

Desain Primer Secara *In Silico* untuk Amplifikasi Gen *cryIII* dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal

Henny Saraswati, Seprianto, Febriana Dwi Wahyuni*

Prodi Bioteknologi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul

*Corresponding author: febriana@esaunggul.ac.id

Abstract

Many types of *Bacillus thuringiensis* isolates and subspecies are well-known as valuable sources for important commercial biopesticides. These Bacteria are qualified as microbiological control agents to against pests and plant disease vectors. It was because in *B. thuringiensis* there are several genes that encode a protein that was resistant to certain pests. One of them was *cryIII* gene, that was able to kill Coleoptera as a pest in sweetpotato. The method can be used for *cryIII* gene amplification is *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Primer is one important component in PCR. The aim of this research was to make a primer design for *cryIII* gene amplification using PCR. The Primers were designed using Primary Blast tool on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website. The Primers that have been designed then analyzed for their specificity with BLAST and dimer structure with DINAmelt. Analysis using the UNAFold was used to determine the secondary structure at the primer-binding site of the amplicon. Secondary structure analysis showed that there is no secondary structure at primer-binding site for primer. One primer that can amplify *cryIII* gene from *B. thuringiensis* was successfully designed. Further optimization of primer in the wet lab is needed to produce a good PCR reaction.

Keywords : sweet potato, bioinformatics, primer, *cryIII*

Abstrak

Berbagai jenis isolat dan subspecies *B. thuringiensis* sangat dikenal sebagai sumber yang bernilai untuk biopestisida penting komersial. Bakteri ini memenuhi syarat sebagai agen pengendali mikrobiologi terhadap hama dan vektor penyakit tumbuhan sehingga aplikasi biopestisida ini cepat tersebar. Hal itu karena di dalam *B. thuringiensis* terdapat beberapa gen yang menyandi suatu protein yang resisten terhadap hama tertentu. Salah satunya yaitu gen *cryIII* yang mampu membunuh Coleoptera sebagai hama di ubijalar. Metode yang bisa digunakan untuk amplifikasi gen *cryIII* adalah PCR. Salah satu komponen penting dalam PCR adalah primer. Penelitian ini bertujuan untuk membuat desain primer yang sesuai untuk amplifikasi gen *cryIII* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Primer dirancang menggunakan perangkat *Primer Blast* yang ada di dalam website National Center for Biotechnology Information (NCBI). Primer yang telah dirancang kemudian dianalisis untuk spesifisitasnya dengan BLAST dan struktur dimer dengan DINAmelt. Analisis dengan alat UNAFold digunakan untuk menentukan struktur sekunder di situs penempelan primer dari amplicon yang dihasilkan. Analisis struktur sekunder menunjukkan tidak ada struktur sekunder di situs penempelan primer yang telah dirancang. Satu primer yang dapat mengamplifikasi gen *cryIII* dari *B. thuringiensis* berhasil dirancang. Optimasi lebih lanjut dari primer di lab basah diperlukan untuk menghasilkan reaksi PCR yang baik.

Kata Kunci : Ubi jalar, Bioinformatika, primer, *cryIII*

Pendahuluan

Bacillus thuringiensis (Bt) merupakan bakteri penghasil protein kristal yang bersifat toksik terhadap serangga dan nematoda selama masa sporulasi [1]. Bioinsektisida Bt merupakan 90-95% dari bioinsektisida yang dikomersialkan untuk dipakai oleh petani di berbagai negara [2]. Keunggulan dari penggunaan bakteri ini sebagai biopestisida antara lain protein yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* bersifat antiserangga spesifik dan disebut sebagai protein Cry (dari kata *crystal*) atau disebut juga dengan nama δ -endotoksin. Protein Cry hanya bersifat toksik terhadap jenis serangga tertentu dan tidak toksik terhadap serangga yang berguna maupun terhadap organisme lain [1]. Salah satu jenis protein Cry yaitu CryIII diketahui mampu membunuh Coleoptera [3]. Serangga dari jenis Coleoptera ini merupakan hama yang menyerang tanaman Ubi Jalar.

