

Specific primer design and optimization of annealing temperature for amplification gene peroxidase (*POD*) in *Oryza sativa* L.

Nella Fauziah¹, Afifatul Achyar¹, Zulyusri¹, Yusni Atifah¹, Linda Advinda¹, Violita Violita^{1*}

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

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

ABSTRACT. Peroxidase (*POD*) is an antioxidant enzymatic that has various functions in the plant life cycle, one of which is as a defense against ROS by catalyzing the conversion of H_2O_2 to water and O_2 . The ability of the *POD* enzyme activity to regulate the H_2O_2 content allows the enzyme to defend plants from stress. One of the methods that can be used to amplify the *POD* gene is quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). This method requires several important components, one of which is the primary (forward and reverse). The primer used in gene amplification must be specific for the target gene so that it can recognize and attach to the desired target gene. This study aims to design suitable primers for *POD* gene amplification using the qRT-PCR technique. Primers are designed using the PrimerQuest tool. The designed primers were then analyzed for their specificity with Geneious prime. Then the primer specificity was checked using the BLAST primer. The results of the primary design with the best criteria for *POD* gene amplification were Forward *POD* 5'-AAATGCGTCGATCTACTGTACCT-3' and Reverse *POD* 5'-GTGTTGAAAATGGCAATAAACCGG-3'

Keywords : Primer design, *POD*, qRT-PCR, Annealing temperature

ABSTRAK. Peroksidase (*POD*) merupakan enzim antioksidan yang memiliki beragam fungsi dalam siklus hidup tanaman, salah satunya yaitu sebagai pertahanan dalam melawan ROS dengan mengkatalisis konversi H_2O_2 menjadi air dan O_2 . Kemampuan aktifitas enzim *POD* dalam mengatur kandungan H_2O_2 memungkinkan enzim tersebut dapat mempertahankan tanaman dari cekaman. Metode yang dapat digunakan untuk amplifikasi gen *POD* salah satunya yaitu *quantitative reverse transcription-PCR* (qRT-PCR). Metode ini memerlukan beberapa komponen penting salah satunya yaitu primer (*forward* dan *reverse*). Primer yang digunakan dalam amplifikasi gen harus spesifik terhadap gen target sehingga dapat mengenali dan menempel pada gen target yang diinginkan. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer yang sesuai untuk amplifikasi gen *POD* menggunakan teknik qRT-PCR. Primer dirancang menggunakan perangkat Primer Quest. Primer yang telah dirancang kemudian dianalisis untuk spesifisitasnya dengan Geneious prime. Kemudian spesifisitas primer di cek menggunakan primer BLAST. Hasil desain primer dengan kriteria terbaik untuk amplifikasi gen *POD* yaitu Forward *POD* 5'-AAATGCGTCGATCTACTGTACCT-3' dan Reverse *POD* 5'-GTGTTGAAAATGGCAATAAACCGG-3'

Kata kunci : Desain primer, *POD*, qRT-PCR, Suhu annealing



1. PENDAHULUAN

Peroksidase (POD) merupakan salah satu antioksidan enzimatis yang berperan sebagai pertahanan dalam melawan ROS dengan mengkatalisis konversi H_2O_2 menjadi air dan O_2 (Abedi & Pakniyat, 2010). POD adalah oksidoreduktase tanaman yang mampu mengkatalisis beberapa reaksi fisiologis dan memiliki peran ganda menghilangkan H_2O_2 di sistem antioksidan tanaman (Yin, 2021). Kemampuan aktifitas enzim POD dalam mengatur kandungan H_2O_2 memungkinkan enzim tersebut dapat mempertahankan tanaman dari cekaman kekeringan (Acemi *et al.*, 2018).

