

Optimasi Primer yang Menargetkan Gen *OsAP2*, *OsERF3* dan *OsEREBP2* Menggunakan qPCR

Arifa Rizqi Nafisa¹⁾, Alfino Sebastian²⁾, Putri Wijayanti²⁾, Rosy Feraningsih Patigu¹⁾, Yekti Asih Purwestri^{1,2,*)}

Faculty of Biology, Universitas Gadjah Mada, Jl Teknika Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281¹⁾

Research Center for Biotechnology, Universitas Gadjah Mada²⁾

*corresponding author : yekti@ugm.ac.id

Paper submit : 20 September 2021, Paper publish : Maret 2022

Abstract – qPCR is an accurate method for detecting the expression of gene. Currently, analysis of the expression of genes encoding transcription factors in rice has been carried out. *OsAP2*, *OsERF3*, and *OsEREBP2* are transcription factors in rice which belong to the AP2/ERF group and play an important role in biological processes in plants. Research on analysis of the expression of genes *OsAP2*, *OsERF3*, and *OsEREBP2* in Cempo Ireng has never been done. In analyzing the expression of genes using qPCR, specific primer is needed according to the targeted gene. Primer is an important component in conducting PCR method. The failure of the primer attachment in the annealing stage causes the amplification failure. The primer optimization needs to be done to get the optimal annealing temperature. In this research, qualitative annealing temperature optimization was carried out on three genes encoding transcription factors in rice, namely *OsAP2*, *OsERF3*, and *OsEREBP2*. The optimization was carried out using cDNA as a template. While, confirmation of qPCR result was done using electrophoresis. Moreover, the optimization results showed that the optimal annealing temperatures for *OsAP2*, *OsERF3*, and *OsEREBP2* primers were respectively 56,3 °C, 60 °C, and 53,9 °C.

Keywords: qPCR, Primer Optimization, Annealing Temperature, AP2/ERF

Abstrak – qPCR merupakan metode yang akurat untuk mendeteksi ekspresi gen. Analisis ekspresi gen pengkode faktor transkripsi pada padi saat ini banyak dilakukan. *OsAP2*, *OsERF3* dan *OsEREBP2* merupakan faktor transkripsi pada padi yang termasuk kedalam kelompok AP2/ERF yang berperan penting dalam proses biologis pada tanaman. Penelitian mengenai analisis ekspresi gen *OsAP2*, *OsERF3* dan *OsEREBP2* pada Cempo Ireng belum pernah dilakukan. Dalam melakukan analisis ekspresi gen menggunakan qPCR dibutuhkan primer spesifik sesuai dengan gen yang diinginkan. Primer merupakan salah satu komponen penting dalam melakukan metode PCR. Gagalnya penempelan primer pada tahapan *annealing* menyebabkan kegagalan amplifikasi. Optimasi primer perlu untuk dilakukan untuk mendapatkan suhu *annealing* yang optimal. Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi suhu annealing secara kualitatif pada tiga gen pengkode faktor transkripsi pada padi yakni *OsAP2*, *OsERF3* dan *OsEREBP2*. Optimasi dilakukan dengan menggunakan cDNA sebagai template. Konfirmasi hasil qPCR dilakukan dengan menggunakan elektroforesis. Hasil optimasi menunjukkan bahwa suhu *annealing* optimal pada primer *OsAP2*, *OsERF3* dan *OsEREBP2* berturut - turut adalah 56,3 °C; 60 °C dan 53,9 °C.

Kata kunci: qPCR, Optimasi Primer, Suhu Annealing, AP2/ERF

PENDAHULUAN

Selama dua puluh tahun terakhir, qRT-PCR / qPCR (*Fluorescence-based quantitative real-time polymerase chain reaction*) telah menjadi pendekatan yang kuat untuk kuantifikasi ekspresi gen yang akurat (Demidenko & Penin, 2012). qPCR adalah metode yang diakui secara umum untuk analisis ekspresi gen karena ketepatan dan reproduktifitasnya pada berbagai sampel.

Ketika menggunakan qPCR untuk mengukur ekspresi gen pada tingkat mRNA, total RNA perlu diekstraksi dari sampel eksperimental dan mRNA harus dikonversi menjadi DNA komplementer (cDNA) melalui proses yang disebut transkripsi balik (sintesis cDNA) (Kuang *et al.*, 2018). Reaksi berlangsung melalui tiga reaksi berulang secara siklis: denaturasi (pemisahan untai), *annealing* (pengikatan primer), dan

permanjangan (sintesis untai baru). Pada akhir reaksi PCR, urutan target akan diperkuat dalam miliaran salinan (amplikon PCR) (Kuang *et al.*, 2018). Masing-masing langkah ini memerlukan inkubasi campuran reaksi pada suhu yang berbeda. Pada langkah denaturasi, DNA diinkubasi pada suhu 93–95°C selama 30 detik hingga 2 menit. Kemudian primer *annealing*, reaksi diinkubasi pada suhu 45–65°C selama 45 detik hingga 1 menit. Ekstensi primer dilakukan pada 72°C selama 15 detik hingga 1 menit dan melibatkan sintesis DNA, di mana primer digunakan untuk menyintesis dua untai anak baru yang melengkapi untai induk asli (Porta & Enners, 2012).

