

Desain Primer Berbasis *In-Silico* Dengan Sekuen Gen *Internal Transcribed Spacer (ITS) Morus alba L.*

Apta Adi Wahyu^{1*}, Agus Muji Santoso¹, Budhi Utami¹

¹ Prodi Biologi, Universitas Nisantara PGRI Kediri

*Email korespondensi: aptaadiwahyu@gmail.com

Diterima:
7 Agustus 2024

Dipresentasikan:
10 Agustus 2024

Disetujui Terbit:
08 Oktober 2024

ABSTRAK

Mulberry (*M. alba L.*) adalah tanaman yang memiliki manfaat di bidang pengobatan, pangan, dan pakan hewan. Marka molekuler dibutuhkan dalam pengujian secara *in-silico* untuk pemuliaan tanaman *M. alba*. Pengujian sekuen gen ITS *M. alba* secara *in-silico* dilakukan untuk mendeteksi, menentukan, dan mengidentifikasi daerah amplifikasi yang tepat untuk desain primer. Fokus penelitian ini adalah merancang sekuen gen ITS *M. alba* secara *in-silico* dengan memilih pasangan basa yang akan digunakan sebagai sampel, sehingga dapat menghasilkan struktur desain primer yang optimal. Jenis penelitian ini bersifat deskriptif eksploratif, sekuen gen ITS *M. alba* diperoleh melalui platform NCBI. Proses perancangan primer dilaksanakan dengan memanfaatkan perangkat lunak *BioEdit*, situs NCBI *Primer-BLAST*, *software Snappene*, serta situs *uMelt* dan *Mfold*. Primer yang memiliki kriteria pada penelitian ini adalah pada *primer pair* 6 terdiri dari primer 5'-TGGGCGTCAAACACCGAT-3', yang memiliki persentase GC sebesar 56% dan suhu leleh (T_m) 58°C untuk primer *forward*. Sedangkan primer 5'-GAGTGTGGGGTTCGGATGAT-3' sebagai primer *reverse* memiliki persentase GC sebesar 60% dan T_m 60°C, dengan daerah ampikon sepanjang 80 bp. Untuk *primer pair* 9, primer *forward* 5'-GTGACAGGTGGT-3' memiliki persentase GC 55% dan T_m 60°C, sementara primer *reverse* 5'-CCGTTTGGGTGCCTCTGATG-3' memiliki persentase GC 60% dan T_m 60°C, dengan daerah ampikon sepanjang 111 bp. Hasil analisis *uMelt* menunjukkan kurva leleh sebesar 93°C dan 94°C. Selain itu, analisis *Mfold* menunjukkan adanya primer dimer dan struktur hairpin pada panjang basa.

Kata Kunci : *Morus alba L.*, Desain primer, *In-silico*

PENDAHULUAN

Morus alba L. memiliki potensi dalam bidang pengobatan, pangan, dan pakan ternak. Tanaman ini mengandung senyawa fenolik seperti flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, dan tokoferol. Selain itu, tanaman ini juga kaya akan senyawa antioksidan, termasuk vitamin C, vitamin E, karoten, serta berbagai senyawa fenolik, terutama polifenol dan flavonoid, yang diakui dapat mengurangi risiko penyakit degeneratif. Tanaman murbei merupakan satu-satunya sumber makanan bagi ulat sutera. Hasil dari budidaya ulat sutera, yaitu kokon, dapat dijual langsung atau diproses menjadi benang sutera yang digunakan untuk memproduksi kain sutera.

Dalam memperbanyak dan menghasilkan jenis baru, marka molekuler digunakan. Para peneliti dapat memperbaiki tanaman dengan menggunakan markah DNA untuk mengidentifikasi jenis markah atau memanfaatkan markah DNA dalam seleksi tanaman, DNA banyak digunakan oleh para peneliti sebagai

penanda molekuler. Selain itu, markah DNA lebih menguntungkan dibandingkan seleksi fenotipik. Markah DNA hanya bergantung pada komponen genetik tanaman karena tidak dipengaruhi oleh variabel lingkungan. Sebagai hasilnya, proses pemilihan tanaman menggunakan markah DNA menjadi lebih cepat, lebih tepat, dan lebih hemat biaya (Azrai, 2005). Alat untuk membantu dalam seleksi pemuliaan tanaman adalah markah DNA. Seleksi markah DNA adalah bentuk seleksi yang lebih menguntungkan dibandingkan seleksi fenotipik atau morfologi karena hanya berdasarkan pada fitur genetik tanaman dan tidak dipengaruhi oleh faktor lainnya. Oleh karena itu, proses pemuliaan tanaman dapat dilakukan dengan lebih cepat dan tepat (Nuraida, 2012).

