

TEKNIK DESAIN PRIMER UNTUK AMPLIFIKASI GEN TUJUAN KLONING DARI DNA *Agrobacterium tumefaciens*

*Primer Design Techniques for Gene Amplification Purpose of Cloning of DNA *Agrobacterium tumefaciens**

Riski Indradewi^{1*} Budi Saksono² dan Sri Damayanti³

¹⁾Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Cokroaminoto Palopo

²⁾Pusat Riset Biomassa dan Bioproduk Badan Riset dan Inovasi Nasional

³⁾Program Studi Pendidikan Bahasa Inggris, Universitas Cokroaminoto Palopo

^{1*)}riskiindradewi@uncp.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan teknik desain primer untuk amplifikasi gen penyandi enzim dengan tujuan kloning dari DNA genom *Agrobacterium tumefaciens*. Metode pengumpulan informasi dari penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung dan melakukan studi pustaka untuk menarik kesimpulan. Prosedur penelitian dimulai dari mengoleksi sekuen DNA genom *Agrobacterium tumefaciens* dari *gene bank* (NCBI), desain primer menggunakan *Genamics expression* dan penambahan situs restriksi. Primer yang telah diperoleh dikonfirmasi melalui perangkat lunak past PCR dan amplifikasi gen dengan teknik *polymerase chain reaction*. Produk hasil amplifikasi dikonfirmasi menggunakan enzim restriksi Sall. Hasil penelitian yang telah diperoleh berupa produk PCR berukuran 870 bp dan hasil konfirmasi menggunakan enzim Sall menghasilkan dua pita yaitu berukuran 358 bp dan 512 bp. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa teknik desain primer tujuan amplifikasi gen untuk kloning dapat dilakukan yaitu dengan kombinasi antara software dan melakukan penyisipan situs restriksi secara manual.

Kata kunci: *Agrobacterium tumefaciens, desain primer, DNA, PCR*

ABSTRACT

*This study aims to produce a primer design technique for amplification of the gene encoding enzyme towards the cloning of gene from *Agrobacterium tumefaciens*. The genes information were collected from literatures study to decide the target gene and primer design. Methods: Firstly, we used genome sequences of the *Agrobacterium tumefaciens* which is available on the gene bank (NCBI) to design a pairs of primers, using *Genamics expression*, for amplifying the gene target. We also added restriction sites into the primers sequence. The specificity of primers designed then were evaluated by past PCR in silico software using the genome sequences as template and were confirmed by polymerase chain reaction amplification technique using the genome isolated from *Agrobacterium tumefaciens* as template. The target gene was confirmed using the restriction enzyme Sall. Results: From Fast PCR amplification in silico, we obtained a single band with size of 870 bp, means that the primer designed were specific to the target gene. The PCR product has the same size with those of insilico study, and was digested with the Sall restriction enzyme, resulting two fragments with length of 358 bp and 512 bp, respectively. Conclusion: the amplified genes was the target gene and the primers were successful designed.*

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens, DNA, PCR, primer design*

PENDAHULUAN

Polimerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknologi yang mampu melipat gandakan suatu fragmen DNA tertentu. Proses penggandaan ini membutuhkan

beberapa komponen diantaranya DNA cetakan, oligonukleotida primer, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), dan enzim DNA polymerase. Setiap komponen

yang digunakan memiliki fungsi tersendiri pada proses ini, dan sangat mempengaruhi keberhasilan dalam proses penggandaan suatu fragmen DNA. Sedangkan kespesifikan suatu produk PCR yang dihasilkan sangat ditentukan oleh sepasang primer yang digunakan (Apte and Daniel, 2009; Salomonsen, *et al.*, 2014).

Primer merupakan fragmen DNA yang terdiri atas beberapa urutan pasang basa. Sekuen ini digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Untuk itu, Sekuen nukleotida yang akan didesain harus sesuai dengan bagian dari DNA yang akan digandakan. Sekuen primer bisa diperoleh dari hasil penelitian yang telah dipublikasi, atau dengan menggunakan perangkat lunak yang dapat memberikan rekomendasi primer dalam waktu yang lebih cepat. Perangkat lunak yang biasa digunakan diantaranya *Genamics expression, primer 3, Bioedit, NCBI* dan sebagainya (Camilo, 2016; Suparman, 2016). Rekomendasi primer yang dihasilkan masih memerlukan penyesuaian sekuen untuk menambahkan situs restriksi, sehingga perlu dilakukan kombinasi proses dalam mendesain primer untuk memperoleh primer yang sesuai.

Desain primer merupakan langkah awal yang dilakukan sebelum memulai amplifikasi suatu fragmen DNA tertentu.

