



Optimization of the annealing temperature specific primers for detection of phytase gene from *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20

Seprianto*, Windy Wulansari, Febriana Dwi Wahyuni, Titta Novianti

Program Studi Bioteknologi, Fakultas Ilmu – Ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul, Jl. Arjuna Utara No.9, Jakarta

*Corresponding Author: seprianto@esaunggul.ac.id

ABSTRACT

Phytic acid is an anti-nutritional substance that can reduce digestibility, nutrient absorption, and the efficiency of feed utilization in livestock. Phytase is an enzyme capable of hydrolyzing phytic acid into inositol and phosphoric acid so that it can increase the absorption of nutrients in the digestive system. Phytase can be found in microorganisms such as molds, yeast, and bacteria. *Rhodotorula mucilaginosa* is one of the reported yeasts that has the potential to produce phytase enzymes. The aim of this study was to determine the optimal annealing temperature for detection of the phytase gene in the *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20 genome using several pairs of specific primers. This research was initiated by designing specific primers for phytase genes through the online site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Comparative sequence analysis was performed using Galaxy (<https://usegalaxy.org/>). The primary annealing temperature (T_a) was optimized using the PCR method. Four pairs of primers were used, where two pairs of primers (FitAF/FitAR and FitaseF/FitaseR) were designed in this study and the other two pairs of primers (*PhyR/F* and *FiF/FiR*) had been previously validated. The primers FitAF/FitAR and FitaseF/FitaseR were able to detect the phytase gene on *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20 at all tested temperatures (52, 54, 56, 58, and 60 °C), at indicated size of ± 500 bp. The detection using primers *PhyR/F* showed specific indicated size of ± 1171 bp at annealing temperatures (T_a) of 56, 58, and 60 °C. However, the primers *FiF/FiR* was unable to detect the specific phytase target gene.

Keywords: *phytic acid, phytase gene, annealing temperature, primer, R. mucilaginosa PK-S20*

Abstrak

Asam fitat merupakan zat antinutrisi yang dapat menurunkan pencernaan, penyerapan nutrisi serta efisiensi pemanfaatan pakan pada hewan ternak. Fitase adalah enzim yang mampu menghidrolisa asam fitat menjadi inositol dan asam fosfat sehingga dapat meningkatkan penyerapan nutrisi pada sistem pencernaan. Fitase dapat dijumpai pada mikroorganisme seperti kapang, yeast dan bakteri. *Rhodotorula mucilaginosa* salah satu yeast yang dilaporkan potensial menghasilkan enzim fitase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu annealing yang optimal dari beberapa pasang primer spesifik untuk deteksi gen penyandi fitase pada genom *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20. Penelitian ini diawali dengan desain primer spesifik untuk deteksi gen fitase menggunakan situs online <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Analisis sekuens komperatif dilakukan menggunakan Galaxy (<https://usegalaxy.org/>). Optimasi suhu *annealing* (T_a) primer dilakukan menggunakan metode PCR. Empat pasang primer yang digunakan adalah pasangan FitAF/FitAR, FitaseF/FitaseR, *PhyR/F* dan *FiF/FiR*. Dua pasang primer yang pertama merupakan hasil desain dari penelitian ini dan 2 pasang primer yang terakhir adalah primer yang sudah tervalidasi dari hasil penelitian sebelumnya. Pasangan primer FitAF/FitAR dan FitaseF/FitaseR dapat mendeteksi gen phytase pada DNA genom *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20 dengan amplifikasi optimal pada semua suhu (52, 54, 56, 58 dan 60 °C), ditandai dengan terbentuknya pita DNA pada ukuran ± 500 bp. Deteksi menggunakan primer *PhyR/F* juga menghasilkan pita DNA yang spesifik pada ukuran ± 1171 bp pada

suhu optimal 56, 58, dan 60 °C. Namun demikian pasangan primer *FiF/FiR* tidak berhasil mendeteksi secara spesifik gen fitase dalam genom *R. mucilaginosa* RG-PK20.

