

Disain Primer Aktin Spesifik Tuntun Angin (*Elaeocarpus floribundus*) (Actin Primer Design Specific of Tuntun Angin (*Elaeocarpus floribundus*))

Dewi Indriyani Roslim^{1)*}, Herman¹⁾

¹⁾Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Indonesia, Kampus Bina Widya, Jl. HR Soebrantas, Panam, Pekanbaru 28293, Riau

*Email Korespondensi: dewiindriyaniroslim@gmail.com

Diterima 25 Januari 2017, diterima untuk dipublikasikan 27 Februari 2017

Abstrak

*Aktin merupakan salah satu dari housekeeping gene yang dapat digunakan sebagai kontrol internal pada analisis ekspresi gen. Sampai saat ini, sekuen DNA dari gen penyandi aktin pada tanaman tuntun angin (*Elaeocarpus floribundus*) belum pernah dipublikasikan. Penelitian ini bertujuan merancang primer aktin spesifik untuk tanaman *Elaeocarpus floribundus* berdasarkan primer aktin degenerate. Pasangan primer degenerate rancangan yang digunakan adalah PIAc46S sebagai primer forward: 5'- ATGGTNGGNATGGGNCARAA-3' dan PIAc245N sebagai primer reverse: 3'- GTDATNACYTGNCCRTCNGG-5'. Metode penelitian meliputi isolasi DNA dari daun segar, amplifikasi dengan teknik polymerase chain reaction (PCR), elektroforesis pada 1,2% gel agarose, peruntukan nukleotida, dan analisis data menggunakan program BLASTn dan perangkat lunak MEGA versi 6.06. Fragmen DNA aktin telah berhasil diamplifikasi menggunakan primer aktin degenerate dan telah dirancang primer aktin spesifik untuk *Elaeocarpus floribundus* dengan urutan sebagai berikut: 5'- CCAAATCATGTTTGAGACCT-3' (forward) dan 5'-GAACACGTTAATTCCTGCTC-3' (reverse). Primer tersebut selanjutnya dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen aktin dari *E. floribundus* pada analisis ekspresi gen.*

*Kata Kunci: aktin, *Elaeocarpus floribundus*, PCR, primer degenerate, tuntun angin.*

Abstract

*Actin is one of the housekeeping genes which commonly be used as an internal control in gene expression analysis. Until now, the DNA sequence of actin gene of tuntun angin (*Elaeocarpus floribundus*) has never been published. This study aimed to design the actin primer specific for *E. floribundus* based on degenerate actin primer. The pair of the degenerate actin primers (PIAc46S 5'- ATGGTNGGNATGGGNCARAA-3' and PIAc245N 3'- GTDATNACYTGNCCRTCNGG-5') were used in this study. Methods included DNA isolation from fresh leaf, PCR, electrophoresis, sequencing, and data analysis using BLASTn program and MEGA software version 6.06. The actin DNA fragment has been successfully amplified using the degenerate actin primer and then the actin primer specific for *E. floribundus* with the following sequences: 5'- CCAAATCATGTTTGAGACCT-3' (forward) and 5'- AACACGTTAATTCCTGCTC-3' (reverse) have been designed. The primer pairs can be used to amplify the actin gene of *E. floribundus*.*

*Keywords: actin, degenerate primer, *Elaeocarpus floribundus*, PCR, tuntun angin.*

PENDAHULUAN

Tuntun angin (*Elaeocarpus floribundus*) merupakan salah satu tanaman yang tumbuh di Danau Kajuik, Kecamatan Langgam, Kabupaten Pelalawan, Provinsi Riau, Indonesia (Roslim *et al.* 2016). Tumbuhan ini tumbuh di tengah danau sehingga memiliki kemampuan adaptasi yang baik terhadap cekaman penggenangan (*flooded stress*) air dalam waktu yang lama atau bahkan sepanjang hidupnya. Oleh karena itu, *E. floribundus* menyimpan sumber gen toleran atau adaptif terhadap cekaman penggenangan dan berpotensi untuk dijadikan bahan kajian untuk menjelaskan mekanisme yang mendasari toleransi cekamana penggenangan pada tumbuhan melalui analisis ekspresi gen-gen terkait.

