

OPTIMASI SUHU ANNEALING PRIMER DEGENERATE UNTUK MENGAMPLIFIKASI FRAGMENT GEN ARGININE DECARBOXYLASE (ADC) GENOM UBI KAYU LOKAL MALUKU TENGGARA

Siti Kurniawati, N. Sri Hartati
Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI
Jl. Raya Bogor KM. 46 Cibinong, Bogor
siti.kurniawati@lipi.go.id

Abstract

Arginine decarboxylase (ADC) is an enzyme that plays a role in polyamine biosynthesis and has been shown to increase resistance to biotic and abiotic stress. Woody oak (*Manihot esculenta* Crantz) is known to grow and produce well in dry and poor nutrient conditions. The purpose of this study was to obtain optimum conditions in PCR reaction process to obtain candidate gene fragment of ADC. Four pairs of primers to amplify the gene fragments of ADC are degenerate from several plants that have been deposited on NCBI databases, namely *Jatropha curcas* (Acc XM_022220421), *Populus trichocarpa* (Acc XM_002306105.2), *Capsicum annuum* cv Nockwang (Acc KC160547.1) and *Lycopersicon esculentum* (Acc L16582.1). The success in amplifying a gene by PCR technique using a specially designed primer is determined by the precision of the primary attachment temperature with the DNA mold. Four primer pairs are designed to successfully amplify DNA sequence fragments from the local cassava genome from Malra, namely Malra012 and Malra016 genotypes. The MeadC1 primary pair can amplify the DNA mold and produce bands of less than 1,000 base pairs at a fixed temperature of 46 ° C, 47 ° C, and 48 ° C. Nucleotide base sequence analysis using primary pair MeadC1 has been done, but based on bioinformatic analysis using NCBI BLAST program, the obtained fragment did not show the encoding fragment of ADC gene.

Keywords : cassava, arginine decarboxylase, AADC

Abstrak

Arginine decarboxylase (ADC) merupakan enzim yang berperan dalam biosintesis poliamin dan telah terbukti dapat meningkatkan ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik. Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) dikenal mampu tumbuh dan berproduksi dengan baik meski pada kondisi kering dan miskin hara. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi optimum pada proses reaksi PCR untuk memperoleh kandidat fragmen gen ADC. Empat pasang primer untuk mengamplifikasi fragmen gen ADC dirancang secara *degenerate* dari beberapa tanaman yang telah terdeposit pada database NCBI yaitu *Jatropha curcas* (Acc XM_012229042.1), *Populus trichocarpa* (Acc XM_002306105.2), *Capsicum annuum* cv Nockwang (Acc KC160547.1) dan *Lycopersicon esculentum* (Acc L16582.1). Keberhasilan dalam amplifikasi suatu gen dengan teknik PCR menggunakan primer yang dirancang khusus sangat ditentukan oleh ketepatan suhu penempelan primer dengan cetakan DNA. Empat pasang primer yang didesain berhasil mengamplifikasi fragmen sekuen DNA dari genome ubi kayu lokal asal Malra yaitu genotipe Malra012 dan Malra016. Pasangan primer MeADC1 dapat mengamplifikasi cetakan DNA dan menghasilkan pita dengan ukuran kurang dari 1.000 pasang basa pada suhu penempelan 46°C, 47°C dan 48°C. Analisis sekuen basa nukleotida menggunakan pasangan primer MeADC1 telah dilakukan, namun berdasarkan analisis bioinformatik menggunakan program BLAST NCBI, fragmen yang diperoleh tidak menunjukkan fragmen penyandi gen ADC.

Kata kunci: ubi kayu, arginine decarboxylase, ADC

Pendahuluan

Teknik rekayasa genetika semakin maju dan banyak diaplikasikan dalam peningkatan kualitas varietas tanaman. Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) sebagai salah satu komoditas tanaman pangan sumber karbohidrat masih memiliki banyak kekurangan dan keunggulan. Kandungan nutrisi ubi kayu relatif kurang jika dibandingkan dengan

sumber karbohidrat lainnya, namun tanaman ubi kayu memiliki keunggulan dari segi ketahanan terhadap cekaman baik biotik maupun abiotik. Tanaman ubi kayu dapat tumbuh dan berproduksi baik pada lahan suboptimum. Salah satu genotipe ubi kayu adaptif terhadap lahan marginal yaitu genotipe ubi kayu lokal Maluku Tenggara (Malra). Wilayah Malra dikenal dengan lahan kering,

berkarang dengan lapisan *topsoil* tipis. Diperlukan usaha yang tinggi dalam budidaya tanaman pertanian atau hanya jenis dan genotipe tertentu yang mampu tumbuh dengan baik di Malra. Ubi kayu genotipe lokal yang tumbuh baik di Malra berpotensi sebagai sumber daya genetik yang dapat dikembangkan lebih lanjut baik sebagai bahan informasi genetik ataupun menghasilkan varietas tanaman unggul.

