

**Sekuen Penyandi 18S Ribosomal RNA dan Ubiquitin pada *Pandanus* sp.
Asal Riau
(Sequences Encoding 18S Ribosomal RNA and Ubiquitin on *Pandanus* sp.
from Riau)**

Dewi Indriyani Roslim^{1)*}, Nurin Nuryani¹⁾, Herman¹⁾

¹⁾Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Indonesia, Kampus Bina Widya, Jl. HR Soebrantas Km 12.5, Panam, Pekanbaru 28293, Riau, Indonesia

*Email korespondensi: dewiindriyaniroslim@gmail.com

Diterima 26 Januari 2018, diterima untuk dipublikasikan 23 Februari 2018

Abstrak

Gen penyandi 18S ribosomal RNA (18S rRNA) dan ubiquitin merupakan anggota dari housekeeping genes yang sering digunakan sebagai kontrol internal pada analisis ekspresi. Penelitian bertujuan mengisolasi kedua gen tersebut pada tanaman Pandanus sp asal Riau. Metode penelitian meliputi isolasi DNA total, elektroforesis, PCR, purifikasi gel, sekuensing, dan analisis data sekuen DNA menggunakan program BioEdit version 7.0.0, BLASTn, dan MEGA6. Sekuen DNA penyandi 18S rRNA (420 bp) dan ubiquitin (493 bp) telah diperoleh. Sekuen 18S rRNA Pandanus sp memiliki kemiripan sebesar 99% dengan beberapa spesies Pandanus. Sekuen ubiquitin Pandanus sp memiliki kemiripan sebesar 87%-89% dengan sekuen ubiquitin dari beberapa tanaman dan alga hijau. Dendrogram yang diturunkan dari kedua sekuen juga mendukung hasil tersebut bahwa sekuen 18S rRNA dari Pandanus sp. membentuk satu kelompok dengan sesama sekuen 18S rRNA, begitu pula dengan sekuen ubiquitin Pandanus sp. membentuk satu kelompok dengan sesama sekuen ubiquitin. Kedua gen berpotensi dijadikan kontrol internal setelah dilakukan validasi. Kata kunci: RNA ribosom 18S, housekeeping gene, Pandanus sp., Riau, ubiquitin.

Abstrak

This research aimed to isolate genes encoding 18S rRNA and ubiquitin in Pandanus sp. from Riau. The research method included total DNA extraction, polymerase chain reaction, electrophoresis, gel purification, sequencing, and DNA sequence analysis using BioEdit version 7.0.0, BLASTn, and MEGA6 programs. Sequences encoding 18S rRNA (420 bp) and ubiquitin (493 bp) had been obtained. The BLASTn analysis showed that 18S rRNA of Pandanus sp. had 99% similarity to some species of Pandanus. Ubiquitin sequence in Pandanus sp. had 87%-89% similarity to ubiquitin sequences of some plants and green algae. Dendrograms generated from both sequences also supported the results that 18S rRNA sequence of Pandanus sp. was the same group as 18S rRNA on Pandanus genus. Similarly, ubiquitin sequence of Pandanus sp was the same cluster as other plants. Both genes were potentially used as internal control in gene expression studies after their validation. Keywords: 18S ribosomal RNA, housekeeping gene, Pandanus sp., Riau, ubiquitin.

PENDAHULUAN

Pandanus sp. merupakan salah satu tumbuhan yang tumbuh di Danau Kajuik yang merupakan salah satu danau paparan banjir yang berlokasi di Provinsi Riau, Indonesia (Elvyra dan Yus 2010; Roslim 2016). Danau paparan banjir adalah daerah dataran rendah yang tergenang air akibat luapan air sungai pada musim hujan lalu genangan tersebut membentuk danau. *Pandanus* sp bersama-sama dengan tumbuhan lain yang tumbuh di ekosistem danau tersebut, seperti *Syzygium* sp (Roslim *et al.* 2016a), *Calamus* sp dan *Gluta renghas* (Roslim 2016), *Elaeocarpus floribundus* (Roslim *et al.* 2016b), dan Putat (*Planchonia valida*) (Elvyra dan Yus 2010), memiliki peran yang sangat penting bagi kelangsungan hidup di ekosistem tersebut. Mereka berperan penting dalam menyediakan tempat berlindung, memijah, dan mengasuh anak ikan dan hewan lainnya, menyediakan nutrisi bagi fauna di ekosistem tersebut, dan menahan tanah di tepi danau agar tidak tergerus ke dalam danau (Pease *et al.* 2006; Zeug & Winemiler 2008). Fauna yang hidup di ekosistem tersebut diantaranya meliputi ikan, udang, burung, serangga, dan hewan air lainnya. Ikan-ikan yang bermigrasi ke Danau Kajuik salah satunya adalah ikan selais yang merupakan ikan endemik Riau (Elvyra dan Yus 2010).

