

Specific Primary Design and Optimization of Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) Gene Amplification in Rice (*Oryza sativa* L.)

Desain Primer Spesifik dan Optimasi Amplifikasi Gen *Monodehydroascorbate reductase* (MDHAR) pada Padi (*Oryza sativa* L.)

Jumatul Hafsah¹, Afifatul Achyar¹, Zulyusri¹, Yusni Atifah¹, Linda Advinda¹, Violita^{1*}

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

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

Abstract

Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) is an enzyme responsible for growth and response to biotic and abiotic stress. MDHAR in rice shows a higher sensitivity to stress compared to other plants. This study aims to obtain specific primers for the MDHAR gene in rice to be used in PCR amplification so that it can amplify the MDHAR gene. Primers are designed using the *Pickprimer* and *Geneious Primer* tools. Optimization of annealing temperature was carried out using the gradient PCR method and then an *in vitro* primary specification test was carried out using the *Touchdown* PCR method. The results of the primary design obtained one candidate primer that met the ideal primer requirements, namely a pair of primers (5'-AAAAACACTGCATGGGTCGTC-3' and 5'-CGCCTACCGTTTCCCAAGTT-3') with an amplicon length of 160 bp. The visualization results of PCR products using 1.5% agarose showed that 6 samples were able to amplify the MDHAR gene at 160 bp in size. However, in each lane there is a non-specific DNA band (Primer dimer). *In vitro* primer specification testing with *Touchdown* succeeded in increasing product formation specifications and was able to reduce non-specific DNA bands (Primer dimers).

Key words *DNA primer, monodehydroascorbate reductase, Polymerase Chain Reaction*

Abstrak

Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) merupakan enzim yang bertanggung jawab atas pertumbuhan serta respon cekaman biotik dan abiotik. MDHAR pada padi menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi terhadap cekaman dibandingkan dengan tanaman lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh primer spesifik gen MDHAR pada tanaman padi yang akan digunakan dalam amplifikasi PCR sehingga mampu mengamplifikasi gen MDHAR. Primer didesain menggunakan tools *Pickprimer* dan *Geneious Primer*. Optimasi suhu annealing dilakukan dengan metode gradient PCR dan kemudian dilakukan uji spesifikasi primer secara *in vitro* dengan metode *Touchdown* PCR. Hasil desain primer diperoleh satu kandidat primer yang memenuhi syarat primer ideal yaitu pasangan primer (5'-AAAAACACTGCATGGGTCGTC-3' dan 5'-CGCCTACCGTTTCCCAAGTT-3') dengan panjang amplicon 160 bp. Hasil visualisasi produk PCR menggunakan agarose 1.5 % menunjukkan bahwa 6 sampel mampu mengamplifikasi gen MDHAR pada ukuran 160 bp. Namun pada setiap lane terdapat pita DNA tidak spesifik (Primer dimer). Pengujian spesifikasi primer secara *in vitro* dengan *Touchdown* berhasil meningkatkan spesifikasi pembentukan produk serta mampu mengurangi pita DNA non spesifik (Primer dimer).

Kata kunci *DNA primer, monodehydroascorbate reductase, Polymerase Chain Reaction*

Pendahuluan

Di lingkungan alami, tanaman terpapar berbagai macam cekaman abiotik seperti kekeringan yang terjadi secara berfluktuasi. Kekeringan akan menyebabkan tanaman mengalami perubahan anatomi, fisiologi serta molekuler. Tanaman akan mengalami penurunan fotosintesis akibat terjadinya penurunan laju pertumbuhan dan produksi pada tumbuhan (Violita, 2007; Hamim dkk., 2017). Salah satu tanaman yang sangat rentan terhadap cekaman kekeringan adalah padi. Tanaman padi mempunyai habitat asli semi akuatik sehingga pada kondisi kering akan mengalami pertumbuhan yang tidak sempurna (Ekowati, 2018)

Cekaman kekeringan pada jaringan tanaman dapat menyebabkan peningkatan radikal bebas berupa Reactive Oxygen Spesies (ROS). Radikal bebas memiliki sifat reaktif pada jaringan tumbuhan, sehingga dapat merusak sel tumbuhan (Abdillah dkk., 2015). Oleh karena itu, salah satu strategi untuk menciptakan tanaman yang tahan cekaman adalah dengan meningkatkan kapasitas antioksidan tanaman yang rentan dengan memproduksi enzim antioksidan utama secara berlebihan (Sudan dkk., 2015). Dalam percobaan yang dilakukan Barba Espin dkk. (2010), menunjukkan bahwa ROS yang dihasilkan selama perkecambahan dapat mengatur ekspresi MDHAR.

Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) adalah enzim pengatur jalur *ascorbate-glutathione* yang memungkinkan tanaman mengatasi peningkatan beban ROS dengan mengkatalisis pengurangan radikal *monodehydroascorbate* (MDHA) dan pembentukan kumpulan askorbat tereduksi. Asam askorbat adalah salah satu antioksidan yang larut dalam air di semua organisme hidup. MDHAR sangat penting untuk mempertahankan tingkat askorbat yang optimal dalam sel dengan secara langsung mereduksi radikal MDHA menjadi askorbat dengan mengorbankan oksidasi NAD(P)H (Sudan dkk., 2015).

Distributor MDHAR pada tanaman terestrial beragam dan enzim ini dapat dibagi menjadi tiga kelas. Semua tanaman memiliki enzim kelas II dan III, yaitu isoform yang terikat pada membran peroksisom dan sitosol/peroksisom, sedangkan beberapa tanaman tidak memiliki enzim kloroplas/mitokondria kelas I. Enzim kelas III termasuk subkelas yang terdiri dari enzim non-sequencing (Tanaka dkk., 2021).

Pada tumbuhan, enzim MDHAR bertanggung jawab atas pertumbuhan, perkembangan serta respon cekaman biotik dan abiotik. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa MDHAR berperan dalam meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman abiotik; MDHAR pada kloroplas (Li Feng dkk., 2010), MDHAR pada *Arabidopsis thaliana* dan *Lycopersicon esculentum* (Eltayeb dkk., 2007), MDHAR pada padi menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi terhadap cekaman dibandingkan dengan tanaman lain (Kim jin-ju dkk., 2017).

Salah satu teknik biologi molekuler yang sering digunakan dalam riset penelitian biomolekuler adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik ini dibagi menjadi dua yaitu PCR konvensional dan PCR *real time*. PCR konvensional telah banyak digunakan terutama dalam penelitian, salah satunya adalah deteksi level ekspresi gen (mRNA) dengan menggunakan metode semi kuantitatif *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Untuk sampel RNA, proses PCR dimulai dengan tahap transkripsi balik (*Reverse Transcriptase*) yang mengubah molekul mRNA menjadi molekul cDNA (*complementary DNA*), selanjutnya molekul cDNA digunakan sebagai cetakan dalam proses amplifikasi. Hasil amplifikasi DNA dipisahkan dengan elektroforesis agarosa menggunakan pewarna fluoresen sebagai penanda ampikon DNA, dan intensitas pita DNA diukur dengan perangkat lunak densitometri digital seperti Image J (Hewajuli, 2014).

Amplifikasi DNA pada PCR dapat dicapai melalui penggunaan primer oligonukleotida yang disebut ampimers (Zuhriana, 2010). Salah satu yang menentukan keberhasilan dalam metode berbasis PCR adalah desain primer spesifik untuk gen target (Achyar dkk., 2021). Desain primer dilakukan untuk memperoleh primer yang dapat digunakan dalam amplifikasi DNA dengan Metode PCR. Oleh karena sebagai tahap awal telah dilakukan desain primer untuk memperoleh urutan basa nukleotida pengkode enzim MDHAR pada padi. Selain itu aspek penting yang juga menentukan keberhasilan metode PCR adalah menentukan suhu annealing (T_a) yang merupakan variabel penting sebagai kinerja primer (Bustin & Huggett, 2017).

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh primer spesifik gen MDHAR pada tanaman padi yang akan digunakan dalam amplifikasi PCR sehingga mampu mengamplifikasi gen MDHAR.

Bahan dan Metode

Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2022 – Maret 2023 di Laboratorium Penelitian Terpadu Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Penelitian ini dilakukan berdasarkan biologi molekuler dan pengujian secara komputasi (bioinformatika) dan optimasi suhu annealing melalui pengujian di laboratorium.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebuah software yaitu Geneious Prime dan *Pickprimer* untuk mendesain primer secara *in silico*. Data sekuen gen *MDHAR Oryza sativa* yang digunakan diperoleh dari database NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>, autoklaf, sentrifugator, vortex, thermal cycle, elektroforesis, spin down, mikropipet, nanodrop, mikropastle tip putih, tip kuning dan tip biru.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel akar padi, GENEzol™, ddH₂O, *ReverseTra Ace qPCR RT Master Mix With gDNA Remover (Toyobo)*, nitrogen cair, agarose, TAE 1x, *Nuclease Free Water (NFW)*, Gotaq.

