

## OPTIMASI SUHU ANNEALING UNTUK AMPLIFIKASI GEN AKTIN PADA PANDAN (*Pandanus sp*)

### Optimization of Annealing Temperature for Amplification of Actin Gene in Pandan (*Pandanus sp*)

**Larissa Anggisti, Dewi Indriyani Roslim, Herman**

Program S1 Biologi Bidang Genetika Jurusan Biologi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau

Email: dewiindriyaniroslim@gmail.com

[Diterima: April 2018; Disetujui Juli 2018]

#### ABSTRACT

Genes expression information involved in *Pandanus sp.* adaptation in Kajuik Lake sp. to environmental stress is unknown. The genes expression analysis requires the internal control gene such as actin. Actin gene is one of the genes that can be expressed continuously at all stages of plant development. Before obtaining genetic information, it is necessary to isolate and amplify DNA. The purpose of this study was to determine the annealing temperature for actin gene amplification in Pandan (*Pandanus sp.*). The DNA amplification uses two primer pairs with 20 annealing temperatures. The annealing temperatures were calculated based on the mean values of  $T_m$  which were then reduced and added with 5, 4, 3, 2 and 1. The annealing temperature of 53.4 °C ( $T_m +1$ ) yielded single thick clear using. The annealing temperature of 53.4 °C ( $T_m +1$ ) using P\_act\_F / P\_act\_R1 primer pair yielded single, thick and firm DNA band. It was concluded that the annealing temperature for actinin gene amplification in Pandanus sp was 53.4 °C with primer P\_act\_F / P\_act\_R1.

**Keywords:** *Actin gene, Annealing temperatures, PCR*

#### ABSTRAK

Informasi mengenai ekspresi gen-gen yang terlibat dalam adaptasi tumbuhan *Pandanus sp.* dari Danau Kajuik terhadap cekaman lingkungan belum diketahui. Untuk analisis ekspresi gen memerlukan gen referensi yang berfungsi sebagai kontrol internal, salah satunya adalah aktin. Gen aktin merupakan salah satu gen yang dapat diekspresikan secara terus-menerus pada semua tahapan perkembangan. Sebelum mendapatkan informasi ilmiah secara genetika perlu dilakukan isolasi dan amplifikasi DNA. Tujuan dari penelitian ini menentukan suhu *annealing* untuk amplifikasi gen *aktin* pada Pandan (*Pandanus sp.*). Amplifikasi DNA menggunakan dua primer aktin spesifik *Pandanus sp.* dengan 20 suhu *annealing*. Suhu *annealing* yang dioptimasi dihitung berdasarkan nilai rata-rata  $T_m$  dikurangi dan ditambahkan dengan nilai 5, 4, 3, 2 dan 1. Optimasi pada suhu *annealing* 53.4 °C ( $T_m +1$ ) menggunakan pasangan primer P\_act\_F/P\_act\_R1 menghasilkan pita DNA yang tunggal, tebal dan tegas. Disimpulkan, suhu *annealing* untuk amplifikasi gen aktin pada *Pandanus sp* adalah 53.4 °C dengan primer P\_act\_F/P\_act\_R1.

**Kata kunci:** *Gen aktin, Suhu annealing, PCR*

#### PENDAHULUAN

Gen *aktin* merupakan salah satu gen pengendalian internal yang telah banyak digunakan dalam penelitian terkait cekaman lingkungan karena gen *aktin* memiliki tingkat

ekspresi yang stabil pada semua tahapan perkembangan diberbagai jaringan (Chandna *et al.* 2012). Aktin merupakan gen yang diekspresikan terus-menerus untuk menjaga proses-proses dasar seluler (Chandna *et al.* 2012). Keberadaan kontrol internal dalam

analisis ekspresi gen sangat penting serta erat hubungannya dengan interpretasi data yang dihasilkan.

Kontrol internal didalam suatu gen makhluk hidup salah satunya dapat dilakukan dengan suatu tehnik molekuler yaitu teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR merupakan suatu metode enzimatis untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratan. Hasil pemeriksaan PCR dapat membantu untuk mengetahui diagnosa sepanjang pemeriksaan tersebut dikerjakan dengan cara yang benar dan sesuai dengan standar internasional (Yusuf 2010).

Teknik PCR memiliki beberapa tahapan penting, salah satunya yaitu tahap *annealing* (penempelan primer). Suhu *annealing* adalah suhu dimana primer akan menempel pada DNA cetakan. Besarnya suhu *annealing* dapat dihitung berdasarkan nilai *melting temperature* ( $T_m$ ) dari masing-masing primer. Pencarian kondisi optimal dari suhu *annealing* sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas dan sensitifitas produk PCR. Oleh karena itu optimasi suhu *annealing* perlu dilakukan terlebih dahulu untuk memperoleh produk PCR yang sesuai target.

## BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian adalah daun muda *Pandanus* sp., akuades, nitrogen cair, kit isolasi DNA (Qiagen, yang berisi *buffer* AP1, *buffer* P3, *buffer* AW1, *buffer* AW2, dan *buffer* AE), etanol absolut, akuabidestilata ( $dH_2O$ ), 10X TBE (Tris; boric acid; EDTA), *buffer* TE pH 8, komponen PCR (10X *buffer* PCR, 2mM dNTP, 10  $\mu$ M primer *forward*, 10  $\mu$ M primer *reverse*, 5u/ $\mu$ l *Taq* DNA polimerase,  $dH_2O$ , DNA *Pandanus* sp.), 5 $\mu$ g/ml etidium bromida dan gel agarose.

Alat-alat yang digunakan yaitu kotak plastik kecil, tabung reaksi, timbangan digital, gelas beaker, *hot plate*, pipet mikro ukuran 10

$\mu$ l, 200  $\mu$ l dan 1000  $\mu$ l, tip mikro ukuran 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l dan 1000  $\mu$ l, gunting, mesin sentrifus, pH meter, *waterbath*, mesin elektroforesis, mesin PCR, kamera, kulkas/ *freezer*, dan UV transiluminator, mortar dan pastel.

Pengambilan sampel dari Danau Kajuik, Sungai Kampar, Kecamatan Langgam, Kabupaten Pelalawan, Provinsi Riau. Bagian tumbuhan yang diambil adalah daun yang masih muda untuk mempermudah isolasi DNA. Isolasi DNA, elektroforesis dan PCR dilaksanakan di Laboratorium Genetika, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau. Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2016 - Maret 2017.

Isolasi dan elektroforesis DNA **total** menggunakan daun muda tumbuhan *Pandanus* sp. yang diambil sebanyak 0.1 gram. Isolasi DNA total menggunakan *Qiagen mini kit*. Molekul DNA total yang diperoleh kemudian dielektroforesis pada 1% gel *agarose* dalam 1X *buffer* TBE (Tris ; Boric acid ; EDTA pH 8,0) yang mengandung 5 $\mu$ g/ $\mu$ l etidium bromida. Cetakan yang berisi gel dimasukkan ke dalam tanki elektroforesis kemudian sampel DNA yang diperiksa dimasukkan ke dalam masing-masing sumur dengan komposisi 2 ul *loading dye* + 3 ul DNA sampel. Setelah itu divisualisasi di atas sinar ultraviolet.

Optimasi suhu *annealing* dilakukan menggunakan 2 pasang primer (Tabel 1):

P\_act\_F 5'- CAGCTTCTCCTTCATGTCTC-3' (*forward*)

P\_act\_R1 3'- ATGTTGCTATCCAAGCTGTT-5' (*reverse*)

P\_act\_F 5'- CAGCTTCTCCTTCATGTCTC-3' (*forward*)

P\_act\_R23'- GGCACCACACTTTCTACAAT-3' (*reverse*).

Komponen PCR yang digunakan sebanyak 20  $\mu$ l (Tabel 2). Proses PCR meliputi pra-PCR pada 94<sup>0</sup> C selama 5 detik, diikuti 35 siklus yang terdiri dari tiga tahap yaitu: denaturasi pada suhu 94<sup>0</sup>C selama 45 detik, *annealing* disesuaikan dengan suhu masing-masing primer selama 1 menit (Tabel 1), dan *extention* dengan suhu 72<sup>0</sup>C selama 1 menit 30 detik. Tahapan terakhir adalah pasca PCR pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 10 menit.

Tabel 1. Kondisi optimal modifikasi suhu *annealing* primer aktin

Pasangan Primer	Rata-rata Tm (°C)	Ta (°C)									
		Tm-5	Tm-4	Tm-3	Tm-2	Tm-1	Tm+5	Tm+4	Tm+3	Tm+2	Tm+1
P_act_F/P_act_R1	52.4	47.4	48.4	49.4	50.4	51.4	57.4	56.4	55.4	54.4	53.4
P_act_F/P_act_R2	52.8	47.8	48.8	49.8	50.8	51.8	57.8	56.8	55.8	54.8	53.8

(Keterangan : F= primer *forward*, R= primer *reverse*, Tm= *Temperature melting*, Ta= *Temperature annealing*)

