

**Analisis Sekuens DNA Penyandi 18S rRNA pada Tumbuhan Cocor Bebek
(*Kalanchoe x laetivirens*)****(Analysis of DNA Sequences Encoding 18S rRNA
in Cocor Bebek (*Kalanchoe x laetivirens*))**

Felly Andariyusti, Dewi Indriyani Roslim *

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Kampus Bina
Widya, Jl. HR Soebrantas Km 12.5, Panam, Pekanbaru 28293, Riau, Indonesia.

*Email korespondensi: dewiindriyaniroslim@gmail.com

(Article History: Received January 16, 2021; Revised April 6, 2021; Accepted April 13, 2021)

ABSTRAK

Studi mengenai stress pada tumbuhan semakin banyak didasarkan pada ekspresi gen. Gen penyandi 18S rRNA merupakan salah satu anggota dari gen housekeeping yang umum digunakan sebagai kontrol internal. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis sekuens DNA penyandi 18S rRNA pada tumbuhan cocor bebek (*K. x laetivirens*). Metode penelitian meliputi ekstraksi DNA total dari daun segar menggunakan Mini Kit Genomic DNA Mini Kit Plant (Geneaid). Data sekuen DNA diolah menggunakan program BioEdit, BLASTn dan MEGA 6. Sekuen DNA parsial dari gen penyandi 18S rRNA *K. x laetivirens* telah diperoleh dengan ukuran 419pb. Sekuen tersebut memiliki kemiripan sebesar 99,28% dengan *K. daigremontiana*. *Kalanchoe x laetivirens* membentuk satu kelompok dengan sesama anggota dari famili Crassulaceae dan terpisah dari famili lainnya yang diteliti. Primer 18S rRNA spesifik terhadap cocor bebek telah dirancang, yaitu forward 5'- CAA ATT ACC CAA TCC TGA CA -3' dan reverse 5'- CCA ACG TAA ATA GGA TCG AA -3'. Sekuen yang diperoleh pada penelitian ini berpotensi sebagai gen referensi setelah dilakukan validasi.

Kata kunci: 18S rRNA; gen housekeeping; *Kalanchoe x laetivirens*; kontrol internal; PCR

ABSTRACT

Plant stress studies are based on gene expressions. This study aims to analyze the DNA sequence of 18S rRNA in cocor bebek (*K. x laetivirens*). Methods being out are total DNA isolation using Mini Kit Genomic DNA Mini Kit Plant (Geneaid). The DNA sequence was analyzed utilizing BioEdit, BLASTn and Mega 6 programs. Partial DNA sequence of 18S rRNA in *K. x laetivirens* has been obtained with 419 bp length. The DNA sequence has 99.28% similarity to *K. daigremontiana*. *Kalanchoe x laetivirens* formed one group with another species from the same family, Crassulaceae, based on the DNA sequence of 18S rRNA. A primer pair specific to *K. x laetivirens* for amplifying 18S rRNA has been designed such as forward 5'- CAA ATT ACC CAA TCC TGA CA -3' and reverse 5'- CCA ACG TAA ATA GGA TCG AA -3'. This DNA sequence is potentially being employed as an internal control once the validation process completed.

Keywords: 18S rRNA; housekeeping gene; internal control; *Kalanchoe x laetivirens*; PCR

PENDAHULUAN

Cocor bebek atau nama ilmiahnya *Kalanchoe x laetivirens* merupakan tumbuhan herba sukulen yaitu tumbuhan yang mengandung air (Ai 2012). *Kalanchoe x laetivirens* termasuk ke dalam famili Crassulaceae yang diduga merupakan hasil persilangan antara *K. laxiflora* dengan *K. daigremontiana* (Shaw 2008). Cocor bebek merupakan tumbuhan yang kerap dijumpai pada daerah-daerah yang beriklim tropis

seperti Asia, Australia, Galapagos, dan Hawaii (Kazmi *et al.* 2012).

Tumbuhan cocor bebek sudah turun-temurun digunakan oleh masyarakat sebagai tumbuhan hias dan juga tumbuhan obat (Latief 2012). Tumbuhan ini mudah tumbuh pada kondisi lingkungan kering dan panas dan tidak sulit dalam pemeliharannya. Kemampuan adaptasi cocor bebek pada kondisi lingkungan tersebut menunjukkan bahwa ada gen-gen yang mengontrolnya. Untuk mempelajari pola ekspresi gen-gen

tersebut diperlukan kontrol internal yang umumnya berasal dari kelompok gen *housekeeping*.

