



SEKUEN DNA PARSIAL DARI GEN *GAPDH* PADA SIRSAK (*Annona muricata* L.)

PARSIAL DNA SEQUENCE OF *GAPDH* GENE ON SOURSOP (*Annona muricata* L.)

Dewi Indriyani Roslim*, Hastini Asih, Herman

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Riau, Kampus Bina Widya,
Jl HR Soebrantas Km 12,5, Panam, Pekanbaru 28293, Riau, Indonesia

*Corresponding author: dewiindriyaniroslim@gmail.com

Naskah Diterima: 2 Januari 2020; Direvisi: 19 Maret 2019; Disetujui: 8 Juni 2020

Abstrak

Gen *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) merupakan salah satu gen referensi yang sering bertindak sebagai kontrol internal pada analisis ekspresi gen di beberapa spesies tumbuhan. Penelitian ini bertujuan menganalisis sekuen gen *GAPDH* parsial pada sirsak (*Annona muricata* L.). Metode meliputi persiapan sampel tanaman, isolasi DNA total menggunakan *Genomic DNA mini kit Plant (Geneaid)*, amplifikasi gen *GAPDH* dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), elektroforesis pada 1% gel agarose dan analisis data sekuen DNA. Studi ini telah memperoleh sekuen DNA dari gen *GAPDH* parsial sirsak sepanjang 961 pb. Sekuen tersebut memiliki kemiripan sekitar 68,93–84,35% dengan sekuen mRNA gen *GAPDH* pada beberapa spesies tumbuhan. Sekuen ini diprediksi terdiri dari 5 ekson dan 4 intron. Total ekson diprediksi terdiri dari 429 pb. Sekuen ini adalah yang pertama kali dilaporkan dari genus *Annona* dan juga dari famili *Annonaceae*. Sekuen ini dapat dimanfaatkan untuk analisis ekspresi gen pada sirsak dan dapat menjadi dasar untuk mengisolasi gen *GAPDH* spesies lain di dalam genus *Annona* dan famili *Annonaceae*.

Kata kunci: *Annona muricata* L.; Gen *GAPDH*; Gen referensi; Kontrol internal; PCR

Abstract

GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) gene is one of reference genes that is frequently became an internal control in any plant species. This study reports a DNA sequence of parsial *GAPDH* gene on soursop (*Annona muricata* L.). Methods included sample preparation, total DNA isolation using *Genomic DNA mini kit Plant (Geneaid)*, amplification of *GAPDH* gene using PCR (*polymerase chain reaction*) technique, electrophoresis using 1% agarose gel and data analysis. This study had been obtained the DNA sequence of soursop partial *GAPDH* gene sizing 961 bp. The sequence had 68.93–84.35% similarity to *GAPDH* mRNA of some plants species. The soursop partial *GAPDH* gene was predicted consisting of 5 exons and 4 introns. The total exons length was 429 bp. The sequence is the first reported from *Annona* genus and also *Annonaceae* family. The sequence can be used for gene expression in soursop and also can be used to isolate *GAPDH* gene of other species in *Annona* genus and *Annonaceae* family.

Keywords: *Annona muricata* L.; *GAPDH* gene; Internal control; PCR; Reference gene

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v13i2.13964>

PENDAHULUAN

Sirsak (*Annona muricata* L.) atau nangka belanda merupakan tumbuhan dari famili *Annonaceae* yang banyak tumbuh di negara tropis dan subtropis pada ketinggian sampai 1.200 meter di atas permukaan laut. Tumbuhan ini berbunga dan berbuah sepanjang tahun. Daging buah segar berwarna putih dan mengandung 55–170 biji berwarna hitam. Bagian-bagian tumbuhan ini berupa daun, bunga, buah, batang, kulit kayu, bubur kertas, dan akarnya dapat dijadikan obat untuk menyembuhkan berbagai penyakit (Pinto & de Q, 2005; Moghadamtousi et al., 2015a; Wahab, Jantan, Haque, & Arshad, 2018).

Air rebusan daun sirsak dapat digunakan untuk mengobati penyakit diabetes, insomnia, sakit kepala, rematik, neuralgik, abses, peradangan, diare, disentri, kanker, dan infeksi parasit. Potensinya untuk mengobati berbagai penyakit tersebut tidak terlepas dari adanya berbagai senyawa kimia dari kelompok alkaloid, *annonaceous acetogenin*, megastigmane, *flavonol triglycoside*, *phenolic* dan *cyclopeptide* yang terkandung di dalam sirsak. Kelompok senyawa *annonaceous acetogenin* berperan mengobati berbagai penyakit kanker seperti kanker hati, payudara dan usus. Aksinya sebagai antikanker lebih baik dan lebih efektif dibandingkan dengan terapi dengan senyawa kimia sintetis (Coria-Teñe, Montalvo-Gonzalez, Yahia, & Obledo-Vázquez, 2018; Moghadamtousi et al., 2015b; Wahab et al., 2018).

