

Kloning dan karakterisasi daerah promotor gen penyandi ADP glucose pyrophosphorylase dari *Metroxylon sagu* rendemen pati-tinggi dan rendah

Cloning and characterization of promoter region of ADP glucose pyrophosphorylase-encoding gene from Metroxylon sagu with high- and low-starch content

Asmini BUDIANI¹⁾, Riza Arief PUTRANTO¹⁾, Hayati MINARSIH¹⁾, Imron RIYADI¹⁾, SUMARYONO¹⁾ & Barahima ABBAS²⁾

¹⁾Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No.1, Bogor 16128

²⁾Pusat Penelitian Ubi-ubian dan Sagu, Universitas Negeri Papua, Jl. Gunung Salju, Amban, Manokwari 98314, Papua Barat.

Diterima tanggal 30 Juni 2016/disetujui tanggal 13 Oktober 2016

Abstract

ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) is one of key enzymes in the starch biosynthesis. In many plants, the activity of this enzyme was reported to affect the yield and the composition of produced starch. This research is a part of an effort to develop molecular markers for early selection of high starch-yielding of sago palm. The purpose of the research was to isolate promoters of AGP gene and to analyze the differences in their DNA sequences between sago palm with high starch content (MsHS) and low starch content (MsLS). DNA was isolated and purified from the leaves of two sago palms. The promoter region of AGP was amplified by Genome Walking technique. The specific primers were designed by Primer3 program based on the information of DNA sequence of AGP genes of sago palm from previous studies. Selected DNA fragments resulted from Genome Walking were isolated from the gel, cloned into E. coli, and analyzed its DNA sequence. DNA sequence analysis showed that one DNA fragment from MsHS (\pm 1500 bp) and one DNA fragment from MsLS ($>$ 2000 bp) were confirmed as a 5' upstream of the AGP gene. Further in silico analysis using MEME program identified various DNA motifs of cis-acting elements, which confirmed that those DNA fragments were promoter region of the gene. Preliminary analysis showed the differences in DNA sequences and motifs of cis-acting elements in the promoter region of the two samples which might influence or indirectly associated with the character of the starch content in sago palm.

[Keywords : *Metroxylon sagu* Rottb., starch biosynthesis, carbohydrate, ADP-glucose pyrophosphorylase, cis-regulatory elements]

Abstrak

ADP-glucose Pyrophosphorylase (AGPase) merupakan salah satu enzim kunci dalam biosintesis pati. Pada berbagai tanaman, aktivitas enzim ini dilaporkan mempengaruhi rendemen dan komposisi pati yang dihasilkan. Penelitian ini merupakan bagian dari usaha untuk mengembangkan penanda molekuler untuk seleksi dini tanaman sago rendemen pati tinggi. Tujuan penelitian adalah untuk mengklon dan menganalisis perbedaan sekuen DNA daerah promotor gen penyandi AGP dari tanaman sago rendemen pati tinggi (MsHS) dan rendemen pati rendah (MsLS). DNA diisolasi dan dimurnikan dari daun tanaman sago rendemen pati tinggi dan rendemen pati rendah. Amplifikasi DNA daerah promotor AGP dilakukan dengan teknik *Genome Walking*, menggunakan primer spesifik yang dirancang menggunakan program Primer3 berdasarkan informasi sekuen DNA gen *AGP* tanaman sago yang telah diperoleh pada penelitian sebelumnya. Fragmen DNA produk *Genome Walking* terpilih diklon ke dalam *E. coli* dilanjutkan dengan analisis sekuen DNA. Hasil analisis sekuen DNA menunjukkan bahwa satu fragmen DNA produk *Genom Walking* MsHS (\pm 1500 bp) dan satu fragmen DNA dari MsLS ($>$ 2000 bp) terklon adalah daerah 5' *upstream* dari gen *AGP*. Analisis lebih lanjut secara *in silico* menggunakan program MEME berhasil mengidentifikasi beberapa sekuen dan motif elemen *cis-acting* yang mengkonfirmasi bahwa fragmen DNA tersebut adalah daerah promotor gen *AGP*. Terdapat perbedaan sekuen DNA dan motif *cis acting elemen* pada daerah promotor kedua sampel yang diduga berpengaruh atau secara tidak langsung terkait dengan karakter rendemen pati pada tanaman sago.

[Kata kunci : *Metroxylon sagu* Rottb., biosintesis pati, karbohidrat, ADP-glucose pyrophosphorylase cis-regulatory elements]

*) Penulis korespondensi: asminib@yahoo.com

Pendahuluan

Tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) merupakan salah satu tanaman penghasil karbohidrat tertinggi. Pati kering yang dihasilkan tanaman ini dapat mencapai 15-25 ton/ha/tahun (McClatchey et al., 2006). Oleh karena itu tanaman sagu merupakan sumber pangan dan energi yang sangat potensial (Ohmi, 2010; Bintoro, 2011). Di sebagian wilayah Indonesia, terutama Indonesia bagian timur, sagu sudah lama dikonsumsi sebagai bahan makanan pokok. Namun demikian, riset dan publikasi mengenai tanaman sagu di Indonesia terutama dalam kaitannya dengan budidaya dan pemuliaan, jauh tertinggal dibandingkan dengan tanaman pangan maupun tanaman perkebunan lainnya. Beberapa riset yang telah dilaporkan di antaranya adalah pengembangan teknik perbanyakan klonal tanaman sagu melalui *embriogenesis somatik*, sebagai upaya untuk mengatasi keterbatasan benih (Sumaryono et al., 2009), studi kekerabatan genetik tanaman sagu di Indonesia dengan teknik RAPD (Abbas et al., 2009), dan berdasarkan ekspresi gen Wx (Abbas & Ehara, 2012). Sementara dalam upaya mengembangkan marka untuk rendemen pati tinggi, Budiani et al., (2014) mengidentifikasi perbedaan pola RAPD antara sagu rendemen pati tinggi dengan sagu rendemen pati rendah. Dalam bidang molekuler, Ibrahim et al., (2014) menguji efisiensi beberapa metode transformasi pada tanaman ini. Dari konstruksi pustaka cDNA dan analisis EST yang dilakukan, Wee & Roslan (2012), mengidentifikasi transkrip yang terlibat dalam metabolisme primer dan toleran stres.

Di sisi lain, Indonesia memiliki keragaman tanaman sagu yang besar, yang sangat potensial digunakan dalam pemuliaan untuk merakit sagu unggul. Keragaman tersebut dapat dikelompokkan berdasarkan beberapa karakter, yaitu rendemen pati, kualitas (cita rasa) pati, ketebalan empulur, dan berduri atau tidak berduri. Bintoro (2011) melaporkan tentang keragaman dan distribusi tanaman sagu di Indonesia, baik keragaman morfologi daun, batang dan hasil pati. Yamamoto (2011) meneliti berbagai faktor yang berhubungan dengan produktivitas pati pada tanaman sagu. Hasil pengamatannya menunjukkan bahwa perbedaan varietas paling menentukan perbedaan produktivitas pati. Hal ini menunjukkan bahwa faktor genetiklah yang paling berpengaruh terhadap produktivitas pati. Rendemen pati merupakan salah satu faktor penting yang menentukan produksi pati per batang sagu, dan ke depan akan menjadi salah satu kriteria seleksi dalam program pemuliaan sagu unggul. Oleh karena itu ketersediaan marka molekuler untuk seleksi tanaman sagu yang memiliki rendemen pati tinggi akan sangat membantu program pemuliaan untuk menghasilkan bibit sagu unggul.

