

Prediksi DNA Primer gen PGC-1 α cecak (*Hemidactylus platyurus*) dengan metoda phylogenetic, multiple alignment, dan qPCR

Titta Novianti^{1,2}, Vetzazah Juniantito³, Ahmad Aulia Jusuf⁴, Evy Ayu Arida⁵, Sri Widia A. Jusman⁶, Mohamad Sadikin^{6*}

¹Program Studi Doktorat Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

²Program Studi Bioteknologi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul

³Departemen Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

⁴Departemen Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

⁵Laboratorium Zoologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

⁶Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

*Corresponding Authors: sadikinmohamad@gmail.com

Abstract

The role of genes in tissue regeneration process of house gecko (*Hemidactylus platyurus*) tail is very important to study. However, the PGC-1 α gene that plays a role in mitochondrial biogenesis in the tissue regeneration process of house gecko tail has not been studied before. The phylogenetic method can be used to track the determinant species closest to kinship. Multiple alignment method is software that can align the conserved gene sequences from several species that have sequence identities highly. The phylogenetic analysis is used to track the determinant species closest to kinship. Basic Local Alignment Software Tools (BLAST) is used to analyze the identity of gene sequences from several species. Alignment the conserved sequences of gene was using to multiple alignment methods in MEGA7 software. Primary DNA predicted of PGC-1 α gene was made using Primer3 software that based on gene sequences conserved from MEGA7 multiple alignment process. The specification of gene expression was tested by Real Time PCR. The results of phylogenetic analysis the species closest to *H. platyurus* are *Gecko japonicus*. BLAST results and multiple alignments obtained by sequences as a basis for the design of primary DNA. The primary design of the DNA predicted PGC-1 α *H. platyurus* gene was successfully amplified with Real Time PCR and produced one peak, which indicates the specific gene expression. Predicted primary DNA PGC-1 α gene of *Hemidactylus platyurus* that has not been previously studied, can be designed using phylogenetic to determinant species closest to kinship and multiple alignment methods.

Keywords: mitochondrial biogenesis, tissue regeneration, MEGA7, BLAST, qPCR

Abstrak

Peran gen pada proses regenerasi jaringan ekor cecak rumah *Hemidastylus platyurus* sangat penting untuk diteliti, Namun, gen PGC-1 α yang berperan dalam biogenesis mitokondria pada proses regenerasi jaringan ekor cecak rumah, belum pernah diteliti sebelumnya. Metoda phylogenetic dapat digunakan melacak spesies penentu yang paling dekat kekerabatannya. Metoda multiple alignment merupakan software yang dapat mensejajarkan sekuen gen lestari dari beberapa spesies yang memiliki identity sekuen tinggi. Analisis phylogenetic digunakan untuk melacak spesies penentu yang paling dekat kekerabatannya. BLAST software digunakan untuk analisis identity sekuen gen dari beberapa spesies. Pensejajaran sekuen gen yang bersifat lestari menggunakan multiple alignment metoda pada software MEGA7. Dibuat rancangan prediksi DNA primer gen PGC-1 α dengan software primer3 berdasarkan sekuen gen lestari hasil multiple alignment MEGA7. Spesifikasi ekspresi gen diuji dengan Real Time PCR. Hasil analisis phylogenetic spesies yang terdekat dengan *H. platyurus* adalah *Gecko japonicus*. Hasil BLAST dan multiple alignment diperoleh sekuen lestari sebagai dasar rancangan DNA primer. Diperoleh desain primer DNA predicted gen PGC-1 α *H. platyurus* yang berhasil diamplifikasi dengan Reak Time PCR dan menghasilkan satu peak, yang menandakan gen terekspresikan spesifik. Predicted DNA primer gen PGC-1 α *Hemidactylus platyurus* yang belum pernah diteliti sebelumnya dapat dirancang dengan metoda multiple alignment dengan spesies penentu yang paling dekat kekerabatannya menurut phylogenetic.

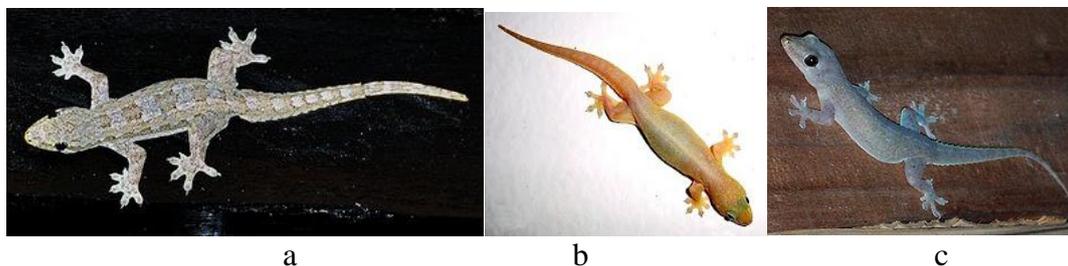
Kata Kunci: biogenesis mitokondria, regenerasi jaringan, MEGA7, BLAST, qPCR

