



Desain *Primer In Silico* Untuk Amplifikasi Genus Andaliman Dengan Aplikasi Bioinformatika

Jesica Widiya Batubara¹, Reinelda Gultom², Aprinia Hutagaol³, Gita Gabriela Parapat⁴, Rivaldi Ariansah Marpaung⁵, Rini Hafzari^{6*}, Ayu Putri Ningsih⁷, Rio Marthin Pasaribu⁸

¹²³⁴⁵⁶⁷⁸ Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Medan, Sumatera Utara, Indonesia

Abstrak: Desain primer merupakan tahapan awal dalam proses amplifikasi dan analisis segmen DNA. Desain primer pada proses PCR merupakan hal yang sangat penting karena primer tersebut yang akan menempel pada DNA template lalu mengamplifikasi sekuen target. Penelitian ini bertujuan merancang primer spesifik untuk amplifikasi gen target pada Andaliman, guna mendukung studi molekuler lebih lanjut. Desain primer dilakukan secara *in silico* menggunakan software MEGA X, Primer3Plus, dan Clone Manager Demo 9. Sekuen gen Andaliman diperoleh dari database NCBI. Hasil analisis menunjukkan bahwa pasangan primer yang dirancang memenuhi kriteria panjang, temperatur leleh, dan kandungan GC yang ideal untuk reaksi PCR. Selain itu, primer juga tidak membentuk dimer atau hairpin yang dapat mengganggu efisiensi amplifikasi. Primer yang telah diperoleh dapat digunakan sebagai dasar untuk pengembangan marka molekuler pada Andaliman, yang berguna untuk identifikasi varietas, analisis filogenetik, dan program pemuliaan.

Keywords: Desain Primer, PCR, Andaliman, Gen Target, *In Silico*

DOI:

<https://doi.org/10.47134/biology.v1i4.3283>

*Correspondensi: Rini Hafzari

Email : rinihafzari@unimed.ac.id

Received: 28-06-2024

Accepted: 28-07-2024

Published: 29-08-2024



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Primer design is the initial stage in the process of amplification and analysis of DNA segments. Primer design in the PCR process is very important because the primer will attach to the DNA template and then amplify the target sequence. This research aims to design specific primers for amplification of target genes in Andaliman, to support further molecular studies. Primer design was carried out in silico using MEGA X, Primer3Plus, and Clone Manager Demo 9 software. The Andaliman gene sequence was obtained from the NCBI database. The analysis results show that the designed primer pairs meet the ideal criteria for length, melting temperature and GC content for PCR reactions. Apart from that, the primers also do not form dimers or hairpins which can interfere with amplification efficiency. The primers that have been obtained can be used as a basis for developing molecular markers in Andaliman, which are useful for variety identification, phylogenetic analysis and breeding programs.*

Keywords: *Primer Design, PCR, Andaliman, Target Gene, In Silico*

Pendahuluan

Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) merupakan tumbuhan endemik Sumatera Utara yang termasuk dalam famili Rutaceae. Tumbuhan ini telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat Batak sebagai bumbu masakan tradisional dan dipercaya memiliki berbagai khasiat obat. Keberadaan andaliman yang semakin langka di habitat aslinya memerlukan upaya konservasi dan pengembangan varietas unggul melalui

pendekatan molekuler (Wijaya, 2018). Salah satu teknik yang umum digunakan untuk menganalisis kehalalan suatu produk adalah Polymerase Chain Reaction (PCR). Kelebihan PCR meliputi spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi dibandingkan dengan teknik lain. Selain itu, PCR dapat mengidentifikasi banyak sampel dengan risiko kontaminasi yang rendah. Namun, kelemahannya adalah kebutuhan akan DNA probe (fragmen DNA, RNA, atau protein yang menandai gen target) untuk mencapai hasil yang optimal dalam proses pengujian (Fakih, 2021).