Tabel 2. Komponen PCR

Komponen	Konsentrasi akhir	Volume (µl)
10 X <i>buffer</i> PCR	1X	2
2 mM dNTP	0.1 Mm	1
10 µM primer <i>forward</i>	0.4 µM	0.4
10 µM primer <i>reverse</i>	0.4 µM	0.4
5 u/µl <i>Taq polymerase</i>	1 Unit	0.2
DNA <i>Pandanus sp.</i>	30 ng	1
dH <sub>2</sub> O	-	15
Total		20

Elektroforesis produk PCR dilakukan pada 1% gel *agarose* dalam 1X *buffer* TBE (Tris-Borate-EDTA pH 8.0) yang mengandung 5 µg/ml *etidium bromida* sebagai pewarna pita DNA. Kemudian sampel DNA yang diperiksa dimasukkan ke dalam masing-masing sumur dengan komposisi 2 ul *loading dye* + 3 ul DNA sampel. Setelah itu divisualisasi di bawah sinar ultraviolet.

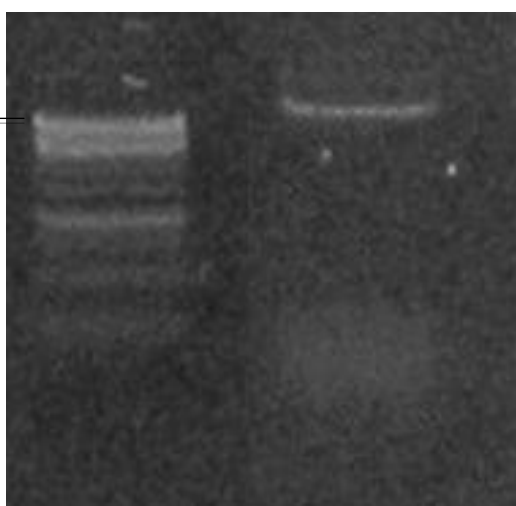
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Molekul DNA total *Pandanus sp.*

Pada penelitian ini diperoleh molekul DNA total *Pandanus sp.* yang berukuran lebih besar dari 10.000 pb dengan kondisi pita utuh, tidak smear dan konsentrasinya sebesar 30 ng/µl. Menurut Irmawati (2003) pita DNA yang tebal menunjukkan konsentrasi yang tinggi.

M 1

10.000 pb



Gambar 1. Molekul DNA total *Pandanus sp.* Keterangan: M= 1 kb DNA Ladder (*ThermoScientific*), 1= DNA total *Pandanus sp.* dari Danau Kajuik Kabupaten Kampar).

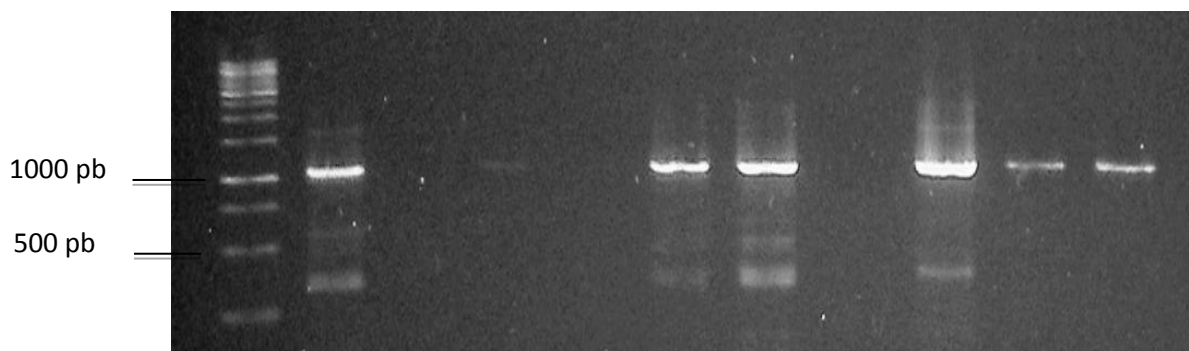
**Optimasi suhu *annealing* untuk amplifikasi gen aktin**

Amplifikasi dengan primer P\_act\_F/P\_act\_R1 dan P\_act\_F/P\_act\_R2 menggunakan 20 suhu *annealing* menghasilkan beberapa Pita DNA antara 350 pb dan 1000 pb (Gambar 2 dan 3).

