

## Analysis Of ZDS and LCYb Enzyme Coding Gene Related To Beta Carotene Biosynthesis in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using Reverse transcription PCR (RT-PCR)

Jihan Rezi Okanti<sup>1</sup>, Dwi Hilda Putri<sup>1</sup>, Ahmad Fathoni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, Air Tawar Barat, Padang 25131, West Sumatra, Indonesia

<sup>2</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911

email : [jihanrezio@gmail.com](mailto:jihanrezio@gmail.com)

**Abstrack.** This study aims to determine variations in the expression of ZDS and LCYb enzymes encoding several types of yellow tubers. Cassava used, namely Carvita 25, Nangka and Mentega 2 (yellow bulb) and Menti (white bulb) were used as controls. The target enzyme coding genes (ZDS and LCYb) in cassava were identified in an online database, Phytozome using the BLAST method. Design and primary analysis for the target genes were carried out using online software, OligoAnalyzer and PCR. The expression of the target enzyme coding gene was analyzed using the Reverse Transcription PCR (RT-PCR) method. The BLAST results in the cassava genome in the Phytozome database showed that the enzymes ZDS and LCYb in cassava were encoded by two genes. The primary optimization results showed the primary annealing temperature for the LCYb enzyme coding gene was 55 ° C. The ZDS primers were not amplified after several replications, so that only the LCYb enzyme coding gene was selected for qualitative gene expression analysis using RT-PCR. Futhermore, positive control in the analysis of gene expression is the housekeeping gene, PP2A. Electrophoresis results of PCR products (RT-PCR) showed negative results (no DNA bands were detected) in all samples from both yellow and white tuber samples and its housekeeping gene. This is possible from the low quality of RNA used in cDNA synthesis.

**Keywords:** cassava, beta caroten, gene expression, housekeeping gene, reverse transcription.



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2020 by author

### 1. PENDAHULUAN

Ubi kayu merupakan salah satu tanaman pangan yang dimanfaatkan sebagai sumber karbohidrat. Ubi kayu memiliki karbohidrat yang tinggi dalam umbinya. Namun kandungan nutrisi lainnya seperti protein, beta karoten dan mineral dari varietas ubi kayu yang banyak digunakan saat ini rendah. Hal tersebut menjadi saalah satu kelemahan penggunaan ubi kayu sebagai bahan pangan berkualitas (Ceballos et al., 2012). Penelitian untuk mengembangkan jenis ubi kayu berkarakter unggul nutrisi menjadi sangat penting sehingga

ubi kayu dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan utama. Penelitian yang dilakukan oleh (Ramadanti & Putri, 2019) telah mengoptimasi elektroforesis untuk analisis genotype varietas ubi kayu

Beta karoten adalah prekursor vitamin A yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan reproduksi, kesehatan kulit, membran mukosa dan kesehatan mata (Hartati, Hani, & Supatmi, 2012). Beta karoten pada tanaman ubi kayu dikendalikan oleh beberapa gen dan kandungan beta karoten dapat ditingkatkan melalui perbaikan genetic (Iglesias, Mayer, Chavez, & Calle, 1997). Jalur biosintesis beta karoten pada ubi kayu telah diketahui meliputi beberapa tahapan reaksi yang dikatalis oleh enzim spesifik seperti *phytoene shynthase* (PSY), *phytoene desaturase* (PDS),  $\zeta$ -*caroten desaturase* (ZDS), *carotenoid isomerase* (CRTISO),  $\beta$ -*ring, lycopenebeta* (LCYb), *hidroksilase* (BCH), *zeaxanthin epoxidase* (ZEP), *Neoxanthin synthase* (NXS), dan *deoxidase violaxanthin* (VDE) (Carvalho et al., 2016). Penelitian yang dilakukan oleh (Putri, Anika, & Wahyuni, 2019) melakukan analisis bioinformatik gen Lcy  $\alpha$  and Lcy  $\beta$  ubi kayu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua gen ini memiliki hubungan yang dekat dengan gen yang sama dari tanaman *Durio zibethinus*.

