

PROSEDING

SEMINAR NASIONAL BASIC SCIENCE III

Tema:

*Kontribusi Sains untuk Pengembangan Pendidikan,
Biodiversitas dan Mitigasi Bencana pada Daerah Kepulauan*



Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Pattimura
Ambon 2010

ISBN : 978-602-97522-0-5

PROSEDING

SEMINAR NASIONAL BASIC SCIENCE II

Kontribusi Sains Untuk Pengembangan Pendidikan,
Biodiversitas dan Mitigasi Bencana
Pada Daerah Kepulauan



SCIENTIFIC COMMITTEE:

Prof. H.J. Sohilait, MS
Prof. Dr. Th. Pentury, M.Si
Dr. J.A. Rupilu, SU
Drs. A. Bandjar, M.Sc
Dr.Ir. Robert Hutagalung, M.Si

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PATTIMURA
AMBON, 2010**

2 Juli 2010

**PERANCANGAN PRIMER-OLIGONUKLEOTIDA UNTUK REAKSI RANTAI
POLIMERISASI GEN SUKROSA SINTASE (EC 2.4.1.13)**

Pieter Agusthinus Riupassa

*Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Pattimura, Kotak Pos 95 Jalan Ir. M. Putuhena, Kampus
Poka Ambon 97233, Tel. +62-911-3825055*

ABSTRACT

The most important problems in using polymerase chain reaction (PCR) are the efficiency of energy, cost and time due to amplify gene. Primer-oligonucleotide design of sucrose synthase gene was conducted as a model of preliminary experiment to amplify gene using PCR. In plant cells, this gene has a play important role in carbohydrate metabolism; it breaks down a sucrose molecule into glucose. This design were involved some computer software in bioinformatics tools. Five data sequences of legumes are downloaded from gene bank using accession number AF030231, AJ311496, X92378, X69773, and D10266 which belonging to soybean, pea, alnus bean, fava bean, and mung bean, respectively. After sequences alignment, some conservative regions were determined as forward and reverse primer candidates. Furthermore, the candidates were tested for primer oligonucleotides compatibility. The results showed that the primer oligonucleotides can amplify sucrose synthase gene with ± 1462 bp fragment size using 5'-AACTTTgTgCCTTgA-3' and 5'-TCCTTTgACTCCTTC-3' for forward and reverse primer, respectively. Even though the PCR process weren't applied, those primers might be a universal primer to amplify sucrose synthase gene of legume plants.

Key words: Sucrose synthase, Primer, Oligonucleotide, PCR, Bioinformatics

PENDAHULUAN

Perancangan primer-oligonukleotida memiliki peran yang sangat penting dalam kegiatan biologi molekuler. Perancangan ini diharapkan dapat memperoleh primer spesifik yang dapat digunakan dalam proses perbanyakan (amplifikasi) DNA. Primer adalah nukleotida pendek berukuran 12 – 20 basa yang diperlukan sebagai titik pelekatan enzim polimerase DNA pada proses pembentukan atau pemanjangan DNA suatu gen spesifik secara in vitro melalui teknik reaksi berantai polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR). Teknik PCR ditemukan secara tidak sengaja oleh Kary B Mullis pada tahun 1989. Sebelum penemuan tersebut, para ahli telah mengetahui bahwa penggandaan materi genetik dapat terjadi di dalam tubuh (*in-vivo*) dan merupakan mekanisme yang umum. Namun, penemuan tersebut membuktikan bahwa reaksi polimerisasi DNA dapat juga terjadi di dalam tabung (*in-vitro*) (Yowono 2006). Implementasi

2 Juli 2010

teknik PCR pada polimerisasi gen *sukrosa sintase* (EC 2.4.1.13) membutuhkan teknik perancangan primer yang tepat sehingga menghasilkan primer spesifik untuk deteksi gen.

