



PROSIDING

SEMINAR NASIONAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA III

"Teori dan Aplikasi Sains dalam Isu Globalisasi Lingkungan, Profesionalisasi Pembelajaran dan Kewirausahaan"

Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS

Surakarta, 7 Mei 2011



MAKALAH PENDAMPING

BIOKIMIA
(Kode : F-14)

ISBN : 978-979-1533-85-0

KARAKTERISASI FRAGMENT 0,58 kb GEN PENGKODE STILBEN SINTASE (STS) DARI TANAMAN MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)

Rosyida Azis Rizki¹, Tri Joko Raharjo²

¹Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara Yogyakarta 55281. Email: azies_rizq@yahoo.com

²Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara Yogyakarta 55281. Email: tri_jrarvin@yahoo.com

Abstrak

Resveratrol bermanfaat dalam kesehatan sebagai antikanker dan agen pencegah kanker (cancer chemopreventive). Melinjo (*Gnetum gnemon*) telah diketahui sebagai penghasil resveratrol. Gen pengkode sts pada melinjo dianggap sebagai salah satu target untuk perubahan genetik tanaman penghasil resveratrol. Amplifikasi dilakukan dengan RT-PCR dengan pasangan primer GGF2 (5' AAGGGCATCAAGGAGTGGGG 3') dengan GGR2 (5' CACCAGGATGTGCGATCCAG 3') menghasilkan banyak fragmen dengan salah satu fragmen berukuran 0,58 kb sesuai dengan perkiraan ukuran berdasarkan posisi urutan primer di gen sts yang lain. Hasil sekuensing fragmen hasil RT-PCR (fragmen 0,58 kb) menunjukkan kemiripan dengan urutan DNA gen sts *Arachis hypogaea*, sebesar 67%. Homologi ini lebih tinggi dibandingkan kemiripan urutan antara gen sts yang biasanya berkisar 66%. Dengan demikian penelitian ini telah berhasil mendapatkan urutan DNA fragmen gen sts *Gnetum gnemon*.

Kata Kunci: Gen stilben sintase (sts), RT-PCR, Resveratrol, Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan salah satu masalah kesehatan yang dihadapi dunia pada saat ini. Pengobatan pada kanker biasanya mengkombinasikan pembedahan, radiasi, dan *chemoteraphy* (terapi obat). Selain pengobatan kanker juga dapat di cegah diantaranya dengan menggunakan obat dan suplemen pencegah kanker (*cancer chemopreventive*).

Salah satu senyawa yang banyak menunjukkan anti kanker yang sekaligus dapat berfungsi sebagai kemopreventif adalah senyawa resveratrol [1]. Pemanfaatan resveratrol sebagai senyawa *chemopreventive* terkendala pada ketersediaannya. Untuk mendapatkan beberapa gram resveratrol diperlukan isolasi dari bahan

alami seperti tumbuhan hingga puluhan kilogram dengan proses pemurnian yang relatif panjang dan mahal. Hal ini menjadikan proses isolasi dari tumbuhan menjadi sangat tidak ekonomis.

Salah satu alternatif produksi resveratrol adalah dengan menggunakan pendekatan biologi molekuler. Berdasarkan jalur biosintesis resveratrol diketahui bahwa enzim Stilbene Sintase (STS) merupakan enzim kunci dalam biosintesis. Enzim ini mengkatalisis kondensasi *p*-coumaril-CoA dengan malonil-CoA menghasilkan resveratrol [2].

Gen pengkode *sts* yang dikenal sebagai gen *sts* merupakan gen kunci yang bertanggung jawab terhadap proses biosintesis sehingga jika gen tersebut dapat diklon ke dalam bakteri

Escherichia coli, maka bakteri akan menghasilkan *sts* yang dapat dimanfaatkan untuk katalis biosintesis *in vitro* bahkan kemungkinan bakteri tersebut dapat memproduksi resveratrol.