Arginine decarboxylase (ADC) merupakan enzim yang berperan dalam proses biosintesis poliamin, dan poliamin yang terdiri dari putresin, spermidin dan spermin telah terbukti dapat meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman (Gupta *et al.* 2013). Menurut Kusano *et al.* (2008), poliamin pada tanaman juga berperan dalam banyak proses fisiologis, seperti organogenesis, embryogenesis, inisiasi dan pembungaan, penuaan daun, perkembangan dan pemasakan buah serta respon tanaman ketika terjadi cekaman biotik dan abiotik. Karena perannya yang sangat kompleks, oleh karena itu telah banyak dilakukan penelitian terutama melalui pendekatan molekuler terkait manipulasi biosintesis poliamin. Runutan lengkap basa nukleotida dari genome tanaman *Arabidopsis* telah dipakai sebagai sarana/alat menggunakan pendekatan 'omic' untuk mengidentifikasi gen target yang terlibat dalam jalur sinyal dan biosintesis poliamin (Alcázar *et al.* 2010). Peremarti *et al.* (2010) telah melakukan *cloning* gen ADC dari tanaman padi, Zhao *et al.* (2017), melakukan *cloning* gen SAMDC dari tanaman karet (*Hevea brasiliensis*), namun demikian, informasi mengenai runutan basa nukleotida dan fungsi dari gen ADC pada tanaman ubi kayu masih belum banyak dilakukan. Oleh karena itu sebagai tahap awal, telah dilakukan desain primer untuk memperoleh runutan basa nukleotida pengkode enzim poliamin dari tanaman ubi kayu genotipe lokal Malra.

Reaksi PCR merupakan salah satu bagian dari kegiatan dalam analisis molekuler DNA. Menurut Polz & Cavanaugh (1998), PCR merupakan alat yang sangat berharga karena kecepatan, sederhana dan efisien dalam mengamplifikasi segmen DNA spesifik dari latar belakang genome yang kompleks. Untuk mendapatkan amplifikasi fragmen gen target dalam hal ini gen ADC, maka keberhasilan amplifikasi sangat tergantung pada pemilihan primer yang tepat dan pada saat proses PCR yaitu tahap *annealing* (penempelan) primer pada DNA (Zein & Prawiradilaga, 2013). Optimasi suhu penempelan empat pasang primer *degenerate* dilakukan untuk mendapatkan fragmen gen *arginine decarboxylase* dari cetakan gDNA ubi kayu asal Malra.

Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juni sampai dengan September 2017 di Laboratorium Genetika Molekuler dan Modifikasi Jalur Biosintesa Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong-Bogor.

Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom dari daun muda tanaman ubi kayu dilakukan menggunakan metode yang dikembangkan oleh Doyle & Doyle (1990) yang telah dimodifikasi.

Perancangan Primer Degenerate gen ADC

Perancangan primer diawali dengan mengumpulkan informasi mengenai sekuen gen ADC dari beberapa tanaman yang telah terdeposit pada database *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primer dirancang sebanyak empat pasang. Sekuen yang dipilih berasal dari daerah *coding* DNA *sequence* (CDS) di mana CDS merupakan bagian dari sekuen DNA yang tersusun atas *exon* dan mengkodekan protein tertentu (Twyman, 2003).

