



## Analisis Oligonukleotida Gen Pengkode Starch Synthase pada Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz)

Dhea Ferda Pratiwi, Dwi Hilda Putri, Wahyuni

Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Padang

Email: leliambellamayanda@gmail.com

### ABSTRAK

Pati ubi kayu merupakan bahan baku berbagai jenis industri, seperti industri pangan, farmasi, bioplastik, dan bioethanol. Pemanfaatan pati spesifik industri tertentu dipengaruhi oleh komposisi pati yang terdiri dari amilosa dan amilopektin. Salah satu enzim yang berperan dalam meregulasi komposisi amilosa/amilopektin adalah Starch Synthase (SS). Pemuliaan tanaman untuk merekayasa komposisi pati merupakan salah satu upaya untuk penyediaan bahan baku pati. Informasi genetik yang mengatur biosintesis pati pada tanaman ubi kayu perlu diketahui dan tahapan awal untuk mendapatkan informasi genetik yang valid adalah dengan mendesain oligonukleotida yang mengamplifikasi gen target secara spesifik. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh oligonukleotida dengan spesifitas tinggi sehingga dapat digunakan untuk amplifikasi fragmen gen SS ubi kayu. Sekuen gen SS yang terpublikasi di submit ke Primer3 versi 4.0 sebagai *template* untuk mendesain kandidat oligonukleotida dengan parameter sebagai berikut: *Temperature melting* (Tm) berkisar 60°C, *GC content* 40-60%, dan panjang untai basa 18-25 bp. Urutan setiap kandidat oligonukleotida di-realign ke database genom ubi kayu di Phytozome12 untuk menilai sekuen diluar target. Oligonukleotida yang dipilih dianalisis lebih lanjut spesifitasnya dengan mengamplifikasi gen SS menggunakan PCR. Sekuen oligonukleotida yang terpilih memiliki urutan basa nukleotida 5'-CAACCCTTTGATCCATTTAG-3' untuk *forward* dan 5'-ATCCTCGTATTTAGCAGCAG-3' untuk *reverse*. Oligonukleotida ini memiliki nilai Tm 54.75°C dan 54.84°C, *GC content* sebesar 40-45%, dan total panjang sekuen 20 bp untuk setiap oligonukleotida primer. Oligonukleotida yang di-realign ke database genom ubi kayu menunjukkan nukleotida tersebut spesifik pada kromosom 1 (21623315-21629007), yang telah dinotasikan sebagai urutan pengkode SS. Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan oligonukleotida sebagai pasangan primer untuk mengamplifikasi gen SS dengan *template* cDNA. Berdasarkan hasil ini diperoleh pita DNA tunggal dengan panjang yang diharapkan yaitu 192 bp.

**Kata kunci:** Desain Primer, Ubi Kayu, Biosintesis Pati, Gen Starch Synthase

### PENDAHULUAN

Ubi kayu merupakan tanaman tropis dengan kandungan pati yang tinggi. Dalam Ceballos *et al.*, (2010), akar penyimpanan atau umbi ubi kayu mengandung 65-91% pati. Pati ubi kayu umumnya dimanfaatkan diberbagai bidang industri, seperti industri pangan, farmasi, bioplastik, dan bioethanol. Pemanfaatan ubi kayu pada masing-masing bidang industri ditentukan oleh sifat fisikokimia pati. Secara umum pati terdiri dari dua jenis polimer yaitu amilosa dan amilopektin (Charoenkul *et al.*, 2006). Kandungan amilosa dan amilopektin yang berbeda pada ubi kayu menjadi penentu sifat fisikokimia pati. Pati



dengan tinggi amilopektin dimanfaatkan dalam industri kertas, lem, dinding panel gipsum, dan konstruksi (Baguma, 2004). Akan tetapi, pati dengan proporsi amilopektin tinggi tidak dapat diperoleh dari penggunaan pati alami. Oleh karena itu sebelum digunakan, pati alami perlu dimodifikasi untuk menunjang sifat fisikokimia pati sesuai dengan keperluan bidang industri, dan ini menjadi salah satu kelemahan penggunaan pati alami. Salah satu solusi yang dapat dilakukan yaitu melalui pemuliaan tanaman dengan bantuan informasi genetik untuk memperoleh tanaman ubi kayu dengan kandungan pati spesifik.