Pendahuluan

Gecko adalah hewan reptil yang biasa merayap di dinding atau pohon. Berdasarkan habitatnya terdapat dua jenis, yaitu cecak rumah dan cecak hutan. Cecak rumah memiliki tiga spesies yang berbeda yaitu *Hemidactylus frenatus*, *Hemidactylus platyurus* (cecak tembok) dan *Gehyra mutilata*, dengan habitat berupa bangunan, semak, dan pohon [1,2].

Hemidactylus platyurus adalah sejenis reptil yang termasuk suku cecak (Gekkonidae). Dalam bahasa Inggris disebut *flat-tailed house gecko*, seperti tercermin dari nama ilmiahnya, *platyura* (dari bahasa Yunani, *platus* artinya pipih, *ura* artinya ekor) [3]. *Hemidactylus platyurus* ini bertubuh pipih

lebar, berekor lebar dengan jumbai-jumbai halus di tepinya. Pada sisi bawah bagian tubuhnya terlihat adanya lipatan kulit agak lebar di sisi perut dan di belakang kaki. *Hemidactylus frenatus* memiliki tubuh lebih kurus, bentuk ekor lebih bulat, dan memiliki tonjolan kulit serupa duri. *H. frenatus* lebih menyukai tinggal di pohon atau di bagian rumah yang berkayu seperti atap rumah. Terkadang didapati bersama cecak tembok di dinding luar rumah dekat lampu, namun umumnya kalah bersaing dalam memperoleh makanan. *Gehyra mutilata* bertubuh lebih kecil, kepala membulat, dan warna kulit lebih cerah. Cecak ini kerap ditemui di sekitar dapur, kamar mandi, dan lemari makan, mencari butir-butir nasi atau gula [4,5].



Gambar 1. Jenis-jenis cecak (a) cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*); (b) Cecak kayu (*Hemidactylus frenatus*); (c) cecak gula (*Gehyra mutilata*) (modifikasi dari^{4,5})

Cecak rumah termasuk ke dalam kelas Reptilia, ordo Squamata, dan famili Gekkonidae. Cecak *H. frenatus* ditemukan di seluruh wilayah Indonesia, sedangkan *H. platyurus* ditemukan di pulau Jawa, Nias, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Lombok, dan Flores. *H. platyurus* tersebar luas, mulai dari Nepal dan Bhutan, India

utara (Darjeeling, Sikkim), India timur, termasuk Andaman dan Nikobar, Sri Lanka, lewat Myanmar, Vietnam, Thailand, semenanjung Malaya sampai ke Sumatra, Borneo, dan Jawa, ke timur sampai Filipina, Tiongkok, dan Florida, Amerika Serikat [6,7].

Tabel 1. Tabel Klasifikasi Ilmiah Cecak Rumah (modifikasi dari^{4,5})

Taksa	Nama taksa
Kingdom	Animalia Linnaeus, 1758 - kerajaan hewan (animals)
Phylum	Chordata Bateson, 1885 – filum chordata (chordates)
Class	Reptilia Laurenti, 1768 – kelas binatang melata (reptiles)
Order	Squamata Opperl, 1811 - ordo kadal dan ular
Family	Gekkonidae Gray, 1825 - suku cecak (geckoes)
Genus	<i>Hemidactylus</i> Gray, 1825
Species	<i>H. platyurus</i>
Binomial nama latin	<i>Hemidactylus platyurus</i> (Schneider, 1797)

Cecak memiliki daya regenerasi tinggi pada ekor yang terputus (autotomi) dan mampu membentuk ekor baru. Autotomi adalah perilaku cecak dalam kemampuannya memutuskan ekor untuk mengelabui predator. Saat autotomi, cecak akan menekan ototnya di bagian tataran autotomi sehingga ekor terputus (gambar 1).

Secara struktur, ekor cecak disokong oleh ruas-ruas tulang ekor (vertebra kaudalis) yang tersusun berurutan dari pangkal sampai ke ujung ekor. Pada ekor terdapat jaringan lemak, jaringan otot, jaringan saraf (pusat dan tepi), pembuluh darah, dan kulit. Pada bagian tengah ruas tulang ekor cecak terdapat bagian yang

menyempit membentuk suatu celah melintang disebut tataran autotomi [8,9].

