

# **Analisis Homologi Fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> dari Jeruk Kinkit *Trophasia trifolia* Menggunakan BLAST Protein Dan BLAST Nukleotida**

WHISNU IDA BAGUS  
I GEDE PUTU WIRAWAN<sup>\*)</sup>  
I WAYAN ADIARTAYASA

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana  
Jl. PB. Sudirman Denpasar Bali 80231

<sup>\*)</sup>Email: putuwirawan@unud.ac.id

## **ABSTRACT**

### **Homology Analysis Of CVPD<sup>r</sup> DNA Fragment from 13 Citrus Variety in Bali Using Nucleotide Blast And Protein Blast**

CVPD<sup>r</sup> from *Trhiphasia trifolia* is predicted to have to increase resistance from CVPD, but the mechanism of this DNA is still largely unknown. The first step of DNA analyzing is by using homology with Nucleotide and Protein BLAST. BLAST can identify, similarity search, and predict the function of DNA. The goal of this research is to compare CVPD<sup>r</sup> DNA fragment from *T. Trifolia* with sequences from NCBI Genbank and finding it's significant homology using nucleotide BLAST and protein BLAST. Nucleotide BLAST result shows that "DNA Citrus nobilis cultivar Tabanan citrus vein phloem degeneration r protein (CVPD<sup>r</sup>) gene, partial cds" have the highest homologs, the other sequences that's shown by BLAST does not have high enough similarity to be homologus. Protein BLAST show "citrus vein phloem degeneration r protein [Citrus nobilis]" have the highest homologs, but even if the other BLAST result have percentage of similarity lower than 55% there are still possibility of structural homolog because the E value is lower than 0.01.

Keywords : CVPD<sup>r</sup>, Homology, Nucleotide BLAST, Protein BLAST

## **1. Pendahuluan**

### **1.1 Latar Belakang**

Jeruk merupakan salah satu buah dengan permintaan tinggi di Indonesia. Pada tahun 2015 produksi jeruk Indonesia mencapai 1.856.075 ton, dengan konsumsi langsung sebesar 837.351 ton dan penggunaan sebagai bahan baku industri makanan sebesar 1.180.797 ton (Kementan, 2016). Walau dari segi kuantitas produksi jeruk di

Indonesia masih surplus, namun produksi jeruk di Indonesia masih rentan terhadap masalah seperti penyakit.

Salah satu penyakit penting tanaman jeruk di Indonesia adalah *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) yang disebabkan oleh *Liberibacter asiaticus* (Sandrine *et al.*, 1996). Persebaran penyakit ini dilakukan oleh vektor *Diaphorina citri* (Tirtawidjaja, 1983), maupun akibat bibit yang terinfeksi, dikarenakan gejala CVPD bisa belum terlihat pada bibit dikarenakan masa inkubasi patogen berkisar 3 sampai 5 bulan (Tirtawidjaja & Suharsodjo, 1990).

CVPD menyerang hampir semua kultivar jeruk namun ditemukan bahwa kinkit (*Triphacia trifolia*) memiliki ketahanan terhadap penyakit CVPD dimana ketahanan ini diperkirakan disebabkan oleh keberadaan DNA yang membawa ketahanan terhadap penyakit ini (Wirawan *et al.*, 2004)

Wirawan *et al.*, (2004) menemukan 1 mutan dari 7000 spesimen *T. trifolia*, yang rentan terhadap serangan CVPD, dengan menggunakan IPCR, setelah fragmen tersebut di isolasi didapatkan fragmen DNA yang diperkirakan membawa sifat resisten terhadap penyakit CVPD. Diah Yuniti *et al.*, 2018 menggunakan primes spesifik 16S rDNA menemukan keberadaan fragmen DNA CVPD<sup>f</sup>, baik pada tanaman yang rentan maupun resisten terhadap CVPD. Walau fragmen CVPD<sup>f</sup> ini sudah banyak diidentifikasi, dan ditemukan pada berbagai jenis jeruk baik yang resisten maupun tidak, namun secara genetik, belum banyak diketahui tentang DNA CVPD<sup>f</sup>

Salah satu cara untuk menganalisa DNA adalah dengan menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). BLAST mampu menemukan daerah yang memiliki kemiripan antar sekuen. Dua buah sekuen dapat memiliki kemiripan, dengan menggunakan BLAST kemiripan tersebut dapat ditentukan apakah disebabkan karena kebetulan saja, ataupun dikarenakan adanya hubungan kekerabatan antar sekuen. Program ini mampu membandingkan baik sekuen basa maupun protein dengan pusat data yang ada dan menentukan signifikansi kecocokan tersebut secara statistik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui lebih dalam DNA CVPD<sup>f</sup> secara genetik menggunakan homologi nukleotida dan protein (Pearson, 2013).