Secara alami faktor-faktor yang mempengaruhi proporsi kandungan pati yaitu, musim, umur panen, dan genetik (Moorthy, 2002). Gen merupakan salah satu faktor penting yang berperan dalam penentu proporsi kandungan pati. Dalam (Tappiban *et al.*, 2019) biosintesis pati dipengaruhi oleh gen-gen penyandi enzim biosintesis pati. Terdapat dua enzim utama yang berperan dalam mempengaruhi kadar amilosa dan amilopektin. Enzim tersebut yaitu granule bound starch synthase (GBSS) dan Starch synthase (SS).

GBSS berperan dalam katalisis pembentukan amilosa sedangkan SS merupakan prekursor utama dalam pembentukan amilopektin (Pfister & Zeeman, 2016; Tappiban *et al.*, 2019). Penghambatan atau peningkatan ekspresi gen penyandi enzim tersebut dapat mempengaruhi proporsi kandungan pati pada ubi kayu yang diuji. Penghambatan ekspresi gen *GBSSI* pada ubi kayu berpengaruh dalam proporsi kandungan amilosa yang terbentuk. Dalam penelitian yang dilakukan Zhao *et al.*, (2011), dengan menghambat aktivitas gen *GBSSI* pada tanaman ubi kayu menunjukkan kadar amilosa yang berkurang secara signifikan (<5%) dibandingkan tanaman liar (25%). Akan tetapi, hanya 30% tanaman transgenik yang menunjukkan penurunan ekspresi *GBSSI* secara signifikan pada level RNA. Penelitian yang dilakukan Zhao *et al.*, (2011), merupakan satu dari banyak penelitian yang bertujuan dalam upaya peningkatan produksi dan kualitas ubi kayu. Beberapa penelitian lain yang juga bertujuan dalam peningkatan kualitas ubi kayu yaitu menganalisis ekspresi gen penyandi beta-karoten pada ubi kayu sebagai dasar pemuliaan tanaman ubi kayu dengan kandungan tinggi beta-karoten (Anika, 2019), dan mengidentifikasi marka molekuler *Simple Sequence Repeats* (SSR) antara ubi kayu berumbi putih dan kuning dan memperoleh konfirmasi karakteristik dari berbagai genotip ubi kayu dalam upaya pemuliaan tanaman (Ramadanti., 2019).

Penelitian secara molekuler mengenai upaya peningkatan kualitas ubi kayu masih terus dilakukan. Salah satu analisis molekuler yang banyak dilakukan dengan memanfaatkan ilmu bioinformatika. Ilmu bioinformatika merupakan kajian yang memadukan disiplin biologi molekuler, matematika dan teknik informasi yang meliputi bagian pengumpulan data, penyimpanan, analisis, interpretasi, penyebaran dan aplikasi dari data-data biologi molekuler (Aprijani & Elfaizi, 2004). Analisis bioinformatika banyak digunakan dalam mendukung eksperimen laboratorium di bidang molekuler,



seperti bidang peternakan (Sukri, 2014), kesehatan, dan pertanian (Parikesit dkk., 2017). Salah satu pemanfaatan analisis bioinformatika yaitu, melakukan prediksi terhadap kemungkinan reaksi-reaksi molekular yang terjadi pada suatu eksperimen. Saat ini sudah banyak penelitian yang memanfaatkan fungsi analisis bioinformatika tersebut. Salah satunya penelitian yang dilakukan oleh Putri & Fiffendy (2019), dengan melakukan analisis prediksi penghapusan daerah C-terminal (*stem-anchor*) pada gen envelope DENV E terhadap perubahan sifat umum protein, topologi protein, dan struktur 3D dari domain protein envelope DENV E. Beberapa penelitian berbasis bioinformatika lainnya yaitu penggunaan penanda/marka molekular pada variasi genetik ubi kayu berumbi kuning dan berumbi putih (Ramadanti, 2019), pengembangan peta genetik pada *Coffe sp.* (Putranto, 2016), perbandingan tingkat homologi urutan nukleotida dan gen penyandi protein Lcy  $\alpha$  dan Lcy  $\beta$  pada biosintesis karotenoid (Anika *et al.*, 2019), dan desain primer terkait ekspresi gen penyandi beta-karoten pada ubi kayu berumbi putih dan berumbi kuning (Anika dkk., 2019).