Kata Kunci : asam fitat, gen fitase, suhu annealing, Primer, *R. mucilaginosa* PK-S20

PENDAHULUAN

Asam fitat merupakan zat yang dapat menurunkan pencernaan, penyerapan nutrisi serta efisiensi pemanfaatan pakan pada hewan ternak. Asam fitat tersimpan sebagian besar (60-90 %) fosfor yang terdapat pada berbagai bijian. Asam fitat dapat bereaksi membentuk senyawa kompleks dengan kalsium, magnesium, tembaga, seng, karbohidrat dan protein sehingga dapat mengurangi pencernaan nutrisi dan membuatnya tidak tersedia untuk hewan monogastrik [1]. Karena itu, asam fitat dalam makanan manusia dan hewan dapat menyebabkan kekurangan mineral (misalnya, besi (Fe), seng (Zn), dan kalsium (Ca)). Makanan hewan sering didasarkan pada bahan yang berasal dari tumbuhan, seperti sereal, jagung, atau biji minyak yang mengandung fitat (garam asam fitat), dan akibatnya, dapat mempengaruhi penyerapan kation logam [2]. Salah satu enzim eksonegus pemecah asam fitat adalah enzim fitase.

Fitase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases, EC 3.1.3.26, EC 3.1.3.8) adalah kelas khusus dari fosfatase, seperti histidin asam fosfatase (HAP), b-propeller phytase (BPP), dan asam fosfatase ungu (PAP) [3]. Fitase adalah enzim yang mampu menghidrolisa asam fitat menjadi inositol dan asam fosfat. Inositol merupakan salah satu vitamin yang diperlukan untuk pertumbuhan normal tubuh, pemeliharaan dan reproduksi [4]. Reduksi asam fitat secara metode fisika dan kimia diketahui mengurangi sifat nutrisi makanan, karena permasalahan tersebut terjadi secara terus menerus dan berakibat pada pembuangan yang dapat mencemari lingkungan [1].

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan enzim fitase mampu mendegradasi asam fitat dengan baik. Pada beberapa tahun terakhir, enzim fitase sangat intensif diteliti dan menjadi enzim yang mempunyai nilai komersial tinggi. Hal ini disebabkan oleh kemampuan mereduksi senyawa fitat dalam rangsum makanan ternak. Fitase dapat dijumpai pada mikroorganisme seperti kapang, yeast dan bakteri, baik fitase ekstraseluler maupun intraseluler [5].

Salah satu jenis mikroorganisme dari kelompok yeast yang telah dilaporkan potensial menghasilkan enzim fitase adalah *Rhodotorula mucilaginosa* [6]. Chanklan dkk melaporkan *Rhodotorula mucilaginosa* optimum menghasilkan enzim fitase pada kondisi pH 4 dengan suhu inkubasi 40 °C. Sementara Yu dkk melaporkan *Rhodotorula mucilaginosa* strain JMUY14 dari sedimen laut dalam antartika mampu menghasilkan enzim fitase yang dapat beradaptasi pada suhu dingin (*cold-adapted phytase*) [7]. *Rhodotorula sp* adalah yeast uniseluler yang ditandai dengan tingkat pertumbuhan yang tinggi diberbagai habitat. Beberapa spesies dari *Rhodotorula* merupakan organisme saprofit yang dapat diisolasi dari sumber lingkungan seperti tanah, air tawar, air laut, laut dingin, fermentasi susu, salad buah, fermentasi buah dan sayur [8]. Yeast *R. mucilaginosa* RG-PK20 sendiri di isolasi dari ragi alami dari fermentasi kismis yang secara pertumbuhan sudah terbukti sebagai kandidat probiotik [9].

Produksi enzim fitase dari strain liar mempunyai beberapa kekurangan diantaranya selain produk yang dihasilkan sedikit, protein yang dihasilkan juga bercampur dengan protein non-target, sehingga diperlukan sentuhan teknologi rekayasa molekuler yaitu dengan melakukan deteksi gen fitase menggunakan primer spesifik yang dapat mengamplifikasi gen penyandi enzim fitase. Harapannya gen ini dapat dikloning dan diekspresikan kembali menggunakan perantara bakteri yang mudah dikultur seperti *Escherichia coli*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu *annealing* (T_a) yang optimal dari beberapa primer spesifik untuk deteksi gen penyandi fitase pada genom *R. mucilaginosa* RG-PK20.