Kandungan beta karoten bervariasi tergantung dari jenis ubi kayu. Hal ini menunjukkan bahwa gen-gen yang berperan dalam biosintesis beta karoten pada ubi kayu diduga memiliki tingkat ekspresi yang berbeda-beda di dalam umbi. Di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, beberapa jenis ubi kayu telah diidentifikasi memiliki kandungan beta karoten yang cukup tinggi terutama yang memiliki warna daging umbi kuning. Namun profil ekspresi gen yang berperan dalam jalur biosintesis beta karoten pada jenis ubi kayu tersebut belum semuanya terkarakterisasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi gen penyandi enzim yang terlibat dalam biosintesis beta karoten antara lain ZDS dan LCYb secara kualitatif pada beberapa jenis ubi kayu menggunakan metode Transkripsi-balik (*Reverse Transcription*) PCR (RT-PCR).

## 2. Bahan dan Metode

Sampel ubi kayu berumbi kuning (jenis ubi kayu Carvita 25, Nangka dan Mentega 2) dan jenis ubi kayu berumbi putih (Menti) sebagai kontrol diperoleh dari lahan koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI. Target gen adalah Cassava4.1\_004265 dan Cassava4.1\_004296 (Carvalho et al., 2016). Sekuens gen target diperoleh dari *database online* (phytozome 12) pada fitur *Manihot esculenta database*. Primer didesain berdasarkan criteria (Dieffenbach, Lowe, & Dveksler, 2008), parameter dalam desain primer yaitu panjang primer, GC *content* dan *temperature melting* (Tm) (Kadri, 2018). Kriteria dapat dilihat melalui situs web oligoanalyzer (<https://sg.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Spesifitas primer dianalisis dengan melakukan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) *search* sekuen primer di *database* genom ubi kayu melalui phytozome 12.

Pasangan primer dicek suhu *annealing* optimum menggunakan *gradient* PCR, dimana primer digunakan dalam reaksi PCR pada suhu yang berbeda-beda pada saat yang bersamaan. Reaksi PCR dalam 25  $\mu$ l yang terdiri dari 1  $\mu$ l *template*, 1  $\mu$ l *forward* dan *reverse* primer, 2.5  $\mu$ l 10x *reaction buffer* (SMOBIO, Inc), 2  $\mu$ l dNTPs (SMOBIO, Inc), 0.125  $\mu$ l *taq polymerase* dan 17.375  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O (Invitrogen). Siklus suhu PCR, yaitu *initial* step 94°C selama 2 menit, dilanjutkan *denaturation* 94°C selama 30 detik, *Annealing* berkisar 55-60°C selama 30 detik, *elongation* 72°C selama 50 detik, dan *final elongation* 72°C selama 5 menit.

Isolasi RNA dilakukan dengan metode yang dikembangkan oleh Chang *et al* (1993) yang telah dimodifikasi. Tabung berukuran 1.5 ml disiapkan dan diberi label sesuai nama

sampel. Larutan stok A (buffer ekstraksi) dimasukkan dan ditambahkan 2% *mercaptoethanol*. Setiap sampel ubi kayu 100 mg digerus hingga halus menggunakan nitrogen cair dan tambahkan PVP secukupnya. Sampel ubi kayu yang telah menjadi bubuk masukkan ke larutan larutan stok A yang telah dipanaskan dan diinkubasi pada suhu 65°C. Setelah itu tambahkan *chloroform* : Isoamyl alcohol (IAA) (24:1) disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm dan suhu 4°C. supernatan di ambil sebanyak 600 µl dan pindahkan ke dalam tabung yang sudah dilabel lalu tambahkan *chloroform:Iso Amil Alkohol* (IAA) (24:1) dan disentrifugasi dengan kecepatan dan suhu yang sama. supernatan dipindahkan ke tabung baru dengan ditambahkan isopropanol dan 3M LiCl. Seluruh sampel diinkubasi pada suhu 4°C semalaman. Setelah diinkubasi semalaman, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm suhu 4°C, buang supernatan dan tinggalkan pelet, tambahkan *nuclease-free water* (Invitrogen) dan LiCl lalu diinkubasi. Sampel disentrifugasi kemudian supernatan dibuang dan tinggalkan pelet dalam tabung. Pelet ditambahkan *nuclease-free water* (invitrogen), *sodium acetat*, *ethanol absolut* dan diinkubasi. Selanjutnya, supernatan dibuang dan keringkan pelet selama 1 jam. Pelet dilarutkan dengan 50 µl *RNAse-free water*. Sampel disimpan disuhu -80°C sampai akan digunakan.