Riset terkait biosintesis pati serta cara memodifikasinya telah banyak dilaporkan pada berbagai tanaman terutama pada padi dan gandum (Sestili et al., 2009; Jeon et al., 2010; Slade et al., 2012; Fasahat et al., 2014). Menurut Masouleh et al., (2012) ada tujuh kelompok enzim yang berperan langsung maupun tidak langsung pada produksi granul pati, yaitu AGP, *granule bound starch synthase* (GBSS), *starch synthases* (SS), *branching enzyme* (BE), *debranching enzyme* (DBE), *starch phosphorylase* (PHO) dan *glucose 6-phosphate translocator* (GPT). Tiga di antaranya merupakan enzim utama yang berperan dalam biosintesis pati, yaitu: (1) *ADP-glucose pyrophosphorylase* (AGP), yang berperan mengkatalisis reaksi pembentukan *ADP-glucose* dari *Glucose-1P*; (2) *starch synthase* (SS) yang mengkatalisis pembentukan pati dari *ADP-Glucose* melalui pembentukan ikatan (1-4) antara ujung nonreduksi dari satu rantai glukcan dengan gugus *glucosyl* dari *ADP-glucose*; dan (3) *starch branching enzyme* (SBE). SBE berperan dalam reaksi yang menghasilkan ikatan α -(1,6)- dengan memutus ikatan α -(1,4)- internal dan mentransfer ujung tereduksi yang dilepaskan ke C6 hidroksil untuk menghasilkan struktur bercabang molekul amilopektin (Tetlow et al., 2004).

Komposisi pati tidak semata-mata dipengaruhi oleh aktivitas AGP, tetapi merupakan hasil akhir dari keseluruhan tahapan biosintesis pati. Over ekspresi AGP pada tanaman gandum, padi dan jagung dilaporkan meningkatkan jumlah biji dan produksi, yang membuktikan bahwa AGP menentukan akumulasi pati secara keseluruhan (Geigenberger, 2011). Budiani et al., (2015) telah mempelajari perbedaan ekspresi AGP pada tanaman sagu rendemen pati tinggi dengan pada tanaman sagu rendemen pati rendah, dan hasilnya menunjukkan bahwa tanaman sagu rendemen pati tinggi mengekspresikan AGP lebih tinggi dibandingkan tanaman sagu rendemen pati rendah. Ekspresi suatu gen dikontrol melalui beberapa mekanisme, yang pada umumnya melibatkan sekuen DNA daerah 5' *upstream* (promoter) dari gen tersebut. Perbedaan sekuen pada daerah promoter dapat menentukan kuat tidaknya suatu gen diekspresikan. Sebagai bagian dari upaya untuk mendapatkan marka rendemen pati pada tanaman sagu, penelitian ini bertujuan untuk mengklon dan menganalisis sekuen DNA daerah promoter gen AGP dari tanaman sagu rendemen pati tinggi dan tanaman sagu rendemen pati rendah. Perbedaan sekuen DNA daerah promoter kedua jenis tanaman sagu yang berbeda rendemen patinya dapat dijadikan dasar untuk merancang marka yang terkait dengan rendemen pati tinggi pada tanaman sagu.

Bahan dan Metode

Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun yang telah berkembang penuh dari tanaman sagu yang memiliki rendemen pati tinggi yang diambil dari daerah Kalimantan Selatan dan merupakan varietas sagu lokal (MsHS) dan dari tanaman sagu dengan rendemen pati rendah yang diambil dari daerah Papua Barat, yang disebut sebagai 'sagu air' (MsLS).

Isolasi DNA dari daun tanaman sagu

DNA diisolasi dari daun sagu menggunakan prosedur Orozco-Castillo *et al.*, (1994) dengan sedikit modifikasi. Sampel daun dihaluskan dalam mortar dengan bantuan N₂ cair serta PVP (BM 30000), kemudian dihomogenkan dengan bufer ekstraksi (10 mL CTAB 10%, 2 mL EDTA 0,5 M pH 8,0, 5 mL tris-HCl 1M pH 8,0, 12,6 mL NaCl 5 M, 20,4 mL dH₂O) yang telah dipanaskan 65 °C dan ditambahkan 50 µL β-merkaptoetanol, dengan perbandingan 1:5 (g/mL). Campuran dikocok dengan vorteks kemudian dipanaskan kembali pada suhu 65 °C selama 30 menit. Ke dalam suspensi ditambahkan larutan kloroform : isoamil alkohol (1 x volume), dikocok dengan vorteks dan disentrifus dengan kecepatan 12000 x g selama 10 menit. Larutan DNA di lapisan paling atas dipindahkan ke tabung sentrifus yang baru. Perlakuan ini diulang kembali, kemudian larutan DNA dari lapisan paling atas dipindahkan ke tabung sentrifus baru dan ditambah isopropanol dingin (1 x volume). Campuran dibolak-balik perlahan hingga homogen dan disimpan dalam kulkas pada suhu 4 °C selama 30 menit kemudian disentrifus kembali (12000 g, 10 menit, 4°C). Pelet yang diperoleh dikering-anginkankan, kemudian dilarutkan dengan 1 mL bufer TE (1 mL Tris-HCl 1 M pH 8,0; 0,2 mL EDTA 0,5 M pH 8,0 dan 98,8 mL dH₂O), 1/10 volume NaCH₃COO 3 M pH 5,2 dan 2,5 mL etanol absolut. Selanjutnya campuran disimpan dalam freezer -20 °C selama 30 menit atau semalam. Homogenat disentrifus dengan kecepatan 13000 x g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Endapan dicuci dengan etanol 70% kemudian DNA dikeringkan dengan *speed vacuum*. DNA dilarutkan dalam 100 µL ddH₂O. Kontaminan RNA dihilangkan dengan menambahkan RNase 25 µg/mL ke dalam larutan DNA dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit.

Amplifikasi DNA promoter dengan Genome Walking

Isolasi promoter (DNA daerah 5'upstream) dilakukan dengan teknik *Genome Walking* menggunakan kit *Genome Walker TM Universal*. Untuk itu dirancang primer menggunakan *template* DNA gen *AGP* yang telah dihasilkan pada tahapan penelitian sebelumnya (Budiani *et al.*, 2015).

Perancangan primer dilakukan dengan program Primer3. Prosedur dan tahapan kerja *Genome Walking* dilakukan sesuai dengan yang direkomendasikan dalam *User Manual* yang secara garis besar terdiri dari: (1) Konstruksi *Genome Walker Libraries* yang diawali dengan pengecekan ukuran dan kemurnian DNA dilanjutkan dengan pemotongan DNA dengan empat enzim restriksi secara terpisah, yaitu *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* dan *StuI*, pemurnian DNA, Ligasi DNA dengan adaptor; dan (2) *GenomeWalkerTM DNA Walking*, yaitu PCR untuk amplifikasi daerah 5' upstream menggunakan primer spesifik dengan cetakan (*template*) keempat *DNA library* yang telah dikonstruksi menggunakan empat enzim restriksi.