Desain primer adalah langkah awal dalam amplifikasi dan analisis segmen DNA (Amaniyah, 2023). Dalam proses PCR, desain primer sangat krusial karena primer tersebut akan melekat pada DNA template dan mengamplifikasi sekuen target. Sepasang primer oligonukleotida, yaitu primer forward dan reverse, akan berikatan dengan DNA target selama proses annealing (Chukwuemeka, 2020). Urutan basa nukleotidanya harus sesuai dengan urutan basa nukleotida dari sekuen target. Studi *in silico* merupakan gabungan ilmu biologi dan komputasi yang menggunakan komputer dan perangkat lunak yang dapat membantu dalam merancang kandidat primer. (Fakih, 2021).

MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) adalah perangkat lunak yang berguna untuk mendesain primer secara *in silico*. Software ini menyediakan berbagai fitur yang memudahkan dalam analisis sekuen DNA dan desain primer, termasuk kemampuan untuk mempertimbangkan parameter-parameter penting seperti panjang primer, temperatur melting, kandungan GC, dan kemungkinan pembentukan struktur sekunder (Tamura *et al.*, 2021).

Menurut Menurut Kamus Oxford, Bioinformatika adalah ilmu yang berkaitan dengan pengumpulan dan analisis data biologi, seperti kode genetik. Definisi lainnya menyatakan bahwa bioinformatika adalah pengelolaan sistem informasi untuk biologi molekuler dan memiliki beberapa aplikasi fungsional (Saraswati, 2017). Bioinformatika merupakan bidang interdisipliner yang secara umum didefinisikan sebagai gabungan antara ilmu biologi (terutama biologi molekuler) dan komputasi, menggunakan bantuan komputer dan perangkat lunak (Davi, 2021). Salah satu peran utama bioinformatika ialah merancang dan menghasilkan sekuen primer, yang merupakan komponen penting dalam proses PCR. Primer yang baik harus memiliki sifat spesifik, sedangkan primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Untuk mendapatkan suatu primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk amplifikasi dilakukan desain secara *in silico* (Saraswati *et al.*, 2019).

Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer spesifik untuk amplifikasi gen target pada andaliman menggunakan software MEGA X. Hasil perancangan primer ini diharapkan dapat mendukung studi molekuler andaliman lebih lanjut, seperti identifikasi varietas, analisis filogenetik, dan pengembangan marka molekuler untuk program pemuliaan (Nissa, 2024).

Metodologi

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini merupakan sepasang primer *forward* FrF 5'-GGCATCGCCCGTATTTATGG-3' dan *reverse* RrR 5'-CAGAGCTGCGCCCGTATAAG-3'. Dan peralatan yang digunakan diantaranya adalah aplikasi MEGA 11, program PRIMER 3PLUS, Clone Manager Demo 9 untuk mendesain primer secara *in silico* (Alexandrou, 2020).

Prosedur

Gen tumbuhan andaliman (Zanthoxylum sp)

Sekuen gen tumbuhan andaliman (*Zanthoxylum sp*) yang diperoleh dari situs www.ncbi.nlm.nih.gov digunakan sebagai template dalam mendesain sepasang primer.

Tahapan Desain Primer

Berikut adalah tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini :

1. Mengambil 10 sekuen DNA *Zanthoxylum sp* di NCBI dengan format FASTA
2. Setelahnya, sekuen DNA di alignment pada software MEGA 11 yang kemudian memilih panjang sekuen dna 100-800 sekuen primer yang dianalisis.
3. Kemudian buka we Primer3 Plus untuk mencari design primer
 - a. Desain primer yang sudah dari software MEGA 11 dilanjutkan pada program aplikasi Primer 3 Plus
 - b. Pada "Main" di Primer 3 Plus dimasukkan sekuen DNA yang memiliki panjang 100-800



- c. Lalu General Settings pada Produk Size Ranges = 100-800, dan pada Primer GC% = Min :40, Opt : 60, Max : 80 kemudian klik "Pick Primers"