Daya regenerasi jaringan ekor pada cecak merupakan upaya cecak untuk memperbaiki jaringan pada ekor sehingga dapat memulihkan struktur dan fungsi jaringan seperti sedia kala [9]. Proses regenerasi jaringan meliputi proses proliferasi sel, migrasi, diferensiasi, dan morfogenesis. Pada dasarnya, proses regenerasi dimediasi oleh proses regulasi molekuler, gen, dan protein [10]. Keseluruhan proses regenerasi jaringan memerlukan energi dalam jumlah besar, yang dapat diperoleh melalui proses metabolisme aerob. Peningkatan metabolisme aerobik tercermin dengan meningkatnya jumlah mitokondria, sebab mitokondria merupakan organel pengguna oksigen untuk menghasilkan energi dalam jumlah besar [11]. Pada kondisi tersebut, energi sangat diperlukan untuk sejumlah proses regulator dan biosintesis, oleh karena itu biogenesis mitokondria sangat diperlukan selama proses regenerasi jaringan [12]. Mitokondria mampu mengatur regulasi biosintesis pada proses miogenesis. Hasil penelitian Duguez memperlihatkan kemampuan regenerasi otot rangka tikus tergantung pada kemampuan fosforilasi oksidatif di mitokondria [13].

Mitokondria sebagai organel penghasil energi, memiliki peran dalam proses proliferasi dan diferensiasi sel serta jaringan. Biogenesis mitokondria dapat didefinisikan sebagai sintesis dan pertumbuhan mitokondria dalam hal jumlah, masa, serta ukuran. Protein mitokondria dikode oleh genom inti sel dan genom mitokondria itu sendiri. Biogenesis mitokondria memerlukan sekitar 1000–1500 protein yang dikode oleh genom inti sel. Biogenesis mitokondria terjadi karena adanya tekanan dari lingkungan seperti aktivitas tubuh yang tinggi, perubahan suhu, stres oksidatif, pembelahan sel, serta diferensiasi sel. Biogenesis mitokondria juga memerlukan membran mitokondria yang utuh untuk mendukung sintesis protein dan mempertahankan gradien proton selama respirasi [14,15]. Sel pada jaringan ikat dan sel otot dapat memodulasi ekspresi gen *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator* (PGC-1 α), yang berperan dalam proses biogenesis mitokondria selama regenerasi otot skeletal [16].

Ekspresi gen pada regenerasi jaringan ekor cecak belum pernah diteliti sebelumnya. Oleh karena itu desain DNA primer gen pada

cecak sangat penting, untuk meneliti peranan gen tersebut pada proses regenerasi jaringan. Rancangan desain primer gen yang belum pernah diteliti sebelumnya dapat dilakukan dengan metode sekuensing gen secara keseluruhan atau secara sederhana dengan metoda filogenetik yang lebih dekat kekerabatannya dilanjutkan menggunakan metoda multiple alignment pada sekuense gen yang bersifat konserv serta uji Real Time PCR.

Real-time PCR atau quantitative PCR (qPCR) merupakan salah satu metode paling sensitif untuk mendeteksi spesifikasi dan kauntitas mRNA. Prinsip kerja qPCR adalah mendeteksi dan mengkuantifikasi berdasarkan keberadaan Reporter Fluorescens. Sinyal Fluorescens akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR (amplikon) dalam reaksi. Peningkatan jumlah amplikon yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen. Makin tinggi tingkat ekspresi gen maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi. Tujuan dari penelitian ini adalah mendesain DNA primer gen PGC-1 α cecak yang belum pernah diteliti sebelumnya. Uji ekspresi spesifikasi gen PGC-1 α dilakukan melalui real time PCR (qPCR) dengan analisis single peak melt curve pada amplifikasi gen PGC-1 α yang mengindikasikan bahwa amplifikasi target telah spesifik, yang dapat menentukan keberhasilan desain primer DNA predicted gen PGC-1 α yang spesifik untuk *H. platyurus*.

Metode Penelitian

Metode Filogenetik

Pelacakan gen PGC-1 α cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*), dimulai dengan pengkajian filogenetik spesies yang paling dekat kekerabatannya. Spesies yang dipilih adalah yang paling dekat kekerabatannya dan telah diidentifikasi serta dipublikasikan urutan DNA pada gennya [3,4].

Blast

Selanjutnya gen tersebut dianalisis dengan perangkat lunak software *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) dengan spesies lainnya sehingga didapatkan nilai identity dari mulai yang tertinggi sampai yang terendah. Sekuen gen yang memiliki nilai identity tinggi digunakan dalam metoda multiple alignment untuk mendapatkan sekuen yang conserved.

Multiple Alignment

Penentuan daerah lestari ditentukan dengan menggunakan program Mega7. Urutan basa yang diperoleh disejajarkan dengan Program *ClustalX* untuk kemudian dipilih yang paling memiliki kesamaan dalam basa penyusunnya dengan kemiripan 80-100 %. Sebagai dasar pelacakan penempelan primer [17].