Peningkatan aktivitas peroksidase dikaitkan dengan tekanan lingkungan pada tanaman, yaitu tanaman yang mengalami berbagai jenis stres seperti luka, sengatan panas atau osmotik, dan polusi udara (Geiger *et al.*, 1989). Tekanan lingkungan yang terjadi pada tanaman semakin memperburuk produksi ROS yang menyebabkan kerusakan oksidatif parah pada tanaman (Violita & Hamim, 2010). POD diamati sebagai respon terhadap kelebihan ROS yang muncul akibat cekaman di lingkungan (Chakraborty *et al.*, 2016).

Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi yang terjadi saat ini telah memicu kemajuan bioteknologi (Sutarno, 2016). Salah satunya yaitu berkembangnya teknologi molekuler. Kemajuan teknologi di bidang biologi molekuler dapat dimanfaatkan untuk isolasi RNA yang mengandung gen yang ingin diamplifikasi. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menganalisis ekspresi gen adalah *Real-Time Quantitative Reverse Transcription* PCR (qRT-PCR) (Santos, 2004).

Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR telah menjadi standar untuk deteksi dan kuantifikasi target RNA dan ditetapkan sebagai teknologi penelitian arus utama. qRT-PCR digunakan dalam berbagai aplikasi termasuk analisis ekspresi gen. Prinsip pengujian qRT-PCR yaitu RNA pertama kali akan ditranskripsi menjadi DNA komplementer (cDNA) dengan reverse transcriptase dari total RNA atau messenger RNA (mRNA). cDNA kemudian digunakan sebagai template untuk reaksi qPCR. Diperlukan deteksi kimia untuk melaporkan keberadaan produk PCR, instrumen untuk memantau amplifikasi secara realtime dan perangkat lunak yang sesuai untuk analisis kuantitatif. qRT-PCR dicirikan oleh titik waktu selama siklus ketika amplifikasi produk PCR pertama kali terdeteksi. Semakin tinggi salinan awal jumlah target asam nukleat, semakin cepat signifikan peningkatan fluoresensi diamati (Bustin, 2005).

Penelitian ini dilakukan dengan menerapkan suatu disiplin ilmu bioinformatika. Bioinformatika adalah bidang interdisipliner ilmu komputer yang mengembangkan metode dan perangkat lunak (software) untuk memahami data biologi (Mahrus *et al.*, 2021). Salah satu peran paling signifikan dari bioinformatika adalah untuk merancang dan menghasilkan sekuen primer.

Primer adalah urutan oligonukleotida pendek yang berperan untuk menandai daerah sekuens gen target (Nuraini & Roslim, 2021). Primer yang baik adalah primer yang spesifik. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Untuk mendapatkan suatu primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk amplifikasi dilakukan desain secara *in silico* (Pradnyaniti *et al.*, 2010).

Perancangan atau desain primer bertujuan untuk memperoleh primer yang tepat digunakan dalam amplifikasi DNA dengan metode Polymerase (Yustinadewi *et al.*, 2018). Keberhasilan amplifikasi sangat bergantung pada primer yang digunakan sehingga untuk mendapatkan produk PCR yang spesifik diperlukan primer yang tepat. Selain primer, keberhasilan PCR juga dipengaruhi oleh suhu annealing (T_a). Suhu annealing adalah suhu yang diperlukan oleh primer untuk menempel pada DNA cetakan secara stabil (Sasmito *et al.*, 2014). Pemilihan suhu annealing yang terlalu rendah akan menyebabkan penempelan yang tidak spesifik, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan sulit terbentuknya ikatan primer dan DNA template (Amanda *et al.*, 2019). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis kombinasi pasangan primer yang dapat digunakan dalam proses PCR untuk mengamplifikasi gen *POD* dari akar beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.), serta mengetahui suhu annealing yang tepat untuk mengamplifikasi gen *POD*.

