

Primary Design and Optimization of Dehydroascorbate reductase (DHAR) Gene Amplification in *Oryza sativa* L.

Desain dan Optimasi Primer Amplifikasi Gen *Dehydroascorbate reductase (DHAR)* pada *Oryza sativa* L.

Isna Aryunita Putri¹, Afifatul Achyar¹, Zulzusri¹, Yusni Atifah¹, Dwi Hilda Putri¹, Violita¹

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

² Department of Environmental Sciences, Faculty of Human and Environment, Sumatra University, West Sumatera, Indonesia

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

Abstract

Dehydroascorbate reductase (DHAR) is one of the antioxidant enzymes involved in ascorbate recycling which catalyzes the reduction of oxidized ascorbate. DHAR is responsible for regenerating AsA from its oxidized state and regulating the redox state of cellular AsA which ultimately influences cell response and tolerance to ROS. DHAR is important for plant growth because it plays a role in the recycling of AsA. Rice is a plant that is sensitive to drought stress, one of the defense mechanisms of plants in dealing with drought stress is to activate the DHAR gene. The method that can be used to amplify the *Dehydroascorbate reductase* (DHAR) gene is by qRT-PCR. This method requires specific primers for the target gene. However, for now, the primary design of the DHAR gene is unknown. This study aims to design suitable primers for the amplification of DHAR target genes using the qRT-PCR technique, and to determine the optimal annealing temperature. Primer design was carried out using the PrimerQuest program, then viewed and then analyzed using GeneiousPrime, after which it was checked for specificity with primerBLAST. The primary design results with the best criteria were Forward DHAR 5'-GTACCCAACCCCGTCTCTTG -3' and Reverse DHAR 5'- TGGTAGAGCTTTGGTGCCAG -3' primers with a product size of 228 bp with an optimal temperature for PCR of 60°C.

Key words *Primary design, Dehydroascorbate reductase, Padi, Annealing temperature, PCR*

Abstrak

Dehydroascorbate reductase (DHAR) merupakan salah satu enzim antioksidan yang terlibat dalam daur ulang askorbat yang mengkatalisis reduksi askorbat teroksidasi. *DHAR* bertanggung jawab untuk regenerasi AsA dari keadaan teroksidasi dan mengatur keadaan redoks AsA seluler yang pada akhirnya mempengaruhi respons dan toleransi sel terhadap ROS. DHAR penting untuk pertumbuhan tanaman karena berperan dalam daur ulang AsA. Padi merupakan tanaman yang sensitif terhadap cekaman kekeringan, salah satu mekanisme pertahanan tanaman dalam menghadapi cekaman kekeringan adalah mengaktifkan gen DHAR tersebut. Metode yang dapat digunakan untuk amplifikasi gen *Dehydroascorbate reductase* (DHAR) adalah dengan qRT-PCR. Metode ini memerlukan primer yang spesifik untuk gen target. Namun untuk saat ini belum diketahui perancangan primer (*primer design*) dari gen DHAR tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer yang sesuai untuk amplifikasi gen target DHAR dengan menggunakan teknik qRT-PCR, dan untuk menentukan suhu annealing yang optimal. Perancangan primer dilakukan dengan program *PrimerQuest*, lalu dilihat dan kemudian dianalisis dengan menggunakan *GeneiousPrime*, setelah itu dicek spesifisitasnya dengan *primerBLAST*. Diperoleh hasil desain primer dengan kriteria terbaik yaitu primer *Forward* DHAR 5'- GTACCCAACCCCGTCTCTTG -3' dan *Reverse* DHAR 5'- TGGTAGAGCTTTGGTGCCAG -3' dengan ukuran produk 228 bp dengan suhu optimal untuk PCR yaitu 60°C.