Desain primer merupakan salah satu pemanfaatan analisis bioinformatika yang paling umum dilakukan. Dalam penelitian ini diperlukan analisis desain oligonukleotida (primer) dengan tujuan mengamplifikasi gen target spesifik untuk memperoleh informasi genetik yang mengatur biosintesis pati pada tanaman ubi kayu. Desain primer bertujuan untuk merancang primer yang diprediksi memiliki spesifitas yang baik. Primer adalah oligonukleotida yang berperan sebagai penyedia gugus hidroksi (-OH) dari ujung 3' dan sebagai pembatas DNA target yang akan diamplifikasi pada saat melakukan PCR (Handoyo & Rudiretna, 2000). Keberhasilan PCR untuk menghasilkan produk DNA spesifik ditentukan dari desain primer yang baik (Borah, 2011). Beberapa kriteria penting dalam melakukan desain primer yaitu memiliki panjang primer berkisar antara 18-30 pasang basa, memiliki nilai GC *content* berkisar 40-60%, dan nilai Tm antara 50-65°C (Handoyo & Rudiretna, 2000; Udvardi *et al.*, 2008; Borah, 2011; Christensen, 2018)

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian analisis ekspresi gen penyandi biosintesis pati ubi kayu dan tujuan khusus dari penelitian ini untuk memperoleh desain oligonukleotida primer yang memiliki spesifitas tinggi sehingga dapat digunakan dalam proses amplifikasi fragmen gen *SS* pada ubi kayu.

## **METODE PENELITIAN**

### **Analisis Bioinformatik Gen Starch Synthase (*SS*)**

Informasi terkait gen *SS* sebagai salah satu gen penyandi yang berperan dalam biosintesis pati, serta kode akses gen (Manes.01G091700.1) diperoleh dari jurnal yang telah dipublikasi (Tappiban *et al.*, 2019) dan *database genom Manihot esculenta* di Phytozome12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).



### **Desain Oligonukleotida Primer**

Primer didesain dengan menggunakan *program* Primer3 versi 4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Kandidat primer ditentukan berdasarkan beberapa kriteria yaitu, *Temperature melting* ( $T_m$ ) berkisar  $60^\circ\text{C}$ , *GC content* 40-60%, dan panjang untai basa nitrogen 18-25 bp (Udvardi *et al.*, 2008). Urutan basa nukleotida *coding sequence* (CDS) *SS* diperoleh dari *database* phytozome12. Urutan nukleotida CDS *SS* disubmit pada program Primer3 versi 4.0 dan parameter primer diisikan pada kolom *primer size*, *primer  $T_m$* , dan *Primer GC* sesuai dengan kriteria yang dijelaskan oleh Udvardi *et al.*, (2008). Dari hasil penggunaan program ini akan diperoleh beberapa pasang kandidat primer dengan parameter yang telah di setting sebelumnya. Beberapa kandidat primer ini diseleksi dengan memperhatikan posisi sekuen kandidat primer di dalam CDS *SS*, yaitu yang berada pada posisi paling mendekati ujung 3' dari CDS *SS*. Untuk menguji spesifisitas kandidat primer terpilih, maka sekuen kandidat primer tersebut di-realign ke dalam genom ubi kayu yang ada di Phytozome 12 menggunakan fasilitas *Basic Local Alingment Search Tool* (BLAST)

### **Amplifikasi Gen Target**

Amplifikasi gen target dilakukan dengan reaksi PCR konvensional. Reaksi PCR menggunakan KOD FX Neo (KFX-201, TOYOBO), dalam volume 10  $\mu\text{L}$ . Reaksi terdiri dari 1  $\mu\text{L}$  cDNA, 5  $\mu\text{L}$  2x PCR *buffer*, 2  $\mu\text{L}$  dNTPs, 0,2  $\mu\text{L}$  KOD FX Neo *polymerase*, 0,3  $\mu\text{L}$  primer *forward* dan *reverse* dari (10 mM) dan 1,2  $\mu\text{L}$  *UltraPure Destiled Water* (ddH<sub>2</sub>O). Tahapan reaksi PCR adalah pra-denaturasi  $94^\circ\text{C}$  selama 2 menit dan 35 siklus reaksi yang terdiri dari denaturasi  $98^\circ\text{C}$  selama 10 detik, *annealing* pada suhu  $56^\circ\text{C}$  selama 30 detik, dan *extension*  $68^\circ\text{C}$  selama 50 detik. Bagian akhir reaksi PCR dilakukan *final extension*  $68^\circ\text{C}$  selama 5 menit.

