

ANALISIS BIOINFORMATIKA GEN POTENSIAL PENYANDI HALICHONDRINB DARI SPONS LAUT SEBAGAI KANDIDAT ANTI KANKER

Seprianto^{1*}, Febriana Dwi Wahyuni²

^{1,2}Program Studi Bioteknologi, Universitas Esa Unggul, Jakarta
seprianto@esaunggul.ac.id

Abstract

HalichondrinB is a complex polyether macrolide compound isolated from a variety of marine sponges, especially Halichondria sp. It has a strong antitumor effect invivo test for melanoma and leukemia. The aim of this study was to obtain a suitable primer candidate to amplify and characterize potential genes of HalichondrinB from the sponge Halichondria sp. Bioinformatics analysis for the purpose of designing the HalichondrinB primer was carried out using several software such as: BLAST to search sequence HalichondrinB gene, Bioedit for alignment, UGENE for genes within the genome annotation and BLAST primer for primer design on the site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. The ten primers candidates were successfully obtained based on the HalichondrinB analog gene sequences which are aligned with the genome sequence of Halichondria okadai. A primer was selected to represent the HalichondrinB gene, with forward primer (HalF) 5'-ATTGCAGCCGATTGCAGATG-3' and reverse primer (HalR) 5'-AGGCACTAGCACCACAAAGG-3'. The amplification of HalichondrinB potential genes by PCR in silico produced a product with a length of 817 bp.

Keywords: *Bioinformatics, HalichondrinB, Halichondria sp, Primer, PCR in silico*

Abstrak

HalichondrinB merupakan suatu kompleks polyether macrolide yang diisolasi dari berbagai jenis spons laut terutama dari Halichondria sp. Senyawa ini memiliki efek antitumor yang kuat secara in vivo untuk penyakit melanoma dan leukemia. Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan kandidat primer yang baik untuk mengamplifikasi dan mengkarakteristik gen potensial penyandi senyawa HalichondrinB dari spons laut Halichondria sp. Analisis bioinformatika yang dilakukan menggunakan beberapa perangkat lunak seperti, BLAST untuk penelusuran sekuen gen HalichondrinB, Bioedit untuk pensejajaran, UGENE untuk anotasi gen dalam genom sertaprimer BLAST untuk mendesain primer pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Sepuluh kandidat primer berhasil diperoleh berdasarkan sekuen gen analog Halichondrin B yang disejajarkan dengan sekuen genom Halichondria okadai. Terpilih satu primer yang dapat mewakili sekuen gen HalichondrinB dengan sekuen primer forward (HalF) 5'-ATTGCAGCCGATTGCAGATG-3' dan primer reverse (HalR) 5'-AGGCACTAGCACCACAAAGG-3'. Amplifikasi gen potensial HalichondrinB secara PCR in silico menghasilkan produk dengan panjang 817 bp.

Kata Kunci : *Bioinformatika, HalichondrinB, Halichondria sp, Primer, PCR In silico*

Pendahuluan

Mikroba laut khususnya bakteri yang bersimbiosis dengan biota laut, menjadi sumber penting untuk mendapatkan senyawa baru dengan aktivitas farmakologis potensial (Kjer *et al*, 2010). Beberapa hasil riset menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh biota laut ternyata dihasilkan oleh mikroba yang berasosiasi dengannya (Zhang dan Son, 2007). Kondisi lingkungan laut yang berbeda dan lebih bervariasi dibanding dengan lingkungan teresterial, ternyata mempengaruhi karakteristik biokimia yang dihasilkan oleh biota

laut termasuk senyawa bioaktif sebagai kandidat antikanker, antitumor, dan antifungi yang sangat prospek dikembangkan dalam dunia industri obat – obatan (Nursyid *et al*, 2005).

Penapisan senyawa bioaktif dari alam secara konvensional dapat dilakukan dengan serangkaian uji dan kultivasi mikroba untuk membuktikan senyawa tersebut memiliki potensial sehingga memerlukan waktu yang lama. Metode yang berkembang saat ini dalam melakukan penapisan terhadap kandidat–kandidat mikroorganisme yang potensial dalam menghasilkan senyawa bioaktif

dengan pendekatan secara molekular dengan analisis bioinformatika (Fawzya et al, 2016). *HalichondrinB* merupakan senyawa *polyether macrolide* yang diisolasi dari berbagai jenis spons laut terutama spesies *Halichondria* sp. Senyawa ini memiliki efek antitumor yang kuat secara *in vivo* untuk melanoma dan leukemia. Senyawa *HalichondrinB* dapat menghambat pertumbuhan mikrotubulus sel kanker payudara karena mampu membentuk struktur analog *keton makrosiklik eribulin mesylate* yang digunakan sebagai obat kanker payudara (*breast cancer*) (Swami et al, 2015)

Penelitian sebelumnya tentang senyawa aktif *HalichondrinB* dihasilkan oleh biota laut dari spons genus *Halichondria* ssp. Alluri (2012) melaporkan ekstrak metanol dan diklorometana yang berasal dari spons spesies *Haliclona* lunak dapat menghambat kelangsungan hidup sel HeLa. *HalichondrinB* yang diisolasi dari spons *Halichondria okadai* terbukti aktif melawan leukemia (Faulkner, 2002). Tikus yang diobati dengan ekstrak senyawa aktif *HalichondrinB* dengan leukemia B-16 atau leukemia P388 menunjukkan peningkatan harapan hidup sebesar 30% dibandingkan tahun sebelumnya. Secara kimiawi senyawa *HalichondrinB* analog (E7389) disintesis dalam uji coba klinis fase I oleh perusahaan Jepang *Eisai* di Indonesia bersama dengan *American National Cancer Institute* (Cragg and Newman, 2004). *IsohomohalichondrinB* diperoleh dari alam dan budidaya laut. Pengujian lebih lanjut tentang uji klinis senyawa *halichondrinB* atau *isohomohalichondrinB* berhasil dijadikan sebagai komersial dalam obat-obatan. *HalichondrinB Eribulin* telah disetujui oleh *United States Food and Drug Administration* di Singapura pada tahun 2010 sebagai terapi lini ketiga untuk pasien kanker payudara metastatik yang sebelumnya diobati dengan *anthracycline* dan *taxane* *HalichondrinB* memiliki daya hambatan terhadap mikrotubulus sel kanker payudara (Swami et al, 2015).