Keberhasilan primer untuk mengamplifikasi suatu fragmen DNA yang menyandakan suatu enzim tertentu dari genom organisme dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya sekuen penyusun primer, ukuran primer, suhu penempelan dan komposisi kandungan GC. Kesalahan dalam desain primer dapat berdampak pada ketidakspesifikan produk PCR yang dihasilkan dan tidak dapat mengamplifikasi suatu fragmen DNA secara keseluruhan (Apte dan Daniel, 2009; Aisah, 2018). Untuk itu, penelitian tentang teknik desain primer untuk mengamplifikasi satu gen untuk tujuan kloning perlu dilakukan.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Metode pengumpulan informasi dilakukan dengan cara observasi langsung dan melakukan studi pustaka untuk menarik kesimpulan dari berbagai hasil penelitian yang telah dipublikasi. Literatur tambahan lain yang digunakan dapat berupa jurnal, buku-buku, serta sumber lain yang kredibel.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini dimulai dari mengkoleksi sekuen DNA *Agrobacterium tumefasien* dari data base yang ada di NCBI. Primer yang telah diperoleh dari *Genamics expression* kemudian disisipi situs enzim

restriksi pada sekuen primer tersebut. Primer yang telah diperoleh digunakan untuk proses amplifikasi gen target. Hasil amplifikasi secara *in vitro* dianalisis menggunakan DNA elektroforesis untuk melihat kualitas dan kuantitas produk PCR yang dihasilkan. Produk PCR dikonfirmasi menggunakan enzim restriksi Sall.

Bahan dan Alat

Penelitian ini menggunakan bahan berupa sekuen DNA dari *Agrobacterium tumefaciens* dan DNA genom yang telah dikoleksi. Amplifikasi menggunakan komponen dari *Dream Taq Green PCR Master Mix* (Promega, USA). Analisis kualitas dan kuantitas produk hasil PCR menggunakan agarose 1%. Alat yang digunakan yaitu perangat lunak *Genamics expression* dan Bioedit. Mesin PCR (Thermocycler gradient TC 5000, USA), Sentrifugasi (Hettich Mikro 200R, Germany), dan DNA Elektroforesis (Mupid), serta beberapa *software* pendukung lainnya.

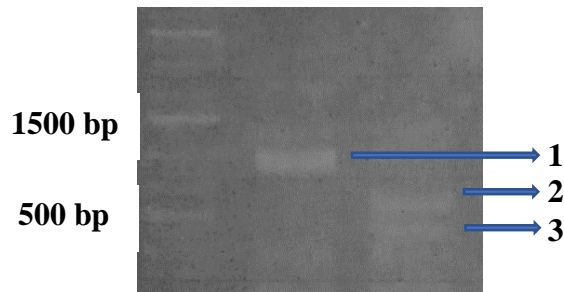
HASIL DAN PEMBAHASAN

Desain primer menggunakan *Genamics expression* memberikan hasil berupa beberapa rekomendasi primer dengan kriteria yang digunakan yaitu *length range* 19 sampai 21 nukleotida, *GC range* sebesar 40% - 60% dengan *Tm range* menacapai 50

sampai 75°C. Primer *forward* dan *reverse* yang dipilih dari rekomendasi yang memiliki urutan sekuen yaitu F 5'-AGACACCCATGAAACACGG -3' dan R 5'-CAGCCACCAAGAACGAAGC-3'.

Hasil analisis menggunakan bioedit diperoleh informasi bahwa sekuen yang akan diamplifikasi tidak dikenali oleh enzim restriksi NdeI dan XhoI serta beberapa enzim restriksi lainnya. Enzim NdeI dan XhoI merupakan dua enzim restriksi yang memiliki urutan sekuen yaitu CATATG dan CTCGAG. Situs restriksi NdeI pada penelitian ini dikombinasikan pada sekuen primer *forward* dan XhoI dengan primer *reverse*.

Hasil konfirmasi menunjukkan bahwa sepasang primer yang telah dikombinasi dengan situs enzim restriksi telah mampu mengamplifikasi secara *in vitro* fragmen DNA dengan ukuran sebesar 870 bp dengan menggunakan cetakan dari DNA genom *A. tumefaciens* hasil isolasi (Gambar 1). Produk hasil PCR yang telah diperoleh selanjutnya dikonfirmasi menggunakan enzim Sall. Situs pengenalan enzim Sall berada pada urutan ke 358 basa pada sekuen yang diamplifikasi. Untuk itu, dihasilkan produk yang berukuran 358 bp dan berukuran berkisar 512 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Produk Hasil Amplifikasi ukuran 870 bp (1), produk pcr hasil pemotongan enzim restriksi SalI ukuran 358 bp (2) dan 512 bp (3).

