

Desain Primer Spesifik dan Suhu Annealing untuk Amplifikasi Gen Glutathion Peroxidase (GPX) pada *Oryza sativa*

Wina Ayunanda¹, Afifatul Achyar¹, Zulyusri¹, Yusni Atifah¹, Dwi Hilda Putri¹, Violita¹

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Padang, Indonesia.

*Corresponding author: violita@fmipa.unp.ac.id / violitavioviolita@gmail.com

ABSTRACT. *Glutathione peroxidase (GPX) is one of the antioxidant enzymes for the protection of proteins and cell membranes against oxidative stress in plants. Plants will activate the antioxidant defense system in plant cells, namely enzymatic and nonenzymatic components when experiencing oxidative stress, and rice is a plant whose growth has a serious impact due to drought which has an impact on oxidative stress. One method that can be used for glutathione peroxidase (GPX) gene amplification is qRT-PCR and this method requires a specific primer for the target gene. But currently there is no known primary design of the gene. The purpose of this study was to design specific primers to be used in PCR amplification so as to amplify the GPX gene and determine the optimal conditions of the annealing temperature. The search for optimal conditions of the annealing temperature is very important, as it relates to the specificity and sensitivity of the PCR product. Primary design is done on the PrimerQuest program. The results of the analysis were viewed using GeneiousPrime, then checked primary specificity with primerBLAST. The results of the primary design with the best criteria are Forward GPX 5'-GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC-3' and Reverse GPX 5'-AGCCCACCTTTGTTAGACTTC-3' primers. The primary pair can amplify the GPX gene from *Oryza sativa* with a product size of 185 bp. PCR performance is optimum at an annealing temperature of 60°C and results will be specific using the Touchdown PCR program in vitro tests.*

Keywords: Primary design, Glutathione proxidae, Rice, Annealling Temperature

ABSTRAK. Glutathion peroxidase (GPX) merupakan salah satu enzim antioksidan untuk perlindungan protein dan membran sel terhadap cekaman oksidatif pada tanaman. Tanaman akan mengaktifkan sistem pertahanan antioksidan dalam sel tumbuhan yaitu komponen enzimatik dan nonenzimatik saat mengalami cekaman oksidatif, dan padi merupakan tanaman yang pertumbuhannya berdampak serius akibat kekeringan yang berdampak pada cekaman oksidatif. Salah satu metode yang bisa digunakan untuk amplifikasi gen glutathion peroxidase (GPX) adalah qRT-PCR dan metode ini memerlukan primer yang spesifik untuk gen target. Namun saat ini belum diketahui perancangan primer (*primer design*) dari gen tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendesain primer spesifik yang akan digunakan dalam amplifikasi PCR sehingga mampu mengamplifikasi gen GPX dan menentukan kondisi optimal dari suhu annealing. Pencarian kondisi optimal dari suhu annealing sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas dan sensitivitas produk PCR. Desain primer dilakukan pada program PrimerQuest. Hasil analisis dilihat menggunakan GeneiousPrime, kemudian dicek spesifisitas primer dengan primerBLAST. Hasil desain

primer dengan kriteria terbaik yaitu primer Forward GPX 5'-GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC-3' dan Reverse GPX 5'-AGCCACCTTTGTTAGACTTC-3'. Pasangan primer dapat mengamplifikasi gen GPX dari *Oryza sativa* dengan ukuran produk 185 bp. Kinerja PCR optimum pada suhu annealing 60°C dan hasil akan spesifik menggunakan program *Touchdown* PCR dalam uji *in vitro*.

Kata kunci: Desain primer, Glutathion peroxidase, Padi, Suhu Annealing



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2025 by author.

1. PENDAHULUAN

Glutathion peroxidase (GPX) merupakan salah satu enzim antioksidan untuk perlindungan protein dan membran sel terhadap oksidasi. Tanaman mengembangkan suatu mekanisme ketahanan sistem antioksidan dengan mengakumulasi Glutathion Peroxidase (GPX) untuk mengatasi kerusakan akibat fotoinhibisi (Pessarakli, 1999). Tanaman akan mengaktifkan sistem pertahanan antioksidan dalam sel tumbuhan yaitu komponen enzimatik dan nonenzimatik saat mengalami cekaman kekeringan (Nahar *et al.*, 2018).

