

## Optimasi Ekstraksi RNA dan Teknik Kloning: Studi Kasus Kloning Gen *Heading Date 3a* pada Kelapa Sawit

### *Optimizing RNA Extraction and Cloning Techniques: A Case Study of Cloning the Heading Date 3a Gene in Oil Palm*

Aqwin Polosoro<sup>1,2</sup>, Wening Enggarini<sup>2</sup>, Kusumawaty Kusumanegara<sup>3</sup>, Toto Hadiarto<sup>2</sup>, Miftahudin<sup>1</sup>, Ence Darmo Jaya Supena<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi Tumbuhan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agathis, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

<sup>2</sup>Pusat Riset Rekayasa Genetika, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Kawasan Sains dan Teknologi Soekarno, Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46, Cibinong, Bogor 16911

<sup>3</sup>Pusat Riset Hortikultura, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Kawasan Sains dan Teknologi Soekarno, Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46, Cibinong, Bogor 16911

<sup>\*</sup>Penulis untuk korespondensi E-mail: [encedarmo@apps.ipb.ac.id](mailto:encedarmo@apps.ipb.ac.id)

**Diajukan:** 10 Juni 2023 **/Diterima:** 6 Mei 2024 **/Dipublikasi:** 29 Mei 2024

#### ABSTRACT

*Flowering holds significant importance in the plant kingdom as it facilitates genetic mixing, thereby supporting crucial genetic diversity. The phosphatidylethanolamine binding proteins (PEBP) protein family plays a pivotal role in regulating the timing of flowering and seed dormancy across diverse plant species. This research aimed to design a binary vector by constructing pCAMBIA1300, which incorporates the EgHd3a gene sequence from oil palm. The gene construction process involves RNA extraction, cDNA synthesis, amplification of the EgHd3a gene, cloning the gene into a cloning vector, subcloning into the pCAMBIA1300 binary vector, and concluding with gene validation through sequence analysis. During RNA extraction, the PCL-Chisam method has proven effective through iterative extraction, enhancing both the quality and quantity of total RNA. In the cloning process, conventional methods face challenges in selecting appropriate cleavage sites. To overcome this hurdle, the use of enzymes with compatible overhangs is proposed as a potential solution. Specifically, the substitution of BglII for BamHI has effectively addressed this challenge. The confirmation of the integration of gene fragments into the pCAMBIA1300 plasmid was achieved through sequencing. Although differences were identified in the sequence of EgHd3a-2, these alterations did not impact the encoded amino acids, thereby preserving the integrity of the protein sequence.*

**Keyword:** cloning; flowering; Hd3a; oil palm.

#### INTISARI

Pembungaan memegang peranan penting bagi tumbuhan karena memfasilitasi rekombinasi genetik, sehingga mendukung perkembangan keragaman genetik yang penting. Keluarga protein phosphatidylethanolamine binding proteins (PEBP) memainkan peran penting dalam mengatur waktu pembungaan dan dormansi benih di beragam spesies tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk merancang vektor biner dengan membangun pCAMBIA1300 yang menggabungkan rangkaian gen *EgHd3a* dari kelapa sawit. Proses konstruksi gen meliputi ekstraksi RNA, sintesis cDNA, amplifikasi gen *EgHd3a*, kloning gen menjadi vektor kloning, subkloning ke dalam vektor biner pCAMBIA1300, dan diakhiri dengan validasi gen melalui analisis sekuens. Pada ekstraksi RNA, metode PCL-Chisam telah terbukti efektif melalui ekstraksi berulang,

meningkatkan kualitas dan kuantitas total RNA. Dalam proses kloning, metode konvensional menghadapi tantangan dalam memilih lokasi pembelahan yang tepat. Untuk mengatasi kendala ini, penggunaan enzim dengan overhang yang kompatibel diusulkan sebagai solusi potensial. Secara khusus, penggantian *BamHI* dari *BglII* telah secara efektif mengatasi tantangan ini. Konfirmasi integrasi fragmen gen ke dalam plasmid pCAMBIA1300 dicapai melalui pengurutan. Meskipun perbedaan diidentifikasi dalam rangkaian *EgHd3a-2*, perubahan ini tidak berdampak pada asam amino yang dikodekan, sehingga menjaga integritas rangkaian protein.

**Kata kunci:** kelapa sawit; kloning; *Hd3a*; pembungaan.

## PENDAHULUAN

Pembungaan memiliki arti penting dalam dunia tumbuhan karena memfasilitasi pertukaran materi genetik melalui persilangan yang kemudian meningkatkan variasi genetik (Kalra & Lal, 2018). Proses berbunga menjadi sangat penting dalam mencapai kesuksesan reproduksi karena mengatur saat buah dan biji berkembang yang pada gilirannya menjamin kelangsungan hidup tumbuhan pada musim berikutnya (Kumar *et al.*, 2021). Proses pembungaan memiliki peran yang sangat sentral dalam reproduksi tumbuhan serta dalam kelangsungan hidup dan penyebaran berbagai spesies tumbuhan dan komunitasnya (Jung *et al.*, 2017). Setiap organ tumbuhan secara dapat merasakan perubahan yang terjadi pada lingkungan; misalnya, daun dewasa merasakan panjang hari, sementara ujung tunas merasakan dinginnya musim dingin (Fornara *et al.*, 2010). Stimulus lingkungan ini akan menginisiasi terbentuknya sinyal pembungaan atau zat florigen yang akan menginduksi pembentukan tunas bunga pada meristem apikal (Kumari 2018). Selanjutnya, zat florigen ini diidentifikasi sebagai protein FLOWERING LOCUS T atau Heading date

3a (FT/Hd3a) yang umum ditemui pada seluruh tanaman berbunga.