Penelitian tentang desain primer sekuen gen ITS *M. alba* ini dilakukan secara deskriptif eksploratif untuk mengidentifikasi keragaman genetik tanaman melalui analisis DNA serta untuk menemukan kandidat primer yang sesuai untuk pemuliaan tanaman. Penelitian ini dilakukan secara *in-silico* dengan mengunduh data dari situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) untuk mengidentifikasi desain primer sekuen gen ITS *M. alba*. Desain primer sekuen gen ITS *M. alba* bertujuan untuk merancang primer yang efisien, memprediksi spesifisitas primer, serta mengurangi kemungkinan terbentuknya struktur sekunder pada primer selama proses amplifikasi sekuens DNA menggunakan metode PCR (Saraswati & Wahyuni, 2019).

METODE

Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer secara *in-silico* untuk amplifikasi sekuen gen ITS *M. alba*. Eksplorasi database tanaman murbei dilakukan melalui situs NCBI, diikuti dengan beberapa langkah, mulai dari penjajaran sekuen gen, pencarian primer yang sesuai, hingga penentuan persentase GC dan suhu leleh (T_m) yang tepat untuk mendeteksi kemungkinan adanya primer dimer. Oleh karena itu, penelitian ini termasuk dalam kategori deskriptif eksploratif. Penelitian ini menggunakan tanaman *M. alba* sebagai target dengan sekuen gen ITS yang dieksplorasi melalui situs NCBI. Sebanyak 6 hingga 9 sampel *M. alba* digunakan, dengan panjang basa sekuen tidak melebihi 1000 agar dapat disejajarkan menggunakan perangkat lunak.

Eksperimen yang dilakukan secara *in-silico* pada penelitian ini terdapat 6 tahap. Tahap pertama mengunduh database *M. alba* melalui laman NCBI. Tahap kedua menentukan *regions conserve* dengan software BioEdit. Setiap sekuen yang telah diunduh disimpan dalam format FASTA. Tahap ketiga mendesain sekuen gen pada NCBI Primer-BLAST. Tahap keempat menganalisis posisi primer dengan software Snapgene. Tahapan kelima menganalisis desain primer pada laman uMelt. Tahap keenam menganalisis primer pada laman Mfold.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Terdapat dua tabel yang menggambarkan database gen ITS *M. alba*, dengan enam sekuen gen ITS dan sembilan gen ITS *M. alba*. Eksplorasi database di situs NCBI menghasilkan enam dan sembilan sekuen gen ITS *M. alba*, di mana

enam sekuen *M. alba* berhasil diunduh dan disimpan dalam format FASTA. Format FASTA yang diunduh digunakan untuk merancang primer yang akan menjadi target.

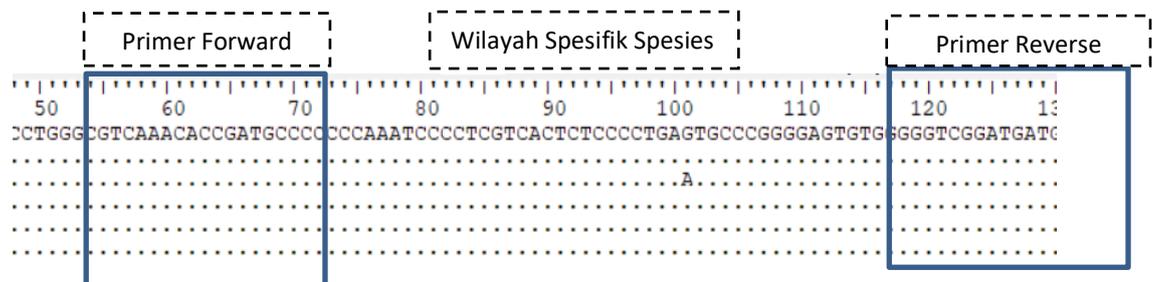
Tabel 1. Hasil explorasi 6 database *M. alba* ITS