Desain Primer

Dilakukan analisis penentuan DNA primer dengan perangkat lunak *Primer3*, dan secara manual dipilih daerah yang paling lestari dengan mempertimbangkan daerah tersebut adalah daerah urutan sandi, dengan persyaratan umum, antara lain jumlah nukleotida, kandungan GC dan tidak terdapat kemungkinan adanya saling komplementer antar basa di dalam satu rantai primer ataupun antara primer yang satu dengan lainnya.

Real Time PCR

Uji Real Time PCR merupakan pembuktian bahwa desain DNA primer telah sesuai dengan melihat hasil annealing DNA primer dengan DNA sampel. Prosedur Real Time PCR adalah sebagai berikut; sintesis DNA, inaktivasi *Reverse transcriptase*, PCR, annealing gen PGC-1 α , dan *melting curve*.

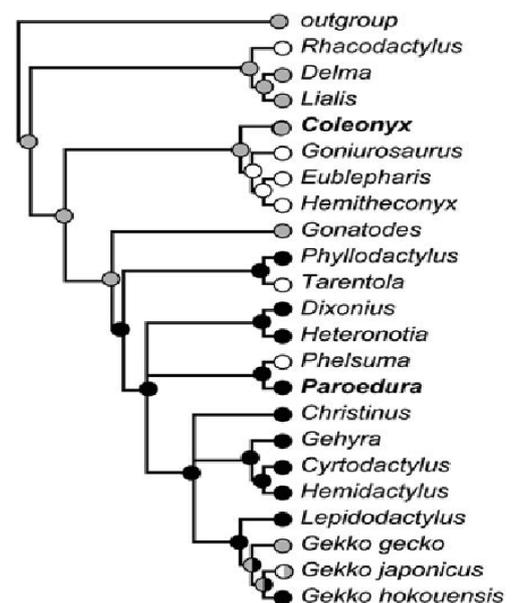
Gen 18s rRNA digunakan sebagai house keeping gene. Desain primer gen 18S rRNA dirancang dengan menggunakan metoda yang sama dengan desain gen PGC-1 α . Sebagai kontrol negatif digunakan nuklease free water sebagai pengganti RNA untuk menyingkirkan hasil positif palsu. Dari hasil Real Time PCR diperoleh nilai efisiensi dan *Cycle Threshold* (CT).

Nilai ambang (*threshold*) diatur untuk memperoleh efisiensi ekspresi yang paling optimum dan diseragamkan agar semua data dapat dibandingkan. Nilai CT merupakan perpotongan kurva dengan garis ambang.

HASIL

Metode Filogenetik

Hasil analisis filogenetik ditemukan spesies *Gecko japonicus* merupakan spesies yang digunakan sebagai referensi karena paling dekat kekerabatannya dengan *H. platyurus* dan telah teridentifikasi urutan DNANYA. Identifikasi basa DNA diperoleh dari website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.)



Gambar 2. Phylogenetic Reptil (Gamble, 2010)

PREDICTED: Gekko japonicus peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta (PPARGC1B), mRNA
 NCBI Reference Sequence: XM_015419850.1

LOCUS XM_015419850 3000 bp mRNA linear VRT 20-JAN-2016
 DEFINITION PREDICTED: Gekko japonicus peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta (PPARGC1B), mRNA.
 ACCESSION XM_015419850
 VERSION XM_015419850.1
 DELINEATION Diagnostics: 20160308133
 KEYWORDS RefSeq; includes ab initio.
 SOURCE Gekko japonicus
 ORGANISM Gekko japonicus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Lepidosauria; Squamata; Bifurcata; Gekkotia; Gekkonidae; Gekkoninae; Gekko.
 COMMENT MODEL REFSEQ: This record is predicted by automated computational analysis. This record is derived from a genomic sequence (NM_015171585.1) annotated using gene prediction method: Gnomon. Also see: [Documentation of NCBI's Annotation Process](#)
 ##Genome-Annotation-Data-START##
 Annotation Provider :: NCBI
 Annotation Status :: Full annotation
 Annotation Version :: Gekko_japonicus_Annotation_Release
 Annotation Software Version :: 6.5
 Annotation Method :: Best-placed RefSeq; Gnomon
 Features annotated :: Gene; mRNA; CDS; ncRNA
 ##Genome-Annotation-Data-END##
 ##RefSeq-Attributes-START##
 ab initio :: 5% of CDS bases
 ##RefSeq-Attributes-END##
 FEATURES
 source
 1..3000
 /organism="Gekko japonicus"
 /mol_type="mRNA"
 /isolate="JY-2015"
 /isolation_source="soil"
 /db_xref="taxon:348934"
 /chromosome="Unknown"
 /sex="male"
 /country="China: Nantong, Jiangsu province"
 /lat_lon="32.0881632086724 N 128.91639571675062 E"
 /collection_date="2009-10-25"
 gene
 1..3000
 /gene="PPARGC1B"
 /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Gnomon. Supporting evidence includes similarity to: 10 Proteins, and 72% coverage of the annotated genomic feature by RNAseq alignments"
 /db_xref="GeneID:107117693"
 CDS
 1..3000
 /gene="PPARGC1B"
 /codon_start=1
 /product="peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta"
 /protein_id="XP_015273336.1"
 /db_xref="GeneID:107117693"
 /translation="MACSITARRNTLGGIDVDPSPARKVAVPFKGAFLGFDLDRY LVEDKRIIDSENEAL LAALTELDLQGGDHLAARFVDEGDMPSGCTSPTPS PPKAPVSKPPPLAPEVDLSSLKLLLSPIVWVSVFPEKAVWAGSGSRSSKQRP CTVDGVRDRKSSFLPQSRSCLELHMLTSSSITTHCPHTKSSSLDECHSSNDGN EPQGHVHWGDEGDDSDPELFSFNIAATPPSSSEGSSEKELRAAVELIRYHYTYCLP

