

Jurnal Ilmu Pengetahuan, Teknologi dan Budaya

AL AZHAR INDONESIA

Volume 1, №. 2, Desember 2002

ISSN 1412 - 8659

ULASAN :

Sensor Decalibration Monitoring using the Detection of Abrupt Change Method
Meirios Moechtar

**Perlindungan Hukum Konsumen dalam Transaksi Bisnis Melalui Internet
(e-Commerce)**
Agus Surono

Lentinan dari Shiitake (*Lentinus edodes*) sebagai Antitumor
Netty Widayastuti

PENELITIAN :

**Destruction Removal Efficiency (DRE) Of Waste Derived Synthetic Fuel Through
Cement Kiln**
Kardono

**Implementasi Antena Mikrostrip Susunan Rotasi Sekuensial 16 Elemen & Simulasi
satu Elemen Menggunakan Ensemble SV.7 Frekuensi 5,8 GHz**
Sofian Hamid

**Studi Pemanfaatan Brine dari PT. GARAM Sebagai Bahan Baku Produksi Barium
Sulfat dan Magnesium Hidroksida**
Eriawan Risman

**Eksplorasi dan Skrining Mikroba Pengkonversi Asam Lemak Jenuh pada Minyak
Kelapa Sawit.**
Witono Basuki

**Konstruksi Pustaka Mikrosatelit yang sudah Diperkaya pada Genom Jati
(*Tectona grandis L*)**
Yunus Effendi

Konstruksi Pustaka Mikrosatelite yang Sudah Diperkaya pada Genom Jati (*Tectona grandis, L*)

YUNUS EFFENDI

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Al Azhar Indonesia
Kompleks Masjid Agung Al Azhar, Jl. Sisingamangaraja, Kebayoran Baru, Jakarta.
e-mail: yunus@bi.itb.ac.id

Abstract

*The partial genomic library of teak (*Tectona grandis, L*) has designed to isolate and characterize microsatellite sequences from teak genome. Microsatellite or Simple Sequence Repeat (SSR) are short tandem array of repeated sequences in DNA which have mono- to tetra-nucleotide repeated motif and randomly distributed throughout eukaryotic genomes. Microsatellite has advantages characters than the other DNA markers such as codominan and highest polymorphic information content (PIC). In this research, using hybridization of oligos bounded - membran to fragments of adaptered-DNA technique was designed enriched partial genomic library. The DNA was digested with Rsa I, Ssp I and Alu I restriction enzymes before ligated to Mlu I adapters and hybridized to oligos bounded-membrans. The result was cloned to modified pGEM-T vektors and transformed to Escherichia coli strain JM 109 by using heat shock method. Verification of successfully partial genomic libraries were done by sequencing 13 recombinant colonies that randomly chosen. We found 12 of 13 colonies were contain microsatellite sequences that can be grouped in perfect and imperfect microsatellite motif. Mono and dinucleotide motifs were dominated this result.*

Key words: genomic library, microsatellite, teak

I. PENDAHULUAN

Mikrosatelite atau SSR (Simple Sequence Repeat) adalah urutan segmen DNA yang tersusun dari urutan inti berupa pengulangan tandem mono-, di-, tri-, dan tetranukleotida yang berjumlah sangat melimpah dan tersebar dalam genom eukariot (Saghai Maroof *et al.*, 1994). Adanya variasi jumlah pengulangan dari urutan mikrosatelite menyebabkan mikrosatelite bersifat sangat polimorfik.

Sebagai salah satu jenis penanda molekul yang relatif baru, mikrosatelite menjanjikan kemampuan yang lebih baik dari pada penanda molekul lainnya (mis. RFLP, RAPD, AFLP). Hal ini disebabkan oleh adanya kelebihan dari mikrosatelite dibanding dengan penanda molekul lainnya, seperti polimorfisme yang sangat tinggi yang tercermin dari banyaknya jumlah alel dalam satu lokus mikrosatelite, berbasis teknik PCR

sehingga mudah diaplikasikan, dan sifat kodominan (Powell *et al.*, 1996).