Keluarga *protein phosphatidylethanolamine binding proteins* (PEBP) memiliki peran yang sangat penting dalam mengatur waktu berbunga dan dormansi biji pada berbagai spesies tumbuhan (Yang *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Protein-protein ini diklasifikasikan ke dalam subfamili yang berbeda, termasuk FLOWERING LOCUS T-like (FT-like), TERMINAL FLOWER 1-like (TFL1-like), dan MOTHER OF FT AND TFL1-like (MFT-like) (Zhang *et al.*, 2016). Protein-protein ini terlibat dalam mengatur keseimbangan antara pertumbuhan vegetatif-generatif, mempromosikan diferensiasi tunas bunga, serta mengontrol proses perkecambahan biji (Zhao *et al.*, 2020). Ekspresi gen PEBP diatur oleh faktor-faktor lingkungan, induksi hormon, dan jalur-jalur sinyal endogen (André *et al.*, 2022).

*FT* dan *TFL* merupakan dua gen yang paling banyak dipelajari karena peran keduanya yang saling berlawanan. *FT* berperan dalam menginduksi proses berbunga, sementara *TFL1* berfungsi untuk menekan proses berbunga dan mengatur

arsitektur tumbuhan (Ahn *et al.*, 2006; Bennett & Dixon, 2021). Penelitian terbaru telah menunjukkan bahwa gen-gen keluarga *FT/TFL1* juga berpartisipasi dalam aspek-aspek lain dalam perkembangan tumbuhan, seperti perkecambahan biji dan pembentukan umbi (Jin *et al.*, 2021). *MFT* adalah gen yang berperan dalam perkecambahan biji dan perkembangan tumbuhan. Regulasi gen ini dipengaruhi oleh jenis cahaya, khususnya diinduksi oleh cahaya merah jauh dan ditekan oleh cahaya merah (Vaistij *et al.*, 2018). Pemahaman fungsi gen *FT*, *TFL1*, dan *MFT* dapat berkontribusi pada identifikasi gen baru dalam pemuliaan untuk mempercepat waktu berbunga dan perkembangan reproduktif tumbuhan.

Sejumlah penelitian telah dilakukan dalam rangka menginvestigasi gen-gen terkait induksi pembungaan pada kelapa sawit (*Elaeis guineensis*). Salah satu penelitian menemukan keberadaan gen *Heading Date 3a* yang merupakan homolog *FT* (Polosoro *et al.*, 2021). Penelitian lain berfokus pada kesulitan dalam membedakan bunga jantan dan betina pada pohon kelapa sawit sebelum tahap berbunga (Ajambang *et al.*, 2015, 2016). Dalam penelitian lainnya, pemetaan sidik jari mRNA digunakan untuk mengisolasi cDNA spesifik pada bunga kelapa sawit dan berhasil mengidentifikasi beberapa mRNA yang diekspresikan secara diferensial pada jaringan bunga (Singh & Cheah, 2000).

Kloning gen adalah proses pembuatan salinan identik dari gen atau urutan DNA tertentu menggunakan teknik rekayasa

genetika. Proses kloning ini melibatkan pemotongan DNA yang mengandung gen target menjadi fragmen-fragmen dengan menggunakan enzim-enzim restriksi dan menyisipkan fragmen-fragmen ini ke dalam vektor-vektor kloning, seperti plasmid atau bakteriofag, yang nantinya digunakan untuk mentransfer DNA rekombinan ke sel inang untuk direplikasi (Gautam, 2022). Kesulitan yang dihadapi dalam kloning gen terutama dengan metode tradisional adalah terpotongnya fragmen pada bagian tengah gen. Untuk itu, pemahaman yang mendalam tentang metode-metode yang telah mapan sangat penting untuk mengatasi masalah dan menerapkan pendekatan-pendekatan alternatif dalam kloning gen.

Dalam penelitian sebelumnya, Polosoro *et al.* (2021) mengidentifikasi tiga protein Hd3a pada tanaman kelapa sawit (XP\_019705101, XP\_010925712, dan XP\_010911427) dengan struktur serupa dengan AtFT1 berdasarkan pemodelan protein. Ekspresi *EgHd3a-1* ditemukan pada sari bunga, putik, mesokarp, dan daun, menunjukkan peran perkembangan (Whankaew *et al.*, 2019). Namun, belum ada bukti yang kuat yang membuktikan bahwa *EgHd3a-1* dan dua protein lainnya terkait inisiasi pembungaan.

Tujuan penelitian ini ialah merancang vektor biner dengan konstruksi pCAMBIA1300 yang mengandung sekuens gen *EgHd3a* dari kelapa sawit. Sekuens gen tersebut sebelumnya telah diidentifikasi oleh Polosoro *et al.* (2021) dan Whankaew *et al.* (2019). Hasil penelitian ini menjadi dasar

untuk penelitian lanjutan mengenai peran sebenarnya gen *EgHd3a* pada kelapa sawit.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Juli 2021 hingga bulan Desember 2021 bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Kementerian Pertanian di Bogor, Jawa Barat.

### Materi genetik

Dalam penelitian ini, sumber materi genetik yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kelapa sawit varietas Tenera dan vektor plasmid pCAMBIA 1300. Tanaman kelapa sawit yang digunakan di dalam penelitian terletak di kebun koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen, Cimanggu, Kota Bogor. Sekuens *EgHd3a* (XP\_019705101 dan XP\_010925712 selanjutnya disebut *EgHd3a-1* dan *EgHd3a-2*) didapatkan dari basis data NCBI berdasarkan hasil modeling yang dilakukan oleh Polosoro *et al.* (2021), sedangkan gen yang ke-3 tidak terdeteksi aktif pada kelapa sawit.