Analisis ekspresi gen membutuhkan kontrol internal dan beberapa *housekeeping gene* telah digunakan secara umum sebagai kontrol internal karena jumlahnya melimpah di dalam sel eukariot dan diekspresikan terus-menerus pada setiap tahapan perkembangan dan pada semua jaringan organisme eukariot (Thellin *et al.* 1999). Beberapa *housekeeping gene* yang umum digunakan sebagai kontrol internal yaitu aktin, α -tubulin, β -tubulin, 18S rRNA, dan *gadh* (Nicot *et al.* 2005; Jain *et al.* 2006; Caldana *et al.* 2007).

Aktin merupakan subunit penyusun filamen aktin atau mikrofilamen pada sitoskeleton dari sel eukariot. Setiap sel eukariot pada semua jaringan dan pada semua tahapan pertumbuhannya mengandung sitoskeleton dan juga mikrofilamen tersebut. Gen penyandi aktin telah diisolasi dan dikarakterisasi pada beberapa tanaman seperti *Arabidopsis thaliana* (McDowell *et al.* 1996), *Melastoma malabathricum* (Hannum

et al. 2010), kentang (Nicot *et al.* 2005), padi (Caldana *et al.* 2007), dan *Populus* (Zhang *et al.* 2010). Sampai saat ini, sekuen DNA dari gen penyandi aktin pada tanaman tuntun angin (*Elaeocarpus floribundus*) belum pernah dipublikasikan.

McDowell *et al.* (1996) telah merancang empat primer *degenerate* untuk mengamplifikasi gen penyandi aktin. Rancangannya berdasarkan famili gen aktin pada tanaman *A. thaliana*. Primer *degenerate* tersebut telah berhasil diaplikasikan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi cDNA penyandi aktin pada tumbuhan *M. malabathricum* (Hannum *et al.* 2010). Nurkhairani (2016) juga telah menggunakan primer *degenerate* tersebut untuk mengisolasi DNA penyandi aktin dan pada tumbuhan *Syzygium* sp.

Penelitian ini bertujuan merancang primer aktin spesifik untuk tanaman *E. floribundus* berdasarkan primer aktin *degenerate* tersebut.

METODE

Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun segar dari tumbuhan tuntun angin (*E. floribundus*) yang tumbuh di Danau Kajuik, Kecamatan Langgam, Kabupaten Pelalawan, Provinsi Riau, Indonesia. Primer *degenerate* yang digunakan yaitu PIAc46S sebagai primer *forward*: 5'-ATGGTNGGNATGGGNCARAA-3' dan PIAc245N sebagai primer *reverse*: 3'-GTDATNACYTGNCRCRTCNGG-5' (McDowell *et al.* 1996).

Isolasi DNA Total

Molekul DNA total diisolasi dari daun segar *E. floribundus* menggunakan *DNeasy plant mini kit* dengan prosedur sesuai instruksi

pabrik (*Qiagen*). Kualitas dan kuantitas DNA total selanjutnya dideteksi menggunakan teknik elektroforesis pada 1,2% gel agarose. Elektroforesis dilakukan menggunakan buffer elektroforesis 1X TBE (Tris-Borate-EDTA pH 8,0) pada 65 volt selama 30 menit.

Amplifikasi Menggunakan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplifikasi dilakukan pada volumer PCR sebanyak 50 μ l dengan komponen sebagai berikut: 1X buffer PCR (plus Mg^{2+}) (*Thermo Scientific*), 0,1 mM dNTPs (*Thermo Scientific*), 2,4 μ M primer *forward*, 2,4 μ M primer *reverse*, 2 U Dream Taq DNA polymerase (*Thermo Scientific*), 1 ng DNA total, dan akuabidestilata (Porebski *et al.* 1997). Program PCR adalah sebagai berikut: pra-PCR pada 95°C selama 5 menit, dilanjutkan 35 siklus yang terdiri dari tahapan denaturasi pada 95°C selama 45 detik, penempelan primer pada 52°C selama 1 menit 30 detik. Tahap akhir pasca-PCR dilakukan pada 72°C selama 10 menit.