Primer merupakan salah satu komponen penting dalam melakukan metode PCR. Gagalnya penempelan primer pada tahapan *annealing* menyebabkan kegagalan amplifikasi. Suhu *annealing* merupakan faktor penting penentu keberhasilan menempelnya primer. Ketika proses PCR dilakukan dengan menggunakan suhu *annealing* yang tepat maka, primer akan menempel pada DNA template. Suhu yang digunakan dalam tahap *annealing* merupakan faktor penting keberhasilan amplifikasi DNA dengan metode PCR. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat menyebabkan ketidakberhasilan amplifikasi DNA, sedangkan suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer menempel pada tempat yang tidak spesifik. Menurut Korbic & Mattick (2008) Tahap optimasi suhu *annealing* merupakan tahap penentu keberhasilan pengukuran ekspresi mRNA.

Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi suhu *annealing* pada 3 gen pengkode faktor transkripsi pada padi yakni *OsAP2*, *OsERF3* dan *OsEREBP2*. Ketiga gen tersebut termasuk ke dalam kelompok faktor transkripsi AP2/ERF. Protein AP2/ERF merupakan salah satu kelompok protein yang berperan sebagai faktor transkripsi yang

memainkan peran penting dalam regulasi transkripsional dari berbagai proses biologi. Faktor transkripsi ini dikenal untuk mengatur beragam proses perkembangan tanaman dan respons stres (Xu *et al.*, 2011; Rashid *et al.*, 2012). Sejak tahun 2012 penelitian mengenai kelompok gen tersebut banyak dilakukan, seperti peran kelompok gen *AP2/ERF* pada padi dalam cekamana biotik maupun abiotik (Zhang *et al.*, 2013; Abiri *et al.*, 2017; Ahn *et al.*, 2017).

Pada padi, *OsERF3* berpartisipasi dalam resistensi terhadap penyakit dan respons pertahanan yang diinduksi oleh herbivora melalui mediasi jalur hormon yang berbeda (Lu *et al.*, 2011). Penelitian menunjukkan bahwa *OsERF3* berdampak negatif terhadap produksi etilen dan toleransi kekeringan pada padi. Analisis ekspresi *OsERF3* dapat digunakan sebagai isyarat molekuler tanaman dalam menanggapi hormon dan stress yang berbeda pada padi (Zhang *et al.*, 2013). *ERF3* terlibat dalam inisiasi dan perpanjangan akar mahkota (Zhao *et al.*, 2015). *OsEREBP2* memiliki peran yang mirip dengan *OsERF3* yakni dalam pengaturan etilen pada tanaman. Sedangkan, *OsAP2* merupakan faktor transkripsi yang merupakan regulator positif pada pemanjangan sel pada padi. Hasil overekspresi *OsAP2* pada padi menunjukkan adanya peningkatan inklinasi lamina dan besar bulir padi (Jang & Li, 2018).

Gen *OsAP2*, *OsERF3* dan *OsEREBP2* merupakan kelompok gen *AP2/ERF* pada padi yang memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan perkembangan padi. Studi ekspresi dari ke tiga gen pengkode faktor transkripsi pada padi tersebut perlu untuk dianalisis lebih lanjut mengenai fungsi dan tingkat ekspresinya pada tanaman padi. Primer dengan suhu *annealing* yang spesifik untuk analisis ekspresi gen tersebut perlu untuk didapatkan. Oleh sebab itu, perlu dilakukan optimasi suhu *annealing* pada

ketiga primer tersebut dengan metode qPCR. Hasil optimasi menunjukkan suhu *annealing* optimal pada ke tiga primer tersebut berada pada kisaran suhu >50 °C.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada pada Bulan Desember 2020 – Maret 2021.

1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yakni autoklaf, sentrifugator (Eppendorf), vortex, *thermal cycle* (Applied Biosystem), Nanodrop (Maestro Gen), RT-PCR (BioRad), elektroforesis, spin down, mikropipet (Eppendorf), microtube, tip biru, tip kuning, tip putih, spatula, dan mortar.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah daun Cempo Ireng Sleman, aquades, ddH₂O, *Favorgen RNA isolation kit*, *Toyobo cDNA synthesis*, nitrogen cair, β-mercaptoethanol, agarose, TBE 1x, *Nuclease Free Water* (NFW), dan Smobio Exceltaq RT-PCR.

2. Metode

Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan Favorprep Plant Total RNA Mini Kit (Favorgen) sesuai dengan prosedur yang ditetapkan. RNA hasil isolasi kemudian dicek konsentrasinya dengan Nanodrop.

Sintesis cDNA

Pertama, kebutuhan RNA dan NFW dihitung terlebih dahulu. Konsentrasi RNA terendah ditentukan berdasar hasil pengukuran terendah (minimal 50 ng). Kemudian, dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus berikut ini :

$$RNA (\mu l) = \frac{[RNA \text{ terendah}]}{[RNA \text{ terukur}]} \times 6$$

Setelah dilakukan perhitungan, selanjutnya jumlah NFW yang dibutuhkan ditentukan dari pengurangan 6 dengan nilai RNA yang diperoleh. RNA disintesis menjadi cDNA menggunakan ReversTra Ace Master Mix with gDNA Remove (Toyobo) sesuai dengan protokol.