Studi ekstraksi senyawa telah banyak dilakukan oleh peneliti sebelumnya, namun analisis molekular gen yang menyandi protein *Halichondrin* sangat terbatas. Penelitian bioinformatika berbasis piranti lunak ini bertujuan untuk mengeksplorasi terhadap spons laut yang potensial menghasilkan senyawa bioaktif sebagai antikanker dengan menggunakan potongan sekuen DNA yang

menyandi gen senyawa aktif sebagai kandidat primer yang baik dalam mengamplifikasi gen tersebut. Pendekatan metagenomik dalam pembuatan pustaka genom dari *Holichondria okadai* untuk mendapatkan gen – gen potesial *anti cancer* salah satunya *HalichondrinB* berhasil dilakukan. Hasil pustaka genom didapatkan beberapa klon bakteri *unculture* yang bersimbion dengan spons dari kelompok *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, dan *Cyanobacteria* yang mengandung gen yang terlibat dalam sintesis senyawa peptida non ribosom terhadap simbiannya (Abe et al, 2014). Penelitian ini merupakan riset pendahuluan dalam usaha penapisan senyawa bioaktif *HalichondrinB* sebagai kandidat anti kanker pada spons *Halichondria* sp serta menentukan sekuen DNA yang belum diketahui yang berfungsi untuk sintesis gen *HalichondrinB* yang ditargetkan.

Metode Penelitian

Penelusuran sekuen gen penyandi *Halichondrin B* pada situs NCBI

Sekuen gen potensial penyandi *HalichondrinB* didapatkan dari hasil penelusuran Genbank sekuen analog *HalichondrinB* (DM024987.1) pada situs (www.nlm.nih.gov). Sekuen yang digunakan hasil dari pensejajaran genom mitokondria *Halichondria okadai* (NC_037391.1) dengan ClustalW diperangkat lunak Bioedit (v7.0.9 Tom Hall) dan UGENE (GNU General Public License v3) .

Analisis sekuens gen *HalichondrinB*

Sekuen gen potensial penyandi *HalichondrinB* dari spons laut dengan kerabat terdekat menggunakan *toolsBLAST (Basic Local Alignment Search Tools)*

Anotasi gen dalam sekuen Mitokondria *Halichondria Okadai*

Anotasi gen – gen fungsional dalam sekuen genom mitokondria *Halichondria okadai* sebagai model dalam menentukan daerah CDS menggunakan piranti lunak UGENE (GNU General Public License v3)

Desain primer dan PCR *in silico*

Analisis desain primer dengan menggunakan piranti lunak Primer BLAST (Bethesda MD, 20894 USA) dari sekuen gen yang memiliki similaritas tinggi (pada daerah basa domain cds) dengan keunikan basa untuk dibuat desain primer dan melakukan PCR *insilico* untuk menentukan daerah penempelan primer pada template DNA menggunakan software UGENE (GNU General Public License v3).

Analisis prediksi struktur 3D

Analisis prediksi struktur 3D protein *HalichondrinB* dengan menggunakan software secara daring yaitu SWISS- Model (Basel, Switzerland) dan Phymol(California, USA)

Konstruksi pohon filogenetik

Konstruksi pohon filogenetik spesies *Halichondria okadai* dengan genus lain dan *Halichondriassp* berdasarkan sekuen mitokondrianya untuk melihat kekerabatan terdekat dalam penapisan spesies lain dari genus yang berbeda yang potensial menghasilkan *HalichondrinB* dengan menggunakan piranti lunak MEGA 7 (Kumar et al, 2016)

Hasil dan Pembahasan

Pencarian Database Gen *HalichondrinB* di GenBank

Senyawa *HalichondrinB* merupakan senyawa makrolida polieter yang dihasilkan oleh spons *Halichondria okadai*(NC_037391.1).Spons ini

umumnya hidup didaerah *tidal zone* diperairan Poso Peninsula Jepang (Abe et al, 2014) dan di perairan laut Korea (Kim et al, 2017). Penelusuran sekuen gen *HalichondrinB* yang ada di GenBank melalui situs NCBI menggunakan sekuen gen analog *HalichondrinB* yang digunakan untuk penapisan *Tubulin isotype* pada pasien terapi kanker leukemia (Agoulnik et al, 2008). Sekuen gen analog *HalichondrinB* ini hanya berukuran 32 bp nukleotida dengan urutan sekuen TATACCATTGGCAAGGAGATAATTATACCT (DM024987.1).Sekuen utuh dari gen *HalichondrinB* sendiri belum pernah dipublikasikan sebelumnya, sehingga dalam pencariannya tidak ditemukan sekuen yang sama atau identik. Oleh karena itu, penggunaan sekuen analog *HalichondrinB* sangat membantu dalam memprediksi sekuen gen *HalichondrinB* berdasarkan hasil pensejajaran gen *HalichondrinB* analog dengan sekuen genom *Halichondria okadai*(NC_037391.1) menggunakan piranti lunak *Bioedit*(Gambar 1).