Syarat suatu gen dapat dijadikan sebagai kontrol internal ialah ekspresinya stabil dan ekspresinya terdapat pada semua jaringan. Beberapa gen *housekeeping* yang sudah dijadikan kontrol internal pada beberapa tumbuhan seperti 18S rRNA, 26S rRNA, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), aktin dan *elongation factor-1-alpha* (EF1 α) (Chen *et al.* 2015).

Gen penyandi 18S rRNA merupakan salah satu kontrol internal yang banyak digunakan dalam studi ekspresi gen karena gen tersebut diekspresikan pada semua jaringan, sel, dan berbagai perlakuan (Kuchipudi *et al.* 2012). Molekul 18S rRNA merupakan komponen dari subunit besar ribosom sel eukariotik (Meyer *et al.* 2010). Gen penyandi 18S rRNA berukuran 1800 pb dan terletak di genom inti (Kwon *et al.* 1991).

Isolasi gen dari 18S rRNA sebagai gen referensi sebelumnya sudah pernah dilakukan pada tumbuhan *Gynura procumbens* (Christiningrum *et al.* 2016), *Capsicum annuum* (Elsima *et al.* 2019), dan *Platyclus orientalis* (Chang *et al.* 2016). Namun, saat ini informasi mengenai gen referensi 18S rRNA dari tumbuhan *K. x laetivirens* belum diketahui dan belum diteliti. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis sekuens DNA penyandi 18S rRNA pada tumbuhan cocor bebek (*K. x laetivirens*). Sekuen ini belum pernah dilaporkan dari spesies tanaman ini dan nantinya dapat digunakan sebagai kontrol internal pada analisis ekspresi gen di tanaman ini setelah dilakukan validasi.

METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau. Pengambilan sampel dilakukan di tanah kebun jalan Kuantan 7 Kota Pekanbaru, Provinsi Riau.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini ialah daun segar dari tumbuhan *K. x*

laetivirens. Amplifikasi daerah target 18S rRNA ini menggunakan pasangan primer *forward* 5'- CGC GCA AAT TAC CCA ATC CTG ACA -3' dan *reverse* 5'- TCC CGA AGG CCA ACG TAA ATA GGA -3' (Gantasala *et al.* 2013). Amplifikasi menggunakan pasangan primer tersebut akan menghasilkan ampikon sekitar 400 pb.

Sampel daun untuk isolasi DNA diambil sebanyak 0,1 gram setelah itu dipotong lalu dibelah dan dibuang lendir yang berada di dalam daun. Daun kemudian digerus menggunakan mortar dan pestel dan ditambahkan dengan Nitrogen cair. Isolasi dilakukan menggunakan kit isolasi DNA tumbuhan *Genomic DNA Mini Kit Plant* (Geneaid) hingga didapatkan larutan DNA yang disimpan pada suhu 4°C.

Amplifikasi daerah gen 18S rRNA dilakukan dengan teknik PCR. Larutan DNA yang telah diperoleh digunakan sebagai cetakan pada proses PCR (*Hercuvan*). Komponen dan program PCR mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Roslim (2017).

Larutan DNA total maupun produk PCR dideteksi dengan teknik elektroforesis, yaitu dengan memigrasikan pada 1% gel agarosa menggunakan larutan buffer 1x TBE (pH 8). Larutan 1 kb DNA *ladder* (Thermo Scientific) digunakan sebagai DNA standar.

