

# Primer Design and Annealing Temperature Optimization for Catalase (CAT) Gene Amplification in Rice (*Oryza sativa* L.)

## Desain Primer dan Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi Gen Katalase (CAT) pada Padi (*Oryza sativa* L.)

Nelfi Yulita<sup>1</sup>, Violita<sup>1\*</sup>, Afifatul Achyar<sup>1</sup>, Dwi Hilda Putri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

\*Correspondence Author: [violita@fmipa.unp.ac.id](mailto:violita@fmipa.unp.ac.id)

### Abstract

Catalase (CAT) is an antioxidant enzyme that plays an important role in plant growth and defense against abiotic stress, one of which is rice (*Oryza sativa*). When plants are under abiotic stress conditions, the CAT gene will be regulated and expressed as a form of defense response to stress. To determine the expression of this CAT gene, optimal primers and annealing temperatures are needed to specifically amplify the CAT gene. This study aims to design primers and determine the optimal annealing temperatures to amplify the CAT gene. Primers are designed using the pick primer, primer BLAST and geneious prime tools. Primers are designed in silico and must meet the ideal primer criteria because they will be used in vitro. Optimization of the annealing temperature was carried out using a PCR temperature gradient. The results of this study obtained a pair of primers, namely forward primer 5'-ATAAGTAGGGCGGTGTGTGG-3' with a primer length of 20 bp, and reverse primer 5'-GCGAGTTGTTGTTGTTCCATAC-3' with a primer length 22 bp. This primer pair produces a 185 bp amplicon in the *Oryza sativa* CAT gene. The optimum annealing temperature for this primer pair is 60°C.

**Key words:** *Catalase, CAT, Design Primer, PCR*

### Abstrak

Katalase (CAT) merupakan enzim antioksidan yang berperan penting dalam pertumbuhan dan pertahanan tanaman terhadap stress abiotik salah satunya pada tanaman Padi (*Oryza sativa*). Ketika tanaman dalam kondisi stress abiotik maka gen CAT akan diregulasi dan diekspresikan sebagai bentuk respon pertahanan terhadap cekaman. Untuk mengetahui ekspresi gen CAT ini dibutuhkan primer dan suhu annealing yang optimal untuk mengamplifikasi gen CAT secara spesifik. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer dan menentukan suhu annealing yang optimal untuk mengamplifikasi gen CAT. Primer didesain menggunakan tools *Pick Primer, Primer BLAST* dan *Geneious Prime*. Primer didesain secara in silico dan harus memenuhi kriteria primer ideal karena akan digunakan secara in vitro. Optimasi suhu annealing dilakukan menggunakan gradient suhu PCR. Hasil dari penelitian ini didapatkan sepasang primer yaitu primer forward 5'-ATAAGTAGGGCGGTGTGTGG-3' dengan panjang primer 20 bp dan primer reverse 5'-GCGAGTTGTTGTTGTTCCATAC-3' dengan panjang primer 22 bp. Pasangan primer ini menghasilkan amplicon 185 bp pada gen CAT *Oryza sativa*. Suhu annealing optimum untuk pasangan primer ini adalah 60°C.

**Kata kunci:** *Katalase, CAT, Desain Primer, PCR*

### Pendahuluan

Padi merupakan salah satu sumber makanan pokok penduduk Indonesia yang banyak dibudidayakan. Salah satu permasalahan yang sering terjadi dalam pertumbuhan tanaman padi adalah cekaman abiotik berupa kekeringan (Oktaviani *et al.*, 2021). Banyak tanaman yang tidak tahan terhadap cekaman kekeringan, salah satu penyebab utamanya karena kerusakan pada tanaman akibat kelebihan produksi Reactive Oxygen Species (ROS) selama cekaman kekeringan (Jiang dan Zhang, 2002; Violita & Hamim, 2010). Kelebihan

produksi ROS yang disebabkan oleh kondisi stres pada sel tumbuhan sangat reaktif dan toksik terhadap protein, lipid, dan asam nukleat yang pada akhirnya mengakibatkan kerusakan dan kematian sel (Gill & Tuteja, 2010). Di sisi lain, kelebihan produksi ROS selama stres juga dianggap sebagai sinyal untuk aktivasi jalur respons stres (Baxter et al., 2014). Tanaman telah mengembangkan sistem antioksidan enzimatik yang efisien sebagai pertahanan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh ROS (You & Chan, 2015)