Untuk memahami mekanisme yang mendasari aksi biologi dari senyawa obat tersebut, perlu dilakukan analisis ekspresi gen. Studi ekspresi gen dapat dilakukan salah satunya dengan teknik *quantitative real time polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Teknik tersebut membutuhkan gen referensi sebagai kontrol internal, seperti gen penyandi aktin, ubikuitin, tubulin, gliseraldehid dehidrogenase, faktor pemanjangan translasi (EF1-alfa), RNA ribosomal dan histon 3 (Pickart & Eddins, 2004; Zhang, Du, Xu, Zhang, & Li, 2010; Sirover, 2011; Kozera & Rapacz, 2013; Niu et al., 2015; Pabuayon et al., 2016; Singh et al., 2018).

Gen penyandi *gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase* (GAPDH) adalah salah satu gen referensi yang terdapat di dalam genom sel

eukariot dan sudah sering digunakan sebagai kontrol internal dalam uji ekspresi gen tertentu. Gen *GAPDH* dikenal luas sebagai enzim glikolitik. Namun, terdapat beberapa fungsi gen ini yang ditemukan tidak berhubungan dengan glikolisis, seperti inisiasi apoptosis, transkripsi gen yang terlibat dalam jalur antiapoptotik, proliferasi sel, dan regulasi panjang telomer (Kosova, Khodyreva, & Lavrik, 2017). Sampai saat ini belum ada gen referensi yang dilaporkan dari sirsak. Sebagai langkah awal perlu dilakukan isolasi satu gen referensi, yaitu gen *GAPDH*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menganalisis sekuen gen *GAPDH* parsial pada sirsak.

MATERIAL DAN METODE

Bahan yang digunakan adalah daun di bagian pucuk dari tanaman sirsak yang ditumbuhkan dari biji untuk keperluan isolasi DNA total. Pasangan primer yang digunakan adalah *GAPDH_F* = 5'-AAC CGG TGT CTT CAC TGA CAA GGA-3' dan *GAPDH_R* = 5'-GCT TGA CTT GCT GTC ACC AAC AAA-3' (Gantasala et al., 2013). Pasangan primer ini telah digunakan untuk mengamplifikasi gen *GAPDH* pada tumbuhan durik-durik (*Syzygium* sp.) (Roslim et al., 2018).

Isolasi DNA total sirsak dilakukan menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Plant) Geneaid*. Sebanyak 0,1 g sampel daun sirsak segar yang sudah dipotong-potong kecil dimasukkan ke dalam mortar, lalu ditambahkan nitrogen cair secukupnya, kemudian digerus hingga berbentuk serbuk. Setelah sampel halus dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL lalu dilakukan isolasi DNA total sesuai dengan instruksi pabrik (*Geneaid*). Sebanyak 400 µL *buffer* GPX1 ditambahkan RNase sebanyak 5 µL, dan diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit. Tabung dibolak-balik setiap 3 menit sekali. Selanjutnya, ditambahkan *buffer* GP2 sebanyak 100 µL dan dimasukkan ke dalam wadah berisi es selama 3 menit. Sampel dimasukkan ke dalam *filter column* dan *collection tube* yang telah dirakit lalu dihomogenkan menggunakan sentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 1000 x g. *Filter column* dibuang dan supernatan pada *collection tube* dipindahkan ke dalam tabung 1,5 mL kemudian ditambahkan *buffer* GP3

sebanyak 1,5 volum dari supernatan yang diperoleh dan dibolak-balik hingga campuran menjadi homogen. Larutan yang telah tercampur diambil 700 μL , kemudian dimasukkan ke dalam rakitan GD *column* dan *collection tube*, selanjutnya dihomogenkan menggunakan sentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 x g. Supernatan dibuang dan GD *column* dipasang kembali dengan *collection tube*, lalu sisa larutan dimasukkan ke dalam GD *column* dan dihomogenkan menggunakan sentrifus kembali selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 x g. Supernatan dibuang dan GD *column* dipasang kembali dengan *collection tube*. Tahap selanjutnya dimasukkan *buffer* W1 sebanyak 400 μL ke dalam GD *column* kemudian dihomogenkan menggunakan sentrifus selama 30 detik dengan kecepatan 13.000 x g. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan larutan *wash buffer* sebanyak 600 μL ke dalam GD *column*, lalu dihomogenkan menggunakan sentrifus selama 30 detik dengan kecepatan 13.000 x g. Supernatan dibuang dan GD *column* ditempatkan kembali pada *collection tube*, lalu dihomogenkan menggunakan sentrifus dengan kecepatan 13.000 x g selama 3 menit bertujuan untuk mengeringkan matriks. Tahap terakhir adalah ditambahkan *elution buffer* sebanyak 70 μL ke dalam GD *column* yang telah dipindahkan ke tabung 1,5 mL yang steril, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit dan dihomogenkan menggunakan sentrifus sebanyak 2 kali dengan kecepatan 13.000 x g selama 1 menit. Larutan DNA total yang diperoleh kemudian disimpan pada suhu 4 °C.