### **Kualifikasi hasil PCR dengan Elektroforesis**

Kualifikasi hasil amplifikasi PCR dilakukan menggunakan perangkat elektroforesis dengan *gel agarose* 1%. *Gel agarose* yang sudah larut ditambahkan 10% *nucleid acid staining acid* dan dihomogenkan. Hasil PCR dan *loading dye* dimasukkan ke dalam masing-masing sumur *gel agarose*. *Marker* yang digunakan adalah 50 bp (DM1100, SMOBIO). Proses elektroforesis dilakukan dengan pengaturan *voltage* 85 V selama 45 menit, dan pengecekan hasil RNA dilakukan dengan menggunakan UV-Transiluminator.

### **Desain Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah deskriptif dengan melakukan analisis bioinformatik terkait gen penyandi starch synthase (*SS*) pada ubi kayu.

### **Analisis Data**



Data hasil analisis diperoleh dari penggunaan program Primer3 versi 4.0 untuk memperoleh urutan basa nukleotida (primer), selanjutnya dilakukan analisis dengan program BLAST di phytozome12 untuk memperoleh hasil analisis uji spesifitas primer yang telah dipilih dan diujikan secara *in-vitro* menggunakan PCR.

## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Primer3 versi 4.0 merupakan salah satu program desain primer yang telah banyak digunakan karena tersedia secara *online*. Keunggulan program Primer3 versi 4.0 antara lain, karena penggunaan yang mudah, praktis dan lebih efisien. Program Primer3 versi 4.0 bekerja dengan terlebih dahulu mencocokkan informasi tentang daerah target dan panjang produk. Setelah diperoleh daerah target yang akan dipilih, Primer3 versi 4.0 selanjutnya akan menampilkan beberapa pasang primer berdasarkan standar pemilihan primer yang telah ditentukan (Biñas, 2000). Beberapa kandidat primer yang dipilih dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandidat primer penyandi gen *SS* pada ubi kayu

Enzim	Gen	Primer	Urutan Basa 5'-3'	Start	Temperatur Melting (°C)	G+C Content (%)	Length (bp)
Starch Synthase (SS)	Starch Synthase (SS)	Forward	CAACCCTTTGATCCATT TAG	1813	54.75	40	20
		Reverse	ATCCTCGTATTTAGCAG CAG	2004	54.84	45	20
		Forward	ATGGGACAGTTCCTGTT GTA	1763	55.41	45	20
		Reverse	CATTCCTCTTCTCTGCA GTC	1959	55.05	50	20
		Forward	ACTCTATGACCCAGTTG GTG	1150	54.97	50	20
		Reverse	TCCCATTA ACTATGCCA CTC	1331	55.17	45	20
		Forward	TCCCTGGAAACACTAG ACAC	1397	55.10	50	20
		Reverse	TGACTAGTTGCACATCC TGA	1580	55.19	45	20
		Forward	TGCAGACATCTCACAG GATA	1674	55.09	45	20
		Reverse	CTAAATGGATCAAAGG GTTG	1839	54.75	40	20
		Forward	CAGTGGACGATTTTCGT TAT	1095	55.25	40	20
		Reverse	AACCACCTTCAGATGTT TTG	1271	55.12	40	20



Hasil beberapa pasang primer yang ditampilkan dalam Primer3 versi 4.0 dipilih berdasarkan posisi daerah amplifikasi. Primer yang disarankan yaitu menempati posisi paling mendekati ujung 3'. Menurut Gorenkov *et al.*, (2001) daerah ujung 3' umumnya lebih unik (*unique*) dibandingkan wilayah pengkodean lain. Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat enam kandidat primer yang berada pada posisi paling mendekati ujung 3' yang disarankan oleh program primer Primer3 versi 4.0. Kandidat primer yang dipilih berada pada posisi antara 1095-1813 bp untuk *forward* dan 1271-2004 bp untuk *reverse* dimana gen ini memiliki jumlah urutan nukleotida CDS sebesar 2034 bp. Selain itu, masing-masing primer memiliki nilai  $T_m$  berkisar antara 54.75 hingga 55.41°C, GC content sebesar 40-50, dan memiliki panjang primer 20 bp untuk masing-masingnya.