Pandanus sp. dapat tumbuh baik pada kondisi tergenang air pada musim hujan maupun kondisi kering pada musim kemarau. Hal ini mengindikasikan bahwa tanaman ini menyimpan berbagai gen yang terkait dengan toleransinya terhadap cekaman penggenangan. Untuk mempelajari ekspresi dari gen-gen tersebut diperlukan satu atau beberapa gen referensi sebagai kontrol internal. Gen penyandi 18S

ribosomal RNA dan ubiquitin merupakan gen referensi yang sering digunakan sebagai kontrol internal pada analisis ekspresi gen. Gen referensi merupakan gen yang ekspresinya stabil, tidak diinduksi oleh perlakuan tertentu, dan melimpah pada semua jaringan dan tahapan perkembangan organisme eukariot (Thellin *et al.* 1999). Selain 18S rRNA dan ubiquitin, beberapa yang termasuk kelompok gen referensi yang telah berhasil diidentifikasi dari berbagai tanaman adalah gen penyandi glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), faktor inisiasi transkripsi (*TIF*), aktin (*Act*), cyclophilin (*CAC*), tubulin (*TUB*), faktor elongasi translasi (*EF1 α*) (Jain *et al.* 2006; Caldana *et al.* 2007), dan 25S rRNA (Jain *et al.* 2006).

Gen *18S rRNA* menyandikan ribosomal RNA berukuran 18S yang merupakan penyusun sub unit kecil ribosom eukariot dan berperan penting dalam pengenalan dan hibridisasi mRNA yang akan ditranslasikan di ribosom (Dresios *et al.* 2006). Isolasi dan validasi gen *18S rRNA* sebagai gen referensi sudah dilakukan pada berbagai tanaman, seperti pada berbagai tanaman *Chenopodium album* (Aman *et al.* 2017), padi (Jain *et al.* 2006), dan tembakau (Nicot *et al.* 2005).

Gen penyandi ubiquitin yang merupakan anggota dari famili protein regulator pada sel eukariot telah diisolasi dan divalidasi sebagai gen referensi pada beberapa tumbuhan, seperti *Brassica juncea* (Chandna *et al.* 2012) and *Solanum melongena* (Gantasala *et al.* 2013).

Informasi mengenai gen referensi pada *Pandanus* sp. asal Riau sampai saat ini belum tersedia di *database GenBank* dan belum pernah diteliti. Oleh karena itu, sebagai langkah awal pada penelitian ini akan dilakukan isolasi

gen penyandi 18S rRNA dan ubiquitin dari tumbuhan *Pandanus* sp asal Riau yang nantinya gen referensi tersebut dapat digunakan sebagai kontrol internal pada analisis ekspresi gen-gen terkait cekaman penggenangan dan melengkapi *database* di *GenBank*.

METODE

Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah daun segar *Pandanus* sp. yang diambil dari Danau Kajuik. Danau tersebut terletak di Kecamatan Langgam, Kabupaten Pelalawan, Provinsi Riau, Indonesia. Pasangan primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *18S rRNA* adalah 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). Pasangan primer untuk amplifikasi gen *ubiquitin* adalah forward 5'-GCY AAR ATH CAR GAY AAG GA-3' dan reverse 5'-TGD AGD GTK GAY TCC TTC T-3' yang dirancang berdasarkan daerah terkonservasi dari gen tersebut.