Kata kunci *Desain primer, Dehydroascorbate Reductase, Padi, suhu annealing, PCR*

Pendahuluan

Dehydroascorbate reductase (DHAR) adalah enzim yang terlibat dalam daur ulang askorbat yang mengkatalisis reduksi askorbat teroksidasi yang bergantung pada glutathione (GSH). Asam askorbat (AsA) adalah kofaktor yang terkenal dalam banyak reaksi enzimatik yang penting untuk mekanisme pertahanan melawan stres oksidatif. Namun, AsA terus dioksidasi oleh ROS yang dihasilkan oleh cekaman lingkungan seperti kekeringan, salinitas, sinar ultraviolet (UV), dan suhu ekstrem. Akibatnya, DHAR meregenerasi kumpulan askorbat tereduksi dan mendetoksifikasi ROS (Gallie, 2013). Asam askorbat (AsA) adalah antioksidan utama pada tanaman yang mendetoksifikasi ROS dan mempertahankan fungsi fotosintesis. DHAR bertanggung jawab untuk regenerasi AsA dari keadaan teroksidasi dan mengatur keadaan redoks AsA seluler yang pada akhirnya mempengaruhi respons dan toleransi sel terhadap ROS. DHAR penting untuk pertumbuhan tanaman karena berperan dalam daur ulang AsA (Gallie, 2013).

Kekeringan adalah suatu kondisi kadar air tanah berada pada kondisi yang minimum untuk pertumbuhan dan produksi tanaman. (Asmara, 2011). Kekurangan air akan menyebabkan penutupan stomata yang akan menurunkan konsentrasi CO₂ dan mengakibatkan ketidakseimbangan energi sehingga konsentrasi ROS meningkat (Hapsari 2018). Peningkatan ROS akan meningkatkan terjadinya proses oksidatif. (Sopandie 2014). Cekaman kekeringan dapat menyebabkan tanaman menghasilkan lebih banyak *Reactive oxygen spesies* (ROS), yang merupakan jenis radikal bebas. (Purwanto dan Agustono, 2010).

Tanaman padi sangat sensitif terhadap cekaman kekeringan (Purwanto dan Agustono, 2010). Air merupakan salah satu komponen lingkungan yang mempengaruhi perkembangan dan hasil tanaman padi. Kekurangan air mengakibatkan pertumbuhan tanaman padi tidak sempurna dan bahkan dapat menyebabkan tanaman padi mati karena dehidrasi (Sujinah dan Jamil, 2016).

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan metode pengujian berbasis biomolekuler berupa reaksi enzimatik untuk melipat gandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu secara *in vitro* (Dorak 2006). PCR merupakan reaksi yang menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu, dengan cara mensintesis molekul DNA yang baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut Muladno (2010). Komponen utama reaksi PCR terdiri dari: template DNA atau DNA cetakan; primer yang didesain; enzim DNA polimerase; dan nukleotida (dNTP atau deoxynucleoside triphosphate) (Handoyo & Ari, 2001).

Proses annealing merupakan proses yang sangat penting untuk mencari suhu optimum sehingga bisa diperoleh DNA hasil dalam jumlah yang maksimum pada daerah yang ditargetkan sehingga cukup memudahkan bagi analisis DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi suhu annealing untuk amplifikasi dna padi hasil persilangan varietas tahan terendam dengan metode polymerase chain reaction (Septi, *et al.*, 2021). Menurut Uslan & Pharmawati (2015), suhu annealing merupakan kisaran suhu yang membuat pasangan primer menempel dengan komplemenya pada DNA target saat proses PCR. Suhu annealing sangat menentukan keberhasilan amplifikasi. Hal ini disebabkan karena proses pemanjangan DNA dimulai dari primer.

Bahan dan Metode

Bahan

Penelitian ini dilakukan dengan sebuah software yaitu PrimerQuest untuk mendesain primer secara *in silico*. Data sekuen gen *DHAR Oryza sativa* yang digunakan diperoleh dari database NCBI pada URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> dengan kode genbank AY074786.1. Bahan yang digunakan dalam amplifikasi DNA yaitu nuclease-free water (NFW), GoTaq Green Master Mix, primer DHAR forward dan reverse, Tube PCR (ExtraGene) dan cDNA akar padi. Bahan yang digunakan untuk elektroforesis adalah agarose, buffer TAE 1x, DNA ladder 100 bp, loading dye, GelRed, dan parafilm.