Electroforesis

Produk PCR yang berupa fragmen DNA kemudian dimigrasikan pada 1,2% gel agarose menggunakan 1X buffer TBE. Elektroforesis dilakukan pada 65 volt selama 1 jam. Setelah itu gel diwarnai dengan 5 μ g/ml etidium bromida lalu divisualisasi di atas lampu UV UV (*WiseUv WUV-M20, Daihan Scientific*), dan difoto menggunakan kamera Olympus SP-500 UZ.

Purifikasi Produk PCR dan Perunutan Nukleotida

Produk PCR selanjutnya dikirim ke PT Genetika Science Indonesia yang berdomisili di Jakarta untuk dipurifikasi.

Perunutan nukleotida dilakukan di 1st Base Malaysia melalui PT Genetika Science Indonesia menggunakan primer *degenerate*.

Analisis Data

Data urutan nukleotida disejajarkan dan dianalisis menggunakan program BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST (Altschul *et al.* 1997). Pembuatan dendrogram menggunakan perangkat lunak MEGA versi 6.06. Dendrogram dikonstruksi menggunakan koefisien *Kimura-2-parameter model* dan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) dengan *bootstrap* 1000 kali. Primer aktin spesifik *E. floribundus* dirancang menggunakan program Primer3 pada situs <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>.

HASIL DAN PEMBAHASAN

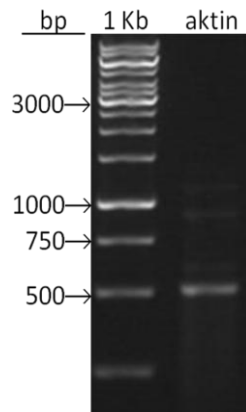
Amplifikasi menggunakan primer *degenerate* telah berhasil dilakukan dan produk PCR berukuran sekitar 500 bp (Gambar 1) telah dirunutkan nukleotidanya. Fragmen DNA penyandi aktin parsial yang berukuran 445 bp telah diperoleh dari tumbuhan *E. floribundus* dan telah mendapatkan nomor aksesori dari GenBank, yaitu KX365740. Ekson mencakup nukleotida dari nomor 1 sampai dengan 43 dan 177 sampai dengan 445, sedangkan intron meliputi nukleotida ke-44 sampai dengan 176 (Gambar 2).

Hasil analisis BLASTn menunjukkan bahwa urutan nukleotida atau sekuen DNA dari *E. floribundus* tersebut benar merupakan bagian dari gen penyandi aktin. Sekuen DNA dari *E. floribundus* yang diperoleh pada penelitian ini mirip dengan sekuen DNA penyandi aktin pada *Eperua*

grandiflora dengan nilai *identity* 75% serta *query cover* sebesar 57%. Nilai *query cover* ini menunjukkan bahwa 57% sekuen DNA *E. floribundus* terpakai dalam analisis BLASTn dan memiliki kesamaan sebesar 75% dengan *Eperua grandiflora*. Sekuen DNA penyandi aktin dari *E. floribundus* juga memiliki kesamaan dengan beberapa sekuen DNA penyandi aktin dari beberapa tanaman dengan nilai *identity* sekitar 75%-79% (Tabel 1). Nilai *query cover* yang rendah disebabkan karena bagian yang memiliki kesamaan dengan sekuen DNA pada database GenBank adalah bagian ekson kedua saja,

yaitu antara nukleotida 177 sampai dengan 445.

Jarak genetik antara *E. floribundus* dengan beberapa aksesori yang diteliti berkisar 0.13 sampai 1.18. *Elaeocarpus floribundus* memiliki jarak genetik paling dekat dengan *P. tomentosa* dan paling jauh dengan *M. truncatula* (Tabel 2). Dendrogram yang diturunkan dari matriks jarak tersebut menunjukkan bahwa *E. floribundus* membentuk satu kelompok dengan *P. tomentosa* dan *H. pallidum* dengan nilai *bootstrap* 100 (Gambar 3). Hasil ini memperkuat bahwa sekuen DNA dari *E. floribundus* benar merupakan bagian dari sekuen DNA penyandi aktin.