Beberapa enzim antioksidan yang berperan dalam penyelamatan ROS tanaman adalah Katalase (CAT), superoksida dismutase (SOD), askorbat peroksidase (APX), glutathione peroksidase (GPX), monodehidroaskorbat reduktase (MDHAR), dehidroaskorbat reduktase (DHAR), glutathione reduktase (GR), glutathione S-transferase (GST), dan peroksiredoksin (PRX). Enzim antioksidan ini terletak di situs yang berbeda dari sel tumbuhan dan bekerja sama untuk detoksifikasi ROS (You & Chan, 2015)

Katalase (EC 1.11.1.6) adalah enzim antioksidan pertama yang didokumentasikan dan muncul di semua makhluk hidup, mulai dari prokariota uniseluler hingga eukariota multiseluler. Aktivitas katalase pertama kali di amati pada jaringan tumbuhan dan hewan oleh thernard pada tahun 1818, yang mencatat bahwa jaringan seperti itu (katalase) mudah mendegradasi hidrogen peroksida. Kemudian pada tahun 1901 Low menetapkan bahwa degradasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam jaringan disebabkan oleh efek enzim terpisah yang dinamakan dengan "katalase". (Nandi *et al.*, 2019). Pada tahun 1923 Warburg mengemukakan bahwa katalase merupakan enzim yang mengandung besi, karena dihambat oleh sianida (Sharma & Ahmad, 2014). Selanjutnya, Zeile dan Hellstrom (1930) menemukan bahwa katalase memiliki gugus prostetik hematin. Sejak itu, katalase telah menjadi subyek dari berbagai penelitian dan salah satu enzim pertama yang dimurnikan (Ścibior & Czczot, 2006)

Katalase terdapat pada semua organisme aerobik yang berfungsi untuk mengkatalisis hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) menjadi air (H<sub>2</sub>) dan oksigen (O<sub>2</sub>) dengan hemat energi dalam sel yang terpapar tekanan lingkungan (Shin *et al.*, 2008). Katalase terletak di semua situs utama produksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada lingkungan seluler seperti mitokondria, peroksisom, sitosol, dan kloroplas (Sharma & Ahmad, 2014). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adalah ROS yang sangat umum terlibat dalam respons tanaman. Ketika tanaman padi dalam kondisi kekeringan gen catalase akan diregulasi dan diekspresikan sebagai bentuk respon pertahanan terhadap cekaman (Oktaviani *et al.*, 2021).

Pentingnya katalase dalam sistem pertahanan antioksidan telah dibuktikan oleh berbagai penelitian, gen *osCATA* pada tanaman padi (*Oryza sativa*) (Vighi *et al.*, 2016), CAT pada tiga varietas buncis (Bivaniej, ILC48 dan Pirouz) (Mafakheri *et al.*, 2011), dan CAT pada kultivar gandum (Moloudi *et al.*, 2013). Dalam penelitian tersebut ekspresi gen CAT meningkat saat tanaman terpapar kekeringan.

Salah satu metode yang digunakan dalam deteksi ekspresi gen adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metode PCR memiliki beberapa kelebihan yaitu tidak memerlukan waktu yang lama dalam proses dan spesifisitasnya, (Pesurnay, 2018; Achyar *et al.*, 2021), memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi dalam mengamplifikasi suatu fragmen, reaksi dapat menggunakan komponen dalam jumlah yang sedikit, (Yuwono, 2006; Anika *et al.*, 2019)

Salah satu yang menentukan keberhasilan PCR adalah desain primer yang baik sesuai dengan kriteria (Borah, 2011), suhu annealing (Ta) yang optimal karena berkaitan dengan spesifisitas dan sensitivitas produk PCR (Farma *et al.*, 2020). Pada penelitian sebelumnya telah banyak desain primer gen CAT pada tanaman padi, namun peneliti mendesain primer baru karena desain primer yang sudah ada belum tentu memiliki hasil yang sama, karena banyak faktor dalam kondisi percobaan yang berbeda seperti reagen, jenis thermocycler dan program PCR yang digunakan (Achyar *et al.*, 2021). Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh primer yang spesifik dan optimasi suhu annealing gen CAT pada tanaman padi.