Metode

Desain primer dilakukan pada program PrimerQuest. Dengan memasukkan sekuen gen *DHAR 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.

Hasil dan Pembahasan

1. Desain Primer Spesifik Gen *DHAR Oryza sativa*

Berdasarkan hasil desain primer yang dilakukan menggunakan *primer blast* pada situs NCBI, didapatkan 5 kandidat primer untuk gen *DHAR* (Tabel 1). Dari 5 kandidat primer tersebut diseleksi kembali sesuai kriteria primer yang baik untuk PCR karena keberhasilan dalam melakukan desain primer pada PCR sangat dipengaruhi oleh karakteristik primer yang digunakan.

Tabel 1. Spesifikasi kandidat primer

Set	Primer	Sekuen	Tm (°C)	GC (%)	Panjang produk
1	Forward	5'- GTGCATGATTGGGTTGGAATAA - 3'	62	40,9	98
	Reverse	5' - GCCAGCAGGAGATAGTTCATAG- 3'	62	50	
2	Forward	5' - GAGTATGCATCAGTGGGATCAA- 3'	62	45,5	109
	Reverse	5' - GTGCCTGCAGTTCAGTAAGA- 3'	62	50	
3	Forward	5' - ATCAAGACGAAGGCAGCTAAG- 3'	62	47,6	128
	Reverse	5' - CTGACATGGACCGATCAGATAAA- 3'	62	43,5	
4	Forward	5' - GGTGGGCACTACTACTACTCT - 3'	63	50	102
	Reverse	5' - GCACACTTGCAACAACCATATC- 3'	62	45,5	
5	Forward	5'- GCACCAAAGCTCTACCATCT -3'	62	50	97
	Reverse	5'- GAGCCTCTGTGTAAGCATGAA-3'	62	47,6	

Lima set kandidat primer yang diperoleh tersebut dicek menggunakan *Geneious prime* untuk melihat primer memenuhi kriteria yang dibutuhkan atau tidak. adapun dari lima set kandidat primer yang dihasilkan masing-masing memiliki panjang amplicon dan susunan nukleotida yang berbeda. Semua set primer memiliki panjang sekuen yang kurang dari kriteria panjang amplicon yang baik yaitu berkisar antara 150-250 bp. Selain itu salah satu kriteria primer yang baik adalah tidak memiliki hairpin ataupun timer. Menurut Judelson (2006), dalam mendesain primer penting untuk meminimalkan adanya primer dimmer dan primer hairpin. Primer set satu sampai empat bukan termasuk primer dengan kriteria terbaik karena memiliki hairpin dan self dimer.

Sekuen primer set 5 memenuhi salah satu kriteria primer terbaik yang dapat digunakan dalam proses PCR, yaitu Primer Forward DHAR 5'- GCACCAAAGCTCTACCATCT-3' dan Reverse DHAR 5'- GAGCCTCTGTGTAAGCATGAA -3'. Namun primer set 5 tersebut memiliki panjang amplicon yang tidak memenuhi kriteria primer yang baik. Maka dari itu dilakukan desain kembali menggunakan *Geneious prime* untuk mendapat panjang produk yang tepat.

Tabel 2. Sekuen primer yang dipilih

Nama primer	Panjang	Urutan sekuen nukleotid
DHAR F	22	5'- GCACCAAAGCTCTACCATCT -3'
DHAR R	21	5'- GAGCCTCTGTGTAAGCATGAA -3'

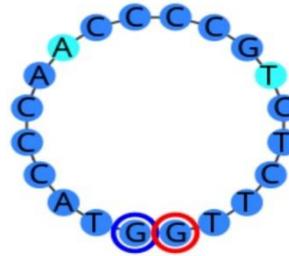
Desain primer pada penelitian ini mengacu pada kriteria pedoman Desain *Premier Biosoft* (2015), yaitu Panjang primer berukuran 18-22 bp, memiliki *Melting Temperature* (Tm) berkisar 52-58 °C maksimal 65 °C, konten GC (GC *clamp*) berkisar dari 40% - 60%, menghindari hairpin, menghindari self dimer antara dua primer, nilai GC clamp tidak lebih dari 3, menghindari pengulangan nukleotida secara berurutan ≥ 4 pengulangan, dan menghindari cross homology untuk meningkatkan spesifikasi primer.