Metode Desain Primer

Pasangan primer yang akan digunakan didesain berdasarkan sekuens dengan accession no. XM_015771553 menggunakan program *Basic Local Alingment Search Tool (BLAST)* pada NCBI. Dari sekuens tersebut dilakukan desain primer menggunakan *software Geneious Prime* dan *Pickprimer*. Kandidat pasangan primer yang diperoleh dianalisis kriteria primer ideal mengikuti aturan primer sederhana meliputi: Panjang primer 18–24 bp, dengan kandungan GC 50%–60%, sehingga memiliki *Melting temperature (T_m)* 52°–58°C. Primer tidak boleh membentuk dimer (*selfdimer* dan *cross dimer*) atau struktur hairpin, dan *false priming* (Henegariu dkk., 1997; Kumar & Chordia, 2015). Adapun primer yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

Urutan nukleotida yang memiliki kriteria dan spesifikasi yang paling baik akan dipilih dan dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia untuk pemesanan primer. Selanjutnya melakukan validasi di laboratorium dengan gradient PCR untuk menemukan suhu annealing yang tepat.

Metode Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan sesuai dengan protokol resmi GENEzol™. Akar padi umur 3 hari diambil dan ditimbang sebanyak 40 mg, ditambahkan nitrogen cair dan dihaluskan dengan micropestle hingga halus. Kemudian sampel digunakan untuk isolasi RNA menurut protokol resmi GENEzol™ dengan sedikit modifikasi. RNA yang diisolasi kemudian dilakukan pengecekan konsentrasi dan kemurnian RNA menggunakan spektrofotometer NanoDrop. Hasil isolasi RNA disimpan pada suhu -80°C atau dapat dilanjutkan dengan tahap sintesis cDNA.

Metode Sintesis cDNA

Sebelumnya dilakukan perhitungan kebutuhan RNA dan NFW. Konsentrasi RNA terendah ditentukan berdasarkan hasil pengukuran terendah (minimal 50 ng) (Nafisa dkk., 2022). 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.

Metode Optimasi Suhu Annaeling

Optimasi primer dilakukan melalui gradien PCR dengan menggunakan RT-PCR. cDNA hasil sintesis kemudian diamplifikasi menggunakan mesin PCR menggunakan GoTaq. Mesin PCR diset pada suhu predenaturasi 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus denaturasi 95°C selama 30 detik, dilakukan annealing dengan gradien 50°C, 52,2°C, 54, 4 °C, 56,7 °C, 58,7 °C dan 60 °C, ekstensi pada 72 °C selama 30 detik dan siklus terakhir pada suhu 72°C selama 5 menit.

Hasil amplifikasi gradien PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1,5% (Syamsurizal dkk., 2021). Hasil elektroforesis kemudian dipantau dengan GelDoc.

Metode Spesifikasi Primer Secara In Vitro dengan *Touchdown* PCR

Touchdown PCR digunakan sebagai alternatif untuk mendapatkan ukuran ampikon yang spesifik dan mengurangi terbetknya primer dimer pada produk PCR. Prinsip kerja *Touchdown* PCR berdasarkan pada suhu annealing yang diturunkan setiap siklus. Program *Touchdown* PCR diset dalam mesin qPCR dengan suhu annealing awal 64°C kemudian suhu diturunkan menjadi 60°C.

Hasil dan Pembahasan

Desain Primer

Hasil primer yang didesain pada sekuen gen MDHAR *Oryza sativa* L. dengan accession no. XM_015771553.2 menggunakan tools *Pickprimer* pada NCBI dan *Geneious Prime* diperoleh 5 kandidat primer *forward* dan *reverse* (Tabel 1).