Gambar 3. Gen PGC-1α *Gekko Japonicus* sumber NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.)

Basic Local Alignment Search Tools (BLAST)

Proses BLAST dilakukan pada gen PGC-1α spesies *Gekko japonicus* sebagai spesies penentu dengan spesies lainnya. *Gekko japonicus* digunakan sebagai spesies penentu

karena secara phylogenetik paling dekat kekerabatannya dengan *Hemidactylus platyurus*. Hasil BLAST diperoleh nilai identity sebesar 80%-78% gen PGC-1α beberapa spesies lainnya terhadap *Hemidactylus platyurus*.

BLAST » blastn suite » RID-KV7TWE51015

Job title: ref|XM_015419850.1| (3000 letters)

RID KV7TWE51015 (Expires on 07-06 12:31 pm)

Query ID XM_015419850.1
 Description PREDICTED: Gekko japonicus peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta (PPARGC1B), mRNA
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 3000

Database Name nr
 Description Nucleotide collection (nr)
 Program BLASTN 2.8.0+ » citation

Graphic Summary

Distribution of the top 122 Blast-Hits on 86 subject sequences

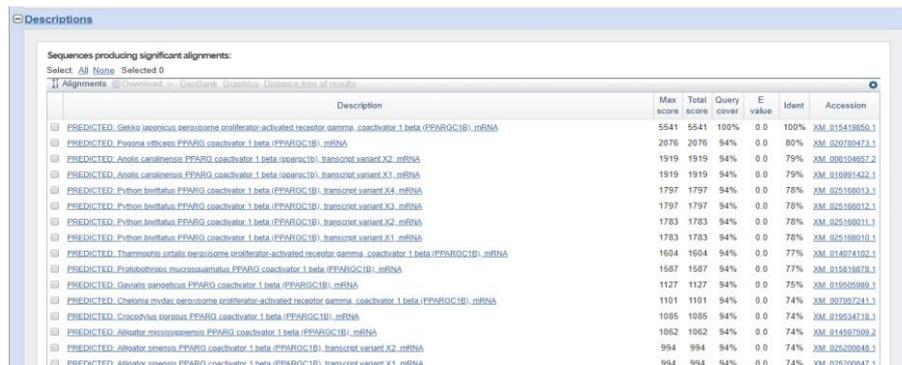
Color key for alignment scores

■ <40 ■ 40-50 ■ 50-80 ■ 80-200 ■ >=200

Query

1 600 1200 1800 2400 3000

Gambar 4. BLAST gen PGC-1α *Gekko japonicus* dengan spesies reptile lainnya (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.)



Gambar 5. Analisis Identity gen PGC-1α *Gecko japonicus* dengan genPGC-1α dari spesies lainnya (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.)