2. METODE

Penelitian ini dilakukan dengan menerapkan suatu disiplin ilmu bioinformatika, yang secara luas didefinisikan sebagai perpaduan antara ilmu biologi (biologi molekuler) dan komputasi dengan menggunakan bantuan komputer dan software. Desain primer dilakukan pada program PrimerQuest. Dengan memasukkan sekuen gen *POD Oryza sativa* pada "Sequence Entry". Selanjutnya pada menu "Custom Design Parameters" dimasukkan parameter primer yang diinginkan sehingga muncul beberapa set primer. Hasil analisis dilihat menggunakan GeneiousPrime, kemudian dicek spesifisitas primer (forward dan reverse) dengan primerBLAST. Bahan yang digunakan dalam merancang primer yang akan di amplifikasi digunakan beberapa perangkat lunak diantaranya yaitu PrimerQuest

untuk mendesain primer secara *in silico*, data sekuen gen *POD Oryza sativa* (kode akses XM_015773716.1) yang diperoleh dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dan GeneiousPrime. Bahan yang digunakan dalam amplifikasi DNA yaitu *nuclease-free water* (NFW), *Go Tag Green Master Mix*, primer POD (*forward* dan *reverse*), tube PCR dan cDNA akar padi. Bahan yang digunakan untuk elektroforesis yaitu agarose, buffer TAE 1 X, DNA *ladder* 100 bp, *loading dye*, *GelRed*, dan parafilm.

2.1 Desain Primer *POD*

Sebagai cetakan untuk mendesain primer, digunakan gen *POD Oryza sativa* (kode akses XM_015773716.1) dari penelitian (Duan *et al.*, 2012) untuk di desain kembali sehingga diperoleh primer yang memenuhi kriteria. Sekuen nukleotida dapat di unduh pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov. File FASTA dari gen *POD* (XM_015773716.1) yang sebelumnya telah di unduh pada laman NCBI, kemudian dimasukkan ke primerQuest pada situs <https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest> untuk memperoleh kandidat primer.

2.2 Analisis Kriteria Primer

Primer yang telah dirancang dapat mengenali urutan dari diri mereka sendiri, sehingga dapat berikatan satu sama lain membentuk struktur yang disebut dimer. Hal ini dapat menimbulkan masalah karena primer akan cenderung saling menempel sesamanya tidak dengan gen target, sehingga dapat mengurangi konsentrasi DNA (Saraswati *et al.*, 2019). Oleh karena itu, perlu dilakukan analisis menggunakan software yang tersedia untuk memprediksi keberadaan dimer pada kandidat primer, yaitu Geneious Prime dengan memasukkan semua kandidat primer ke Geneious Prime kemudian pilih primer yang memenuhi kriteria.

2.3 Spesifisitas Primer

Spesifisitas primer harus dipertimbangkan sehingga primer dapat mengenali dan menempel pada gen target yang diinginkan. Untuk analisisnya bisa digunakan BLAST dari NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. Hasil dan Pembahasan

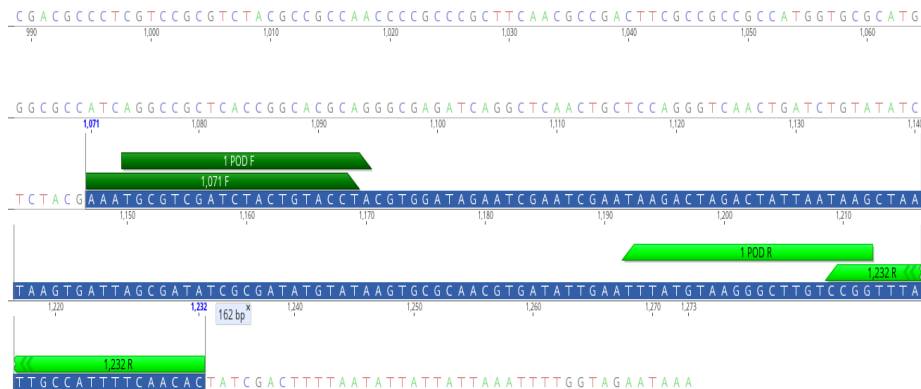
3.1 Desain Primer

Berdasarkan hasil desain primer menggunakan primer quest tool, didapatkan lima set kandidat primer untuk gen *POD* (Tabel 1). Lima kandidat primer tersebut diseleksi kembali sesuai dengan kriteria primer yang baik untuk PCR. Keberhasilan dalam melakukan desain primer pada PCR sangat dipengaruhi oleh karakteristik primer yang digunakan (Sasmito *et al.*, 2014).