Kemajuan teknologi di bidang biologi molekuler telah mendorong para ilmuwan untuk mengisolasi kromosom ataupun plasmid yang mengandung gen *cry*. Gen *cry* merupakan sekuens DNA pembawa sandi pembentukan protein Cry [1]. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk amplifikasi gen *cryIII* [4,5]. Salah satu metode yang bisa digunakan untuk amplifikasi gen *cry* adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang akan dilakukan dalam penelitian ini dengan menerapkan suatu disiplin ilmu bioinformatika.

Bioinformatika merupakan bidang interdisipliner yang secara luas didefinisikan sebagai perpaduan antara ilmu biologi (biologi molekuler) dan komputasi dengan menggunakan bantuan komputer dan *software* [6]. Salah satu peran paling signifikan dari bioinformatika adalah untuk merancang dan menghasilkan sekuens primer. Primer merupakan salah satu komponen yang berperan penting dalam proses PCR [7]. Primer yang baik adalah primer yang spesifik. 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* [6]. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis kombinasi pasangan primer yang digunakan dalam proses PCR untuk mengamplifikasi gen *cryIII* dari *B. thuringiensis*. Adapun gen *cryIII* yang akan diamplifikasi merupakan suatu domain dari total sekuens gen *cryIII* yang sudah ada di genebank.

Metode Penelitian

Gen *cryIII* *Bacillus thuringiensis*

Sebagai cetakan untuk mendesain primer, digunakan gen *cryIII* *B. thuringiensis* (kode genebank AY518201.1) yang dapat diunduh pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov

Analisis Spesifitas Primer

Spesifitas primer harus dipertimbangkan sehingga primer dapat mengenali dan menempel pada gen target yang diinginkan. Untuk analisisnya bisa digunakan BLAST dari NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dengan menggunakan *software* ini, sekuens kandidat primer akan dibandingkan dengan sekumpulan database sekuens dari berbagai organisme di NCBI. Kesamaan antara primer dan gen dari organisme tertentu akan ditunjukkan dalam identitas persentase. Semakin tinggi nilai persentase ini, semakin banyak primer spesifik gen. Jika ada primer yang dapat mengenali gen selain gen *cryIII* dengan spesifitas tinggi, kami tidak akan memilih primer ini.

Analisis Primer Dimer

Adakalanya primer yang dirancang dapat mengenali urutan dari diri mereka sendiri, mengikat satu sama lain membentuk struktur yang disebut dimer. Hal ini bisa menjadi masalah karena primer akan cenderung saling menempel, tidak dengan gen target dan hal ini dapat mengurangi konsentrasi DNA. Untuk itu perlu dilakukan analisis prediksi dimer dengan menggunakan

software yang tersedia untuk memprediksi keberadaan dimer pada kandidat primer, yaitu DINAmelt

(<http://unafold.rna.albany.edu/?q=DINAmelt>) yang dibuat oleh N.M Markham dan Michael Zucker dari Rensselaer Polytechnic Institute. Dari hasil analisis menggunakan DINAmelt ini dapat diketahui apakah dimer terbentuk di primer, berapa banyak pembentukan ikatan G-C, dan keberadaan ujung 3' komplemen.

Analisis Struktur Sekunder pada Amplikon

Struktur sekunder dari amplikon juga dianalisis dengan menggunakan Mfold [8]. Analisis ini penting untuk mengetahui apakah ada struktur sekunder di situs pengikatan primer. Adanya struktur sekunder di daerah ini dapat mempengaruhi perlekatan primer pada gen target. Hasil analisis ini akan menunjukkan ada atau tidaknya struktur sekunder di situs 5' dan 3', yang

juga merupakan situs pengikatan primer. Suhu annealing dari masing-masing pasangan primer dan konsentrasi Na^+ dan Mg^{2+} pada 10 dan 2 mM juga diatur.