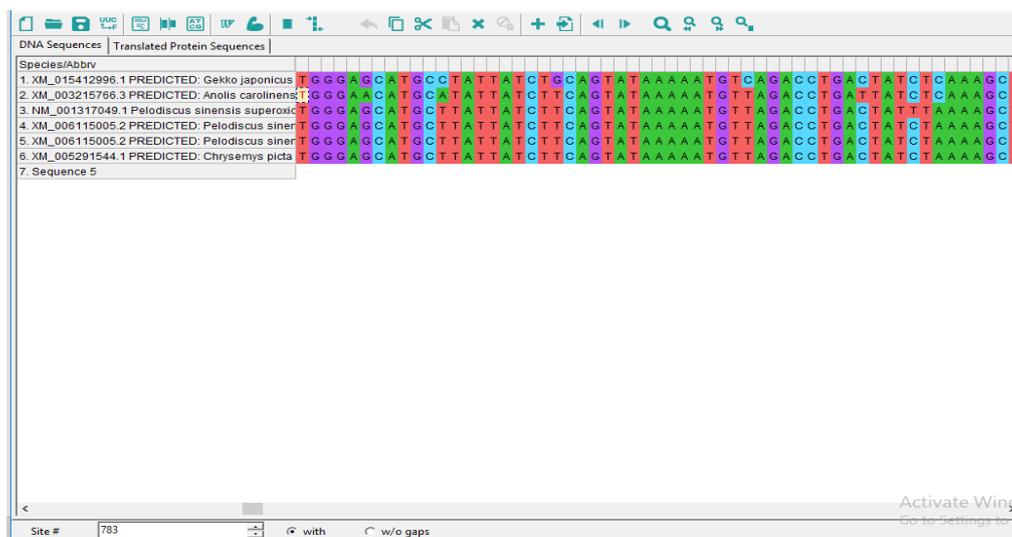
Multiple alignment

Dari beberapa spesies hasil BLAST yang memiliki nilai identity sekuen DNA 100-79% dilakukan multiple alignment, sehingga diperoleh beberapa spesies dengan sekuen DNA PGC-1α yang memiliki sekuen DNA sejajar (Gambar 6). Dipilih sekuen sejajar pada daerah CDS yang sesuai dengan

sekuen DNA primer yang telah dirancang dengan software Primer3.

DNA Primer gen PGC-1α

Rancangan DNA Primer gen PGC-1α dan 18S RNA *Hemidactylus platyurus* menggunakan software primer3 yang telah melewati proses phylogenetik, BLAST, dan multiple alignment (Tabel 2).



Gambar 6. Proses multiple alignment gen PGC-1α *Gecko japonicus* dengan spesies lainnya yang memiliki nilai identity sekuen DNA 100-79 % menggunakan software MEGA7

Tabel 2. Primer PGC-1α cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*)

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Produ k (pb)
18 S rRNA	ACACGCTCCACCTCATCTTC	ATCCC GAGAAGTTCCAGCA	188
PGC-1α	TCTCGATCGGGAATATGG AG	GATCTGTCGCCTTCTTGCTC	159

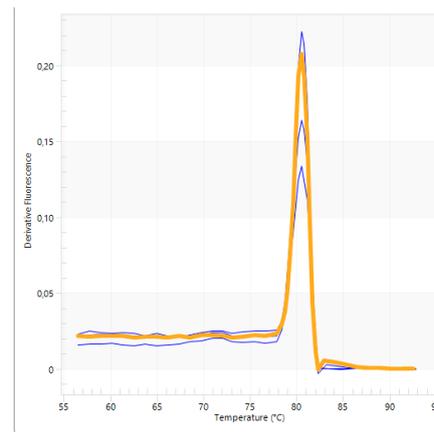
Real Time PCR

Proses Real Time PCR predicted gen PGC-1 α *Hemidactylus platyurus* yang meliputi sintesis DNA selama 5 menit, suhu 42 $^{\circ}$ C; inaktivasi *Reverse transcriptase* 2-5 menit, suhu 95 $^{\circ}$ C; siklus PCR dilakukan 40 siklus selama 10 detik pada suhu 95 $^{\circ}$ C; 30 detik 55 $^{\circ}$ C suhu annealing untuk gen PGC-1 α ; 30 detik pada suhu 72 $^{\circ}$ C. Selanjutnya tahap *melting curve*

selama satu menit pada suhu 95 $^{\circ}$ C, satu menit pada suhu 55 $^{\circ}$ C, 10 detik pada suhu 55 $^{\circ}$ C.

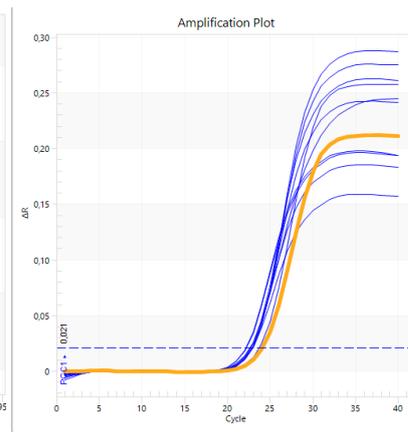
Diperoleh hasil Real Time PCR gen PGC-1 α pada gambar 7, dengan menghasilkan grafik *melting curve* satu peak yang menunjukkan DNA yang diamplifikasi spesifik untuk gen PGC-1 α . Hasil amplifikasi yang menunjukkan kuantitas RNA yang dihasilkan berbeda-beda untuk setiap perlakuan yang berbeda.