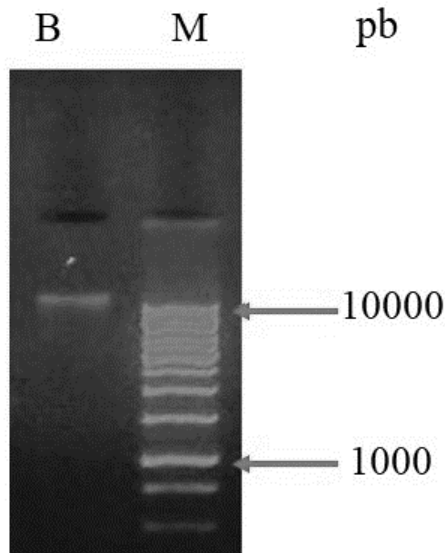
Produk PCR dengan pita yang tunggal dan tebal dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia untuk dilakukan sekuensing di 1st Base Malaysia. Volume produk PCR yang dikirim sebanyak minimal 40 μ l. Selain itu, juga dikirimkan primernya untuk keperluan sekuensing. Primer yang dikirim adalah 30 μ l primer *forward* dan 30 μ l primer *reverse*.

Data sekuen DNA *forward* dan *reverse* yang diperoleh kemudian diolah menggunakan program BioEdit 7.0. Urutan sekuen DNA yang telah diperoleh selanjutnya dianalisis untuk mencari kemiripannya menggunakan program BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang diakses secara online pada website NCBI. Matriks jarak genetik dan dendrogram dibuat menggunakan program MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics*

Analysis) versi 6.0. Dendrogram dikonstruksi dengan analisis *Neighbour-Joining Tree* dan *bootstrap* 1000 Kali. Untuk merancang primer gen penyandi 18S rRNA yang spesifik terhadap cocor bebek (*K. x laetivirens*) digunakan program primer3 yang diakses secara langsung melalui situs <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Molekul DNA total telah diperoleh dengan kondisi utuh, tidak terfragmentasi dan layak untuk PCR (Gambar 1). Isolasi DNA adalah langkah awal dalam proses analisis DNA. Isolasi DNA menggunakan kit merupakan salah satu metode cepat dan mudah untuk memurnikan DNA total.

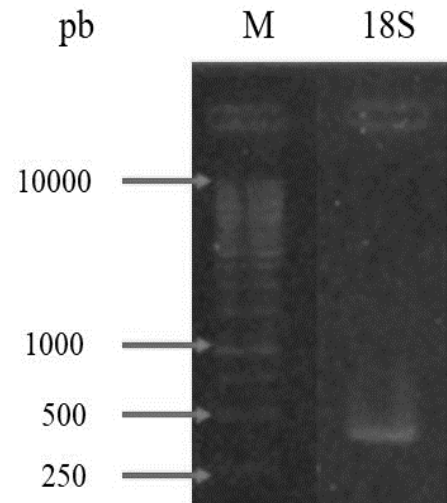


Gambar 1. Profil DNA total tumbuhan cocor bebek (*Kalanchoe x laetivirens*). pb: pasang basa, M: 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific), B: DNA total cocor bebek.

Produk PCR telah diperoleh dengan ukuran sekitar 400 pb. Fragmen DNA yang diperoleh tunggal, tebal dan layak untuk disekuensing (Gambar 2). Sekuen DNA yang diperoleh setelah berukuran 419 pb (Gambar 3). Sekuen tersebut telah didaftarkan di database *GenBank* dengan nomor akses MW286358.

Sekuens yang telah disejajarkan dari tumbuhan cocor bebek mempunyai kemiripan tertinggi yaitu dengan *K.*

daigremontiana (99,28%). Dengan nilai *Query cover* 99% (Tabel 1). Nilai *Query cover* menunjukkan bahwa sekuen penyandi 18S rRNA yang diperoleh 99% yang tersejajarkan atau teranalisis.



Gambar 2. Profil fragmen DNA penyandi 18S rRNA tumbuhan cocor bebek. pb: pasang basa, M: 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific), 18S: gen 18S rRNA.