Keberhasilan isolasi DNA diperiksa menggunakan teknik elektroforesis. Elektroforesis dilakukan pada 1% gel agarosa dengan larutan penyangga berupa 1x TBE pH 8, pada tegangan 50 voltase selama 20 menit. Sebelum *loading* pada sumur gel, sebanyak 2 μL larutan DNA total dicampur dengan 2 μL 3x-*loading dye* di atas parafilm. Sebagai DNA standar digunakan 1 kb DNA *ladder* (Thermo Scientific).

Amplifikasi gen GAPDH dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) pada mesin *thermal cycler* (Hercuvan). Komponen PCR yang digunakan mengikuti Roslim et al. (2018), yaitu 1x buffer PCR

(+Mg²⁺) (Thermo Scientific), 0,2 mM dNTPs (Thermo Scientific), 2,4 μM primer GAPDH_F, 2,4 μM primer GAPDH_R, 2U *dreamTaq DNA polymerase* (Thermo Scientific), 1 μL DNA total sirsak dan ddH₂O untuk menggenapkan volume PCR menjadi 50 μL . Program PCR meliputi: pra-PCR pada suhu 94 °C selama 5 menit, 35 siklus yang terdiri dari tiga tahap, yaitu denaturasi pada suhu 94 °C selama 45 detik, penempelan primer pada suhu 55 °C selama 45 detik dan elongasi dengan suhu 72 °C selama 1 menit 30 detik, pasca PCR pada suhu 72 °C selama 10 menit (Roslim et al., 2018). Produk PCR dimigrasikan pada 1% gel agarosa untuk menentukan keberhasilan PCR. Produk PCR sebanyak 40 μL , primer GAPDH_F dan GAPDH_R masing-masing sebanyak 30 μL kemudian dikirim ke PT Genetika Science Indonesia di Jakarta untuk diteruskan ke 1st Base Malaysia untuk disekuensing.

Data sekuen DNA dianalisis menggunakan program BioEdit (Hall, 1999), BLASTn (Altschul et al., 1997), dan MEGA6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013). Sebanyak 11 sekuen dari hasil analisis BLASTn pada situs <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> diunduh untuk keperluan pembuatan dendrogram menggunakan program MEGA6. Program primer3 pada situs <http://primer3.ut.ee/> (Untergasser et al., 2012; Koressaar et al., 2018) digunakan untuk merancang primer GAPDH sirsak berdasarkan sekuen DNA yang diperoleh.

HASIL

Profil Produk PCR

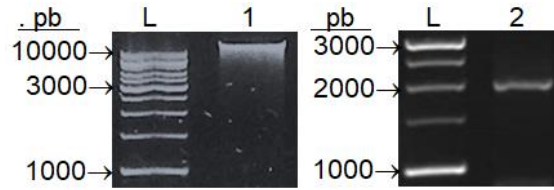
Molekul DNA total sirsak yang berhasil diamplifikasi berukuran 2.000 pb (Gambar 1). Produk PCR tersebut cukup tebal untuk keperluan sekuensing. Sekuensing dilakukan dua arah, namun karena produk PCR terlalu panjang, hasil yang diperoleh tidak utuh sepanjang 2.000 pb. Hasil sekuensing diperoleh 961 pb yang di analisis selanjutnya.

Analisis Sekuen DNA Parsial dari Gen GAPDH pada *Annona muricata*

Analisis BLASTn pada sekuen DNA parsial dari gen GAPDH *A. muricata* menunjukkan bahwa sekuen DNA parsial dari gen GAPDH sirsak memiliki kemiripan sekitar

68,93–84,35% dengan sekuen mRNA dari gen *GAPDH* pada beberapa spesies tumbuhan (Tabel 1). Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa sekuen *GAPDH* *A. muricata* belum tersedia di *database GenBank*

