



Desain Primer untuk Identifikasi Gen *GmDREB2* pada Kedelai

Muhammad Rizza Pahlevi

Dosen Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Kahuripan Kediri

Abstrak

Primer adalah oligonukleotida yang penting pada proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Desain primer yang baik merupakan langkah awal dari keberhasilan sekuensing DNA suatu gen. Gen *GmDREB2* adalah salah satu gen terkait stres kekeringan pada kedelai yang dikategorikan kedalam gen regulasi. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendapatkan primer yang berguna dalam mengidentifikasi gen *GmDREB2* pada tanaman kedelai dengan bantuan *software Oligo Analyzer 1.0.2*. Desain primer mengacu pada *GenBank*(NCBI):DQ054363.1. Hasil amplifikasi dari primer hasil desain gen *GmDREB2* pada kedelai sekitar 415 bp.

Kata Kunci: Kedelai, stres kekeringan, desain primer, *GmDREB2*

A. PENDAHULUAN

Primer adalah oligonukleotida yang memiliki peranan penting dalam proses PCR. Untuk mendapatkan primer dapat dilakukan dengan cara melakukan desain primer. Desain primer dapat diperoleh dengan menggunakan bantuan *software* bioinformatik. *Software* akan secara otomatis

menentukan primer yang layak pada suatu sekuens. Namun tidak semua hasil pemilihan primer secara otomatis sesuai dengan harapan, sehingga diperlukan campur tangan secara manual (Judelson, 2011). Banyak *software* yang dapat membantu melakukan desain primer secara manual diantaranya yaitu *Oligo Analyzer 1.0.2.*, dan *Oligo Explorer 1.1.0.* (Kuulasmaa, 2002 dalam Kropinski, 2009)

Dalam melakukan desain primer ada beberapa kriteria untuk mendapatkan primer yang optimal diantaranya spesifisitas, panjang primer 18-30 bp, kandungan %GC sekitar 40-60%, suhu leleh (T_m) optimal berkisar 52-58°C, peniadaan basa Timin (T) pada 3'-end, primer bukan komplemennya sehingga mencegah *self-annealing/dimmers* dan *mispriming*, suhu disosiasi primer pada pasangan PCR kira-kira sama (Abd-Elsalam, 2003; McPherson *et al.*, 2001; Dieffenbach *et al.*, 1993). Desain primer yang spesifik dapat digunakan dalam identifikasi suatu gen.

Gen *GmDREB2* merupakan gen yang berperan dalam sinyal transduksi dan regulasi ekspresi gen pada kedelai (Shinozaki dan Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Chen *et al.*, 2007). Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan primer yang spesifik gen *GmDREB2* pada tanaman kedelai.

B. METODE PENELITIAN

1. Bahan dan Alat

Seperangkat komputer dengan *software gratis/freeware* untuk *design primer* yaitu *Oligo Analyzer 1.0.2.*, dan *software Oligo Explorer 1.1.0.* (Kuulasmaa, 2002 dalam Kropinski, 2009), koneksi internet ke database NCBI (online).

2. Desain Primer

Desain primer dilakukan dengan mengacu pada gen *GmDREB2* dari *GenBank: DQ054363.1 database NCBI (The National Center for Biotechnology Information)*. Desain dilakukan dengan menggunakan *software Oligo Analyzer 1.0.2.*, dan dibantu dengan *software Oligo Explorer 1.1.0.* serta *tools online* dari NCBI.

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

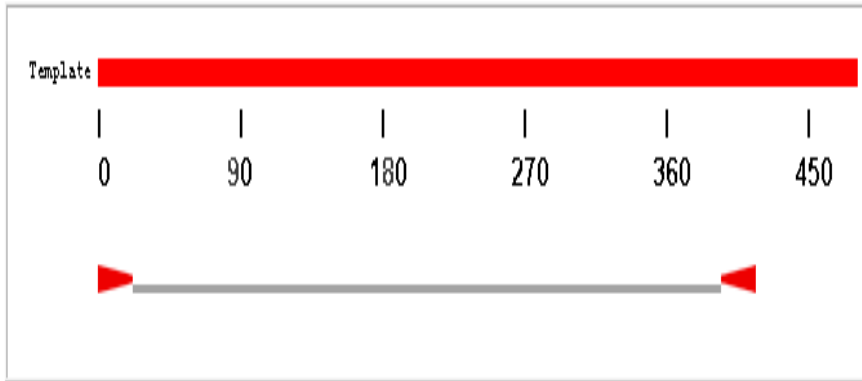
Tabel 1. Hasil desain primer dengan bantuan *software Oligo Analyzer 1.0.2.* mencakup kandungan %GC, Tm, uji hairpin/loop, uji dimmer dan uji multiplex antara primer *forward* dan primer *reverse*.

