



Desain dan Evaluasi in Silico Primer Spesifik Gen *matK* (*Maturase K*) pada Genus *Vaccinium* Menggunakan Oligo Calc dan Primer-BLAST

Muhammad Haidar Amrullah*

*Universitas Islam Negeri Sultan Aji Muhammad Idris Samarinda, Indonesia,
m.haidar.a@uinsi.ac.id

Abstrack

The maturase K (*matK*) gene is a standard DNA barcoding marker in higher plants, possessing an evolutionary rate ideal for chloroplast analysis, phylogenetic studies, and species identification. This study aimed to design and evaluate—in silico—PCR primer pairs specific for amplifying the *matK* gene within the genus *Vaccinium*. The methodology involved multiple sequence alignment of ten *Vaccinium***matK* gene sequences obtained from the NCBI database, analysis of the GC/AT ratio, design of forward and reverse primer pairs, assessment of secondary structures (such as hairpins and self-dimerization) using the Oligo Calc tool, and validation of amplicon specificity via NCBI Primer-BLAST. Analysis revealed a base composition of 40% GC and 60% AT. Candidate primer pairs were designed and screened; candidates forming hairpin structures or exhibiting self-annealing were eliminated. The final evaluation yielded two sets of specific primer pairs with potential for PCR analysis: Primer Set 1 (Forward: 5'-CATGTATGTGAATACGAATCTATCT-3', Reverse: 5'-GGCACTAGAGTATCGAACTTCT-3') produces a specific 457 bp amplicon, while Primer Set 2 (Forward: 5'-CAGCAACATGACTTCATATATCC-3', Reverse: 5'-TATGGATCCTTCTTGGTTGAGC-3') yields a specific 222 bp amplicon within the **Vaccinium** plastid. These primer pairs meet thermodynamic criteria and represent strong candidates for *in vitro* DNA barcoding applications.

Keyword : *Vaccinium*, *matK*, Primer Design, Oligo Calc, Primer-BLAST

Abstrak

Gen *maturase K* (*matK*) merupakan salah satu marka DNA *barcoding* standar pada tumbuhan tinggi yang memiliki tingkat evolusi ideal untuk analisis kloroplas, filogenetik, dan identifikasi spesies. Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan mengevaluasi pasangan primer PCR secara *in silico* yang spesifik untuk amplifikasi gen *matK* pada genus *Vaccinium*. Metode yang digunakan meliputi penyelarasan sekuens (*multiple sequence alignment*) dari 10 sekuens gen *matK* genus *Vaccinium* yang diperoleh dari basis data NCBI, analisis rasio GC/AT, perancangan pasangan primer forward dan reverse, pemeriksaan struktur sekunder (seperti *hairpin* dan *self-dimerization*) dengan alat Oligo Calc, serta validasi spesifisitas amplicon menggunakan NCBI Primer-BLAST. Hasil analisis menunjukkan kandungan basa kelompok berada pada proporsi GC 40% dan AT 60%. Pasangan primer kandidat berhasil dirancang dan ditapis; kandidat primer yang membentuk struktur *hairpin* atau *self-annealing* dieliminasi. Evaluasi akhir menghasilkan dua set pasangan primer spesifik yang potensial untuk analisis PCR: Set Primer 1 (Forward: 5'-CATGTATGTGAATACGAATCTATCT-3', Reverse: 5'-GGCACTAGAGTATCGAACTTCT-3') menghasilkan amplicon spesifik berukuran 457 bp, serta Set Primer 2 (Forward: 5'-



Barongko

Jurnal Ilmu Kesehatan

CAGCAACATGACTTCATATATCC-3', Reverse: 5'-TATGGATCCTTCTTGTTGAGC-3') menghasilkan ampikon spesifik berukuran 222 bp pada plastida *Vaccinium*. Pasangan primer ini memenuhi syarat termodinamika dan menjadi kandidat kuat untuk aplikasi barcode DNA secara *in vitro*.

Kata Kunci: *Vaccinium*, *matK*, Desain Primer, *Oligo Calc*, *Primer-BLAST*

Penulis Korepondensi : Muhammad Haidar Amrullah

I. PENDAHULUAN

Genus *Vaccinium* (famili Ericaceae) mencakup berbagai spesies tumbuhan berbuah berry penting secara ekonomi dan ekologi, seperti *blueberry* dan *cranberry* (Zhidkin & Matveeva, 2022). Identifikasi taksonomi pada tingkat spesies sering kali menghadapi kendala jika hanya mengandalkan karakter morfologi, terutama pada spesimen tanpa organ reproduktif yang lengkap (Hebert et al., 2003; Stoeckle & Hebert, 2008). Oleh karena itu, pendekatan molekuler berbasis *DNA barcoding* menjadi metode standar yang tepercaya untuk autentikasi spesies dan studi filogenetik (Kress et al., 2005; Watoo et al., 2016).