>*Kalanchoe x laetivirens*_18S rRNA_419 pb

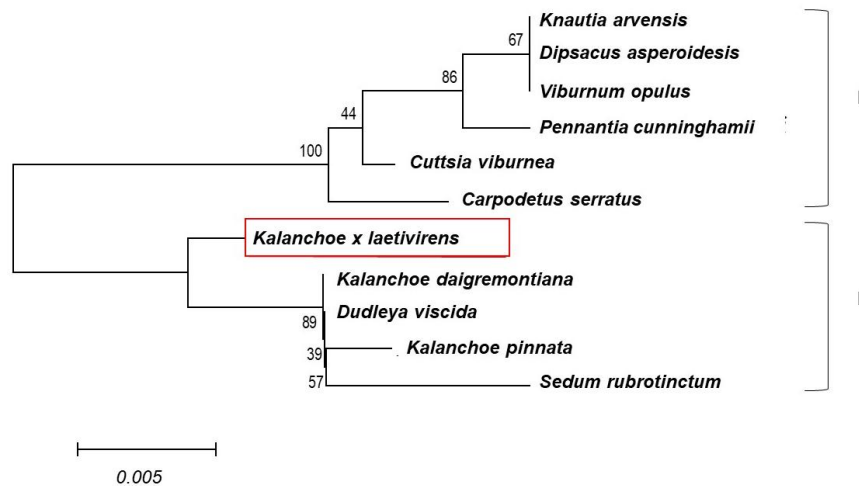
```
TCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACA
ATAAATAACAATACCGGGCTCAATGAGTCTGGTAATTGGAA
TGAGTACAATCTAAATCCCTTAAACGAGGATCCATGGAGGG
CAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGGTAATCCAGCTCCAATA
GCGTATATTTAAGTTGTTGCAAGTAAAAAGCTCGTAGTTGG
ACCTTGGGTTGGGACGTCCGGTCCTCCTTTCGGTGTGCACC
GGCCGTCTCGGCCCTTCTGCGGCGATGCGCTCCTGGCCTT
AACTGGCCGGGTCTGTCCTCCGGCGCTGTTACTTTGAAGAA
ATTAGAGTGCTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGTATACATTAG
CATGGGATAACATCATAGGATTTTCGATCCTATTTACGTTGG
CCTTCGGGA
```

Gambar 3. Sekuens DNA 18S rRNA pada cocor bebek (*Kalanchoe x laetivirens*).

Nilai *E-value* 0,0 menunjukkan bahwa sampel memiliki derajat kesamaan yang tinggi. Semakin rendah nilai *E-value*, data akan semakin akurat. Nilai *Ident* menunjukkan persentase kemiripan sekuen yang disejajarkan. Semakin besar nilainya, semakin tinggi tingkat kesamaan dari sekuen yang disejajarkan. Sementara itu, karena perbedaan beberapa pasang basa nukleotida yang dianalisis, maka nilai identiti 10 akses tidak mencapai 100%.

Tabel 1. Hasil analisis BLASTn dari gen penyandi 18S rRNA pada tumbuhan cocor bebek (*Kalanchoe x laetivirens*)

No	Spesies	Famili	Total Scor	Query Cover (%E	Ident value	(%)
1	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Crassulaceae	737	99	0	99,28
2	<i>Dudleya viscida</i>	Crassulaceae	737	99	0	99,28
3	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Crassulaceae	733	99	0	99,04
4	<i>Sedum rubrotinctum</i>	Crassulaceae	720	99	0	98,33
5	<i>Cuttsia viburnea</i>	Rousseaceae	706	99	0	97,61
6	<i>Carpodetus serratus</i>	Rousseaceae	706	99	0	97,61
7	<i>Viburnum opulus</i>	Adoxaceae	701	99	0	97,37
8	<i>Knautia arvensis</i>	Caprifoliaceae	701	99	0	97,37
9	<i>Dipsacus asperoides</i>	Dipsacaceae	701	99	0	97,37
10	<i>Pennantia cunninghamii</i>	Pennantiaceae	701	99	0	97,37



Gambar 4. Dendrogram berdasarkan sekuens DNA penyandi 18S rRNA dengan metode *Neighbour-Joining* dan *Bootstarp* 1000 Kali

Tabel 2. Primer 18S rRNA yang spesifik terhadap Cocor Bebek (*K. x laetivirens*)

Primer	start	Len (pb)	Tm (°C)	GC%	Seq 5'-3'
Forward	6	20	55,94	40,00	CAAATTACCCAATCCTGACA
Reverse	410	20	55,35	40,00	CCAACGTAAATAGGATCGAA

Dendrogram yang dikonstruksi berdasarkan sekuens DNA 18S rRNA (Gambar 4) menunjukkan bahwa aksesori yang diteliti membentuk dua kelompok besar, yaitu kelompok I dan kelompok II. Kelompok I beranggotakan aksesori dari famili selain Crassulaceae, sedangkan kelompok II beranggotakan aksesori dari famili Crassulaceae. Tumbuhan cocor bebek

(*K. x laetivirens*) yang diteliti berada di kelompok II.