Pada penelitian ini digunakan tiga primer yang dirancang secara spesifik dengan program Primer3, yaitu GW-AGP1 yang digunakan untuk *primary PCR* berpasangan dengan primer adaptor AP1 (tersedia dalam Kit), dan GW-AGP2 dan GW-AGP3 yang digunakan untuk *secondary PCR* bersama dengan AP2 (tersedia dalam Kit). Baik *primary* maupun *secondary PCR* dilakukan dengan program seperti yang disarankan dalam buku manual, dengan pengaturan pada suhu *annealing* sesuai dengan T_m dari primer yang digunakan. Susunan nukleotida primer tersebut disajikan pada Tabel 1.

Isolasi, kloning dan analisis DNA produk Genome Walking (GW)

Fragmen DNA tertentu produk *Genome Walking (GW)* diisolasi dan dimurnikan dari gel menggunakan QIAquick Gel Extraction dari QIAGEN, kemudian diklon ke dalam *E.coli* DH5α menggunakan vektor kloning pGEM-T Easy. Koloni berwarna putih yang tumbuh pada media seleksi kemudian diuji untuk mengetahui ada tidaknya fragmen DNA produk GW menggunakan PCR koloni. Koloni yang menghasilkan ampikon dengan ukuran yang sesuai dengan ukuran produk GW yang diklon ditumbuhkan kembali pada media cair untuk isolasi plasmid. Plasmid yang diperoleh kemudian digunakan untuk sekuensing DNA menggunakan metode Sanger Dideoxy Sequencing (1st BASE, Malaysia).

Analisis in silico daerah promoter gen AGP

Analisis *in silico* daerah promoter gen AGP dilakukan untuk mengetahui adanya motif DNA yang menunjukkan bahwa fragmen DNA tersebut adalah daerah promoter gen AGP, sekaligus untuk mengetahui perbedaan sekuen DNA daerah promoter antara kedua sampel yang digunakan. Skrining elemen regulasi *cis* putatif di daerah *upstream start codon* (methionion) dilakukan dengan menggunakan *software online* PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Jumlah *copy* dari tiap elemen *cis* dihitung. Lokasi dari tiap elemen *cis* dianotasi dalam sekuen

daerah promotor gen dengan menggunakan *software* Geneious (Biomatters Ltd, New Zealand). Penjajaran sekuen daerah promotor gen AGP dari sampel MsHS dan MsLS dilakukan menggunakan algoritma MUSCLE (Putranto et al, 2015).

Hasil dan Pembahasan

Kuantitas dan kualitas DNA hasil isolasi

Gambar 1 menyajikan profil elektroforesis dan hasil pengujian kuantitas serta kualitas DNA hasil isolasi, baik terhadap kontaminan protein (A260/A280) maupun terhadap kontaminan polisakarida (A260/A230). Hasil tersebut menunjukkan bahwa DNA yang diisolasi dari kedua jenis sampel memiliki kemurnian dan kuantitas yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk tahapan percobaan berikutnya.

Genome Walking untuk amplifikasi dan isolasi promotor AGP

Isolasi promotor menggunakan teknik *Genome Walking* memerlukan DNA dengan kemurnian tinggi. Oleh karena itu sebelum tahapan pada *Genome Walking* dimulai, terlebih dahulu dilakukan pengujian kemurnian DNA dengan jalan memotong DNA menggunakan enzim restriksi *DraI*. Hasil pemotongan dicek dengan elektroforesis pada gel agarosa dan menunjukkan bahwa DNA dapat dipotong dengan enzim tersebut secara sempurna

yang berarti bahwa DNA tersebut mempunyai kemurnian yang tinggi (Gambar tidak disajikan).

DNA yang telah terbukti tinggi kemurniannya tersebut selanjutnya digunakan untuk mengkonstruksi empat *GenomeWalker™ Libraries* dengan cara memotong DNA menggunakan enzim restriksi *DraI* (DL1), *EcoRV* (DL2), *PvuII* (DL3) dan *StuI* (DL4) secara terpisah. Analisis pada gel agarosa untuk keempat *GenomeWalker™ Libraries* memperlihatkan bahwa DNA dapat dipotong dengan keempat enzim tersebut secara sempurna. Keempat *library* tersebut pada tahapan kegiatan berikutnya akan diligasikan dengan adaptor, kemudian dilanjutkan dengan *PCR-based DNA Walking* pada *GenomeWalker Libraries*

Setelah dipotong dengan enzim restriksi, DNA dimurnikan kemudian diligasikan dengan *Genome Walker Adaptor* yang telah tersedia pada kit *Genome Walking* dan dilanjutkan dengan primary PCR menggunakan primer AP1 (dari kit) dan GW_AGP1 (Tabel 1). Program untuk *primary PCR* yang digunakan adalah sebagai berikut : (1) tujuh siklus yang masing-masing terdiri dari 94 °C selama 25 detik dan 72 °C selama 3 menit; 32 siklus masing-masing terdiri dari 94 °C selama 25 detik dan 67 °C selama 3 menit; diakhiri dengan satu siklus 67 °C selama 7 menit. PCR dilakukan dalam mesin Esco Swift Maxi Thermal Sycler. Hasil *primary PCR* disajikan pada Gambar 2.

Tabel 1. Susunan nukleotida primer untuk *primary PCR* (AP1 dengan GW_AGP1) dan *secondary PCR* (AP2 dengan GW_AGP2 atau dengan GW_AGP3) untuk amplifikasi promotor gen AGP.

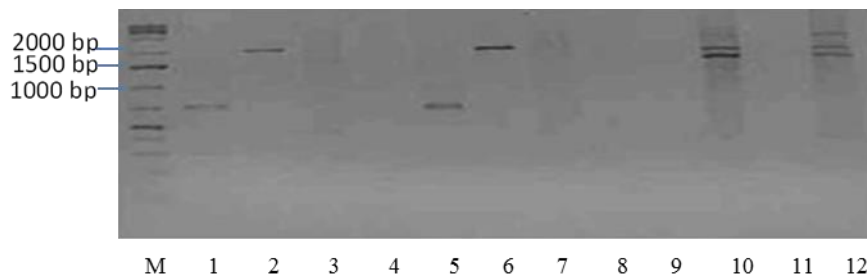
Table 1. Nucleotide sequence of primers used for primary PCR (AP1 and GW_AGP1) and secondary PCR (AP2 and GW_AGP2 or GW_AGP3) for amplification of promoter of AGP gene.