Conservative region

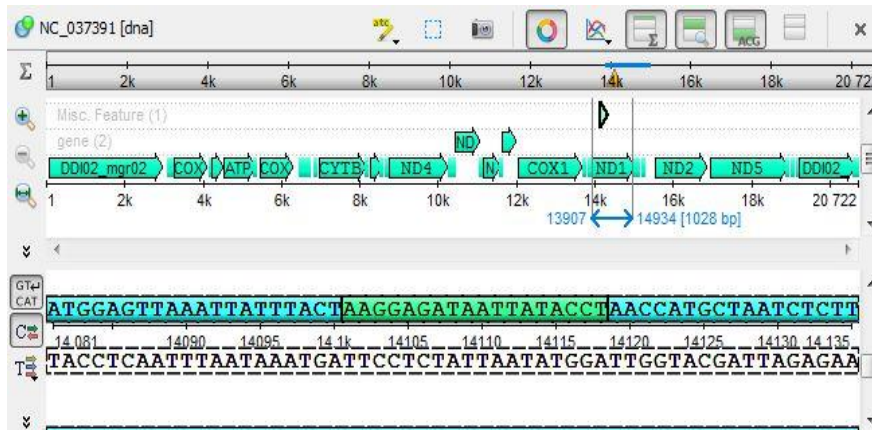
Gambar 1

Hasil pensejajaran sekuen *HalichondrinB* analog dengan sekuen genom mitokondria *Halichondria okadai*

Hasil pensejajaran dari Gambar 1 menunjukkan daerah lestari (konservatif) dari kedua sekuen tersebut terletak pada basa ke 14100 sampai basa 14118 dari sekuen genom mitokondria spons *Halichondria okadai*. Hasil ini juga diperkuat dengan letak dari sekuen konservatif tersebut berada pada daerah sekuen CDS (*coding sequence*) genom mitokondria *Halichondria okadai* yang terletak pada urutan basa 13924 sampai 14925 (Kim et al, 2017). Hasil anotasi gen fungsional dari genom mitokondria menggunakan piranti lunak UGENE dengan sekuen analog gen *HalichondrinB* menunjukkan bahwa gen ini merupakan bagian dari cluster gen MT-ND1 (*Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1*) sebagai gen yang menginduksi pembentukan protein NADH dehydrogenase Genom mitokondria *Halichondria okadai* (MG267395) memiliki panjang 20.722 bp mengandung 14 gen pengkode protein (PCG), dua ribosom RNA (rRNA), dan 25 RNA transfer (tRNA). Secara keseluruhan komposisi basa nukleotida *H. okadai* adalah 29,5% A, 14,2% C,

21,5% G, 34,7% T, Semua PCGs menggunakan tipikal ATG sebagai *star codon*. Sepuluh PCGs (*atp9*, *cytb*, *cox3*, *atp6*, *cox2*, *nad1*, *cox1*, *nad4l*, *nad6*, dan *nad4*) menggunakan TAA sebagai *stop codon* sementara empat (*atp8*, *nad5*, *nad2*, *nad3*) gen memiliki TAG (Kim et al, 2017) (Gambar 2).

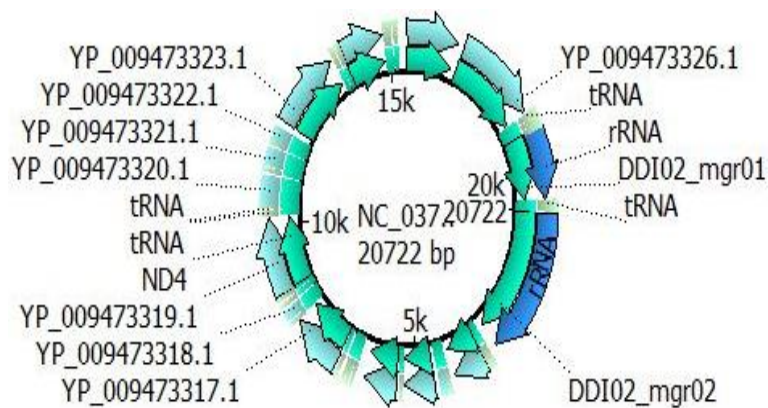
Gambar 3 menunjukkan daerah CDS tersebar pada seluruh genom (tanda panah). Sekuen CDS atau ORF (*open reading frame*) merupakan bagian gen yang mengkode asam amino dalam menghasilkan protein. Dipilih sekuen basa daerah CDS karena memiliki sekuen homolog dengan spesies lainnya namun memiliki basa yang unik. Sekuen ini juga sangat penting dalam menentukan letak gen – gen fungsional dalam sebuah genom (Furuno et al, 2003). Prediksi sekuen CDS sebagai gen penyandi *HalichondrinB* untuk mendapatkan kandidat primer yang tepat untuk mengamplifikasi gen tersebut secara utuh (Gambar 4).



Gambar 2

Anotasi Gen *HalinchondrinB* pada DNA mitokondria *Halichondria okadai*

Hasil anotasi gen fungsional dalam genom mitokondria *Halichondria okadai* menggunakan piranti lunak UGENE (Gambar 3)



Gambar 3

Anotasi sekuen genom mitokondria *Halichondria okadai* (Kim et al, 2017)

Gambar 4 menunjukkan sekuen CDS diawali dengan kodon awal dengan kode ATG dengan panjang nukleotida 1010 pasang basa dengan total 330 asam amino. Dalam sekuen asam amino start kodon diawali dengan asam amino metionin (UAG). Hal ini dapat memberikan informasi gen utuh dalam sebuah genom, indikasi ini harus dibuktikan dengan mengekspresikan gen tersebut kedalam *Escherichia coli* BL21 sebagai strain yang umum digunakan pada tingkat ekspresi gen. Pembuktian gen yang diprediksi penyandi *HalichondrinB* pada tingkat molekuler lebih memudahkan dalam proses penapisan (*skrining*) terhadap kandidat spons laut yang potensial menghasilkan senyawa *HalichondrinB* terutama dari genus *Holichondria* spp.