Hasil Penelitian

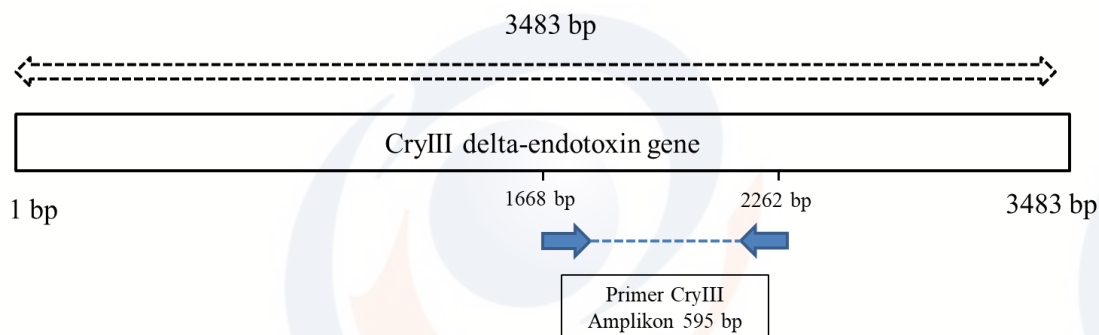
Desain Primer Menggunakan situs NCBI

Berdasarkan hasil desain primer menggunakan *primer blast* pada situs NCBI, didapatkan sepuluh kandidat primer untuk gen *cryIII* (Tabel 1). Sepuluh kandidat primer tersebut diseleksi kembali sesuai dengan kriteria primer yang baik untuk PCR karena keberhasilan dalam melakukan desain primer pada PCR sangat dipengaruhi oleh karakteristik primer yang digunakan [9]. Berdasarkan hal tersebut, maka dipilih satu pasangan primer yang sesuai dengan kriteria primer yang baik, yaitu pasangan primer nomor 7. Posisi relatif dari primer dengan gen *cryIII* delta-endotoksin dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Kandidat primer untuk gen *cryIII*

	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC%	Self 3' complementarity
Primer Pair 1					
Forward	GGATTCCAGTGCTTGGGGAA	20	59.96	55	0,00
Reverse	GCTTAGCACCCGTTCTCTT	20	60.04	55	0,00
Product length 537					
Primer Pair 2					
Forward	ACGCATAGTAGTGCCAGTCG	20	59.90	55	2,00
Reverse	CTCGATTCCCGTACTTCCCG	20	59.97	60	2,00
Product length 774					
Primer pair 3					
Forward	CGGGAAGTACGGGAATCGAG	20	59.97	60	2,00
Reverse	TACAAGGTTTTGGGCTGCCA	20	60.11	50	3,00
Product length 707					
Primer pair 4					
Forward	GCAACAGATGCAAAGGGAGC	20	60.11	55	2,00
Reverse	CCGTCCATCCGTTTTCTCCA	20	60.04	55	0,00
Product length 577					
Primer pair 5					
Forward	GTCGCAACAGATGCAAAGGG	20	60.11	55	0,00
Reverse	TTCCACAACCTCGATTCCCG	20	60.04	55	2,00
Product length 606					
Primer pair 6					
Forward	CGGGAATCGAGGTTGTGGAA	20	60.04	55	0,00
Reverse	GGCGTACATCTGGCAAGAGA	20	59.82	55	2,00