Untuk kualifikasi RNA total, hasil isolasi sampel RNA di elektroforesis dalam gel agarosa 1% dalam larutan penyangga TAE 1X. RNA yang dicek, sampel ditambahkan *loading dye* dengan perbandingan 2:1 ke dalam sumur gel agarosa. Elektroforesis diatur selama 45 menit dengan tegangan 80 V. Selanjutnya gel hasil elektroforesis diletakkan diatas UV-transluminator dan difoto untuk didokumentasi.

Sedangkan untuk kuantitas RNA total, hasil isolasi sampel RNA diukur menggunakan nanofotometer (nanodrop), diambil sebanyak 4 µl, dan diletakkan diatas kaca penampungan sampel. Kuantitas RNA terdeteksi berupa ng/µl dengan asorbansi A260/A280, kemurnian berkisar 2.0

Sintesis cDNA menggunakan Kit ReverTra Ace® QPCR RT Master Mix with gDNA Remover dari TOYOBO. cDNA diperoleh dengan melakukan sintesis cDNA dari RNA total yang telah diisolasi sebelumnya. Reaksi sintesis cDNA dilakukan dalam 10 µl reaksi yang terdiri dari 2 µl 4x DN Master Mix, 2 µl RNA, dan 6 µl ddH<sub>2</sub>O. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Sebanyak 2 µl 5x RT Master Mix II ditambahkan ke dalam campuran sebelumnya, sehingga total volume akhir 12 µl. cDNA disintesis pada reaksi yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, suhu 50°C selama 5 menit dan suhu 98°C selama 5 menit. cDNA disimpan pada suhu 4°C. cDNA langsung dipakai untuk reaksi selanjutnya.

Komposisi 25 µl untuk 1x reaksi yaitu, 3 µl *loading dye*, 2.5 µl 10x *buffer reaction* (SMOBIO,Inc), 2 µl dNTPs (SMOBIO,Inc), 0.125 µl *taq polymerase*, 14.375 µl ddH<sub>2</sub>O (Invitrogen), 1 µl primer *forward* dan *reverse* dan 1 µl cDNA. Hasil produk RT-PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada tegangan 80 V selama 1 jam. Gel divisualisasikan menggunakan UV-Transluminator.

### 3. Hasil dan Pembahasan

#### A. Keragaman gen penyandi ZDS dan LCYb

Keragaman gen memanfaatkan informasi dari *database* yang dapat diakses melalui internet. Gen penyandi enzim ZDS dan LCYb ditemukan dalam tanaman ubi kayu. Enzim ZDS di kode oleh dua gen yaitu Manes08G128100.1 dan Manes09G155800.1, Sedangkan LCYb di kode oleh satu gen yaitu Manes12G071600.1. Untuk menemukan daerah

terkonservasi dari gen tersebut telah dilakukan analisis BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) dengan memasukkan sekuen gen ubi kayu yang diperoleh dari phytozome *database*. Menurut (Neumann, Kumar, & Shalchian-Tabrizi, 2014) analisis BLAST dilakukan dengan melihat parameter skor lebih dari 150 dan E. value yang kurang dari  $10^{-4}$  atau mendekati nilai nol (0), maka tingkat homologi yang dihasilkan cukup baik. Semakin tinggi skor, maka tingkat homologinya semakin baik, semakin rendah E value maka semakin baik pula tingkat homologinya.

Tabel 1. Hasil BLASTN gen ZDS dan LCYb yang diperoleh dari database Phytozome.

No	Defline	Score	E-Value	Description/Pathways	Alias	Sequences	Identity (%)
1	Chromosome 08	3252	0.0	Trans lycopene biosinthesys	Cassava4.1_004265(Manes08G128100.1)	Genomic : 7803 Transcript sequence : 2442 CDS : 1761 Peptide sequence : 586	100
2	Chromosome 09	1635	0.0	- Trans lycopene biosinthesys - Zeta karotene desaturase	Cassava4.1_004265 (Manes09G155800.1)	Genomic : 2760 Transcript sequence : 1101 CDS : 885 Peptide sequence : 294	100
3	Chromosome 12	3241	0.0	- Beta karoten biosintesis - Lycopene beta cyclase	Cassava4.1_004296 (Manes12G071600.1)	Genomic : 8451 Transcript sequence : 2184 CDS : 1755 Peptide sequence : 584	100