Isolasi DNA Total

Sebanyak 500 mg daun segar dipotong kecil-kecil kemudian digerus menggunakan mortar dan pestel di dalam Nitrogen cair. Setelah itu, bubuk daun dimasukkan ke dalam tabung 1.5 ml dan selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA menggunakan *DNeasy plant mini kit* (Qiagen).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Proses PCR dilakukan dalam volume reaksi sebanyak 50 ul dengan komponen sebagai berikut: 1X buffer PCR (plus Mg^{2+}), 0.1 mM dNTPs, 0.2 μ M primer forward, 0.2 μ M primer reverse, 1 U enzim Dream *Taq* DNA polymerase (*Thermo Scientific*), dan 50 ng DNA

total, dan akuabidestilata. Kondisi PCR adalah sebagai berikut: pre-PCR selama 5 menit pada 94 °C sebanyak 1 siklus; denaturasi selama 45 detik pada 94 °C, penempelan primer selama 45 detik pada 55 °C untuk pasangan primer 18S rRNA dan 51.2 °C untuk pasangan primer ubiquitin, dan pemanjangan primer selama 1 menit pada 72 °C, ketiga tahap tersebut diulang sebanyak 35 siklus. Proses PCR diakhiri dengan tahapan post-PCR selama 10 menit pada 72 °C.

Elektroforesis

Molekul DNA total dan produk PCR dimigrasikan dengan elektroforesis pada 1.2% gel agarose untuk menentukan kualitas dan kuantitasnya. Buffer elektroforesis yang digunakan adalah larutan 1X TBE (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 75 volt selama 20 menit. Setelah itu, pita DNA pada gel diwarnai dengan cara merendam gel di dalam larutan 5 μ g/ml ethidium bromide. Visualisasi pita DNA yang sudah diwarnai tersebut dilakukan menggunakan lampu *UV transilluminator* (*WiseUV WUV-M20, Daihan Scientific*) dan pita yang tampak difoto menggunakan kamera digital (*Olympus SP-500 UZ*).

Purifikasi Gel dan Sekuensing

Tabung PCR yang berisi produk PCR kemudian tutup rapat menggunakan parafilm lalu dikirim ke ke 1st Base Malaysia melalui PT Genetika Science Indonesia. Untuk dilakukan purifikasi gel dan sekuensing. Sekuensing dilakukan dua arah menggunakan pasangan primer saat PCR.

Analisis Data Sekuen DNA

Sekuen DNA yang diperoleh kemudian diolah menggunakan program program BLASTn yang

tersedia di (*Basic Local Alignment Search Tool*) at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul *et al.* 1997) dan MEGA6 (Build#: 6140226) (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura *et al.* 2013). Hasil analisis ditampilkan dalam bentuk gambar, tabel, dan dendrogram. Dendrogram dikonstruksi menggunakan Kimura 2-parameter model dan UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) bootstrap 1000 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sekuen DNA parsial sepanjang 420 bp untuk gen *18S rRNA* dan 493 bp untuk gen *ubiquitin* telah diperoleh. Sekuen tersebut telah didaftarkan dan telah mendapatkan nomor accession sebagai berikut: KY751912 untuk gen penyandi 18S rRNA parsial KY751913 dan untuk gen penyandi *ubiquitin* parsial (Gambar 1).

Hasil analisis BLASTn terhadap sekuen 18S rRNA menunjukkan bahwa tidak seluruh sekuen 18S rRNA dari *Pandanus* sp tersejajarkan dengan database di GenBank yang ditunjukkan dengan nilai query cover sebesar 99%. Sekuen 18S rRNA dari *Pandanus* sp memiliki kemiripan dengan beberapa spesies dari genus *Pandanus* dengan nilai *identity* sebesar 99%. Sementara itu, hasil analisis BLASTn terhadap sekuen *ubiquitin* menunjukkan bahwa seluruh sekuen *ubiquitin* dari *Pandanus* sp terpakai dalam analisis BLASTn yang ditunjukkan dengan nilai *query cover* sebesar 100%. Sekuen *ubiquitin* dari *Pandanus* sp memiliki kesamaan dengan sekuen *ubiquitin* dari beberapa tanaman dan alga yang ditunjukkan dengan nilai *identity* sekitar 87%-89% (Tabel 1). Hasil analisis BLASTn dengan nilai *query cover* dan *identity* yang tinggi pada kedua sekuen yang diteliti

menunjukkan bahwa sekuen DNA yang diperoleh pada penelitian ini memang benar merupakan bagian dari gen penyandi 18S rRNA dan *ubiquitin*.