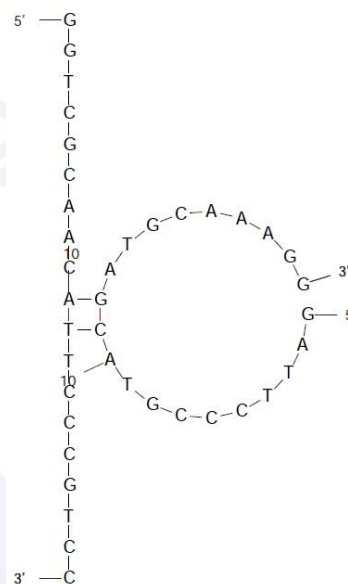
Product length 258					
Primer pair 7					
Forward	GGTCGCAACAGATGCAAAGG	20	60.11	55	0,00
Reverse	GATCCCGTACTTCCCGTCC	20	59.90	60	0,00
Product length 595					
Primer pair 8					
Forward	TGGAGAAAACGGATGGACGG	20	60.04	55	1,00
Reverse	TGGGCTGCCAACAAATCTGA	20	60.18	50	3,00
Product length 714					
Primer pair 9					
Forward	TTCCAGTGCTTGGGGAAGTC	20	59.89	55	2,00
Reverse	ATATCCTCAGCACCGGCAAG	20	59.89	55	0,00
Product length 946					
Primer pair 10					
Forward	AGCAGGTGCTGCTAACCTTT	20	59.89	50	1,00
Reverse	CGTTTCGCCTCTTTCCTGC	20	60.11	55	2,00
Product length					



Gambar 2. Posisi relatif primer terhadap gen *cryIII* delta-endotoksin

Struktur Dimer pada Primer

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer untuk meminimalisir adanya struktur dimer pada primer adalah jumlah ikatan G-C pada primer dan letak ikatan G-C. Primer dengan jumlah ikatan G-C yang banyak akan mendorong primer tersebut untuk membuat dimer daripada berikatan dengan gen target dan juga dapat mengurangi konsentrasi DNA. Letak ikatan G-C juga perlu diperhatikan karena ikatan G-C yang letaknya dekat dengan ujung 3' memiliki kecenderungan primer untuk membuat dimer dan juga akan mengganggu dalam proses amplifikasi. Oleh karena itu primer yang dipilih adalah primer dengan jumlah ikatan G-C paling sedikit untuk menghindari adanya struktur dimer (Gambar 3).



Gambar 3. Struktur dimer pada primer dengan 1 ikatan G-C

Struktur Sekunder pada Amplikon

Sangat penting untuk mengetahui apakah ada struktur sekunder pada amplikon yang dapat mengganggu proses penempelan primer pada gen target. Dari hasil analisis Mfold menunjukkan bahwa amplikon yang terbentuk tidak memiliki struktur sekunder di situs penempelan primer. Hal ini bisa membantu proses pemanjangan DNA dengan metode PCR.

Pembahasan

Desain primer merupakan langkah awal yang menentukan keberhasilan amplifikasi DNA dengan metode PCR [10]. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer diantaranya adalah panjang primer, *temperature melting* (T_m), kandungan GC dan ikatan di ujung 3'. Primer yang baik berkisar antara 18-30 pasang basa. Primer yang memiliki panjang lebih dari 30 pasang basa akan menyebabkan penempelan primer menjadi tidak spesifik. Karakteristik kedua yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer adalah T_m . Primer yang baik memiliki selisih T_m sekitar 5°C. Hal ini ditujukan agar tidak terjadi penurunan pada proses amplifikasi. Prosentase antara basa G dan C juga perlu diperhatikan karena kandungan jumlah basa G dan C dapat mempengaruhi T_m yang dimiliki suatu primer [11]. Primer yang baik mempunyai prosentase G dan C sekitar 40-60%. Kriteria lainnya untuk primer yang baik yaitu memiliki *self 3' complementarity* yang rendah agar tidak terjadi penempelan antar pasangan primer dan membentuk struktur yang disebut *hairpin* [12].

Dimer adalah struktur yang terbentuk diantara pasangan primer, dimana mereka bersatu karena memiliki basis yang saling melengkapi. Proses ini terjadi pada suhu penempelan yang sesuai, biasanya pada suhu rendah. Dengan melihat tahapan proses PCR, dapat dilihat bahwa penempelan primer pada DNA cetakan terjadi pada suhu annealing yang optimal. Proses ini dapat terjadi bersamaan dengan pembentukan dimer. Permasalahan yang mungkin muncul

adalah primer mempunyai kecenderungan menempel satu dengan lainnya, dan bukan menempel pada DNA cetakan. Jika ikatan dimer ini terlalu kuat, akan mengganggu proses perpanjangan DNA dan akan menghasilkan konsentrasi DNA yang rendah. Dari analisis menggunakan DINAmelt, dapat dilihat bahwa semua primer membentuk dimer. Tetapi ada satu primer yang hanya mempunyai satu ikatan G-C. Ikatan antara basa G dan C adalah ikatan yang kuat karena terdiri dari 3 ikatan hydrogen. Hal itu akan membuat primer lebih mudah untuk disatukan. Itulah alasan dipilihnya primer dengan satu ikatan G-C untuk meminimalisasi terjadi penempelan antar primer.