Di antara tanaman penghasil resveratrol, tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon*) merupakan tanaman yang banyak terdapat di Indonesia. Dalam *Gnetum gnemon* telah ditemukan resveratrol dan turunannya [3].

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah timbangan digital, Waterbath incubator, Mesin PCR, sentrifugase, seperangkat alat elektroforesis, pipet mikro, microwave, laminar flow, lampu UV, DNA sequencer ABI PRISM 310.

Bahan utama yang digunakan adalah daun melinjo (*Gnetum gnemon*), dan primer GGF1(5'GCAACCGTCCCTGGCAATCGC3') dan GGR1 (5' GTTCCACCTGCGAAGCAGCC 3'). Bahan kimia yang digunakan adalah Trizol reagent, Transcriptor first strand cDNA synthesis kit, illustra™ Ready To Go PCR bead, PureLink™ Quick gel extraction kit dan bahan pendukung: isopropanol, kloroform, etanol 75%, agarose, loading buffer, ethidium bromida, DNA marker, RNAse free water, aquadest steril, nitrogen cair, buffer TAE.

Prosedur Penelitian

Isolasi RNA Total Melinjo

Daun melinjo muda 100 mg dengan nitrogen cair digerus dalam mortar dan dimasukkan dalam ke tube 1,5 mL, dilarutkan dengan trizol 1000 µL, divortex dan inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Campuran disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan (800 µL) dipindahkan ke tube yang baru, tambahkan kloroform 200 µL dan digojok dengan tangan selama 10 detik, inkubasi pada suhu kamar

selama 10 menit. Campuran disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan (500 µL) dipindah ke tube yang baru, tambahkan isopropanol 500 µL dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Campuran disentrifuse pada 12.000 rpm selama 15 menit dan supernatan dibuang. Pellet dicuci dengan 1000 µL etanol 75% sebanyak 2 kali, divortex dan disentrifuge pada 7500 rpm selama 10 menit, sisa etanol dikeringkan dalam laminar flow dan pellet RNA total dilarutkan dalam RNAse free water.

RNA total dianalisis kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarose 1 % dalam 100 volt. Analisis kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV pada λ 260 dan 280 nm.

RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

Sebanyak 1 µg RNA total ditambah 1 µL oligo-dT primer, 2 µL random hexamer primer, dan RNAse free water sehingga volume total menjadi 13 µL, tambahkan mineral oil 20 µL dan sentrifuge singkat (spin) selama 10 detik. Campuran template-primer dalam mesin PCR pada suhu 65 °C selama 10 menit, dinginkan dalam *ice bath*. Tambahkan 4 µL transcriptor RT reaction buffer 5X, 2 µL campuran dNTP, 0,5 µL protector RNAse inhibitor dan 0,5 µL transcriptor RT, sehingga volume total 20 µL, dihomogenkan secara hati-hati, spin selama 10 detik. Campuran reaksi di inkubasi pada suhu 25 °C selama 10 menit (suhu kamar), PCR pada suhu 55 °C selama 30 menit dan pada suhu 85 °C selama 5 menit.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Sebanyak 1 butir illustra™ Ready To Go PCR bead dilarutkan dalam RNAse free water 21 µL, tambahkan 1 µL primer forward (GGF2), 1 µL primer reverse (GGR2) , 2 µL template (cDNA) hasil tahap RT-PCR, volume total 25 µL. Campuran didiamkan sampai larut,

dihomogenkan dan spin selama 10 detik, tambahkan mineral oil 25 μ L. Campuran dimasukkan dalam mesin PCR dan direaksikan dengan kondisi denaturasi pada suhu 95 $^{\circ}$ C selama 1 menit, annealing pada suhu 52 $^{\circ}$ C selama 1 menit, polimerisasi pada suhu 72 $^{\circ}$ C selama 2 menit masing-masing sebanyak 35 siklus. Siklus terakhir diperpanjang pada suhu 72 $^{\circ}$ C selama 10 menit.

Hasil amplifikasi dianalisis kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5 % dalam 50 volt.

