

# Genetic Variation Analysis of CYP2R1 Gene Sequence in Homo Sapiens (PopSet: 1928007955) Using RFLP In Silico

## Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen CYP2R1 Pada Homo Sapiens (PopSet: 1928007955) Menggunakan RFLP Secara *In Silico*

Silvy Rahmayanti<sup>1</sup>, Affifatul Achyar<sup>1\*</sup>

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

\*Correspondence author: [afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id](mailto:afifatul.achyar@fmipa.unp.ac.id)

### Abstract

The CYP2R1 gene is the gene responsible for Vitamin D metabolism. Plays a crucial role in maintaining bone health, the immune system, and various other biological functions in Homo sapiens. The CYP2R1 gene resides on chromosome 11p15.2 and has five exons, spread over a region of about 15.5 kb. In-silico is an approach to research approach whose use will be discussed with advances in technology and available databases. This approach is very commonly used in the medical and healthcare field. The method used is to use the NCBI website, screen the restriction enzymes within the silico web and continue with the benchling website, restriction enzyme within the silico web and continue with the benchling site. The results obtained using the MseI enzyme which produces two allele fragments, namely Allele A1 and Allele A2. Allele A1 has fragments measuring 100 and 120 bp and allele A2 has a fragment size of 123 bp. Allele A1 is more dominant than allele A2 because it has a presentation of 93.9%.

**Keyword** : Gen CYP2R1, in-silico, sequence gen

### Abstrak

Gen CYP2R1 merupakan gen yang bertanggung jawab untuk metabolisme Vitamin D. Vitamin D memiliki peran krusial dalam menjaga kesehatan tulang, sistem kekebalan tubuh, dan berbagai fungsi biologis lainnya pada *Homo sapiens*. Gen CYP2R1 berada pada kromosom 11p15.2 dan memiliki lima ekson, tersebar di wilayah sekitar 15,5 kb. *In-silico* merupakan pendekatan penelitian yang penggunaannya akan dibahas dengan kemajuan teknologi dan *database* yang tersedia. Pendekatan ini sangat umum digunakan dalam bidang medis dan layanan kesehatan lainnya. Metode yang digunakan adalah dengan menggunakan situs NCBI, menyaring enzim restriksi dengan web *in silico* dan dilanjutkan dengan situs *benchling*. Hasil yang diperoleh menggunakan enzim MseI yang menghasilkan dua fragmen alel yaitu Alel A1 dan Alel A2. Alel A1 mempunyai fragmen berukuran 100 dan 120 bp dan alel A2 mempunyai ukuran fragmen 123 bp. Alel A1 lebih dominan dibandingkan Alel A2 karena mempunyai persentase sebesar 93,9 %.

**Kata kunci** : Gen CYP2R1, *in-silico*, sequence gen

## Pendahuluan

Gen CYP2R1 adalah sebutan untuk gen manusia yang memberikan petunjuk untuk pembuatan enzim bernama cytochrome P450 2R1. Enzim ini memiliki peran penting dalam mengonversi vitamin D3 menjadi bentuk aktifnya, yakni calcitriol. Calcitriol sendiri sangat penting untuk regulasi tingkat kalsium dan fosfat dalam tubuh, yang merupakan faktor kunci untuk kesehatan tulang. Gen CYP2R1 biasanya diekspresikan terutama di hati dan terlibat dalam proses hidroksilasi vitamin D3, yang mengubahnya menjadi 25-hidroksivitamin D3. Produk intermediet ini kemudian diubah menjadi calcitriol di ginjal (Slater dkk., 2017).