Table 1. Kandidat Primer

No	Sekuen (5'--> 3')	Panjang Basa (nt)	Karakteristik				Produk PCR (bp)
			Tm (°C)	GC%	Tm Hairpin	Tm Self Dimer	
2	<i>MDHAR -f</i> GAGGAGAGGAGGAAGGCTGA	20	60.0	60.0	-	-	138
	<i>MDHAR -r</i> CAAGGCTGAAACTGTTGGGC	20	60.0	55.0	-	0,6	
6	<i>MDHAR -f</i> CTATTTGCTCCCACAAGACGC	21	59.6	52.4	-	-	195
	<i>MDHAR -r</i> CATTGCGCAGATAGCAGACG	20	59.8	55.0	46.5	11.3	
7	<i>MDHAR -f</i> AAAAACACTGCATGGGTCGTC	21	59.7	47.6	-	-	160
	<i>MDHAR -r</i> CGCCTACCGTTCCCAAGTT	20	60.6	55.0	-	-	
10	<i>MDHAR -f</i> GGCTATTTGCTCCCACAAGAC	21	59.3	52.4	42.8	-	91
	<i>MDHAR -r</i> CTCCACATTGCGCAGATAGC	20	59.4	55.0	40.9	11.3	
11	<i>MDHAR -f</i> GGCTATTTGCTCCCACAAGAC	20	60.0	55.0	-	9.7	150
	<i>MDHAR -r</i> CTCCACATTGCGCAGATAGC	20	60.0	55.0	34.6	7.0	

Berdasarkan 5 kandidat primer yang telah dianalisis, diperoleh satu kandidat primer yang memenuhi syarat primer ideal yaitu pasangan primer nomor 7 (5'-AAAAACTGTCATGGGTCGTC-3' dan 5'-CGCCTACCGTTTCCCAAGTT-3'). Informasi mengenai karakteristik hasil desain primer yang dipilih dapat dilihat pada Tabel 2.

Table 2. Karakteristik Hasil Desain Primer

Karakteristik Primer	DNA Fold	Amplikon
MDHAR-<i>f</i> Sequence (5'-3') : AAAAACACTGTCATGGGTCGTC Length : 21 %GC : 47.6 Hairpin Tm : None Self Dimer Tm : None Tm : 59.7		
MDHAR-<i>r</i> Sequence (5'-3') : CGCCTACCGTTTCCCAAGTT Length : 20 %GC : 55.0 Hairpin Tm : None Self Dimer Tm : None Tm : 60.6		160

Prednyaniti dkk. (2013) menyatakan bahwa primer yang baik merupakan primer yang memenuhi kriteria parameter primer yaitu *melting temperatur* (T_m), *persentase* jumlah G dan C (GC%), 3'dimer, stabilitas, *repeats* dan *hairpin*. Panjang primer sebaiknya antara 18 sampai 30 oligonukleotida untuk dapat mengikat templat pada suhu annealing dan mendapatkan sekuen yang spesifik (Borah, 2011). Primer yang terlalu pendek dapat mengurangi spesifisitas primer sehingga mudah menempel pada templat dengan suhu annealing yang tidak diinginkan. Sedangkan jika primer terlalu panjang tidak mempengaruhi spesifitas secara bermakna (Handoyo & Rudiretna, 2001).

Kandungan G/C dan T/A yang terlalu tinggi akan mempengaruhi nilai *melting temperature* (T_m) ((Rodríguez-Lázaro dkk., 2013). Perentase G/C harus sedekat mungkin dengan 50%. Oligonukleotida dengan kandungan G/C yang tinggi akan mempersulit prose denaturasi selama PCR sehingga akan menyebabkan menurunnya efisiensi amplifikasi (Lim dkk., 2011). Secara umum T_m untuk primer serupa (dalam rentang 2 sampai 4°C) untuk menghasilkan produk PCR yang baik (Sulistyaningsih, 2007). Primer dengan T_m yang terlalu tinggi akan menghasilkan produk PCR yang rendah. Sedangkan T_m yang terlalu rendah memiliki kecenderungan menempel ditempat lain dan menghasilkan produk yang tidak spesifik. Berdasarkan kandidat primer yang dipilih, T_m primer yang didesain telah memenuhi kriteria yaitu memiliki perbedaan T_m *forward* dan *reverse* berkisaran 1°C.

Ukuran amplikon primer juga akan mempengaruhi hasil amplifikasi primer. Kisaran amplikon yang relatif pendek atau dibawah 100 bp akan mempersulit dalam membedakan produk PCR target yang spesifik dengan dimer primer saat elektroforesisi gel (Wang dkk., 2012). Pada penelitian ini ukuran amplikon PCR yang diambil memiliki kisaran 150-250 bp.