Dendrogram yang diturunkan berdasarkan kedua sekuen tersebut menunjukkan bahwa sekuen DNA penyandi 18S rRNA dari *Pandanus* sp asal Riau membentuk satu kelompok dengan sesama gen penyandi 18S rRNA dari genus *Pandanus*. Begitu pula dengan sekuen DNA penyandi *ubiquitin* dari *Pandanus* sp asal Riau membentuk satu kelompok dengan sesama sekuen DNA penyandi *ubiquitin* dari beberapa tanaman dan alga (Gambar 2). Dendrogram tersebut memperkuat bahwa sekuen DNA dari *Pandanus* sp asal Riau yang diperoleh pada penelitian ini adalah benar bagian dari sekuen DNA penyandi 18S rRNA dan *ubiquitin*.

Analisis ekspresi gen membutuhkan kontrol internal untuk memastikan bahwa besar kecil ekspresi gen target bukan karena *human error* atau *pipetting error*. Gen yang umum dijadikan sebagai kontrol internal adalah gen referensi yang telah divalidasi (Volkov *et al.* 2003; Nicot *et al.* 2005; Jain *et al.* 2006; Banaras *et al.* 2012; Chandna *et al.* 2012; Gantasala *et al.* 2013). Isolasi gen-gen referensi dari *Pandanus* sp asal Riau belum pernah dilaporkan.

Pada penelitian ini, telah berhasil diisolasi sekuen DNA penyandi 18S rRNA dan *ubiquitin* dari *Pandanus* sp asal Riau. Besarnya nilai *identity* antara sekuen 18S rRNA dari *Pandanus* sp asal Riau dengan beberapa aksesi dari genus *Pandanus* tidak mencapai 100% dan ini mengindikasikan bahwa sekuen yang diperoleh pada penelitian ini adalah baru dan belum pernah dilaporkan sebelumnya.

```

> KY751912 | Pandanus sp asal Riau, sekuen gen 18S
rRNA parsial
TCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAAC
AATACCGGGCTCCTAGAGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCC
CTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTA
GTTGGACCTTGGGTTGGGCCGGCCGGTCCGCCTTCGGTGTGCACCGGCCG
TCTCGTCCCTTCTGCCGGCGATGCGCTCCTGGCCTTAACTGCGCCGGGTC
GTGCCTCCGGCGCCGTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGTCAAAGCAAGCC
TACGCTCTGCATACATTAGCATGGGATAACATCATAGGATTTTCGGTCTTA
TTTACGTTGGCCTTCGGGAA

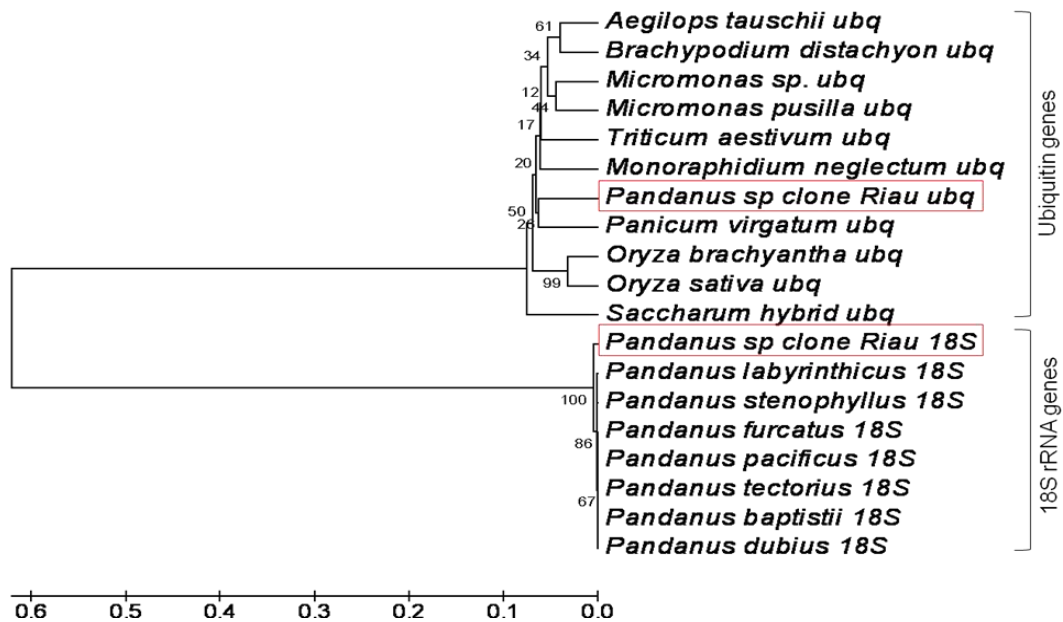
>KY751913 | Pandanus sp asal Riau, sekuen gen
ubiquitin parsial
CTGGTCTCCGCCTTCGAGGTGGCATGCAAATCTTCGTCAAGACTTTGAC
AGGCAAGACCATCACCTCGAGGTGGAGTCTTCCGACACCATTGACAACG
TTAAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGT
CTCATCTTTGCTGGCAAGCAGCTCGAGGACGGGCGCACCCTCGCCGACTA
TAACATCCAGAAGGAATCCACCCTCCAACCTGGTCTCCGCCTTCGAGGTG
GCATGCAAATCTTCGTCAAGACTCTGACAGGCAAGACCATCACCTCGAG
GTGGAGTCTTCCGACACCATTGACAACGTTAAGGCGAAGATCCAGGACAA
GGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTTGCTGGCAAGCAGC
TCGAGGACGGGCGCACCCTCGCCGACTATAACATCCAGAAGGAATCCACC
CTACAACCTGGTCTTCGGCCTTCGAGGTGGCATGCAAATCTTCG