Produk PCR yang dihasilkan dari hasil amplifikasi memiliki ukuran sebesar 870 bp. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa primer yang digunakan adalah primer spesifik yang memiliki kesamaan pada bagian sekuen DNA genom *A. tumefaciens* yang digunakan sebagai cetakan. Meskipun dilakukan perubahan pada urutan sekuen primer dalam hal ini yaitu adanya penambahan situs enzim restriksi tetapi hal ini tidak mempengaruhi proses amplifikasi. Penyisipan situs restriksi pada penelitian ini yaitu untuk memudahkan proses memasukkan gen ke suatu plasmid untuk tujuan kloning.

Hasil penelitian ini didukung oleh Indradewi, dkk (2017) yang menunjukkan adanya produk PCR yang berukuran 870 bp yang diperoleh dengan menggunakan DNA genom dari *A. tumefaciens* sebagai cetakan dalam proses amplifikasi secara *in vitro*. Hal serupa juga dilaporkan oleh Kim *et al.*,

(2006). Selain itu, menurut Aisah, dkk (2018) bahwa situs enzim restriksi pada molekul DNA diperlukan untuk menghasilkan rekombinan molekul DNA.

Teknik desain primer yang dilakukan pada penelitian ini dimulai dari menyiapkan koleksi sekuen genom *A. tumefaciens* dari bank gen (NCBI). Sekuen yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan *Genamics expression* untuk memperoleh beberapa rekomendasi primer. Hanya primer yang dapat menghasilkan produk PCR sebesar 870 sampai 880 bp yang akan dipilih. Selanjutnya sekuen nukleotida yang akan diamplifikasi analisis menggunakan sofwer Bioedit untuk memperoleh informasi tentang enzim restriksi yang bias digunakan. Berdasarkan hal itu, diperoleh informasi bahwa enzim NdeI dan XhoI dapat digunakan pada primer yang dipilih. Selanjutnya dilakukan penambahan situs restriksi pada sekuen primer secara manual. Menurut Apte dan Daniel (2009) bahwa primer yang dirancang dengan baik akan menghasilkan produk PCR yang spesifik dan sebaliknya jika primer yang dirancang dengan tidak baik bisa menghasilkan sedikit bahkan tidak ada produk hasil PCR, karena amplifikasi nonspesifik atau pembentukan primer-dimer yang bisa menyebabkan kegagalan reaksi, meskipun ketika semua

parameter lainnya telah dioptimalkan dengan benar.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh dari hasil penelitian ini yaitu teknik desain primer tujuan amplifikasi gen untuk kloning dapat dilakukan dengan cara kombinasi antara studi bioinformatic dengan penambahan situs enzim restriksi secara manual yang selanjutnya menggunakan riset basah sebagai pembuktiannya.

DAFTAR PUSTAKA

Aisah, I. Litani, F.N, Hendra, S.M. (2018). Rekombinasi Molekul DNA. *Jurnal Ilmiah Matematika dan Pendidikan Matematika*. Vol.10 (1): 2550-0422.

Apte, A. and S. Daniel. (2009). *PCR Primer Design*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vo.4(3). doi:10.1101/pdb.ip6.

Camilo, C.M. Lima, G.M.A., Maluf, F.V., Guido, R.V.C and Polikarpov, G. (2016). HTP-Oligo Designer: An Online Primer Design Tool for High-Throughput Gene Cloning and Site-Directed Mutagenesis. *Journal of Computational Biology*. Vol.23 (1). DOI: 10.1089/cmb.2015.0148.

Indradewi, R., B. Saksono, dan Miftahudin. (2017). *Isolasi, Kloning, dan Eksresi Gen dpe dari Agrobacterium tumefaciens sebagai gen penyandi Enzim D-Psicose 3-Epimerase (DPEase)*. Tesis. <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/91476>.

Kim, K., H.J. Kim, D.K. Oh, S.S. Cha and S. Rhee. (2006). Crystal Structure of D-psicose3-Epimerase from *Agrobacterium tumefaciens* and its complex with true substrate D-fructose:

A pivotal role of metal in catalysis, an active site for the non-phosphorylated substrate, and its conformational changes. *J. Mol. Biol.* 72: 981-985 (2006).

Salomonsen B., U. H. Mortensen, and B.A. Halkier. (2014). *DNA Cloning and Assembly methods: USER-Derived Cloning Methods and Their Primer Design*. Humana Press. New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8>.

Suparman, H.Ahmad, Z.Ahmad. (2016). Desain Primer PCR secara In Silico untuk Amplifikasi gen COI pada Kupu-Kupu *Papilio Ulysses Linnaeus* dari Pulau Bacan. *Jurnal Pendidikan Matematika dan IPA*. Vol.7 (1):14-24.

WWW. Designing Primers for PCR (genamics.com). Diakses tanggal 2 Agustus 2022.