Analisis Mfold menunjukkan bahwa amplikon tidak memiliki struktur sekunder di daerah penempelan primer (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada gangguan dalam proses penempelan primer. Mfold merupakan suatu perangkat lunak yang digunakan untuk memprediksi lipatan asam nukleat (DNA atau RNA) dan hibridisasinya [8].

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.

Kesimpulan

Primer untuk amplifikasi gen *cryIII* dari *B. thuringiensis* telah berhasil didesain. Prediksi struktur dimer menunjukkan bahwa semua kandidat primer membentuk dimer, tetapi salah satu primer membentuk ikatan G-C lebih sedikit daripada kandidat lainnya. Primer yang didesain akan menghasilkan amplikon sebesar 595 bp.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemenristekdikti yang telah memberikan dana untuk penelitian ini melalui Hibah Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi untuk anggaran tahun 2019.

Daftar Pustaka

- [1] Saraswati NPA. Deteksi dan Identifikasi Gen Cry4 pada Isolat Bacillus thuringiensis Daerah Bogor dan Sekitarnya. *Inst Pertan Bogor, Bogor*. 2007.
- [2] Bahagiawati. Penggunaan Bacillus Thuringiensis sebagai biolarvasida. *Bul AgroBio*. 2003;5(1):21-28.
- [3] Suryanto D. Amplifikasi gen Cry1 dan analisis genom isolat Bacillus thuringiensis lokal. *J Biol Res*. 2017;15(1):1-4. doi:10.23869/bphjbr.15.1.20091
- [4] Malik K, Muhammad M, Talpur A. Cloning and Expression of a cry III Gene Isolated from the Local Habitat into a Modified Strain of Bacillus thuringiensis. *IOSR J Pharm Biol Sci*. 2013;7(5):87-95.
- [5] Ceron J, Ortiz A, Quintero R, Guereca L, Bravo A. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a Bacillus thuringiensis strain collection. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(11):3826-3831.
- [6] Suryadi PT, Ratnayani K, Yowani SC. Desain Primer untuk Amplifikasi Gen katG Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Kim*. 2014;8(1):77-82.
- [7] Septiari IGAA, Yustiantara PS, Yowani SC. Analisis Primer untuk Amplifikasi Promoter inhA Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Kim*. 2015;9(1):117-123.
- [8] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Researsearch*. 2003;31(13):3406-3415. doi:10.1093/nar/gkg595
- [9] Sasmito DEK, Kurniawan R, Muhimmah I, Metode M. Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Semin Nas Inform Medis*. 2014:93-102.
- [10] Suparman, Ahmad H, Ahmad Z. Desain Primer PCR Secara in silico untuk Amplifikasi Gen COI pada Kupu-kupu Papilio ulysses Linnaeus dari Pulau Bacan. *J Pendidik Mat dan IPA*. 2016;7(1):14-25.
- [11] Dewi RW, Dewi VR, Yowani SC, Yustiantara PS. Desain Primer untuk Amplifikasi Regio Promoter Gen inh A Isolat P016 Multidrug Resistance Mycobacterium tuberculosis dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *J Farm Udayana*. 2018;7(1):34-39.
- [12] Safitri TA, Nurul D, Patty J, Saraswati H. Gen L1 HPV 16 dan 18 Sebagai Dasar Dalam Desain Primer untuk Deteksi Kanker Leher Rahim dengan in-House Multiplex PCR. *Indones J Biotechnol Biodivers*. 2018;2(2):67-71.