Secara umum, panjang primer ideal antara 18 sampai 30 oligonukleotida. Jika panjang primer kurang dari 18 basa, akan mudah menyebabkan terjadinya *mispriming* sehingga primer akan menempel pada tempat yang tidak diinginkan. Panjang primer lebih dari 30 basa akan menunjukkan spesifisitas rendah dan mengakibatkan terjadinya proses hibridasi dengan primer lain sehingga akan menghambat terbentuknya polimerasi DNA (Maitri, *et al.*, 2016).

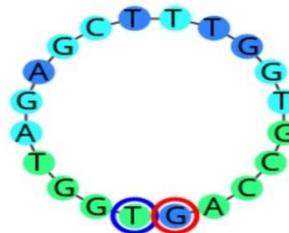
Tabel 3. Parameter primer yang dipilih

Primer	Parameter primer	DNA fold
--------	------------------	----------

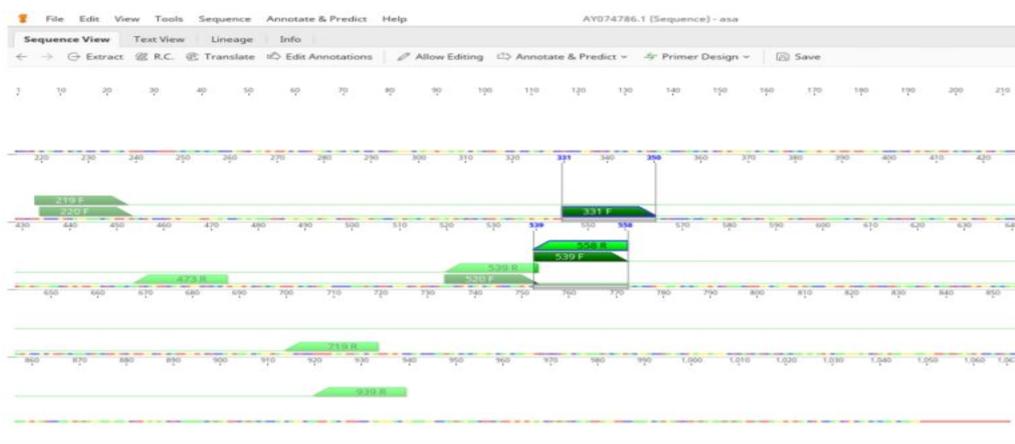
Forward	Panjang	: 20
	GC(%)	: 60
	Tm (°C)	: 60
	Hairpin	: none
	Self Dimers	: none
	Topology	: linear
	Ukuran produk	: 228



Reverse	Panjang	: 20
	GC(%)	: 55
	Tm (°C)	: 60
	Hairpin	: none
	Self Dimers	: none
	Topology	: linear
	Ukuran produk	: 228



Berdasarkan desain primer, primer telah memenuhi kriteria yang baik yaitu dengan panjang basa 20 dan 20 nukleotida, Tm masing-masing 60 °C, %GC 60% dan 55%, panjang *amplicon* 228 bp dan tidak memiliki hairpin dan self dimer.