*Temperature melting* ( $T_m$ ) adalah suhu optimal primer untuk mengalami disosiasi (Sasmito dkk., 2014). Dalam Abd-Elsalam (2003),  $T_m$  yang optimal untuk primer berkisar antara 52-58°C. Kisaran tersebut menghasilkan produk PCR yang lebih baik dibandingkan primer yang memiliki nilai  $T_m$  lebih rendah. Sebaliknya primer dengan  $T_m$  di atas 65°C tidak dianjurkan karena berpotensi mengalami *annealing* sekunder (penempelan primer pada daerah non-target). Pasangan primer sebaiknya tidak memiliki selisih nilai  $T_m$  lebih dari 5°C karena dapat menghambat amplifikasi saat PCR (Sasmito dkk., 2014).

Standar pemilihan nilai GC content sesuai dengan kriteria pemilihan primer yang baik dengan nilai diantara 40-60% (Udvardi *et al.*, 2008). GC content berkaitan erat dalam mempengaruhi stabilitas primer. Tiga ikatan hidrogen yang dimiliki GC lebih kuat sehingga dapat mempertahankan stabilitas primer dan *template* (Sasmito dkk., 2014). Dalam Handoyo & Rudiretna (2000), GC content sebaiknya memiliki nilai yang sama atau lebih tinggi dibandingkan GC content sekuen DNA yang akan diamplifikasi. Dalam merancang primer, komposisi susunan basa nukleotida juga perlu diperhatikan. Urutan basa nukleotida yang sama secara berurutan perlu dihindari agar tidak terjadi *mispriming* (kesalahan penempelan primer pada wilayah non-target), sehingga mengurangi spesifitas primer yang dipilih.

Panjang primer yang didesain yaitu 20 bp untuk masing-masing primer *reverse* dan *forward*. Panjang primer yang dipilih telah sesuai dengan kriteria primer yang disarankan yaitu berkisar 18-30 bp (Christensen, 2018). Ketentuan panjang primer berdasar atas pertimbangan kombinasi acak urutan nukleotida yang ada pada satu urutan DNA genom. Panjang urutan primer yang melebihi 30 bp tidak direkomendasikan karena akan meningkatkan non-spesifitas pada DNA target yang lebih tinggi dan menambah biaya pembelian primer.

Panjang primer yang dilakukan pada beberapa penelitian berbeda-beda, disesuaikan dengan kepentingan penelitian serta komposisi nukleotida dari masing-masing sekuen yang akan didesain. Dalam Maitriani dkk., (2015) primer *forward* yang





didesain memiliki panjang 20 bp dan 19 bp pada *reverse*. Sementara dalam Aris dkk., (2013) desain primer yang dipilih memiliki panjang sekuen 21-18 bp.

Nilai *GC content*, *Tm*, dan *annealing* saling mempengaruhi satu sama lain (Rychlik *et al.*, 1990). Sehingga penting untuk memastikan seluruh kriteria pemilihan primer sesuai agar diperoleh primer dengan hasil yang diharapkan. Kriteria lain yang perlu dipertimbangkan saat mendesain primer adalah stabilitas termal ujung primer. Stabilitas primer ujung 3' harus lebih rendah dibandingkan stabilitas daerah 5'. Dengan tujuan afinitas primer hanya didominasi pada daerah ujung 5'. Sebaliknya, apabila afinitas primer 3' lebih tinggi menyebabkan kemungkinan penempelan ujung 3' terlebih dahulu pada sekuen non-target (Septiari dkk., 2015).

