. Mengetahui frekuensi satu gen saja sudah dapat digunakan untuk memprediksi frekuensi gen yang lain. Hal tersebut dapat diaplikasikan dalam mendiagnosa penyakit genetik (Arisuryanti & Daryono, 2007; Campbell *et al.*, 2003; Sofro, 1994).

Variasi genetik adalah variasi yang terjadi pada genom suatu organisme, baik pada basa nukleotida, gen, maupun kromosom. Variasi genetik pada tingkat dasar ditunjukkan oleh perbedaan pada urutan basa nukleotida (adenin, timin, guanin, dan sitosin) yang membentuk DNA di dalam sel (Harrison *et al.*, 2004). Sumber terjadinya variasi genetik antara lain, mutasi, migrasi, dan rekombinasi (Griffiths *et al.*, 2000). Variasi genetik yang terdapat pada suatu populasi akan berpengaruh terhadap kemampuan bertahan hidup suatu individu (Frankham *et al.*, 2002). Semakin tinggi variasi genetik pada suatu populasi, maka semakin baik kemampuan individu untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan (Dunham, 2004).

Metode *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)* adalah metode yang digunakan untuk mengetahui keragaman suatu gen. Metode ini memanfaatkan enzim restriksi tertentu untuk memberikan informasi keragaman suatu fragmen DNA yang diakibatkan adanya perbedaan lokasi dan jumlah situs potong enzim restriksi tertentu (Agung *et al.*, 2017). Uji *in silico* adalah istilah untuk uji yang dilakukan dengan metode simulasi komputer. *In silico* mulai dilirik karena kelebihannya yang murah dan hasilnya lebih cepat. *In silico* adalah metode riset yang memanfaatkan teknologi komputasi dan *database* untuk mengembangkan penelitian lebih lanjut. Salah satu bentuk aplikasinya yaitu dalam pencarian sekuen gen pada website *database* NCBI.

Berdasarkan uraian di atas, dan terbatasnya informasi mengenai keragaman gen tsel perlu dilakukan penelitian tentang "Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen Tsel pada *Aedes albopictus* NCBI PopSet 2222555040 Menggunakan *RFLP* secara *in silico*". Corak putih pada nyamuk *Aedes albopictus* berbentuk lurus di tengah-tengah punggung (median stripe) (Sigit, 2006 dalam Boekoesoe, 2013). Mulut nyamuk termasuk tipe menusuk dan menghisap (*rasping-sucking*), mempunyai enam stilet yaitu gabungan antara *mandibula*, *maxilla* yang bergerak naik turun menusuk jaringan sampai menemukan pembuluh darah kapiler dan mengeluarkan ludah yang berfungsi sebagai cairan racun dan antikoagulan (Sembel DT, 2009 dalam Palgunadi, 2011 dalam Kharisma, 2018).

## Bahan dan Metode

### Bahan

Sekuen gen yang digunakan untuk uji *in silico* diunduh dalam format FASTA dari NCBI dengan nomor identitas NCBI PopSet 2222555040 yang dikirimkan oleh Wei, Y., Zheng, X., Xin, X., Zhang, J., Hu, K., Zhou, G., and Zhong, D. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/2222555040>). Dalam PopSet tersebut terdapat 433 sekuen gen pengkode *Aedes albopictus* dan kami hanya memakai 30 sekuen gen dengan nomor identitas GenBank OK300097.1- OK300126. Status resistensi larva dan dewasa *Ae. albopictus* deltamethrin pada delapan populasi feld di Cina. Efek *knockdown resistance* (kdr), dideteksi dengan mengurutkan produk PCR dan didapatkan hasil pada delapan populasi larva *Ae. albopictus* di Cina memiliki perbedaan derajat resistensi terhadap deltamethrin (Wei *et al.*, 2021).

### Metode

#### a. 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*" memilih enzim yang memiliki variasi sisi pemotongan di setiap sampel sekuen dan kandidat enzim restriksi tersebut akan digunakan pada tahap berikutnya.

#### b. RFLP secara *In Silico*

*Restriction-Fragment Length Polymorphism* 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 from database*" dari sekuen DNA gen 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*".

### Analisis Data

Berdasarkan *output* yang diperoleh dari skrining kandidat enzim restriksi pada situs <http://insilico.ehu.es/restriction/> terdapat beberapa pengenalan enzim restriksi di antaranya G'CWG\_C yang dikenali oleh enzim *TseI*. Sisi pengenalan ini dipilih karena menunjukkan variasi pemotongan pada semua sekuen gen dalam PopSet 2222555040. Dengan hadirnya berbagai macam *tools* bioinformatika, proses skrining 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.