Tabel 1. Komposisi Bahan Sintesis cDNA

Bahan	1x (μl)
4x DN Master Mix	2
RNA dan NFW	6
Enzim Reverse Transcriptase	2
Total Volume	10

Tabel 2. Kondisi PCR

Siklus	Waktu (menit)	Temperatur (°C)
Inkubasi I	5	37
	Pause	
Inkubasi I	15	37
Inkubasi II	5	50
Heating	5	98
Hold	∞	4

Tabel 3. Komposisi Reaksi PCR (ubq)

Bahan (Komponen)	Volume (μ l)
<i>Go Taq Green Mix</i>	5
<i>Primer Forward</i> (10 pM)	1
<i>Primer Reverse</i> (10 pM)	1
dH ₂ O	2
cDNA	1
Total	10

Campuran direaksikan sesuai program PCR (Tabel 2). Setelah program berjalan selama 5 menit, mesin dihentikan sementara dan campuran ditambahkan dengan enzim Reverse Transcriptase sebanyak 2 μ l (Tabel 1). Keberhasilan sintesis cDNA dilihat dengan cara mengamplifikasi *housekeeping gene* ubiquitin (ubq) (Tabel 3.).

Desain Primer

Desain primer ditujukan untuk gen *OsERF3*, *OsAP2* dan *OsEREBP2* dilakukan dengan menggunakan software yang terdapat pada prime3 plus. Adapun primer dapat dilihat pada (Tabel 4).

Tabel 4. Primer

Nama Primer	Sekuens Nukleotida
<i>OsERF3</i> AB036883.1	F:5' CAGCAGCAATAGCACGGTAG 3' R:5' GTAAGGATGCGTTGCTGGAC 3'
<i>OsAP2</i> KC988330.1	F:5' GCACCTTTGACACTGCTGAT 3' R: 5' GGTAGGGGTCGCCGAAGTAG 3'
<i>OsEREBP2</i> AJ575218.1	F: 5' CCCC GTATCGCATCCTTACT 3' R: 5' GCGGTGATGGTGCCAGAT 3'

Optimasi Primer (qPCR)

Optimasi primer dilakukan dengan menggunakan kit Smobio Exceltaq RT-PCR. Reaksi disiapkan seperti pada (Tabel 5).

Program reaksi RT-PCR mengikuti (Tabel 6). Hasil RT-PCR kemudian di elektroforesis.

Tabel 5. Komposisi Reaksi Optimasi Primer

Bahan	1x (μ l)
Kit Smobio Exceltaq RT-PCR	5
Primer R	1
Primer F	1
NFW	2
cDNA Sampel	1
Total Volume	10

Tabel 6. Program Reaksi Real Time PCR

Tahap	Suhu (°C)	Durasi (detik)	Siklus
Aktivasi Enzim	95	120	Hold
Denaturasi	95	15	
Annealing/Ekstensi /Akuisisi data	50 – 60	60	40
Disosiasi*		Mengikuti alat	

3. Analisis Data

Data diperoleh pada aplikasi bawaan mesin qPCR yakni Bio-Rad CFX Manager. Hasil yang diperoleh diamati dan dianalisis secara deskriptif

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan RNA dari sampel daun padi. Dalam melakukan isolasi atau ekstraksi RNA daun padi digerus hingga halus menggunakan nitrogen cair. Penggunaan nitrogen cair dalam hal ini berfungsi untuk menjaga agar RNA tidak rusak. Kemudian sampel ditambah dengan FARB buffer yang telah dicampur dengan β -mercaptoethanol. Menurut Ouyang *et al.*, (2014), β -mercaptoethanol berfungsi sebagai agen yang dapat mereduksi RNases dan protein kontaminan lainnya yang mungkin ada saat proses penghancuran sel dan homogenisasi.

Hasil isolasi RNA dengan menggunakan kit isolasi RNA favorprep memberikan konsentrasi yang cukup baik (Tabel 7.). Berdasarkan hasil uji nanodrop menunjukkan bahwa sampel hasil isolasi RNA memiliki konsentrasi lebih dari 50 ng/ μ l dengan kemurnian A260/230 lebih dari 2 dan A260/280 antara 1.8 – 2. Penggunaan kit ekstraksi RNA lebih mudah dilakukan dan lebih efektif menghasilkan RNA dengan konsentrasi dan kemurnian yang baik. Konsentrasi dan kemurnian RNA yang baik Menurut Yockteng *et al.*, (2013) adalah pada gelombang A260/A280 berada pada kisaran rasio 1.8 – 2.2 dan A260/A230 memiliki rasio >2.0. Apabila hasil pengukuran tidak seperti rasio tersebut maka RNA yang terbentuk masih terkontaminasi oleh protein, fenol, karbohidrat, EDTA maupun kontaminan lainnya.

Tabel 7. Konsentrasi dan Kemurnian RNA Hasil Isolasi

Sampel	Konsentrasi RNA (ng/ μ l)	A260/230	A260/280
1	63,61	2,139	1,819
2	61,34	2,169	1,841
3	58,90	2,086	1,808
4	193,67	2,182	1,954
5	91,97	2,004	1,958
6	68,06	2,109	1,902
7	111,22	2,173	1,854
8	130,51	2,129	1,966