Gambar 1. Fragmen DNA penyandi aktin *E. floribundus*.

```
>KX365740 | Elaeocarpus floribundus klon Riau gen aktin
parsial cds; DNA genomik
AATGATACTATTTTCTTTAGTTAGAAATAGGGAAAAAGCCTTCATAAAAAGATGAAGTTAAA
CTTTACTTTTTAAGATAAACAATTATAGTACATGGTGAGTAATCTGTAAATTTGTAATGTA
AGTGATACTGAGCAGGAATTAACGTGTTCCACTCATTTTTTTTTGTATTCTGTGCAGGTTT
TGTTTTGGACTCTGGAGATGGTTGGAGCCACACAGTCCCATTTATGAGGGGTATGCCCT
TCCACATGCCTTCCTTCGTCTTGATCTGGCAGGTGGGATCCTCCATGATGCCTTCAGAAA
ATACTGACCGAGCGCGGTATATTTGTCACCCACCACGCCTAGCGTTAAAATGGGAGGGAA
CAGAAAGAGAAAGTTTCTACAATGGCCCTGGATTGGACCAGAGAGCGAGAAAGTTCTAG
ACCCGAGTTTCTTCCGTAAGAGATG
```

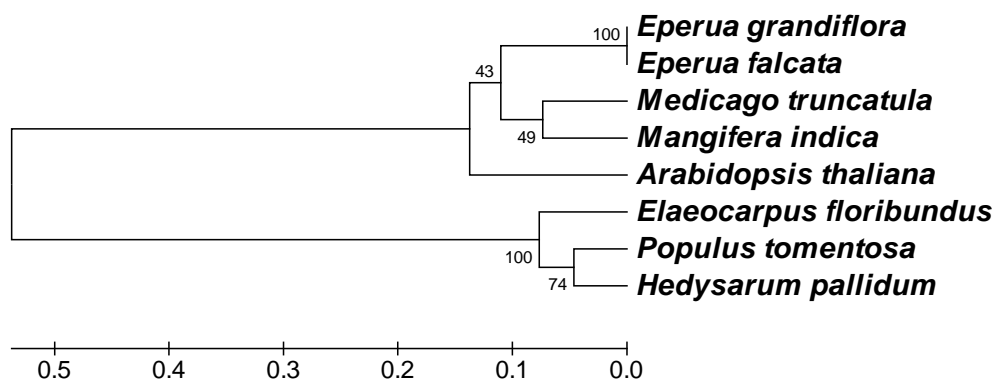
Gambar 2. Urutan nukleotida dari gen penyandi aktin parsial pada *E. floribundus*. Nukleotida yang diberi garis bawah adalah bagian ekson dan selebihnya adalah bagian intron.

Tabel 1. Hasil analisis BLASTn terhadap sekuen DNA penyandi aktin pada *E. floribundus*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Eperua grandiflora</i> clone Act-Eg3 actin-like protein (Act) gene, partial cds	161	161	57%	1.00E-35	75%	GU385994.1
<i>Eperua falcata</i> clone Act-Ef8 actin-like protein (Act) gene, partial cds	159	159	44%	4.00E-35	79%	GU385992.1
<i>Populus tomentosa</i> clone 3 actin gene, complete cds	156	156	54%	5.00E-34	76%	JX986588.1
<i>Medicago truncatula</i> actin-97 partial mRNA	145	145	54%	9e-31	75%	XM_013609938.1
<i>Hedysarum pallidum</i> actin 3 gene, partial cds	145	145	45%	9e-31	77%	JX840487.1
<i>Mangifera indica</i> cultivar SiJi actin 4 (ACT4) mRNA, complete cds	143	143	44%	3e-30	77%	JF737035.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> actin 1 gene, complete cds	143	143	48%	3e-30	76%	U39449.1