Kekeringan adalah faktor lingkungan yang menyebabkan tidak tersedianya air bagi tanaman (Azhari & Violita, 2019). Cekaman kekeringan mengakibatkan penurunan fotosintesis, yang mengakibatkan terjadinya penurunan laju pertumbuhan dan produksi pada tumbuhan (Violita, 2007; Hamim *et al.*, 2017). Terjadi kerusakan komponen fotosintesis termasuk fotosistem I dan fotosistem II. Keadaan ini dapat mengakibatkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti ion radikal superoksida O_2^- , hidrogen peroksida H_2O_2 dan oksigen singlet (Hossain *et al.*, 2015). Tanaman menginduksi ROS sehingga memicu jalur sinyal transduksi pertahanan yang mengaktifkan sistem antioksidan enzimatik yang akan bereaksi dengan H_2O_2 untuk mengkatalisis pembentukan H_2O dan O_2 sehingga mencegah kerusakan sel pada kondisi cekaman (Oktaviani *et al.*, 2021).

Padi merupakan tanaman yang pertumbuhannya berdampak serius akibat kekeringan, terutama pada fase generatif (Akram, *et al.*, 2013). Karena salah satu faktor penting pada sistem penanaman padi adalah ketersediaan air (Bouman *et al.*, 2007). Air merupakan bagian penting dari protoplasma dan membentuk 80-90% dari berat segar jaringan aktif yang sedang tumbuh (Violita & Azhari, 2021).

Beberapa penelitian telah mendeteksi adanya ekspresi pada gen *GPX* yang mengalami cekaman kekeringan dengan teknik PCR. Peningkatan aktivitas GPX pada tanaman *G. Tomentella* terjadi ketika tanaman berada pada kondisi cekaman berat (Adisti,

2006). Ekspresi gen *GPX* tanaman kedelai pada cekaman 8 HSP (Hari Setelah Perlakuan) lebih tinggi dibanding setelah *recovery*, kecuali pada kedelai liar (Hindarta, 2008).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan reaksi yang menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA yang baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target (Muladno, 2010). Salah satu modifikasi program PCR adalah *touchdown* PCR yang menggunakan prinsip awalan suhu annealing yang lebih tinggi dari Temperatur melting (T_m) primer yang selanjutnya turun secara bertahap dalam tiap siklusnya. Fungsi *touchdown* PCR adalah untuk meningkatkan spesifitas, sensitivitas dan kinerja PCR tanpa harus mendesain ulang primer (Korbie & Mattick, 2008). Keberhasilan metode berbasis PCR tidak terlepas dari kajian bioinformatika saat merancang primer yang spesifik untuk gen target (Achyar *et al.*, 2021). Penelitian ini dilakukan dengan menerapkan suatu disiplin ilmu bioinformatika.

Optimasi suhu annealing pada primer bertujuan untuk mendapatkan pita PCR yang tebal, T_m akan menjadi dasar dalam menentukan suhu annealing (T_a). Suhu annealing yang terlalu tinggi menyebabkan primer yang sudah menempel pada DNA cetakan terlepas sehingga produk PCR tidak terbentuk, sementara T_a yang terlalu rendah menyebabkan terjadinya penempelan primer yang tidak spesifik pada DNA cetakan. Besarnya suhu annealing dapat ditentukan berdasarkan nilai T_m dari primer yang akan digunakan (Asy'ari *et al.*, 2005).

Bioinformatika adalah bidang interdisipliner yang didefinisikan sebagai perpaduan antara ilmu biologi molekuler dan komputasi yang menggunakan bantuan komputer dan software. Bioinformatika berperan untuk merancang dan menghasilkan sekuens primer (Neel *et al.*, 2010). Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian mengenai ekspresi gen glutathion peroxidase (*GPX*) pada akar padi yang mendapat perlakuan simulasi kekeringan menggunakan PEG. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendesain primer spesifik yang akan digunakan dalam amplifikasi PCR sehingga mampu mengamplifikasi gen *GPX*.