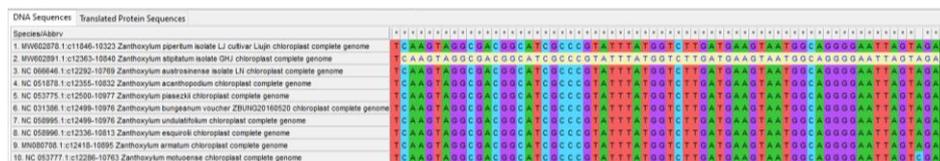
Main	General Settings	Advanced Settings	Internal Oligo	Penalties	Advanced Seq.
Product Size Ranges: 501-600 601-700 401-500 701-850 851-1000 1001-1500 1501-3000 3001-5000 401-500 301-400 21					
Primer Size	Min: 18	Opt: 20	Max: 27		
Primer Tm	Min: 57.0	Opt: 60.0	Max: 63.0	Max Tm Difference: 100.0	
Primer Bound%	Min: -10.0	Opt: 97.0	Max: 110.0	Annealing Temp: 52.0	
Primer GC%	Min: 20.0	Opt: 50.0	Max: 80.0		
Concentration of monovalent cations:	50.0	ANNEALING Oligo Concentration:	50.0	Not the concentration of oligos in the reaction mix!	
Concentration of divalent cations:	1.5	Concentration of dNTPs:	0.6		
DMSO Concentration:	0.0	Formamide Concentration:	0.0		
DMSO Factor:	0.6				
Mispriming/Repeat Library:	NONE				
Load and Save					
To upload or save a settings file from your local computer, choose here:					
Load only Settings from file: <input type="button" value="Choose File"/> No file chosen					

- d. Kemudian setelah beberapa saat akan muncul 10 primer
- Kemudian primer *forward* dan *reverse* dimasukkan ke Clone Manager Demo 9 > direct entry > diberi nama pada primer (F untuk forward dan R untuk reverse) > pilih tipe primer > masukkan sekuen primer yang dipilih

Jika terdapat tulisan merah maka terdapat masalah pada dimers primer atau primer tidak dapat digunakan, namun jika tidak ada tulisan merah maka primer dapat digunakan.

Pembahasan

Pada penelitian ini tahapan yang perlu dilakukan adalah mencari sekuen DNA dari tumbuhan Andaliman (*Zanthoxylum sp.*) yang akan kita desain primernya melalui website <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, lalu melakukan alignment di software MEGA, kemudian memilih nomor urut 100 - 800 sekuen primer gen-gen yang akan dianalisis.



Gambar 1. Sekuens primer varietas 1 yang dianalisis dengan menggunakan software MEGA



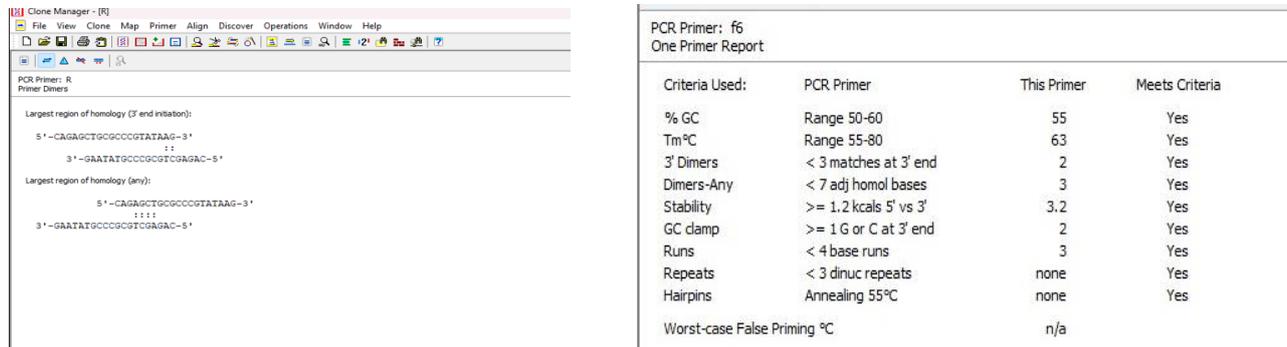
Gambar 2. Sekuens primer varietas 2 yang dianalisis dengan menggunakan software MEGA