Tabel 1. Kandidat primer POD

Set	Type	Sequence	Length	Tm	%GC	Amplicon
1	Forward	ACTTCCACGACTGCTTTGT	19	61.837	47.368	108
	Reverse	CCCTCAGCGAGTTGACATTAG	21	62.194	52.381	
2	Forward	GGGATGACGACGAACCAAA	19	62.039	52.632	81
	Reverse	GAAGCTAGTGACGAAGTTACCC	22	62.102	50	
3	Forward	TGCGTCGATCTACTGTACCTA	21	61.938	47.619	110
	Reverse	CACGTTGCGCACTTATACATATC	23	61.788	43.478	
4	Forward	ACGTGGATAGAATCGAATCGAATAA	25	62.296	36	119
	Reverse	CCGGACAAGCCCTTACATAAA	21	62.216	47.619	
5	Forward	GATGCAACTCGAGGCATCTT	20	62.464	50	146
	Reverse	TGGTTTGGTTCGTCGTCATC	20	62.501	50	

Lima set kandidat primer tersebut kemudian di periksa menggunakan geneious prime untuk memastikan primer memenuhi kriteria yang dibutuhkan. Karena hasil amplicon yang kami inginkan hanya sebesar 150-250 bp dan 5 set kandidat primer memiliki panjang dibawah 150 bp, sehingga dilakukan penggabungan antar set primer dengan menggabungkan forward dan reverse dari set primer yang berdekatan. Setelah dilakukan pengecekan dari gabungan set primer didapatkan bahwa primer yang hampir memenuhi kriteria primer yang baik adalah gabungan forward set 3 dengan reverse set 4 dengan panjang sekuen 139 bp. Sekuen dengan panjang 139 bp masih belum dapat memenuhi kriteria panjang yang baik, oleh sebab itu dilakukan desain ulang menggunakan geneious prime, sehingga didapatkan pasangan primer yang memenuhi kriteria primer dengan panjang 162 bp. Posisi relatif dari primer dengan gen *POD* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Posisi relatif dari primer dengan gen *POD*

3.2 Analisis Kriteria Primer

Primer dapat dikatakan baik apabila memenuhi kriteria parameter primer. Parameter tersebut antara lain: melting temperature (Tm), persentase jumlah G dan C (%GC), 3'dimer, stabilitas, repeats, dan hairpins. Sebaiknya % GC berada pada rentang 40-60 % dan dalam

primer yang didesain tidak terdapat haipins dan dimer sehingga primer ini cukup baik dapat digunakan dalam proses PCR (Borah, 2011).

Tabel 2. Kriteria primer POD yang telah dianalisis menggunakan geneious prime

Type	Karakteristik primer		DNA Fold
Forward	Panjang	: 23	
	%GC	: 43,5%	
	TM	: 59,6	
	Selfdimer	: none	
	Hairpin	: none	
	Produk size	: 162 bp	
	Sequence	:AAATGCGTCGATCTACTGTACCT	
Reverse	Panjang	: 24	
	% GC	: 41,7%	
	TM	: 59,8	
	Self dimer	: none	
	Hairpin	: none	
	Produk size	: 162 bp	
	Sequence	:GTGTTGAAAATGGCAATAAACCGG	

3.3 Spesifitas Primer

Spesifitas primer forward dan reverse diperiksa kembali menggunakan primerBLAST pada laman NCBI. Hasil BLAST (gambar 2) menunjukkan bahwa pasangan primer dapat mengamplifikasi gen *POD* dari padi (*Oryza sativa* L.) dengan panjang produk 162 bp.