Gen CYP2R1 terletak pada kromosom 11 pada posisi q13.2 dan mengandung sejumlah ekson dan intron yang membentuk struktur dasar gen. Fungsi gen CYP2R1 adalah mengkode enzim yang terlibat dalam konversi vitamin D3 menjadi bentuk aktifnya, yaitu calcitriol, di hati dan ginjal (Abdalla dkk., 2022). Protein yang dihasilkan oleh gen CYP2R1 berperan dalam serangkaian reaksi biokimia yang membentuk tahap-tahap awal dari sintesis vitamin D aktif (Cheng et al., 2004). Mutasi gen CYP2R1 memiliki kapasitas untuk berdampak langsung pada kadar 25(OH)D dan berkorelasi dengan penyakit yang berhubungan dengan kekurangan vitamin D (Duan dkk., 2018). Vitamin D merupakan faktor kunci regulasi mineralisasi dan homeostasis kalsium baik pada perempuan dan laki-laki (Laswati, 2016). Vitamin D memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan kalsium dan fosfor dalam tubuh, mendukung kesehatan tulang, dan berpartisipasi dalam berbagai proses biologis, termasuk regulasi sistem kekebalan tubuh (Thacher dkk., 2015).

Mutasi atau variasi dalam gen CYP2R1 dapat mempengaruhi kemampuan gen tersebut dalam menghasilkan enzim, dan hal ini dapat memiliki dampak pada metabolisme vitamin D dalam tubuh. Pemahaman lebih lanjut tentang variasi genetik ini dapat memberikan wawasan tentang keragaman respons individu terhadap asupan vitamin D dan potensi kaitannya dengan berbagai kondisi kesehatan (Dong dkk., 2021). Variasi genetik merupakan perubahan yang terjadi pada nukleotida, gen, kromosom, dan genom pada suatu organisme (Achyar dkk., 2021). Dalam konteks penelitian tentang analisis variasi genetik sekuens gen CYP2R1, para peneliti menggunakan teknik seperti RFLP secara *in silico* untuk memahami polimorfisme genetik dan pola fragmentasi yang mungkin terjadi pada tingkat molekuler. Uji *in silico* adalah suatu istilah untuk percobaan atau uji yang dilakukan dengan metode simulasi komputer. *In silico* dapat digunakan sebagai metode untuk mendekati kondisi nyata ke dalam simulasi berbasis komputer menggunakan program aplikasi atau perangkat lunak tertentu (Kanaya & Achyar, 2023). Hal ini membantu dalam memahami bagaimana variasi genetik pada CYP2R1 dapat berkontribusi pada keragaman fungsional dan kesehatan manusia.

RFLP merupakan marka molekuler yang menggunakan enzim restriksi dalam mengidentifikasi sekuensi-sekuensi DNA (Ramadhani & Achyar, 2023). RFLP secara *in silico* adalah metode analisis genetika yang menggunakan simulasi komputer untuk memprediksi pola fragmentasi DNA yang dihasilkan oleh enzim pemotong restriksi pada sekuens genetik tertentu (Fadhilah & Achyar, 2022). RFLP secara *in silico* memungkinkan penelitian variasi genetik tanpa perlu melakukan manipulasi langsung pada materi genetik asli, dan proses ini memanfaatkan perangkat lunak bioinformatika. Pendekatan *in silico* menggunakan RFLP dapat mengidentifikasi polimorfisme genetik pada sekuens gen CYP2R1 tanpa memerlukan ekstraksi DNA fisik. Gen CYP2R1, yang berperan penting dalam metabolisme vitamin D pada manusia (Thacher & Levine, 2017). Dalam kaitannya, teknik RFLP secara *in silico* memberikan alternatif yang efektif untuk menganalisis polimorfisme genetik tanpa perlu melakukan ekstraksi DNA secara fisik. Pendekatan ini memungkinkan identifikasi polimorfisme, restrains enzim penghancur DNA, dan pemodelan variasi genetik pada tingkat molekuler.