Perancangan primer untuk gen yang berperan dalam metabolisme karbohidrat, *sukrosa sintase* dapat dilakukan dengan memanfaatkan kode sekuen yang tersedia dan mudah diperoleh di internet pada beberapa situs, yaitu GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) yang mencakup koleksi data sekuens di Amerika, *European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute* / EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk) mencakup Eropa, dan DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp) di Jepang. Ketiga situs tersebut saling bertukar databasenya, sehingga tidak terjadi duplikasi data dan dengan cepat terjadi pembaharuan data. Penggunaan piranti lunak (*software*) ClustalW dan NetPrimer telah memberikan kemudahan dalam perancangan ini. *Software* tersebut dapat dengan mudah dan cepat dieksekusi melalui hubungan komputer-internet. Dengan demikian, bioinformatika di Indonesia harus segera menjembatani para ahli genetika, biologi molekuler, biokimia dan ilmu komputer dalam kegiatan rekayasa genetika secara terpadu.

Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer-oligonukleotida gen sukrosa sintase sebagai suatu model penggunaan perangkat bioinformatika yang menunjang proses amplifikasi gen menggunakan PCR. Penggunaan data GenBank, *software* ClustalW (Hinggens *et al.* 1994 dan Pearson 1990), dan NetPrimer diperlukan dalam perancangan primer gen spesifik. Perancangan ini juga telah menghemat tenaga, uang dan waktu daripada pekerjaan uji coba PCR berulang-ulang di laboratorium. Studi perancangan primer merupakan kajian awal yang memudahkan pekerjaan molekuler terhadap suatu gen menggunakan teknik PCR.

Gen sukrosa sintase (UDP-glucosa: D-fructose-2 α -glucosyltransferase, SuSy, SS, nodulin-100, EC 2.4.1.13) adalah gen yang menghasilkan enzim sukrosa sintase, yang berperan penting dalam metabolisme karbohidrat. Enzim ini mengkatalisis reaksi reversibel dari sukrosa uridin-difosfat menjadi fruktosa dan UDP-glukosa. Sukrosa sintase menyiapkan jalur UDP-glukosa untuk menghasilkan selulosa selama deposisi dinding sel (Haigler 2001). Peran sukrose sintase adalah merombak sukrosa pada bintil akar tanaman kedelai (*Glycine max*) dengan aktivitasnya dapat mencapai 20 kali lebih besar daripada di dalam jaringan akar (Thummler dan Verma 1987; Gordon 1999). Perancangan primer dilakukan berdasarkan sekuen basa atau asam amino yang konservatif. Tingkat konservatif dapat diperoleh melalui pensejajaran (*alignment*) beberapa sekuen. Bila data asam amino tersedia dalam perancangan primer, maka terlebih

2 Juli 2010

dahulu data tersebut dikonversi menjadi sekuen basa menurut urutan kodon tertentu (Dieffenbach dan Dveksler 1995).

Primer adalah oligonukleotida sintesis, terdiri dari 12 sampai 20 basa, yang berfungsi sebagai prekursor sintesis DNA dari cetakan DNA. Oligonukleotida memiliki urutan sekuen berbeda dan komplemen dengan utas yang berlawanan pada cetakan DNA. Pada PCR diperlukan satu set primer yang masing-masing terletak di kedua ujung fragmen DNA target, yaitu primer *forward* (arah sintesa maju atau hulu) dan *reverse* (arah sintesa terbalik atau hilir), yang dikatalisa oleh DNA polimerase. PCR digunakan untuk memperbanyak segmen DNA, yaitu daerah antara yang pada kedua ujung segmen telah diketahui urutan basanya (Dieffenbach dan Dveksler 1995). Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam perancangan primer untuk mengoptimalkan perolehan hasil amplifikasi, yaitu terbebas dari pembentukan struktur sekunder (*hairpin*, *dimer* /*self-dimer*, dan *cross dimer*), besar ampikon, panjang primer, titik leleh (T_m), dan kestabilan internal (Dieffenbach dan Dveksler 1995).