## Bahan dan Metode

### Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November – Maret 2023. Bertempat di Laboratorium Biologi Dasar dan Laboratorium Genetika, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk pengujian In Silico adalah software Geneious Prime, tools Pick Primer dan BLAST pada situs NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Alat yang digunakan untuk uji In Vitro adalah thermal cycler, mikropipet, tip, tube PCR, vortex, spindown, eppendorf, ice box, nanodrop, autoklaf, mikropestel, sentrifuge, LAF (Laminar Air Flow), mesin elektroforesis, microwave, UV illuminator. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel akar padi, alkohol 70%, GENEzol™, ddH<sub>2</sub>O,

*ReverseTra Ace qPCR RT Master Mix With gDNA Remover (Toyobo)*, nitrogen cair, agarose 1,5%, TAE 1x, *Nuclease Free Water (NFW)*, Gotaq, DNA template, primer forward dan primer reverse, ladder 100 bp, loading dye, dan gel red.

### Desain Primer

Primer yang akan digunakan didesain dari sequen DNA template yang diperoleh dari NCBI dengan accession number D86611.1 *Oryza sativa* gen catalase. Dari sekuens tersebut dilanjutkan desain primer menggunakan software Geneious Prime dan tools Pick Primer pada NCBI dengan target amplicon 150-300 bp. Pasangan primer yang diperoleh dianalisis kriteria primer ideal mengikuti aturan primer sederhana meliputi panjang primer 18-22 bp, dengan kandungan GC 40%- 60%, suhu annealing (Ta) 55-58°C, *melting temperature* (Tm) 52-58°C (Borah, 2011). Primer yang sesuai kriteria dan spesifisitas yang paling baik akan dipilih dan dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia untuk pemesanan primer

### Isolasi RNA

Isolasi RNA dengan sampel akar padi berumur 3 hari sebanyak 40 mg, ditambahkan nitrogen cair dan digerus menggunakan micropestle hingga halus. Sampel yang telah digerus kemudian digunakan dalam isolasi RNA mengikuti protokol resmi dari GENEzol™ dengan sedikit modifikasi. Kemurnian dan konsentrasi RNA hasil isolasi dianalisis menggunakan Nanofotometer dengan absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Hasil isolasi RNA disimpan pada suhu -80°C atau dapat dilanjutkan ke tahap sintesis cDNA.

### Sintesis cDNA

Sebelumnya dilakukan perhitungan kebutuhan RNA dan NFW. Selanjutnya dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Vol RNA } (\mu\text{l}) = \frac{1000 \text{ ng}/\mu\text{l}}{\text{konsentrasi RNA}}$$

Sampel RNA disintesis menggunakan ReverseTra Ace qPCR RT Master Mix Dengan gDNA Remover (Toyobo) mengikuti protokol dua langkah (<https://www.toyobo-global.com/>) yaitu langkah pertama adalah DNase I dengan penambahan campuran master 4x DN (dengan penghapus gDNA) dan langkah transkripsi balik (Reverse Transcription) dengan menambahkan 5x RT Master Mix II.

### Optimasi Suhu Annealing (Ta)

Optimasi suhu annealing dilakukan secara in vitro gradient PCR. Komponen reaksi PCR yang akan diuji yaitu dengan total volume 10 µl per tabung PCR yang terdiri dari 5 µl GoTaq PCR master mix, 0,4 µl primer forward CAT 10 µM, 0,4 µl primer reverse CAT 10 µM, 0,5 µl DNA template dan 3,7 µl Nuclease Free Water (NFW). Selanjutnya program PCR diatur dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, tahap pengulangan siklus sebanyak 35 kali yang terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, tahap annealing dengan gradient pada suhu 50°C, 52.2°C, 54.4°C, 56.7°C, 58.7°C, dan 60°C, tahap elongasi pada 72°C selama 30 detik dan siklus terakhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi dari gradient PCR divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose 1.5% (Syamsurizal *et al*, 2021). Hasil elektroforesis diamati menggunakan UV Transilluminator. Hasilnya kemudian dianalisa berapa temperatur annealing optimum berdasarkan ketebalan (Achyar *et al*, 2021).