TAGGGGTGTGGTAAAAATGGTGATAAGATTAATAAAAAATTAACATATATTAGT
 13 907 13915 13920 13925 13930 13935 13940 13945 13950 13955 13 961
 ATCCCCACACCATTTTCTACCACTATTCTAATTATTTTATAAATTGATATAATCA

CCCTTTACTTATTTCAATAGCATATTTAACATTAGCGGAACGAAAAGTATTAGGT
 13 962 13970 13975 13980 13985 13990 13995 14k 14005 14010 14 016
 GGGAAATGAATAAAGTTATCGTATAAAATGTAATCGCCTTGCTTTTCATAATCCA

TATATACAATGTAGAAAAGGTCCAAATGTGGTAGGTATATACGGTTTATTGCAG
 14 017 14025 14030 14035 14040 14045 14050 14055 14060 14065 14 071
 ATATATGTTACATCTTTTCCAGGTTTACACCATCCATATATGCCAAATAACGTCG

CGATTGCAGATGGAGTTAAATTATTTACTAAGGAGATAATTATACCTAACCATGC
 14 072 14080 14085 14090 14095 14.1k 14105 14110 14115 14120 14 126
 GCTAACGTCACCTCAATTAATAAAATGATTCCTCTATTAATATGGATTGGTACG

TAATCTCTTTATATATATATTAGCCCTATTTTGTGGTTAACATTGCTTTTATA
 14 127 14135 14140 14145 14150 14155 14160 14165 14170 14175 14 281
 ATTAGAGAAAATATATATAATAATCGGGGATAAAAACAGCAATTGTAACAGAAAATAT

CGGTGGGGGGTAATACCTTATAGTGAGGGTGTAGTGTAAAGTGATTAGGTATTG
 14 182 14190 14195 14.2k 14205 14210 14215 14220 14225 14230 14 236
 CGCACCCCCATTATGGAAATATCACTCCACATCACAAATCACTAAATCCATAAC

GGTTCCTTTATTTATTTGCGGTTTCTTCGATTAGTGTATTATCGCATATTAATGTC
 14 237 14245 14250 14255 14260 14265 14270 14275 14280 14285 14 291
 CCCAAGAAATAAATAAACGGCAAAGAAGCTAATCACAAATACGCTATAATTACAG

GGGATGAGGCAGTAATTCCTAAGTATGCTTTTTTAGGGGGGATAAGGGCAGCAGCG
 14 292 14.3k 14305 14310 14315 14320 14325 14330 14335 14340 14 346
 CCTACTCGTTCATTAAGATTTCATACGAAAAAATCCCGCTATTCCCGTCGTCGG

CAAATGATAAGCTACGAGGTGCTATTGGGCTAATAATCATTTCTGTGGTTTTAT
 14 347 14355 14360 14365 14370 14375 14380 14385 14390 14395 14 401
 GTTACTATTCGATGCTCCACAGATAACCCGATTATAGTAAAGACACCAAAATA

GTGTTGGTCTTTAAATTTAAGCCAAATAGTTTTAACTCAGACTATGGTATGGTT
 14 402 14410 14415 14420 14425 14430 14435 14440 14445 14450 14 456
 CACAACCAAGAAATTTAAATTCGGTTTTATCAAATTGAGTCTGATACCATACCAA

FATTTTACCATTGTTTCCATTGCTTCATGTTTTTTGTTTCTGCTTTAGCAGAA
 14 457 14465 14470 14475 14480 14485 14490 14495 14.5k 14505 14 511
 ATAAAATGGTAACAAAGGATAACGGGAAGTACAAAAACAAAGACGAAATCGTCTT

ACAAACAGAGTGCCTTTTGATTTAACAGAAGGGGAATCAGAATTAGTATCGGGGG
 14 512 14520 14525 14530 14535 14540 14545 14550 14555 14560 14 566
 TGTTTGTCTCACGGAAAATAAATTGTCTTCCCTTAGTCTTAATCATAGCCCCA

TAATGTAGAGTATTCAAGTATGTCATTTGCTTTGTTCTTTTLAGCGGAGTATTG
 14 567 14575 14580 14585 14590 14595 14.6k 14605 14610 14615 14 621
 AATTACATTCATAAGTTCATACAGTAAACGAAACAAGAAAATCGCCTCATAAC

TCATATAATTTGATGCTGCTTTGGGGTTCTTTTATTTTTTGGGGGATGATTG
 14 622 14630 14635 14640 14645 14650 14655 14660 14665 14670 14 676
 AGTATATTAAACTACAGACAGAAACCCCAAGAAAATAAAAACCCCTACTAAC

TGCCCATTTGAGGGCCTTTTTAGTTATATCTTATTAGACGGAAATTGAGCACATT
 14 677 14685 14690 14695 14.7k 14705 14710 14715 14720 14725 14 731
 ACGGGTAAACTCCCGGAAAATAAATAAGAAATAATCTGCCTTTAAGTCTGTTAA

TTTGGTGATTAGCGGGAAAGTGGTTTTCTTATTTATTTGTTTATTTGAATAAG
 14 732 14740 14745 14750 14755 14760 14765 14770 14775 14780 14 786
 AAACCACTAATCCGCCCTTTCACCAAAAAGAATAAATAAACAAATAAATTAATTAAT

AGGGACTTACCCTAGAATAAGGTACGACCAACTAATGGCTCTATTGTGAAAATCT
 14 787 14795 14.8k 14805 14810 14815 14820 14825 14830 14835 14 841
 TCCCTGAATGGGATCTTATTCATGCTGGTTGATTACCGAGATAAACACTTTTAGA

FATTTACCCTTAAGCTTAGCCTTTGTTGGTGTAGTGCCTGGGCTTGAATAGGTT
 14 842 14850 14855 14860 14865 14870 14875 14880 14885 14890 14 896
 ATAAAATGGGAATTCGAATCGGAAACACCAAGATCACGGACCCGAACATTATCCAA