Berdasarkan sekuens DNA yang telah diperoleh, telah dirancang primer 18S rRNA spesifik terhadap cocor bebek menggunakan program primer3 (Tabel 2). Panjang primer yang dirancang masing-masing 20 pb. Primer tersebut dapat digunakan dalam analisis ekspresi gen terkait cekaman

lingkungan tertentu pada tumbuhan cocor bebek (*K. x laetivirens*).

KESIMPULAN

Sekuen DNA parsial penyandi 18S rRNA pada *K. x laetivirens* yang didapatkan dari penelitian ini berukuran 419 bp. Sekuen tersebut memiliki kemiripan tertinggi sebesar 99,28% dengan spesies *K. daigremontiana*. *Kalanchoe x laetivirens* membentuk satu kelompok dengan sesama anggota dari famili Crassulaceae. Primer 18S rRNA spesifik terhadap cocor bebek telah dirancang dan primer tersebut dapat digunakan untuk keperluan validasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA FMIPA Universitas Riau dengan nomor 2407e/UN19.5.1.1.3/PL.01.00/2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Ai NS (2012) Evolusi Fotosintesis Pada Tumbuhan. *J Ilmiah Sains* 12: 28–34.
- Chang E, Zhao Y, Wei Q, Shi S, Jiang Z (2016) Isolation of high-quality RNA from *Platyclusus orientalis* and other Cupressaceae plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 23: 21-27.
- Chen C, Xie T, Ye S, Jensen AB, Eilenberg J (2015) Selection of reference genes for expression analysis in the entomophthoralean fungus *Pandora neoaphidis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 47: 259-265.
- Christiningrum OD, Budiharjo A, Kusdiyantini E (2016) Karakterisasi Molekuler Tanaman Sambung Nyawa (*Gynura Procumbens* [Lour.] Merr) Berdasarkan 18S rRNA. *Jurnal Biologi* 5: 60-70.
- Elsima A, Ferniah RS, Kusumaningrum HP (2019) Ekspresi Gen Penyandi Peroksidase Cabai Merah (*Capsicum annum* L.) (Caper) sebagai Respons terhadap *Fusarium Oxysporum*. *Jurnal Akademika Biologi* 8: 30-35.
- Gantasala NP, Papolu PK, Thakur PK, Kamaraju D, Sreevathsa R, Rao U (2013) Selection and Validation of Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies by Real-Time PCR in Eggplant (*Solanum melongena* L). *BioMed Central* 6: 1-11.
- Kazmi I, Khan R, Singh R, Chauhan M, Anwar F, Bist T (2012) *Brophyllum Pinnatum* A Review. *Int. J. of Research in Biological Sciences* 2: 143-149.
- Kuchipudi SV, Tellabati M, Nelli RK, White GA, Perez BB, Sebastian S, Slomka MJ, Brookes SM, Brown IH, Dunham SP, Chang KC (2012) 18S rRNA is a Reliable Normalisation Gene for Real Time PCR Based on Influenza Virus Infected Cells. *BioMed Central* 9: 1-7.
- Kwon O, Ogino K, Ishikawa H (1991) The longest 18s ribosomal RNA Ever Known Nucleotide Sequence and Presumed Secondary Structure of the 18s rRNA of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Biochem* 202 : 827-833.
- Latief A (2012) Obat Tradisional. EGC, Jakarta.
- Meyer A, Todt C, Mikkelsen NT, Lieb B (2010) Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) Resist Standard PCR Amplification and Give New Insights Into Mollusk Substitution Rate Heterogeneity. *BioMed Central* 10: 2-12.
- Roslim DI (2017). Identification of Pandan Plant (*Benstonea* sp) from Riau, Indonesia Using Three DNA Barcodes. *SABRAO J Breed. and Genet.* 49(4): 346-360.
- Shaw JMH (2008) An investigation of the cultivated *Kalanchoe daigremontiana* group, with a checklist of *Kalanchoe* cultivars. *Hanburyana* 3: 17–79.