## **2. Metode Penelitian**

### **2.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari Agustus 2018 sampai Januari 2019. Analisis ini dilakukan di UPT. Lab Sumberdaya Genetika dan Biologi Molekular, Universitas Udayana, Denpasar, Bali.

### **2.2 Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat komputer yang telah dilengkapi dengan aplikasi bioinformatika UGENE (Golosova *et al.*, 2014) dan NCBI BLAST Database (Madden, 2003).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil sekuen fragmen DNA CVPD<sup>f</sup> 13 jeruk yang berasal dari 7 kabupaten yang ada di Bali yaitu Denpasar, Bangli,

Tabanan, Buleleng, Badung, Giaymar, dan Karangasem, diperoleh menggunakan primer CVPD<sup>r</sup> WR-F dan WR-R.

**2.3 Pelaksanaan Penelitian**

Analisis homologi nukleotida dilakukan dengan melakukan BLAST nukleotida menggunakan NCBI Genbank *database*. Sebelum dapat dilakukan analisis homologi protein sekuen perlu diterjemahkan terlebih dahulu. Menggunakan aplikasi bioinformatika UGENE sekuen diterjemahkan dengan cara menemukan ORF nya, lalu memilih ORF dan frame untuk diterjemahkan. Sekuen ORF yang telah diterjemahkan ke protein selanjutnya dilakukan analisis homologi protein dengan melakukan BLAST Protein menggunakan NCBI Genbank *database*.

**3. Hasil dan Pembahasan**

**3.1 Homologi Nukleotida**

Berdasarkan analisis BLAST sekuen fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> dari jeruk kinkit menggunakan algoritma *discontiguous megablast*. Diperoleh 5 DNA organisme dengan kemiripan tertinggi yaitu: *C. nobilis*, *I. triloba*, *L. angustifolius*, *B. rapa*, dan *A. alpina*.

Tabel 1. Persentase homologi nukleotida 13 fragmen DNA CVPD

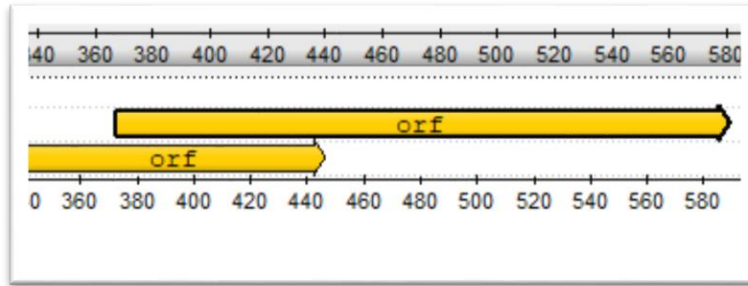
Nama Sekuen	<u>Citrus nobilis</u> <u>cultivar Tabanan</u> <u>citrus vein phloem</u> <u>degeneration r</u> <u>protein (CVPDr)</u> <u>gene, partial cds</u>	Ipomoea triloba cultivar NCNSP0323 chromosome 11	<u>Lupinus</u> <u>angustifolius</u> <u>cultivar Tanjil</u> <u>chromosome</u> <u>LG-08</u>	Brassica rapa genome, scaffold: Brapa_scaffold_39	Arabis alpina genome assembly, chromosome: 4
<i>Triphacia trifolia</i>	99.54%	68.56%	70.28	69.14%	68.33%

Tabel 1. menunjukkan bahwa sekuen “*Citrus nobilis* cultivar Tabanan citrus vein phloem degeneration r protein (CVPD<sup>r</sup>) gene, partial cds” memiliki persentase kemiripan tertinggi terhadap fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> *T. trifolia* dengan persentase homologi sebesar 99.54%. Persentase homologi tersebut menunjukkan bahwa fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> kinkit homolog dengan dna CVPD<sup>r</sup> *Citrus nobilis* cul. Tabanan yang ada di NCBI Genbank. Sedangkan ke empat sekuen lainnya masih belum dapat dikatakan homolog pada tingkatan nukleotida karena persentase homolog yang masih lebih rendah dari 90%.

**3.2 ORF dan Sekuen Protein CVPD<sup>r</sup>**

Pencarian ORF menggunakan aplikasi UGENE menunjukkan adanya dua buah ORF pada sekuen seperti yang ditunjukkan pada gambar 1. Dari ke dua ORF tersebut

dipilih satu ORF yang paling Panjang. ORF tersebut terbentang dari basa ke 370-588 dan berada pada frame forward 1(+1).