Pasangan	PRIMER	Length (bp)	Tm	GC% 40-60%	Ta= Tm-5	Total Uji Dimmer	Total Uji Hairpin	Total Multiplex
1	F: 5'-ATG GAAGAAGCG GGT TTA GGA GA-3'	23	68	47,8%	63	-	-	5
	R: 5'-CTA ATC TTC AGG TTT GGG ATA CTC-3'	24	68	41.7 %	63	1	1	
2	F: 5'-GGA AAA GCG AGA AGC GAA AGC AG-3	23	70	52.2 %	65	-	-	6
	R: 5'-ACG AGG ATT GCT GAA GCG CGG -3'	21	68	61.9 %	63	3	-	
3	F: 5'-CGAGGAAAAGCGAGAAGC GAA AG-3'	23	70	52.2 %	65	-	-	4
	R: 5'-ACG AGG ATT GCT GAA GCG CGG -3'	21	68	61.9 %	63	3	-	
4	F: 5'-GCG AAA GCA GCA GCA CCA ACA A-3'	22	68	54.5 %	63	-	-	8
	R: 5'-TGG AGT GTG TCG ACG AGG ATT G-3'	22	68	54.5 %	63	2	-	
5	F: 5'-CGA GGA AAA GCG AGA AGC GAA -3'	21	64	52.4 %	59	-	-	4
	R: 5'-CGAGGATTGCTGAAGCGC GG-3'	20	66	65.0 %	61	3	-	
6	F: 5'-GAA AAG CGAGAA GCG AAA GCA GC-3'	23	70	52.2 %	65	-	-	6
	R: 5'-ACG AGG ATT GCT GAA GCG CGG-3'	21	68	61.9 %	63	3	-	
7	F: 5'-AGCGAGAAGCGAAAGCAG CAG-3'	21	66	57.1 %	61	-	-	7
	R: 5'-TGT CGA CGA GGA TTG CTG AAG-3'	21	64	52.4 %	59	2	-	
8	F: 5'-AGC GAA AGC AGC AGC ACC AAC A-3'	22	68	54.5 %	63	-	-	7
	R: 5'-TGG AGT GTG TCG ACG AGG ATT G-3'	22	68	54.5 %	63	2	-	

Kandidat pasangan primer *forward* dan *reverse* yang terbaik adalah dimana memenuhi dari kriteria-kriteria desain primer diantaranya spesifisitas, dengan asumsi semakin panjang bp primer maka nilai spesifisitas primer semakin tinggi namun akan meningkatkan besarnya suhu T_m jika dikalkulasi dengan pendekatan rumus Wallace (Prezioso, 2006). Pada pasangan pertama primer *forward* F: 5'-ATG GAA GAA GCG GGT TTA GGA GA-3' dengan primer *reverse* R: 5'-CTA ATC TTC AGG TTT GGG ATA CTC-3 memenuhi kriteria panjang, suhu T_m yang sama, kandungan% GC, spesifisitas namun menghasilkan total multiplex yang tinggi. Total multiplex yang tinggi berpotensi pada ketidakberhasilan PCR dikarenakan primer saling berikatan antara sesama primer (*forward* dengan *reverse*) sehingga peluang untuk mengamplifikasi sekuen target semakin rendah, begitu pula yang terjadi pada pasangan primer 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8. Menurut Judelson (2011), dalam mendesain primer penting untuk meminimalkan adanya primer *dimmer* dan primer *hairpin*. Hasil kombinasi primer optimal tampak pada Tabel 2.

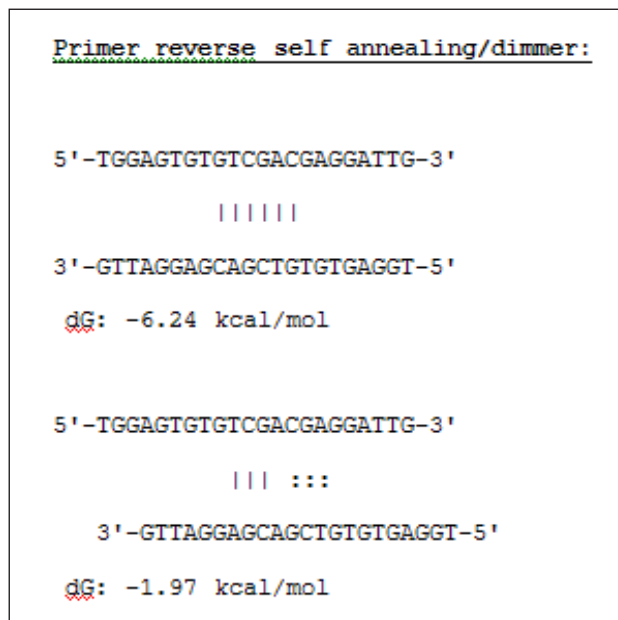
Tabel 2. Pasangan primer gen *GmDREB2* hasil kombinasi yang memenuhi kriteria desain primer

PRIMER	Length(bp)	T_m	GC% 45-60%	$T_a = T_m - 5$	Total Uji Dimmer	Total Uji Hairpin	Total Multiplex
F: 5'-ATG GAA GAA GCG GGT TTA GGA GA-3'	23	68	47,8 %	63	-	-	-
R: 5'-TGG AGT GTG TCG ACG AGG ATT G-3'	22	68	54.5 %	63	2	-	



Gambar 1. Produk amplifikasi kandidat primer *GmDREB2* dan posisi *start* dan *stop* pada *database* NCBI posisi *start* primer *forward* di 1-23→, sedangkan primer *reverse* di 415-394→ menghasilkan produk *amplicon* dengan ukuran 415 bp (*base pair*).