## Hasil dan Pembahasan

### Desain Primer

Dari hasil penjabaran berpasangan sekuens primer gen CAT *Oryza sativa* menggunakan tools pick primer, primer BLAST pada NCBI dan *geneious prime* diperoleh 6 kandidat primer (Tabel 1.). Analisis karakteristik primer menggunakan *software* bioinformatika geneious prime bertujuan untuk memastikan kandidat primer telah memenuhi kriteria ideal untuk proses amplifikasi pada mesin PCR secara in vitro (Kearse *et al*, 2012). Dalam pemilihan primer ada hal-hal yang harus diperhatikan yaitu panjang primer, *melting temperature* (TM), suhu annealing (Ta), *GC content*, *secondary structures* berupa harpin, self dimer dan cross dimer serta ukuran amplicon primer (Borah, 2011). Secara umum panjang primer yang optimal adalah 18-22 bp, spesifisitas dan suhu anil bergantung pada panjang primer, primer yang terlalu pendek dapat mengurangi spesifisitas primer sedangkan primer yang terlalu panjang menyebabkan reaksi PCR tidak berjalan efektif (Garg, 2008).

Tm adalah suhu ketika 50% DNA beruntai ganda akan membentuk DNA beruntai tunggal. Tm yang baik untuk primer berada di kisaran 52-58°C. Tm yang terlalu tinggi cenderung membentuk anil sekunder (Mubarak *et al.*, 2020). Suhu annealing merupakan kisaran suhu yang membuat pasangan primer menempel dengan komplemennya pada DNA target saat proses PCR. Suhu annealing yang umum digunakan adalah 50-60°C. Jika suhu annealing terlalu rendah, reaksi menjadi tidak spesifik, sedangkan jika suhu annealing terlalu tinggi dapat mengakibatkan kurangnya amplifikasi (Uslan & Pharmawati, 2015)

GC *content* merupakan karakteristik penting DNA dan memberikan informasi tentang kekuatan anil. Jumlah GC *content* yang ideal dalam primer adalah sekitar 45- 60% (Kamel A. Abd-Elsalam, 2016). Dalam mendesain sebuah primer, *secondary structures* berupa hairpin dan self dimer sebaiknya dihindari

Tabel 1. Kandidat Primer

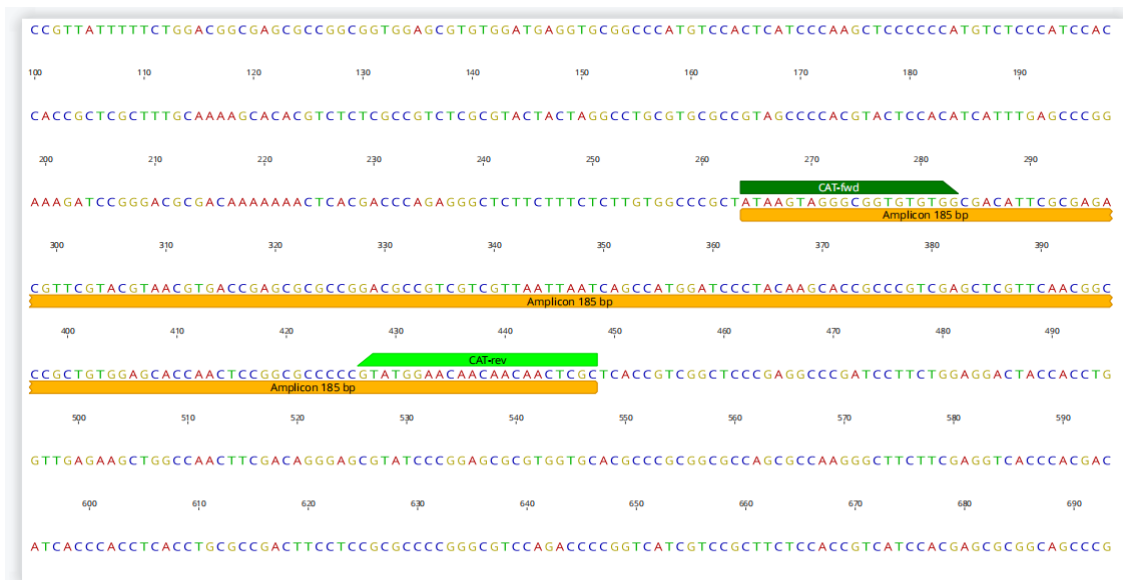
No	Sekuens (5' - 3')	Karakteristik Primer					Produk PCR (bp)
		Panjang Basa	Tm (°c)	% GC	Tm Hairpin	Tm Self Dimer	
1	<b>CAT F</b> ACGCCATGGATCCCTACAAG	20	59,5	55.5	-	18.4	210
	<b>CAT R</b> CTCCCCTGCATGAACGACA	20	60,3	55.0	-	-	
2.	<b>CAT F</b> CGGGAGCAATTCCACCTTCT	20	60,0	55.0	48.8	-	140
	<b>CAT R</b> CCCTGTCAAACGTGCAAGC	20	60,0	55.0	-	-	
3.	<b>CAT F</b> GCTTGCACAGTTTGACAGGG	20	60.0	55.0	-	-	170
	<b>CAT R</b> CGACTGTGGAGAACCGAACA	20	60.0	55.0	39.4	-	
4.	<b>CAT F</b> CGACTGTGGAGAACCGAACA	20	60.0	55.0	39.4	-	165
	<b>CAT R</b> TTGTAGGGATCCATGGCGTG	20	59.8	55.0	-	15.2	
5.	<b>CAT F</b> ATAAGTAGGGCGGTGTGTGG	20	59.5	55.0	-	-	185
	<b>CAT R</b> GCGAGTTGTTGTTGCCATAC	22	58.4	45.5	-	-	
6.	<b>CAT F</b> CACGCCATGGATCCCTACAA	20	59.8	55.0	-	18.4	195
	<b>CAT R</b> GACACGTTCAGGGATACGCT	20	59.8	55.0	41.2	-	