Penelitian tentang mikrosatelite telah dilakukan pada berbagai bidang penelitian, baik yang berupa isolasi dan karakterisasi maupun aplikasi. Penanda mikrosatelite telah diaplikasikan untuk berbagai macam tujuan seperti kedokteran (Lench *et al.*, 1996), pemuliaan tanaman (Maughan *et al.*, 1996), penelitian genetika dasar berupa kontruksi peta genetik (Cregan *et al.*, 1994) maupun konservasi genetik (Luo *et al.*, 1999, Isagi *et al.*, 1999, England *et al.*, 1999). Namun, meski telah terbukti bahwa mikrosatellite memiliki banyak keunggulan, penanda ini juga memiliki kelemahan yakni tingkat kesulitan yang cukup tinggi dalam usaha mengisolasi dan mengkarakterisasi urutan yang mengandung mikrosatelite tersebut. Sebab meskipun jumlah mikrosatelite di dalam genom melimpah (Powel *et al.*, 1996), namun proporsinya terhadap genom

secara keseluruhan relatif kecil. Sehingga untuk mengkarakterisasi lokus mikrosatelite perlu dilakukan teknik 'enrichment' dengan tujuan mendapatkan urut-urutan yang banyak mengandung mikrosatelite dalam pustaka genom.

Beberapa teknik isolasi dan karakterisasi lokus mikrosatelite telah dilaporkan (Lench *et al.*, 1996, Edwards *et al.*, 1996, Ostrander *et al.*, 1992, Connell *et al.*, 1998) dapat digunakan untuk mendesain pustaka genom yang telah diperkaya, namun dari beberapa penelitian lain (Cordeiro *et al.*, 1999) terungkap bahwa tidak semua teknik 'enrichment' tersebut dapat diaplikasikan pada semua sampel yang berbeda. Sehingga diperlukan optimasi teknik untuk mendapatkan pustaka genomik yang sudah diperkaya untuk jenis-jenis sampel yang berbeda.

Untuk itu dalam penelitian ini akan didesain pustaka genomik yang telah diperkaya motif mikrosatelite dengan menggunakan metode Edwards *et al.* (1996) pada DNA jati.

II. BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan adalah daun segar jati (*Tectona grandis*, L). Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode CTAB-Porebsky *et al* (1996) dengan sedikit modifikasi. DNA hasil ekstraksi difragmentasi dengan menggunakan enzim restriksi *Rsa I*, *Ssp I* dan *Alu I*. Kemudian diligasi dengan adapter *Mlu I* (21 dan 25 mer). Fragmen yang sudah diligasi adapter diamplifikasi dengan teknik PCR dan dihibridisasi dengan membran Hybon N+ berukuran 0,5 cm² yang mengandung oligonuklotida bermotif mikrosatelite selama 48 jam. Membran kemudian dicuci 5X dengan 2X SSC, 0,01% SDS dan 3X dengan 0,5 SSC, 0,01 % SDS. Selanjutnya membran dielusi pada air deionisasi mendidih selama 8 menit. Hasil elusi membran diamplifikasi dengan teknik PCR dan hasilnya diklon ke dalam vektor pGEM-T modifikasi. Kemudian ditransformasi dengan menggunakan teknik kejut panas ('heat shock') pada inang kompeten sel *Escherichia coli* strain JM 109 (Promega).