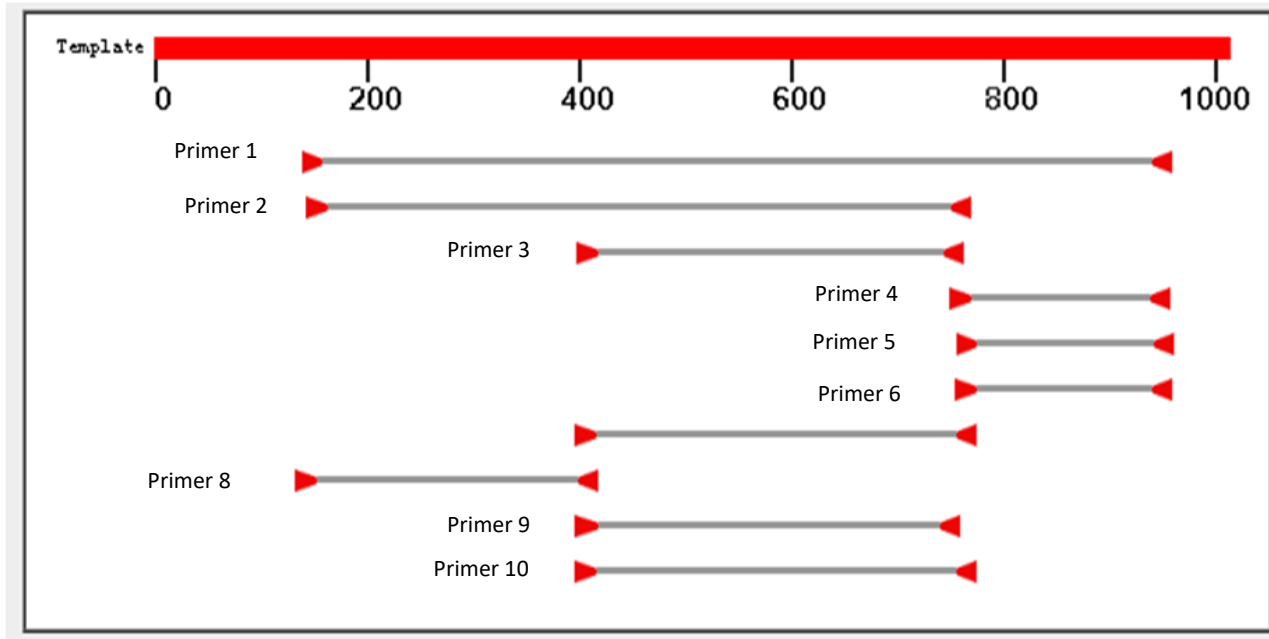
TTGATATATTACCGCCCTTTGGGTTATAATCTAGGTAT
 14 897 14905 14910 14915 14920 14925 14 934
 AACTATATAATGGCGGAAACCAATAATATAGATCCATA

Gambar 4
 Sekuen CDS sebagai prediksi Gen *HalichondrinB*

Desain Primer Gen penyandi HalichondrinB

Primer merupakan salah satu bagian terpenting dalam reaksi PCR, *Polymerase Chain Reaction* merupakan teknik perbanyakan sample DNA secara *in vitro*. Sekuen dasar dalam mendesain primer yang dapat mengaplifikasi gen *HalichondrinB* berdasarkan sekuen CDS yang

terdapat dalam sekuen genom spons *Halichondria okadai*. Hasil desain primer menggunakan primer BLAST pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Terdapat 10 pasang primer yang memiliki daerah target masing – masing dengan ukuran yang berbeda-beda. Posisi pasang primer *forward* dan *reverse* dapat dilihat pada Gambar 5



Gambar 5
Posisi relatif pasangan – pasangan primer terhadap gen *HalichondrinB*

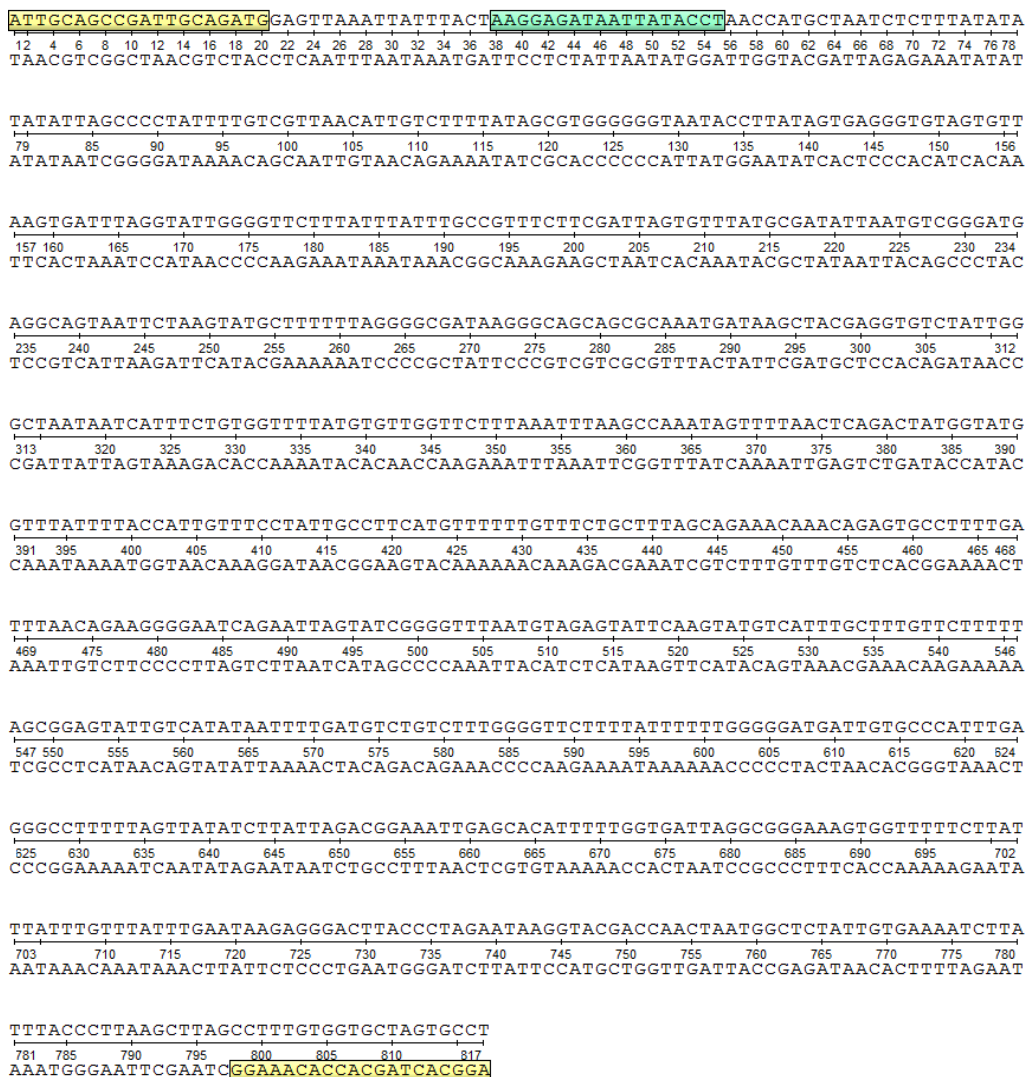
Gambar 5 menunjukkan daerah amplifikasi masing – masing primer pada template DNA sekuen. Selain itu, terbentuknya ikatan yang terlalu kuat antar *template* DNA dan primer akan mengakibatkan produk PCR yang dihasilkan rendah. Panjang primer berkisar 18-30