METODE PENELITIAN

Prekultur *R. mucilaginosa* RG-PK20

Isolat aktif *R. mucilaginosa* RG-PK20 dikultur dalam 100 mL medium cair YPD *Yeast Extract–Peptone–Dextrose YPD (broth)*, dan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 3 hari dalam *shaking waterbath* dengan kecepatan 120 rpm. Kultur yeast yang baik

ditandai dengan media yang berwarna keruh kemerahan.

Isolasi DNA Genom Yeast

Sebanyak 1.5 mL kultur *R. mucilaginosa* RG-PK20 ditransfer ke dalam mikrotub dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Pelet yeast diambil untuk diisolasi DNANYA mengikuti prosedur standar *Presto mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid)*. Kemurnian diukur menggunakan *TECAN Nanoquant* pada panjang gelombang 230, 260 and 280 nm.

Desain Primer Spesifik Gen Fitase

Selain menggunakan primer yang sudah dipublikasikan (Tabel 2), primer spesifik gen fitase didesain berdasarkan dari hasil penelusuran sekuens gen fitase yang ada di GenBank melalui situs online <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Analisis sekuens komperatif menggunakan (<https://usegalaxy.org/>). Desain primer menggunakan *PrimerBLAST*, pengecekan parameter primer menggunakan *Netprimer*, dilakukan PCR insilico menggunakan *SnapGene 6.1.1* untuk memastikan hasil produk PCR yang diharapkan melalui situs (<https://www.snapgene.com>)(10).

Optimasi Primer untuk Deteksi Gen Fitase dengan Metode PCR

Deteksi gen fitase dari DNA genom *R. mucilaginosa* RG-PK20 diamplifikasi menggunakan

primer spesifik gen dengan 25 μ L total reaksi PCR yang mengandung 1 μ L DNA genom 30 μ g/mL, 12.5 μ L PCR Master Mix 2x (*Thermo Scientific*), 1 μ L masing-masing primer 10 μ M, 9.5 μ L ddH₂O. Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan kondisi PCR pra-denaturasi selama 5 menit pada suhu 95°C sebanyak satu kali, denaturasi 95°C selama 60 detik, penempelan primer pada suhu 61°C selama 60 detik, dan pemanjangan pada 72°C selama 60 detik. Pada siklus pasca-PCR dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit (11).

HASIL PENELITIAN

Desain Primer Spesifik Gen Fitase

Desain primer diawali dengan pengunduhan sekuens enzim fitase (*no. accession* XP_016274299.1) yang dihasilkan oleh *Rhodotorula toruloides* NP11 dari GenBank melalui *platform* NCBI (Gambar 1). Penelusuran sekuens fitase diperoleh dari kerabat terdekat *R. Mucilaginosa*. Sekuens genom DNA *R. mucilaginosa* diunduh menggunakan situs *European Nucleotide Archive* (<https://www.ebi.ac.uk>) dengan kode nomor akses RZHN01000000. Sekuens gen fitase (*no. accession* TNY23137.1) dari *putative phytase* dan sekuens genom *R. mucilaginosa* dilakukan analisis komparatif antara kedua sekuens dengan menggunakan website dari *platform* Galaxy (<https://usegalaxy.org/>).

```
>ref|XP_016274299.1|:1-561 phytase [Rhodotorula toruloides NP11]
MQHPEGVPDDSDLDSNAPLLPTTARTDEERKDP SHARYFAWAWAVLGTFAIGLLWLAFGQAYLDRREDE
ARKGDPGFPSRIGFEGPTPTGGEAFAAATSYPHNFSSPLNPPSLATEEFNLLHYLGNLSPWRTVNHGL
KSTAQVPDGCVVEQVQLLRHGARYPTSGAGTESFAKNVVGVEGFKASGNLTFLNDWKYRLGAEILTPFG
REQLFNLGVSFRTKYGHLLKPGQKPVFRTESQDRMLKSALNFAAGFFGVPEEYQYHQLITVEWPGFNNTL
APYMTCKNANRMDLTRGPQKMAEWIKIYLADALERMQAQVEGVKLT HRDVFNMQLLCAYELVALGGS AFC
PLFTEDEWRGFEYAHDIEFFDIFSFGQSAQA AVGKGVQEWLARTLNQPLSEFNSTTNSTLHTSRYFPLD
QNIYVDATHDTIVSAVIVSLGFSSFARSAPLPTDHIPDLSFVTSSISPFAANLHSQVLS CPDSPLAKPG
RSRFVRIWLN DGVVPLDSIDGCVANE EGMCELDAFVRATQRRLEEIDWAYDCLGHYKLPREPI RDGRPPH
S
```