Akses	No.	ID Gen	Sekuen Gen
>MH187221.1	Akses 1 <i>M. alba</i> voucher 1	1540352147	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>MH187218.1	Akses 2 <i>M. alba</i> voucher 2	1540352144	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>MH187216.1	Akses 3 <i>M. alba</i> voucher 3	1540352142	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>MH187217.1	Akses 4 <i>M. alba</i> voucher 4	1540352143	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>HQ144172.1	Akses 5 <i>M. alba</i> voucher 5	304636283	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>JN407492.1	Akses 6 <i>M. alba</i> voucher 6	345106436	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>

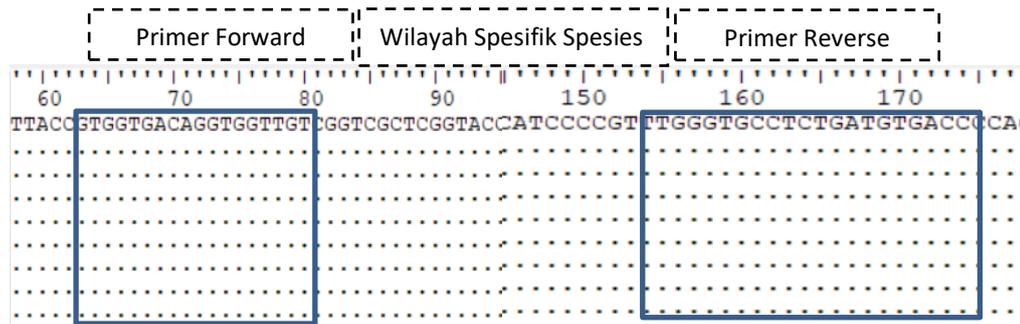
Tabel 2. Hasil eksplorasi 9 database *M. alba* ITS

Akses	No.	ID Gen	Sekuen Gen
>HQ144172.1	Akses 1 <i>M. alba</i> voucher 1	304636283	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>MH187218.1	Akses 2 <i>M. alba</i> voucher 2	1540352144	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
1	Akses 3 <i>M. alba</i> voucher 3	304636284	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>HQ144173.1	Akses 4 <i>M. alba</i> voucher 4	2533238413	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>OR251283.1	Akses 5 <i>M. alba</i> voucher 5	2533238407	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>OR251277.1	Akses 6 <i>M. alba</i> voucher 6	222084045	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>FJ599759.1	Akses 7 <i>M. alba</i> voucher 7	2533238410	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>OR251280.1	Akses 8 <i>M. alba</i> voucher 8	2533238408	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>OR251278.1	Akses 9 <i>M. alba</i> voucher 9	2533238412	<i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>
>OR251282.1			

BioEdit berhasil menyelaraskan sekuen gen ITS *M. alba* dengan 201 pasangan basa yang telah dipotong. Dari semua daerah konservatif yang telah diselarasakan, hanya ada satu pasangan basa yang berbeda. Tampilan grafis yang ditampilkan oleh BioEdit menunjukkan bahwa pada akses 3 *M. alba*, terdapat adenin di urutan ke-101 dan timin di urutan ke-139.



Gambar 1. Hasil pensejajaran ITS *M. alba* dari 6 sekuen gen ITS *M. alba*



Gambar 1. Hasil pensejajaran ITS *M. alba* dari 9 sekuen gen ITS *M. alba*

Tabel 3. hasil running *Primer-BLAST* NCBI pertama

Primer Pair 6 Product length 80	Panjang basa	start	stop	TM	GC%	Self Complementarity	Self 3' Complementarity
Forward : TGGGCGTCAAAC ACCGAT	18	50	67	√	√	3.00	√
Reverse : ATCATCCGACCCC CACACTC	20	129	110	√	√	3.00	√