Struktur sekunder pada primer dapat terjadi melalui tiga cara. Pertama, *hairpin* (struktur tusuk konde) yaitu komplementasi melalui pelipatan kembali dirinya akibat adanya ikatan intra-molekul yang mampu memutar primer sehingga terjadi pengikatan sendiri. Kedua, *dimer* adalah komplementasi antar sesama primer. Ketiga, *cross dimer* prosesnya hampir sama dengan dimer, namun komplementasi antar primer *forward* dan *reverse* (Rychlik 1995). Temperatur leleh (*melting temperatur*, T_m) primer adalah temperatur bilamana 50% primer dapat menempel pada utas pasangannya. Temperatur ini dipengaruhi oleh rasio GC/AT dari primer, semakin besar ratio semakin tinggi temperatur. Temperatur yang rendah menghasilkan ampikon nonspesifik (*non-target*) dan mengurangi efisiensi amplifikasi, karena primer yang telah menempel (*annealing* atau renaturasi) terlepas bila suhu dinaikan pada saat sintesis (*elongation*) DNA. Temperatur kedua primer (*forward* dan *reverse*) tidak berbeda jauh akan memudahkan penentuan waktu denaturasi (Rychlik 1995). Freier *et al.* (1986) telah membuat rumus untuk menghitung temperature leleh dari primer. Rumus tersebut disusun berdasarkan atas teori termodinamik jarak terdekat (*nearest neighbor thermodynamic theory*) berikut:

$$T_m = \Delta H / (\Delta S + R * \ln(C/4)) + 16.6 \log ([K^+]/(1 + 0.7 [K^+])) - 273.15$$

di mana: T_m : temperatur leleh primer
 ΔH : entalpi pembentukan struktur heliks
 ΔS : entropi pembentukan struktur heliks
 R : konstanta gas molar 1,987 kal mol^oC

2 Juli 2010

C : konsentrasi asam nukleat
K⁺ : konsentrasi garam (kation)

Stabilitas internal primer merupakan perbedaan kestabilan perlekatan primer ujung 5' dan ujung 3' pada DNA target. Primer dengan kestabilan ujung 5' lebih besar dari ujung 3' umumnya memiliki interaksi spesifik primer-cetakan yang terbaik. Primer dengan kestabilan yang rendah pada ujung 3' berfungsi lebih baik, karena perlekatan non target ujung 3' menjadi tidak stabil untuk diperpanjang oleh DNA polimerase (Rychlik 1995). *Multiple sequence alignment* adalah cara penyusunan lebih dari dua sekuens untuk memperoleh posisi basa (atau asam amino) yang lebih mementingkan kesamaannya. Proses ini dibantu dengan pendekatan skor matriks dan *gap penalties*, dan dengan cepat dapat dikerjakan dengan piranti lunak (ClustalW). NetPrimer adalah piranti lunak yang digunakan dalam pengujian kelayakan primer untuk menghasilkan efisiensi interaksi primer-cetakan dan menghasilkan amplikon spesifik dalam PCR (Breslauer *et al.* 1986; Freier *et al.* 1986; Rychlik *et al.* 1990).

MATERI DAN METODE

Sekuen gen *sukrosa sintase* diperoleh dari situs internet bank data EMBL-EBI. Sebanyak lima data sekuen tanaman yang diperoleh adalah kacang kedelai, kacang ercis, kacang alnus, kacang fava, dan kacang hijau yang berturut-turut memiliki nomor akses AF030231, AJ311496, X92378, X69773, dan D10266. Sekuen berupa file dalam bentuk standar (*gene bank flatfile format*, GBFF). Sekuen DNA atau *coding sequence* (CDS) dituliskan kembali dalam format Fasta (Pearson, 1990) dan disimpan sebagai suatu file teks.