Setelah itu, dilakukan desain primer dengan program Primer 3 Plus. Tahap awal desain primer pada program primer 3 plus didapat 10 varietas kandidat primer alternatif pasang primer yang akan dianalisis untuk menentukan primer yang akan digunakan. Berdasarkan hal tersebut, maka dipilih pasangan primer yang sesuai dari varietas tumbuhan Andaliman (*Zanthoxylum sp.*), yaitu pasangan primer nomor 2 (*Zanthoxylum stipitatum*) dan 6 (*Zanthoxylum bungeanum*).



Gambar 3. Tampilan salah satu alternative primer yang dianalisis

Kemudian, dilakukan desain primer secara *in silico* menggunakan program clone manager demo 9. Terdapat 20 panjang primer dengan daerah target 100-800. Sekuen primer dengan kriteria yang dapat digunakan dalam proses PCR yaitu primer FrF 5'-GGCATCGCCCGTATTATGG-3' dan RrR 5'-CAGAGCTGCGCCCGTATAAG-3'. Sekuen primer telah memenuhi kriteria parameter untuk sebuah primer yang digunakan dalam proses PCR.



Gambar 4. Tampilan detail primer yang dianalisis pada program clone manager demo 9

Pada umumnya, primer yang baik memiliki panjang antara 18 sampai 30 oligonukleotida. Dengan panjang ini diharapkan cukup untuk mengikat template pada suhu annealing dan juga mendapatkan sekuen yang lebih spesifik (Pradnyaniti *et al.*, 2013). Panjang antara 18-30 oligonukleotida merupakan primer yang baik karena jika primer yang dihasilkan memiliki panjang kurang dari 18 basa, primer rentan menyebabkan terjadinya *mispriming*. *Mispriming* merupakan terjadinya primer menempel pada tempat yang tidak diharapkan (Tanabe, 2019). Sedangkan jika panjang primer lebih dari 30 basa, hal ini tidak menunjukkan spesifitas yang lebih tinggi dan dapat memunculkan terjadinya proses hibridasi dengan primer lain dan menghambat terbentuknya polimerasi DNA (Sasmitha *et al.*, 2018). Analisis menggunakan Program Primer 3 Plus, yaitu simulasi primer pada tanaman Andaliman (*Zanthoxylum* sp) dengan dua varietas yaitu *Zanthoxylum stipiatum* dan *Zanthoxylum bungeanum*. Program Primer 3 plus ini digunakan karena mempunyai

keunggulan yang efektif dan mudah dioperasikan secara manual serta hasil primer mudah untuk dianalisis (Nugraha, 2022). Berdasarkan analisis yang telah dilakukan, hasil analisis menunjukkan bahwa primer dari dua tanaman tersebut berada dalam kondisi yang sangat baik. Pada primer yang diperoleh dengan analisis menggunakan program clone manager tidak terdapat fragmen DNA yang tidak diinginkan pada ujung 3' ataupun dilain tempat, artinya primer yang didesain tidak berikatan pada primer lain. Primer yang telah didesain juga tidak menempel pada yang primer memiliki banyak ikatan, artinya primer ini bisa digunakan untuk target daerah yang akan ditemplei primer tersebut (Moriarity, 2022).

Primer yang baik adalah primer yang mampu memenuhi kriteria parameter primer. Parameter-parameter tersebut adalah : melting temperature (Tm), persentase jumlah G dan C (%GC), 3'dimer stabilitas, repeats, runs dan hairpins (Maitriani *et al.*, 2015).