Sel hasil transformasi ditumbuhkan dalam medium LB agar padat yang mengandung 100 μ g/ml ampicilin dan sudah diolesi dengan 100 μ l 100mM IPTG + 20 μ l 50mg/ml X-Gal. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 4°C selama 24 jam. Efisiensi transformasi dihitung dan verifikasi

klon rekombinan dilakukan dengan melakukan sekuensing sampel yang dipilih secara acak.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, ekstraksi DNA yang dilakukan dengan menggunakan metode CTAB - Porebsky *et al* (1996) dengan sedikit modifikasi, menunjukkan hasil DNA yang cukup bagus. Nilai rasio absorbansi A260/A280 hasil pengukuran menunjukkan nilai 1.81, sedangkan konsentrasi DNA yang diperoleh \pm 38 μ g/ μ l. Nilai rasio absorbansi yang diperoleh menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh hampir tidak mengandung kontaminan (protein dan metabolit sekunder lainnya). Rasio absorbansi A260/A280 yang menunjukkan nilai $<$ 1.8 berarti DNA masih mengandung protein dan metabolit sekunder lainnya sedangkan nilai $>$ 1.9 berarti DNA banyak mengandung RNA dan fragmen DNA banyak sudah terdegradasi.

Ekstraksi DNA pada tanaman membutuhkan lebih banyak perlakuan dibandingkan ekstraksi DNA pada sel hewan. Pada ekstraksi DNA sel tumbuhan dibutuhkan tahap untuk membebaskan isi sel (khususnya DNA) dari bungkus dinding sel. Umumnya dilakukan dengan menggunakan teknik penghancuran secara mekanis/pengerusan dan penambahan deterjen Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) ataupun Cationik hexadecyl Trimetil Bromide (CTAB) (Wilke, 1997). Selain itu pada tanaman umumnya banyak dijumpai kandungan-kandungan zat-zat yang berpotensi menjadi kontaminan terhadap perolehan DNA hasil ekstraksi, misalnya senyawa-senyawa polifenolik dan polisakarida (Wilke, 1996), sehingga untuk mendapatkan DNA kualitas bagus seringkali masih diperlukan beberapa modifikasi terhadap suatu metode ekstraksi DNA. Pada tanaman jati, ditemukan kandungan senyawa polifenolik dan polisakarida yang cukup signifikan, sehingga diperlukan modifikasi untuk mendapatkan metode optimum untuk ekstraksi sampelnya. Modifikasi penambahan Polyvinyl Pirrolidone (PVP) sebanyak 1gr/3gr sampel daun dan ekstraksi kloroform:isoamil alcohol (24:1) sebanyak 2X dengan sentrifugasi bersuhu 4°C, ternyata memberikan hasil DNA yang bagus.

Kualitas DNA juga teruji dari hasil fragmentasi dengan menggunakan enzim restriksi *Rsa I*, *Alu I* dan *Ssp I*, yang terbukti DNA dapat

terfragmentasi dengan baik. DNA hasil pemotongan didominasi fragmen berukuran 200 – 700 bp. Ukuran ini sesuai dengan tujuan fragmentasi dalam penelitian, yakni mendapatkan fragmen DNA berukuran 300 – 500 bp. Ukuran fragmen DNA ini adalah ukuran DNA yang umum digunakan dalam metode isolasi mikrosatelit (England *et al.*, 1999).

Hibridisasi antara hasil amplifikasi fragmen yang sudah dipasangi adapter *Mlu I* diujung 3' dan 5' (21 dan 25 mer) dengan membran Hybon N+ yang mengandung oligo bermotif mikrosatelit, dilakukan secara lengkap selama 48 jam. Teknik pencucian membran merupakan faktor penting dalam menentukan akurasi pustaka genomik parsial yang diperoleh nantinya. Dengan menggunakan 5X pencucian dengan konsentrasi garam tinggi dan 3X pencucian garam rendah pada suhu 65°C, memberikan hasil yang cukup bagus pada pustaka genomik yang diperoleh. Berdasarkan kajian pustaka, kondisi teknik pencucian (konsentrasi garam dan suhu pencucian) diduga bersifat spesifik untuk jenis DNA tanaman yang berbeda.