Gambar 1. Grafik arah dan lokasi ORF fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> kinkit (*T. trifolia*)

Setelah ORF didapatkan, sekuen tersebut selanjutnya diterjemahkan ke protein berdasarkan frame yang didapatkan. Setelah diterjemahkan didapatkan sekuen protein fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> kinkit seperti pada gambar 2.

```
> Triphacia trifolia
MSIYNHRFQETYEKWIGQPTNF
GDLKAFACSDYSHISQGKLAHR
ALKVICMGYLEGVRI IKSGVHM
LILQNA
```

Gambar 2. Sekuen protein fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> kinkit

### 3.3 Homologi Protein

Berdasarkan analisis homologi sekuen protein fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> kinkit menggunakan BLAST protein dipilih sepuluh sekuen dengan nilai homologi tertinggi yang berasal dari sekuen yang berbeda

Homolog protein tertinggi dari protein fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> adalah citrus vein phloem degeneration r protein [Citrus nobilis] dengan persentase homologi sebesar 100%. Sembilan sekuen lainnya walau persentasenya masih dibawah 55%, namun masih berkemungkinan homolog pada tingkatan protein dikarenakan nilai E value yang lebih kecil dari 0.01 (Scholz, 2019).

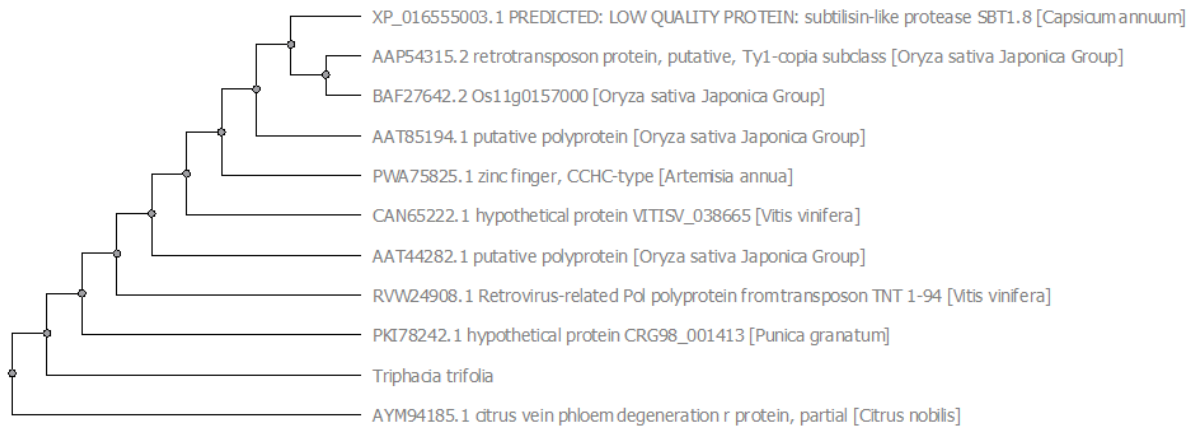
Tabel 2. Hasil BLAST protein sekuen protein fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> kinkit

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<a href="#">citrus vein phloem degeneration r protein [Citrus nobilis]</a>	152	152	98%	1,00E-46	100.00%
<a href="#">hypothetical protein CRG98_001413 [Punica granatum]</a>	59.7	59.7	63%	9,00E-09	54.35%
<a href="#">Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TNT 1-94 [Vitis vinifera]</a>	59.7	59.7	70%	2,00E-08	47.06%
<a href="#">putative polyprotein [Oryza sativa Japonica Group]</a>	58.9	58.9	63%	4,00E-08	50.00%
<a href="#">hypothetical protein VITISV_038665 [Vitis vinifera]</a>	58.9	58.9	70%	4,00E-08	47.06%
<a href="#">zinc finger, CCHC-type [Artemisia annua]</a>	58.5	58.5	63%	4,00E-08	50.00%
<a href="#">PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: subtilisin-like protease SBT1.8 [Capsicum annuum]</a>	57.0	57.0	73%	1,00E-07	47.17%
<a href="#">Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TNT 1-94 [Vitis vinifera]</a>	57.0	57.0	70%	2,00E-07	47.06%
<a href="#">retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass [Oryza sativa Japonica Group]</a>	56.6	56.6	63%	2,00E-07	47.83%
<a href="#">Os11g0157000 [Oryza sativa Japonica Group]</a>	56.6	56.6	63%	2,00E-07	47.83%