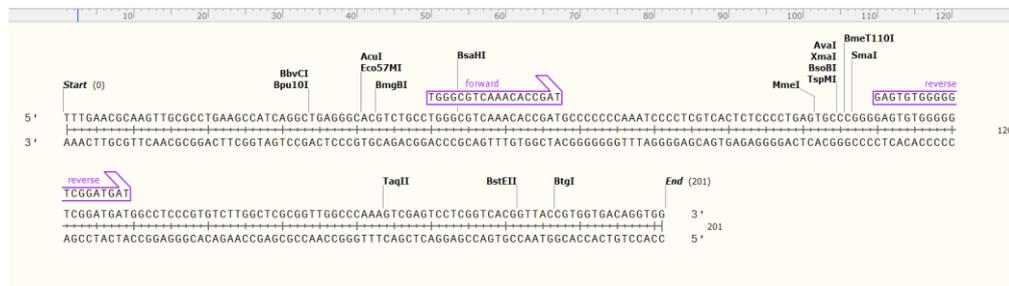
Tanaman *M. alba* memiliki data yang bervariasi terkait panjang basa, *self 3' complementarity*, suhu leleh (TM), dan persentase GC%, menurut hasil dari *running Primer-BLAST* NCBI yang pertama. Penting untuk mempertimbangkan faktor-faktor ini agar dapat menghindari pembentukan primer dimer pada langkah-langkah berikutnya. Primer pair 6 adalah salah satu dari sembilan pasang basa yang dihasilkan untuk tanaman *M. alba* yang memenuhi kriteria untuk analisis lebih lanjut. Persentase GC dan suhu leleh dari primer pair 6 sesuai dengan parameter yang ditetapkan. Selain itu, dibandingkan dengan pasang basa lainnya, *self complementarity* dari primer *forward* dan *reverse* pada primer pair 6 mencatat angka terendah, yaitu 3.00.

Tabel 4. hasil running *Primer-BLAST* NCBI Kedua

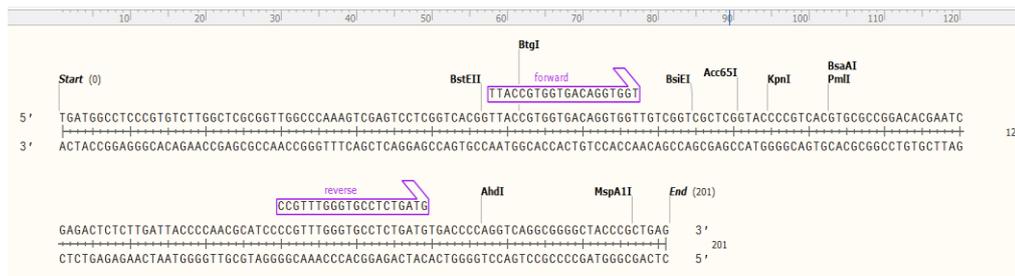
Primer Pair 9 Product length 112	Panjang basa	start	Stop	TM	GC%	Self Complementarity	Self 3' Complementarity
Forward : TTACCGTGGTGACA GGTGGT	20	58	77	√	√	4.00	√
Reverse : CACACTC	20	169	150	√	√	3.00	√

CATCAGAGGCACCC AAACGG							
--------------------------	--	--	--	--	--	--	--

Tanaman *M. alba* menunjukkan data yang tidak konsisten mengenai panjang basa dan *self-3' complementarity*, menurut temuan dari *running* kedua *Primer-BLAST* NCBI. Primer pair 9 adalah salah satu dari sepuluh pasang basa yang dihasilkan untuk tanaman *M. alba* yang dapat digunakan untuk penyelidikan lebih lanjut. Suhu leleh dan persentase GC dari primer pair 9 memenuhi kriteria. Untuk primer pair 9, primer *forward* memiliki *self complementarity* sebesar 4.00, sedangkan primer *reverse* memiliki *self complementarity* sebesar 3.00. Kriteria untuk *self 3' complementarity* juga harus diperhatikan, meskipun *self complementarity* pada primer pair 6 lebih rendah dibandingkan dengan primer pair 9.