Melting temperature (Tm) merupakan salah satu dari beberapa kriteria yang dipertimbangkan dalam menentukan primer yang baik. Primer yang baik, primer forward maupun primer reverse yang digunakan terlebih dalam pcr secara umum adalah antara 60°C hingga 70 °C untuk menghasilkan produk yang baik (Pradnyaniti *et al.*, 2013). Dengan primer yang memiliki Tm terlalu tinggi sangat mempengaruhi hasil produk PCR. Dengan Tm yang tinggi akan mengeluarkan hasil PCR yang rendah. Sedangkan dengan Tm yang terlalu rendah akan mengakibatkan tidak dapat bekerja pada temperature tinggi. Berdasarkan analisis dan pengerjaan dengan program software bioinformatika Tm pada primer dua variates yang telah didesain telah memenuhi kriteria yaitu 63°C. Nilai Tm ini merupakan nilai Tm dari dua varietas yang dianalisis (Culley, 2019).

Kriteria lain adalah persentase GC. Persentase GC yang di maksud adalah persentase keberadaan sitosin dan guanin dalam suatu primer yang dihasilkan, % GC yang baik dalam primer yang baik adalah % yang berada pada rentang 40-60 % (Sasmito *et al.*, 2014). Hasil primer pada dua varietas yang didesain menunjukkan % GC yang sama besar yaitu sebesar 55%. Hasil ini masih dalam rentang kriteria % GC primer yang baik. Primer dengan % GC yang rendah dapat menurunkan kualitas hasil proses PCR, hal ini disebabkan karena primer tidak mampu untuk menempel secara efektif pada target yang diinginkan (Pradnyaniti *et al.*, 2013).

Seperti yang telah disinggung dibagian awal pembahasan penelitian ini, fragmen DNA yang diinginkan pada ujung 3' primer harusnya tidak melebihi 3 basa karena hal ini dapat menurunkan kualitas primer (Pradnyaniti *et al.*, 2013). Primer sebaiknya juga tidak memiliki 3 atau lebih basa guanin atau sitosin pada 3' dimer, karena dapat menetralkan annealing primer non spesifik (Pradnyaniti *et al.*, 2013). Fragmen DNA pada ujung 3' masing-masing primer yang dirancang adalah 1 fragmen pada primer forward dan 2 fragmen pada primer reverse, dan hal tersebut mendukung kualitas dari primer yang dihasilkan pada desain primer ini (Kim, 2019).

Kriteria yang diperhatikan ada juga keberadaan repeats. Repeats merupakan nukleotida yang ditemukan ganda dalam primer, adanya repeats dapat menyebabkan terjadinya penempelan primer di tempat yang tidak diharapkan yang disebut dengan *mispriming* (Maitriani *et al.*, 2015). Pada kedua primer yang telah didesain, primer menunjukkan tidak adanya repeats, dengan ketidakberadaan repeats ini sehingga primer

yang dihasilkan berada dalam kondisi yang baik dan mendukung kualitas primer yang dihasilkan.

Hal lain yang perlu juga diperhatikan dalam desain primer adalah haipins dalam primer. Haipins merupakan interaksi intramolekuler dalam primer. Haipins dalam primer dapat mengganggu proses penempelan primer pada rentang daerah yang diinginkan dalam proses PCR (Li, 2024). Dalam primer dua varietas yang telah didesain tidak ada haipins, sehingga primer ini dinyatakan cukup baik dan dapat digunakan dalam proses PCR.

Primer yang telah didesain ini dapat memotong daerah target dengan tepat sesuai dengan rentang daerah yang telah dirancang secara *in silico* (Donna, 2024). Dengan dukungan atau penggunaan software bioinformatika yang menghasilkan suatu primer menunjukkan bahwa primer dari dua varietas andaliman yang didesain cukup baik untuk dapat digunakan dalam proses PCR dan dapat menghasilkan produk sesuai dengan daerah sasaran yang diinginkan.