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

2. Uji Spesifitas Primer Secara *In Silico*

Primer forward dan reverse yang telah dihasilkan selanjutnya diuji spesifitas primer pada template menggunakan BLAST-NCBI. Primer dianalisa secara *in silico* dengan BLAST berdasarkan informasi *database* NCBI. Hasil BLAST menunjukkan bahwa sepasang primer yang dihasilkan benar-benar unik atau spesifik. Penelusuran BLAST (BLAST search) pada basis data sekuens memungkinkan ilmuwan untuk mencari sekuens asam nukleat yang mirip dengan sekuens tertentu yang dimilikinya. Hal ini berguna misalnya untuk menemukan urutan nukleotida sejenis pada beberapa organisme atau untuk memeriksa keabsahan hasil desain primer maupun untuk memeriksa fungsi urutan nukleotida hasil sekuensing. (Yunita, *et al.*, 2020)

Adapun spesifisitas primer forward dan primer reverse tersebut diperiksa kembali dengan Primer BLAST pada laman NCBI. Hasil NCBI Primer BLAST (Gambar 2) menunjukkan bahwa pasangan primer dapat mengamplifikasi gen DHAR dari *Oryza sativa* dengan ukuran produk 228 bp.

```

>AY074786.1 Oryza sativa dehydroascorbate reductase (DHAR) mRNA, complete cds

product length = 228
Forward primer 1  GTACCCAACCCCGTCTCTTG  20
Template       331  .....  350

Reverse primer 1  TGGTAGAGCTTTGGTGCCAG  20
Template       558  .....  539

>AB037970.1 Oryza sativa Japonica Group DHAR1 mRNA for GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1, complete cds

product length = 228
Forward primer 1  GTACCCAACCCCGTCTCTTG  20
Template       301  .....  320

Reverse primer 1  TGGTAGAGCTTTGGTGCCAG  20
Template       528  .....  509

>XM_006653913.3 PREDICTED: Oryza brachyantha probable glutathione S-transferase DHAR1, cytosolic (LOC102719584), mRNA

product length = 228
Forward primer 1  GTACCCAACCCCGTCTCTTG  20
Template       343  .....T..T.....  362

Reverse primer 1  TGGTAGAGCTTTGGTGCCAG  20
Template       570  ...A.....  551

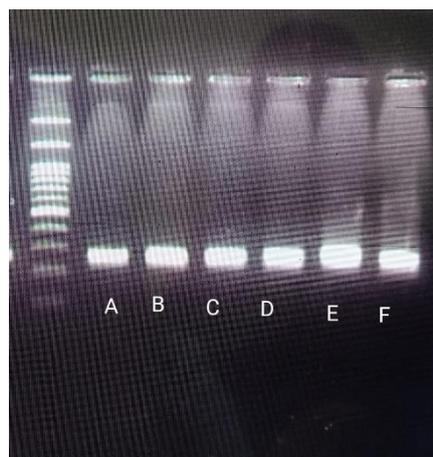
```

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

3. Optimasi Suhu Annealing

Analisis *in silico* adalah prediksi komputasi penting dalam desain primer. Primer juga harus diuji melalui serangkaian optimasi di laboratorium. Optimasi kandidat 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. (Henny, *et al.*, 2019)

Annealing merupakan tahap terjadinya penempelan primer pada DNA template. Primer dapat menempel pada DNA template apabila suhu yang digunakan merupakan suhu optimum, sehingga suhu yang digunakan dalam tahap annealing merupakan faktor penting keberhasilan amplifikasi DNA dengan metode PCR. Suhu annealing yang terlalu tinggi dapat menyebabkan ketidakberhasilan amplifikasi DNA, sedangkan suhu annealing yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer menempel pada tempat yang tidak spesifik (Coyne, *et al.*, 2002)



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 dari produk PCR dari cDNA *Oryza sativa* (Gambar 3) untuk *gradient* suhu *annealing* menunjukkan hasil amplifikasi yang positif. Secara umum cDNA band tebal pada semua suhu yaitu, 50°C, 52,2°C, 54,4°C, 56,6 °C, 58,7 °C, dan 60 °C. Adapun ukuran amplicon yang teramati berada di antara 200–250 bp, sesuai dengan panjang amplicon primer 228 bp. Hal ini menunjukkan bahwa primer dapat menempel dengan baik pada template target menggunakan semua suhu annealing yang telah diuji.