2. METODE

Desain primer dilakukan pada program PrimerQuest. Dengan memasukkan sekuens gen *GPX* *Oryza sativa* pada "*Sequence Entry*". Selanjutnya pada menu "*Custom Design Parameters*" dimasukkan parameter primer yang diinginkan sehingga muncul beberapa pilihan primer. Hasil analisis dilihat menggunakan GeneiousPrime, kemudian dicek spesifisitas primer (forward dan reverse) dengan primerBLAST. Optimasi suhu annealing dilakukan dengan metode PCR. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat PCR dengan Pra denaturasi dilakukan pada 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing dilakukan dengan menggunakan gradien annealing pada 50 °C - 60°C,

dan elongasi 72°C selama 10 detik. Dilakukan uji spesifisitas primer secara in vitro dengan *Touchdown* PCR.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Desain Primer Spesifik Gen GPX *Oryza sativa*

Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi (Handoyo & Rudiretna, 2000). Menurut penelitian Pradnyaniti (2013), hasil analisis menunjukkan bahwa primer berada dalam kondisi terbaik yaitu tidak terdapat dimer pada ujung 3' maupun di tempat yang lain, primer ini tidak berikatan dengan internal primer ataupun primer pasangannya. Primer yang didesain juga tidak menempel pada banyak molekul, dan dapat menempel dengan baik pada daerah yang ditargetkan. Sekuen primer sebaiknya tidak memiliki daerah yang dapat berikatan dengan internal primer tersebut maupun dengan primer pasangannya.

Berdasarkan hasil desain pada program PrimerQuest, didapatkan sebanyak 5 primer *forward* dan 5 primer *reverse* (5 set primer) yang terdapat pada (Table 1) dan akan diseleksi menjadi 1 kandidat terbaik. Primer forward akan menempel pada ujung DNA 5'-fosfat yang komplemen dengan bagian dari cetakan DNA. Primer reverse akan menempel pada ujung rantai DNA antisense 3'-OH (Sambrook & Russel, 2001; Yuwono, 2006).

Tabel 1. Spesifikasi kandidat primer

Set	Primer	Sekuen	Tm (°C)	GC (%)	Panjang produk
1	<i>Forward</i>	5'- GTTTGCTTGCACTCGCTTCA - 3'	60	50	119
	<i>Reverse</i>	5' – CACCGAAAAGCCCACCTTTG - 3'	60	55	
2	<i>Forward</i>	5' – CGGTGATAGCATCAAGTGGAA - 3'	58.1	47.6	150
	<i>Reverse</i>	5' – GATCCCGACCTTTAGGTTTAAGAG– 3'	58.6	45.8	
3	<i>Forward</i>	5' – GCTTCAAGGCTGAGTATCCC – 3'	58	55	150
	<i>Reverse</i>	5' – CCTCCTTGTCAACCAAGAATTTG – 3'	58.1	43.5	
4	<i>Forward</i>	5' - GTGAACCTGAGCACCTACAAG – 3'	58.6	52.4	150
	<i>Reverse</i>	5' – ATTGCACGGGAAAGCCAATA – 3'	58.2	45	
5	<i>Forward</i>	5'- GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC-3'	57.7	45.5	185
	<i>Reverse</i>	5'- GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC-3'	57.9	47.6	

Dari 5 set kandidat primer yang dihasilkan masing-masing memiliki panjang amplikon dan susunan nukleotida yang berbeda. Panjang produk menandakan jumlah basa produk yang dihasilkan dalam proses amplifikasi dengan metode PCR (Pratiwi *et al*, 2015). Primer set 1 sampai 4 bukan termasuk primer dengan kriteria terbaik karena memiliki hairpin dan self dimer, sebab salah satu kriteria dalam desain primer adalah menghindari hairpin dan menghindari self dimer antara dua primer.

Sekuen primer dengan kriteria terbaik yang dapat digunakan dalam proses PCR yaitu primer set 5. Primer Forward GPX 5'- GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC-3' dan

Reverse GPX 5'- AGCCACCTTTGTTAGACTTC-3'. Sekuen primer telah memenuhi kriteria parameter untuk sebuah primer yang digunakan dalam proses PCR.