Primer/ Primer	Susunan nukleotida/Nucleotide sequences
Adaptor Primer (AP1)	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
Nested Adaptor Primer (AP2)	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'
GW_AGP1	5'-CATTCTTGTATCCACCCATGTTACTTC-3'
GW_AGP2	5'-AGTATAATTCCAAAACACTGCGACTG-3'
GW_AGP3	5'-CGGAGAAGTGAAAAGAGGAGGAGAGG-3'

	[ng/ul]	260/280	260/230
MsHS	3716,3	1,99	2,23
MsLS	2974,5	1,93	2,19

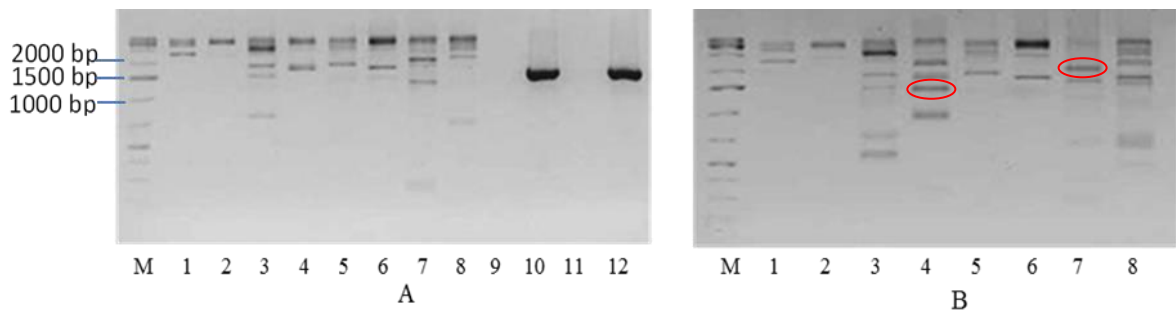
Gambar 1. Profil elektroforesis, konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi dari daun tanaman sagu. (kiri = MsHS dan kanan = MsLS).

Figure 1. Electrophoretic profile, concentration and purity of DNA isolated from leaf of sago palm (left = MsHS and right = MsLS)



Gambar 2. Profil elektroforesis hasil *primary* PCR AP1/GW_AGP1. lajur 1&5= DL1, lajur 2&6= DL2, lajur 3&7= DL 3, lajur 4&8 = DL 4, . lajur 1-4 = MsHS, lajur 5-8 MsLS. lajur 9 = kontrol negatif GSP, lajur 10 = control *human genome* , lajur 11 = kontrol negatif PCP, lajur 12= kontrol positif *Library*. M=Marker DNA 1 kb plus DNA ladder.

Figure 2. Electrophoretic profile of *primary* PCR product using AP1/GW_AGP1 primers. Lanes 1&5= DL1, lanes 2&6= DL2, lanes 3&7= DL 3, lanes 4&8 = DL 4. lanes 1-4 = MsHS, lanes 5-8 = MsLS, lane 9 = negative control GSP, lane 10 = human genome control, lane 11 = negative control PCP, lane 12= Library positive control. M = 1 kb plus DNA ladder.



Gambar 3. Profil elektroforesis hasil *secondary* PCR menggunakan pasangan primer AP2/GW_AGP2 (A) dan pasangan primer AP2/GW_AGP3 (B). lajur 1&5 = DL1, lajur 2&6 = DL2, lajur 3&7= DL 3, lajur 4&8 = DL 4, lajur 9 = Kontrol negatif 1 (primer AP2/GW_AGP2 tanpa templat DNA), lajur 10 = kontrol positif 1 untuk konstruksi *Library* (dengan *human genome* DNA), lajur 11 = kontrol negatif 2 (Primer AP1/PCP tanpa *template* DNA), lajur 12= kontrol positif 2 menggunakan *template* DNA *Library* dari Kit. lajur 1-4 = Sampel MsHS, lajur 5-8 = sampel MsLS. M = Marker DNA 1 kb plus DNA ladder.

Figure 3. Electrophoretic profile of *secondary* PCR product using AP2/GW_AGP2 primers (A) and using AP2/GW_AGP3 primers (B). Lanes 1&5= DL1, lanes 2&6= DL2, lanes 3&7= DL 3, lanes 4&8 = DL 4, lane 9 = negative control 1 (primer AP2/GW_AGP2 without DNA template), lane 10 = positive control 1 for library construction (using human genome DNA), lane 11 = negative control 2 (Primer AP1/PCP without DNA template), lane 12= positive control 2 (using library available from Kit), lanes 1-4 = MsHS, lanes 5-8 = MsLS. M = 1 kb plus DNA ladder.

Primary PCR hanya menghasilkan fragmen dari *library* 1 (DL 1) dengan ukuran sekitar \pm 700 bp (lajur 1 dan 5) dan *library* 2 (DL 2) berukuran \pm 2000 bp (lajur 2 dan 6) dengan intensitas yang kurang tajam. Oleh karena itu, percobaan kemudian dilanjutkan dengan *secondary* PCR menggunakan pasangan primer AP2 (dari kit) dengan GW_AGP2 dan GW_AGP3 dengan *template* hasil *primary* PCR. Program PCR yang digunakan untuk *secondary* PCR adalah 5 siklus, masing-masing terdiri dari 94 °C selama 25 detik dan 72 °C selama 3 menit; 20 siklus masing-masing terdiri dari 94 °C selama 25 detik dan 67 °C selama 3 menit; diakhiri

dengan satu siklus pada 67 °C selama 7 menit. Profil elektroforesis hasil *secondary* PCR disajikan pada Gambar 3. Dari Gambar tersebut dapat dilihat adanya perbedaan pola pita DNA kedua sampel untuk masing-masing *library*, baik yang diperoleh dari hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer AP2/ GW_AGP2 maupun AP2/ GW_AGP3. Perbedaan tersebut diduga kuat disebabkan oleh perbedaan sekuen DNA yang mengakibatkan perbedaan situs restriksi, sehingga *library* yang dihasilkan pada pemotongan dengan keempat enzim restriksi juga berbeda.

Isolasi, kloning dan analisis sekuen DNA hasil PCR

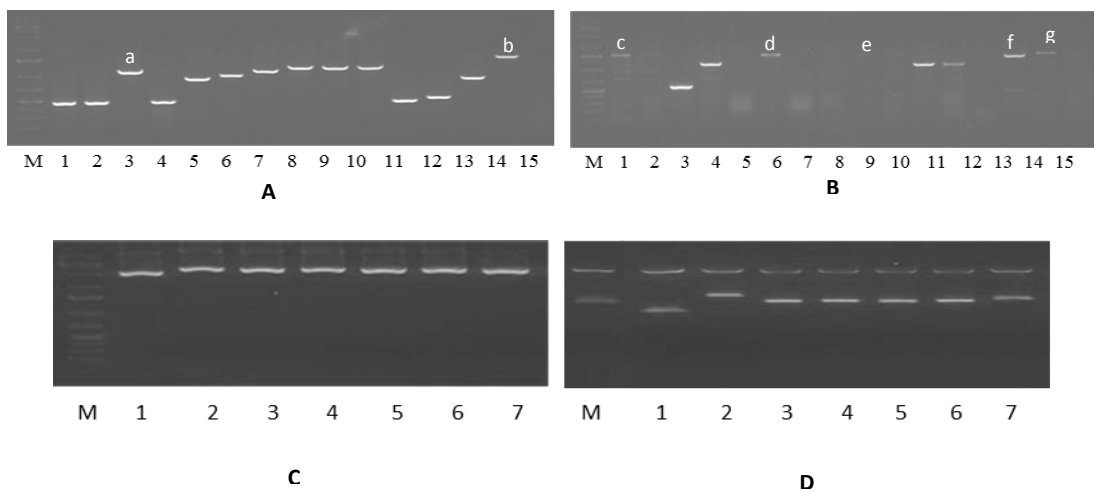
Dua fragmen DNA produk *secondary* PCR berukuran sekitar 1500 bp dan >2000 bp (Gambar 3B lajur 4 dan lajur 7) dipilih untuk diisolasi dari gel dan diklon. Fragmen berukuran sekitar 1500 bp (Gambar 3B, lajur 4 dengan lingkaran berwarna merah) berasal dari DL4 sampel MsHS, sedangkan fragmen berukuran >2000 bp (Gambar 3B, lajur 7 dengan lingkaran berwarna merah) berasal dari DL3 sampel MsLS. Pemilihan kedua fragmen tersebut didasarkan pada pertimbangan bahwa efektivitas analisis *in silico* lazim dilakukan menggunakan daerah putatif promoter 1500-2000 bp. Analisis promoter tersebut dilakukan untuk memperoleh prediksi situs-situs *cis* utama yang dekat dengan ATG (*start codon*).