Melting Curve



A

Amplification Plot



B

Gambar 8. Hasil Real Time PCR gen PGC-1 α *Hemidactylus platyurus* (A) Grafik *melting curve* satu peak (B) Grafik amplifikasi gen

Pembahasan

Analisis gen yang memiliki peran penting pada suatu proses dalam tubuh organisme, perlu dilakukan uji ekspresi gen tersebut. Gen PGC-1 α yang memiliki peran dalam proses biogenesis mitokondria pada proses regenerasi jaringan [14,15]. perlu dianalisis perannya dalam regenerasi jaringan ekor cecak (*Hemidactylus platyurus*). Namun, cecak sangat terbatas datanya dalam hal penelitian biologi molekuler sehingga sekuen DNA cecak belum terdokumentasikan dalam website NCBI. Oleh karena itu untuk analisis lebih lanjut secara biologi molekuler peranan gen dalam proses regenerasi jaringan ekor cecak memerlukan desain primer DNA PGC-1 α cecak terlebih dahulu.

Langkah awal adalah mencari spesies hewan yang paling dekat kekerabatannya dengan cecak (*Hemidactylus platyurus*) dengan metode analisis filogenetik. Spesies hewan yang dicari paling dekat kekerabatannya adalah hewan yang telah diteliti sebelumnya secara biologi molekuler, sehingga memiliki banyak data molekuler dalam NCBI. Hasil analisis

filogenetik *Hemidactylus platyurus* menunjukkan adanya kekerabatan yang lebih dekat dengan *Gecko japonicus* yang memiliki data sekuen DNA teridentifikasi di laman website NCBI [16]. Oleh karena itu spesies *Gecko japonicus* dapat digunakan sebagai spesies penentu dalam perancangan gen PGC-1 α *Hemidactylus platyurus*. Melalui uji Basic Local Alignment Search Tools dengan menggunakan gen PGC-1 α *Gecko japonicus* sebagai spesies yang menghasilkan similaritas tinggi sebesar 78-80% dengan spesies lainnya [16,17]. Tingkat kemiripan medium identic sebesar 40-50%; identifikasi rendah jika nilai similaritinya 20-35%. Hasil BLAST gen PGC-1 α *Gecko japonicus* dengan spesies lainnya tergolong hasil uji similaritinya relative tinggi. Beberapa spesies yang memiliki nilai similarity tinggi dilakukan uji pensejajaran sekuen (*Multiple alignment*) untuk mencari sekuen conserved pada sekuen gen PGC-1 α yang diduga dimiliki juga oleh *Hemidactylus platyurus*, yang secara filogenetika cukup dekat [18].

Analisis membandingkan sekuen DNA dan protein memiliki peran penting perannya

dalam evolusi, rekonstruksi, dan seleksi alami secara evolusi. Metoda yang digunakan dengan program computer yang mudah digunakan untuk pensejajaran sekuen (*multiple alignment*) adalah Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software. Pada penelitian ini digunakan pensejajaran sekuen DNA dari beberapa spesies hasil BLAST dengan tingkat similaritas tinggi.

Spesies *Gecko japonicus* yang digunakan sebagai spesies patokan pada proses multiple alignment, ditentukan terlebih dahulu sekuen *Coding domain Sequence* (CDS) nya dari data NCBI.¹⁶ Sekuen ini merupakan sekuen koding yang akan ditranslasi menjadi protein, yang diduga memiliki daerah conserved. Hasil alignment gen PGC-1 α *Gecko japonicus* dengan gen PGC-1 α dari spesies lainnya menunjukkan adanya kesamaan sequence yang cukup tinggi pada daerah Coding Domain Sekuense (CDS). Kesamaan sekuens tersebut menunjukkan adanya sekuens yang terkonservasi sehingga dapat dijadikan acuan untuk dibuat desain primer DNA bagi spesies *Hemidactylus platyurus*.

Hasil desain primer dengan software primer3 pada daerah terkonservasi dan pada daerah CDS menghasilkan DNA primer yang memenuhi syarat sebagai DNA primer. Rancangan DNA primer predicted gen PGC-1 α *Hemidactylus platyurus* memiliki panjang DNA reverse dan forward sepanjang 20 bp, panjang produk PCR 159 bp, dan suhu Tm sebesar 55^oC. Rancangan DNA primer gen PGC-1 α ini telah memenuhi parameter dalam rancangan DNA primer, yaitu jumlah nukleotida 15-22 mers, kandungan GC 50% atau lebih. Tidak terdapat kemungkinan adanya saling komplemen antara basa di dalam satu rantai primer ataupun antara primer yang satu dengan lainnya.