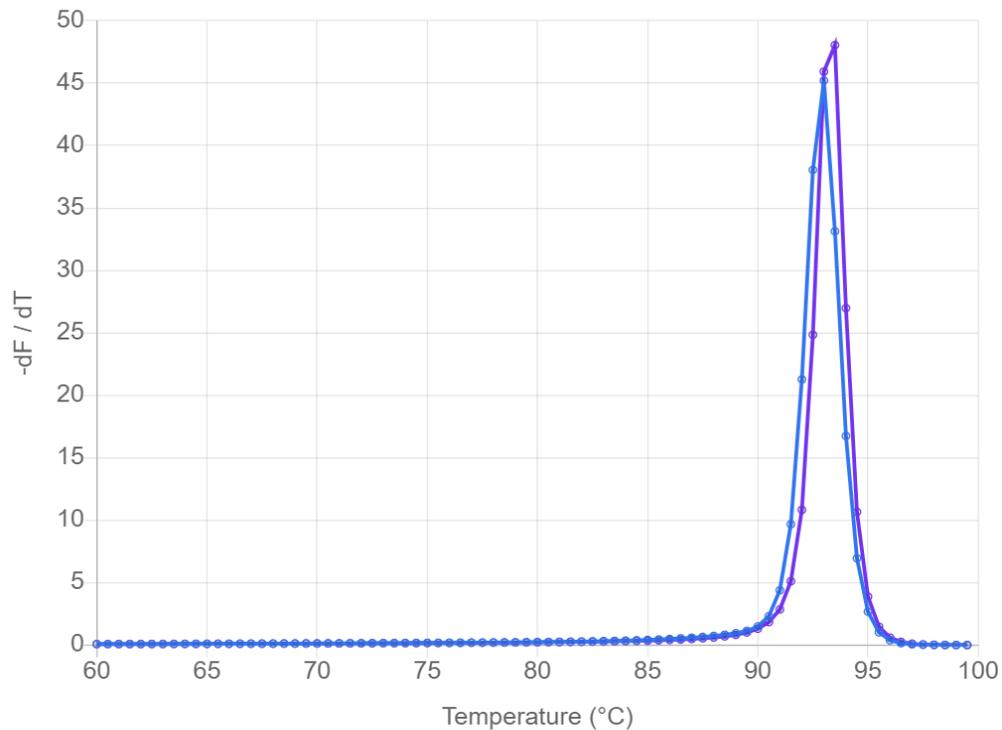


Gambar 2. posisi *forward* dan *reverse primer* pair 6 dari software *Snapgene*



Gambar 3. posisi *forward* dan *reverse primer* pair 9 dari software *Snapgene*

Hasil dari perangkat lunak *Snapgene*, pada primer pair 6 primer *forward* memiliki panjang 18 pasang basa dan terletak di antara posisi 50 hingga 68. Primer *reverse* memiliki panjang 20 pasang basa dan terletak dari posisi 110 hingga 129. Daerah sekuen gen yang mencakup posisi dari 50 hingga 129, atau total 80 pasang basa, akan digunakan untuk menentukan suhu leleh di situs web *uMelt*. Hasil dari perangkat lunak *Snapgene*, primer *forward* memiliki panjang 20 pasang basa dan terletak di antara posisi 58 hingga 77. Primer *reverse* juga memiliki panjang 20 pasang basa dan terletak di antara posisi 150 hingga 169. Daerah sekuen gen yang mencakup 112 pasang basa dari posisi 58 hingga 169 akan digunakan untuk menentukan suhu leleh di situs web *uMelt*.