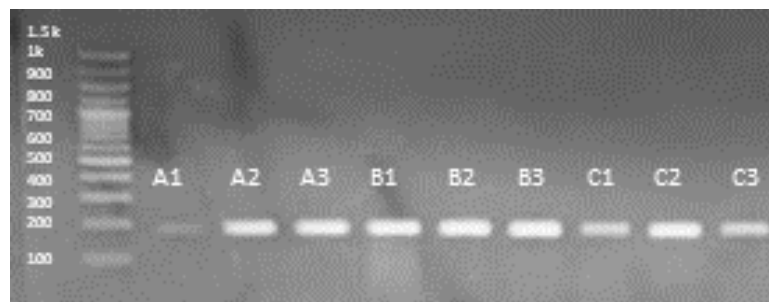
Hasil ekstraksi RNA diubah kedalam bentuk cDNA. RNA hasil ekstraksi diubah kedalam bentuk cDNA karena RNA tidak lebih stabil dan lebih mudah rusak dibanding cDNA. Proses sintesis cDNA dilakukan

dengan menggunakan kit sintesis cDNA Toyobo Master Mix. Proses sintesis cDNA dilakukan dengan cara mencampurkan kit dengan RNA yang didapat. Total RNA yang dimasukkan dan NFW yang ditambahkan

bergantung pada konsentrasi RNA yang didapatkan. Hal tersebut dilakukan agar cDNA yang terbentuk memiliki konsentrasi yang sama. Menurut Suharsono *et al.*, (2018) cDNA merupakan cetakan sintesis dari mRNA yang dibantu proses sintesisnya dengan menggunakan enzim reverse transcriptase. Hasil cDNA dapat digunakan dalam beberapa kegiatan molekular yang lebih aman dibandingkan RNA (mRNA) secara langsung. Hal tersebut dapat terjadi karena kestabilan RNA yang mudah tergedradasi oleh RNase.

Hasil sampel yang terbentuk dilakukan pengecekan terhadap UBQ (Ubiquitin) untuk memastikan keberhasilan sintesis cDNA. Hasil analisis UBQ secara

kualitatif menggunakan elektroforesis menunjukkan bahwa semua hasil isolasi berhasil diubah kedalam bentuk cDNA ditunjukkan dengan adanya pita pada gel elektroforesis dengan ukuran kurang lebih 200 bp, Menurut Wijayanti *et al.*, (2018), Untuk mengetahui kualitas cDNA yang disintesis, dilakukan amplifikasi terhadap *housekeeping gene* Ubiquitin (UBQ). Menurut Roslim *et al.* (2018), Ubiquitin termasuk kedalam gen referensi yakni gen yang ekspresinya stabil yang dapat digunakan sebagai kontrol pada analisis ekspresi gen khususnya pada tanaman. Hasil cDNA yang diperoleh digunakan sebagai template untuk optimasi primer *OsAP2*, *OsERF3* dan *OsEREBP2* menggunakan qPCR.



Gambar 1. Deteksi Ubiquitin pada cDNA Padi Cempo ireng

2. Optimasi Primer

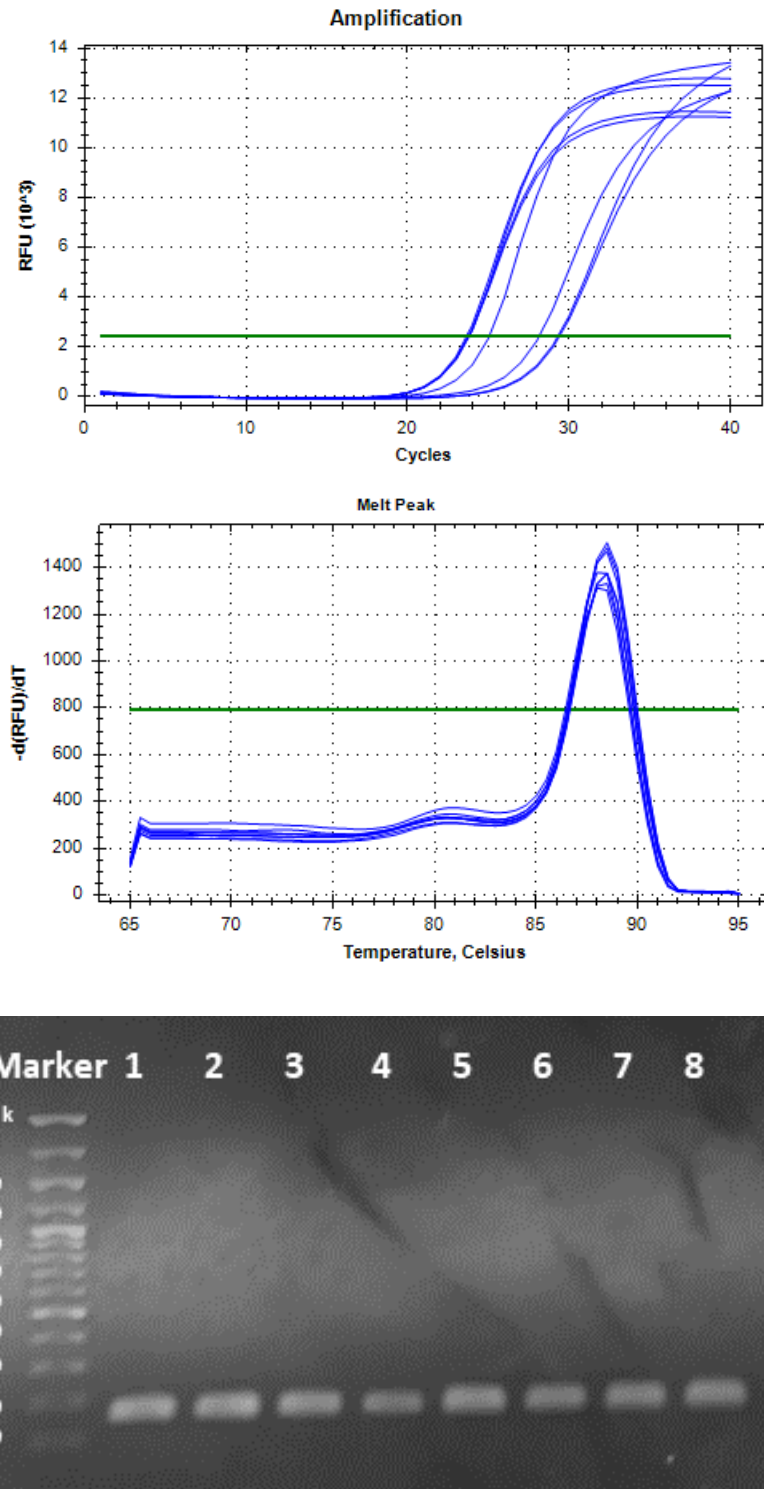
Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk mendapatkan suhu *annealing* yang optimal untuk penempelan primer *OsAP2*, *OsERF3* dan *OsEREBP2*. Optimasi suhu *annealing* ke tiga primer dilakukan secara bersamaan menggunakan qPCR. Kit yang digunakan untuk optimasi ini adalah Smobio Exceltaq qPCR. Prinsip dasar dari Optimasi primer ini adalah melakukan amplifikasi dengan beberapa suhu yang berbeda dimana suhu yang menghasilkan hasil terbaik lah yang nantinya akan digunakan. Menurut Siswanto *et al.*, (2018) optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk mendapatkan kondisi optimal dalam qPCR. Menurut