Kandidat primer yang telah memenuhi kriteria *Tm*, *GC content*, dan panjang yang sesuai di BLAST pada database genom ubi kayu yang tersedia di Phytozome12. BLAST diperlukan untuk memastikan primer yang dipilih spesifik mengamplifikasi satu wilayah target. Prinsip dasar mekanisme BLAST yaitu mengidentifikasi dan menyelaraskan daerah kemiripan antara dua urutan nukleotida (Altschul & Koonin, 1998). Hasil BLAST kandidat primer dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil identifikasi sekuen primer dengan menggunakan program BLAST *Manihot esculenta* database phytozome12

<i>Gene</i>	<i>Trascript Name (Phytozome 12)</i>	<i>Primer</i>	<i>Score</i>	<i>E-value</i>	<i>Identify (%)</i>	<i>Chromosome and CDS position</i>	<i>Primer Position</i>
<i>Starch Synthase (SS/MeSSII-2, MeSSIIb)</i>	Manes.01G 091700.1	<i>Forward</i>	37.4	0.046	100	1 (21623315-21629007)	21628786-
		<i>Reverse</i>					21628805
		<i>Forward</i>	42.8	0.001			21628736-
		<i>Reverse</i>					21628758
		<i>Forward</i>	37.4	0.046			21628116-
		<i>Reverse</i>					21628135
		<i>Forward</i>	41.0	0.004			21628363-
		<i>Reverse</i>					21628384
		<i>Forward</i>	39.2	0.013			21628786-
		<i>Reverse</i>					21628806
		<i>Forward</i>	39.2	0.013			21628061-
		<i>Reverse</i>					21628081

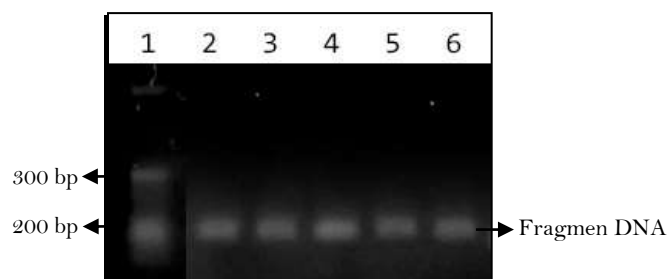
Berdasarkan hasil BLAST, nilai skor dari seluruh primer berkisar antara 37.4-41.0, *E-value* sebesar 0.001-0.046 dan *identify* 100% untuk seluruh kandidat primer. Posisi penempelan primer pada genom *M. esculenta* spesifik hanya pada kromosom 1 pada daerah CDS *SS* yang berada pada posisi 21623315-21629007 bp. Hal ini dapat dilihat dari hasil analisis posisi primer yang ditunjukkan pada Tabel 2, seluruh kandidat



primer berada pada daerah CDS *SS* yang ditandai dengan urutan posisi masing-masing primer berada diantara posisi CDS *SS*. Berdasarkan analisis ini seluruh kandidat primer telah sesuai dengan standar pemilihan primer yang ideal, akan tetapi, 1 pasang primer sudah cukup untuk memperoleh bagian dari gen yang akan diteliti. Dalam penelitian ini, pasangan primer yang dipilih adalah primer *forward* dan *reverse* dengan urutan nukleotida 5'-CAACCCTTTGATCCATTTAG-3' dan 5'- ATCCTCGTATTTAGCAGCAG-3'. Pasangan primer tersebut dipilih karena berada pada posisi paling mendekati ujung 3' dibandingkan kandidat primer lainnya, yaitu dimulai dari urutan 1813 bp untuk primer *forward* dan 2004 bp untuk primer *reverse*.

Untuk menguji spesifitas primer terpilih maka dilakukan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mengamplifikasi daerah CDS *SS* menggunakan cDNA ubi kayu. Primer yang baik akan mengamplifikasi sekuen target yang sesuai dengan analisis bioinformatika yang dilakukan sebelumnya. Salah satu faktor penting keberhasilan PCR yaitu penggunaan suhu yang tepat pada proses *annealing*. Pemilihan suhu *annealing* dapat berpedoman pada nilai  $T_m$  primer yang digunakan. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk menentukan suhu optimum *annealing* dengan menggunakan hasil pengurangan nilai  $T_m$  dalam rentang kurang dari 5°C (Arimurti, 2018). Beberapa suhu yang diperoleh dapat diuji coba terlebih dahulu melalui optimasi primer. Penentuan suhu optimum *annealing* ditandai dengan tingkat ketebalan produk PCR yang diperoleh melalui hasil visualisasi menggunakan elektroforesis.