Cordeiro *et al* (1999) yang melakukan penelitian serupa pada *Saccharum spp* dengan menggunakan teknik 'enrichment' metode Edwards *et al* (1996) dengan teknik pencucian 5X konsentrasi garam tinggi dan 3X garam rendah pada suhu 65°C, tidak mendapatkan lokus mikrosatelit pada pustaka yang diperolehnya. Artinya pustaka genomik parsial *Saccharum spp* yang dibuatnya tidak benar-benar dapat diperkaya. Metode Edwards *et al* (1996) sendiri menggunakan teknik pencucian 20X (5 menit untuk tiap pencucian) dengan menggunakan 0,5 SSC (garam rendah) pada suhu 65°C. Dalam penelitian ini, pada awalnya sudah dicoba menggunakan teknik pencucian 20X dengan konsentrasi garam rendah, namun tidak didapat pustaka genomik yang benar-benar telah diperkaya seperti yang diharapkan. Namun dengan melakukan perubahan teknik pencucian yakni dengan menggunakan 5X buffer pencuci konsentrasi garam tinggi dan dilanjutkan 3X garam rendah pada suhu 65°C, didapatkan pustaka genomik parsial yang diperkaya.

Amplifikasi hasil elusi didapat fragmen berukuran antara 100 – 700 bp. Fragmen ini kemudian diligasikan ke vektor pGEM-T modifikasi. Modifikasi berupa penghilangan kedua ujung timidin dan pemotongan vektor dengan pada 'site restriction' enzim *Mlu I*. Agar

tetap linear, plasmid hasil modifikasi difosforilasi menggunakan enzim alkalin fosfatase (Calf intestine alkaline phosphatase). Hasil elektroforesis gel agarose plasmid menunjukkan bahwa modifikasi plasmid berhasil dilakukan.

Transformasi hasil ligasi fragmen-plasmid ke sel inang *Escherichia coli* strain JM 109 menggunakan metode kejut panas menunjukkan hasil yang cukup bagus yang ditandai dengan nilai efisiensi transformasi yang cukup tinggi yakni $1,3 \times 10^8$. Dalam penelitian ini dilakukan 'white-blue screening' untuk membedakan koloni rekombinan/koloni putih (yang mengandung mikrosatelit) dan koloni yang non-rekombinan/koloni biru. Adapun efisiensi ligasi fragmen dengan vektor dapat dilihat dari perbandingan jumlah koloni putih dan koloni biru, yakni sekitar ± 3500 koloni putih : 175 koloni biru (20 : 1).

Untuk membuktikan ada tidaknya urutan mikrosatelit pada koloni rekombinan, dilakukan sekuensing pada beberapa koloni putih yang dipilih secara acak dari pustaka genomik yang sudah diperoleh. Hasil sekuensing dari 13 sampel koloni, menunjukkan bahwa 12 koloni mengandung mikrosatelit dengan tipe sempurna dan tidak sempurna. Sedangkan motif mikrosatelit yang diperoleh umumnya bertipe pengulangan mononukleotida dan dinukleotida. Namun dari ke-12 sampel yang mengandung mikrosatelit tersebut, 7 diantaranya memiliki fragmen sisipan yang sama. Sehingga meskipun ditemukan 12 plasmid yang mengandung mikrosatelit, hanya 6 motif mikrosatelit saja yang dapat dikarakterisasi. Hal ini meskipun dianggap sebagai kondisi yang umum dan sering dialami dalam penelitian-penelitian serupa, namun dalam penelitian ini penyebabnya diduga adalah kondisi pada teknik pencucian membran hasil hibridisasi.

Dari hasil sekuensing tersebut dapat disimpulkan bahwa dalam penelitian ini telah berhasil didesain pustaka genomik parsial pada jati yang sudah diperkaya motif mikrosatelit berdasar metode 'enrichment' Edwards *et al* (1996) yang sudah dimodifikasi. Namun untuk meningkatkan efisiensi perolehan mikrosatelit atau dengan kata lain untuk meningkatkan mutu pustaka genomik parsial, masih diperlukan optimasi teknik 'enrichment' khusunya pada tahap pencucian membran hasil hibridisasi.