Isolasi Fragmen RT-PCR

Hasil elektroforesis menunjukkan lebih dari satu fragmen maka fragmen dengan ukuran sesuai ukuran target diisolasi untuk selanjutnya di sekuensing. Fragmen DNA target pada gel dipotong dengan scapel steril, dimasukkan ke mikrotube, ditimbang. Ditambahkan buffer pelarut gel sebanyak 3X volume gel (μ L). Campuran kemudian diinkubasi pada waterbath 50 $^{\circ}$ C selama 10 menit dengan dibolak-balik setiap 3 menit agar gel larut sempurna, inkubasi dilanjutkan 5 menit lagi, tambahkan isopropanol sebanyak 1X volume gel. Larutan gel dimasukkan ke dalam kolom ekstraksi gel yang telah dipasangkan pada *wash tube*, disentrifugasi pada 12.000 g selama 1 menit. Sisa ethidium bromide dibuang, kolom dicuci dengan 600 μ L *wash buffer* yang mengandung etanol, sentrifugasi lagi pada 12.000 g selama 1 menit, buang residu di *wash tube*, sentrifugasi lagi pada 15.000 g selama 2 menit. Buang *wash tube* dan tempatkan kolom pada *recovery tube*. Fragmen DNA dielus dari kolom dengan memipetkan 50 μ L *elution buffer* ke bagian tengah kolom, diinkubasi selama 1 menit pada suhu kamar, sentrifugasi pada 12.000 g selama 1 menit untuk mengelus DNA purified ke *recovery tube*.

Hasil isolasi gel dianalisis kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5 %

dalam 50 volt. Analisis kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV pada λ 260 dan 280 nm.

Sekuensing Fragmen DNA

Sekuensing fragmen DNA menggunakan ABI PRISM 310 Instrument DNA Analyzer, menggunakan Vector NTI (Invitrogen). Pencarian homologi DNA dan protein homology menggunakan BLAST 2.0 dan GeneBank database.

HASIL DAN PEMBAHASAN

RNA total Melinjo diisolasi dari daun muda Melinjo menggunakan pereaksi Trizol kit. Dipilihnya jaringan daun dikarenakan berdasarkan informasi dari gen-gen sejenis pada *Vitis vinifera* ekspresi yang paling besar terdapat di daun sehingga kebanyakan teknis RT-PCR menggunakan sampel RNA daun. Prinsip isolasi total RNA dengan trizol sebenarnya seperti proses isolasi dengan menggunakan fenol-kloroform yang sudah biasa dipakai di laboratorium.

Kuantifikasi RNA total dengan spektrofotometer menunjukkan ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ antara 1,75. Hasil ini menunjukkan bahwa tingkat kemurnian RNA total yang diperoleh terlalu tinggi dan terdapat terkontaminasi protein. Rasio OD₂₆₀/280 diharapkan <1,60. Rendahnya angka hasil (yield) ini dapat disebabkan oleh kontaminasi fase air oleh fase organik, atau resuspensi yang kurang sempurna pada pembentukan pellet RNA. Pellet RNA selanjutnya lebih spesifik disebut sebagai molekul mRNA. Hasil analisis kualitatif total RNA dalam gel elektroforesis agarose 1% pada 100 volt ditunjukkan pada gambar 1.

Proses RT-PCR dilakukan dengan dua tahap, tahap *reverse transcription* (RT) menghasilkan cDNA dan tahap PCR. Kelebihan metode ini yaitu cDNA dari hasil RT dapat digunakan untuk beberapa kali reaksi PCR.

Tahap RT dilakukan dengan menggunakan primer oligoDT dan hexamer. Hal ini menjadikan hasil RT merupakan koleksi lengkap cDNA mRNA yang ada pada daun *Gnetum gnemon* yang terdiri tidak hanya oleh cDNA gen *sts*.

Pada tahap PCR dilakukan dengan menggunakan primer hasil desain yaitu pasangan primer GGF2 dan GGR2. Konsentrasi primer yang digunakan berkisar antara 10-30 pmol, dengan panjang masing-masing primer adalah 20 nukleotida. Panjang oligonukleotida yang digunakan sebagai primer umumnya 18-28 nukleotida dan mempunyai kandungan G + C sebesar 50-60% [4].