Hasil analisis PCR koloni produk transformasi menggunakan kedua fragmen DNA tersebut menunjukkan keragaman ukuran fragmen DNA antar koloni yang diuji (Gambar 4A dan 4B). Oleh karena itu untuk sekuensing DNA hanya dipilih koloni yang mengandung fragmen DNA berukuran sekitar 1500 bp atau 2000 bp (a sampai g). Profil elektroforesis hasil PCR dari plasmid rekombinan yang diisolasi dari koloni tersebut disajikan pada Gambar 4C, sedangkan Gambar 4D menyajikan hasil digesti ketujuh plasmid rekombinan dengan enzim restriksi *EcoRI*.

Lajur 1 dan 2 dari Gambar 4D adalah plasmid rekombinan dari koloni hasil transformasi menggunakan fragmen produk PCR *Genome Walking* DL3 sampel MsLS, sedangkan lajur 3 – 7

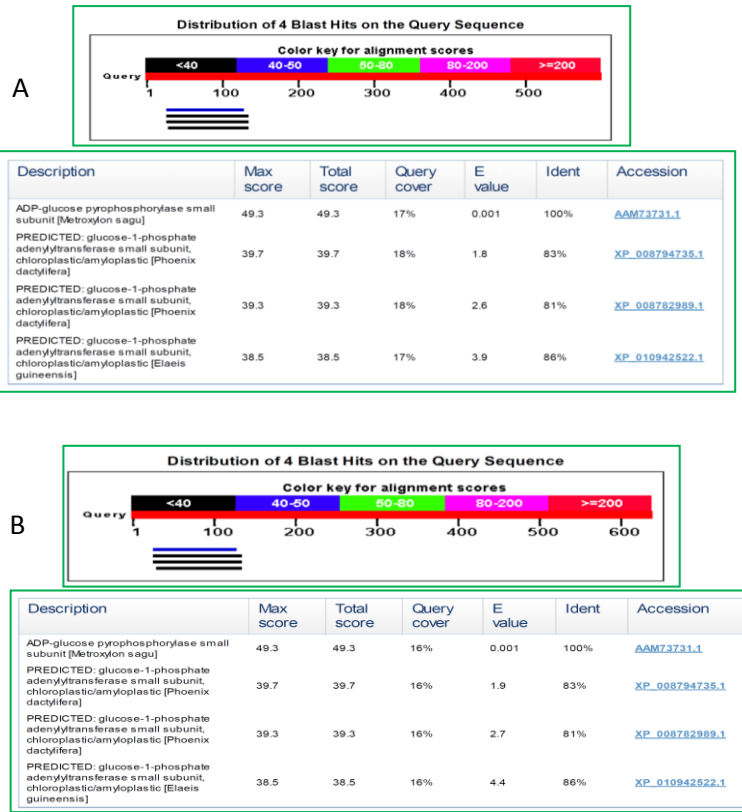
adalah plasmid rekombinan dari koloni hasil transformasi menggunakan fragmen produk PCR *Genome Walking* DL4 sampel MsHS. Berdasarkan ukuran fragmen hasil digesti, maka untuk analisis sekuen DNA sampel MsLS dipilih plasmid rekombinan dari lajur 2 (2000 pb), sedangkan untuk sampel MsHS digunakan plasmid rekombinan dari lajur 3 (1500 pb). Hasil analisis menggunakan BlastN sekuen DNA fragmen DL4 (sampel MsHS) dan DL3 (sampel MsLS) kedua fragmen DNA tersebut menunjukkan adanya sekuen DNA (16 dan 17 %) di ujung 3' yang merupakan bagian dari gen *AGP* (Gambar 5A dan 5B), sehingga dapat diprediksi bahwa bagian sekuen lainnya adalah daerah promoter gen tersebut.

Analisis *in silico* sekuen daerah promoter gen *AGP* menunjukkan bahwa kedua fragmen tersebut memiliki berbagai motif *cis acting element* yang sekaligus mengkonfirmasi bahwa fragmen tersebut adalah daerah promoter (Pro). Gambar 6 dan Gambar 7 berturut-turut menyajikan jenis dan posisi *cis acting element* pada fragmen DNA DL4 sampel MsHS dan sekuen DNA DL3 sampel MsLS. Dari kedua peta *cis acting element* tersebut, perbedaan jenis dan jumlah masing-masing *element* pada kedua sampel telah teridentifikasi (Tabel 2). Dari 18 jenis motif *cis acting element* yang teridentifikasi, 14 motif ditemukan dalam jumlah yang berbeda antara ProMsHS dan ProMsLS. Masing-masing dari keempat belas promoter tersebut memiliki fungsi spesifik seperti (sinyalisasi sitokinin, sinyalisasi giberelin, respons terhadap stres).



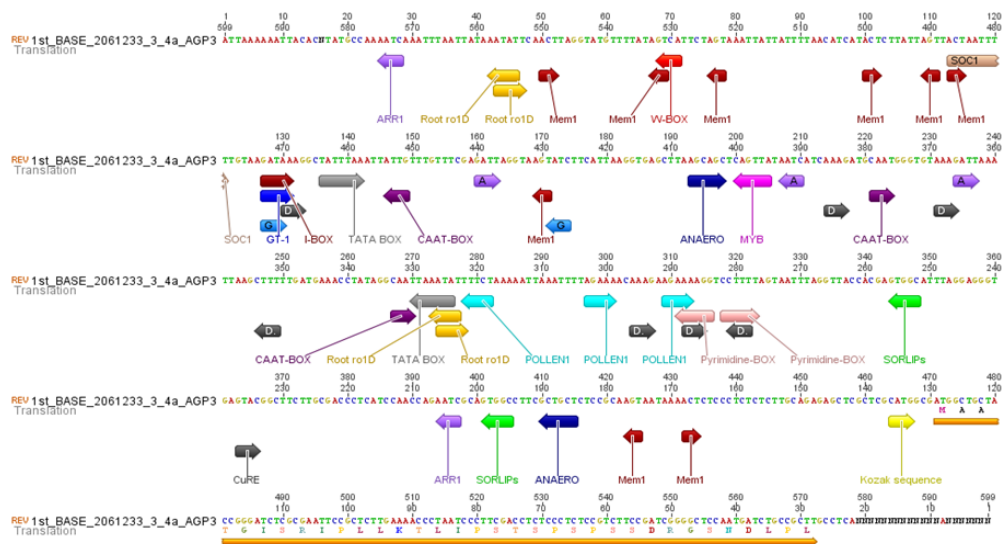
Gambar 4. Profil elektroforesis hasil PCR koloni produk transformasi dengan fragmen produk *secondary* PCR DL3 sampel MsLS (A) dan DL 4 dari sampel MsHS (B), serta hasil isolasi plasmid rekombinan (lajur 1 – 7 berturut-turut dari koloni yang membawa fragmen a-g) (C), dan hasil digesti ketujuh plasmid rekombinan menggunakan *EcoRI* (D). M= Marker DNA 1 kb plus *DNA ladder*.