**Keterangan**

- Max(imum) score : Merupakan nilai tertinggi dari satu segmen yang didapatkan dari kesamaan antar sekuen
- Total score : Merupakan jumlah dari nilai yang didapatkan dari semua segmen dalam sekuen yang memiliki kesamaan
- Query cover : Perentase dari sekuen yang memiliki kesamaan dengan pasangannya
- E(xpect) value : Nilai kesamaan yang muncul akibat kebetulan
- Per(centage) of identity : Per(centage) of identity: nilai yang menunjukkan persentase kesamaan antar sekuen yang dimiliki dengan sekuen target

Pohon filogeni pada gambar 3. Menunjukkan hasil yang serupa dengan hasil analisis BLAST yang menunjukkan sekuen protein CVPD<sup>r</sup> kinkit memiliki kekerabatan paling dekat dengan CVPD<sup>r</sup> *C. nobilis*. Pohon filogeni menunjukkan mereka berpisah pada cabang pertama yang menunjukkan kedua sekuen tersebut memiliki leluhur yang sama. Sedangkan untuk sekuen-sekuen lain terbentuk cabang-cabang yang menggambarkan seberapa jauh hubungan kekerabatan sekuen-sekuen tersebut.



Gambar 3. Pohon filogeni hasil BLAST

#### 4. Kesimpulan dan Saran

##### 4.1 Kesimpulan

1. menunjukkan bahwa sekuen “*Citrus nobilis* cultivar Tabanan citrus vein phloem degeneration r protein (CVPD<sup>r</sup>) gene, partial cds” memiliki persentase kemiripan tertinggi terhadap fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> *T. trifolia* dengan persentase homologi sebesar 99.54%. Sedangkan ke empat sekuen lainnya belum bisa dikatakan homolog pada tingkatan nukleotida
2. Homolog protein tertinggi dari protein fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> adalah citrus vein phloem degeneration r protein [*Citrus nobilis*] dengan persentase homologi sebesar 100%. Pohon filogeni menunjukkan sekuen protein CVPD<sup>r</sup> kinkit memiliki kekerabatan paling dekat dengan CVPD<sup>r</sup> *C. nobilis* dengan adanya perpisahan pada cabang pertama. Sekuen lain walau memiliki persentase kesamaan dibawah 55% namun dikarenakan E value yang lebih rendah dari 0.01 masih memiliki kemungkinan homolog secara struktural

##### 4.2 Saran

Dengan didapatkannya sekuen yang homolog sifat-sifat dan kemampuan dari DNA CVPD<sup>r</sup> dapat ditelusuri dengan membandingkannya dengan sekuen homolognya. Hal ini digunakan untuk menambah informasi tentang DNA CVPD<sup>r</sup> dan informasi tersebut dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

#### Daftar Pustaka

- Golosova, O., R. Henderson, Y. Vaskin, A. Gabrielian, G. Grekhov, V. Nagarajan, A.J. Oler, M. Quiñones, D. Hurt, M. Fursov, Y. Huyen, 2014. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and CHIP-seq data analyses. PeerJ 2(8)
- Madden, T. 2003. The NCBI Handbook [Internet] Chapter 16 The BLAST Sequence Analysis Tool. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology

- Information (US); 1-5 hal. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>
- Pearson, W.R. 2013. An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Curr protect Bioinformatics* Volume42, Issue1
- Kementrian Pertanian. 2016. *Outlook Komoditas Pertanian sub Sektor Hortikultura Jeruk2016* . Pusat Data dan. Sistem Informasi Pertanian, Sekretariat Jenderal, Jakarta.
- Sandrine, J., J.M. Bove, & M. Garnier. 1996. PCR detection of two candidates Liberobacterspecies associated with greening disease of citrus. *Moleculer an Celluler Probes*. 10: 43
- Scholz, M. 2019. E-value & Bit-score. <http://www.metagenomics.wiki/tools/blast/evaluate>. Diakses pada 20 Juni 2019
- Tirtawidjaja, S. and R. Suharsojo. 1990. Penyakit CVPD merupakan bahaya laten bagi tanaman jeruk di Indonesia. *Perlindungan Tanaman Menunjang Terwujudnya Pertanian Tangguh dan Kelestarian Lingkungan*. PT. Agricon. hlm 299 – 310
- Wirawan, I. G. P. Liliek, S. dan I.N. Wijaya. 2004. Penyakit CVPD Pada Tanaman Jeruk. Denpasar: Udayana Press. 135 hal.
- Yuniti, I G.A.D. 2018. Polimorfisme fragmen DNA CVPD<sup>r</sup> pada beberapa jenis tanaman jeruk di Bali. (*disertasi*). Universitas Udayana. Denpasar.