### Isolasi RNA kelapa sawit

RNA diekstraksi dari bunga jantan kelapa sawit menggunakan RNeasy *Plant Mini Kit* (QIAGEN, USA) dengan beberapa penyesuaian. Sebanyak 100 mg serbuk sampel bunga jantan diambil secara langsung dari pohon kelapa dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 ml. Serbuk sari tersebut kemudian ditambah 450  $\mu$ l bufer lisis

RLT yang telah ditambahkan  $\beta$ -merkuptoetanol 2%. Campuran kemudian diaduk dan diinkubasi pada suhu 56°C selama 3 menit. Selanjutnya, sampel diekstraksi dengan menggunakan 500  $\mu$ l campuran kloroform dan isoamil alkohol (24:1). Fraksi air yang didapatkan kemudian diambil dan diekstraksi kembali dengan 400  $\mu$ l campuran fenol, kloroform, dan isoamil alkohol/PCL (25:24:1). Fraksi air kembali diambil dan dilakukan ekstraksi tambahan dengan campuran kloroform dan isoamil alkohol (24:1) sebanyak dua kali pengulangan. Selanjutnya, sampel dimasukkan ke dalam kolom spin QIAshredder (berwarna ungu muda) dan proses dilanjutkan sesuai dengan petunjuk yang tertera pada protokol kit. Pengukuran RNA total menggunakan Nanodrop 2000 untuk mengukur kuantitas maupun kualitas RNA total.

### Sintesis cDNA

Proses sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan reagen *ReverTra Ace*® (Toyobo, Jepang). Sebanyak 2  $\mu$ l *DN Master Mix 4x* (dengan DNase), 0,5  $\mu$ g cetakan (*template*) RNA, dan *nuclease-free water* ditambahkan ke dalam tabung mikro 200  $\mu$ l hingga mencapai volume total 8  $\mu$ l. Campuran reagen diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya, 2  $\mu$ l *RT Master Mix II 5x* ditambahkan ke dalam campuran dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah itu, dilakukan pemanasan pada suhu 98°C selama 5 menit. Hasil reaksi kemudian disimpan pada suhu -20°C.

Tabel 1. Sekuens primer yang digunakan untuk kloning gen *EgHd3a-1* dan *EgHd3a-2*

Target gen	Nama primer	Sekuens primer*	Situs restriksi
<i>EgHd3a-1</i>	EgHd3a-1F	CGAGATCTTCAAAGTCCCCACTTGTTCC	<i>Bgl</i> II
	EgHd3a-1R	TAGGTACCGCTAGCTCCCAATTTACCA	<i>Kpn</i> I
<i>EgHd3a-2</i>	EgHd3a-2F	GCAGATCTATGCAGCGCGAAACAGA	<i>Bgl</i> II
	EgHd3a-2R	GTGGTACCTTAGAGGTACATGCGTCTGC	<i>Kpn</i> I

\*Warna kuning dan hijau masing-masing menunjukkan letak situs restriksi *Bgl*II dan *Kpn*I

### Amplifikasi gen *EgHd3a*

PCR dilakukan untuk mengamplifikasi gen kandidat pengontrol waktu berbunga yang berasal dari organ yang menunjukkan ekspresi gen tertinggi. Pada ujung primer ditambahkan situs pembatas *Bgl*II dan *Kpn*I untuk mempermudah proses penyambungan gen ke vektor biner pCAMBIA1300 sebagaimana dijelaskan pada Tabel 1. Reagen yang digunakan adalah *KOD -Plus-Neo* (Toyobo, Jepang) dengan komposisi 5 µl bufer 10×, 5 µl dNTPs, 3 µl MgSO<sub>4</sub> (1,5 mM), 1 µl masing-masing primer F dan R (Tabel 1), 1 µl *KOD -Plus-Neo*, 1 µl sampel, dan 33 µl PCR grade water (Y µl). Proses amplifikasi fragmen gen dilakukan pada *thermal cycler* PCR (Bio-Rad, USA) dengan siklus sebagai berikut: tahap denaturasi pada suhu 98°C selama 20 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik, dan pemanjangan DNA pada suhu 72°C selama 35 detik. Siklus PCR ini diulang sebanyak 35 kali dan diakhiri dengan tahap pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 2 menit.

### Konstruksi plasmid rekombinan pCAMBIA1300 yang mengandung gen *EgHd3a*

Hasil reaksi PCR selanjutnya diperiksa untuk menentukan ukuran fragmennya dengan elektroforesis dan hasilnya didokumentasikan dengan *Gel Documentation System* (Bio-Rad, USA). Hasil PCR tersebut diolah dengan menambahkan 1 µl campuran *A-attachment* 10× (Toyobo, Jepang) dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Fragmen yang dihasilkan kemudian dihubungkan dengan vektor kloning *Target Clone* (Toyobo, Jepang) menggunakan enzim ligase T4 (Toyobo, Jepang). Komposisi reagen ligasi, yaitu 1 µl fragmen produk PCR yang telah dimurnikan, 1 µl vektor kloning *Target Clone*, dan 5 µl campuran ligasi. Campuran reagen tersebut diaduk dan diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Hasil ligan dimasukkan ke dalam bakteri *Escherichia coli* strain DH5α dengan teknik kejutan panas (*heat shock*).

### Direct PCR

Koloni yang telah tumbuh di dalam media LB padat yang berisi antibiotik kanamisin selanjutnya diuji dengan PCR menggunakan primer gen *EgHd3a* (Tabel 1). Sampel diambil dari koloni yang tumbuh dengan tusuk gigi steril dan dilarutkan dalam

campuran PCR dengan komposisi sama seperti yang dijabarkan sebelumnya. Amplifikasi fragmen gen dilakukan pada *thermal cycler* PCR (Bio-Rad, USA) dengan serangkaian tahapan sebagai berikut: tahap denaturasi awal pada suhu 98°C selama 5 menit, tahap denaturasi pada suhu 98°C selama 20 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik, dan pemanjangan DNA pada suhu 72°C selama 35 detik. Siklus PCR ini diulang sebanyak 35 kali dan diakhiri dengan tahap pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 2 menit.