Figure 4. Electrophoretic profile of colony PCR of transformation product using *secondary* PCR of DL3 from MsLS sample (A) and DL4 from MsHS sample (B), and isolated recombinant plasmids (lanes 1-7 from colonies containing DNA fragments of a – g respectively)(C), and digested recombinant plasmids using *EcoRI* (D). M= 1 kb plus *DNA ladder*.

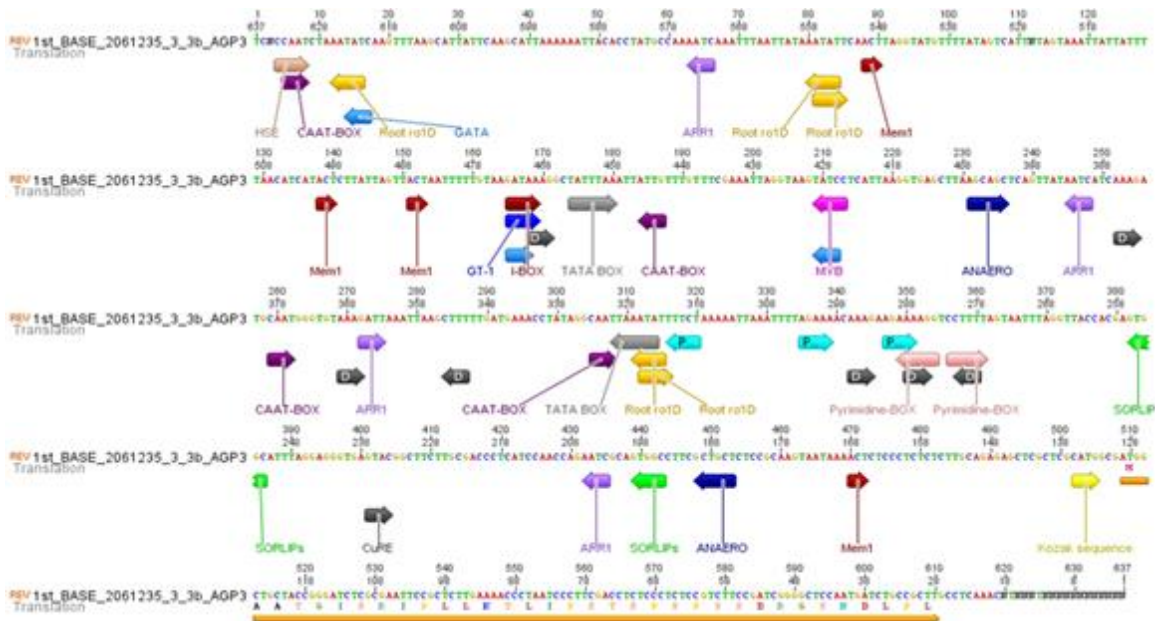


Gambar 5. Hasil analisis Blast-N sekuen DNA produk *secondary PCR Genome Walking*. (A) DL4 sample MsHS yang menunjukkan bahwa 17% dari sekuen DNA tersebut merupakan bagian dari gen penyandi AGP subunit kecil tanaman sagu. (B) DL3 sampel MsLS, yang menunjukkan bahwa 16% dari sekuen DNA tersebut adalah bagian dari gen penyandi AGP subunit kecil tanaman sagu.

Figure 5. Result of BlastN analysis of DNA sequence of the secondary PCR Genome Walking product. (A) DL4 from MsHS sample, which show that 17% of the sequence is part of gene encoding small subunit of AGP. (B) DL3 from MsLS sample, which show that 16% of the sequence is part of gene encoding small subunit of AGP



Gambar 6. Peta *cis acting elemen* pada sekuen DNA dari produk *Genome Walking* DL4 sampel MsHS.
Figure 6. Map of *cis acting element* on the DNA sequence of *Genome Walking* product DL4 MsHS sample



Gambar 7. Peta *cis* acting elemen pada sekuen DNA dari produk *Genome Walking* DL3 sampel MsLS.
 Figure 7. Map of *cis* acting element on the DNA sequence of *Genome Walking* product DL3 MsLS samp

Hasil penjajaran sekuen DNA kedua fragmen daerah promotor menunjukkan adanya empat (4) perbedaan nukleotida tunggal (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) pada 479 pb *upstream start codon* (ATG) dari kedua promotor ProMsLS dan ProMsHS yaitu pada posisi ke-16 (C/T), posisi ke-74 (G/C), posisi ke-160 (A/G) dan posisi ke-175 (C/T) (Gambar 8).

Dari Gambar 8 dapat dilihat bahwa beberapa posisi SNP bersinggungan langsung dengan motif regulasi *cis*, yaitu pada posisi basa ke-74 (G/C): *WRKY-binding element* (W-box) dengan motif inti TGAC dan *Mesophyll expression module 1* (Mem1) dengan motif inti YACT, pada posisi basa ke-160 (A/G): *Arabidopsis Response Regulator 1* (ARR1) dengan motif inti NGATT, dan pada posisi ke-175 (C/T): *MYB-binding element* (MYB) dengan motif inti CNGTTR.