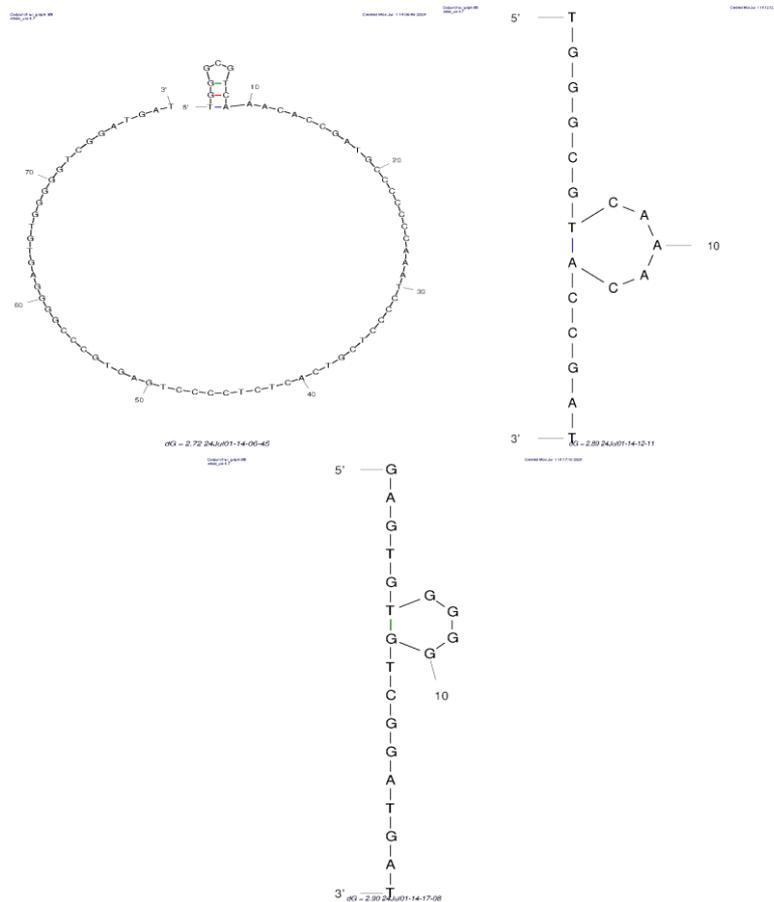
Gambar 4. Temperature melting primer pair 6 dan primer pair 9 pada laman uMelt

Nilai suhu leleh (T_m) untuk primer pair 6 dan 9 diprediksi dengan akurat oleh perangkat lunak uMelt dan disajikan dalam bentuk kurva leleh. Hasil dari primer pair 6 diwakili oleh kurva biru, sedangkan hasil dari primer pair 9 diwakili oleh kurva ungu. Tidak ada tumpang tindih antara target, karena nilai T_m dari kedua pasang basa tersebut, yang berkisar antara 0,1 hingga 0,5°C, tidak berbeda secara signifikan. Menariknya, nilai T_m tertinggi untuk primer pair 6 tidak jauh berbeda dibandingkan dengan primer pair 9. Nilai T_m yang diamati untuk primer pair 6 adalah 93°C, sedangkan nilai T_m untuk primer pair 9 adalah 93,5°C, menunjukkan adanya selisih sebesar 0,5°C. Salah satu keuntungan dari uMelt adalah kemampuannya untuk meniru nilai T_m dengan mempertimbangkan komposisi reagen, termasuk kandungan $MgCl_2$, konsentrasi garam, dan resolusi pembacaan. Dengan demikian, simulasi ini lebih mirip dengan kondisi dunia nyata. Selain itu, memprediksi profil kurva pasca-PCR adalah aplikasi berguna lainnya dari pendekatan ini yang dapat memperpendek durasi eksperimen (Waluyo *et al.*, 2021).