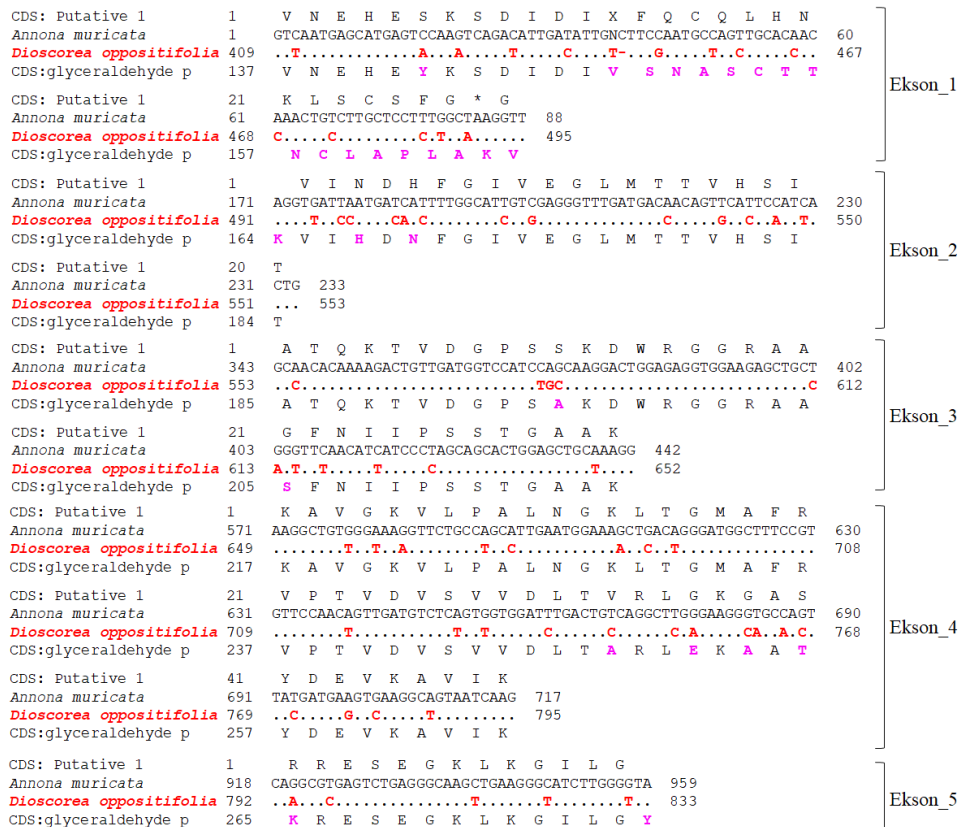
dan belum pernah dilaporkan sebelumnya. Sekuen *GAPDH* *A. muricata* yang diperoleh pada penelitian ini merupakan yang pertama kali dilaporkan dari spesies ini dan juga dari famili *Annonaceae*.



Gambar 1. Profil pita DNA total dan produk PCR gen *GAPDH* sirsak (L) 1 kb *DNA Ladder* (*Thermo Scientific*). (1) Pita DNA total, (2) Pita produk PCR

Tabel 1. Analisis BLASTn pada sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH* sirsak

Spesies	Famili	Query cover (%)	E-value	Kemiripan (%)
<i>Papaver alpinum</i>	<i>Papaveraceae</i>	51	6e-46	71,92
<i>Meconopsis horridula</i>	<i>Papaveraceae</i>	40	6e-46	72,06
<i>Meconopsis henrici</i>	<i>Papaveraceae</i>	40	6e-46	72,06
<i>Agave murpheyi</i>	<i>Asparagaceae</i>	52	8e-45	72,54
<i>Meconopsis horridula</i>	<i>Papaveraceae</i>	57	8e-45	69,11
<i>Agave americana</i>	<i>Asparagaceae</i>	52	3e-44	71,79
<i>Meconopsis horridula</i>	<i>Papaveraceae</i>	40	9e-44	71,53
<i>Meconopsis simplicifolia</i>	<i>Papaveraceae</i>	40	9e-44	70,66
<i>Meconopsis superba</i>	<i>Papaveraceae</i>	44	9e-44	71,36
<i>Dioscorea oppositifolia</i>	<i>Dioscoreaceae</i>	45	5e-35	84,35
<i>Salvia mellifera</i>	<i>Lamiaceae</i>	59	2e-33	68,93

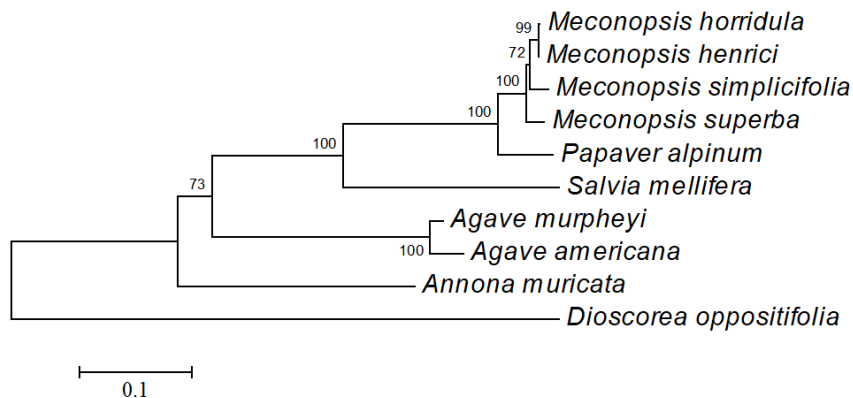


Gambar 2. Pensejajaran sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH* *Annona muricata* dengan sekuen mRNA *GAPDH* *Disocorea oppositifolia*