## Bahan dan Metode

### Bahan

Urutan gen target seperti saluran natrium berpintu tegangan yang digunakan dalam uji *in silico* ini diperoleh dari NCBI fasta dengan nomor Popset: 1928007955 yang dikirim oleh Mashlawi, AM di <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/1928007955>. Pada Popset terdapat 53 sekuens gen yang mengkode screening kandidat enzim restriksi yang akan digunakan pada RFLP *in-silico* pada situs <http://insilico.ehu.es/restriction/>. Alat ini akan membandingkan pola restriksi dari banyak sekuens DNA yang diuji serta enzim restriksi yang memotongnya.

### Metode

Di situs <http://insilico.ehu.es/restriction/>, pilih "Bandingkan pola rekonstruksi banyak urutan". Urutan gen ini sudah diunduh sebelumnya dalam format fasta, dimasukkan pada kolom yang ada. Pada langkah selanjutnya akan terlihat hasil penyelarasan setiap sekuen dan sekuen yang sama akan dibuang untuk memudahkan proses analisis. Selanjutnya pilih opsi "hanya enzim restriksi yang biasanya diketahui (tanpa N,R,Y...)" untuk mendapatkan enzim restriksi dengan hasil yang baik. Kemudian pilih opsi "Get the list Restriction Enzyme" untuk mendapatkan hasil enzim restriksi yang akan digunakan pada tahap selanjutnya yaitu *Restriction Fragment Long Polymorphism (RFLP) in silico* atau restriksi virtual yang dilakukan dengan menggunakan tools pada situs <https://www.benchling.com/>. Situs ini gratis, namun Anda harus mendaftar terlebih dahulu menggunakan email atau akun Google Anda. Tahap awal yang dilakukan adalah mengimpor 30 rangkaian gen mirip saluran natrium berpintu tegangan yang telah diunduh dari NCBI ke dalam folder proyek di website Benchling. Selanjutnya, lakukan pemotongan dengan mengklik simbol gunting di pojok kanan layar. Kemudian pilih "find enzim" dan pilih nama enzim restriksi yang telah ditentukan sebelumnya pada saat screening. Selanjutnya klik menu "run digest" untuk melakukan pembatasan. Gambar elektroforegram diperoleh dengan mengklik menu "virtual digest".

## Hasil dan Pembahasan

### Restriction Enzyme Candidate Screening

Screening calon enzim restriksi dilakukan pada website (<http://insilico.ehu.es/restriction/>) dengan cara sebelum memasukkan urutan fasta pada *in-silico*, kita ambil fasta terlebih dahulu pada website NCBI. PopSet NCBI yang digunakan untuk enzim restriksi ini adalah PopSet: 1928007955. Dimana organisme tersebut adalah *Homo sapiens* (Human) dengan target gen *pressure-gated sodium channel-like gene*. Setelah selesai menyaring enzim restriksi, pilih salah satu enzim yang memiliki variasi cutting edge pada setiap sampel sekuens. Hasil skrining enzim restriksi dari rangkaian gen *Voltage-Gated Sodium Channel* pada *Homo sapiens* (Human) dapat dilihat pada Gambar 1.

AluI,AluBI AG^CT		47	46	48	47	47	47	47	47	47
BfuCI,Bsp143I,Bss^HI,Bst^MBI,DpnII,Kzo9I,MboI,NdeII,Sau3AI ^GATC_		51	50	52	51	51	51	51	51	51
Bst^KTI G_AT^C		54	53	55	54	54	54	54	54	54
DpnI,HaeII GA^TC		53	52	54	53	53	53	53	53	53
MluCI,Sse9I,TasI,Tsp509I,TspEI 'AATT_		98	97	99	98	98	98	98	98	98
MluCI,Sse9I,TasI,Tsp509I,TspEI 'AATT_		98	97	99	98	98	98	98	98	98
HseI,SaqAI,TruII,Tru9I T^TA_A		120	119	121	120	120			120	120
AluI,AluBI AG^CT		47	46	48	47	47	47	47	47	47
BfuCI,Bsp143I,Bss^HI,Bst^MBI,DpnII,Kzo9I,MboI,NdeII,Sau3AI ^GATC_		51	50	52	51	51	51	51	51	51
Bst^KTI G_AT^C		54	53	55	54	54	54	54	54	54
DpnI,HaeII GA^TC		53	52	54	53	53	53	53	53	53
MluCI,Sse9I,TasI,Tsp509I,TspEI 'AATT_		98	97	99	98	98	98	98	98	98
MluCI,Sse9I,TasI,Tsp509I,TspEI 'AATT_		98	97	99	98	98	98	98	98	98
HseI,SaqAI,TruII,Tru9I		120	119	121	120	120			120	120