```

Gambar 1. Sekuen gen penyandi 18S rRNA (atas) dan ubiquitin (atas) pada *Pandanus* sp asal Riau.

Tabel 1. Hasil analisis BLAST terhadap sekuen gen penyandi 18S rRNA dan ubiquitin parsial pada *Pandanus* sp asal Riau.

Deskripsi	Skor Maksimal	Skor Total	Query cover	E-value	Nilai Identity	Aksesi
Gen 18S rRNA						
<i>Pandanus baptistii</i>	733	733	99%	0.0	99%	KF298360.1
<i>Pandanus cf. dubius</i>	733	733	99%	0.0	99%	KF298359.1
<i>Pandanus furcatus</i>	733	733	99%	0.0	99%	KF298358.1
<i>Pandanus labyrinthicus</i>	733	733	99%	0.0	99%	KF298357.1
<i>Pandanus pacificus</i>	733	733	99%	0.0	99%	KF298355.1
<i>Pandanus stenophyllus</i>	733	733	99%	0.0	99%	KF298353.1
<i>Pandanus tectorius</i>	733	733	99%	0.0	99%	KF298352.1
Gen Ubiquitin						
<i>Aegilops tauschii</i>	654	3723	100%	0.0	89%	XM_020309243.1
<i>Micromonas sp</i>	641	3192	100%	5e-180	89%	XM_002508129.1
<i>Oryza brachyantha</i>	632	3493	100%	3e-177	88%	XM_006646848.2
<i>Panicum virgatum</i>	616	3608	100%	2e-172	88%	HM209468.1
<i>Oryza sativa</i>	614	3521	100%	7e-172	88%	GQ848039.1
<i>Micromonas pusilla</i>	614	3019	100%	7e-172	88%	XM_003061910.1
<i>Saccharum hybrid</i>	605	2873	100%	4e-169	88%	AF093505.1
<i>Brachypodium distachyon</i>	603	2882	100%	1e-168	87%	NM_001317880.1
<i>Monoraphidium neglectum</i>	598	2862	100%	5e-167	87%	XM_014044992.1
<i>Triticum aestivum</i>	596	2907	100%	2e-166	87%	EU081898.1



Gambar 2. Dendrogram yang dikonstruksi berdasarkan sekuen penyandi 18S rRNA dan ubiquitin. Kalkulasi menggunakan Kimura 2-parameter model and UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) dengan *bootstrap* 1000 kali.

Tidak ada satupun data sekuen DNA penyandi ubiquitin dari genus *Pandanus* yang muncul pada hasil analisis BLASTn. Hal tersebut mengindikasikan bahwa belum pernah ada laporan dan atau belum pernah didaftarkan pada database GenBank mengenai sekuen penyandi ubiquitin dari genus *Pandanus*. Dengan demikian ini adalah sekuen ubiquitin pertama yang pernah dilaporkan dari genus *Pandanus*.