Gen *maturase K* (*matK*) yang terletak pada intron gen *trnK* di dalam genom kloroplas (*plastid DNA*) diakui oleh Consortium for the Barcode of Life (CBOL) sebagai salah satu area *barcode*

utama tumbuhan (CBOL Plant Working Group, 2009; Hilu & Alice, 1999). Gen ini memiliki laju substitusi nukleotida 2 hingga 3 kali lebih tinggi dibandingkan gen kloroplas lain seperti *rbcL*, sehingga sangat ideal untuk membedakan antar-spesies yang berkerabat dekat (Lahaye et al., 2008; Selvaraj et al., 2008).

Meskipun demikian, keberhasilan amplifikasi melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sangat bergantung pada kualitas dan spesifisitas primer oligonukleotida yang digunakan (Rychlik, 1995). Kegagalan PCR sering disebabkan oleh kesalahan desain primer, seperti terbentuknya struktur sekunder (*hairpin*), pembentukan dimer (*self-annealing*), atau perbedaan suhu leleh (\$T_m\$) yang berlebihan (Dieffenbach et al., 1993; Kibbe, 2007). Penelitian ini bertujuan merancang dan memvalidasi pasangan primer PCR secara *in silico* untuk mengamplifikasi gen *matK* pada genus *Vaccinium* guna mendukung identifikasi molekuler yang akurat (Ye et al., 2012; Zhidkin & Matveeva, 2022).

II. METODE PENELITIAN

Data sekuens gen *matK* dari 10 target genus *Vaccinium* diunduh dari basis data GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Benson et al., 2013). Selanjutnya, sekuens disejajarkan menggunakan perangkat lunak MEGA11 (Tamura et al., 2021) dan BioEdit (Hall, 1999) untuk mengidentifikasi daerah konservatif (*conserved region*) serta menghitung proporsi kandungan GC dan AT (Cronn et al., 2008).

Kandidat primer dirancang pada daerah konservatif dengan panjang target ampikon berkisar 200 bp hingga >1000 bp (Kuzmina et al., 2012). Setiap kandidat primer dianalisis berdasarkan parameter fisik dan



Barongko

Jurnal Ilmu Kesehatan

termodinamika menggunakan *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator* (Kibbe, 2007), meliputi panjang basa 20–25 mer, kandungan GC ideal 40–50% (Rychlik, 1995), suhu leleh (*melting temperature/T_m*) 50–63°C (Kibbe, 2007), serta struktur sekunder berupa *hairpin* dan dimerisasi (*self-complementarity/self-annealing*) (Dieffenbach et al., 1993; Kibbe, 2007).

Kandidat primer yang menunjukkan pembentukan *hairpin* signifikan atau *self-annealing* dengan *mismatch* rendah dieliminasi. Kandidat primer *reverse* kemudian dikonversi menjadi *reverse complement* menggunakan *Sequence Manipulation Suite* (SMS) sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut (Stothard, 2000).

Pasangan primer yang lolos penapisan termodinamika selanjutnya diuji spesifisitas amplifikasinya secara *in silico* menggunakan *NCBI Primer-BLAST* (Ye et al., 2012), dengan parameter ukuran produk PCR 200–1500 bp, *T_m* minimum 57,0°C, optimum 60,0°C, maksimum 63,0°C, dan perbedaan *T_m* maksimum 3°C (Rychlik, 1995; Ye et al., 2012). Pencarian dilakukan terhadap genus *Vaccinium* (taxid: 13727) menggunakan basis data *RefSeq* dan *Nucleotide collection* (Benson et al., 2013; Ye et al., 2012).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Komposisi Basa Gen *matK* *Vaccinium*

Hasil penyelarasan (*multiple sequence alignment*) pada 10 sekuens gen *matK* genus *Vaccinium* menunjukkan bahwa proporsi populasi basa didominasi oleh basa AT (Zhidkin & Matveeva, 2022). Kandungan rata-rata basa kelompok adalah GC 40% dan AT 60%. Hal ini konsisten dengan karakteristik genom kloroplas tumbuhan yang secara umum kaya akan basa AT (Cronn et al., 2008; Hilu & Alice, 1999).