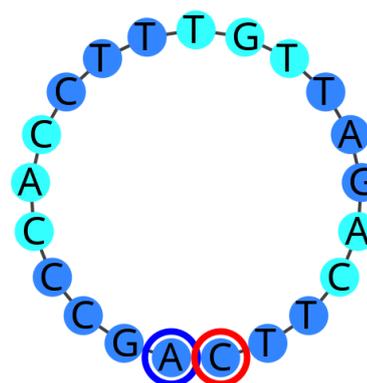
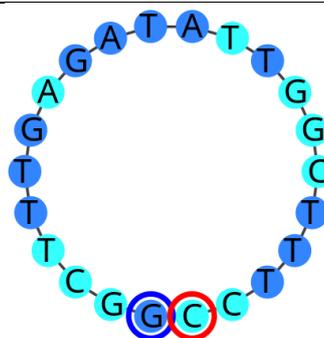
Tabel 2. Sekuen primer yang dipilih

Nama primer	Panjang	Urutan sekuen nukleotid
GPX F	22	5'- GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC-3'
GPX R	21	5'- AGCCACCTTTGTTAGACTTC-3'

Primer dipilih karena memenuhi kriteria yang baik yaitu dengan panjang basa 22 dan 21 nukleotida, Tm 57.7 oC dan 57.9oC, %GC 45.5% dan 47.6 %, panjang amplicon 185 bp dan tidak memiliki secondary struktur (hairpin dan self dimer). Analisis DNA fold juga menunjukkan bahwa amplicon tidak memiliki struktur sekunder di daerah penempelan primer.

Tabel 3. Parameter primer yang dipilih

Primer	Parameter primer	DNA fold
Forward	Panjang	: 22
	GC(%)	: 45.5
	Tm (°C)	: 57.7
	Hairpin	: none
	Self Dimers	: none
	Topology	: linear
	Ukuran produk	: 185
	Rough temperature	: 58.39
Reverse	Panjang	: 21
	GC(%)	: 47.6
	Tm (°C)	: 57.9
	Hairpin	: none
	Self Dimers	: none
	Topology	: linear
	Ukuran produk	: 185
	Rough temperature	: 57.871



Kriteria desain primer pada penelitian ini mengacu pada pada pedoman Desain Premier Biosoft (2015), yaitu Panjang primer berukuran 18-22 bp, memiliki Melting Temperature (Tm) berkisar 52-58 °C serta tidak lebih dari 65 °C, konten GC (GC clamp) berkisar dari 40% - 60%, menghindari hairpin, menghindari self dimer antara dua primer,

nilai GC clamp tidak lebih dari 3, menghindari pengulangan nukleotida secara berurutan ≥ 4 pengulangan, dan menghindari cross homology untuk meningkatkan spesifikasi primer.

Primer ideal memiliki panjang antara 18 sampai 30 oligonukleotida. Panjang ini diharapkan cukup untuk dapat mengikat template pada suhu annealing dan mendapatkan sekuen yang spesifik (Borah, 2011). Primer yang terlalu pendek dapat mengurangi spesifisitas primer sehingga mudah menempel pada template dengan suhu annealing yang tidak diinginkan. Sementara, jika primer terlalu panjang tidak mempengaruhi spesifisitas secara bermakna (Handoyo & Rudiretna, 2000).

Berdasarkan desain primer, primer telah memenuhi kriteria yang baik yaitu dengan panjang basa 22 dan 21 nukleotida, T_m 57.7 °C dan 57.9°C, %GC 45.5% dan 47.6 %, panjang amplicon 185 bp dan tidak memiliki *secondary structur* (hairpin dan self dimer).



Gambar 1. Panjang amplicon GPX *forward* dan GPX *reverse*

Amplicon merupakan untai DNA target yang berhasil digandakan saat proses PCR berlangsung (Mawarnursavira *et al.*, 2019). Panjang amplicon dari masing-masing primer menandakan jumlah basa produk yang dihasilkan oleh primer tersebut ketika terjadi proses amplifikasi dengan menggunakan PCR.