Hasil amplifikasi RT-PCR dengan pasangan primer GGF2 dan GGR2, selanjutnya di uji secara kualitatif dengan melakukan elektroforesis pada gel agarose 1,5% yang ditunjukkan dalam gambar 2

Hasil elektroforesis RT-PCR menggunakan primer GGF2 dengan GGR2 menunjukkan banyak fragmen DNA yang muncul, dan tidak menghasilkan fragmen tunggal. Namun yang digunakan dalam DNA target yaitu fragmen tunggal pada kisaran 580 bp. Primer yang digunakan merupakan primer yang spesifik untuk amplifikasi gen *sts*. Namun pada beberapa kasus seringkali primer dapat mengamplifikasi fragmen DNA, meskipun belum melekat secara sempurna pada cetakan target. Hal ini terjadi jika suhu amplifikasi telah sesuai dengan suhu annealing primer. Oleh karena itu, langkah selanjutnya adalah mengisolasi fragmen DNA target hasil PCR untuk sekuensing.

Isolasi fragmen hasil PCR menggunakan PureLink™ Quick gel extraction kit. Hasil purifikasi divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarose 1,5% untuk mengetahui kualitas DNA murni yang dihasilkan dari isolasi fragmen RT-PCR, dan berdasarkan hasil elektroforesis didapatkan fragmen tunggal untuk DNA target

yang dapat langsung disekuensing. Hasil isolasi fragment DNA target ditunjukkan dalam gambar 3

Hasil menunjukkan kemurnian tinggi fragmen hasil isolasi yang ditunjukkan dengan fragmen tunggal. Fragmen DNA hasil isolasi selanjutnya disekuensing.

Sekuensing dilakukan dengan menggunakan metode Dye ddNTP terminator dengan pemisahan fragmen menggunakan metode capillary electrophoresis. Fragmen (hasil PCR dengan GGF2 dan GGR2) disekuensing dengan menggunakan primer GGF2, dan primer GGR2. Fragmen disekuensing dengan satu primer mengingat metode *capillary* elektroforesis dapat mensekuen sampai 800 pb dalam sekali reaksi sehingga baik fragmen I (580 pb) masih dapat disekuensing dalam sekali reaksi dengan satu primer.

Hasil pembacaan sekuensing untuk fragmen gen *sts Gnetum gnemon* ditunjukkan pada gambar 4.

Untuk memastikan bahwa fragmen hasil PCR merupakan bagian gen *sts Gnetum gnemon* maka dilakukan studi homologi fragmen hasil tersebut dengan urutan gen *sts Arachis hypogaea* L00952. Hasil *alignment* ditunjukkan pada gambar 4.

Hasil sekuensing terhadap fragmen dengan primer GGF2 menghasilkan 270 pb. Aligment urutan hasil sekuensing fragmen terhadap urutan nukleotida gen *sts Arachis hypogaea* L00952 menunjukkan bahwa sekuensing fragmen mempunyai kemiripan dengan daerah depan gen yang merupakan posisi target amplifikasi gen. Untuk fragmen II didapatkan nilai homologi urutan yang mencapai 67% terhadap *Vitis vinifera* DQ459351. Berdasarkan data-data tersebut maka diyakini bahwa fragmen tersebut merupakan hasil amplifikasi RT-PCR total RNA *Gnetum gnemon* merupakan bagian gen *sts* dari *Gnetum gnemon* dan sekuensing yang dihasilkan

merupakan bagian urutan gen *sts Gnetum gnemon*.

KESIMPULAN

Pasangan primer GGF2 (5' AAGGGCATCAAGGAGTGGGG 3') dengan GGR2 (5' CACCAGGATGTGCGATCCAG 3') dapat mengamplifikasi fragmen gen *sts* dengan ukuran 580 pb.