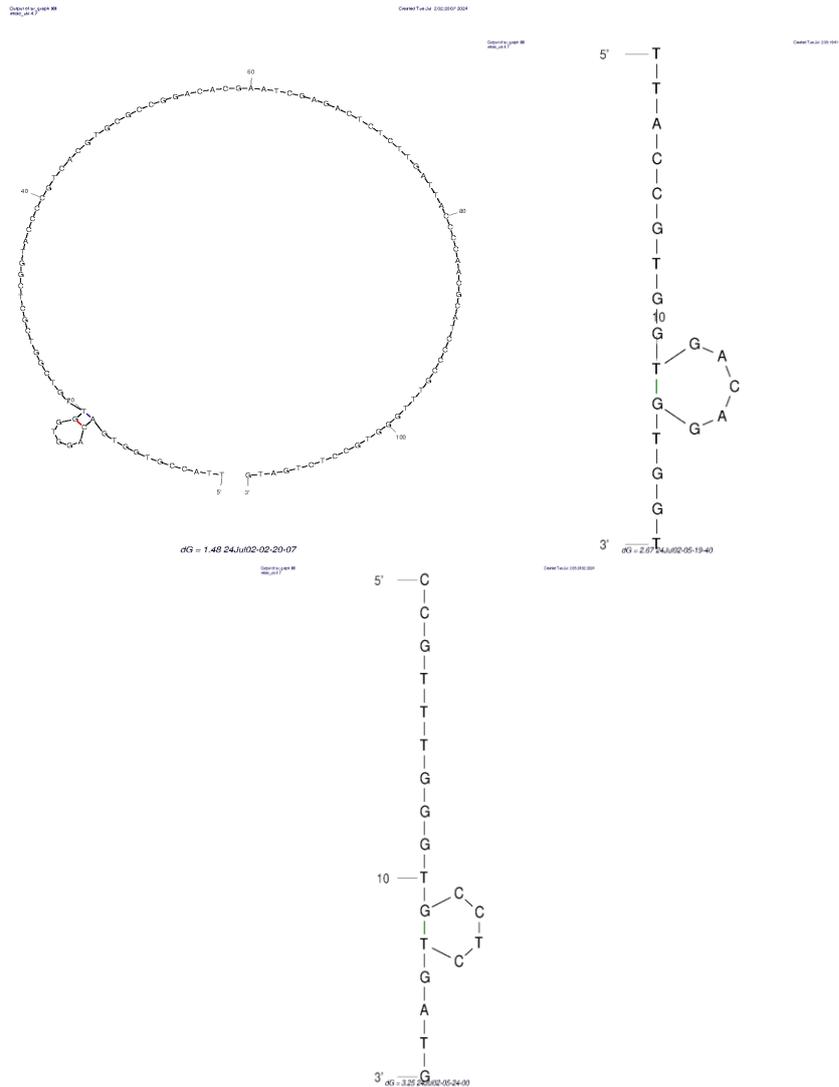
Primer yang baik seharusnya memiliki persentase G dan C antara 40 hingga 60 persen. *Low self 3' complementarity* adalah syarat lain untuk primer yang baik karena mencegah pelekatan antar pasangan primer dan pembentukan struktur hairpin (Safitri *et al.*, 2018). Primer harus dipilih dengan mempertimbangkan faktor-faktor berikut: panjang primer, kandungan GC, suhu leleh (T_m), dan ikatan di ujung 3'. Primer yang baik seharusnya memiliki panjang antara 18 hingga 30 pasang basa. Penempelan primer yang tidak spesifik dapat terjadi ketika primer

memiliki panjang lebih dari 30 pasang basa. Tm adalah faktor kedua yang harus diperhatikan dalam pemilihan primer. Selisih Tm dari primer yang baik seharusnya sekitar 5°C. Hal ini untuk memastikan bahwa proses amplifikasi tidak melambat. Karena jumlah basa G dan C dapat mempengaruhi Tm suatu primer, persentase basa G dan C juga harus diperhatikan (Sari, 2018).

Dalam reaksi PCR, struktur sekunder seperti dimer atau hairpin seharusnya tidak ada. Stabilitas struktur sekunder ditentukan oleh suhu leleh dan energi bebas (ΔG). Akibatnya, primer tidak menempel pada templat. Hairpin adalah struktur yang ditemukan dalam asam nukleat yang terbentuk ketika urutan komplementer dari DNA atau RNA untai tunggal berpasangan. Meskipun sangat sulit untuk menghasilkan primer tanpa struktur hairpin, diharapkan untuk menghindari pembentukan struktur loop atau hairpin dalam primer (Sasmito *et al.*, 2014).