Dari tabel 1 terlihat bahwa pasangan primer yang paling ideal terdapat pada pasangan primer nomor 5 (5'-ATAAGTAGGGCGGTGTGTGG-3' dan 5'-GCGAGTTGTTGTTGCCATAC-3'). Pasangan primer nomor 1 belum sesuai dengan kriteria primer ideal karena Tm self dimer primer forward cukup tinggi, pasangan primer nomor 2 terdapat *secondary structure* berupa hairpin yang tinggi dan ukuran ampikon belum memenuhi target, karena target ampikon berkisar 150-250 bp. Ukuran ampikon yang terlalu pendek dapat mempengaruhi efisiensi amplifikasi PCR. Pasangan primer nomor 3, 4, dan 6 disalah satu pasangan primer juga terdapat hairpin dan Tm self dimer, sehingga primer yang dipilih adalah pasangan primer nomor 5 dengan informasi karkteristik primer sebagai berikut:

Tabel 2. Informasi karakteristik hasil desain primer

Karakteristik Primer	DNA Fold	Ukuran Amplikon
<b>CAT F</b> <b>Sequence (5' &gt; 3')</b> ATAAGTAGGGCGGTGTGTGG <b>Type:</b> Primer bind <b>Length:</b> 20 <b>%GC:</b> 55.0 <b>Hairpin Tm:</b> none <b>Self dimer Tm:</b> none <b>Tm:</b> 59.5		185 bp
<b>CAT R</b> <b>Sequence (5' &gt; 3')</b> GCGAGTTGTTGTTGTTCCATAC <b>Type:</b> Primer bind <b>Length:</b> 22 <b>%GC:</b> 45.0 <b>Hairpin Tm:</b> none <b>Self dimer Tm:</b> none <b>Tm :</b> 58.4		

Pasangan sekuens primer (Tabel 2.) dapat mengamplifikasi panjang produk PCR sebesar 185 bp, dengan menunjukkan primer forward memiliki panjang basa 20 bp dan primer reverse memiliki panjang basa 22 bp. %GC dari pasangan primer ini masing-masing adalah 55.0 dan 45.0. Tm primer forward 59.5 sedangkan Tm primer reverse 58.4 dengan selisih Tm antara primer forward dan reverse adalah 1,1. Selisih Tm antara primer forward dan reverse yang baik adalah tidak lebih dari 5°, jika selisih lebih dari 5° dapat menyebabkan penurunan efisiensi proses amplifikasi (Purwakasih dan Achyar, 2021). Masing-masing primer tidak memiliki *secondary structures* berupa hairpin maupun self dimer. Berdasarkan kriteria primer ideal, pasangan primer ini telah memenuhi persyaratan kriteria primer ideal yang baik, hal ini juga didukung dengan gambaran DNA Fold yang menunjukkan tidak adanya ikatan antara basa nukleotida. Setelah itu dilakukan uji spesifitas primer menggunakan primer BLAST.