Uji spesifitas primer dilakukan dengan menggunakan 5 jenis genotipe ubi kayu yang berbeda yaitu Adira 4, Menti, Kristal merah, Revita 1, dan Tali. Berdasarkan hasil yang diperoleh saat pengujian optimasi primer pada suhu 56°C, dengan penggunaan reagen dari KOD FX Neo (KFX-201, TOYOBO), menunjukkan adanya satu pita DNA yang terdeteksi pada *gel agarose* 1% dengan ukuran setara dengan penanda DNA berukuran 200 bp (Gambar 1). Berdasarkan analisis bioinformatika, produk PCR yang dihasilkan memiliki panjang 192 bp.



Gambar 1. Hasil amplifikasi daerah CDS *SS* menggunakan PCR, oligonukleotida (5'-CAACCCTTTGATCCATTTAG-3' dan 5'-ATCCTCGTATTTAGCAGCAG-3') pada suhu *annealing* 56°C yang





divisualisasikan pada *gel agarose* 1% dengan susunan (1) Penanda DNA 50 bp (DM1100, SMOBIO) dan (2-6) hasil amplifikasi menggunakan cetakan cDNA dari ubi kayu (2) Adira 4, (3) Menti, (4) Kristal merah, (5) Revita 1, dan (6) Tali.

Terbentuknya satu pita DNA dengan panjang produk yang sesuai dengan analisis bioinformatika, menunjukkan primer yang dirancang mampu menghasilkan pita tunggal seperti yang diharapkan. Dalam uji PCR sebuah primer dikatakan baik jika menghasilkan pita tunggal, yang artinya tidak bekerja pada daerah non-target dan memiliki panjang pita yang sesuai dengan analisis bioinformatika (Anika dkk., 2019; Dewi dkk., 2019). Hasil ini menunjukkan primer bekerja baik pada reaksi PCR konvensional. Namun, seperti yang diutarakan sebelumnya tujuan utama penelitian ini adalah pengujian ekspresi gen dengan menggunakan reaksi *real-time* PCR. Oleh karena itu, perlu diketahui bagaimana primer yang terpilih bekerja pada reaksi *real-time* PCR. Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan desain primer yang dipilih telah memenuhi standar primer yang ideal dengan spesifitas yang baik.

## REFERENSI

- Abd-Elsalam KA. 2003. Bioinformatic Tools and Guideline for PCR Primer Design. *African Journal of Biotechnology*, 2 (5): 91-95.
- Altschul SF, & Koonin EV. 1998. Iterated Profile Searches with PSI-BLAST a Tool for Discovery in Protein Databases. *Trends in Biochemical Sciences*, 23 (11): 444-447.
- Anika M. 2019. Analisis Ekspresi Gen Penyandi Beta-karoten pada Ubi Kayu. Skripsi. Tidak diterbitkan. Padang: Program Studi Biologi, Universitas Negeri Padang.
- Anika M, Putri DH, & Wahyuni W. 2019. Bioinformatics Study Genes Encoding Enzymes Involved in the Biosynthesis of Carotenoids Line Cassava (*Manihot esculenta*). *EKSAKTA: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 20 (1): 10-16.
- Anika M. Putri DH, & Wahyuni W. 2019. Primer Design for Identification of Beta-Carotene Encoding Genes in Cassava. *Serambi Biologi*, 4 (1).
- Aprijani DA, & Elfaizi MA. 2004. Bioinformatika: Perkembangan, Disiplin Ilmu dan Penerapannya di Indonesia. 94.
- Arimurti ARR. 2018. Keanekaragaman Genetik Nyamuk Vektor Filariasis *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) di Kota dan Kabupaten Pekalongan dengan Metode PCR-RAPD. *The Journal of Muhammadiyah Medical Laboratory Technologist*, 1 (2): 42-61.
- Aris M, Sukenda S, Harri E, & Sukadi MF. 2013. Molecular identification of pathogenic bacteria and PCR specific primer design. *e-Journal Budidaya Perairan*, 1(3).
- Baguma Y. 2004. Regulation of Starch Synthesis in Cassava. *Disertation*, Agraria, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.
- Biñas M. 2000. Designing PCR Primers on the Web. *Biotechniques*, 29 (5): 988-990.