Suryanto (2003) proses penempelan primer pada DNA cetakan yang terbuka membutuhkan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu rendah mengakibatkan primer menempel pada DNA genom yang bukan targetnya. Sebaliknya suhu yang terlalu tinggi mengakibatkan proses amplifikasi tidak terjadi. Suhu penempelan primer dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer.

Pada penelitian ini rentang suhu yang digunakan untuk optimasi primer adalah 50 – 60°C. Proses *annealing* pada protokol qPCR dilakukan dalam waktu 1 menit (60 detik) dengan 39x ulangan. Menurut Thronton & Basu (2010), suhu *annealing*

optimal untuk qPCR adalah 59 – 60°C. Menurut Porta & Enners (2012), suhu *annealing* untuk penempelan primer biasanya

berada pada suhu inkubasi 45 – 60°C dengan waktu 45 – 60 detik.



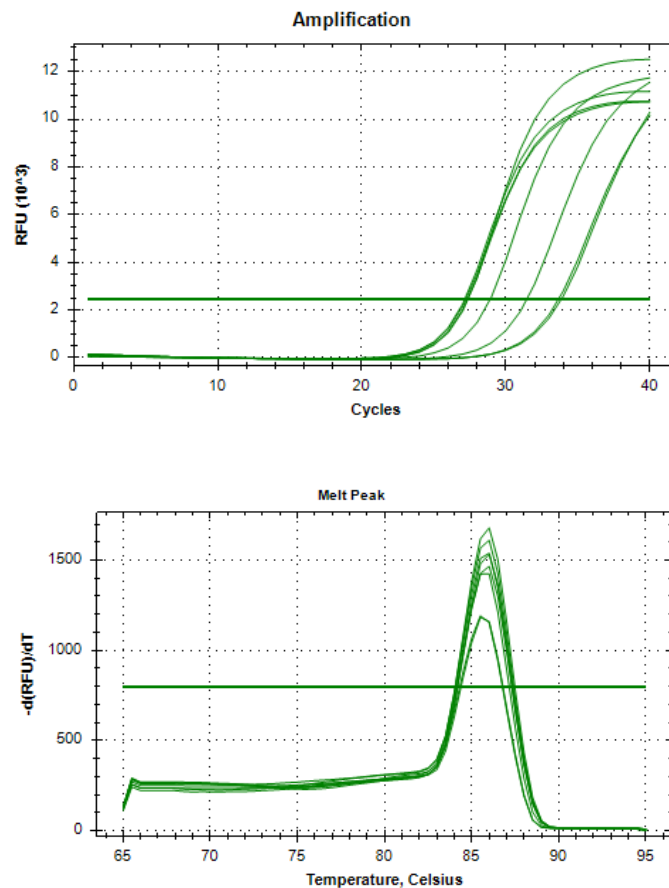
Gambar 2. Kurva amplifikasi, *Melting Peak* dan Hasil Elektroforesis *OsEREBP2* (keterangan pada nomor 1: 60°C, 2: 59,4°C, 3: 58,3°C, 4: 56,3°C, 5: 53,9°C, 6: 52°C, 7: 50,7°C, 8: 50°C)