Kandidat pasangan primer *forward* F: 5'-ATG GAA GAA GCG GGT TTA GGA GA-3' dengan primer *reverse* R: 5'-TGG AGT GTG TCG ACG AGG ATT G-3' memiliki panjang yang 23bp dan 22bp dimana panjang ini dapat dikategorikan kedalam primer yang spesifik karena panjang antara lebih dari 20bp, suhu T_m antara primer *forward* dan *reverse* yang sama yaitu 68°C, Total uji multiplex keduanya yang nol dengan uji dimmer dan uji hairpin primer *forward* nol, sedangkan untuk primer *reverse* terdapat peluang dimmer sebanyak 2 bentuk tampak pada (Gambar 2.) Menurut Abd-Elsalam (2003), beberapa parameter termasuk panjang primer, kandungan %GC, sekuen 3'end perlu dioptimasi untuk keberhasilan PCR sedangkan parameter yang lain dapat dilakukan dengan *software* komputer.



Gambar 2. Posisi primer *dimmer* dari primer *reverse* R: 5'-TGG AGT GTG TCG ACG AGG ATTG-3'

Suhu *annealing* yang didapatkan dengan menggunakan *software Oligo Analyzer 1.0.2.*, adalah suhu 63°C, *software* ini menggunakan kalkulasi pendekatan Wallace *et al.*, (1979) $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ dengan suhu *annealing* (T_a) secara umum 5°C dibawah T_m . Suhu yang tinggi tersebut perlu dilakukan *gradient* suhu ketika dilakukan *wet lab* analisis. Sehingga desain primer spesifik dengan menggunakan *software* ini perlu untuk dilakukan optimasi suhu *annealing*. Menurut Prezioso (2006) untuk mendapatkan suhu *annealing* diperlukan optimasi PCR melalui percobaan empiris dan bisa dilakukan dengan *gradient* PCR. Primer hasil desain ini telah digunakan dan dipublikasikan oleh Arumingtyas *et al.* (2014) dengan suhu *annealing* 58°C. Pasangan primer *GmDREB2* di analisis dengan *database* NCBI dan menghasilkan produk amplifikasi sekitar 415bp (Gambar 1).

D. KESIMPULAN

Pasangan primer F: 5'-ATG GAA GAA GCG GGT TTA GGA GA-3' dan R: 5'-TGG AGT GTG TCG ACG AGG ATT G-3' dapat mengamplifikasi gen *GmDREB2* pada tanaman kedelai dengan ukuran sekitar 415bp sesuai dengan desain primer. Optimasi suhu annealing diperlukan untuk mendapatkan hasil amplifikasi DNA. Penggunaan software *Oligo Analyzer 1.0.2*. dapat membantu dalam mendesain primer.

1. Ucapan Terimakasih

Terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elsalam, K.A. 2003. Bioinformatic Tools and Guideline for PCR Primer Design. *African Journal of Biotechnology*. 2(5). Pp 91-95.
- Arumingtyas, E. L., A. Sugianto & M. R. Pahlevi. 2014. DNA polymorphism of the drought tolerance gene *GmDREB2* of Indonesian local varieties soybean (*Glycine max* L. Merr). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 5(5):228-232
- Chen, M., Q-Y. Wang, X-G. Cheng, Z-S. Xu, L-C. Li, X-G. Ye, L-Q. Xia dan Y-Z. Ma. 2007. *GmDREB2*, a Soybean DRE-binding Transcription factor, Conferred Drought and High-Salt Tolerance in Transgenic Plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **353**: 299-305.
- Dieffenbach, C.W., T.M. Lowe dan G. S. Dveksler. 1993. General Concepts for PCR Primer Design. *Genome Res*. 3: S30-S37
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.
- Judelson, H.2011. Guidelines for Designing Primers. <http://oomyceteworld.net/protocols/primer%20designing2.pdf>
- Kropinski, A. 2009. Molecular Biology Freeware for Windows. http://molbiol-tools.ca/molecular_biology_freeware.htm. Diakses tanggal 1 Maret 2010.
- McPherson, M. J., B. D. Hames, dan G. R. Taylor. 2001. *PCR 2 A Practical Approach*. Oxford University Press. New York.
- Prezioso, V.R.2006.General Notes on Primer Design in PCR. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.509.731&rep=rep1&type=pdf>. Diakses tanggal 27 Agustus 2016
- Shinozaki, K and K. Y-Shinozaki. 2007. Gene Networks Involved in Drought Stress Response and Tolerance. *Journal of Experimental Botany* **58** (2): 221-227.
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K.1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res*. 6: 3543-3557.