Gambar 5. struktur basa nitrogen primer pair 6



Gambar 6. struktur basa nitrogen primer pair 9

Struktur basa nitrogen adalah hasil dari proses Mfold. Seperti yang terlihat pada Gambar 5, primer pair 6 mengandung hairpin loop dan primer dimer dengan panjang basa nitrogen sebanyak 80 pasang. Elemen struktural yang diperoleh meliputi *double helix* dengan tiga pasang basa, hairpin loop pada G 3-T 7, lingkaran eksternal dengan 71 basa nitrogen, dan tumpukan primer dimer pada T 1-A 9 dan G 2-C 8. Pada Gambar 5 elemen struktural dari 20 pasang basa pada primer *forward*, terdapat *hairpin loop* di posisi T 7-A 13 dan 11 basa nitrogen dalam lingkaran eksternal. Dari 20 pasang basa pada primer reverse yang ditunjukkan di Gambar 4.10, elemen struktural yang dihasilkan adalah hairpin loop pada basa T 6-G 11 dan lingkaran eksternal dengan 14 basa nitrogen. Menariknya, baik pada primer forward maupun reverse tidak ditemukan primer dimer.

Lingkaran eksternal dengan 103 basa nitrogen, tumpukan primer dimer pada basa A 12-T 20, *double helix* dengan dua pasang basa, dan *hairpin loop* pada

basa C 13-G 19 adalah hasil yang diperoleh dari output Mfold untuk primer pair 9 pada Gambar 6. Fitur struktural dari primer forward yang ditunjukkan pada Gambar 6 terdiri dari hairpin loop pada T 10-G 16 dan lingkaran eksternal dengan 13 basa nitrogen. Menurut data dari Gambar 6., fitur struktural dari primer reverse adalah *hairpin loop* pada basa T 5-G 10 dan lingkaran eksternal dengan 14 pasang basa. Seperti primer pair 6, fitur menarik dari primer pair 9 adalah bahwa baik primer forward maupun reverse tidak mengandung primer dimer.

KESIMPULAN

Layanan akses data nukleotida ditawarkan oleh NCBI untuk desain primer secara *in-silico*. Desain primer dengan penanda molekuler sangat penting untuk pemuliaan tanaman. Pada tanaman *M. alba*, urutan gen ITS sangat penting dalam proses amplifikasi. Pasangan primer yang diperiksa oleh NCBI *Primer-BLAST* menunjukkan adanya pasangan basa yang sesuai untuk digunakan. Sangat penting untuk memperhatikan Tm dan GC% dari sampel. Untuk memastikan pasangan basa cocok untuk digunakan, suhu serta panjang primer *forward* dan *reverse* juga harus diperhitungkan. Panjang 18-20 pasang basa pada primer *forward* dan *reverse* menghasilkan hasil yang baik untuk Tm dan GC%. Untuk memaksimalkan spesifisitas terhadap gen target dan mengurangi kemungkinan pembentukan primer dimer, desain primer yang efektif untuk mengamplifikasi gen ITS dari *M. alba* harus mempertimbangkan GC% yang tepat, Tm yang memadai, dan panjang primer. Analisis *in-silico* yang dibantu perangkat lunak diperlukan untuk memastikan parameter memenuhi spesifikasi desain. Penggunaan perangkat lunak Snapgene, uMelt, dan Mfold untuk desain struktur primer menghasilkan hasil yang penting. Struktur basa nitrogen yang diperoleh perlu diperhatikan adanya primer yang mengandung hairpin loop dan primer dimer.

DAFTAR RUJUKAN

- Ayu Safitri, T., Nurul Jannah Patty, D., & Saraswati, H. (2018). Gen L1 Hpv 16 Dan 18 Sebagai Dasar Dalam Desain Primer Untuk Deteksi Kanker Leher Rahim Dengan in-House Multiplex Pcr. *Ijobb*, 2(2), 67–71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Azrai, M. (2005). Pemanfaatan markah molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. *Jurnal AgroBiogen*, 1(1), 26–37.
- Eling Sasmito, D. K., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. In *Seminar Nasional Informatika Medis*.
- Nuraida, D. (2012). Pemuliaan tanaman cepat dan tepat melalui pendekatan marka molekuler. *El-Hayah: Jurnal Biologi*, 2(2).



- Saraswati, H., & Dwi Wahyuni, F. (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. <http://unafold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt>
- Waluyo, S., Malau, J., Raekiansyah, M., Yulian, E., & Hardiman, I. (2021). In-silico Analysis of Actin Gene as a Candidate for DNA Non-Halal Detection Base on Real-Time PCR. *Indonesian Journal of Halal Research*, 3(2), 70–74. <https://doi.org/10.15575/ijhar.v3i2.12123>