Situs internet <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html> digunakan untuk menjalankan piranti lunak ClustalW. File teks sekuen dan berformatkan Fasta dapat di-*upload* dengan mengklik tombol perintah *browse* atau dengan prinsip *copy-paste* sekuen yang berformat Fasta ke dalam kotak teks *Sequences* (Higgins *et al.* 1994). Klik tombol perintah *run* ClustalW untuk melakukan *alignment sequence*. Hasil analisis menunjukkan tanda "*" bila sekuen basa sama pada semua jenis tanaman. Tanda tersebut menunjukkan tingkat konservatif basa pada gen. Pemilihan kandidat primer *forward* dan *reverse* bila dijumpai suatu bagian yang memiliki basa konservatif berjumlah 12-15. Hasil pensejajaran dapat diperoleh tiga kandidat primer forward dan dua kandidat primer reverse (dilihat pada Gambar 1). Pengujian kelayakan primer menggunakan situs "<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch.html>". Kandidat

2 Juli 2010

primer dianalisis apakah memiliki struktur *hairpin*, *dimer*, *cross dimer*, *palindrome*, dan *repeat & run*. Sekuen kandidat primer dimasukkan ke dalam kotak teks *Oligo Sequence 5'-3'*. Tombol pilihan *Sense* harus dipilih ketika akan memasukan sekuen untuk kandidat primer *forward*, sedangkan tombol pilihan *Anti-sense* dipilih jika akan memasukan kandidat primer *reverse*. Tombol perintah *Analyze* dipilih untuk menampilkan hasil pengujian kelayakan primer. *Tabstrip* *hairpin*, *dimer*, *cross dimer*, *palindrome*, dan *repeat & run* diklik secara simultan untuk mengetahui hasil analisis kelayakan kandidat primer. Cara tersebut dilakukan untuk semua kandidat primer forward dan reverse. Tombol *print-screen* pada keyboard ditekan hingga setiap tampilan analisis di layar monitor dapat terekam sebagai objek *clipboard* (gambar Bitmap) di memori komputer, dan dengan segera setiap saat dapat melakukan *copy-paste* ke dokumen baru Microsoft® Word atau ke gambar Bitmap Microsoft® Paint, melalui menu Edit → Paste. Primer terbaik yang dipilih adalah primer yang tidak atau sedikit memiliki struktur *hairpin*, *dimer*, dan *cross dimer* (Breslauer *et al.* 1986; Freier *et al.* 1986; Rychlik 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis *multiple sequence alignment* dengan ClustalW diperoleh tiga kandidat primer forward dan dua kandidat primer reverse (Tabel 1). Penentuan kandidat primer berdasarkan atas analisis menggunakan NetPrimer untuk masing-masing primer tunggal. Bila tidak ditemukan *hairpin* (struktur tusuk konde), *dimer*, dan *palindrome*, maka kandidat primer ini dipakai untuk merancang satu set primer (forward dan reverse). Adanya sekuens berulang (*repeat & run*) tidak akan mempengaruhi prioritas urutan sebagai kandidat primer.

Tabel 1. Kandidat primer forward dan reverse

Kode	Sekuens	# basa	T _m (°C)	% GC	Repeat & Run	Keterangan
Kandidat Primer Forward						
F2	5' AACTTTGTGCTTGA	14	31,18	35,71	TTT	
F2.1	5' AACTTTGTGCTTGA G	15	34,82	40,00	TTT	F2 + 1 basa G
F1	5' GTTCGTCCAAGGC	13	37,36	61,54		
Kandidat Primer Reverse						
R2	5' TCCTTTGACTCCTTC	15	36,41	46,67	TTT	

2 Juli 2010

R1	5' TTTATGAGCCAACAA	15	37,09	33,33	TTT	
----	--------------------	----	-------	-------	-----	--

T_m dihitung berdasarkan rumus dari Freier *et al.* (1986)

Your ClustalW Results:

Pairwise Scores:

CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Alignments

Sequence format is Pearson

Sequence 1: Glycine 2842 bp
 Sequence 2: Pisum 2757 bp
 Sequence 3: Alnus 2783 bp
 Sequence 4: Vicia 2647 bp
 Sequence 5: Vigna 2652 bp

Start of Pairwise alignments

Alignment Score 140055

CLUSTAL-Alignment file created

[/net/nfs0/voll/production/w3nobody/tmp/276370.69933-517632.aln]

Your Multiple Sequence Alignment:

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

Kandidat Pr. Forward 1 (Dikode: F1)