Gambar 1. Sekuens protein enzim fitase pada *Rhodotorula toruloides* NP11

Tabel 1. Hasil analisis komparatif parameter desain primer gen fitase

Parameter	Standar	
	Minimum	maksimum
Ukuran produk	400 bp	600 bp
Panjang primer	20 bp	22 bp
Tm Primer	58 °C	60 °C
GC content	45 %	55%
GC clamp	0	
Max self complementary	4.00	1.00
Max 3' self complementary	4.00	1.00
Max 3' stability	9.00	

Tabel 2. Hasil putative gen fitase dan *R. mucilaginosa*

<i>qaccver</i> (Gen Fitase)	<i>saccver</i> <i>R.mucilaginosa</i>	length	pident	bitscore	score
XP_016274299.1	ENA RZHN01000022	189	58.73	209	532

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTTCCCCTGACCGAATGAAC	Plus	20	19	38	57.81	50.00	3.00	0.00
Reverse primer	CCATACTTTGCCCTGAACGA	Minus	20	520	501	57.89	50.00	3.00	0.00
Product length	502								
Primer pair 2									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTTTCCCCTGACCGAATGAA	Plus	20	18	37	57.81	50.00	3.00	0.00
Reverse primer	AAAATTGAGCGCCGACTTGA	Minus	20	599	580	58.77	45.00	4.00	1.00
Product length	582								
Primer pair 3									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTCAATGGGTTCAAAGCGTG	Plus	20	306	325	57.95	50.00	3.00	0.00
Reverse primer	ACTTCCGCTTCTTGGTGTG	Minus	19	838	820	57.99	52.63	2.00	0.00
Product length	533								
Primer pair 4									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TATTCTGCATCACCTCGGCA	Plus	20	62	81	59.17	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	GAGGAGCCCAAAAGACTCAC	Minus	20	638	619	58.19	55.00	3.00	0.00
Product length	577								
Primer pair 5									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCTGACCGAATGAACCTCT	Plus	20	23	42	59.09	55.00	2.00	0.00
Reverse primer	GGTCGTTGCCCTCTTTCA	Minus	19	547	529	57.98	52.63	2.00	1.00
Product length	525								

Gambar 2. Kandidat primer terpilih hasil analisis *PrimerBLAST* (lingkaran merah menunjukkan pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini.

Hasil analisis komperatif menunjukkan ukuran produk dengan rentang 400 – 600 bp dan panjang primer 20 – 22 bp dengan Tm (58 – 60 °C) serta persentase GC (45 – 55%). Standar ini yang direkomendasikan dalam mendesain suatu primer baik (Tabel 1). Desain primer dilakukan dengan menggunakan website *PrimerBLAST*

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) dengan memasukkan *putative gene* fitase yang telah dipilih dengan mengatur parameter yang diinginkan. Hasil analisis komparatif menggunakan *platform Galaxy* yang telah dilakukan antara sekuens gen fitase dan sekuens *R. mucilaginosa* menunjukkan dengan