Hasil Real Time PCR menunjukkan adanya grafik melting curve satu peak. Hal ini menunjukkan bahwa DNA yang diamplifikasi spesifik untuk gen tertentu, dalam hal ini yang diamplifikasi adalah gen PGC-1 α *Hemidactylus platyurus* yang telah berhasil diamplifikasi. Keberhasilan amplifikasi DNA tersebut menunjukkan keberhasilan dalam rancangan predicted DNA primer gen PGC-1 α yang belum pernah diteliti sebelumnya.

Kesimpulan

Predicted DNA primer gen PGC-1 α *Hemidactylus platyurus* yang belum pernah diteliti sebelumnya dapat dirancang dengan

metoda multiple alignment dengan spesies penentu yang paling dekat kekerabatannya secara filogenetik.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Kemenristek DIKTI atas beasiswa program Doktornya di Program Doktor Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Terimakasih tak terhingga kepada hibah Riset UI atas hibah penelitiannya, dan teman-teman di LIPI Cibinong, Dr. Marlina dan Dr. Hadi yang telah membimbing dalam desain primer ini. Tak lupa terimakasih kepada PT Ecosains atas ijin penggunaan alat real time PCR di laboratorium biokimia FKUI.

Daftar Pustaka

- [1] Bansal R, Karanth KP. Phylogenetic Analysis and Molecular Dating Suggest That *Hemidactylus anamallensis* Is Not a Member of the *Hemidactylus* Radiation and Has an Ancient Late Cretaceous Origin. *PLoS One*. 2013;8(5).
- [2] Tkaczenko GK, Weterings R, Weterings R. Prey preference of the common house geckos *Hemidactylus frenatus* and *Hemidactylus platyurus*. *Herpetol Notes*. 2014;7(August):483–8.
- [3] Zug GR, Vindum J V, Koo MS. Burmese *Hemidactylus* (Reptilia , Squamata , Gekkonidae): Taxonomic Notes on Tropical Asian *Hemidactylus*. *Sci York*. 2007;58(19):387–405.
- [4] Kongbuntad W, Tantrawatpan C, Pilap W, Jongsomchai K, Chanaboon T, Laotongsan P, et al. Genetic diversity of the red-spotted tokay gecko (*Gekko gecko* Linnaeus, 1758) (Squamata: Gekkonidae) in Southeast Asia determined with multilocus enzyme electrophoresis. *J Asia-Pacific Biodivers*. 2016;9(1):63–8.
- [5] Hawkeswood TJ. Observations on the reptile fauna of Queen. 2017;(9).
- [6] Prabhakar, N.R. & Semenza GL. Description and Physical Characteristics of Reptiles: Adaptives and Maladaptive Cardiorespiratory Respons to Continous and Intemittent Hypoxia Mediated Hipoxia-Inducible Factor 1 and 2. *Physiol Rev Publ*. 2012;92:967–1003.
- [7] Jayatissa LP. Present Status of Mangroves

- in Sri Lanka. The National Red List 2012 of Sri Lanka; Conservation Status of the Fauna and Flora. 2012. 77-87 p
- [8] Liu Y, Zhou Q, Wang Y, Luo L, Yang J, Yang L, et al. Gekko japonicus genome reveals evolution of adhesive toe pads and tail regeneration. *Nat Commun.* 2015;6:1–11.
- [9] Ifeanyichukwu P. Neural Tissue And Complete Regeneration Of The Tail Of The Gekkonid Lizard , *Hemidactylus flaviviridis*. *Anim Res Int.* 2006;3:415–8.
- [10] Alibardi L. Morphological and Cellular Aspects of Tail and Limb regeneration in Lizards. New York: Springer; 2010.
- [11] Allen JWA. Cytochrome c biogenesis in mitochondria - Systems III and v. *FEBS J.* 2011;278(22):4198–216.
- [12] Jornayvaz FR, Shulman GIG. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 2010;47:69–84.
- [13] Duguez S, Féasson L, Denis C, Freyssenet D. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(4):E802–9.
- [14] Fisher RE, Geiger LA, Stroik LK, Hutchins ED, George RM, Denardo DF, et al. A Histological Comparison of the Original and Regenerated Tail in the Green Anole, *Anolis carolinensis*. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol.* 2012;295(10):1609–19.
- [15] Lozito TP, Tuan RS. Lizard tail regeneration: Regulation of two distinct cartilage regions by Indian hedgehog. *Dev Biol.* 2015;399(2):249–62.
- [16] Ritzman TB, Stroik LK, Julik E, Hutchins ED, Lasku E, Denardo DF, et al. The Gross Anatomy of the Original and Regenerated Tail in the Green Anole (*Anolis carolinensis*). *Anat Rec.* 2012;295(10):1596–608.
- [17] Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(7):1269–78.
- [18] Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1?? expression. *J Biol Chem.* 2007;282(1):194–9.