Tabel: Mikrosatelite Hasil Sekuensing^{*}

| kode koloni | ukuran fragmen (bp) | Motif pengulangan | kategori |
|-------------|---------------------|-------------------|-----------|
| Tg-1 | 232 | (CT)15 | Perfect |
| Tg-2 | 274 | (GA)13 | Perfect |
| Tg-4 | 238 | (GA)6TA(GA)10 | Perfect |
| Tg-71 | 334 | (T)3AAA(T)9C | Imperfect |
| Tg-72 | | (T)10 | |
| | | (GA)11 | Perfect |
| Tg-8 | 191 | (T)n | Imperfect |
| Tg-a | 162 | (GA)13 | Perfect |
| Tg-f | 197 | (GA)19 | Perfect |

^{*})koloni yang mengandung fragmen sisipan yang sama tidak dimasukan dalam table.

DAFTAR PUSTAKA

1. Connell, J.P., S. Pammi, M.J. Iqbal, T. Huisenga & A.S. Reddy, 1998, A high throughput procedure for capturing microsatellite from complex plant genome, *Plant Mol. Biol. Rep.*, **16**: 341-349.
2. Cordeiro, G.M., T.L. Maguire, K.J. Edwards & R.J. Henry, 1999, Optimisation of microsatellite enrichment technique in *Saccharum spp.*, *Plant Mol. Biol. Rep.*, **17**: 225-229.
3. Cregan R.B., A.A. Bhagwat, M.S. Akkaya & J. Rongwen, 1994, Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean, *Methods in Molecular and Cellular Biology*, **5**: 49-61.
4. England P.R., D.J. Ayre & R.J. Whelan., 1999, Microsatellite in Australian shrub *Grevillea macleayana* (Proteaceae), *Molecular Ecology*, **8**: 689-690.
5. Isagi Y., T. Kanazashi, W. Suzuki, H. Tanaka & T. Abe, 1999, Polymorphic microsatellite DNA markers for *Magnolia obovata* Thunb. and their utility in related species, *Molecular Ecology*, **8**: 699 – 700.
6. Lench, N. J., A. Norris, A. Bailey, A. Booth & A.F. Markham, 1996, Vektorette PCR isolation of microsatellite sequences using anchored dinucleotide repeat primers, *Nucleic Acid Research*, **24** (11): 2190-2191.
7. Luo H., M. Morchen, C.R. Engel, C. Destombe, J.T. Epplen, C. Epplen, P. Saumitou-Laprade & M. Valero, 1999, Characrterization of microsatellite in the alga *Gracilaria gracilis*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **17**: 700-702.
8. Maughan P.J., M.A. Saenger, 1996, Molecular marker analysis of *Scutellaria* weight: genomic location, gene action and evidence for orthologous evolution among three legume species, *Theor Appl. Genet.*, **93**: 574-579.
9. Ostrander E.A., P.M. Jong, J.Rine & G.Duyk., 1992, Construction of small insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **89**: 3419-3422.
10. Porebsky S., L.G. Bailey & B.R. Baum., 1997, Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide, *Plant Mol. Biol. Rep.*, **15** (1): 8-10.
11. Powell W., G.C. Machray & J.Provan, 1996, Polymorphism revealed by simple sequence repeats, *Trend in Plant Science*, **7** (1): 215-222.
12. Saghai Maroof, M.A., R.M. Bisayev, G.P. Yang, Q. Zhang & R.W. Allard, 1994, Extraordinary polymorphic microsatellite DNA in Barley: species diversity, chromosomal locations and population dynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **91**: 5466-5470.
13. Wilke, S., 1997, Isolation of total genomic DNA. In: *Plant Molecular Biology – A Laboratory Manual*, Clark M.S. (Ed.) Springer Lab manual. – Berlin