Suhu *annealing* 47.4 °C, 51.4 °C, 57.4 °C,

dan 55.4 °C dengan primer P\_act\_F/P\_act\_R1 menghasilkan pita DNA yang tebal, utuh dan *smear*. Sementara pada suhu *annealing* 54.4 °C dan 53.4 °C menghasilkan pita DNA yang tunggal, dan tidak *smear*. Akan tetapi, pada suhu *annealing* 54.4 °C pita lebih tipis daripada suhu *annealing* 53.4 °C. Pita yang sangat tipis pada gel disebabkan konsentrasi DNA terlalu rendah (Haris et al., 2003)

M	Tm-5	Tm-4	Tm-3	Tm-2	Tm-1	Tm+5	Tm+4	Tm+3	Tm+2	Tm+1
	47.4	48.4	49.4	50.4	51.4	57.4	56.4	55.4	54.4	53.4

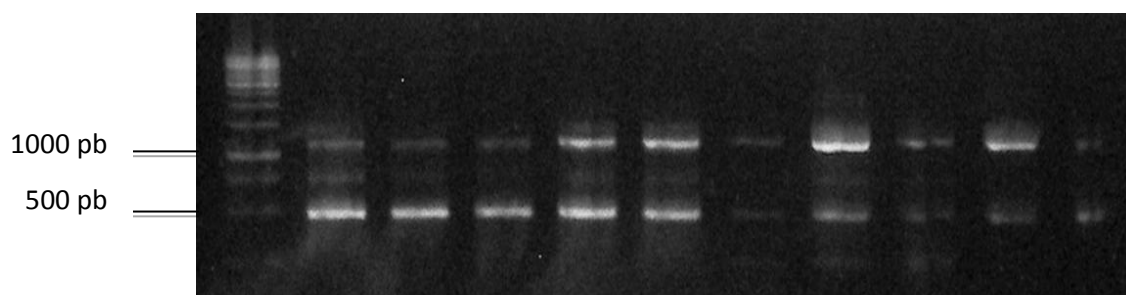


Gambar 2. Hasil optimasi PCR dengan primer P\_act\_F/P\_act\_R1 pada gel *agarose* 1%. Keterangan: (M) 1kb DNA ladder (ThermoScientific).

Primer P\_act\_F/P\_act\_R2 dengan suhu *annealing* 47.8 °C, 48.8 °C, 49.8°C, 50.8°C, 51.8 °C, 56.8°C dan 54.8°C menghasilkan pita DNA yang tebal dan *smear* (Tabel 2). Sementara pita DNA pada suhu *annealing* 57.8°C, 55.8°C dan 53.8°C menghasilkan pita

yang tipis, tidak utuh dan *smear*. Menurut Newton dan Graham (1997) pita DNA yang *smear* salah satu penyebabnya ialah suhu *annealing* yang tidak sesuai sehingga terjadi *mispriming*, yaitu penempelan primer pada tempat yang salah pada DNA cetakan target sehingga dihasilkan produk non target dan target.

M	Tm-5	Tm-4	Tm-3	Tm-2	Tm-1	Tm+5	Tm+4	Tm+3	Tm+2	Tm+1
	47.8	48.8	49.8	50.8	51.8	57.8	56.8	55.8	54.8	53.8



Gambar 3. Hasil optimasi PCR dengan primer P\_act\_F/P\_act\_R2 pada gel *agarose* 1%. Keterangan: (M) 1kb DNA ladder (ThermoScientific).

## KESIMPULAN

Proses isolasi dari Qiagen menghasilkan DNA total yang utuh dan tidak smear yang digunakan sebagai cetakan untuk tahap amplifikasi. Suhu *annealing* 53.4 °C dengan primer P\_act\_F/P\_act\_R1 merupakan suhu yang tepat untuk amplifikasi gen aktin pada *Pandanus sp.* yang menghasilkan pita berukuran ±1200 pb.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DRPM-Dirjen Penguatan Riset dan Pengembangan-Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi RI SIMLITABMAS DIKTI yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Fundamental tahun 2017 atas nama Dr. Dewi Indriyani Roslim, M.Si.

## DAFTAR PUSTAKA

- Chandna R, Augustine R, Bisht NC. 2012. Evaluation of Candidate Referenc 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.
- Graham A, Newton CR. 1997. *PCR(Polymerase Chain Reaction). Ed Ke-2*. New York: Springer Verlag.
- Haris N, Aswidinoor H, Mathius NT, Purwantara A. 2003. Kemiripan Genetik Klon Karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) Berdasarkan Metode Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP). *Menara Perkebunan*. 71 (1) : 1-15.
- Irmawati. 2003. Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok Hatchery [Tesis]. Bogor: IPB
- Yusuf ZK. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek* 5(6): pp.