Koloni yang positif PCR kemudian ditumbuhkan pada media LB cair sebanyak 5 ml yang telah diberi ampisilin, lalu diinkubasi di dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C. Plasmid rekombinan yang dihasilkan kemudian diekstraksi dengan menggunakan kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, USA). Plasmid yang berhasil diperoleh selanjutnya disekuensing dengan menggunakan primer M13 untuk memastikan jenis spesimen mRNA yang telah didapatkan. Proses sekuensing dilakukan sepenuhnya oleh 1st base, sedangkan data kemudian dianalisis dengan melakukan alignment dengan algoritma ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)

### **Integrasi fragmen *EgHd3a* ke dalam vektor pCAMBIA 1300**

Plasmid kloning rekombinan yang diperoleh kemudian dipotong dengan enzim restriksi *Bgl*II dan *Kpn*I, sementara pCAMBIA1300 disiapkan untuk dipotong dengan enzim *Bam*HI dan *Kpn*I. Hasil pemotongan kemudian dipisahkan dengan

elektroforesis untuk memisahkan fragmen-fragmen yang terbentuk. Fragmen pCAMBIA1300 dan *EgHd3a* kemudian dipotong dari gel untuk memisahkan dengan fragmen lainnya dan dimurnikan dengan menggunakan metode *Freeze 'N Squeeze* (Bio-Rad, USA). Kedua fragmen ini kemudian digabungkan dengan menggunakan enzim *Ligation high Ver.2* (Takara Bio, Jepang). Komposisi larutan ligasi terdiri atas 2 µl fragmen gen yang telah dimurnikan, 3 µl fragmen vektor biner pCAMBIA1300, dan 5 µl *ligation mix*. Campuran ligasi tersebut kemudian diaduk secara merata dan diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Produk hasil ligasi ditransformasi ke dalam bakteri *E. coli* DH5α dengan teknik kejutan panas (*heat shock*). Bakteri kemudian ditumbuhkan pada media seleksi LB dengan higromisin 50 mg/l. Koloni yang tumbuh diuji dengan *direct* PCR, yaitu sampel bakteri diambil dengan tusuk gigi dan dicampur dengan PCR *mix* dengan kondisi yang sama dengan seperti *direct* PCR di atas. Koloni yang terdeteksi positif kemudian ditumbuhkan pada media LB cair sebanyak 5 ml.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

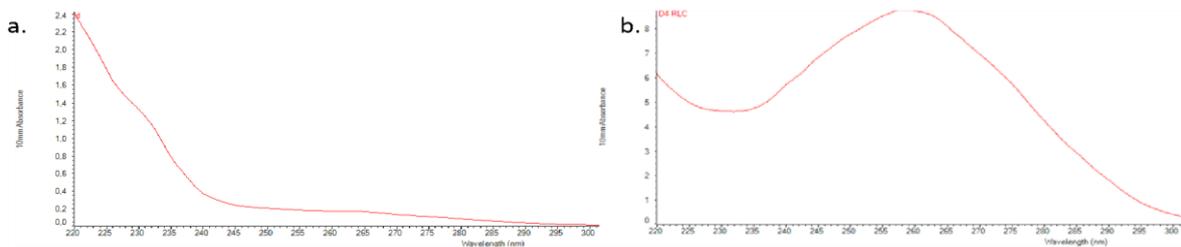
Ekstraksi DNA dan RNA dari jaringan kelapa sawit memiliki kesulitan yang relatif tinggi akibat keberadaan berbagai senyawa, termasuk lipida, polisakarida, polifenol, dan metabolit sekunder. Beberapa metode telah dikembangkan untuk mengatasi hambatan-hambatan ini dan menghasilkan asam nukleat berkualitas tinggi. Salah satu

pendekatan adalah penggunaan metode berbasis CTAB yang dimodifikasi dengan penambahan fenol. Metode ini telah terbukti menghasilkan RNA yang berkualitas baik dan utuh dari berbagai jaringan kelapa sawit, termasuk buah utuh (Badai *et al.*, 2020). Pada penelitian ini, modifikasi prosedur kit *RNeasy* telah dilakukan dengan penambahan BME dan serial ekstraksi PCL-Chisam. Beta-merkaptotanol umumnya digunakan dalam metode ekstraksi DNA untuk mencegah oksidasi fenol yang dapat menyebabkan perubahan warna menjadi coklat dan degradasi DNA (Kouamé *et al.*, 2015). Beta-merkaptotanol ini juga digunakan untuk mendenaturasi protein dan nuklease, terutama RNase (Wang & Stegemann, 2010).

Pengukuran kuantitatif dan kemurnian RNA total dengan menggunakan *NanoDrop* menunjukkan bahwa penambahan prosedur serial ekstraksi PCL-Chisam meningkatkan hasil RNA total dan kemurniannya (Gambar 1a dan 1b). Fenol-kloroform digunakan dalam proses ekstraksi DNA untuk meningkatkan kemurnian dan kualitas DNA yang diekstraksi. Penggunaannya membantu dalam menghilangkan kontaminan, seperti kelebihan fenol, kloroform, garam, protein, dan zat-zat impuritas lainnya yang dapat mengganggu aplikasi hilir dan interpretasi data (Silva *et al.*, 2020). Penambahan langkah ekstraksi kloroform kedua dalam metode ekstraksi RNA berbasis fenol-kloroform secara signifikan meningkatkan kemurnian RNA dengan menghilangkan kontaminan yang ada pada lapisan antarfasa (Dubey *et al.*, 2020). Lebih lanjut,

penggunaan metode ekstraksi fenol-kloroform dalam isolasi DNA telah terbukti lebih sensitif dalam mengisolasi DNA, menghasilkan pita-pita DNA yang jelas saat elektroforesis (Choudhary *et al.*, 2020). Secara keseluruhan, fenol-kloroform memainkan peran penting dalam meningkatkan kemurnian dan hasil ekstraksi DNA selama proses ekstraksi.