Daftar Pustaka

- Amaniyah, M., Febrita, R. E., & Prasetyo, J. A. (2023). Deteksi Marker Genetik dari Sekuen Protein Hewan untuk Autentikasi Halal Melalui Pendekatan Bioinformatika. *Jurnal Agroindustri Halal*, 9(3), 289-299.
- Alexandrou, G. (2020). In-silico automated allele-specific primer design for loop-mediated isothermal amplification. *Proceedings - IEEE International Symposium on Circuits and Systems*, 2020. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?partnerID=HzOxMe3b&scp=85109281227&origin=inward>
- Chukwuemeka, P. O. (2020). In silico design and validation of a highly degenerate primer pair: a systematic approach. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00086-y>
- Culley, T. (2019). Editorial: Growing up and moving forward: Discontinuing Primer Notes. *Applications in Plant Sciences*, 7(10). <https://doi.org/10.1002/aps3.11293>
- Davi, M. J. P. (2021). Design and in silico validation of polymerase chain reaction primers to detect severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91817-9>
- Donna, J. D. (2024). Structural Presumptions for Non-horizontal Mergers in the 2023 Merger Guidelines: A Primer and a Path Forward. *Review of Industrial Organization*, 65(1), 303–345. <https://doi.org/10.1007/s11151-024-09971-z>
- Fakih, T. M., Wijaya, S., & Priani, S. E. (2021). Desain primer gen 12s srna dari dna mitokondria babi (*sus scrofa*) secara *in silico* sebagai kandidat primer dalam analisis molekuler kehalalan produk. *JSEK (Jurnal Sains Farmasi & Klinis)*, 8(3), 316-322.
- Kim, H. (2019). Importance of the 3'-Terminal Nucleotide of the Forward Primer for Nucleoprotein Gene Detection of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus by Conventional Reverse-Transcription PCR. *Indian Journal of Microbiology*, 59(2), 234–236. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00791-4>

- Li, C. Y. (2024). Establishment of a forward primers-superposed amplification analysis for accurate aspirin pharmacogenomic measurement. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51458-0>
- Maitriani, L. K. B., Wirajana, I. N., & Yowani, S. C. (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(2), 89-96.
- Moriarty, D. P. (2022). A primer on common analytic concerns in psychoneuroimmunology: Alternatives and paths forward. *Brain, Behavior, and Immunity*, 102, 338–340. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.03.007>
- Nissa, N. A. (2024). Primer design and restriction site analysis targeting POU domain class 1 transcription factor 1 gene of Friesian Holstein in silico. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1292(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1292/1/012007>
- Nugraha, R. (2022). Evaluation of COI Gene Primer as a Biomarker Traceability using Bioinformatics Abstract. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(1), 67–79. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v25i1.36501>
- Pradnyanti, 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.
- Saraswati, H. (2017). Analisa Bioinformatika Gen E1 Dan E2 Dari Virus Hepatitis C (Hcv) Genotipe 1, 2, 3 Dan 6 Sebagai Kandidat Vaksin Virallike Particles (Vlp). *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 1(2).
- Saraswati, H., Seprianto, S., & Wahyuni, F. D. (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.
- Sasmitha, L. V., Yustiantara, P. S., Yowani, S. C., MDR-TB, K. S., & Jimbaran, B. (2018). Desain DNA primer secara in silico sebagai pendeteksi mutasi gen gyrA Mycobacterium tuberculosis untuk metode polymerase chain reaction. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)* 6: 63–69.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tanabe, A. S. (2019). Primer Design, Evaluation of Primer Universality, and Estimation of Identification Power of Amplicon Sequences In Silico. *Marine Metagenomics: Technological Aspects and Applications*, 21–36. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8134-8_3
- Wijaya, C. H. (2018). Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.): A review on its botanical aspects, phytochemicals and pharmacological activities. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10(9), 1-7.