Dari hasil BLAST search pada Phytozome terhadap beberapa tanaman lain seperti *Daucus carota* (wortel), *Ricinus communis* (jarak), dan *Carica papaya* (pepaya) menunjukkan bahwa enzim ZDS dan LCYb juga memiliki keragaman yang rendah. Hasil BLASTN gen ZDS dan LCYb pada tanaman lain dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil BLASTN gen ZDS dan LCYb pada tanaman lain yang di peroleh dari database Phytozome

Jenis Enzim	Accession Number	Max Score	Total Score	Query Cover (%)	E Value	Identity (100%)	Pathways
ZDS	<i>Daucus carota</i> _DCAR V2_Chr7	1282	1282	87	0.0	81.68	Trans lycopene biosinthesys
	<i>Daucus carota</i> _DCAR V2_Chr2	1203	1203	85	0.0	81.17	Trans lycopene biosinthesys

<b>ZDS</b>	<i>Ricinus communis_30128_M008623</i>	339	718	63	2.0	90.59	Trans lycopene biosinthesys
<b>LCYb</b>	<i>Carica papaya_Superco ntig_1324</i>	516	516	35	4.0	81.72	-beta karoten biosinthesys - lutein biosinthesys

Gen penyandi enzim ZDS (Manes08G128100.1) pada tanaman *Daucus carota* disandi oleh 2 gen dengan *accession number* *Daucus carota\_DCARV2\_Chr7* dan *Daucus carota\_DCARV2\_Chr2*. *Daucus carota\_DCARV2\_Chr7* yang mana memiliki total score terbesar 1282, E value 0.0, *query cover* 87% dan kesamaan (*identity*) 81.68%, *Daucus carota\_DCARV2\_Chr2* memiliki score sebesar 1203, *query cover* 85%, E value 0.0 dengan kesamaan 81.17%. Jenis tanaman *Daucus carota* memiliki kesamaan homologi dan urutan basa DNA yang baik dengan gen penyandi enzim ZDS (Manes08G128100.1). Sedangkan gen penyandi enzim ZDS (Manes09G155800.1) di kode satu gen pada tanaman *Ricinus communis* dengan *accession number* (*Ricinus communis\_30128\_M008623*) memiliki total skor 718, *query cover* 63%, E value 2.0 dan kesamaan (*identity*) 90.59%. Jenis tanaman *Ricinus communis* memiliki kesamaan homologi yang cukup baik dengan gen penyandi enzim ZDS (Manes09G155800.1). Gen penyandi enzim LCYb (Manes12G071600.1) dikode satu gen ditanaman *Carica papaya* yang memiliki skor sebesar 516, *query cover* 35%, E value 4.0 dan kesamaan (*identity*) 81.72%. Jenis tanaman *Carica papaya* memiliki kesamaan homolog yang hampir mendekati dengan gen penyandi enzim LCYb (Manes12G071600.1).

## B. Desain Primer dan optimasi

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan analisis PCR atau RT-PCR adalah primer yang spesifik. Primer *forward* dan *reverse* yang telah dirancang mengacu pada beberapa kriteria antara lain kandungan GC *content* sebesar 40-60%, panjang primer 19-24 bp, dan *temperature melting* 50-60°C. Tabel 3 menunjukkan hasil desain primer untuk gen penyandi kedua enzim target yaitu ZDS dan LCYb.

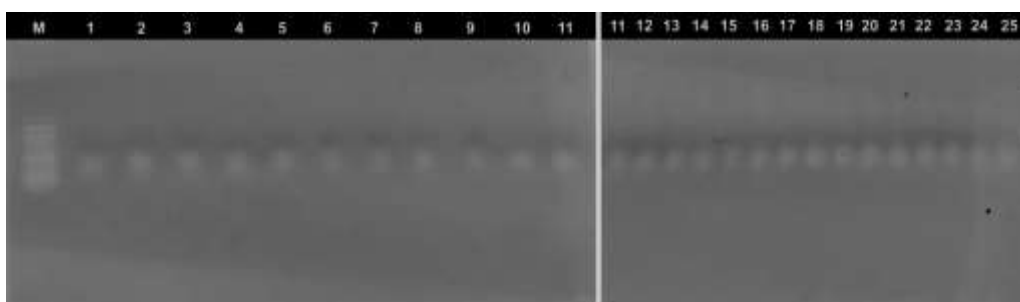
Spesifitas umumnya dikendalikan oleh panjang primer dan suhu *annealing* dari reaksi PCR. Panjang primer antara 18-24 bp cenderung spesifik jika suhu *annealing* dari reaksi PCR diatur dengan tepat dalam beberapa derajat dari *temperature melting*. Selain itu urutan nukleotida pada ujung 3' sebaiknya G atau C, nukleotida A atau T lebih toleran terhadap *mismatch* dari pada G dan C, sehingga dapat menurunkan spesifitas primer (Dieffenbach et al., 2008).