3.2 Uji Spesifitas Primer Secara In Silico

Primer yang baik adalah rangkaian basa nukleotida yang unik pada template tersebut, dilakukan analisis melalui BLAST-NCBI untuk menghindari cross homologi primer dan untuk mengetahui bahwa primer yang digunakan benar-benar unik dan tidak menempel pada organisme lain (Sasmito *et al.*, 2014). Spesifisitas primer forward dan primer reverse diperiksa ulang dengan Primer BLAST pada laman NCBI. Hasil NCBI Primer BLAST

(Gambar 2) menunjukkan bahwa pasangan primer dapat mengamplifikasi gen GPX dari *Oryza sativa* dengan ukuran produk 185 bp.

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC	22	57.69	45.45	4.00	0.00
Reverse primer	AGCCACCTTTGTTAGACTTC	21	57.86	47.62	3.00	2.00

Products on target templates						
>CP101150.1 <i>Oryza sativa</i> Japonica Group cultivar Changxianggeng 1813 chromosome 10						
product length = 321						
Forward primer	1	GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC	22			
Template	27482616	27482637			
Reverse primer	1	AGCCACCTTTGTTAGACTTC	21			
Template	27482936	27482916			
>XM_015780454.2 PREDICTED: <i>Oryza sativa</i> Japonica Group probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (LOC4336627), mRNA						
product length = 185						
Forward primer	1	GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC	22			
Template	417	438			
Reverse primer	1	AGCCACCTTTGTTAGACTTC	21			
Template	601	581			
>AP014960.1 <i>Oryza sativa</i> Japonica Group DNA, chromosome 4, cultivar: Nipponbare, complete sequence						
product length = 321						
Forward primer	1	GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC	22			
Template	27839977	27839998			
Reverse primer	1	AGCCACCTTTGTTAGACTTC	21			
Template	27840297	27840277			

Gambar 2. Primer BLAST NCBI hasil dari GPX *forward* dan GPX *reverse*

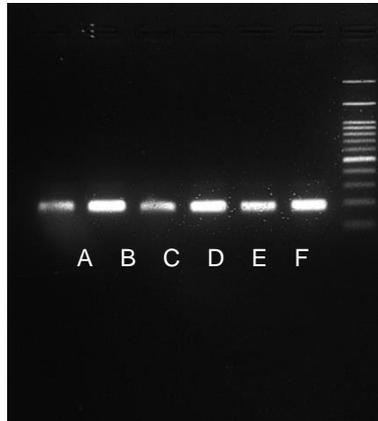
Primer dianalisa secara *in silico* dengan BLAST berdasarkan informasi *database* NCBI. Proses ini bertujuan untuk mengetahui apakah primer yang digunakan merupakan primer spesifik. Berdasarkan hasil BLAST Primer dapat membedakan amplifikasi dari DNA genomik dan mRNA GPX krena ukuran produk pcr nya berbeda.

3.3 Optimasi Suhu Annealing

Primer perlu diuji melalui serangkaian optimasi di laboratorium. Optimasi primer melibatkan optimasi dalam suhu annealing (T_a) menggunakan PCR gradient dan optimasi konsentrasi primer. Selain primer, optimalisasi reaksi PCR juga dilakukan untuk memeriksa deteksi minimum dan kuantifikasi asam nukleat dalam reaksi, dan hal ini membutuhkan kerja di laboratorium untuk menghasilkan tes PCR yang baik (Pradnyaniti *et al*, 2013).

Suhu annealing adalah suhu dimana primer akan menempel pada templat DNA, besarnya suhu dapat dihitung berdasarkan nilai melting temperature (T_m) dari masing-masing primer. Pencarian kondisi optimal dari suhu annealing sangat penting, karena berkaitan dengan spesifitas dan sensitivitas produk PCR (Asy'ari & Noer, 2005). Optimasi konsentrasi primer penting dilakukan karena konsentrasi primer yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat mempengaruhi sensitifitas reaksi PCR, hal ini dapat beresiko terhadap

terjadinya hasil negatif palsu (Siswanto et al.,2019). Proses annealing merupakan tahap penempelan primer berkaitan dengan template (DNA) secara stabil dan awal pembentukan pasangan basa nitrogen. T_m primer



Gambar 3. Elektroferogram hasil amplifikasi Cdna akar *Oryza sativa* dengan variasi suhu annealing.