Tabel 2. Jarak genetik antara *E. floribundus* dengan beberapa aksesori berdasarkan sekuen DNA penyandi aktin

Aksesori	<i>Efs</i>	<i>Eg</i>	<i>Efa</i>	<i>Pt</i>	<i>Mt</i>	<i>Hp</i>	<i>Mi</i>	<i>At</i>
<i>Elaeocarpus floribundus</i> (<i>Efs</i>)								
<i>Eperua grandiflora</i> (<i>Eg</i>)	0.89							
<i>Eperua falcata</i> (<i>Efa</i>)	0.89	0.00						
<i>Populus tomentosa</i> (<i>Pt</i>)	0.13	1.05	1.05					
<i>Medicago truncatula</i> (<i>Mt</i>)	1.18	0.28	0.28	1.26				
<i>Hedysarum pallidum</i> (<i>Hp</i>)	0.18	0.95	0.95	0.09	1.18			
<i>Mangifera indica</i> (<i>Mi</i>)	1.06	0.16	0.16	1.18	0.15	1.11		
<i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>At</i>)	1.00	0.32	0.32	1.19	0.24	1.18	0.22	

Gambar 3. Dendrogram yang dikonstruksi berdasarkan sekuen DNA penyandi aktin menggunakan metode UPGMA dengan *bootstrap* 1000 kali.

Gen *aktin* merupakan gen fungsional yang memiliki fungsi sangat penting dalam suatu organisme. Gen *aktin* memiliki fungsi struktural yang menyokong keberlangsungan hidup tumbuhan. Gen ini merupakan famili gen dengan anggota yang memiliki pola urutan nukleotida yang mirip satu sama lain (McDowell *et al.* 1996). Pada tanaman *Melastoma malabathricum*, telah diisolasi dan dikarakterisasi empat buah cDNA penyandi aktin (Hannum *et al.* 2010). Pada genus *Populus* telah teridentifikasi delapan anggota dari famili gen penyandi aktin yang menyandikan 377 asam amino (Zhang *et al.* 2010). Sepuluh anggota dari famili gen penyandi aktin pada tanaman *Arabidopsis thaliana* telah diisolasi dan dikarakterisasi (McDowell *et al.* 1996).

Primer aktin *degenerate* rancangan McDowell yang digunakan pada penelitian ini diturunkan dari sekuen asam amino dari protein aktin. Primer *degenerate* dapat menunjukkan tingkat keberhasilan amplifikasi yang berbeda-beda pada setiap spesies (McDowell *et al.* 1996). Hasil amplifikasi yang lebih optimal dapat diperoleh dengan menggunakan primer spesifik. Sekuen DNA penyandi aktin pada *E. floribundus* yang diperoleh dapat dijadikan rujukan untuk merancang primer aktin spesifik *E. floribundus* sehingga nantinya primer tersebut dapat digunakan untuk keperluan analisis ekspresi gen-gen pada *E. floribundus*. Primer aktin spesifik *E. floribundus* yang telah berhasil dirancang adalah sebagai berikut: 5'-CCAAATCATGTTTGAGACCT-3' (*forward*) dan 5'-GAACACGTTAATTCCTGCTC-3' (*reverse*).

Primer berperan sebagai titik awal amplifikasi gen target sehingga tingkat kespesifikan primer akan

mempengaruhi keberhasilan amplifikasi. Menurut Zein dan Prawiradilaga (2013) kesalahan penempelan primer akibat pemilihan primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah non target atau bahkan primer tidak akan menempel pada daerah manapun di genom dan hanya terbentuk dimer primer. Oleh karena itu, hasil penelitian ini dapat menjadi referensi untuk merancang primer aktin spesifik *E. floribundus* sehingga memperkecil kemungkinan amplifikasi daerah non target untuk penelitian selanjutnya.