Spesifikasi primer

Kandidat primer yang dipilih kemudian dilakukan uji spesifikasi menggunakan tools PrimerBLAST (Gambar 1). Berdasarkan pengujian tersebut primer yang dipilih mengamplifikasi gen MDHAR secara spesifik pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.) pasangan primer juga diketahui tidak mengamplifikasi DNA genomik, sehingga dapat mencegah terjadinya amplifikasi DNA genomik yang akan mempengaruhi produk PCR.

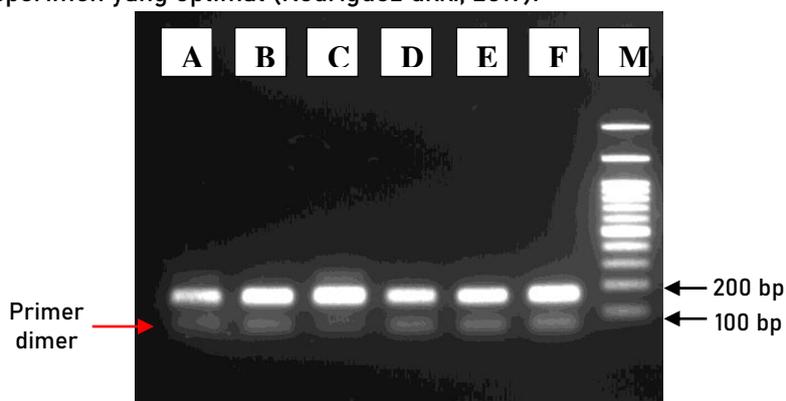
Detailed primer reports						
Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAAAACACTGCATGGGTGTC	21	59.66	47.62	4.00	2.00
Reverse primer	CGCTACCGTTTCCCAAGTT	20	60.60	55.00	3.00	3.00
Products on target templates						
>XM_015771553.2 PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group monodehydroascorbate reductase 1, peroxisomal-like (LOC4330468), mRNA						
product length = 160						
Forward primer	1	AAAAACACTGCATGGGTGTC	21			
Template	917	937			
Reverse primer	1	CGCTACCGTTTCCCAAGTT	20			
Template	1076	1057			

Gambar 1. Spesifikasi Primer Hasil Desain

Primer yang dirancang ini dapat dengan tepat memotong daerah target sesuai dengan daerah yang dirancang secara *silico* (dapat membatasi daerah amplifikasi pada proses PCR). Hal ini menunjukkan bahwa primer yang dirancang cukup baik untuk digunakan dalam proses PCR dan dapat menghasilkan produk berdasarkan region yang diinginkan.

Optimasi Suhu Annaeling Primer

Optimasi suhu annaeling dilakukan untuk memperoleh suhu annaeling yang optimal untuk penempelan primer MDHAR. Optimasi primer dilakukan menggunakan PCR dengan pengaturan suhu annaeling yang digunakan dihitung berdasarkan $(T_m - 5)^\circ\text{C}$ sampai dengan $(T_m + 5)^\circ\text{C}$ untuk memperoleh kondisi annaeling eksperimen yang optimal (Rodríguez dkk., 2019).



Gambar 2. Hasil Elektroforesis Gradient PCR. Ladder 100 bp (M), suhu Annaeling (A) 50°C, (B) 52.2°C, (C) 54.4°C, (E) 56.7°C, (E) 58.7°C, (F) 60°C.

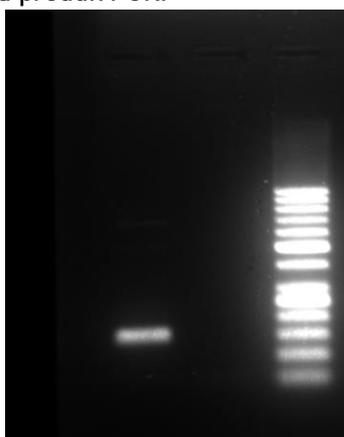
Berdasarkan hasil visualisasi produk PCR menggunakan agarose 1.5 % menunjukkan bahwa 6 sampel dengan optimasi suhu annaeling 50°C; 52,2°C; 54,4°C; 56,7°C; 58,7°C; 60°C mampu mengamplifikasi gen MDHAR dengan ukuran 160 bp, akan tetapi pada setiap lane terdapat pita DNA tidak spesifik yang disebut dengan primer dimer. Menurut Gonzales dkk. (2015) adanya primer dimer pada produk PCR disebabkan oleh kurang/tidak ada DNA yang dicampurkan atau tingginya konsentrasi primer yang digunakan. Dari ke 6 sampel terlihat pita DNA yang terbentuk mengumpul (tidak menyebar). Ketebalan pita DNA ditentukan dari

kemurnian atau proses ekstraksi yang kurang tepat pada sampel yang diamati, sehingga menyebabkan sampel tidak memiliki kualitas yang bagus (Aulia dkk., 2021).