Amplifikasi DNA Genome dengan Primer Degenerate ADC

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR dilakukan sesuai dengan prosedur Kurniawati (2013) menggunakan empat pasang primer *degenerate* untuk mendapatkan fragmen gen ADC. Pasangan primer *degenerate* pertama yaitu *MeADC1* (Forward): 5'-ATG CCK GCC YTR GST TGT TG-3' dan *MeADC1* (Reverse): 5'-TCA AGC ASA GTK HMR TAG GA-3'. Pasangan primer *degenerate* kedua yaitu *MeADC2* (Forward): 5'-DTK GGY GGR GGR YTB CA-3' dan *MeADC2* (Reverse): 5'-TCA GGR ATT GWR GTR AAM AS-3'. Pasangan primer *degenerate* ketiga yaitu *MeADC3* (Forward): 5'-DTK GGY GGR YTB CA-3' dan *MeADC3* (Reverse): 5'-WMR MRS ASW KHM RTA GGA YC-3', dan pasangan primer *degenerate* keempat yaitu *MeADC4* (Forward): 5'-ATG CCK GCC YTR GST TGT TG-3' dan *MeADC4* (Reverse): 5'-TCA SCA CAN GAY GGD CCR GG-3'. Optimasi suhu annealing dilakukan mulai dari suhu yang rendah yaitu 40 °C hingga 50 °C selama 45 detik. Proses PCR dilakukan dengan 35 siklus dengan suhu pemanjangan/ekstensi pada 72 °C selama 90 detik.

Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA

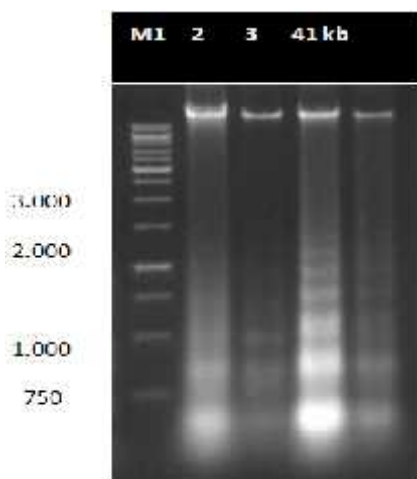
Hasil PCR menggunakan primer *degenerate* divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% pada 1.0x buffer TAE (Tris Acetate Acid-EDTA). Sebanyak 5.0 µl produk PCR dari masing-masing sampel ditambahkan 0.2 µl loading dye dan di-

campur sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam sumur di dalam gel. Untuk menentukan ukuran dari produk PCR disertakan juga DNA standart (1 kb plus ladder universal, KAPPA) sebagai pembanding. Sampel DNA dielektroforesis dengan tegangan 95 volt selama 1 jam 15 menit. Migrasi DNA pada gel agarose, setelah itu diwarnai pada larutan etidium bromide (10 mg L^{-1}) selama 10 menit dan dicuci dengan 1x TAE selama 20-30 menit. Gel agarose kemudian divisualisasi menggunakan alat geldoc.

Hasil dan Pembahasan

Penilaian Kualitas dan Kuantitas DNA

Kualitas masing-masing dari sampel DNA genome daun ubi kayu yang diekstraksi diverifikasi secara spektrofotometri menggunakan instrument NanoDrop dan elektroforesis gel agarose. Visualisasi hasil ekstraksi DNA genom dari daun ubi kayu lokal Malra terdiri dari dua genotipe dapat dilihat pada gambar 1. Genotipe Malra012 dan Malra016 menunjukkan hasil yang baik, terlihat dari pendaran yang kuat dan keutuhan pita DNA genome kedua genotipe pada kedua ulangan sampel. Nilai absorbansi nanodrop berguna untuk mendeteksi kontaminan seperti protein, garam dan polisakarida yang dapat menghambat amplifikasi DNA. Rasio pada pembacaan panjang gelombang 260/280 nm sebesar 1.8 menunjukkan bahwa DNA yang diekstraksi memiliki kemurnian tinggi dengan tidak adanya protein dan fenol (Abdel-Latif & Osman, 2017).



Gambar 1

Elektroforegram gDNA daun ubi kayu genotipe Malra012 (1 dan 2) dan Malra016 (3 dan 4)

Hasil keseluruhan DNA genom berada dalam kisaran $> 1.000 \text{ ng/}\mu\text{l}$ dengan rasio 260/280 sebesar 1.94 - 1.97 (tabel 1). Menurut Pervaiz *et al.* (2011), rasio A260/A280 dengan rentang mulai dari 1.8 hingga 2.0 tidak menunjukkan tingkat kontaminasi yang signifikan.