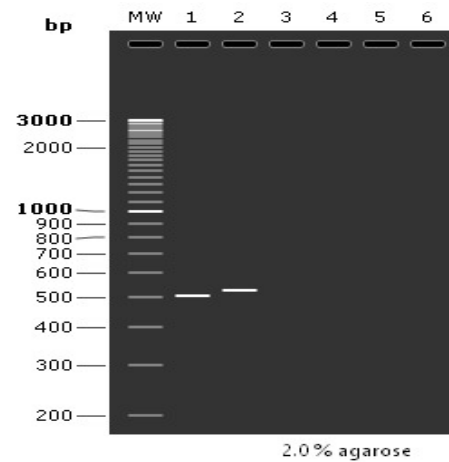
hasil *putative* yang perlu diperhatikan untuk analisis ini yaitu *length*, *pident*, *bitscore* dan *score*. Hasil analisis *putative* mempunyai parameter terbaik yaitu dengan ukuran *pident* sebesar 58.73, *length* sebesar 189 dan *bitscore* sebesar 209 dan *score* 532 (Tabel 2).

Hasil analisis *PrimerBLAST* didapatkan 5 pasang kandidat primer yang baik, akan tetapi dari 5 kandidat primer tersebut didapatkan dua kandidat utama yang sesuai dengan parameter yang diinginkan dalam desain primer yaitu terdapat pada *pair 1* dan *pair 5* (Gambar 2).

Pasangan primer 1 dan primer 5 dipilih sebagai primer yang akan digunakan untuk deteksi gen fitase pada yeast *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20 dengan masing – masing primer 1 dengan kode primer FitAF/FitAR dengan ukuran 502 bp dan primer 5 dengan kode primer FitaseF/FitaseR dengan ukuran 525 bp dengan rata – rata panjang sekuens 20 bp. Selain 2 pasang primer yang didesain dalam penelitian ini, digunakan juga 2 pasang primer spesifik gen fitase yaitu primer *PhyF/PhyR* dengan panjang produk 1171 bp (11) dan primer *FiF/FiR* dengan panjang produk 500 bp (10) (Tabel 3).

Pasangan primer kemudian dianalisis menggunakan server web *SnapGene Viewer* melalui situs web (<https://www.snapgene.com>) untuk mengetahui kemampuan primer dapat menempel pada DNA *template*. Jumlah siklus yang dibutuhkan adalah sekitar 24 siklus dimana

amplifikasi akan linear pada siklus 21. Estimasi siklus tersebut didasari oleh kalkulasi parameter *default Bioline PCR Calculator* sesuai dengan amplifikasi fragmen dengan algoritma reaksi mendekati normal. Hasil simulasi pada Gambar 3 menunjukkan adanya pita DNA yang terbentuk sesuai dengan ukuran gen fitase yang ditargetkan yaitu primer 1 dan primer 5 masing – masing dengan ukuran 502 bp dan 525 bp. Analisis ini menggunakan perakat lunak (https://www.bioline.com/media/calculator/01_14.html).



Gambar 3. Visualisasi DNA gen fitase pada gel agarose secara *in silico* (1) primer 1 (2) primer 5 (MW) marker 1Kb DNA Ladder.

Tabel 3. Beberapa primer yang digunakan dalam penelitian ini

Primer	Sekuen nukleotida (5' ke 3')	Referensi	Produk PCR (bp)
<i>PhyF</i>	TTAGGTACCATGAATCATTCAAAAACAC	(11)	1171
<i>PhyR</i>	ATTGAGCTCTTATTTTCCGCTTCTGTCAGTC		
<i>FiF</i>	TCT GAC CTG CTT CCT TGG	(12)	500
<i>FiR</i>	CGG ATT GTA AAC GGC AGC		
FitAF	TTTCCCCTGACCGAATGAAC	desain penelitian (primer 1)	502
FitAR	CCATACTTTGCCCTGAACGA		
FitaseF	CCCTGACCGAATGAACCTCT	desain penelitian (primer 5)	525
FitaseR	GGTCGTTGCCCTTCTTTCA		

Tabel 4. Hasil pengukuran kuantifikasi DNA genom *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20

No	Kode Isolat	λ 260 (ng/ μ l)	λ 280 (ng/ μ l)	Kosentrasi (ng/ μ l)	Kemurnian A260/280
1	DNA1	0,0031	0,0017	3,1	1,82
2	DNA2	0,0081	0,0044	8,1	1,84
3	DNA3	0,0055	0,0027	5,5	2,04