Pada setiap organisme, tingkat kestabilan ekspresi dari *housekeeping gene* bervariasi. Oleh karena itu, sekuen yang diperoleh pada penelitian ini perlu divalidasi untuk keperluannya sebagai kontrol internal pada analisis ekspresi gen di *Pandanus* sp asal Riau. Aman *et al.* (2017) melaporkan bahwa sekuen penyandi 18S rRNA dan β -tubulin pada tanaman *Chenopodium album* adalah yang paling stabil ekspresinya dan telah divalidasi sehingga layak digunakan sebagai kontrol internal. Sementara itu,

Galeano *et al.* (2014) melaporkan bahwa gen ubiquitin dan EF1 alfa adalah yang paling stabil ekspresinya dan telah divalidasi sebagai kontrol internal pada tanaman *Tectona grandis* L.f.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini telah diperoleh sekuen DNA parsial penyandi 18S ribosomal RNA berukuran 420 bp dan ubiquitin berukuran 493 bp. Sekuen 18S rRNA dari *Pandanus* sp memiliki kemiripan sebesar 99% dengan beberapa spesies *Pandanus*. Sekuen ubiquitin dari *Pandanus* sp memiliki kemiripan sebesar 87%-89% dengan sekuen ubiquitin dari beberapa tanaman dan alga hijau. Dendrogram yang diturunkan dari kedua sekuen juga mendukung hasil tersebut bahwa sekuen 18S rRNA dari *Pandanus* sp membentuk satu kelompok dengan sesama sekuen 18S rRNA dari genus *Pandanus*, begitu pula dengan sekuen ubiquitin

dari *Pandanus* sp membentuk satu kelompok dengan sesama sekuen ubiquitin lainnya. Kedua gen tersebut berpotensi sebagai kontrol internal pada analisis ekspresi gen pada *Pandanus* sp asal Riau setelah dilakukan validasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi, Republik Indonesia - Direktorat Jenderal Riset dan Pengabdian Kepada Masyarakat melalui Hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi tahun anggaran 2017 dengan nomor kontrak 489/UN.19.5.1.3/PP/2017. Terima kasih disampaikan kepada LPPM Universitas Riau yang telah memfasilitasi penelitian ini.

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.
- Aman S, Haq NU, Ahmed S, Shakeel SN (2017) Identification and validations of reference genes for gene expression data normalization of *Chenopodium album*. *Int J Agric Biol* 19: 761-770.
- Caldana C, Scheible WR, Mueller-Roeber B, 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.
- Chandna R, Augustine R, Bisht NC (2012) Evaluation of candidate reference genes for gene expression normalization in *Brassica juncea* using real time quantitative RT-PCR. *PLoS ONE* 7(5): e36918. doi:10.1371/journal.pone.0036918.
- Dresios J, Chappell SA, Zhou W, Mauro VP (2006) An mRNA-rRNA base-pairing mechanism for translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* 13: 30–34.
- Elvyra R, Yus Y (2010) Ikan Lais dan Sungai Paparan Banjir di Provinsi Riau. UR Press Pekanbaru, Pekanbaru.
- 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). *BMC Research Notes* 6:312.
- 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.
- 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.
- Pease AA, Davis JJ, Edwards MS, Turner TF (2006) Habitat and resource use by larval and juvenile fishes in an arid-land river (Rio Grande, New Mexico). *Freshwater Biology* DOI:10.1111/j.1365-2427.2005.01506.x.
- Roslim DI (2017) Pandan (*Pandanus* sp), Rotan (*Calamus* sp), and Rengas (*Gluta* sp) from Kajuik Lake, Riau Province, Indonesia. *Brazilian Archives*

- of Biology and Technology 60: e17160419. [*in press*].
- Roslim DI, Nurkhairani P, Herman, Elvyra R (2016a) Identification of durik-durik plant (*Syzygium* sp) using the *psbA-trnH* intergenic spacer and ITS regions. TPGM 3: 11-16.
- Roslim DI, Khumairoh S, Herman (2016b) Confirmation of tuntun angin (*Elaeocarpus floribundus*) taxonomic status using *matK* and *ITS* sequences. Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education 8(3), 392-399.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30: 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- 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.
- Volkov RA, Panchuk II, Schoffl (2003) Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. J Exp Bot 54(391): 2343-2349. DOI: 10.1093/jxb/erg244.
- Zeug SC, Winemiller KO (2008) Relationships between hydrology, spatial heterogeneity, and fish recruitment dynamics in a temperate floodplain river. River Res Applic 24: 90–102. DOI: 10.1002/rra.1061.