basa, didasarkan pada pertimbangan kombinasi acak yang mungkin ditemukan pada satu urutan genom. Untuk lebih jelas detail sekuen masing – masing primer, posisi relatif primer, nilai *Tm*, konten GC dan karakteristik lainnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1
Sepuluh pasang kandidat primer untuk aplikikasi gen *HalichondrinB*

Primer		Start	BP	(Tm) ^o C	GC	3'Self	Nukleotida	Product Size
1	Forward	141	20	55.34	50.00	2	ATTGCAGCCGATTGCAGATG	817
	Reverse	957	20	54.20	55.00	0	AGGCACTAGCACCACAAAGG	
2	Forward	145	20	55.66	55.00	2	CAGCCGATTGCAGATGGAGT	624
	Reverse	768	20	52.77	55.00	2	GCCCTCAAATGGGCACAATC	
3	Forward	399	20	54.41	55.00	1	TTAGGGGCGATAAGGGCAG	363
	Reverse	761	20	52.27	55.00	2	AATGGGCACAATCATCCCC	
4	Forward	749	20	52.77	55.00	3	GATTGTGCCCATTTGAGGGC	207
	Reverse	955	20	54.85	55.00	3	GCACTAGCACCACAAAGGCT	
5	Forward	755	20	52.36	50.00	0	GCCATTTGAGGGCCTTTT	205
	Reverse	959	20	54.19	55.00	0	CCAGGCACTAGCACCACAAA	

Primer		Start	BP	(Tm) ^o C	GC	3'Self	Nukleotida	Product Size
6	Forward	754	20	53.44	50.00	0	TGCCCATTTGAGGGCCTTTT	205
	Reverse	958	20	53.94	55.00	0	CAGGCACTAGCACCACAAAG	
7	Forward	398	20	53.31	50.00	2	TTTTAGGGGCGATAAGGGCA	376
	Reverse	773	20	53.44	50.00	2	AAAAGGCCCTCAAATGGGCA	
8	Forward	134	21	54.78	47.62	2	ACGGTTTATTCAGCCGATTG	285
	Reverse	418	20	54.41	55.00	1	CTGCCCTTATCGCCCCTAAA	
9	Forward	398	21	55.14	52.38	1	TTTTAGGGGCGATAAGGGCAG	361
	Reverse	758	20	52.43	55.00	0	GGGCACAATCATCCCCAAA	
10	Forward	397	21	54.09	47.62	0	TTTTTAGGGGCGATAAGGGCA	378
	Reverse	774	20	52.36	50.00	3	AAAAGGCCCTCAAATGGGC	



Gambar 6

Hasil PCR *in silico* Primer 1 menggunakan software UGENE

Tabel 1 menunjukkan sepuluh kandidat primer rata – rata memiliki suhu Tm (*temperature melting*) antara 50 – 60 °C. Dalam mendesain primer yang baik suhu Tm yang baik berkisar antara 40 – 60 °C. Primer dengan Tm terlalu tinggi melebihi

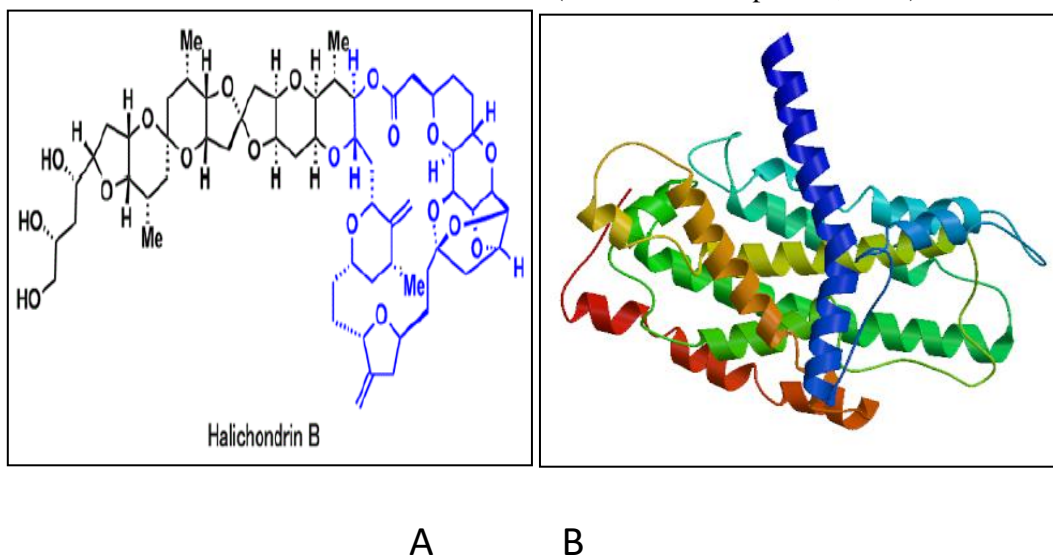
70°C akan mudah mengalami *mispriming* pada temperatur rendah. Pasangan primer sebaiknya tidak memiliki selisih suhu Tm yang tinggi antara *forward* dan *reverse*. Pasangan primer dengan selisih suhu leleh yang lebih dari 5°C menyebabkan penurunan