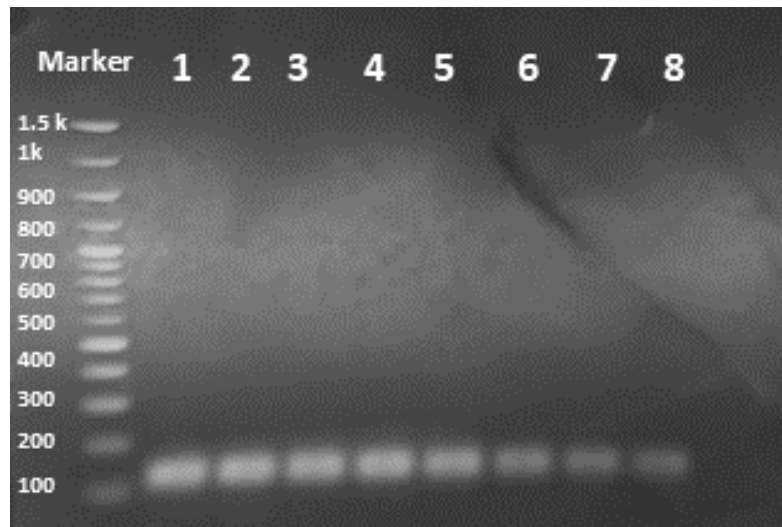
Tabel 8. Tabel Nilai Cq Optimasi Primer OsAP2, OsERF3 dan OsEREBP2

Sampel	Suhu (°C)							
	60	59,4	58,3	56,3	53,9	52	50,7	50
OsAP2	27,15	27,23	27,34	27,37	28,92	31,46	33,66	33,87
OsERF3	27,18	27,24	27,20	27,60	35,39	-	-	37,45
OsEREBP2	23,81	23,77	23,66	23,83	25,07	28,16	29,41	29,32

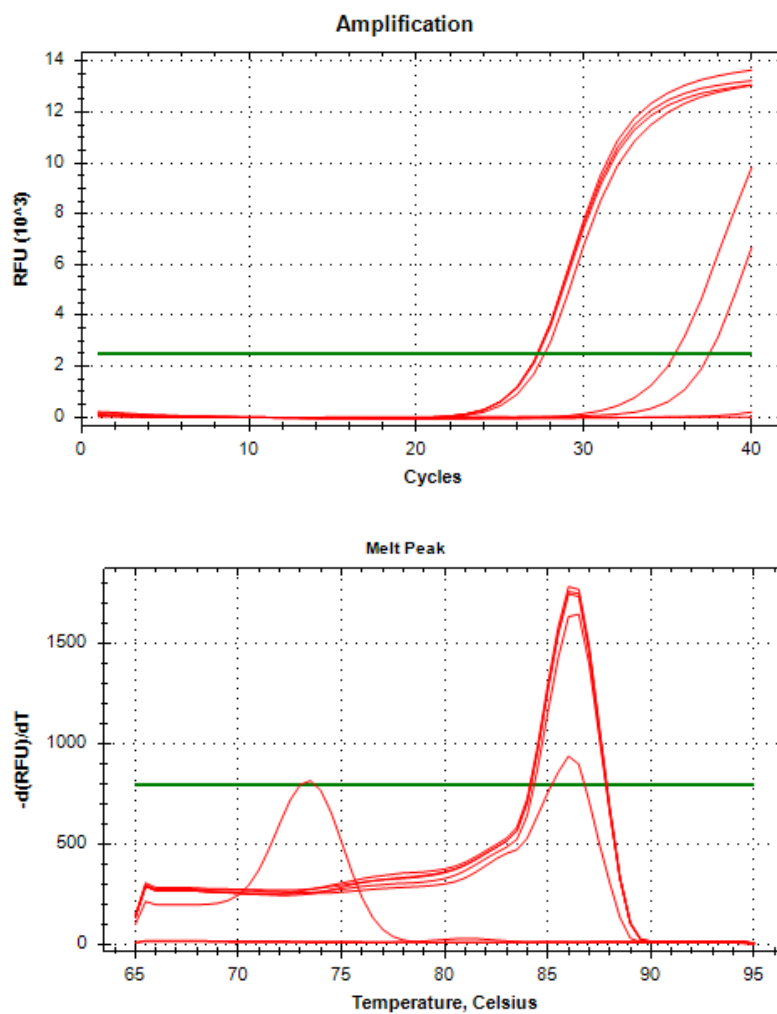
Berdasarkan hasil amplifikasi, primer *OsEREBP2* pada suhu *annealing* 50-60°C didapatkan kurva yang spesifik. Puncak kurva yang terbentuk berada diatas *threshold* yang menandakan bahwa dalam *range* suhu tersebut masih aman digunakan untuk amplifikasi. Berdasarkan kurva yang terbentuk didapatkan *melt peak* tertinggi berada pada suhu 53,9°C. Selain itu, hasil elektroforesis juga menunjukkan bahwa pita dengan pendar terbaik berada pada kisaran suhu 1 - 5 yakni 60; 59,4; 58,3; 56,3 dan 53,9°C (Gambar 2.). Pita yang terbentuk pada gel elektroforesis menunjukkan ukuran 161 bp sesuai dengan ukuran produk yang