Tabel 1

Nilai kuantitas DNA genome daun ubi kayu hasil isolasi menggunakan spektrofotometer

No	DNA genome ID	Konsentrasi (ng/μl)	Kemurnian (A260/A280)
1.	Malra012 ul. 1	1.097	1.948
2.	Malra012 ul. 2	1.471	1.972
3.	Malra016 ul. 1	1.888	1.955
4.	Malra016 ul. 2	1.55e	1.912

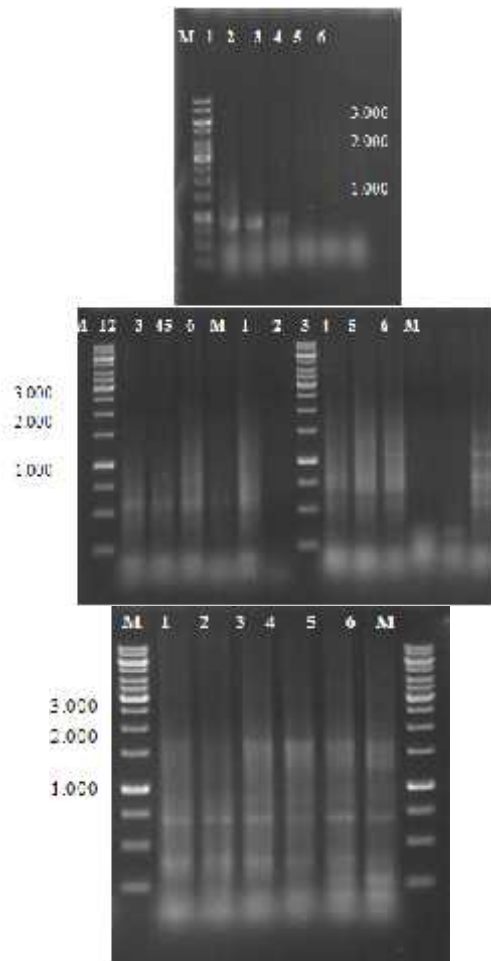
Amplifikasi Fragmen MeADC pada Beberapa Suhu Annealing

Untuk mendapatkan pita atau fragmen gen ADC dari gDNA ubi kayu lokal asal Malra, maka dilakukan amplifikasi PCR menggunakan empat pasang primer *degenerate* yaitu MeADC1, MeADC2, MeADC3 dan MeADC4. Hasil perhitungan Suhu *melting* (T_m dalam $^{\circ}\text{C}$) berdasarkan runutan basa keempat primer dengan dikurangi sebesar $2-5^{\circ}\text{C}$ untuk mendapatkan suhu penempelan primer (T_a), maka dilakukan optimasi suhu penempelan keempat pasang primer berkisar antara $44.0 - 53.9^{\circ}\text{C}$. Keberhasilan amplifikasi sekuen DNA dengan keempat primer ditunjukkan dengan adanya pita yang terdapat pada beberapa suhu annealing untuk keempat pasangan primer (gambar 2).

Pasangan primer MeADC1 dapat mengamplifikasi cetakan gDNA pada beberapa suhu annealing yaitu pada suhu rendah 44.0°C , 46.6°C dan 48.3°C sedangkan suhu annealing di atas 50°C tidak menghasilkan pita. Demikian halnya pada pasangan primer MeADC2, dapat mengamplifikasi cetakan gDNA dengan suhu annealing mulai dari 44.0°C hingga suhu 52.6°C . Pasangan primer MeADC3 menghasilkan banyak pita tidak spesifik pada suhu 53.9°C dan MeADC4 menghasilkan banyak pita pada semua suhu annealing. Suhu annealing yang terlalu rendah, akan pengamplifikasi fragmen DNA yang tidak spesifik, hal ini ditandai dengan munculnya banyak pita (Rychlik *et al.* 1990).

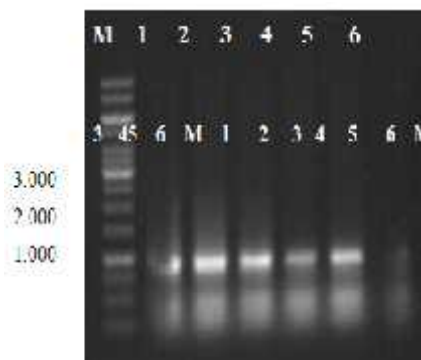
Beberapa pita DNA masih terbentuk dari hasil amplifikasi menggunakan suhu annealing dengan rentang 47.5°C hingga 50°C (gambar 4), meskipun pasangan primer MeADC1 menunjukkan pita yang lebih tajam dan spesifik pada T_a 44.0°C hingga 48.3°C (gambar3), namun hasil yang tidak konsisten terjadi ketika dilakukan pengulangan pada T_a 47°C (gambar 4). Suhu pemanjangan umumnya berkisar antara $70-72^{\circ}\text{C}$ selama $0.5 - 3$ menit tergantung pada besarnya produk PCR yang ditargetkan atau sekitar satu menit cukup untuk

mengamplifikasi runutan basa nukleotida sebesar 2.000 pasang basa (Innis & Gelfand, 1990).