Gambar 1. PCR In silico pasangan primer

## Spesifisitas Primer

Salah satu properti primer yang penting adalah spesifisitas target. Uji spesifisitas dapat dilakukan menggunakan primer BLAST yang bertujuan untuk mengurangi kesulitan dalam merancang primer spesifik target. Primer BLAST memungkinkan pengguna untuk merancang spesifik target baru dalam satu langkah serta untuk memeriksa spesifisitas primer yang sudah ada sebelumnya (Ye *et al.*, 2012). Berdasarkan hasil pengujian melalui primer BLAST, primer yang dipilih berhasil mengamplifikasi gen CAT secara spesifik pada tanaman padi (*Oryza sativa*).

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATAAGTAGGGCGGTGTGTGG	Plus	20	264	283	59.46	55.00	2.00	0.00
Reverse primer	GCGAGTTGTTGTTCCATAC	Minus	22	448	427	58.45	45.45	2.00	1.00
Product length	185								

Products on intended targets

>XM\_015774263.2 PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group catalase-1 (LOC4331509), mRNA

product length = 185

Forward primer 1 ATAAGTAGGGCGGTGTGTGG 20  
Template 264 ..... 283

Reverse primer 1 GCGAGTTGTTGTTCCATAC 22  
Template 448 ..... 427

Gambar 2. Uji spesifitas primer BLAST

## Optimasi Suhu Annealing

Suhu annealing merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan amplifikasi PCR. Optimasi suhu annealing sangat penting dilakukan agar diperoleh suhu yang optimal bagi primer untuk menempel pada DNA template. Untuk mendapatkan suhu annealing yang optimum maka dilakukanlah optimasi menggunakan gradien suhu PCR. Cara kerja gradien suhu PCR yaitu mencari suhu yang spesifik dan optimum pada kisaran suhu tertentu yang memungkinkan primer dapat mengamplifikasi DNA target. Suhu yang umum digunakan pada saat annealing yaitu 50–60°C (Aulia *et al.*, 2021)



Gambar 3. Hasil elektroforesis Gradient PCR. Ladder 100 bp, Suhu Annealing (A) 50 °C, (B) 52,2 °C, (C) 54,4 °C, (D) 56,7 °C, (E) 58,7 °C, (F) 60 °C.

Gambar 3 menunjukkan hasil optimasi suhu annealing gen CAT pada *Oryza sativa* yang divisualisasikan melalui elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5 %. Dari setiap variasi suhu muncul pita DNA dengan ketebalan yang berbeda. Terlihat bahwa pita DNA paling tebal dan terang terdapat pada suhu 60°C. Hal ini menandakan bahwa suhu optimal primer berada pada suhu 60°C. Pada gambar juga terlihat bahwa setiap produk PCR terdapat primer dimer (pita DNA tidak spesifik yang muncul dibawah 100 bp). Menurut Mubarak et al, (2020) terbentuknya primer dimer disebabkan oleh konsentrasi primer yang terlalu tinggi atau konsentrasi primer tidak optimal.

## Kesimpulan

Pada penelitian ini diperoleh sepasang kandidat primer yang telah didesain sesuai dengan kriteria primer ideal menggunakan *tools pick primer, primer blast* dan *Geneious Primer*. Desain primer yang didesain secara *in silico* menghasilkan primer forward 5'-ATAAGTAGGGCGGTGTGTGG-3' dengan panjang primer 20 bp dan primer reverse 5'-GCGAGTTGTTGTTGCCATAC-3' dengan panjang primer 22 bp. Pasangan primer ini menghasilkan amplicon 185 bp pada gen CAT *Oryza sativa*. Suhu annealing optimum untuk pasangan primer ini adalah 60°C.