- Borah P. 2011. Primer Designing for PCR. *Science Vision*, 11 (3): 134-136.
- Ceballos H, Okogbenin E, Pérez JC, López-Valle LAB, & Debouck D. 2010. *Cassava. In Root and tuber crops*. New york: Springer.
- Charoenkul N, Uttapap D, Pathipanawat W, & Takeda Y. 2006. Simultaneous Determination of Amylose Content & Unit Chain Distribution of Amylopectins of Cassava Starches by Fluorescent Labeling/HPSEC. *Carbohydrate polymers*, 65 (1): 102-108.
- Christensen H. 2018. *Introduction to Bioinformatics in Microbiology*. New York: Springer.
- Dewi DA, Ekawasti F, Wardhana AH, & Sawitri DH. 2019. Penggunaan Empat Set Primer dalam Mendeteksi Trypanosoma Evansi pada Mencit dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Jurnal Sains dan Teknologi Peternakan*, 1 (1): 13-19.
- Gorelenkov V, Antipov A, Lejnine S, Daraselina N, & Yuryev A. 2001. Set of Novel Tools for PCR Primer Design. *Biotechniques*, 31 (6): 1326-1330.
- Handoyo D, & Rudiretna A. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*[General Principles and Implementation of *Polymerase Chain Reaction*]. *Unitas*, 9 (1): 17-29.
- Maitriani LKB, Wirajana IN, & Yowani SC. 2015. Desain Primer untuk Amplifikasi Fragmen Gen *Inha* Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (*mdr-tb*) dengan metode *Polymerase Chain Reaction*. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*. 3 (3): 89-95.
- Moorthy SN. 2002. Physicochemical and functional Properties of Tropical Tuber Starches: a Review. *Starch-Stärke*, 54 (12): 559-592.
- Parikesit AA, Anurogo D, & Putranto RA. 2017. Pemanfaatan Bioinformatika dalam Bidang Pertanian dan Kesehatan. *Menara Perkebunan*, 85 (2): 105-115.
- Pfister B, & Zeeman SC. 2016. Formation of Starch in Plant Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73 (14): 2781-2807.
- Putranto RA. 2016. Genetic Mapping Studies in *Coffea sp* using Molecular Marker Methods. *E-Journal Menara Perkebunan*, 83 (2).
- Putri D, & Fiffendy M. 2019. Bioinformatic analysis of truncated envelope protein in C-terminal stem-anchor region: as strategies for increasing protein secretion. *International Conference on Mathematics, Science, Education, and Technology*. Universitas Negeri Padang, Padang, 4-5 October 2018. Paper presented at the *Journal of Physics: Conference Series*.
- Ramadanti NA. 2019. Variasi Genetik Ubi Kayu Berumbi Kuning dan Berumbi Putih Berdasarkan Marka Molekular Simple Sequence Repeats (SSR). Skripsi. Tidak diterbitkan. Padang: Program Studi Biologi, Universitas Negeri Padang.
- Rychlik W, Spencer W, & Rhoads R. 1990. Optimization of the Annealing Temperature for DNA Amplification in Vitro. *Nucleic acids research*, 18 (21): 6409-6412.
- Sasmito DEK, Kurniawan R, & Muhimmah I. 2014. Karakteristik primer pada *Polymerase Chain Reaction (PCR)* untuk sekuensing DNA: mini review. Paper presented at the *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed)*.



- Septiari IGAA, Yustiantara PS, & Yowani SC. 2015. Analisis Primer untuk Amplifikasi Promoter inhA Multidrug Resistance Tuberculosis (*MDR-TB*) dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Jurnal Kimia* (Journal of Chemistry).
- Sukri A. 2014. Analisis Filogeni Kerbau Lokal Indonesia (*Bubalus bubalis*) dengan Gen *Cyt b* Berbasis Biogeografi sebagai Bahan Ajar Matakuliah Bioinformatika. Tesis, Malang, Program Pascasarjana Pendidikan Biologi, Universitas Negeri Malang.
- Tappiban P, Smith DR, Triwitayakorn K, & Bao J. 2019. Recent Understanding of Starch Biosynthesis in Cassava for Quality Improvement: A review. *Trends in food science & technology*, 83: 167-180.
- Udvardi MK, Czechowski, T, & Scheible, WR. 2008. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, 20 (7): 1736-1737.
- Zhao SS, Dufour D, Sánchez T, Ceballos H, & Zhang P. 2011. Development of Waxy Cassava with Different Biological and Physico-chemical Characteristics of Starches for Industrial Applications. *Biotechnology and bioengineering*, 108 (8): 1925-1935.