Glycine	TGCCACCATGGGTTGCTCTGGCTGTTCCGTTCCAAGACCTGGTGTGTGGGAGTACCTGAGAG	369
Vigna	TGCCACCATGGGTTGCTCTGGCCGTTCCGTTCCAAGGCTGGTGTGTGGGAGTACCTGAGAG	335
Vicia	TGCCACCATGGGTTGCACCTTGCTGTTCCGTTCCAAGGCCAGGTGTTTGGGAGTATCTGAGAG	331
Pisum	TAGTGC CGTTTGTGCTCTTGCTGTTCCGTTCCAAGGCTGGCGTTTGGGAGTATCTGAGAG	368
Alnus	TGCCCTCGTGGGTTGCCTTGGCGGTTCCGTTCCAAGGCTGGTGTTTGGGAATACATCAGAG	419
	* * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * *	

→

Glycine	TGAATGTGCACGCTCTTGTGTTGAGGAGTTGCAACCTGCTGAGTACCTGCACCTTCAAGG	429
Vigna	TGAATGTGCACGCTCTAGTTGTTGAGGTTGCAACCTGCTGAGTACCTGCAGCTTCAAGG	395
Vicia	TGAATGTGCATGCTCTTGTGTTGAAAATTTGCAACCTGCTGAGTTTCTCAAATTCAAGG	391
Pisum	TCGACGTGCACGGTCTTGTGTTGTCGATGAACTGAGTGCTGCTGAGTATCTCAAGTTCAAGG	428
Alnus	TGAATGTCCACGCTCTTGTGTTGAGGAGCTGCGTGTGCCCGAGTACTTGCACCTTCAAGG	479
	* *	

Kandidat Pr. Forward 2 dan 2.1 (Dikode: F2 & F2.1)

Glycine	AAGAACTTGTGACGGAAGTTCTAATGGCAACTTTGTGCTTGTGAGTTGGACTTTGAACCAT	489
Vigna	AGGAAC TTGTTGATGGAAGTTCTAATGGCAACTTTGTGCTTGTGAGTTGGACTTTGAACCCCT	455
Vicia	AAGAACTTGTGATGGAAGTTCTAATGGTAAC TTGTTGTGCTTGAATTGGACTTTGAACCAT	451
Pisum	AGGAGCTTGTGAGGAAGTTCTAATGAAAAC TTTGTGCTTGTGAGTTGGACTTTGAACCAT	488
Alnus	AGGAAC TCGTGGACGGAAGCAACCAACGGCAACTTTGTGCTTGTGAGTTGATTTGACCCT	539
	* *	

Kandidat Pr. Reverse 1 (Dikode R1)

Glycine	CTTCTTTGTTGGCACATAAATTAGGTGTC ACTCAGTGTACCATTGCTCACGCACTTGAGA	1389
Vigna	CCTCTTTGTTGGCACATAAATTAGGTGTC ACTCAGTGTACCATTGCTCATGCACTTGAGA	1355
Vicia	CTTCTTTGTTGGCACATAAATTAGGTGTC ACTCAGTGTACTATTGCTCATGCACTTGAGA	1351
Pisum	CCTCTTTGTTAGCACATAAATTAGGCGTAACACAGTGTACTATTGCTCATGCACTTGAGA	1388
Alnus	CCTCATTGTTAGCACATAAATTGGGGTTACCCAGTGCACCCATGCCCATGCCCTCAGAGA	1433
	* * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * *	

5' TTTATGAGCCAACAA ←

Kandidat Pr. Reverse 2 (Dikode R2)

Glycine	AGCTGGTGAACCTTGTGGTTGTTGCTGGAGACAGGAGGAAGGAGTCAAAGGACTTGGAAAG	1929
Vigna	AGTTGGTGAACCTCGTGGTCTGTTGCTGGAGACAGGAGGAAGGAGTCAAAGGACTTGGAAAG	1895
Vicia	AGTTGGTGAACCTTGTGTTGTTGGCCGGAGACAGGAGGAAGGAGTCAAAGGACTTGGAAAG	1891
Pisum	AACTGGTAAACCTTGTGCTGTTGTTGCTGGAGACAGAAGGAAGGAGTCAAAGGACTTTAGAAAG	1928
Alnus	AGTTGGTAAACCTTGTGTTGTTGCTGGGAATTTGGAGGAAGGAGTCAAAGGACTTGGAAAG	1970
	* * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * * ***** * * * * *	