>*Annona muricata*

GTCAATGAGCATGAGTCCAAGTCAGACATTGATATTGNCTTCCAATGCCA
GTTCACACAACAACTGTCTTGCTCCTTTGGCTAAGGTTTGCCTGAATA
AAATATGTTCTGTTAATCAATTCATGTGAGGAAGATGGTGTGTTAATTTT
CACTCTTCTGGATATCGTACAGGTGATTAATGATCATTTTGGCATTGTCG
AGGGTTTGATGACAACAGTTTCATTCCATCACTGGTAAGCACTGCTTTTAT
TGTGTAGATGTAATTAACACTATTAAGTGGCCGTGGTTATGTTGGGGTC
TGCTCTCTCGTGATATGCTCTTATATTTCGTCTTGGGTTTCAGCAACACA
AAAGACTGTTGATGGTCCATCCAGCAAGGACTGGAGAGGTGGAAGAGCTG
CTGGGTTCAACATCATCCCTAGCAGCACTGGAGCTGCAAAGGTATTTATT
CAGAGAGAATGGGTCTCATGAAGGAGTCCCTTGTGGGTATACTTTGTGCT
GGGAGAGATCATTATGCAGGAGCTATCATATAATTATTTTGTCTTACTT
TTCTGATCTTGTCTATCTTGAAGGCTGTGGGAAAGGTTCTGCCAGCATTG
AATGGAAAGCTGACAGGGATGGCTTTCCGTGTTCCAACAGTTGATGTCTC
AGTGGTGGATTTGACTGTCAGGCTTGGGAAGGGTGCCAGTTATGATGAAG
TGAAGGCAGTAATCAAGTATGAATACTTCATTCTCTCTATTTTCATTTGTT
TTTTTTTTCTTTTACCTTTTTTACCATTAAACAATCTATGGTTTTCTTGT
CTAGTCTGTTTCTTTGTATTGATTTGTTGAGCCAGTGACAATTGGTCTCC
GTCTTAGTGTTTTGTCTTCTACTGGCTTATTTGATATGTATGCTTGTGT
ATCTATGGAATGTGATGCAGGCGTGAGTCTGAGGGCAAGCTGAAGGGCAT
CTTGGGGTACA

Gambar 3. Prediksi daerah intron dan ekson pada sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH Annona muricata*. Sekuen yang diberi garis bawah menunjukkan daerah ekson dan yang tidak diberi garis bawah menunjukkan daerah intron. Total ekson diprediksi terdiri dari 429 pb



Gambar 4. Dendrogram berdasarkan sekuen GAPDH pada beberapa aksesori tumbuhan menggunakan metode *Neighbor Joining Tree* dengan Kimura-2-Parameter model dan 1000x *bootstrap*

Pada hasil analisis BLASTn, di antara kesebelas aksesori yang muncul dan setelah dilakukan penelusuran pada *database* sekuen DNA di *GenBank*, hanya *Disocorea oppositifolia* yang memiliki sekuen mRNA GAPDH yang utuh atau lengkap. Sekuen mRNA dari gen *GAPDH D. oppositifolia* tersebut selanjutnya digunakan untuk memprediksi daerah ekson dan intron dari sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH A. muricata*. Hasil pensejajaran sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH A. muricata* dengan

mRNA dari gen *GAPDH D. oppositifolia* menunjukkan bahwa sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH A. muricata* tersejajarkan dengan sekuen mRNA dari gen *GAPDH D. oppositifolia* mulai dari nukleotida ke-409 sampai ke-833. Diperkirakan sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH A. muricata* terdiri dari 5 ekson dan 4 intron, dengan urutan sebagai berikut: ekson_1 - intron_1 - ekson_2 - intron_2 - ekson_3 - intron_3 - ekson_4 - intron_4 - ekson_5 (Gambar 2 dan 3).

Analisis filogeni yang ditampilkan dalam bentuk dendrogram menunjukkan bahwa sekuen *GAPDH* parsial *A. muricata* membentuk kelompok lebih dulu dengan *Dioscorea oppositifolia* (*Dioscoreaceae*) dan kemudian dengan dua spesies *Agave* (*Asparagaceae*) berdasarkan sekuen *GAPDH*. Sementara itu, sekuen *GAPDH* *Salvia mellifera* dan empat spesies dari genus *Meconopsis* serta *Papaver alpinum* berada jauh dari *A. muricata* (Gambar 4).