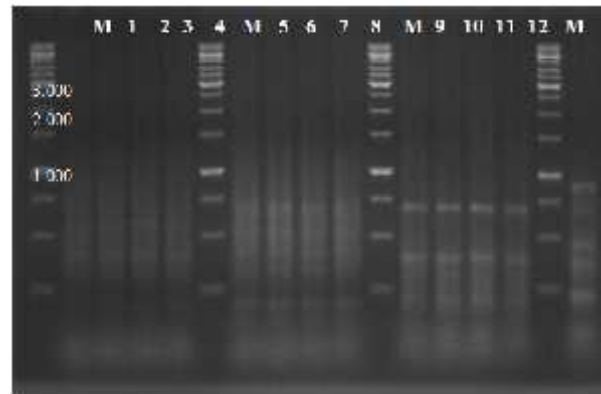
Gambar 2

Elektroforegram hasil optimasi suhu annealing pasangan primer MeADC1 (a), MeADC2 (b), MeADC3 (c) dan MeADC4 (d) pada suhu 44.0 °C (1), 46.6 °C (2), 48.3 °C (3), 50.2 °C (4), 52.6 °C (5) dan 53.9 °C (6), M: 1 kb plus ladder



Gambar 3

Elektroforegram hasil optimasi suhu annealing pasangan primer MeADC1 pada suhu 44.0 °C (1), 45.1 °C (2), 46.2 °C (3), 47.1 °C (4), 48.3 °C (5) dan 48.9 °C (6), M : 1 kb plus ladder

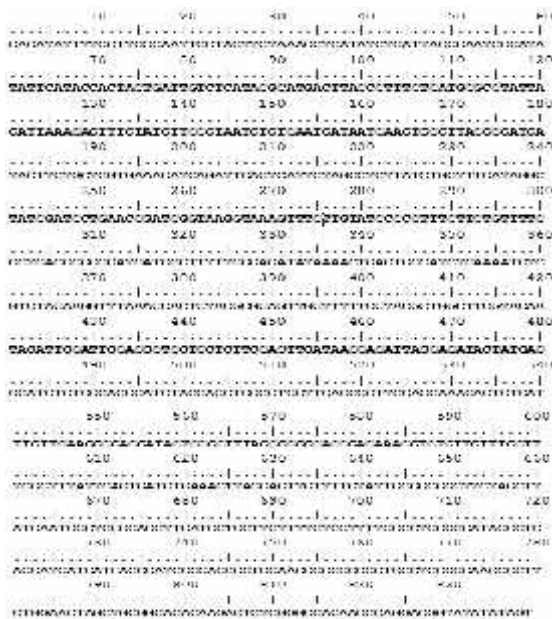


Gambar 4

Elektroforegram hasil optimasi suhu annealing pasangan primer MeADC2 pada suhu 47.5 °C (1), 48.0 °C (2), 48.5 (3), dan 49.0 (4); pasangan primer MeADC3 pada suhu 48.5 °C (5), 49.0 °C (6), 49.5 (7), dan 50.0 (8); dan pasangan primer MeADC4 pada suhu 48.5 °C (9), 49.0 °C (10), 49.5 (11), 50.0 (12), dan pasangan primer MeADC1 pada suhu 47 °C (13), M : 1 kb plus ladder

Berdasarkan beberapa hasil penelitian untuk mendapatkan fragmen gen ADC dari beberapa tanaman menggunakan suhu annealing berkisar lebih dari 50 °C, yaitu 51 °C pada *Poncirus trifoliata* (Wang *et al.*, 2011), 55 °C pada tanaman padi (Peremarti *et al.*, 2010), dan 58 °C pada *Hevea brasiliensis* (Zhao *et al.*, 2017). Belum diperolehnya pita amplifikasi yang spesifik dan tajam menggunakan keempat pasang primer diduga karena suhu annealing yang digunakan masih terlalu rendah sehingga banyak pita amplifikasi yang dihasilkan. Menurut Green *et al.*, (2015) reaksi PCR merupakan reaksi yang sensitif terhadap ketidaksesuaian antara primer dan cetakan, dan ketidakcocokan dapat menyebabkan amplifikasi yang tidak efisien pada daerah cetakan DNA yang ditargetkan.