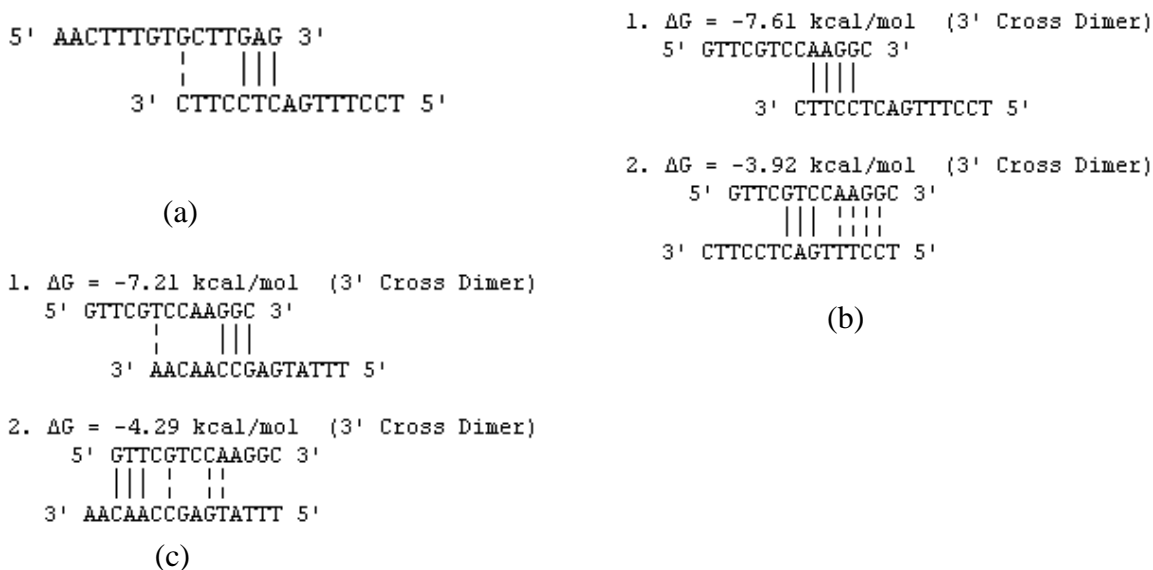
5' TCCTTGGACTCCTC ←

Gambar 1. Hasil pensejajaran diperoleh tiga kandidat primer forward (F1, F2, & F2.1) dan dua kandidat primer reverse (R1 & R2). Garis bergelombang menjelaskan adanya penghapusan sebagian sekuen.

Tiga kandidat primer forward dan dua kandidat primer reverse dipasangkan secara simultan untuk menentukan satu set primer. Hasil analisis dengan NetPrimer mempertimbangkan terjadinya struktur *cross dimer* maksimum dua macam seperti ditampilkan dalam Tabel 2. Sebaliknya jika ditemukan struktur *cross dimer* lebih dari dua, maka secara langsung pasangan kandidat primer tidak dapat digunakan, karena menurunkan efisiensi interaksi primer-cetakan (Dieffenbach dan Dveksler 1995).

Tabel 2. Pasangan satu set primer *forward-reverse* dengan pembentukan *cross dimer* maksimum 2 macam.

No	Kode Set Primer Forward-Reverse	Dugaan panjang amplikon (bp)	Selisih T_m antar primer	Jumlah 3' <i>Cross Dimer</i>	Visualisasi 3' <i>cross-dimer</i>
1.	F2 – R2	1462	5,23	tidak ada	
2.	F2.1 – R2	1462	1,59	1	Gambar 2a
3.	F1 – R2	1588	0,95	2	Gambar 2b
4.	F1 – R1	1016	0,27	2	Gambar 2c



Gambar 2. Visualisasi struktur 3' *cross dimer* pada pasangan primer forward-reverse.