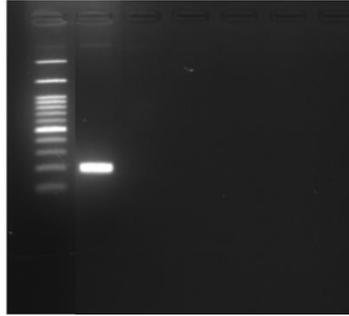
Keterangan:

A: 50 °C	D: 56.7°C
B: 52.2°C	E: 58.7°C
C: 54.4°C	F: 60 °C

Hasil produk PCR dari cDNA *Oryza sativa* (Gambar 2) untuk gradient suhu annealing menunjukkan hasil amplifikasi yang positif. Secara umum cDNA band tebal pada suhu 52,2°C, 56,6 °C, 58,7 °C , dan 60 °C. Ukuran ampikon yang teramati berada di antara 150-200 bp, sesuai dengan panjang ampikon 185 bp. Hal ini menunjukkan bahwa primer dapat menempel dengan baik pada template target menggunakan semua suhu annealing yang diuji.

3.4 Uji Spesifisitas Primer secara in vitro dengan Touchdown PCR

Program *Touchdown* PCR digunakan sebagai alternatif untuk mendapatkan ukuran ampikon yang spesifik. Prinsip kerja *Touchdown* PCR berdasarkan pada suhu annealing yang diturunkan setiap siklus. Program *Touchdown* PCR ini berhasil mengamplifikasi DNA template target sehingga menghasilkan band DNA dengan ukuran yang sesuai yaitu 185 bp.



Gambar 4. Elektroferogram hasil amplifikasi uji sensitivitas menggunakan primer GPX dengan program *Touchdown* PCR

Touchdown PCR berguna untuk template yang sulit diamplifikasi dan juga bisa digunakan secara standar untuk meningkatkan spesifisitas dan pembentukan produk (Korbie & Mattick, 2008). *Touchdown* PCR digunakan sebagai metode untuk menentukan suhu annealing optimal primer oligonukleotida dan mampu mengurangi off-target priming dan meningkatkan kekhususan PCR (Korbie & Mattick 2008). Program *Touchdown* PCR ini berhasil mengamplifikasi DNA template target sehingga menghasilkan band DNA dengan ukuran yang sesuai yaitu ± 185 bp. Sehingga untuk tahapan penelitian berikutnya tetap menggunakan program *Touchdown* PCR.

4. KESIMPULAN

Primer gen GPX dengan urutan *forward* 5'- GGCTTTGAGATATTGGCTTTCC-3' dan *reverse* 5'- AGCCACCTTTGTTAGACTTC-3' memiliki kriteria primer panjang amplicon 185 bp, panjang basa 22 dan 21 nukleotida, nilai T_m 57.7°C dan 57.9°C, GC sebesar 45.5% dan 47.6%, tidak memiliki *secondary structure* (hairpin dan selfdimer) sehingga primer dapat digunakan sebagai primer spesifik untuk mendeteksi gen GPX pada padi dengan menggunakan qPCR. Kinerja PCR optimal pada suhu annealing 60°C dan hasil akan spesifik menggunakan program *Touchdown* PCR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari PNBP pada bagian Penelitian Dasar Perguruan Tinggi (PDPT) Universitas Negeri Padang dengan nomor kontrak No. 947/UN35.15/LT/2022.

REFERENSI

Achyar, A., Atifah, Y., & Putri, D. H. (2021). In Silico Study of Developing a Method for Detecting Pathogenic Bacteria in Refillable Drinking Water Samples. *Journal of Physics: Conference Series*, 1940(1).