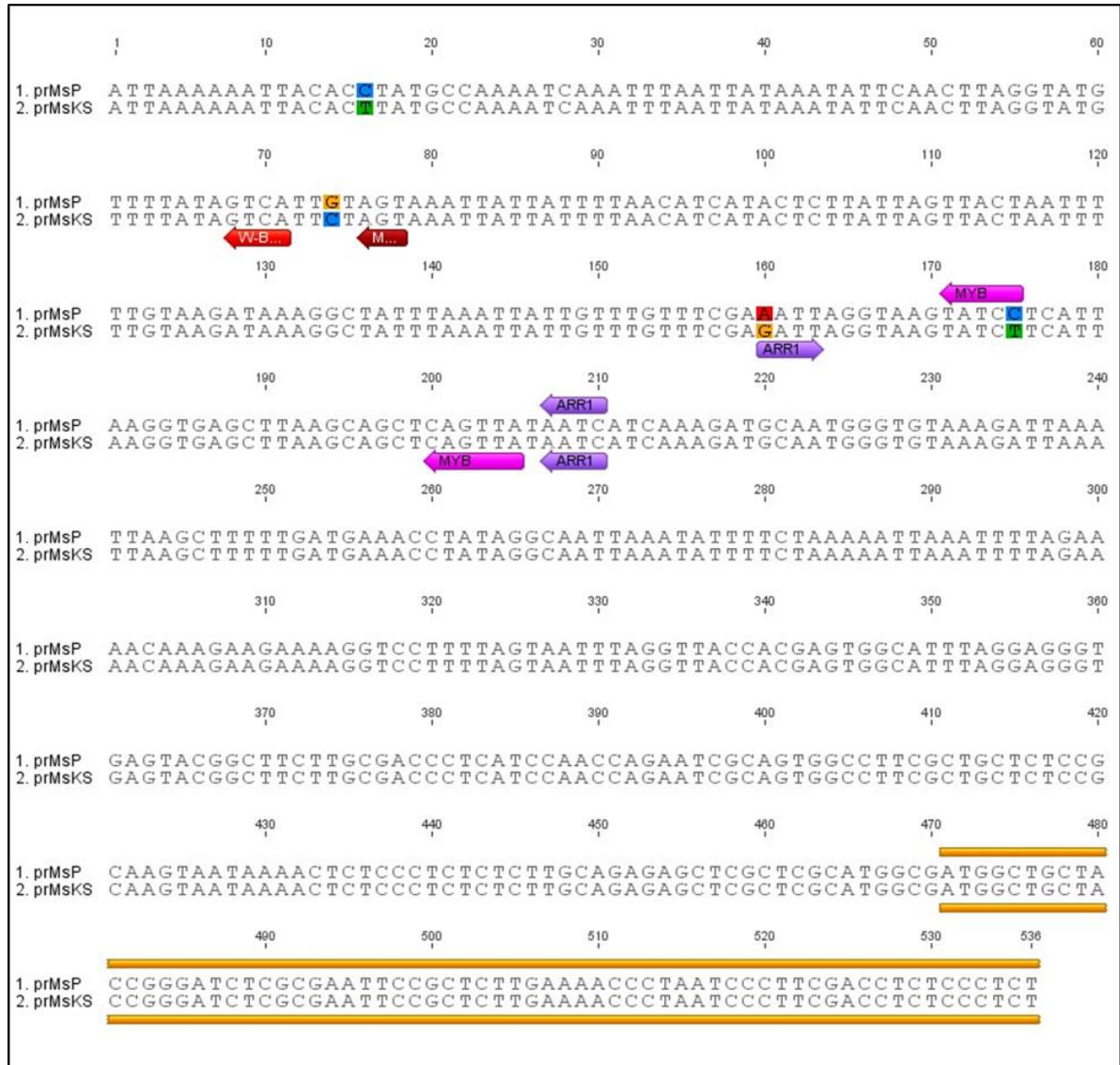
Perbedaan nukleotida tunggal dapat menyebabkan perbedaan aktivitas promotor (ekspresi gen), terlebih jika SNP tersebut terletak pada daerah motif elemen *cis*. Faktor transkripsi WRKY diketahui memiliki peran dalam merespon cekaman biotik dan abiotik pada tanaman (Chen et al., 2012). Faktor transkripsi ini diperkirakan mengatur banyak gen *downstream* yang merespon cekaman terkait. Promoter gen *MsAGP* secara *in silico* terdeteksi memiliki motif *cis* W-box sehingga besar kemungkinan faktor transkripsi WRKY mengendalikan ekspresi dari gen *MsAGP*. Motif

Mesophyll expression module 1 (Mem1) merupakan daerah dimana protein Mem1 dapat mengenali dan menempel pada DNA target untuk kemudian menginduksi atau menghambat ekspresi spesifik di mesofil daun (Akyildiz et al., 2007). Keberadaan motif ini dalam promotor *MsAGP* mengindikasikan potensi ekspresi spesifik gen *MsAGP* pada jaringan daun tanaman sagu, mengingat protein *MsAGP* merupakan salah satu dari tiga aktor penting dalam sintesis pati.

Arabidopsis Response Regulator 1 (ARR1) merupakan elemen regulasi *cis* terkait respons terhadap sitokinin. Motif tersebut merupakan lokasi pelekatan protein-protein sebagai respons terhadap sitokinin (*Cytokinin-responsive genes*) (Ross et al., 2004). Diketahui pula bahwa ARR1 merupakan aktivator dari transkripsi gen (Sakai et al., 2000). Keberadaan motif ini di daerah promotor *MsAGP* menunjukkan bahwa ekspresi tinggi gen *MsAGP* berpotensi dikendalikan oleh sinyal respon terhadap sitokinin. Sementara *MYB-binding element* (MYB) diketahui merupakan elemen regulasi *cis* yang dikendalikan oleh respon terhadap cekaman abiotik, seperti kekeringan (Urao et al., 1993) yang kemudian termasuk ke dalam elemen *cis* untuk *binding domain* gen-gen dependen ABA (Du et al., 2012). Keberadaan motif MYB di daerah promotor *MsAGP* menunjukkan adanya potensi bahwa ekspresi *MsAGP* dapat diinduksi oleh cekaman abiotik.

Tabel 2. Nama dan motif elemen *cis acting element* beserta fungsi dan jumlahnya pada sekuen DNA promoter gen AGP sampel MsLS (ProMsLS) dan sampel MsHS (ProMsHS)
 Table 2. *Name and motifs of cis acting element and its function, and number at the DNA sequence of AGP promoter of the MsLS sample (ProMsLS) and MsHS sample (ProMsHS)*

No	Nama/ Name	Motif inti/ Core motif	Fungsi potensial/ <i>Expected function</i>	Database ID	Jumlah kopi <i>/Number of copy</i>	
					ProMsLS	ProMsHS
1	ANAERO	AGCAGC	Fermentative pathways	<u>S000477, S000478, S000479</u>	2	2
2	ARR1	NGATT	Cytokinin signalling	<u>S000454</u>	4	5
3	CAAT-box	CAAT	Enhancer element	<u>S000028</u>	5	3
4	Mem1	YACT	Secondary metabolism	<u>S000449</u>	5	9
5	SOC1	CCWWWWWWGG	Flowering development	<u>S000404, S000431</u>	0	2
6	HSE	CCAAT	Heat-shock element	<u>S000030</u>	1	0
7	CuRE	GTAC	Secondary metabolism	<u>S000493</u>	2	2
8	DOF	AAAG	Multiple responses in stress and development	<u>S000265</u>	7	7
9	GATA	GATA	Light response	<u>S000039</u>	3	2
10	GT-1	GRWAAW	Light response	<u>S000198, S000453, S000051</u>	4	2
11	I-box	GATAA	Light response	<u>S000124, S000199, S000424</u>	1	1
12	MYB	CNGTTR	Multiple responses in stress and development	<u>S000176, S000180, S000502, S000408, S000181, S000167</u>	5	4
13	POLLEN1	AGAAA	Pollen specific expression	<u>S000245</u>	3	3
14	Pyrimidine box	CCTTTT	Gibberellin signalling	<u>S000259</u>	2	2
15	ro1D	ATATT	Root -specific expression	<u>S000098</u>	5	4
16	SORLIPs	GCCAC	Light response	<u>S000482, S000483</u>	2	2
17	TATA-box	TATA	Transcription regulation	<u>S000109, S000110, S000203</u>	4	4
18	W-box	TGAC	Multiple stress responses	<u>S000310, S000390, S000442, S000447</u>	0	3



Gambar 8. Penjajaran sekuen nukleotida bagian promotor proMsLS dan ProMsHS dengan menggunakan algoritma MUSCLE. Panjang daerah yang dijajarkan adalah 470 pb di depan start codon (ATG). Open reading frame (ORF) gen AGP ditandai dengan batang berwarna oranye. Batang panah pendek menandakan elemen regulasi cis. Perbedaan basa tunggal ditandai dengan perbedaan warna basa nukleotida dalam sekuen.