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAATGCGTCGATCTACTGTACCT	23	59.62	43.48	6.00	3.00
Reverse primer	GTGTTGAAAATGGCAATAAACCGG	24	59.85	41.67	4.00	4.00

Products on target templates
 >XM_015773716.1 PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group peroxidase 70 (LOC4332782), mRNA

```

product length = 162
Forward primer 1  AAATGCGTCGATCTACTGTACCT  23
Template      1071  ..... 1093

Reverse primer 1  GTGTTGAAAATGGCAATAAACCGG  24
Template      1232  ..... 1209
  
```

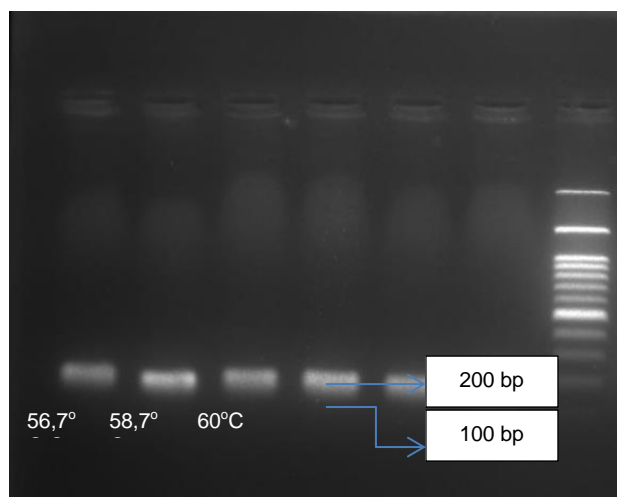
Gambar 2. Hasil BLAST primer *POD* forward dan *POD* reverse

3.4 Optimasi suhu annealing

Optimasi suhu annealing dilakukan bertujuan menentukan suhu annealing yang tepat untuk pasangan primer yang akan mengamplifikasi gen *POD* pada padi (*Oryza sativa* L.). optimasi dilakukan menggunakan program PCR yang digunakan terdiri dari tahapan pra-PCR, setelah itu dilanjutkan dengan tahapan denaturasi, kemudian penempelan primer

dilakukan dengan beberapa suhu optimasi. Suhu optimasi yang digunakan adalah Tm-1 (50°C), Tm-2 (52,2°C), dan Tm-3 (54,4°C), Tm-4 (56,7°C), Tm-5 (58,7°C), Tm-6 (60°C).

Kemudian dilanjutkan elongasi. Pemeriksaan kualitas dan kuantitas dari DNA total dan produk PCR dilakukan menggunakan mesin elektroforesis. Elektroforesis dilakukan dengan cara memigrasikan fragmen DNA pada 1,5 % gel agarose yang mengandung 1,5 g bubuk agaros dalam 100 mL *buffer* TAE (Tris-Amil-EDTA) 1X. Sampel DNA sebanyak 5 µl dicampur dengan *loading dye* sebanyak 1 µl dan *gel red* 5 sebanyak µl, lalu dimasukkan ke dalam sumur gel. Sebagai DNA standar, DNA *ladder* 100 bp sebanyak 3 µl dicampur dengan 15 µl *gel red* dan 1 µl *loading dye* lalu dimasukkan ke dalam sumur pertama. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 volt selama 35 menit untuk pemeriksaan terhadap DNA hasil PCR. Pita DNA pada gel kemudian divisualisasi menggunakan UV-*transluminator* dan didokumentasikan menggunakan kamera digital. Hasil amplifikasi dengan menggunakan teknik PCR telah menghasilkan fragmen DNA yang diperkirakan berukuran 162 pb (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil optimasi suhu annealing

Pada suhu 60 °C memiliki pita yang lebih tebal dan jelas dibandingkan dengan suhu lainnya. Sehingga dari hasil elektroforesis tersebut dapat dilihat bahwa suhu annealing yang optimum bagi primer untuk mengamplifikasi *gen POD* adalah 60 °C.