Hasil visualisasi produk PCR memperlihatkan semua pita DNA memiliki ketebalan pita DNA bagus dan terang. Meskipun terlihat pada setiap suhu menghasilkan pita DNA yang tebal dan terang, suhu *annealing* yang pilih adalah suhu tertinggi yaitu 60°C. Hal ini dikarenakan suhu *annealing* yang tinggi akan mengurangi resiko terbentuknya pita DNA dari non spesifik amplicon (Patel dkk, 2015).

Spesifikasi Primer Secara *In Vitro* dengan *Touchdown* PCR

Touchdown PCR merupakan teknik yang digunakan untuk membatasi amplifikasi non-spesifik dengan memulai suhu *annealing* yang lebih tinggi dan diturunkan pada setiap siklus untuk mendapatkan ukuran amplicon yang spesifik. Penggunaan *Touchdown* PCR mampu mengatasi masalah non spesifik dan adanya pembentukan dimer primer pada produk PCR.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis Uji Spesifikasi Dengan Metode *Touchdown* PCR, Ladder 50 bp.

Menurut Green (2018) *Touchdown* PCR merupakan metode untuk mengurangi priming yang tidak sesuai target dan karenanya meningkatkan spesifisitas PCR. Dalam PCR *Touchdown*, suhu yang dipilih untuk langkah *annealing* awalnya diatur 5°C-10°C lebih tinggi dari T_m yang dihitung dari primer. *Annealing* dalam kondisi ketat tinggi mendukung pembentukan hibrida primer-template yang sempurna. Pada siklus berikutnya, suhu *annealing* secara bertahap diturunkan sedikit sehingga pada akhir PCR, suhu anil adalah 2°C-5°C di bawah T_m yang dihitung dari primer. Pada saat itu, sekuens target akan mengalami beberapa siklus amplifikasi geometrik dan karenanya menjadi produk dominan dari PCR.

Berdasarkan hasil visualisasi produk PCR, tidak terlihat primer dimer yang sebelumnya terdapat dibawah pita DNA spesifik dan pita produk teramplifikasi pada ukuran 160 bp. Hal ini membuktikan penggunaan metode *Touchdown* PCR berhasil meningkatkan spesifikasi pembentukan produk serta mampu mengurangi pita DNA non spesifik (primer dimer).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, setelah melakukan desain primer menggunakan tools *Pick Primer* (NCBI) dan *Geneious Prime* diperoleh sepasang primer dengan ukuran amplicon 160 bp dan menghasilkan pita DNA tunggal yang tebal dan terang namun pada setiap lane terdapat pita DNA non-spesifik (primer dimer). *Touchdown* PCR digunakan untuk meningkatkan spesifikasi pembentukan produk serta mampu mengurangi pita DNA non spesifik (primer dimer).

Daftar Pustaka

Abdillah, D. 2015. Pengaruh Cekaman Kekeringan Terhadap Kandungan Fenolik dan Antioksidan Tanaman Sorgum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Pada Fase Awal Vegetatif. *Skripsi*, Universitas Jember.