2. Penapisan Kandidat Primer (*Oligo Calc Analysis*)

Beberapa kandidat primer dirancang dan diuji struktur sekundernya menggunakan *Oligo Calc* (Kibbe, 2007). Penapisan dilakukan dengan ketat untuk menghindari kegagalan amplifikasi PCR (Dieffenbach et al., 1993).

3. Penapisan Kandidat Primer Reverse

a. Kandidat Reverse 1: 5'-GCG GTT TAT CAG ATT CTG ATA TTA-3'

Basa: G=4, C=3, T=10, A=6 (GC: 7, AT: 16) (Kibbe, 2007).

b. Kandidat Reverse 2: 5'-GTG CCA ATT ACT CCA ATG ATT GCA TC-3'

Basa: G=3, C=7, T=8, A=7.

Keputusan: Ditolak karena terdeteksi memiliki potensi pembentukan *hairpin* (*Potential hairpin formation*) yang dapat mengganggu ikatan primer pada templat (Dieffenbach et al., 1993; Kibbe, 2007).

c. Kandidat Reverse 3: 5'-AGA AGT TCG ATA CTC TAG TGC C-3'

Basa: G=5, C=5, T=6, A=6. Panjang: 22 basa, GC content: 45%,
\$T_m\$: 53°C (Kibbe, 2007).

Keputusan: Diterima, tidak menunjukkan struktur *hairpin* maupun *self-complementarity* (*None potential hairpin formation*) (Kibbe, 2007).



Barongko

Jurnal Ilmu Kesehatan

Sekuens *Reverse Complement* (diperoleh via SMS): 5'-GGCTAGAGTATCGAACTTCT-3' (Stothard, 2000).

4. Penapisan Kandidat Primer Forward

- a. **Kandidat Forward 1:** 5'-CTC CAC GAG TAT CCT TAA TCG GAA-3'

Basa: G=4, C=7, T=6, A=7.

Keputusan: Ditolak karena terdeteksi situs *self-annealing* (*All potential self-annealing sites are marked in red allowing 1 mismatch*) (Dieffenbach et al., 1993; Kibbe, 2007).

- b. **Kandidat Forward 2:** 5'-CAT GTA TGT GAA TAC GAA TCT ATC T-3'

Basa: G=4, C=4, T=8, A=8. Panjang: 25 basa, GC content: 32%,
\$T_m\$: \$51.1^{\circ}\text{C}\$ (Kibbe, 2007).

Keputusan: Diterima, struktur sekunder/hairpin tidak signifikan dan aman untuk analisis PCR (Kibbe, 2007).

- c. **Evaluasi Pasangan Primer Hasil Desain**

Berdasarkan hasil uji Oligo Calc dan Primer-BLAST, didapatkan dua pasang primer optimal untuk dua kisaran target perbandingan sekuens (Kibbe, 2007; Ye et al., 2012):

Tabel 1. Parameter Fisik dan Termodinamika Pasangan Primer Gen *matK Vaccinium*

Set	Arah	Sekuens	Panjang	GC (%)	Tm (°C)	Ukuran	Status
Primer		Oligonukleotida (5'→3')	(mer)			Amplikon (bp)	Hairpin / Dimer
Set 1	Forward	CAT GT ATG TG AAT AC GAA TC TAT CT	25	32.00	54.58	457 bp	Tidak Ada / Minimal
	Reverse	GGCAC TAGAG	22	45.45	57.07		Tidak Ada/



Barongko

Jurnal Ilmu Kesehatan

		TATCG					Minimal
		AACCTT					
		C					
		T					
Set 2	Forward	CAGC A ACAT G ACTT CA TATA TC C	23	39.13	51.17	222 bp	Tidak Ada/ Minimal
	Reverse	TATGG	22	45.45	53.00		Tidak
		ATCCTT					Ada/
		CTTGG T					Minimal
		TGAGC					

d. Validasi Spesifisitas via NCBI Primer-BLAST

1) Set Primer 1 (Sequence Compare 600 – >1000 bp)

Pengujian spesifisitas mengombinasikan Forward Primer (CATGTATGTGAATACGAATCTATCT) dan Reverse Primer GGCAGTAGAGTATCGAACTTCT) (Ye et al., 2012). Hasil verifikasi NCBI Primer-BLAST menunjukkan bahwa pasangan primer ini berhasil menempel secara spesifik pada gen kloroplas genus *Vaccinium* (Zhidkin & Matveeva, 2022). Amplikon yang dihasilkan berukuran 457 bp (posisi templat basa 1379–1835). Tidak ditemukan pasangan target non-spesifik pada organisme lain dalam kriteria stringensi yang ditetapkan (Ye et al., 2012).