Mendapatkan hasil PCR yang optimal perlu dilakukan optimasi proses PCR (Syamsurizal, 2019). Secara umum optimasi proses PCR dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut. Optimasi ini berkaitan dengan faktor-faktor seperti suhu, konsentrasi dan waktu (Dieffenbach et al., 2008).

Tabel 3. Hasil desain primer gen penyandi enzim ZDS dan LCYb pada ubi kayu yang digunakan pada analisis RT-PCR.

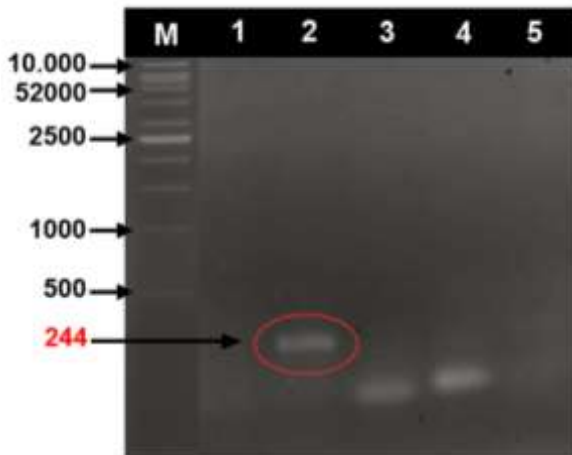
PRIMER	URUTAN BASA	TEMPERATUR MELTING (°C)	G+C (%)	PANJANG PRIMER (bp)	PANJANG PRODUK (bp)	POSISI
ZDS1	<i>Reverse 1</i>	ACG GTT ACA ACA GGG ACT	54.3	52.6	19	1151-1172
	<i>Forward 1</i>	CCA GAT GTT TAC TTG AGT GGT C	53.2	45.5	22	249 851-904
ZDS1	<i>Reverse 2</i>	CCT GCC CCG TTT ATC TTC AAT	54.8	47.6	21	901-939
	<i>Forward 2</i>	AGT CGT GAA GGC CCT TGT TG	57.8	55	20	265 601-653
ZDS2	<i>Reverse 1</i>	GAG CAT GCG TAG TAG GGA AG	55.1	55	20	473-459
	<i>Forward 1</i>	CGG TTT CCA ATT GGA GCT CG	56.4	55	20	666 501-545
ZDS2	<i>Reverse 2</i>	GAC ATG GCA AGT CCT GTG A	54.9	52.6	19	575-596
	<i>Forward 2</i>	GTT GTG AAG GCG CTT GTT AG	54.4	50	20	296 229-281
LCY B	<i>Reverse 1</i>	GAC AAT GCC GAC TCG AAG A	54.8	52.6	19	361-406
	<i>Forward 1</i>	AGG ATA ATG GAG AGC ATT GCA G	54.9	45.5	22	244 121-151
LCY B	<i>Reverse 2</i>	CTG CAT ACT CTG GAA ATT GAC ATG	54.1	41.7	24	1381-1443
	<i>Forward 2</i>	CTT GAT GCA GAC AGT TTG TC	51.7	45	20	109 1261-1311

Untuk mengetahui suhu *annealing* optimum primer pada kondisi suhu *annealing* berbeda-beda di waktu yang bersamaan yaitu 55,56,57,58,59,60 °C (Gambar 1) yang juga dikenal dengan metode *gradient* PCR.



Gambar 1. Optimasi primer menggunakan suhu yang berbeda-beda (55, 56, 57,58, 59 dan 60 °C).

Setelah melakukan optimasi suhu annealing dengan menggunakan metode PCR gradient diperoleh suhu optimum pada 55°C (Gambar 2). Selain mendapatkan suhu *annealing* yang terbaik, juga dapat diketahui hasil spesifitas primer dari hasil desain primer. Hasil optimasi suhu *annealing* dan spesifitas primer dapat dilihat melalui hasil elektroforesis dengan gel agarosa 1% yang dapat dilihat pada Gambar 2.