proses amplifikasi, atau bahkan memungkinkan tidak terjadi proses amplifikasi (Borah, 2011). Sedangkan untuk persentasi GC dari kesepuluh primer berkisar antara 50–60%. GC Content berperan dalam meningkatkan stabilitas primer. Ikatan hidrogen yang kuat pada pasangan basa G dan C menyebabkan primer lebih stabil untuk menempel pada *template*, sehingga GC Content disarankan berkisar antara 40% hingga 60% (Lin et al, 2005). Kesepuluh primer tersebut dapat mengamplifikasi gen *HalichondrinB* dengan ukuran yang berbeda. Dari sepuluh kandidat primer tersebut, primer 1 dan 2 lebih dapat mewakili untuk mengamplifikasi gen *HalichondrinB* dengan ukuran produk yang lebih besar dari pada yang lain yaitu 817 bp dan 624 bp. Adapun primer 1 dengan sekuen *forward* HalF 5'ATTGCAGCCGATTGCAGATG-3' dan primer *reverse* HalR 5'-AGGCACTAGCACCACAAAGG-3'. Hal ini juga didukung dengan karakteristik lainnya yang sesuai sebagai syarat untuk mendesain primer yang baik. Pemilihan primer 1 diperkuat dengan analisis PCR *in silico* menggunakan software UGENE dengan daerah amplifikasi yang dapat menempel pada *template* sekuen CDS gen *HalichondrinB* (Gambar 6)

Permodelan Struktur 3 Dimensi Protein *HalichondrinB*

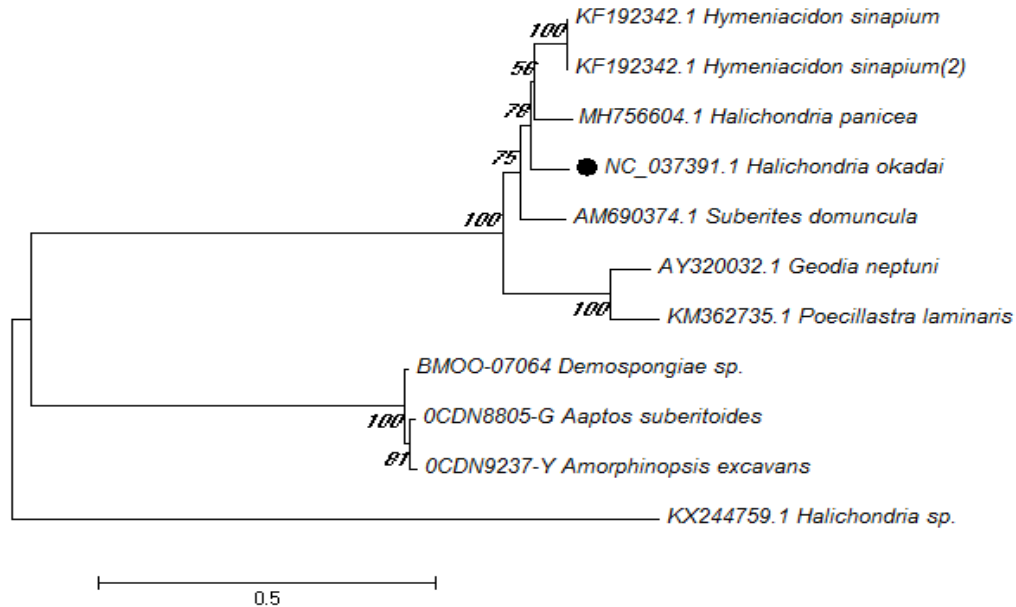
Struktur 3 dimensi protein *HalichondrinB* dapat diprediksi permodelannya menggunakan piranti lunak SWISS-Model. Penggunaan Piranti lunak ini dapat mewakili prediksi permodelan yang disesuaikan dengan *template* protein yang sudah dipublikasikan sebelumnya. SWISS-Model akan mencari struktur yang mirip dengan protein *template* dan membangun protein *template* sesuai dengan protein model (Gambar 8B). Permodelan protein ini dibangun berdasarkan struktur dasar dari senyawa *HalichondrinB* (Gambar 8A) Permodelan protein dapat menggunakan beberapa software yaitu SWISS-Model, I-TASSER, QUARK, Phyre 2 dan analisis akhir menggunakan PyMol.

Prediksi struktur 3D protein *HalichondrinB* terdapat tiga molekul identik berikatan satu sama lain dengan membentuk sebuah cincin homotrimer yang akan melingkari DNA *double helix*. Molekul *loops* (koil) membentuk lipatan yang mana struktur ini mudah mengalami mutasi. Permukaan dalam dari lingkaran tersebut berbentuk α heliks dan bermuatan positif sehingga dapat berinteraksi dengan DNA. Permukaan luar dari lingkaran ini berbentuk β sheet dan bermuatan negatif. Struktur tersier 3D protein mengacu pada hubungan spasial antara struktur sekunder dan struktur tersier. Struktur ini distabilkan oleh empat macam ikatan, yakni ikatan hidrogen, ikatan ionik, ikatan kovalen, dan ikatan hidrofobik (Febriana dan Seprianto, 2018).