- Adisti, P. (2006). Respon Tumbuh dan Aktivitas Glutation Reduktase dan Glutation Peroksidase dari Kedelai Budidaya dan kedelai Liar yang Mengalami Cekaman Kekeringan. *Skripsi*. Departemen Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Akram, H. M., Ali, A., Sattar, A., Rehman, H. S. U., & Bibi, A. (2013). Impact of Water Deficit Stress On Various Physiological and Agronomic Traits of Three Basmati Rice (*Oryza sativa* L.) CULTIVARS. In *J. Anim. Plant Sci* 23(5),1415-1423.
- Asy'ari, M., & Noer, A. S. (2005). Optimasi konsentrasi MgCl₂ dan suhu annealing pada proses amplifikasi multifragmens mtDNA dengan metoda PCR. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 8(1), 23-27.
- Azhari, S., & violita. (2019). Identification Of Drought Tolerance Of West Sumatera Local Rice (*Oryza sativa* L.) At Germination Stage Using Peg 8000. *Ejournal unp*, 4(1), 21–28.
- Borah, P. (2011). Primer Designing for PCR. *Science Vision* 11(3): P. 134 -136.
- Bouman, B. A. M., Lampayan, R. M., & Tuong, T. P. (2007). *Water management in irrigated rice : coping with water scarcity*. International Rice Research Institute.
- Hamim, H., Violita, V., Triadiati, T., & Miftahudin, M. (2017). Oxidative stress and photosynthesis reduction of cultivated (*Glycine max* L.) and wild soybean (*G. tomentella* L.) exposed to drought and paraquat. *Asian Journal of Plant Sciences*, 16(2), 65–77.
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2000). Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR) general principles and implementation of polymerase chain reaction]. *Unitas*, 9(1), 17-29.
- Hindarta, A. (2008). Ekspresi Gen SOD dan GPX pada Kedelai yang Mendapat Cekaman Kekeringan dan Perlakuan Herbisida Paraquat. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., Burritt, D. J., Fujita, M., & Tran, L. S. P. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-19.
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 3(9), 1452-1456

- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika. Edisi Kedua*. Bogor: IPB.
- Mawarnursavira, K., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2019). Optimasi Melting Temperature Primer Degenerate Pada Suhu 60°C Gen Erm(T) (Erythromycin Ribosome Methylase) Yang Resistensi Terhadap Bakteri *Streptococcus pyogenes*. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 1–12.
- Nahar, S., Vemireddy, L. R., Sahoo, L., & Tanti, B. (2018). Antioxidant Protection Mechanisms Reveal Significant Response in Drought-Induced Oxidative Stress in Some Traditional Rice of Assam, India. *Rice Science*, 25(4), 185–196.
- Neel, M., Ajay, R., Pallavi, C., and Sandeep K. (2010). Primer Design and Analysis of *Klebsiella granulomatis* Strain K22-14 16S rRNA Gene. *J. Pharm. Bio. Chem. Sci*, 1 (4): 1054.
- Oktaviani, F., Novita Sari, I., Handoyo, T., Agus Siswoyo, T., Ubaidillah, M., (2021). Pengaruh Cekaman Kekeringan Terhadap Ekspresi Gen Ketahanan *Oscata* Dan *Osapx1* Pada Padi Toleran Kekeringan. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 8, 276-285.
- Pradnyaniti, D.G., Wirajana, I.N., & Yowani, S.C. (2013). Desain Primer secara in silico untuk Amplifikasi Fragmen Gen *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Farmasi Udyana*, 124-130.
- Pratiwi, A., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2015). Optimasi suhu desain primer gen *blaZ* resistensi pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara in silico. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1).
- Premier Biosoft. (2015). PCR Primer Design Guidelines.
- Pessarakli, M. (1999). *Handbook of Plant and Crop Stress, 2nd Edition*. New York: marcel dekker.
- Sambrook, J., R. D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3th editio)*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Sasmito, D. E. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk sekuensing DNA: mini review. In *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)* (pp. 93-102).
- Siswanto, Y. P., Merdekawati, F., Ernawati, E., Hardiana, A. T., & Kurniawan, E. 2019. Optimasi Suhu Annealing Dan Konsentrasi Primer Untuk Deteksi *Brugia malayi*

Menggunakan REAL-TIME PCR. *Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung*, 11(1), 314-321.

Violita. (2007). *Komparasi Respon Fisiologis Tanaman Kedelai yang Mendapat Cekaman Kekeringan dan Perlakuan Herbisida Paraquat*. Thesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Violita & Azhari, S. (2021). Effect of PEG-8000 imposed drought stress on rice varieties germination. *Journal of Physics*, 1-7.

Yuwono, T. (2006). *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction; panduan eksperimen PCR untuk memecahkan masalah biologi terkini*. Yogyakarta: Penerbit Andi.