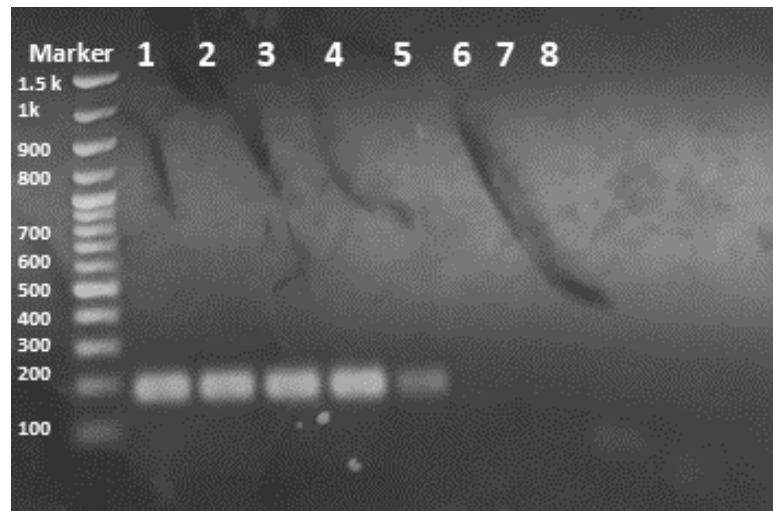
dikehendaki. Berdasarkan hasil tersebut maka suhu *annealing* optimal untuk amplifikasi primer *OsEREBP2* adalah 53,9–60°C dengan suhu terbaiknya adalah 53,9°C. Menurut Downey (2014), *melt peak* yang terbentuk dapat digunakan sebagai acuan dalam optimasi primer, apakah uji qPCR yang dilakukan menghasilkan produk tunggal yang spesifik. Selain itu, uji elektroforesis juga dibutuhkan untuk mengetahui apakah primer yang digunakan dapat mengamplifikasi bagian yang tepat dan spesifik yang ditunjukkan adanya pita tunggal dengan ukuran sesuai dengan produknya.





Gambar 3. Kurva Amplifikasi, *Melting Peak* dan Hasil Elektroforesis *OsAP2* (keterangan pada nomor 1: 60 °C, 2: 59,4 °C, 3: 58,3 °C, 4: 56,3 °C, 5: 53,9 °C, 6: 52 °C, 7: 50,7 °C, 8: 50 °C





Gambar 4. Kurva Amplifikasi, *Melting Peak* dan Hasil Elektroforesis *OsERF3* (keterangan pada nomor 1: 60 °C, 2: 59,4 °C, 3: 58,3 °C, 4: 56,3 °C, 5: 53,9 °C, 6: 52 °C, 7: 50,7 °C, 8: 50 °C)

Melt peak tertinggi pada hasil amplifikasi primer *OsAP2* yang terbentuk berada pada suhu 56,3°C. Setelah dilakukan uji elektroforesis pita terbaik dihasilkan pada suhu 1 – 4 yakni berada pada kisaran suhu 56,3 – 60°C. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa produk yang dihasilkan berukuran 124 bp, sesuai dengan target produk yang dikehendaki. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa suhu optimal untuk amplifikasi primer *OsAP2* adalah 56,3°C. Menurut Kartika (2018), Suhu *melting peak* yang dimiliki oleh satu target mRNA harus sama karena menandakan spesifisitas target, jika terjadi *double peak*, maka terdapat 2 target dalam satu cDNA yang ditemplei oleh primer. Suhu optimal *annealing* untuk amplifikasi pada primer tertentu dapat diketahui berdasarkan kurva amplifikasi dan *melting peak*. Suhu dengan *melting peak* tertinggi, seragam dan satu puncak dapat diduga sebagai suhu terbaik untuk melakukan amplifikasi.

Berdasarkan hasil amplifikasi primer *OsERF3* didapatkan bahwa *melt peak* tertinggi berada pada suhu 60°C. Selain itu, berdasarkan hasil elektroforesis juga menunjukkan pada suhu tersebut membentuk pita yang lebih tebal

dibandingkan dengan pada suhu lainnya dan menghasilkan produk size yang sesuai yakni 187 bp (Gambar 3.) sehingga, dapat diartikan bahwa suhu optimal untuk amplifikasi primer *OsERF3* adalah 60 °C. Pada kurva yang terbentuk pada hasil amplifikasi primer *OsERF3* terdapat 2 *peak* yang tidak berada dalam satu puncak. Kedua kurva tersebut terdapat pada suhu 53,9°C dan 50°C. Selain itu, terdapat 2 kisaran suhu yang tidak memunculkan kurva yakni pada suhu 52 dan 50,7°C.

Untuk lebih memastikan suhu manakah yang lebih optimal maka perlu dilakukan elektroforesis untuk mengetahui pita yang terbentuk. Hasil elektroforesis pada suhu 53,9°C menunjukkan pita yang samar dan tipis sedangkan pada suhu 52; 50,7 dan 50 °C tidak memunculkan pita. Hal tersebut berarti bahwa pada suhu dibawah 53,9 °C tidak dapat digunakan untuk amplifikasi primer *OsERF3* sedangkan suhu optimal yang dapat digunakan adalah 60°C. Menurut Kartika (2018), Uji konfirmasi menggunakan gel elektroforesis dibutuhkan untuk mengetahui target spesifik atau tidak.

Selain menggunakan *melt curve* yang terbentuk, nilai *Cq* (Tabel 8.) menunjukkan hasil yang beragam yang berarti bahwa pada

setiap suhu yang ditargetkan akan menghasilkan amplifikasi yang berbeda. Berdasarkan hasil elektroforesis dan *melt peak* yang dihasilkan, nilai *Cq* yang rendah menunjukkan pita yang tebal dan *melt curve* dengan puncak yang tinggi. Menurut Siswanto *et al.* (2018), perbedaan suhu yang kecil kurang dari 1°C akan menghasilkan perbedaan nilai *Cq* yang kecil pula. Pada rentang suhu yang kecil dan perbedaan nilai *Cq* yang kecil serta *peak* yang mengumpul menunjukkan bahwa hasil optimasi spesifik dan *range* suhu tersebut dapat digunakan untuk amplifikasi.