2) Set Primer 2 (Sequence Compare >1000 bp)

Set primer kedua mengombinasikan Forward Primer (CAGCAACATGACTTCATATATCC) dan Reverse Primer (TATGGATCCTTCTTGGTTGAGC) (Ye et al., 2012). Hasil uji spesifisitas Primer-BLAST mengonfirmasi penempelan primer pada genom kloroplas *Vaccinium* (contoh: *Vaccinium vitis-idaea* chloroplast complete genome, Acc. No. NC_042817 / MH920388) (Benson et al., 2013; Zhidkin & Matveeva, 2022). Produk amplikon yang dihasilkan berukuran 222 bp (posisi templat 2168–2389) dengan tingkat kecocokan 100% pada area target (Ye et al., 2012).



Barongko

Jurnal Ilmu Kesehatan

IV. KESIMPULAN

Melalui pendekatan *in silico* menggunakan kombinasi alat analisis Oligo Calc dan NCBI Primer-BLAST, dua pasang primer spesifik untuk gen *matK* genus *Vaccinium* berhasil dirancang (Kibbe, 2007; Ye et al., 2012):

1. **Set Primer 1** (Forward: 5'-CATGTATGTGAATACGAATCTATCT-3' dan Reverse: 5'-GGCACTAGAGTATCGAACTTCT-3') menghasilkan produk PCR spesifik berukuran **457 bp**.
2. **Set Primer 2** (Forward: 5'-CAGCAACATGACTTCATATATCC-3' dan Reverse: 5'-TATGGATCCTTCTTGTTGAGC-3') menghasilkan produk PCR spesifik berukuran **222 bp**.

Kedua pasang primer ini terbukti bebas dari gangguan struktur sekunder yang berpotensi menghambat reaksi (seperti *hairpin* dan *self-dimerization*) serta memiliki spesifitas tinggi terhadap spesies dari genus *Vaccinium* (Dieffenbach et al., 1993; Zhidkin & Matveeva, 2022). Pasangan primer ini direkomendasikan untuk digunakan dalam pengujian eksperimental *in vitro* PCR untuk aplikasi *DNA barcoding* dan analisis filogenetik (Kuzmina et al., 2012).

DAFTAR PUSTAKA

1. Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
2. CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905801106>
3. Cronn, R., Liston, A., Parks, M., Gernandt, D. S., Shen, R., & Mok, J. H. (2008). Multiplex sequencing of plastid genomes, taking genomics to the species level. *Nucleic Acids Research*, 36(19), e122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn502>
4. Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*, 3(3), S30-S37. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.s30>
5. Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
6. Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
7. Hilu, K. W., & Alice, L. A. (1999). Evolutionary implications of *matK* sequence data in Poaceae. *American Journal of Botany*, 86(12), 1735-1741. <https://doi.org/10.2307/2656671>
8. Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W43-W46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm234>
9. Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8369-8374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>



Barongko

Jurnal Ilmu Kesehatan

10. Kuzmina, M. L., Johnson, K. L., Barron, A. J., & Hebert, P. D. (2012). Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library. *BMC Ecology*, 12(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-12-25>
11. Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., ... & Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2923-2928. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709936105>
12. Rychlik, W. (1995). Selection of primers for PCR. *Molecular Biotechnology*, 3(2), 129-134. <https://doi.org/10.1007/BF02789108>
13. Selvaraj, D., Sarma, R. K., & Sathishkumar, R. (2008). Phylogenetic analysis of chloroplast *matK* gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation*, 3(1), 24-27. <https://doi.org/10.6026/97320630003024>
14. Stoeckle, M. Y., & Hebert, P. D. (2008). Barcode of life. *Scientific American*, 299(4), 82-88. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1008-82>
15. Stothard, P. (2000). The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28(6), 1102-1104. <https://doi.org/10.2144/00286st02>
16. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
17. Wattoo, J. I., Asif, M., Shah, S. H., & Mirza, B. (2016). DNA Barcoding: Amplification and sequence analysis of *rbcL* and *matK* genome regions in divergent plant species. *Advancements in Life Sciences*, 4(1), 16-21.
18. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
19. Zhidkin, R. R., & Matveeva, T. V. (2022). Phylogeny problems of the genus *Vaccinium* L. and ways to solve them. *Ecological Genetics*, 20(3), 151-164. <https://doi.org/10.17816/ecogen109142>