PEMBAHASAN

Level ekspresi gen dapat diukur menggunakan teknik qRT-PCR. Teknik ini membutuhkan gen referensi yang transkripsinya (mRNA) relatif stabil pada berbagai kondisi, tahapan perkembangan dan jaringan (Gantasala et al., 2013; Bao, Qu, Shan, & Wan, 2016; Hou et al., 2017). Ada banyak macam gen referensi, seperti gen penyandi aktin, ubikuitin, tubulin, *cyclophilin*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *ATP-binding cassette (ABC) transporter*, *F-box protein family*, *metalloprotease* dan *CDPK-related protein kinase*, *protein phosphatase 2A-2 (PP2A-2)*, 18S rRNA dan *oligouridylate binding protein 1B (UBP)* (Hong, Seo, Yang, Xiang, & Park, 2008; Libault et al., 2008; Basa, Solti, Sarvari, & Tamas, 2009; Mafra et al., 2012; Aman, Haq, Ahmed, & Shakeel, 2017; Tang et al., 2019). Pada sirsak belum pernah dilaporkan tentang gen referensi termasuk gen *GAPDH*. Penelitian ini telah berhasil mengamplifikasi fragmen DNA dari gen *GAPDH* sirsak. Amplikon yang diperoleh sepanjang 2.000 pb (Gambar 1), namun karena sekuensingnya dilakukan dengan metode standar, maka hanya diperoleh sekuen DNA dengan grafik yang baik sepanjang 961 pb. Berdasarkan hasil analisis BLASTn, sekuen tersebut benar merupakan bagian dari gen *GAPDH* (parsial).

Analisis BLASTn merupakan suatu program yang tersedia di situs www.ncbi.nlm.nih.gov untuk melakukan penjejakan berbagai sekuen DNA, mRNA maupun protein (Altschul et al., 1997; Fassler & Cooper 2008; Madden, 2013). Penjejakan sekuen DNA menggunakan program BLASTn ini bertujuan menentukan kemiripan sekuen DNA sampel dengan sekuen DNA yang ada di *database* publik dan menentukan fungsi

sekuen DNA sampel yang merupakan bagian dari sebuah gen (Madden, 2013). Ada beberapa parameter BLASTn yang berperan menentukan kemiripan suatu sekuen sampel (pada program BLAST diistilahkan dengan *query*) dengan sekuen yang ada di *database* (pada program BLAST diistilahkan dengan *subject*), diantaranya yaitu parameter *query cover*, *e-value* dan identitas atau kemiripan. Semakin kecil nilai *e-value* maka semakin signifikan skor dan penjejajarannya. Nilai *query cover* menunjukkan presentase sekuen sampel yang tersejajarkan dengan sekuen yang ada di *database*. Nilai kemiripan menunjukkan besaran kemiripan sekuen sampel dengan sekuen yang ada di *database*. Semakin tinggi nilai *query cover* dan kemiripan menunjukkan semakin besar kemiripan sekuen sampel dengan sekuen yang ada di *database* (Madden, 2013). Analisis BLASTn telah digunakan untuk menentukan fungsi beberapa sekuen DNA dari tumbuhan durik-durik dan tuntun angin (*Elaeocarpus floribundus*) berdasarkan dari besaran nilai *E-value*, *query cover* dan identitasnya atau kemiripannya (Roslim et al., 2019).

Hasil analisis BLASTn menunjukkan bahwa beberapa daerah pada sekuen *GAPDH* sirsak tidak tersejajarkan dengan sekuen *GAPDH* yang ada di *database*. Hal ini dapat dimaklumi, karena perbedaan molekul yang disejajarkan, yaitu molekul DNA pada sirsak dan mRNA pada aksesori yang tersedia di *GenBank*. Hal ini berimbas pada kecilnya nilai *query cover*, yaitu berkisar 40–59%. Namun demikian, presentase identitasnya atau kemiripannya relatif besar, yaitu 68,93–84,35% (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan dua hal, bahwa (1) hasil analisis BLASTn mengkonfirmasi bahwa sekuen DNA yang berhasil diamplifikasi pada sirsak adalah benar bagian dari gen *GAPDH* dan (2) bagian yang tersejajarkan dari sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH* sirsak dengan mRNA dari gen *GAPDH* beberapa aksesori tumbuhan di *GenBank* adalah bagian ekson (Gambar 2). Pada penelitian ini digunakan sekuen mRNA utuh (*complete cds, coding sequence*) dari gen *GAPDH* *D. Oppositifolia* - yaitu sepanjang 1014 pb (Zhao et al., 2016) - untuk menentukan daerah ekson *A. muricata*. Total panjang ekson pada sekuen *GAPDH* parsial *A.*

muricata yang diperoleh pada penelitian ini diprediksi sepanjang 429 pb (Gambar 3).

Pada organisme eukariotik, sekuen DNA dari sebuah gen terdiri dari ekson dan intron, sedangkan pada transkripsinya (mRNA) hanya terdiri dari ekson. Pada proses transkripsi mRNA organisme eukariotik, transkrip pre-mRNA mengalami *splicing* untuk memotong dan membuang intron lalu menyambung ekson sehingga menghasilkan mRNA matang. Jadi, mRNA matang hanya mengandung daerah ekson. Daerah ekson tersebut akan diterjemahkan pada proses translasi menjadi protein (Lim, Wardell, Kleffmann, & Brown, 2018).

Sekuen GAPDH *D. oppositifolia* membentuk kelompok lebih dahulu dengan sekuen GAPDH *A. muricata* dibandingkan dengan aksesi lainnya. Hal ini sejalan dengan analisis BLASTn yang menunjukkan bahwa sekuen GAPDH *A. muricata* memiliki kemiripan paling tinggi dengan sekuen GAPDH *D. oppositifolia*.

Sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH* sirsak yang diperoleh pada penelitian ini selanjutnya harus divalidasi untuk dapat digunakan sebagai gen referensi atau kontrol internal pada analisis ekspresi gen. Validasi dapat dilakukan salah satunya menggunakan teknik *quantitative real time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) (Bao et al., 2016; Hou et al., 2017). Seleksi dan validasi beberapa gen pada tumbuhan *Dalbergia odorifera* menunjukkan bahwa gen *GAPDH* paling stabil ekspresinya dan layak digunakan sebagai kontrol internal pada spesies ini (Meng, Yang, Gao, & Wei, 2019).

Validasi gen *GAPDH* sirsak dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut: Pertama, merancang primer berdasarkan sekuen *GAPDH* yang diperoleh pada penelitian ini. Pada penelitian ini telah dirancang sepasang primer, yaitu F = 5'-TGA TCA TTT TGG CAT TGT CG-3' (menempel di daerah ekson 2) dan R = 5'-AAA TCC ACC ACT GAG ACA TC-3' (menempel di daerah ekson 4) yang mengapit intron 2 dan 3. Produk PCR yang dihasilkan dengan molekul DNA sebagai cetakannya (*template*) sepanjang 482 pb. Jika PCR dilakukan dengan cetakan berupa molekul mRNA atau cDNA maka ukuran produk PCR sepanjang 244 pb. Kedua, isolasi

RNA dan sintesis cDNA total dari beberapa jaringan dan pada beberapa kondisi atau perlakuan. Ketiga, melakukan analisis qRT-PCR pada cDNA total menggunakan sepasang primer yang telah dirancang tersebut. Keempat, melakukan analisis statistik dengan *NormFinder*, *geNorm*, *Rank Aggreg* atau *Best Keeper* (Bao et al., 2016; Zhao et al., 2016; Meng et al., 2019).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH* sirsak yang diperoleh pada penelitian ini belum pernah dilaporkan sebelumnya dan merupakan sekuen *GAPDH* yang pertama kali dilaporkan dari genus *Annona* dan famili *Annonaceae*. Pencarian di *database GenBank* juga tidak menemukan adanya sekuen *GAPDH* sirsak (pencarian pada 30 Desember 2019). Sekuen ini selanjutnya dapat dijadikan dasar untuk mengisolasi gen *GAPDH* spesies lain di dalam genus *Annona* dan famili *Annonaceae*.

SIMPULAN

Sekuen DNA parsial dari gen *GAPDH* sirsak sudah berhasil diisolasi dengan panjang 961 pb. Sekuen ini diprediksi terdiri dari 5 ekson dengan prediksi panjangnya 429 pb dan 4 intron. Sekuen ini dapat dimanfaatkan untuk analisis ekspresi gen pada sirsak. Selain itu, gen ini juga dapat dijadikan dasar untuk mengisolasi gen *GAPDH* dari spesies lain di dalam genus *Annona* dan famili *Annonaceae*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Jenderal Penelitian dan Pengabdian - Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, Republik Indonesia tahun 2019 melalui 'Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT)' dengan nomor kontrak 756/UN.19.5.1.3/PT.01.03/2019.

REFERENSI

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*, 25(17), 3389-3402.
- Aman, S., Haq, N. U., Ahmed, S., & Shakeel, S. N. (2017). Identifications and validations of reference genes for gene

- expression data normalization of *Chenopodium album*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(4), 761-770.
- Basa, B., Solti, A., Sarvari, E., & Tamas, L. (2009). Housekeeping gene selection in poplar plants under Cd-stress: Comparative study for real-time PCR normalisation. *Functional Plant Biology*, 36(12), 1079-1087.
- Bao, W., Qu, Y., Shan, X., & Wan, Y. (2016). Screening and validation of housekeeping genes of the root and cotyledon of *Cunninghamia lanceolata* under abiotic stresses by using quantitative real-time PCR. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1198. doi: 10.3390/ijms17081198www.
- Coria-Teñeiz, A.V., Montalvo-Goñzalez, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(5), 662-691.
- Fassler, J., & Cooper, P. (2008). *BLAST help*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- Gantasala, N. P., Papolu, P. K., Thakur, P. K., 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(1), 312.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hong, S. Y., Seo, P. J., Yang, M. S., Xiang, F., & Park, C. M. (2008). Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology*, 8(1), 112. doi:10.1186/1471-2229-8-112.
- Hou, F., Li, S., Wang, J., Kang, X., Weng, Y., & Xing, G. (2017). Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in long yellow daylily, *Hemerocallis citrina* Borani. *PLoS ONE*, 12(3), e0174933. doi: 10.1371/journal.pone.0174933.
- Koressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., & Remm, M. (2018). Primer3_masker: Integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, 34(11), 1937-1938.
- Kosova, A. A., Khodyreva, S. N., & Lavrik, O. I. (2017). Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in DNA repair. *Biochemistry*, 82(6), 643-654. doi: 10.1134/S0006297917060013.
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391-406.
- Libault, M., Thibivilliers, S., Bilgin, D. D., Radwan, O., Benitez, M., Clough, S. J., & Stacey, G. (2008). Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. *The Plant Genome*, 1(1), 44-54.
- Lim, C. S., Wardell, S. J. T., Kleffmann, T., & Brown, C. M. (2018). The exon-intron gene structure upstream of the initiation codon predicts translation efficiency. *Nucleic Acids Research*, 46(9), 4575-4591.
- Madden, T. (2013). *The NCBI handbook, 2nd edition*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- Mafra, V., Kubo, K. S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R. M., Boava, L. P., ... Machado, M. A. (2012). Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS ONE*, 7(2), e31263. doi: 10.1371/journal.pone.0031263.
- Meng, H., Yang, Y., Gao, Z-H., & Wei, J-H. (2019). Selection and validation of reference genes for gene expression studies by RT-PCR in *Dalbergia odorifera*. *Scientific Reports*, 9(1), 3341. doi: 10.1038/s41598-019-39088-3.
- Moghadamtousi, S. Z., Rouhollahi, E., Karimian, H., Fadaeinasab, M., Firoozinia, M., Abdulla, M. A., & Kadir, H.A. (2015a). The chemopotential effect of *Annona muricata* leaves against azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats and the apoptotic effect