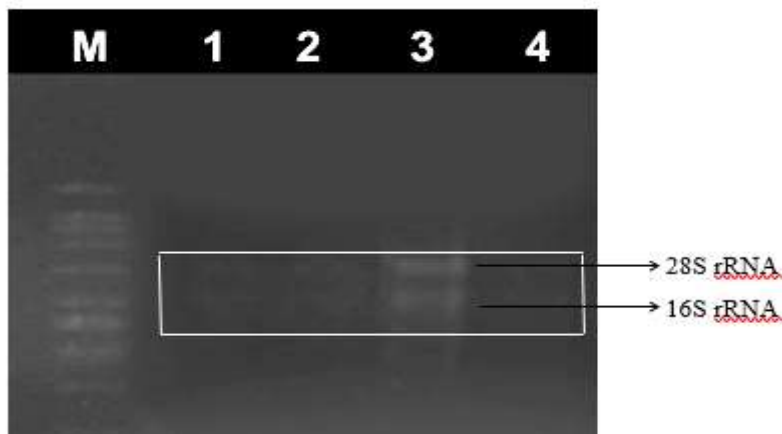
Gambar 2. Hasil optimasi desain primer dan *housekeeping gene* PCR pada suhu 55 °C yang telah di elektroforesis dilihat melalui UV-transluminator. M = marker, lajur 1 merupakan ZDS 1 primer 1, lajur 2 merupakan LCYb primer 1, lajur 3-5 merupakan *housekeeping gene* (UBQ, PP2A dan Hygro).

Hasil optimasi primer gen ZDS dan LCYb menggunakan gradient PCR diperoleh dari annealing optimum pada suhu 55 °C, sehingga pada analisis RT-PCR akan digunakan suhu annealing sesuai hasil optimasi tersebut seperti pada gambar 2. Namun setelah melakukan beberapa kali percobaan ZDS tidak juga dapat dilihat melalui UV-transluminator (Gambar 2). Oleh sebab itu, untuk proses reverse transkripsi akan dipilih primer LCYb dan PP2A.

### C. Isolasi RNA total.

RNA merupakan senyawa berasal dari bahan genetik dan memiliki peran utama dalam ekspresi gen. Kualitas RNA yang dihasilkan dianalisis melalui visualisasi RNA total pada gel agarosa hasil elektroforesis menunjukkan dua buah pita.

Menurut Rapley dan Hepstintall (1998), dua buah pita tersebut menunjukkan bahwa RNA ribosomal (rRNA) jenis 16 dan 28 yang merupakan komponen terbanyak dalam RNA total.



Gambar 4. Hasil isolasi RNA umbi ubi kayu dari tiga perwakilan varietas yaitu lajur 1 dan 2 merupakan varietas menti, lajur 3 merupakan varietas Nangka, dan lajur 4 merupakan varietas Carvita.

Visualisasi hasil isolasi RNA total dari empat varietas ubi kayu (Gambar 3) menunjukkan dua pita yang memiliki ribosomal RNA jenis 16S dan 28S. Sedangkan isolasi

RNA total umbi ubi kayu (Gambar 4) tidak memiliki perwakilan dari varietas Mentega 2. Pada isolasi RNA total umbi ubi kayu (Gambar 2) ini juga memiliki jenis ribosomal RNA 16S dan 28S dikarenakan jenis ribosomal RNA tersebut memang terbanyak pada isolasi RNA total. Isolat RNA total yang diperoleh dalam penelitian memperlihatkan pita 16S rRNA dan 28S rRNA yang cukup jelas.

Penggunaan isolat total RNA mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan menggunakan mRNA, yaitu RNA total mempunyai jumlah persel lebih banyak dibandingkan mRNA. Proporsi rRNA yang besar dalam isolasi RNA total dapat yaitu berperan sebagai target gen RNase sehingga memperlambat digesti nonspesifik spesies mRNA (Invitrogen, 2004). Hasil isolasi RNA total ubi kayu menunjukkan tingkat kemurnian yang cukup baik. Hal ini dikarenakan tidak adanya smear pada sampel. Menurut (Bastard et al., 2002) jika ada smear disepanjang jalur migrasi RNA juga dapat menunjukkan degradasi sampel akibat kontaminan RNase selama proses isolasi RNA.