Figure 8. Nucleotide sequence alignment of promoter region of proMsLS and ProMsHS using MUSCLE algorithm. The length of region aligned is 470 bp in front of start codon (ATG). Open reading frame of the AGP gene is marked by orange bar. Short arrowed bars indicate cis acting elements. Differences in single nucleotide are showed by color mark on the sequence.

Kesimpulan

Fragmen DNA daerah promotor dari gen penyandi ADP glucose phyrophosphorylase (AGP) dari tanaman sagu rendemen pati tinggi dan rendemen pati rendah telah diisolasi dan diklon. Hasil analisis *in silico* cis-acting element dari sekuen DNA parsial hasil sekuensing fragmen DNA produk

Genome Walking kedua sampel menunjukkan bahwa kedua fragmen DNA tersebut memiliki berbagai motif spesifik yang mengkonfirmasi bahwa fragmen tersebut adalah daerah promotor gen AGP. Terdapat perbedaan pada jenis dan jumlah *cis element* serta SNP antara kedua promotor yang diduga ikut secara tidak langsung mempengaruhi ekspresi gen AGP.

Daftar Pustaka

- Abbas B, Bintoro MH, Sudarsono, Surahman M & Ehara H (2009). Genetic relationship of sago Palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) in Indonesia based on RAPD markers. *Biodiversitas* 10(4), 168 – 174.
- Abbas B & H Ehara (2012). Assessment genetic variation and relationship of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) in Indonesia based on specific expression gene (Wx genes) markers. *African J Plant Sci.* 6(12), 314-320.
- Akyildiz M, U Gowik, S Engelmann, M Koczor, M Streubel & P Westhoff (2007). Evolution and function of a *cis*-regulatory module for Mesophyll-Specific gene expression in the C(4) dicot *Flaveria trinervia*. *The Plant Cell* 19, 3391-402.
- Bintoro MH (2011). Progress of sago research in Indonesia. *Proc. of the 10th International Sago Symposium*. Bogor, 29 – 31 October 2011, 16-23.
- Budiani A, I Riyadi, H Minarsih, Sumaryono & B Abbas (2014). Identifikasi molekuler tanaman sago rendemen pati tinggi dan rendemen pati rendah dengan teknik RAPD. Seminar Insinas. Bandung 1-2 Oktober 2014.
- Budiani A, RA Putranto, H Minarsih, I Riyadi, Sumaryono & B Abbas (2015). Ekspresi dan kloning gen penyandi ADP-Glucose Phosphorylase dari tanaman sago (*Metroxylon sagu* Rottb.). *Menara Perkebunan* 83(2), 76-85.
- Chen L, Y Song, S Li, L Zhang, C Zou & D Yu (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochem Biophys Acta* 1819, 120-8.
- Du H, SS Yang, Z Liang, BR Feng, L Liu, YB. Huang & YX Tang (2012). Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean. *BMC Plant Biol* 12, 1-22.
- Fasahat P, S Rahman & W Ratnam (2014). Genetic controls on starch amylose content in wheat and rice grain. *J Genetic* 93(1), 279-292.
- Geigenberger P (2011). Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiology* 155, 1566–1577. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/348140>.
- Ibrahim ER, Md A Hossain & HA Roslan (2014). Genetic transformation of *Metroxylon sagu* (Rottb.) cultures via Agrobacterium-Mediated and Particle bombardment. *BioMed Research International* Vol 2014, Article ID 348140, 9 pages
- Jeon JS, N Ryoo, TR Han, H Walia & Y Nakamura (2010). Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol and Biochem* 48, 383-392.
- Masouleh AK, DLE Waters, RF Reinke, R Ward & RJ Henry (2012). SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice. *Scientific Reports* 2,557, 1-9.
- McClatchey W, HI Manner & CR Elevitch (2006). *Metroxylon amicarum*, *M. paulcoxii*, *M. sagu*, *M. salomonense*, *M. vitiense* and *M. warburgii* (Sago palm). Aracaceae (palm family). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. www.traditionaltree.org
- Ohmi M (2010). Utilization of sago starch as an industrial material *In: Sago Palm as the resource crop in the 21st century* (The society of sago palm studies ed.) Kyoto University press. Kyoto 275 - 287.
- Orozco-Castillo C, Chalmers KJ, Waugh R & Powell W (1994). Detection of genetic diversity and selective gene in coffee using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 87, 332-339
- Putranto RA, C Duan, Kuswanhadi, T Chaidamsari, M Rio, P Piyatrakul, E Herlinawati, J Pirrello, F Dessailly, J Leclercq, F Bonnot, C Tang, S Hu & P Montoro (2015). Ethylene response factors are controlled by multiple harvesting stresses in *Hevea brasiliensis*. *PLoS ONE* 10, e0123618.
- Ross EJ, Stone JM, Elowsky CG, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Sarath G (2004). Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. *J Exp Bot* 55, 1721-31.
- Sakai H, Aoyama T, Oka A (2000). Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *The Plant Journal* 24, 703-11.
- Sestili F, E Botticella, Z Bedo, A Phillips & D Lafiandra (2009). Production of novel allelic variation for genes involved in starch biosynthesis through mutagenesis. *Molecular Breeding* 25, 145-154.
- Slade AJ, C Mcguire, D Loeffler, J Mullenberg, W Skinner, G Fazio, A Holm, KM Brandt, MN Steine, JF Goodstal & VC Knauf (2012). Development of high amylose wheat through TILLING. *BMC Plant Biology* 12,69. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/12/69>.
- Sumaryono, I Riyadi, & PD Kasi (2009). Clonal propagation of Sago Palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) through tissue culture. *J Appl and Industrial Biotechnol in Tropical Region* 2(1), 1-4.

Tetlow IJ, MK Morell & MJ Emes (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* 55, (406) , 2131–214.

Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K (1993). An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *The Plant Cell Online* 5, 1529-39.

Wee CC & HA Roslan (2012). Expressed sequence tags (ESTs) from young leaves of *Metroxylon sagu*. *Biotech* 2, 211–218.

Yamamoto Y (2011). Starchproductivity of sago palm and the related factors. *Proc. of the 10th International Sago Symposium*. Bogor, 29 – 31 October 2011, p. 9-15.