Gambar 1. Restriction enzyme screening

### RFLP Secara *In-silico*

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 (Achyar dkk., 2021). Perbedaan tersebut muncul karena mutasi yang terjadi pada waktu lalu dan dideteksi sebagai variasi (polimorfisme pada perbedaan fragmen restriksi) (Rani dkk., 2024). Kelebihan penggunaan RFLP *in silico* dapat dilihat dalam proses identifikasi organisme dengan kecepatan, kesederhanaan dan produktivitas yang tinggi dibandingkan dengan metode konvensional (Pinta dkk., 2024). *In silico* ini dilakukan dengan cara login ke website benchling. Hal ini dilakukan dengan mengimpor 30 sekuens ke dalam database, setelah itu Anda akan melihat informasi tentang enzim yang memotong pada posisi nukleotida berapa dan menghasilkan fragmen berukuran berapa dan Anda juga akan melihat informasi tangga dari sekuens tersebut. Enzim restriksi pemotongan akan menghasilkan fragmen DNA dengan panjang yang bervariasi dan hasil fragmen tersebut dapat divisualisasikan melalui elektroforesis Enzim restriksi yang digunakan adalah enzim Msel karena enzim ini mempunyai variasi pemotongan pada setiap sekuens sampel. Hasil RFLP *in-silico* menggunakan enzim restriksi Msel dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Restriction electropherogram enzim Msel

Restriksi menggunakan enzim Msel pada sekuens gen Sodium Chanel Tegangan-Gated pada Homo sapiens (human) menggunakan 81 sekuens gen menghasilkan dua variasi gen yang berbeda, yaitu alel A1 mempunyai fragmen pita berukuran 3 dan 120 bp dan alel A2 memiliki fragmen pita berukuran 123 bp. Pada fragmen yang diperoleh hanya terdapat 2 pita yang menandakan tidak terjadi pemotongan oleh enzim restriksi sepanjang fragmen sehingga tetap utuh.

Tabel 1. Analisis e *in-silico* RFLP

Enzim Restriksi	Situs Pengenalan Restriksi	Ukuran Fragmen (bp)	Alel	Jumlah Kehadiran Fragmen (N = 81)	Presentase Kehadiran Fragmen (%)	Frekuensi Alel
Msel	TTA_A	100 bp dan 120 bp	A1	76	93,9%	0,939
		123 bp	A2	5	6,1%	0,061

Berdasarkan Tabel 1, dengan menggunakan enzim restriksi Msel yang mempunyai situs pengenalan TTA\_A diperoleh dua alel yaitu A1 dan A2 dengan dua ukuran fragmen yang berbeda, dimana alel A1 mempunyai fragmen DNA sebesar 100 bp dan 120 bp dan alel A2 mempunyai ukuran fragmen 123 bp. Dari 81 sequence fragment yang digunakan, 1 sequence mempunyai panjang fragment 100 bp dan 120 bp dan 1 sequence mempunyai panjang fragment 123 bp. Persentase fragmen kedua alel juga berbeda, dimana alel A1 memiliki persentase sebesar 93,9% dan alel A2 memiliki persentase sebesar 6,1%. Frekuensi alel kedua alel juga berbeda, alel A1 sebesar 0,939 dan alel A2 sebesar 0,061 . Alel A1 mendominasi populasi di PopSet 1928007955 dibandingkan alel A2.