## Hasil dan Pembahasan

RFLP secara *in silico* pada 5 sekuen RNA gen pengkode *Aedes albopictus* NCBI PopSet 2222555040 dilakukan pada website Benchling menggunakan enzim restriksi yang telah dipilih pada tahap skrining kandidat enzim restriksi, yaitu enzim *TseI*. Hasil RFLP *in silico* divisualisasikan dengan elektroforesis gel secara virtual seperti pada Gambar 1.



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

Restriksi dengan menggunakan enzim *TseI* pada satu sekuen gen pengkode *Aedes albopictus* menghasilkan satu variasi alel, yaitu Alel A1 yang menghasilkan pita RNA berukuran 186 bp (Gambar 1 dan Tabel 1). Hal ini karena alel A1 memiliki situs pengenalan restriksi *TseI* (G'CWG\_C). Alel A1 memiliki frekuensi alel satu dengan persentase kehadiran fragmen 100%, pada NCBI PopSet 2222555040.

**Tabel 1. Frekuensi Alel Gen Pengkode Protein Spike Berdasarkan Hasil RFLP *In Silico***

Enzim Restriksi	Situs Pengenalan Restriksi	Ukuran fragmen (bp)	Alel	Jumlah kehadiran fragmen (N = 4)	Persentase kehadiran fragmen (%)	Frekuensi Alel
<i>TseI</i>	G'CWG_C	186	A1	1	100	1

Genom *Aedes albopictus* adalah genom yang terbesar dari setiap spesies nyamuk diurutkan sampai saat ini, yang bervariasi dari 174 Mb untuk *Anopheles darlingi* menjadi 540 Mb dan 1.376 Mb untuk *Culex quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti*. (Behura *et al.*, 2012). Variasi ukuran genom juga diamati di antara berbagai populasi *Ae. albopictus*. Analisis terhadap 47 isolat geografis dari 18 negara menunjukkan variasi 2,5 kali lipat dalam rentang bobot genom haploid dari 0,62 pg dalam populasi di Koh Samui (Thailand) menjadi 1,66 pg. Inter dan intraspesifik variasi dalam ukuran genom antara nyamuk tampaknya disebabkan terutama oleh perubahan jumlah dan organisasi berulang DNA. Peningkatan kelimpahan semua kelas DNA berulang urutan berkorelasi secara linier dengan ukuran genom total (Rai KS, 1988).

## Kesimpulan

Berdasarkan penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa genom *Aedes albopictus* adalah yang terbesar dari setiap spesies nyamuk diurutkan sampai saat ini, yang bervariasi dari 174 Mb untuk *Anopheles darlingi* menjadi 540 Mb dan 1.376 Mb untuk *Culex quinquefasciatus* dan *Ae. aegypt*. Analisis terhadap 47 isolat geografis dari 18 negara menunjukkan variasi 2,5 kali lipat dalam rentang bobot genom haploid dari 0,62 pg dalam populasi di Koh Samui (Thailand) menjadi 1,66 pg. Inter dan intraspesifik variasi dalam ukuran genom antara nyamuk tampaknya disebabkan terutama oleh perubahan jumlah dan organisasi berulang DNA.

## Ucapan Terima Kasih

Terimakasih saya ucapkan kepada teman teman yang sudah membantu penelitian ini serta kepada ibu dan bapak dosen yang telah memberikan kami arahan. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun guna perbaikan laporan dimasa yang akan datang.

## Daftar Pustaka

- Achyar, A., Hindayageni, A., Humaira, F., Wijaya, N. N., Aqsha, N., & Zultsatunni'mah, Z. (2021). Analysis of Genetic Variations in Poly Gene Sequences in Dengue Virus 2 Using In-Silico RFLP. *Bioscience*, 5(1), 80-86.
- Dunham, R.A. (2004). *Aquaculture and Fisheries Biotechnology. Genetic Approach*. New York: CABI Publishing.
- Frankham, R.J.D., Ballou, D.A., & Briscoe. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. UK.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Lewontin, R.C., & Gelbart, W.M. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis, 7th Edition*. New York: W. H. Freeman. .
- Harrison, I., Lavery, M., & Sterling, E. (2004). *Genetic Diversity*. Connexions module: m12158.
- Rai, K.S., & Black, W.C.T. (1999). Mosquito genomes: structure, organization, and evolution. *Advances in genetics*, 41, 1-33.
- Severson, D.W., & Behura, S.K. (2012). Mosquito genomics: progress and challenges. *Annual review of entomology*, 57, 143.
- Campbell R & Mitchell. (2003). *Biologi Jilid 2*. Jakarta: Erlangga.
- Sofro, A.S.M. (1994). *Keanekaragaman Genetik*. Yogyakarta: Penerbit Andi Offset.
- Arisuryanti, T. & Daryono, B.S. (2007). *Genetika Populasi*. Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.