Kesimpulan

Primer yang telah dirancang memenuhi syarat sebagai primer ideal untuk proses amplifikasi PCR. Desain primer yang dibuat secara *in silico* menghasilkan primer dengan kriteria yang baik. Primer gen DHAR dengan urutan *forward* 5'- GTACCCAACCCCGTCTCTTG-3' dan *reverse* 5'- TGGTAGAGCTTTGGTGCCAG-3' memiliki kriteria primer panjang ampikon 228 bp, panjang basa 20 dan 20 nukleotida, nilai Tm masing-masing 60°C, GC sebesar 60% dan 55%, tidak memiliki *secondary structure* (hairpin dan selfdimer) sehingga primer dapat digunakan sebagai primer spesifik untuk mendeteksi gen DHAR. Suhu annealing yang optimal untuk PCR adalah 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.

Daftar Pustaka

- Asmara R.N. 2011. *Pertumbuhan dan Hasil Sepuluh Kultivar Padi Gogo pada Kondisi Cekaman Kekeringan dan Responnya Terhadap Pemberian Abu Sekam* Program Studi Agronomi-Program Pascasarjana. Purwokerto: Universitas Jenderal Soedirman.
- Coyne VE, James SJ, Reid, Rybicki EP. *Molecular biology techniques manual*. South Africa : Univ. *Cape Town*; 2002.
- Dorak T M. 2006. *Real time PCR*. Newcastle (GB): Taylor and Francis group.
- Gallie, D. R. 2013. The Role Of L-Ascorbic Acid Recycling in Responding to Environmental Stress and in Promoting Plant Growth. *Journal of experimental botany*, 64(2), 433-443.
- Handoyo, Darmo & Ari Rudidetna. (2001). Prinsip Umum Dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Pusat Studi Bioteknologi*. 9 (1): 17-29.
- Hapsari, D.P., R. Poerwanto, D. Sopandie, E. Santosa, D.D. Matra. 2018. Partial rootzone irrigation effects on growth, metabolism and calcium status of Mangosteen seedling (*Garcinia mangostana* L.). *Adv. Hort. Sci.* 32(1), 49-59.
- Henny Saraswati, Seprianto, dan Febriana Dwi Wahyuni. 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.
- Judelson, H., Guidelines For Designing Primers. *Primer Guidelines*, 2006, 10 (6): 1-5.
- Maitri, L. K. B., I. N. Wirajana., S. C., Yowani. (2016). Desain Primer Untuk Amplifikasi Fragmen Gen Inha Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (Mdr-Tb) Dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Cakra Kimia*. 3(2): 89-95.
- Muladno. (2010). *Teknologi Rekayasa Genetik Edisi Kedua*. Bogor : IPB Press.
- Premier Biosoft. (2015). *PCR Primer Design Guidelines*.
- Purwanto dan T. Agustono. 2010. Kajian fisiologi tanaman kedelai pada kondisi cekaman kekeringan dan berbagai kepadatan gulma teki. *Jurnal Agrosains*, 12(1), 24-28.
- Septi Lora Aulia, Rujito Agus Suwignyo, dan Mery Hasmeda. 2021. Optimasi Suhu *Annealing* untuk Amplifikasi DNA Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Ilmiah Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*. 18(1).
- Sopandie, D. 2014. *Fisiologi Adaptasi Tanaman terhadap Cekaman Abiotik pada Agroekosistem Tropika*. Bogor : IPB Press.
- Sujinah, Jamil A. 2016. Mekanisme respon tanaman padi terhadap cekaman kekeringan dan varietas toleran. *Iptek Tanaman Pangan* 11, 1-8.
- Uslan & PharmawatiM. (2015). Optimasi Konsentrasi DNA dan MgCl₂ pada Reaksi *Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA* untuk Analisis Keragaman Genetik Tanaman Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) (*Optimization of DNA and MgCl₂ Concentrations in Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Bioslogos*, 5(1):1639.
- Yunita Messe, I Made Budiarsa, dan Abd Hakim Laenggeng. 2020. Desain Primer Polymerase Chain Reaction (PCR) secara *In Silico* untuk Amplifikasi Gen *gyrA* Extensively Drug Resistant Tuberculosis (XDR-TB). *Journal of Biology Science and Education*. 8(2), 616-622.