Persentase variasi genetik menunjukkan tingkat keanekaragaman genetik suatu organisme yang juga menunjukkan kisaran toleransi organisme tersebut untuk beradaptasi demi kelangsungan hidupnya. Organisme yang mempunyai keanekaragaman tinggi akan lebih mudah beradaptasi dibandingkan organisme yang mempunyai keanekaragaman rendah (Susanti, 2018).

## Kesimpulan

Hasil yang diperoleh pada proses screening enzim restriksi dan pelaksanaan RFLP *in-silico*, menunjukkan bahwa enzim yang digunakan pada proses RFLP adalah enzim MseI. Penggunaan enzim ini menghasilkan dua fragmen alel yaitu Alel A1 dan Alel A2. Alel A1 mempunyai fragmen berukuran 100 bp dan 120 bp dan alel A2 mempunyai ukuran fragmen 123 bp. Alel A1 lebih dominan dibandingkan Alel A2 karena mempunyai persentase sebesar 93,9 %.

## Daftar Pustaka

- Abdalla AT, Koedam M, Drop SLS, Boot AM, Abdullah MA, van der Eerden BCJ. 2022. Clinical presentation and molecular genetic analysis of a Sudanese family with a novel mutation in the CYP2R1 gene. *Gene*, 844(June), 146809.
- Achyar A, Hindayageni A, Humaira F, Wijaya NN, 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.
- Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. 2004. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(20): 7711–7715.
- Dong AN, Tan BH, Pan Y, Ong CE. 2021. The *cyp2r1* enzyme: Structure, function, enzymatic properties and genetic polymorphism. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 24: 94–112.
- Duan L, Xue Z, Ji H, Zhang D, Wang Y. 2018. Effects of CYP2R1 gene variants on vitamin D levels and status: A systematic review and meta-analysis. *Gene*. 678(June): 361–369.
- Fadhilah H & Achyar A. 2022. Analysis of genetics variation of the *NdhF* gene sequence in *Antrophyum* Sp. NCBI Popset 2496377569 using in silico RFLP. *Tropical genetics*. 2(1): 17–21.
- Kanaya ON & Achyar A. 2023. Analisis Variasi Genetik Sekuen Gen PHT1 pada Padi (*Oryza sativa*) NCBI Popset 240028097 Menggunakan RFLP Secara In Silico. *Serambi Biologi*. 8(1): 5–9.
- Laswati H. 2016. *Ancaman osteoporosis pada kaum laki-laki mengenal patofisiologi dan penanganannya*.
- Rani WM, Puspita D, Sefina N, Sa'adah N, Achyar A. 2024. Analisis Variasi Genetik Gen E6 HPV 16 Menggunakan RFLP Secara in Silico. *Serambi Biologi*. 9(1): 170–174.
- Pinta SR, Pratama CD, Fatiha FD, Muharani S, Achyar A. 2024. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(20): 7711–7715.
- Ramadhani M & Achyar A. 2023. 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* ). 8(3): 559–563.
- Slater NA, Rager ML, Havrda DE, Harralson AF. 2017. Genetic Variation in CYP2R1 and GC Genes Associated with Vitamin D Deficiency Status. *Journal of Pharmacy Practice*. 30(1): 31–36.
- Thacher TD, Fischer PR, Singh RJ, Roizen J, Levine MA. 2015. CYP2R1 mutations impair generation of 25-hydroxyvitamin D and cause an atypical form of vitamin D deficiency. *Journal of Clinical*

- Endocrinology and Metabolism. 100(7): E1005–E1013.
- Thacher TD & Levine MA. 2017. CYP2R1 mutations causing vitamin D-deficiency rickets. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 173, 333–336.
- Susanti M. 2018. Pengaruh Polimorfisme Gen Reseptor CYP2R1 (rs 10741657) dengan Kadar Vitamin D (Doctoral dissertation, Universitas Sumatera Utara).