Urutan DNA Fragmen gen *sts gnetum gnemon* mempunyai kemiripan dengan urutan DNA gen *sts Vitis vinifera* DQ459351 sebesar 67%.

Penelitian telah berhasil mendapatkan urutan DNA fragmen gen *sts Gnetum gnemon* dengan primer GGF2.

DAFTAR RUJUKAN

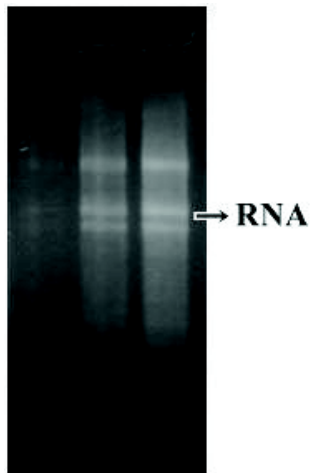
[1] Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong H H. S., Farnsworth N R., Kinghorn A. D, Mehta R G., Moon RC., Pezzuto JM. ,1997, *Cancer Chemopreventive Activity Of Resveratrol, A Natural Product Derived From Grapes. Science*, 275 (5297), 218–220.

[2] Gorham, J. 1995, *The Biochemistry Of The Stilbenoids*, Chapman & Hall, London

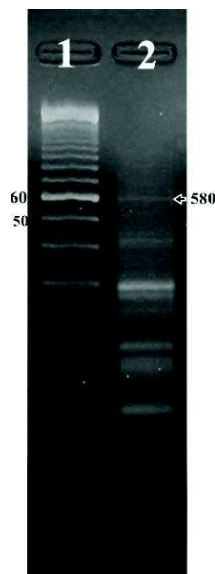
[3] Iliya, I, Ali, Z, Tanaka, T, Iinuma, M, Furusawa, M, Nakaya, K, Murata, J, Darnaedi, D, Matsuura, N, dan Ubukata, M ,2003, *Stilbene Derivatives from Gnetum gnemon* Linn. *Phytochemistry*, 62: 601-606

[4] Gelfand, D.H, and White, T.J, 1990, *Thermostable DNA Polymerases*. In: innis, M. A., Gelfand,D.H., Sninsky J.J, and White, T.J.(eds.). *PCR Protocols.a Guide to Methods and Applications*. Academic press. Inc. san diego.p.18.

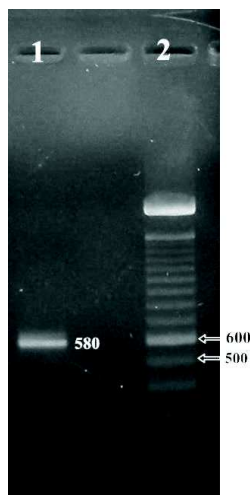
LAMPIRAN



Gambar 1. Elektroforesis gel agarose RNA total daun melinjo



Gambar 2. Hasil elektroforesis RT-PCR dengan primer GGF2 dan GGR2 (2), DNA marker (1). Semua angka menunjukkan ukuran dalam bp.



Gambar 3. Hasil elektroforesis isolasi fragmen RT-PCR dengan primer GGF2 dan GGR2 (2), DNA marker (1). Semua angka menunjukkan ukuran dalam bp.

TAAACAGGGGGCTCAAATCTTTTCTACCCTGAGGGCCCCAAATCATAAGATGCCTATGACATAACA
 GCAAGTAGTTAGTAATCATGATAACCAATTGTCACCCTTAAACATGGATTTCTGGGTTCGATGGTCTCTCT
 CTTTTCTAGCCCTCCCGGGCCCCCTTTTATTTGCCTTTGACATCTCCTCTTCTCCTCTTTAGTATCGTGA
 TACCTAAATGGTTCATTCAACCTGCTCTATAACTTCATTTATAAACACTCTCTCATCCTT