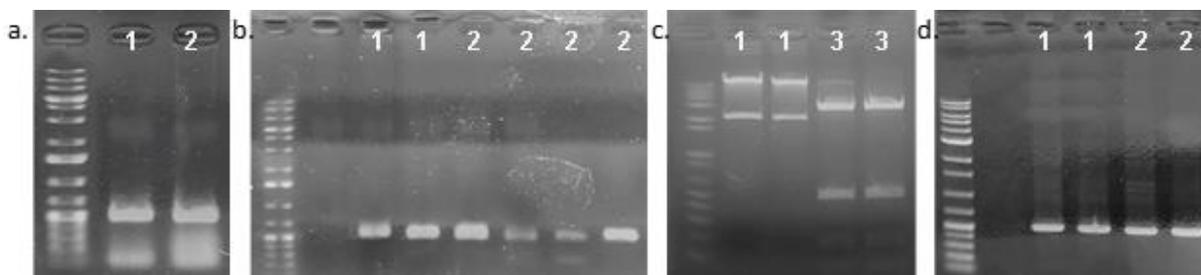
Analisis PCR berhasil mengamplifikasi dua gen homolog *EgHd3a* yang selanjutnya diberi nama *EgHd3a-1* dan *EgHd3a-2* (Gambar 2a) sedangkan gen yang ke-3 tidak berhasil diamplifikasi dengan berbagai kombinasi primer. Namun, variasi *splicing* alternatif yang terjadi pada kedua gen ini tidak dapat diamati secara tegas karena tingkat ekspresi mRNA pada spesimen lain sangat rendah. Dua spesimen mRNA yang menghasilkan protein *EgHd3a* memiliki ukuran 571 bp untuk *EgHd3a-1* dan 576 bp untuk *EgHd3a-2*. Di samping itu, hasil *direct* PCR pada koloni juga menunjukkan fragmen dengan ukuran yang serupa (Gambar 2b). Konsep *direct* PCR yaitu langsung melibatkan penempatan material yang dikumpulkan langsung ke dalam reaksi amplifikasi tanpa perlakuan sebelumnya. Tujuannya adalah mempercepat analisis dan meningkatkan cetakan DNA yang tersedia dengan menghindari langkah ekstraksi dan mencegah potensi kehilangan DNA hingga 83% (Martin & Linacre, 2020). Langkah ini juga efektif untuk mengurangi beban kerja dan penggunaan reagen berlebihan dalam analisis.



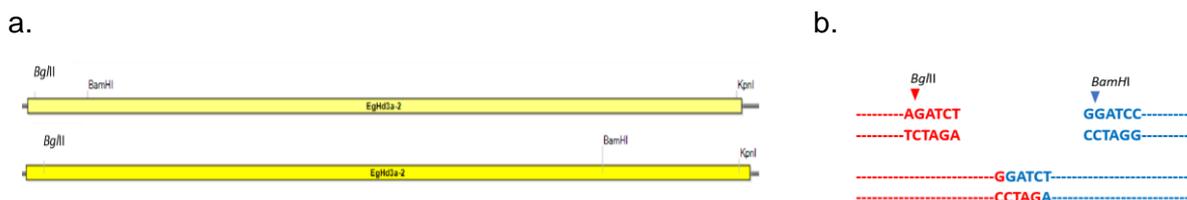
Gambar 1. Perbedaan hasil pengukuran total RNA dengan menggunakan Nanodrop dari sampel yang diekstraksi dengan kit RNeasy tanpa modifikasi (a) dan dengan modifikasi (b).

Proses subkloning dimulai dengan memotong setiap plasmid rekombinan yang diperoleh dengan memanfaatkan enzim *Bgl*II dan *Kpn*I, sedangkan plasmid pCAMBIA1300 dipotong menggunakan enzim *Bam*HI dan *Kpn*I. Penggunaan enzim *Bgl*II dipilih karena situs restriksi *Bam*HI pada plasmid target pCAMBIA1300 juga mengarah pada pemotongan fragmen gen *EgHd3a-1* dan *EgHd3a-2* secara internal (Gambar 3a).

Meskipun *Bam*HI dan *Bgl*II mengenali situs restriksi yang berbeda, keduanya menghasilkan ujung-ujung yang kompatibel atau disebut sebagai *compatible cohesive ends* seperti yang diilustrasikan pada Gambar 3b. Oleh karena itu, pemanfaatan enzim ini mampu mengatasi masalah yang timbul akibat pemotongan DNA pada posisi tengah fragmen, suatu situasi yang umum dijumpai dalam metode kloning tradisional.



Gambar 2. Hasil analisis PCR gen *EgHd3a-1* dan *EgHd3a-2* dari sampel cDNA bunga jantan matang (a), langsung dari koloni *E. coli* pada proses kloning (b), hasil pemotongan plasmid pCAMBIA 1300 dan plasmid vektor kloning yang mengandung gen *EgHd3a-1* dan *EgHd3a-2* (c), dan hasil *direct* PCR gen *EgHd3a-1* dan *EgHd3a-2* dari koloni pada proses sub-kloning ke pCAMBIA1300 (d). 1 = *EgHd3a-1*, 2 = *EgHd3a-2*, dan 3 = pCAMBIA1300



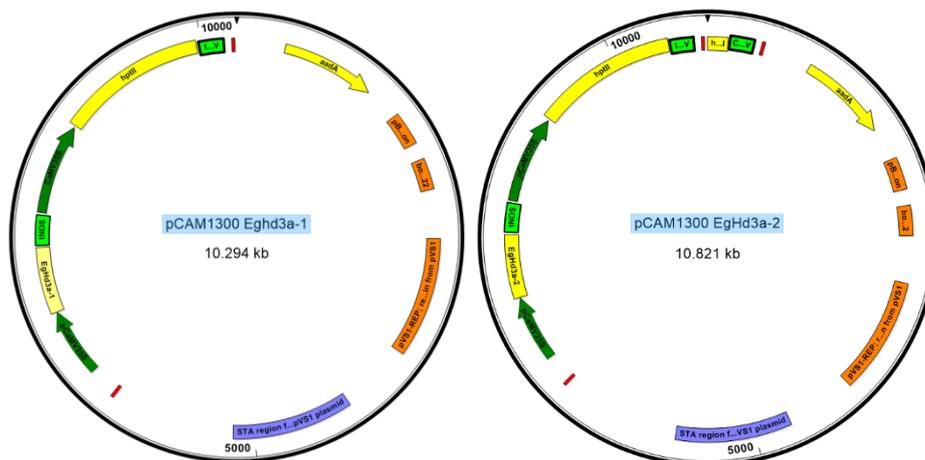
Gambar 3. Ilustrasi lokasi situs restriksi *Bam*HI, *Bgl*II, dan *Kpn*I pada fragmen hasil PCR gen *EgHd3a-1* dan *EgHd3a-2* (a) serta *compatible cohesive ends* pada situs restriksi *Bam*HI dan *Bgl*II (b).