- of acetogenin annonuricin E in HT-29 cells: A bioassay-guided approach. *PLoS ONE*, *10*(4), e0122288. doi: 10.1371/journal.pone.0122288.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015b). *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Science*, *16*(7), 15625-15658; doi:10.3390/ijms160715625.
- Niu, X., Qi, J., Zhang, G., Xu, J., Tao, A., Fang, P., & Su, J. (2015). Selection of reliable reference genes for quantitative real-time pcr gene expression analysis in Jute (*Corchorus capsularis*) under stress treatments. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 848. doi: 10.3389/fpls.2015.00848.
- Pabuayon, I. M., Yamamoto, N., Trinidad, J. L., Longkumer, T., Raorane, M. L., & Kohli, A. (2016). Reference genes for accurate gene expression analyses across different tissues, developmental stages and genotypes in rice for drought tolerance. *Rice*, *9*(1), 32.
- Pickart, C. M., & Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1695*(1-3), 55-72.
- Pinto, A. C., & de Q. (2005). Taxonomy and Botany. In A. C. Pinto, de Q, M. C. R. Cordeiro, S. R. M. De Andrade, F. R. Ferreira, H. A. de C. Filgueiras, R. E. Alves, & D. I. Kinpara (Eds.), *Annona species* (pp. 3-16). Southampton, United Kingdom: International Centre Underutilised Crops, University of Southampton.
- Roslim, D. I., Azrial., Herman., & Lestari, W. (2018). The *GAPDH* partial gene of durik-durik (*Syzygium* sp.) from Riau Province of Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series*, *1116*, 052055.
- Roslim, D. I., Ashfira., Mutiarawati, D., Rosmeilinda, T. F., Aisyah, N., Herman, & Lestari, W. (2019). Isolation of partial housekeeping genes on tuntun angin (*Elaeocarpus floribundus* BI). *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, *11*(2), 194-201.
- Singh, S., Gupta, M., Pandher, S., Kaur, G., Rathore, P., & Palli, S. R. (2018). Selection of housekeeping genes and demonstration of RNAi in cotton leafhopper, *Amrasca biguttula biguttula* (Ishida). *PLoS ONE*, *13*(1), e0191116. doi: 10.1371/journal.pone.0191116.
- Sirover, M. A. (2011). On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochimica et Biophysica Acta*. *1810*(8), 741-751.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725-2729.
- Tang, F., Chu, L., Shu, W., He, X., Wang, L., & Lu, M. (2019). Selection and validation of reference genes for quantitative expression analysis of miRNAs and mRNAs in Poplar. *Plant Methods*, *15*(1), 35. doi: 10.1186/s13007-019-0420-1.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3 new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115.
- Wahab, S. M. A., Jantan, I., Haque, M. A., & Arshad, L. (2018). Exploring the leaves of *Annona muricata* L. as a source of potential anti-inflammatory and anticancer agents. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 661. doi: 10.3389/fphar.2018.00661.
- Zhang, D. Q., Du, Q. Z., Xu, B. H., Zhang, Z. Y., & Li, B. L. (2010). The actin multigene family in *Populus*: Organization, expression and phylogenetic analysis. *Molecular Genetics Genomics*, *284*(2), 105-119.
- Zhao, X., Zhang, X., Guo, X., Li, S., Han, L., Song, Z., ... & Li, M. (2016). Identification and validation of reference genes for qRT-PCR studies of gene expression in *Dioscorea oppositifolia*. *Biomed Research International*, *2016*(3089584), 1-13. doi: 10.1155/2016/3089584.