Gambar 4. Urutan DNA hasil sekuensing fragmen GGF2

Homologi Fragmen

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

L00952Arachis      ATGGTGTCTGTGAGTGAATTTCGCAAGGTTCAAAGGGCAGAAGGTCCAGCAACTGTATTG 60
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      GCAATTGGAACAGCAAATCCACCGAACTGTATTGATCAGAGTACATATGCAGATTATTAT 120
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      TTTAGAGTAACCAATAGCGAACACATGACTGATCTCAAGAAGAAATTCAGCGCATCTGT 180
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      GAGAGAACACAGATCAAGAACAGACATATGTACTTAACAGAAGAGATACTAAAAGAAAAT 240
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      CCTAACATGTGTGCATACAAGGCACCGTCATTGGATGCAAGAGAAGACATGATGATCAGG 300
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      GAGGTACCAAGAGTTGAAAAGAGGCTGCAACCAAGGCCATCAAGGAATGGGGCCAGCCA 360
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      ATGCTAAGATCACACATTTGATCTTCTGCACCACCAGCGGCTTGCCTGCGCTGGCGTT 420
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      GATTACGAACTCATCGTACTTTTAGGGCTGGACCCATGCGTCAAGAGGTACATGATGTAC 480
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      CACCAAGGTTGCTTCGCTGGTGGCACTGTCCTTCGTTTGGCTAAGGACTTGGCTGAAAAC 540
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      AACAAGGATGCTCGTGTACTTATCGTTTGTCTGAGAATACCGCAGTCACTTTCGCGGTT 600
FRAGMEN II
-----TAAACAGGGGGCTCAAATCTTTTCTACC
* * * * *
L00952Arachis      CCTAGTGAGACAGACATGGATAGTCTTGTAGGACAAGCATTGTTTGCCGATGGAGCTGCT 660
FRAGMEN II
CTGAGGGCCCCAAATCATAAGATGCCTATGACATAACAAGTCAAGTAGTTAGTAATCAT 88
* * * * *
L00952Arachis      GCGATTATCATTGGTTCTGATCCTGTGCCAGAGGTTGAGAAGCCTATCTTTGAGCTTGT 720
FRAGMEN II
G----ATAACCAATGTTCACCCTTAAACATGGATTTCTGGGTTCGATGGTCTCTCTCTTT 143
* * * * *
L00952Arachis      TCGACCGATCAAAAACCTTGTCCCTGGCAGCCATGGAGCCATCGGTGGTCTCCTTCGTGAA 780
FRAGMEN II
TCTAGCCCTCCCGGGCCCCCTTTTATTTGCCTTTGACATCTCCTCTTCTCCTTTAGT 203
* * * * *
L00952Arachis      GTTGGACTTACATTCTATCTTAAACAAGAGTGTTCCTGATATTATTTTCGCAAAATATCAAT 840
FRAGMEN II
ATCGTGATACCTAAATGGTTCATTCACCTGCTCTATAACTTCATTTATAAACACTCTCT 263
* * * * *
L00952Arachis      GACGCGCTCAATAAAGCTTTTGATCCATTGGGTATTTCTGATTATAACTCAATATTTTGG 900
FRAGMEN II
CATCCTT-----
* *
L00952Arachis      ATTGCACATCTGGTGGGCGTGCAATTTTGGACCAGGTTGAACAGAAGGTGAAGTGAAG 960
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      CCAGAGAAGATGAAAGCCACTAGAGATGTGCTTAGCAATTATGGTAACATGTCAAGTGCC 1020
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      TGTGTGTTCTTCATTATGGATTGATGAGGAAGAGGCTCTTTGAAGAAGGACTTAAAAC 1080
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      ACCGGAGAAGGACTTGATTGGGGTGTGCTTTTGGCTTTGGTCTGGTCTCACTATTGAA 1140
FRAGMEN II
-----

L00952Arachis      ACTGTCGTTCTCCGAGTGTGGCCATATAA 1170
FRAGMEN II
-----
  
```

Gambar 5. Hasil alignment (perbandingan urutan) DNA fragmen hasil RT-PCR dengan gen *sts* *Arachis hypogaea* L00952.