a.	b.		
referensi EgHd3a-1	ATGCACCTTTGGAGGTAGGACTGATGCCAAGAAGAAAGGATCCTTTGGTTGGGACGG ATGCACCTTTGGAGGTAGGACTGATGCCAAGAAGAAAGGATCCTTTGGTTGGGACGG *****	referensi EgHd3a-2	ATGAGCAGAGAAAGGGATCCTTTGGTTGCGTAGAGTGGTTGGGGATGTTGGACCCC ATGAGCAGAGAAAGGGATCCTTTGGTTGCGTAGAGTGGTTGGGGATGTTGGACCCC *****
referensi EgHd3a-1	GTGATAGGAGATGTTGGATCCATTATAAGAAGTGTACCCCTCAGGGTGTATCAAT GTGATAGGAGATGTTGGATCCATTATAAGAAGTGTACCCCTCAGGGTGTATCAAT *****	referensi EgHd3a-2	TTCAATAGAACCACCACTCTTAGAGTGTCTTAGGCTCAGGGAAGTACCAACGGGCGC TTCAATAGAACCACCACTCTTAGAGTGTCTTAGGCTCAGGGAAGTACCAACGGGCGC *****
referensi EgHd3a-1	TCGAGGGAGGTGGCCAAATGGATGTGAGCTTAAACCTCGGCTGTGTTAACGACCTAGG TCGAGGGAGGTGGCCAAATGGATGTGAGCTTAAACCTCGGCTGTGTTAACGACCTAGG *****	referensi EgHd3a-2	GAGTTCAGGCCCTCCAAGTGGTTCATCAACCAAGGGTGCACGTTGGTGGGAATGACCTC GAGTTCAGGCCCTCCAAGTGGTTCATCAACCAAGGGTGCACGTTGGTGGGAATGACCTC *****
referensi EgHd3a-1	GTTGAGGTTGGAGGACTGACCTCAGGACCTTCTACACCCTTATATGATAGACCCGGAT GTTGAGGTTGGAGGACTGACCTCAGGACCTTCTACACCCTTATATGATAGACCCGGAT *****	referensi EgHd3a-2	AGAACCTCTTACACACTCGTGATGGTAGACCAGATGCTCAAAATCCAAGTGTCCAAGC AGAACCTCTTACACACTCGTGATGGTAGACCAGATGCTCAAAATCCAAGTGTCCAAGC *****
referensi EgHd3a-1	GCTCCAAGTCCAAGTGACCCACACTCAGGGAGTATTGACACTGGTTGGTACGGATATC GCTCCAAGTCCAAGTGACCCACACTCAGGGAGTATTGACACTGGTTGGTACGGATATC *****	referensi EgHd3a-2	CTTAGGGAATATCTCCACTGGCTGGTACAGATATCCCGGGAACACAGGAGCAACCTTT CTTAGGGAATATCTCCACTGGCTGGTACAGATATCCCGGGAACACAGGAGCAACCTTT *****
referensi EgHd3a-1	CCGGCAACGACTGGAGCTGCCTACGGTACAGGAGATGTGTGCTATGAGAGTCCACGGCCG CCGGCAACGACTGGAGCTGCCTACGGTACAGGAGATGTGTGCTATGAGAGTCCACGGCCG *****	referensi EgHd3a-2	GGGCAGGAGTGTGTGCTACGAGAGCCGAGGCCAAGATGGGAATCCACCCTTCGTG GGGCAGGAGTGTGTGCTACGAGAGCCGAGGCCAAGATGGGAATCCACCCTTCGTG *****
referensi EgHd3a-1	GCGCTTGGCATCCACGGTTCATCTTTGTGCTGTCCAGCAGCTTGGCGGCAGACAGTG GCGCTTGGCATCCACGGTTCATCTTTGTGCTGTCCAGCAGCTTGGCGGCAGACAGTG *****	referensi EgHd3a-2	TTCGTACTTTTCAGCAGCTCGGGCGGACAGCTGCTATCTCCGGCTGGCGCAGAAC TTCGTACTTTTCAGCAGCTCGGGCGGACAGCTGCTATCTCCGGCTGGCGCAGAAC *****
referensi EgHd3a-1	TATGCTCTGGTGGCCAAAACCTCGACACCCGGGACTTTGACAGGCTCTACAACCTC TATGCTCTGGTGGCCAAAACCTCGACACCCGGGACTTTGACAGGCTCTACAACCTC *****	referensi EgHd3a-2	TTCAACACAGGGACTTTGACAGGCTCTACAACCTCGGATCCCAGTTGCTGCGTCTAC TTCAACACAGGGACTTTGACAGGCTCTACAACCTCGGATCCCAGTTGCTGCGTCTAC *****
referensi EgHd3a-1	GGATCACCGGTGCGCAGCTATTTAACTGCCAGAGAGAGTCCGGCTCCGGCGGGAGA GGATCACCGGTGCGCAGCTATTTAACTGCCAGAGAGAGTCCGGCTCCGGCGGGAGA *****	referensi EgHd3a-2	TTCAACTGCCAGCGAGAGTCCGGTCTGGTGGGAGAAGGATCTCAGCTTAA TTCAACTGCCAGCGAGAGTCCGGTCTGGTGGGAGAAGGATCTCAGCTTAA *****
referensi EgHd3a-1	AGGATGCAACCTTAA AGGATGCAACCTTAA *****	referensi EgHd3a-2	TTCAACTGCCAGCGAGAGTCCGGTCTGGTGGGAGAAGGATCTCAGCTTAA TTCAACTGCCAGCGAGAGTCCGGTCTGGTGGGAGAAGGATCTCAGCTTAA *****