2 Juli 2010

Hasil analisis NetPrimer terhadap kandidat primer *forward-reverse* berdasarkan syarat kelayakan primer menunjukkan bahwa pasangan primer dengan kode F2 – R2 layak dijadikan sebagai primer (Tabel 1). Secara berturut-turut urutan sekuensnya adalah 5' AACTTTGTGCTTGA (panjang 14 basa) sebagai primer *forward*, dan 5' TCCTTTGACTCCTTC (panjang 15 basa) sebagai primer *reverse*. Dugaan panjang amplikon yang dihasilkan dalam proses amplifikasi (PCR) adalah ± 1462 bp.

Tiga set primer *forward-reverse* yang lain (F2.1-R2, F1-R2, dan F1-R1) dapat digunakan sebagai primer dengan pertimbangan. Hal tersebut disebabkan adanya konsekuensi rendahnya amplikon yang dihasilkan karena makin rendahnya interaksi primer dan cetakan oleh struktur *cross dimer* yang terbentuk. Namun jika mempertimbangkan faktor selisih suhu T_m antar primer yang kecil ($1,59^\circ\text{C}$), dan prosentasi kandungan GC primer forward yang lebih tinggi (dari 35,71 menjadi 40%) (Tabel 1), maka prioritas urutan pasangan primer yang disarankan adalah F2.1 – R2, seperti yang dinyatakan oleh Rychlik (1995). Berturut-turut sekuensnya adalah 5' AACTTTGTGCTTGAG (panjang 15 basa) dan 5' TCCTTTGACTCCTTC (panjang 15 basa), disertai dengan konsekuensi terbentuknya satu macam *cross dimer* (Gambar 2).

Penambahan atau pengurangan satu basa dapat memberikan arti penting dalam proses perancangan primer. Hal ini terjadi pada kandidat primer forward (F2.1) yang hanya mengalami penambahan satu basa guanin tetapi telah menyebabkan struktur *cross dimer* dengan pasangan primer reverse-nya. Penelitian ini masih pada tingkatan perancangan primer saja, dan belum pada tingkat selanjutnya, yaitu penggunaan primer dalam amplifikasi fragmen gen *sukrosa sintase* tanaman yang berkaitan dengan isolasi gen dan kloning. Pemanfaatan piranti lunak yang lebih komprehensif lebih disarankan untuk menghasilkan primer yang baik. Piranti lunak untuk perancangan primer seperti Premier 5 dari Premier Biosoft International adalah software yang terintegrasi dengan keunggulan utama dalam perancangan primer untuk amplifikasi sekuens dari *multiple species*, perancangan primer untuk *highly conserved regions* pada proses deteksi patogen, dan perancangan primer untuk amplifikasi khusus suatu sekuens tunggal (*allele specific primers*).

UCAPAN TERIMA KASIH

2 Juli 2010

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pusat Studi Keragaman Mikrob (*Research Center for Microbial Diversity*, RCMD), Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor; dan Lembaga Penelitian Universitas Pattimura Ambon, atas dukungan dana penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Markey LA. 1986. *Predicting DNA duplex stability from the base sequence*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3746-3750.
- Dieffenbach CW, Dveksler GS. 1995. *PCR primer a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Freier SM, Kierzek R, Jaeger JA, Sugimoto N, Caruthers MH, Neilson T, and Turner DH. 1986. *Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9373-9377.
- Gordon AJ, Minchin FR, James CL, Komina O. 1999. *Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation*. Plant Physiol. 120:867-878.
- Haigler CH. 2001. *Carbon partitioning to cellulose synthesis*. Plant Molecular Biol. 47:29-51.
- Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. 1994. *Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acid Res. 22:4673-4680.
- Pearson WR. 1990. *Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA*. Methods Enzymology 183:63-98.
- Rychlik W. 1995. *Selection of primers for polymerase chain reaction*. Molecular Biotechnology 3:129-134.
- Thummler F, Verma DPS. 1987. *Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules*. J. of Biological Chem. 262(30):14730-14736.
- Yowono T. 2006. *Teori dan aplikasi polymerase chain reaction*. Andi Offset. Yogyakarta.