4. KESIMPULAN

Primer *gen POD* yaitu Forward *POD* 5'-AAATGCGTCGATCTACTGTACCT-3' dan Reverse *POD* 5'-GTGTTGAAAATGGCAATAAACCGG-3' dengan panjang amplicon 162 bp

merupakan hasil desain primer dengan kriteria terbaik untuk amplifikasi gen *POD*. Suhu annealing yang optimal untuk PCR gen *POD* adalah suhu 60 °C.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari PNPB pada bagian penelitian dasar perguruan tinggi (PDPT) Universitas Negeri Padang dengan nomor kontrak No. 947/UN35.15/LT/2022.

REFERENSI

- Abedi, T., & Pakniyat, H. (2010). Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46(1), 27–34.
- Acemi, A., Duman, Y. A., Karakus, Y. Y., & Özen, F. (2018). Developmental and biochemical analyses of in vitro drought stress response in ornamental European Bluestar (*Amsonia orientalis* Decne.). *Folia Horticulturae*, 30(2), 357–366.
- Amanda, K., Sari, R., & Apridamayanti, P. (2019). Optimasi Suhu Annealing Proses PCR Amplifikasi Gen *shv* Bakteri *Escherichia coli* Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1), 1–6.
- Borah, P. (2011). Primer designing for PCR. *Science Vision*, 11(3), 134–136.
- Chakraborty, K., Bishi, S. K., Goswami, N., Singh, A. L., & Zala, P. V. (2016). Differential fine-regulation of enzyme driven ROS detoxification network imparts salt tolerance in contrasting peanut genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 128, 79–90.
- Duan, J., Zhang, M., Zhang, M., Xiong, H., Liu, P., Ali, J., Li, J., & Li, Z. (2012). OsMIOX, a myo-inositol oxygenase gene, improves drought tolerance through scavenging of reactive oxygen species in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 196, 143–151.
- Geiger, J. P., Rio, B., Nandris, D., & Nicole, M. (1989). Peroxidase production in tissues of the rubber tree following infection by root rot fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 34(3), 241–256.
- Mahrus, Lalu Zulkifli, Saprizal Hadisaputra, & Ida Ayu Putu Armyani. (2021). Penggunaan Bioinformatika dalam Pembelajaran Sains Untuk Menyelesaikan Kesulitan Belajar Siswa pada Materi Genetika di SMPN 20 Mataram. *Jurnal Pengabdian Magister Pendidikan IPA*, 4(4), 290–295.
- Nuraini, I. S., & Roslim, D. I. (2021). Optimasi Suhu Annealing Pasangan Primer Untuk Amplifikasi Daerah Atpb-Rbcl Intergenic Spacer Pada Tumbuhan Pandan (*Benstonea* sp.) Asal Riau. *Repository University of Riau*, 3(2), 81–91.
- Pradnyaniti, D. ., Wirajana, I. ., & Yowani, S, C. (2010). Desain Primer secara in silico untuk Amplifikasi Fragmen Gen *rpoB* Mycobacterium tuberculosis Desain Primer secara in silico untuk Amplifikasi Fragmen gen *rpoB* Mycobacterium tuberculosis dengan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Farmasi Udayana*, 124–130.
- Saraswati, H., Dwi Wahyuni, F., Bioteknologi, P., Ilmu-ilmu Kesehatan, F., & Esa Unggul, U. (2019). Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Gen *cryIII* dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1), 33–38.
- Sasmito, D., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction(PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Informatika Medis*, 93–102.
- Sutarno. (2016). Rekayasa Genetik dan Perkembangan Bioteknologi di Bidang Peternakan. *Proceeding Biology Education Conference*, 13(1), 23–27.
- Violita, & Hamim. (2010). Sistem Pertahanan Tanaman Kedelai Yang Mendapat Perlakuan Cekaman Kekeringan. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2(9), 103–112.

- Yin, Z. (2021). Effects Of Drought Stress On Antioxidant Enzymes In Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L .) Seedlings. *Bangladesh J.*, 50(3), 873–878.
- Yustinadewi, P. D., Yustiantara, P. S., & Narayani, I. (2018). Mdr-1 Gene 1199 Variant Primer Design Techniques in Pediatric Patient Buffy Coat Samples With Lla. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 5(1), 105.