Gambar 4. Hasil analisis penyejajaran sekuensing antara sekuens referensi dengan gen *EgHd3a-1* (a) dan *EgHd3a-2* (b). Kotak merah menandakan perbedaan hasil sekuensing dengan sekuens referensi

Proses pemotongan pada plasmid rekombinan menghasilkan dua fragmen. Pertama, fragmen pTA yang memiliki panjang sekitar 3.000 bp. Kedua, fragmen *EgHd3a-1* dan *Hd3a-2* masing-masing berukuran sekitar 571 bp dan 576 bp. Sementara itu, plasmid pCAMBIA1300 menghasilkan dua fragmen: fragmen pCAMBIA dengan panjang sekitar 9.732 bp dan fragmen GUS berukuran sekitar 2.063 bp (Gambar 2c). Keberhasilan penyambungan fragmen juga terkonfirmasi melalui hasil amplifikasi *direct* PCR dari koloni yang terbentuk terlihat pada Gambar 2d.

Hasil sekuensing fragmen menunjukkan bahwa kedua fragmen gen berhasil disisipkan ke dalam plasmid pCAMBIA 1300 (Gambar 4a dan 4b). Namun, berdasarkan analisis penyesuaian sekuens dengan algoritma *ClustalW*, terungkap bahwa gen *EgHd3a-2* memiliki satu perbedaan basa dengan sekuens referensi. Untuk mengetahui apakah perbedaan ini memengaruhi sekuens protein, analisis dilakukan pada pasangan kodonnya. Hasil analisis menunjukkan terdapat perubahan kodon dari TTG menjadi CTG. Namun, kedua kodon tersebut mengode asam amino yang sama, yaitu leusin. Dengan demikian, perubahan sekuens tersebut tidak memengaruhi baik asam amino yang dikodekan maupun protein yang dihasilkan.



Gambar 5. Peta Konstruksi Plasmid Rekombinan dengan Penyisipan Gen *EgHd3a-1* dan *EgHd3a-2*

Dengan dikonfirmasi sekuens gen yang terintegrasi ke dalam plasmid pCAMBIA1300, dapat dipastikan plasmid ini telah dapat digunakan untuk transformasi genetik. Plasmid ini memiliki dua kaset ekspresi yang dikendalikan oleh promotor 35s. Promotor pertama mengendalikan gen *EgHd3a* (1 dan 2), sedangkan promotor kedua mengendalikan gen *hygromycin phosphotransferase II (hptII)* (Gambar 5). Gen resistensi yang mengandung kode genetik untuk *hptII* tersebut sering digunakan sebagai tanda bahwa sel telah berhasil disisipi T-DNA. Dengan demikian, tanaman dapat diseleksi dengan menggunakan antibiotik higromisin. Ketahanan ini yang selanjutnya digunakan untuk membedakan tanaman transgenik dan tipe liarnya.

Untuk memvalidasi fungsi kedua gen *EgHd3a* ini, diperlukan overekspresi keduanya pada tanaman model seperti *Arabidopsis thaliana* atau padi japonica (Nipponbare). Jika overekspresi gen-gen ini terbukti mendorong percepatan pembungaan pada tanaman model, maka kedua gen ini dapat dikonfirmasi sebagai florigen. Mengingat gen FT/Hd3a merupakan mekanisme yang umum dalam regulasi pembungaan, maka overekspresi gen-gen ini akan mempercepat pembungaan pada tanaman lain, sehingga dapat menjadi strategi yang efektif untuk mempercepat proses pemuliaan tanaman atau *fasttrack breeding*.

## KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengembangkan metode ekstraksi RNA yang efektif untuk jaringan kelapa sawit, suatu bahan yang terkenal sulit untuk diekstraksi karena kandungan senyawa kompleksnya. Penggunaan beta-merkaptotanol dan serial ekstraksi dengan menggunakan PCL-Chisam terbukti efektif meningkatkan kualitas dan kuantitas total RNA hasil ekstraksi. Dalam proses kloning, metode kloning konvensional umumnya menghadapi tantangan dalam memilih lokasi pemotongan fragmen DNA yang tepat. Untuk mengatasi kendala ini, penggunaan enzim dengan overhang yang kompatibel dapat digunakan sebagai solusi potensial. Secara khusus pada kasus ini, penggantian *BamHI* dari *BgIII* telah secara efektif mengatasi tantangan ini. Konfirmasi integrasi fragmen gen ke dalam plasmid pCAMBIA1300 dilakukan dengan pengurutan DNA hasil sekuensing ke sekuen referensi. Konfirmasi ini membuktikan jika sekuen *EgHd3a-1* identik dengan sekuen referensi sedangkan *EgHd3a-2* memiliki 1 perbedaan basa nukleotida. Meskipun perbedaan diidentifikasi dalam rangkaian *EgHd3a-2*, perubahan ini tidak berdampak pada asam amino yang dikodekan, sehingga sekuen protein tidak mengalami perubahan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) atas pembiayaan penelitian ini melalui skema Prioritas Riset Nusantara (PRN), kepada Ibu Diani Damayanti atas sumbangan bahan penelitian yang berkontribusi pada kesuksesan penelitian ini, serta kepada semua individu yang turut membantu, meskipun tidak dapat disebutkan satu per satu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, J. H., Miller, D., Winter, V. J., Banfield, M. J., Lee, J. H., Yoo, S. Y., Henz, S. R., Brady, R. L. dan Weigel, D. 2006. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* dan *TFL1*. *EMBO Journal*, 25(3):605–614.
- Ajambang, W., Ardie, S. W., Volkaert, H., Ngando-Ebongue, J. F., dan Sudarsono. 2015. Comparative expression profiling of three early inflorescence stages of oil palm indicates that vegetative to reproductive phase transition of meristem is regulated by sugar balance. *Functional Plant Biology*. 42(6): 589–598.
- Ajambang, W., Mondjeli, C., Ntsefong, G. N., dan Sudarsono. 2016. RNA-seq analysis reveals influence of sugar level and photoperiod on seasonality in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) sex-specific inflorescence emergence. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 4(02):16–22
- André D., Marcon, A., Lee, K. C., Goretti, D., Zhang, B., Delhomme, N., Schmid, M., dan Nilsson, O. 2022. *FLOWERING LOCUS T* paralogs control the annual growth cycle in *Populus* trees. *Current Biology*. 32(13):2988-2996.e4.