Hasil kuantifikasi dengan nano fotometer RNA total pada penelitian ini menunjukkan bahwa hasil pengukuran isolasi RNA ubi kayu berada pada tingkat konsentrasi yang cukup baik. Tabel 4 menunjukkan nilai konsentrasi yang cukup baik dan nilai purity yang didapatkan berdasarkan hasil rasio absorbansi A260/280 sebesar 2.0. Ratio 2.0 mengartikan sampel RNA memiliki kemurnian RNA yang cukup baik sebab sampel RNA yang baik memiliki absorbansi A260/280 sebesar 1.8-2.0.

Tabel 5. Hasil nanofotometer pada isolasi RNA total umbi ubi kayu.

Sampel	Konsetrasi (ng/ $\mu$ l)	$\lambda$ 260/280	$\lambda$ 260/230
Umbi ubi kayu varietas Mentega 2 (U.1.1)	30.0	1.974	0.974
Umbi ubi kayu varietas Mentega 2. Ulangan 1 (U.1.2)	112	2.022	1.567
Umbi ubi kayu varietas Menti (U.2.1)	40.4	1.804	0.981
Umbi ubi kayu varietas Menti. Ulangan 1 (U.2.2)	7.60	2.111	2.741
Umbi ubi kayu varietas Nangka (U.3.1)	28.8	2.000	1.241
Umbi ubi kayu varietas Nangka. Ulangan 1 (U.3.2)	18.8	2.238	1.469
Umbi ubi kayu varietas Carvita (U.4.1)	20.4	1.700	0.573
Umbi ubi kayu varietas Carvita. Ulangan 1 (U.4.2)	37.6	2.043	1.288

Hasil dari Tabel 5 cukup baik karena memiliki nilai absorbansi 1.8-2.0 hanya saja pada varietas Carvita memiliki absorbansi sebesar 1.700. Hal ini diduga karena ada nya kontaminan pada saat isolasi dan juga adanya kandungan DNA yang cukup banyak. Menurut (Sambrook & Russell, 2001), jika ratio A260/A280 nya rendah menunjukkan adanya kontaminan dari DNA, protein dan zat lainnya. Menurut Farrel (2005), isolat RNA murni mempunyai rasio A260/230 sebesar 2.0-2.4. Nilai rasio A260/230 dibawah atau melebihi kisaran 2.0-2.4 dapat disebabkan oleh sisa buffer  $\beta$ -merkaptotanol yang terbawa selama isolasi RNA. Rasio A260/230 yang rendah juga bisa disebabkan kontaminasi polisakarida.



Menurut (Wang & Young, 2003) kemurnian kemurnian RNA bebas dari kontaminasi protein, polisakarida dan DNA dan integritas RNA memiliki degradasi yang minimal merupakan faktoryang sangat mempengaruhi keberhasilan sintesis cDNA.

Nanofotometer ini bisa digunakan sebagai salah satu sarana untuk melihat kualitas RNA. Nanofotometer/spektrofotometer berkerja dengan cara menangkap gelombang cahaya sampel RNA yang diserap dan dikalkulasikan melalui hasil Absorbansi 260/280 dan 260/230. A260 merupakan gelombang cahaya yang berfungsi untuk menangkap RNA, sedangkan A280 merupakan gelombang cahaya yang berfungsi untuk menangkap DNA, protein, dll. Tingkat kemurnian RNA berbanding lurus dengan nilai absorbansi dan berkolerasi positif, dimana nilai ratio absorbansi sama dengan 2 maka sampel tidak terkontaminasi (Sambrook & Russell, 2001)

#### D. Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

Analisis ekspresi *housekeeping gene* biasanya digunakan untuk menormalkan ekspresi data gen. Penggunaan *housekeeping gene* perlu dalam analisis ini karena jumlahnya melimpah dalam sel ekukariotik dan diekspresikan terus menerus pada setiap tahapan perkembangan dan pada semua jaringan organisme eukariot (Dheda et al., 2004).



Gambar 5. Hasil sintesis Reverse Transkripsi PCR menggunakan dua primer (LCYB dan PP2A).