## Daftar Pustaka

- Achyar, A., Putri, A. I., Putri, D. H., & Ahda, Y. (2021). Primer design, *in silico* PCR and optimum annealing temperature for Escherichia coli detection in refillable drinking water samples. *Tropical Genetics*, 1(2), 52-60.
- Anika, M., Putri, D. H., & Wahyuni. (2019). Primer Design For Identification Of Beta-Carotene Encoding Genes In Cassava. *Jurnal Bio Sains*, 4(1).
- Aulia, S. L., Suwignyo, R. A., & Hasmeda, M. (2021). Optimasi Suhu Annealing untuk Amplifikasi Dna Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 18(1).
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 65, Issue 5).
- Borah, P. (2011). Primer designing for PCR. *Science Vision*, 1(3).
- Farma, S. A., Handayani, D., Putri, D. H., Argantos, & Syahrastani. (2020). *Optimization of Annealing Temperature of HIF-1 A and 18s rRNA in Blood of Swimming Athletes Using RT-PCR*.
- Garg, N. (2008). PCR Primer Design: DREB Genes. *Journal of Computer Science & Systems Biology*, 01(01).
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 48, Issue 12).
- Jiang, M., & Zhang, J. (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of experimental botany*, 53(379), 2401-2410.
- Kamel A. Abd-Elsalam. (2016). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2(5).
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12).
- Mubarak, S. M. H., Al-Koofee, D. A. F., Radhi, O. A., Ismael, J. M., & Al-Zubaidi, Z. F. (2020). An optimization and common troubleshooting solving in polymerase chain reaction technique. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(2).
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- Oktaviani, F., Novita Sari, I., Handoyo, T., Agus Siswoyo, T., Ubaidillah, M., Studi Magister Bioteknologi, P., Jember Jl Kalimantan, U., Tegal Boto, K., Studi Agroteknologi, P., & Unggulan Bioteknologi Tanaman Industri, P. (2021). Pengaruh Cekaman Kekeringan terhadap Ekspresi Gen Ketahanan Oscata dan OsAPX1 pada Padi Toleran Kekeringan. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 8(2).
- Pesurnay, Y. (2018). Deteksi Keberadaan Bakteri Escherichia Coli O157:H7 pada Air Galon Penderita Diare dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *Bimafika*, 9, 23-26.
- Purwakasih, D. B. (2021). Primer Design and *in Silico* PCR for Detection Shigella Sp. on Refilled Water Samples. *Serambi Biologi*, 6(1).
- Ścibior, D., & Czczot, H. (2006). Katalaza-budowa, właściwości, funkcje. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 60.
- Sharma, I., & Ahmad, P. (2014). Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants. In *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling*.
- Shin, D. H., Choi, Y. S., & Cho, Y. H. (2008). Unusual properties of catalase A (KatA) of Pseudomonas aeruginosa PA14 are associated with its biofilm peroxide resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(8).

- Syamsurizal, Ardi, M. D., Fevria, R., Atifah, Y., Badriyya, E., Achyar, A., & Robiansyah, I. (2021). Design of primer Ipomoea batatas chloroplast gene matK. *Tropical Genetics*, 2(1), 12–16
- Uslan, U., & Pharmawati, M. (2015). Optimasi Konsentrasi DNA dan MgCl<sub>2</sub> pada Reaksi Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA untuk Analisis Keragaman Genetik Tanaman Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) (Optimization of DNA and MgCl<sub>2</sub> Concentrations in Polymerase Chain Reacti. *JURNAL BIOS LOGOS*, 5(1).
- Vighi, I. L., Benitez, L. C., do Amaral, M. N., Auler, P. A., Moraes, G. P., Rodrigues, G. S., Da Maia, L. C., Pinto, L. S., & Braga, E. J. B. (2016). Changes in gene expression and catalase activity in *Oryza sativa* L. Under abiotic stress. *Genetics and Molecular Research*, 15(4).
- Violita, & Hamim. (2010). Sistem Pertahanan Tanaman Kedelai Yang Mendapat Perlakuan Cekaman Kekeringan. *Eksakta*, 2(11).
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer BLAST- A tool to design targer-specific primers for PCR. *BMC Bioinformatics*, 13(134), 13:134.
- You, J., & Chan, Z. (2015). Ros regulation during abiotic stress responses in crop plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 6, Issue DEC).