Informasi sekuen gen *aktin* pada *E. floribundus* ini juga sangat membantu dalam analisis ekspresi gen karena gen aktin memiliki tingkat transkripsi yang stabil sehingga analisis ekspresi gen menjadi lebih akurat. Pengaplikasian gen *aktin* dalam analisis ekspresi gen telah dilakukan pada berbagai penelitian. Gen *aktin* sebagai *housekeeping* mampu menunjukkan ekspresi gen *fosfofruktokinase* yang dikarakterisasi dari padi pada kondisi kekurangan oksigen (Musthroph *et al.* 2013). Ekspresi gen *aktin Hevea brasiliensis Ethylene Response Factors (HbERFs)* juga telah dikarakterisasi pada klon tanaman karet oleh Putranto *et al.* (2014). Hasilnya bahwa gen *aktin* mampu memberikan informasi respon fisiologis klon tanaman karet terhadap ethephon. Gen *aktin ACT7* yang dikarakterisasi dari *Arabidopsis* menunjukkan ekspresi gen pada perkembangan jaringan dan respon terhadap rangsangan dari luar (*eksternal*) (McDowell *et al.* 1996a).

KESIMPULAN

Pada penelitian ini telah diperoleh sekuen DNA penyandi aktin dari *E. floribundus* dengan

ukuran 445 bp dan juga telah dirancang primer aktin spesifik *E. floribundus*, yaitu 5'-CCAAATCATGTTTGAGACCT-3' (*forward*) dan 5'-GAACACGTTAATTCCTGCTC-3' (*reverse*). Primer tersebut dapat digunakan untuk mengamplifikasi sebagian daerah dari gen aktin pada *E. floribundus* untuk keperluan analisis ekspresi gen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Kemenristekdikti Republik Indonesia melalui Hibah Penelitian Fundamental Tahun 2017 a.n. Dr. Dewi Indriyani Roslim. Ucapan terima kasih kepada Siti Khumairoh atas bantuan teknisnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 25:3389-3402
- Caldana C, Scheible WR, Mueller-Roeber B, dan Ruzicic S (2007) A quantitative RT-PCR platform for high throughput expression profiling of 2500 rice transcription factors. *Plant Methods* 3:7 doi: 10.1186/1746-4811-3-7
- Hannum S, Akashi K, Suharsono UW, Hartana A, Yokota A, Suharsono (2010) Isolasi fragmen cDNA dari gen penyandi aktin dari *Melastoma malabathricum*. *Makara Sains* 14(2):163-167
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 646–651
- McDowell JM, Huang S, McKinney EC, An Y-Q, Meagher RB (1996a) Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 142: 587-602
- McDowell JM, An Y, Huang S, Elizabeth C. McKinney, Meagher RB (1996b). The *Arabidopsis* ACT7 actin gene IS EXPRESSED IN RAPIDLY developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiology* 111 : 699-711
- Mustroph A, Stock J, Hess N, Aldous S, Dreilich, Grimm B (2013) Characterization of the phosphofructokinase gene family in rice and ITS expression under oxygen deficiency stress. *Plant Physiology* 4: 1-16
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56(421): 2907–2914
- Porebski SL, Bailey G, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Bio* 15(1): 8-15
- Putranto RA, Kuswanhadi, Montoro P (2014) Respon molekuler *Hevea brasiliensis ethylene response factors* (Hberfs) sebagai marka ekspresi gen terhadap stimulasi ethephon pada klon-klon tanaman karet. *Menara Perkebunan* 82(2):70-80
- Roslim DI, Khumairoh S, and Herman (2016) Confirmation of tuntun angin (*Elaeocarpus floribundus*) taxonomic status

- using *matK* and *ITS* sequences. Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education 8(3): 392-399
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, Borman BD, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J Biotechnol 75:291-295
- Zein MSA, Prawiradilaga DM (2013) DNA barcode fauna Indonesia. Jakarta: Prenada Media
- Zhang D, Du Q, Xu B, Zhang Z, Li B (2010) The actin multigene family in *Populus*: organization, expression and phylogenetic analysis. Mol Genet Genomics 284(2): 105-19. doi: 10.1007/s00438-010-0552-5