- Badai, S.S., Rasid, O. A., Parveez, G. K. A., dan Masani, M. Y. A. 2020. A rapid RNA extraction method from oil palm tissues suitable for reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR). *3 Biotech.* 10(12):1–11. doi:10.1007/s13205-020-02514-9.
- Bennett, T. dan Dixon, L.E. 2021. Asymmetric expansions of *FT* dan *TFL1* lineages characterize differential evolution of the EuPEBP family in the major angiosperm lineages. *BMC Biology.* 19(1):181.
- Choudhary, C.K. Dhillon, S., Boora, K.S., dan Manoj, K. 2020. Comparison of phenol-chloroform and CTAB assay for DNA extraction from polysaccharides-rich *Simarouba glauca* DC applying modified CTAB method. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 9(11):1547–1558.
- Dubey, I.P., Kumawat, R.K., Tripathi, I.P., dan Shrivastava, P. 2020. A pilot study of DNA yield from bloodstains on various surfaces using phenol chloroform isoamyl alcohol (PCIA) and Chelex DNA extraction methods. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences.* 13(2):124–127.
- Fornara, F., Montaigu, A. De., Coupland, G., Fornara, F., Montaigu, A.D., dan Coupland, G. 2010. SnapShot : Control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell.* 141(3):550.
- Gautam, A. 2022. Gene Cloning dan Vectors. In: DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts. *Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert.* Springer, Cham.
- Jin, S., Nasim, Z., Susila, H., dan Ahn, J.H. 2021. Evolution and functional diversification of *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* family genes in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 109:20–30..
- Jung C, Pillen K, Staiger D, Coupland G, dan von Korff M. 2017. Editorial: Recent advances in flowering time control. *Frontiers in Plant Science.* 7(January):2016–2018.
- Kalra, G. dan Lal, M.A. 2018. *Physiology of Flowering, in Plant Physiology, Development and Metabolism.* Singapore: Springer. 797–819.
- Kouamé, L.P., Dabonné, S., Gnangui, S.N., dan Kouamé, J. 2015. Isolation of a latent polyphenol oxidase from edible yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata* cv. Zrèzrou) cultivated in Côte D'ivoire. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology.* 2(4):232–249.
- Kumar, A., Choudhary, A., Kaur, N., dan Kaur, H. 2021. Wake up: It's time to bloom. *Russian Journal of Plant Physiology.* 68(4):579–595.
- Kumari I. 2018. *Florigen and theory of flowering.* Ed ke-1. Palhar Nagar: Ideal International E.
- Martin, B. dan Linacre, A. 2020. Direct PCR: A review of use and limitations. *Science and Justice.* 60(4):303–310.
- Polosoro, A., Enggarini, W., Hadiarto, T., Supena, E.D.J, dan Suharsono. 2021. In silico screening of oil palm early and continuously flowering gene candidates for faster breeding program. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* 762(1):012063.
- Silva, A.N.B.D., Souza, R.C.M., Honorato, N.R.M., Martins, R.R., Câmara, A.C.J.D., Galvão, L.M.D.C., dan Chiari, E.. 2020. Comparison of phenol-chloroform and a commercial deoxyribonucleic acid extraction kit for identification of bloodmeal sources from triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 53:1–9.
- Singh, R. dan Cheah, S.C. 2000. Differential gene expression during flowering in the oil palm (*Elaeis guineensis*). *Plant Cell Reports.* 19(8):804–809.
- Vaistij, F.E., Barros-Galvão, T., Cole, A.F., Gilday, A.D., He, Z., Li, Y., Harvey, D., Larson, T.R., dan Graham, I.A.. 2018. *MOTHER-OF-FT-AND-TFL1* represses seed germination under far red light by modulating phytohormone responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 115(33):8442–8447.

- Wang, L. dan Stegemann, J.P. 2010. Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials*. 31(7):1612–1618.
- Whankaew, S., Ruttajorn, K., Madsen, C.K., Asp, T., Xu, L., Nakkaew, A., dan Phongdara, A.. 2019. An *EgHd3a*-like and its alternatively spliced transcripts in the oil palm (*Elaeis guineensis*). *Songklanakarin Journal of Science & Technology*. 41(2):332–340.
- Yang, Z., Chen, L., Kohnen, M.V., Xiong, B., Zhen, X., Liao, J., *et al.* 2019. Identification and characterization of the PEBP family genes in moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *Scientific Reports*. 9(1):14998.
- Zhang, M., Li, P., Yan, X., Wang, J., Cheng, T., dan Zhang, Q. 2021. Genome-wide characterization of PEBP family genes in nine Rosaceae tree species and their expression analysis in *P. mume*. *BMC Ecology and Evolution*. 21(1):32.
- Zhang, X., Wang, C., Pang, C., Wei, H., Wang, H., Song, M., *et al.* 2016. Characterization and functional analysis of PEBP Family genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *PLoS ONE*. 11(8): e0161080.
- Zhao, S., Wei, Y., Pang, H., Xu, J., Li, Y., Zhang, H., Zhang, J., dan Zhang, Y. 2020. Genome-wide identification of the PEBP genes in pears and the putative role of *PbFT* in flower bud differentiation. *PeerJ*. 8:e8928.