Gambar 8

Prediksi struktur protein *HalichondrinB*, A. Struktur Kimia *HalichondrinB* (Mani dan Swami, 2010) B. Struktur 3D *HalichondrinB*



Gambar 9

Pohon filogenetik *Halichondria okadai* dengan beberapa spesies spons laut

Analisis Filogenetik *Halichondria okadai* dengan spesies lain

Pembuatan filogenetik menggunakan piranti lunak MEGA7 dari spesies *Halichondria okadai* dengan beberapa spesies *Halichondria* ssp dan spesies lain yang memiliki kekerabatan terdekat berdasarkan hasil *multiple alignment* sekuen mitokondria (Gambar 9). Analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbour Joining* yaitu pasangan nukleotida yang mengalami perubahan terkecil diantara sekuen yang telah dibandingkan. Nilai jarak dilambangkan oleh garis skala yang menunjukkan jumlah substitusi nukleotida untuk tiap posisi sekuen (Tamura et al, 2013). Nilai jarak sebesar 0.2 pada hasil konstruksi pohon filogenetik menunjukkan rendahnya substitusi nukleotida pada sekuen dimasing-masing pengelompokan berdasarkan tingkat genus dan spesies. Gambar 9 menunjukkan hasil pengelompokan ini untuk melihat seberapa jauh dan dekatnya hubungan kekerabatan masing-masing spesies. Metode *Bootstrap* digunakan untuk menguji keakuratan suatu titik cabang pohon filogenetik. Stabilitas pengelompokan (*robustness*) diperhitungkan menggunakan bootstrap dengan 1000 kali ulangan. Nilai bootstrap sebesar 78 dari 100 kali pengulangan untuk titik percabangan memiliki kekerabatan terdekat antara spesies *Halichondria okadai* dengan *Halichondria panicea* dan *Hymeniacion sinapium* berdasarkan sekuen genom mitokondria

Kesimpulan

Analisis bioinformatika gen penyandi *HalichondrinB* dari sekuen mitokondria *Halichondria okadai* (NC_037391.1) berdasarkan penelusuran sekuen analog *HalichondrinB* didapatkan sekuen CDS dengan 1010 bp (pasang basa) nukleotida dengan total 330 asam amino. Sepuluh kandidat primer berhasil diperoleh berdasarkan sekuen CDS *HalichondrinB*. Satu primer dipilih yang dapat mewakili sekuen gen *HalichondrinB* memiliki panjang produk 817 bp (*basepair*) dengan sekuen primer *forward* HalF 5'-ATTGCAGCCGATTGCAGATG-3' dan primer *reverse* HalR 5'-AGGCACTAGCACCACAAAGG-3'. Hasil analisis filogenetik memiliki *Halichondria okadai* berkerabat dekat dengan *Halichondria panicea* dan *Hymeniacion sinapium* berdasarkan sekuen genom mitokondria yang berpotensi menghasilkan senyawa *HalichondrinB*.

Daftar Pustaka

Abe T, Sahin FP, Akiyama K, Naito T, Kishogami M, Miyamoto K, Sakakibara Y, Uemura D. 2014. Construction of a Metagenomic Library for the Marine Sponge *Halichondria okadai*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76:4, 633-639, <https://doi.org/10.1271/bbb.110533>

Alluri N, Thameemulansari LH, Reddy CV. 2012. Cytotoxic activity of methanol and

- dichloromethane extracts soft Haliconaspecies. *IJPSR*. Vol.3 (6) 1782 – 1784
- Agoulnik S, Kuznetsov G and Littlefield BA. 2008. Tubulin Isotype Screening in Cancer Therapy using Halichondrin B. Patent: JP 2008522623-A 29
- Borah P. 2011. Primer Designingfor PCR. *Science Vision*, vol. 11(3):134-136.
- Cragg GM, Newman DJ. 2004. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 100:72–79
- Fawzya YN, Zilda DS, Seprianto, Prestisia HN, Lisdiyanti P, Khasanah N. 2016. Screening of indonesian streptomyces sp. Capable of Secreting transglutaminase (MTGase) and optimization Of mtgase production using different growth media. *Squalen Bull. of Mar. and Fish. Postharvest and Biotech*. e-ISSN: 2406-9272, 11 (1), 13-21.doi: <http://dx.doi.org/10.15578/squalen.v11i.195>
- Febriana dan Seprianto. 2018. Candida antarctica Lipase B Synthetic Gene:A Bioinformatics Analysis. *Bioscience*. Vol.(2):2, 1412-9760. Doi: 10.24036/0201822100216-0-00
- Furuno M, Kasukawa T,Saito R,Adachi J, Suzuki H, Baldarelli R, Hayashizaki Y, and Okazaki Y. 2003. CDS Annotation in Full-Length cDNA Sequence. *Genome Res*. 13(6b): 1478–1487. doi: 10.1101/gr.1060303
- Kintoko, Azimhato, Pihie HL. 2008. Morphological study on opoptoxic HeLa cells induced by petroleum ether extraxct from leaves of phateria macrocorpa (Scheff). *Proceeding of The International Seminaron Chemistry* pp 299 ISBN 978 . 979. 18962.7
- Kim H, Kim HJ, Jung YH, Yu C, Rock Y, Han D, Kang DW. 2017. The complete mitochondrial genome of sponge Halichondria okadai (Demospongiae, Suberitida, Halichondriidae) from Korea water. *Mitochondrial Dna Part B: Resources*.Vol. 2:2, 873–874 <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1407693>
- Kjer J, Debbab A, Aly H, and Prokch P. 2010. Methods for isolation of marine – derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature protocols*. 5(3): 479-490
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary GeneticsAnalysis version 7.0 for bigger datasets.*Molecular Biology and Evolution* 33:187-1874
- Lin, FM, Huang HD, Huang HY, and Horng JT. 2005. Primer design for multiplex PCR using a genetic algorithma. *Conf. Genet. Evol. Comput. – GECCO 05*, p. 475.
- Mani S, Swami U. 2010. Eribulin mesilate, a Halichondrin B analogue, in the treatment of breast cancer. *Drugs Today*. 46, 641–653
- Nursid M, Munifah I. dan Januar HI. 2005. Skriningsenyawa bioaktif ekstrak metanol dari karang lunak Alcyonidae. *J. Penel. Perikanan. Indo*. 11(4): 33-38
- Swami U, Shah U and Sanjay Goel. 2015. Eribulin in Cancer Treatment. *Marine Drugs*, 13. 5016-5058; ISSN:1660-3397 doi:10.3390/md13085016
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Zhang D, And Son BW. 2007. Chemical studies on the bioactive metabolites from marine derived fungi MFB604 and MFC353. *Natural Products Chemistry Laboratory*. Pukyong National University. Busan, Korea