SIMPULAN

Isolasi RNA dan sintesis cDNA daun padi telah berhasil dilakukan. Berdasarkan hasil optimasi suhu *annealing* menggunakan qPCR/RT-PCR didapatkan kesimpulan bahwa suhu optimal *annealing* untuk primer *OsAP2* 56,3 - 60°C, primer *OsERF3* 53,9 - 60°C dan primer *OsEREBP2* 53,9 - 60°C.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami ucapkan terimakasih kepada seluruh anggota *Pigmented Rice Tim* Universitas Gadjah Mada atas partisipasi dalam diskusi selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Abiri, R., Shaharuddin, N. A., Maziah, M., Yusof, Z. N. B., Atabaki, N., Sahebi, M., Hanafi, M. M. 2017. Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 134 : 33–44.
- Ahn, H., Jung, I., Shin, S. J., Park, J., Rhee, S., Kim, J. K., Kim, S. 2017. Transcriptional network analysis reveals drought resistance mechanisms of AP2/ERF transgenic rice. *Frontiers in Plant Science*. 8 : 1–18.
- Apridamayanti, P., Pratiwi, R., Purwestri, Y. A., Sri Tunjung, W. A., & Rumiayati, R. 2018. Anthocyanin, nutrient contents, and antioxidant activity of black rice bran of *Oryza sativa* L. 'Cempo Ireng' from Sleman, Yogyakarta, Indonesia. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 22 : 49–54.
- Demidenko, N. V., & Penin, A. A. 2012. Comparative analysis of gene expression level by quantitative real-time PCR has limited application in objects with different morphology. *PLoS ONE*. 7:5–10.
- Downey, Nick. 2014. Explaining Multiple Peaks in qPCR Melt Curve Analysis. *Idtdna*. 2014.
- Jang, S., & Li, H. Y. 2018. Overexpression of *OsAP2* and *OSWRKY24* in arabidopsis results in reduction of plant size. *Plant Biotechnology*. 35 : 273–279.
- Kartika, Aprilia Indra. 2018. Optimasi Annealing Temperature Primer mRNA RECK dengan Metode One Step qRT-PCR. *Jurnal Labora Medika*. 12 : 22-31.
- Korbie, D.J., & Mattick, J.S. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocol*. 3 : 1452-1456.
- Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. 2018. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS ONE*. 13 : 1–27.

- Ouyang, Kunxi., Li, Juncheng., Huang, Hao., Que, Qingmin., Li, Pei., & Chen Xiaoyang. 2014. Agriculture and Environmental Biology : A Simple Mthode for RNA Isolation from Various Tissues of The Tree *Neolamarckia kadamba*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 28 : 1008 – 1013.
- Porta, Angela R & Enners Edward. 2012. Determining Annealing Temperatures for Polymerase Chain Reaction. *The American Biology Teacher*. 74 : 256 – 260.
- Qiagen. 2019. *Sample to Insight__ RNeasy® Mini Handbook*. www.qiagen.com
- Rashid, M., Guangyuan, H., Guangxiao, Y., Hussain, J., & Xu, Y. 2012. AP2/ERF transcription factor in rice: Genome-wide anvas and yntenic relationships between monocots and udicots. *Evolutionary Bioinformatics*. 2012 : 321–355.
- Roslim, D I., Nuryani, Nurin., & Herman. 2018. Sekuen Penyandi 18S Ribosomal RNA dan Ubiquitin pada *Pandanus* sp. Asal Riau. *Jurnal Bioslogos*. 8 : 1-8.
- Siswanto, P.Y., Merdekawati, Fusvita., Ernawati., Hardiana, A. T., & Kurniawa, Entuy. 2018. Optimasi Suhu Annealing dan Konsentrasi Primer untuk Deteksi *Brugia malayi* Menggunakan Real Time PCR. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekes Depkes Bandung*. 11 : 314 – 321.
- Suardi, D., & Ridwan, I. 2009. Beras Hitam, Pangan Berkhasiat yang Belum Populer. *Warta Penelitian Dan Pengembangan Pertanian*, 31 : 9–10.
- Suharsono., Syarifin F., & Utut W S. 2008. Isolasi pengkolanan fragmen cDNA dari gen penyandi multidrug resistance associated protein dari *Melastoma affine*. *Jurnal Makara Sains*. 12 : 102- 107.
- Wijayanti, P., Nuringtyas, T. R., & Purwestri, Y. A. 2018. *Karakter Fenotipik dan Molekuler Padi Hitam Transgenik (Oryza Sativa L . “ Cempo Ireng ”) Pembawa Gen OsRKD4*. [Tesis]. Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Yockteng, Roxana., Almeida, A.M.R., Yee, Stephen., Andre, Thiago., Hill, Cholin., Spech, C.D. 2013. A Method For Extracting High-Quality RNA from Diverse Plants for Nexr Generation Sequencing and Gene Expression Analyses. *Applications in Plant Sciences*. 1 : 1 -6.
- Zhang, H., Zhang, J., Quan, R., Pan, X., Wan, L., & Huang, R. 2013. EAR motif mutation of rice OsERF3 alters the regulation of ethylene biosynthesis and drought tolerance. *Planta*. 237 : 1443–1451.
- Zhao, Y., Cheng, S., Song, Y., Huang, Y., Zhou, S., Liu, X., & Zhou, D. X. 2015. The interaction between rice ERF3 and WOX11 promotes crown root development by regulating gene expression involved in cytokinin signaling. *Plant Cell*. 27 : 2469–2483.