Pita dengan ukuran terbesar hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer MeADC1 dengan ukuran >1.000 pb yang diperoleh pada suhu annealing 47°C dilakukan analisis penyejajaran (alignment?) runutan basa nukleotidanya menggunakan program BLAST pada database GenBank. Hasil analisis penyejajaran runutan basa nukleotida MeADC1 (gambar 5) tidak menunjukkan kemiripan dengan runutan basa nukleotida penyandi gen ADC tanaman lain yang sudah terdeposit di GenBank.



Gambar 5

Runutan basa nukleotida hasil amplifikasi cetakan gDNA Malra016 yang diperoleh dengan primer MeADC1

Kesimpulan

Amplifikasi sekuen DNA genom ubi kayu asal Malra dengan menggunakan empat pasang primer *degenerate* yang dirancang berdasarkan sekuen gen ADC telah menghasilkan pita DNA hasil amplifikasi. Namun demikian kondisi PCR perlu dioptimasi lebih lanjut untuk memperoleh pita DNA yang spesifik. Hasil analisis penyejajaran runutan basa nukleotida menggunakan program BLAST terhadap fragmen runutan basa nukleotida berukuran < 1000 bp yang diperoleh dengan primer MeADC1 tidak menunjukkan fragmen genpenyandi ADC. Untuk memperoleh fragmen sekuen DNA ubi kayu yang memiliki homologi tinggi dengan gen ADC, Selain optimasi kondisi PCR khususnya suhu annealing baik pada pasangan primer MeADC1 maupun primer lainnya, juga perlu didesain primer lainnya yang memiliki sekuen *consensus clamp* yang lebih panjang dan menurunkan persentase degenerasi nukleotidanya.

Daftar Pustaka

Abdel-Latif, A., G. Osman. (2017). *Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize*. Plant Methods13(1):1-9.

Alcázar, R., T. Altabella., F. Marco., C. Bortolotti., M. Reymond., C. Konez., P. Carrasco., A. F. Tiburcio. (2010). *Polyamines: molecule with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance*. Planta 231:1237-1249.

Doyle, J. J., J. L. Doyle. (1990). *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus. 12:13-15.

Green, S. J., R. Venkatramanan., A. Naqib. (2015). *Deconstructing the polymerase chain reaction: understanding and correcting bias associated with primer degeneracies and primer-template mismatches*. PlosOne 10(5):e0128122.

Gupta, K., A. Dey., B. Gupta. (2013). *Plant polyamines in abiotic stress responses*. Acta Physiol Plant. 35:2015-2036.

Innis, M. A., D. H. Gelfand. (1990). *Optimization of PCRs*. Pp 3-12 in: PCR Protocols (Innis, Gelfand, Sninsky and White, eds.); Academic Press, New York.

Kusano, T., T. Berberich., C. Tateda., Y. Takahashi. (2008). *Polyamines: essential factors for growth and survival*. Planta 228:367-381.

Peremarti, A., L. Bassie., C. Zhu., T. Capell. (2010). *Molecular characterization of the arginine decarboxylase gene family in rice*. Transgenic Res 19:785-787.

Pervaiz, Z., N. Turi., I. Khaliq., M. Rabbani., S. A. Malik. (2011). *Modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants*. Genet Mol Res J. 10:1669-1673.

Polz, M F., C. M. Cavanaugh. (1998). *Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR*. Applied and Environmental Microbiology. 64:3724-3730.

Rychlik, W., W. J. Spencer., R. E. Rhoads. (1990). *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. Nucleic Acids Research 18(21):6409-6412.

Wang, J., P. P. Sun., C. L. Chen., Y. Wang., X. Z. Fu., J. H. Liu. (2011). *An arginine decarboxylase gene PtADC from Poncirus trifoliata confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany 62(8):2899-2914.

Zein, M. S. A., D. M. Prawiradilaga. (2013). *DNA barcoding Fauna Indonesia*. Kencana Press, Jakarta, pp. 9-21.

Zhao, M., H. Liu., Z. Deng., J. Chen., H. Yang., H. Li., Z. Xia., D. Li. (2017). *Molecular cloning and characterization of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rubber tree (Hevea brasiliensis)*. *Physiol Mol Biol Plants*. : 1-11. DOI 10.1007/s12298-017-0417-z