M = Marker

- |  |  |
|--|--|
| 1. Ubi kayu varietas Mentega 2 primer LCYB | 9. Ubi kayu varietas Nangka primer LCYB    |
| 2. Ubi kayu varietas Mentega 2 primer PP2A | 10. Ubi kayu varietas Nangka primer PP2A   |
| 3. Ubi kayu varietas Mentega 2 primer LCYB | 11. Ubi kayu varietas Nangka primer LCYB   |
| 4. Ubi kayu varietas Mentega 2 primer PP2A | 12. Ubi kayu varietas Nangka primer PP2A   |
| 5. Ubi kayu varietas Menti primer LCYB     | 13. Ubi kayu varietas Carvita primer LCYB  |
| 6. Ubi kayu varietas Menti primer PP2A     | 14. Ubi kayu varietas Carvitas primer PP2A |
| 7. Ubi kayu varietas Menti primer LCYB     | 15. Ubi kayu varietas Carvita primer LCYB  |
| 8. Ubi kayu varietas Menti primer PP2A     | 16. Ubi kayu varietas Carvita primer PP2A  |

Diambil empat sampel umbi ubi kayu dari varietas yang berbeda dengan menggunakan dua primer yaitu primer LCYB dan primer PP2A. Berdasarkan dari hasil tersebut tidak adanya cDNA yang teramplifikasi. Seharusnya molekul cDNA dari LCYB dan PP2A teramplifikasi pada saat visualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa. Hal tersebut diduga karena beberapa faktor pendukung seperti adanya pengotor pada saat isolasi RNA, teknik laboratorium dan kontaminasi zat kimia (reagen) yang digunakan, dan alat yang kurang steril.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bastard, J. P., Chambert, S., Ceppa, F., Coude, M., Grapez, E., Loric, S., ... Bienvenu, T. (2002). RNA isolation methods. *Annales de Biologie Clinique*.
- Carvalho, L. J. C. B., Agustini, M. A. V., Anderson, J. V., Vieira, E. A., de Souza, C. R. B., Chen, S., ... Silva, J. P. (2016). Natural variation in expression of genes associated with carotenoid biosynthesis and accumulation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage root. *BMC Plant Biology*. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0826-0>
- Ceballos, H., Luna, J., Escobar, A. F., Ortiz, D., Pérez, J. C., Sánchez, T., ... Dufour, D. (2012). Spatial distribution of dry matter in yellow fleshed cassava roots and its influence on carotenoid retention upon boiling. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.001>
- Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., & Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*. <https://doi.org/10.2144/04371rr03>
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (2008). General concepts for PCR primer design. General Concepts for PCR Primer Design PARAMETERS USED IN BASIC PCR PRIMER DESIGN. *Cold Spring Harbor Laboratory Press on May*. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>
- Hartati, S. N., Hani, F., & Supatmi, S. E. (2012). Karakter Umbi Dan Nutrisi Tujuh Genotip Ubi Kayu (*Manihot esculenta*). *Jurnal Agricola*, 2(202).
- Iglesias, C., Mayer, J., Chavez, L., & Calle, F. (1997). Genetic potential and stability of carotene content in cassava roots. *Euphytica*. <https://doi.org/10.1023/A:1002962108315>
- Kadri, H. (2018). Genotyping SNP Rs12255372 TCF7L2 Gene Using Three-Primer ARMS-PCR for Detection T2DM n Indonesian Batak Ethnic. *Journal of Physics: Conference Series*, 1040(1), 12003. IOP Publishing.
- Neumann, R. S., Kumar, S., & Shalchian-Tabrizi, K. (2014). BLAST output visualization in the new sequencing era. *Briefings in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bib/bbt009>
- Putri, D. H., Anika, M., & Wahyuni, W. (2019). Bioinformatics Study Genes Encoding Enzymes Involved in the Biosynthesis of Carotenoids Line Cassava (*Manihot esculenta*). *EKSAKTA: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 20(1), 10–16. <https://doi.org/10.24036/eksakta/vol20-iss1/161>
- Ramadanti, N. A., & Putri, D. H. (2019). The Effect of Polyacrilamide Gel Electrophoresis Duration on separation of Cassava SSR PCR Fragments. *Bioscience*, 3(1), 14–19. <https://doi.org/10.24036/0201931102868-0-00>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition. In *Molecular Cloning: a laboratory a manual*.
- Syamsurizal, S., Handayani, D., Kadri, H., & Badriyya, E. (2019). Genotyping SNP rs7903146 TCF7L2 gene for detection T2DM in Indonesian melayu ethnic. *Journal of Physics: Conference Series*, 1317(1), 12090. IOP Publishing.
- Wang, X., & Young, W. S. (2003). Rapid amplification of cDNA ends. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. <https://doi.org/10.1385/1-59259-359-3:13>