- 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).
- 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), 44-54.
- Barba-Espin G, Diaz-Vivancos P, Clemente-Moreno MJ, Albacete A, Faize L, Faize M, Pérez-Alfocea F, Hernández JA. 2010. Interaction Between Hydrogen Peroxide and Plant Hormones During Germination and The Early Growth of Pea Seedlings. *Plant, Cell and Environment*, 33: 981-994.
- Borah, P. 2011. Primer Designing for PCR. *Sci. Vis.* Vol. 11 (3). pp: 134-136.
- Bustin, S., & Huggett, J. 2017. qPCR Primer Design Revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14(November), 19-28.
- Ekowati, N. Y., & Widiastuti, R. 2018. Uji Ketahanan Cekaman Kekeringan Menggunakan Polyethylene Glycol (PEG) 6000 Pada Padi Lokal dan Non Lokal Di Kabupaten Merauke. *In Prosiding SINTESIS (Seminar Nasional Sains, Teknologi dan Analisis)*.
- Eltayeb, A. E., Kawano, N., Badawi, G. H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., & Tanaka, K. 2007. Overexpression of Monodehydroascorbate Reductase in Transgenic Tobacco Confers Enhanced Tolerance to Ozone, Salt and Polyethylene Glycol Stresses. *Planta*, 225(5), 1255-1264.
- Green, M. R., & Sambrook, J. 2018. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(5), pdb-prot095133.
- Gonzalez-Martinez, A., Rodriguez-Sanchez, A., Rodelas, B., Abbas, B. A., Martinez-Toledo, M. V., Van Loosdrecht, M. & Gonzalez-Lopez, J. 2015. 454-Pyrosequencing Analysis of Bacterial Communities from Autotrophic Nitrogen Removal Bioreactors Utilizing Universal Primers: Effect of Annealing Temperature. *BioMed research international*, 2015.
- 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. dan Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction]. *Unitas*, 9(1): P. 17-29.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., Vogt, P. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 23(3), 504-511.
- Hewajuli, D. A., & Dharmayanti, N. L. P. I. 2014. Perkembangan Teknologi Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction dalam Mengidentifikasi Genom Avian Influenza dan Newcastle Diseases. *Wartazoa*, 24, 16-29.
- Kim, J. J., Kim, Y. S., Park, S. I., Mok, J. E., Kim, Y. H., Park, H. M., & Yoon, H. S. 2017. Cytosolic Monodehydroascorbate Reductase Gene Affects Stress Adaptation and Grain Yield Under Paddy Field Conditions in *Oryza sativa L. japonica*. *Molecular Breeding*, 37(10), 1-13.
- Kumar, A., & Chordia, N. 2015. In silico PCR Primer Designing and Validation. *Methods in Molecular Biology*, 1275, 143-151
- Li, F., Wu, Q. Y., Sun, Y. L., Wang, L. Y., Yang, X. H., & Meng, Q. W. 2010. Overexpression of Chloroplastic Monodehydroascorbate Reductase Enhanced Tolerance to Temperature and Methyl Viologen-Mediated Oxidative Stresses. *Physiologia Plantarum*, 139(4), 421-434.
- Lim, J., Shin, S. G., Lee, S., & Hwang, S. 2011. Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*, 5(1), 28-39.
- Nafisa, A. R., Sebastian, A., Wijayanti, P., Patigu, R. F., & Purwestri, Y. A. 2022. Optimasi Primer yang Menargetkan Gen OsAP2, OsERF3 dan OsEREBP2 Menggunakan qPCR. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*, 8(1), 8-19.
- Patel, S. V, Bosamia, T. C., Bhalani, H. N., Singh, P., & Kumar, A. 2015. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Agrobios Newsletter: A Monthly Magazine of Agricultural and Biological Sciences Publishing*, XIII, p. 148.

- 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). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(3), 279788.
- Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., & Hernández, M. 2013. Real-time PCR in Food Science: PCR Diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology*, 15(2), 39–44.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. 2019. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. *PCR Primer Design*, 1275(3), 31–56.
- Sudan, J., Negi, B., & Arora, S. 2015. Oxidative Stress Induced Expression of Monodehydroascorbate Reductase Gene in Eleusine Coracana. *Physiology and molecular biology of plants*, 21(4), 551–558.
- Sulistyaningsih, E. 2007. Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi. *Biomedis*. 1(1): P. 17-25.
- 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.
- Tanaka, M., Takahashi, R., Hamada, A., Terai, Y., Ogawa, T., Sawa, Y., & Maruta, T. 2021. Distribution and Functions of Monodehydroascorbate Reductases in Plants: Comprehensive Reverse Genetic Analysis of Arabidopsis Thaliana Enzymes. *Antioxidants*, 10(11), 1726.
- Violita. 2007. Komparasi Respon Fisiologis Tanaman Kedelai yang Mendapat Cekaman Kekeringan dan Perlakuan Herbisida Paraquat. Thesis. *Bogor*: Institut Pertanian Bogor.
- Wang, X., Spandidos, A., Wang, H., & Seed, B. 2012. PrimerBank: A PCR Primer Database for Quantitative Gene Expression Analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), 1144–1149.
- Zuhrian.