Sumber: data primer

Isolasi DNA *Rhodotorula mucilaginosa* PK-S20

Isolasi DNA genom *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20 menggunakan *Presto mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid) dengan mengambil sebanyak 3 ml kultur yeast dalam medium YPD. Hasil isolasi DNA diukur kemurnian dan kosentrasi menggunakan Nanoquant (*TECAN Multimode Reader*). Tujuan pengukuran ini untuk membandingkan ekstrak DNA dalam satuan nano gram per satu mikroliter pada panjang gelombang A260/280 (ng/ μ L) berdasarkan nilai absorbansi sebesar 1,8 menunjukkan bahwa DNA yang diekstraksi memiliki kemurnian tinggi dengan tidak adanya protein dan fenol (13). Hasil pengukuran kemurnian DNA genom *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20 menunjukkan kemurnian yang baik dengan rasio A260/280 dengan 3 kali ulangan dengan rata – rata sampel sebesar (1,82), (1,84) dan (2,04) dengan kosentrasi berturut (3,1 ng/ μ l), (8,1 ng/ μ l) dan (5,5 ng/ μ l) (Tabel 4).

Optimasi primer Spesifik Gen Fitase dengan PCR Gradien

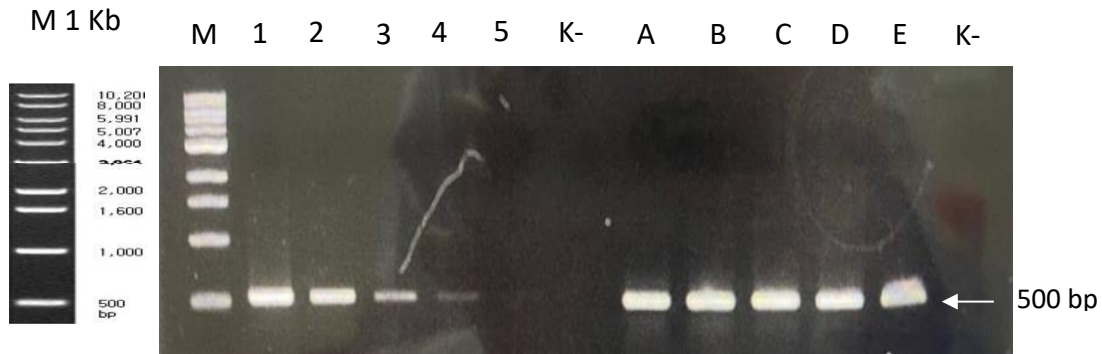
Optimasi primer spesifik gen fitase dengan perlakuan suhu *annealing* (Ta) yang berbeda dilakukan supaya primer dapat menempel dengan baik dan spesifik pada *template* DNA gen fitase dalam genom *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20. Suhu *annealing* (Ta) yang digunakan dalam optimasi ini dengan *range* suhu 52, 54, 56, 58 dan 60 ($^{\circ}$ C). Dua pasang primer spesifik FitAF/FitAR dan FitaseF/FitaseR untuk deteksi gen fitase didesain dengan nilai Tm (*temperature melting*) antara 57 – 59 $^{\circ}$ C. Hasil PCR memperlihatkan kedua pasang primer tersebut mampu mendeteksi gen fitase pada semua suhu *annealing* yang digunakan, yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA yang berhasil teramplifikasi dengan jelas dan tebal pada ukuran \pm 500 bp. Namun demikian, primer FitaseF/FitaseR menghasilkan pita DNA yang tipis pada suhu *annealing* (Ta 58 $^{\circ}$ C), dan pada

suhu *annealing* (Ta 60 $^{\circ}$ C) tidak ada pita DNA yang dihasilkan (Gambar 4). Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat menyebabkan produktivitas PCR menjadi rendah. Sehingga suhu yang diperlukan untuk penempelan primer ini tergantung pada komposisi basa, panjang, dan kosentrasi DNA. Akan tetapi suhu *annealing* yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel tidak spesifik pada DNA *template* (20).

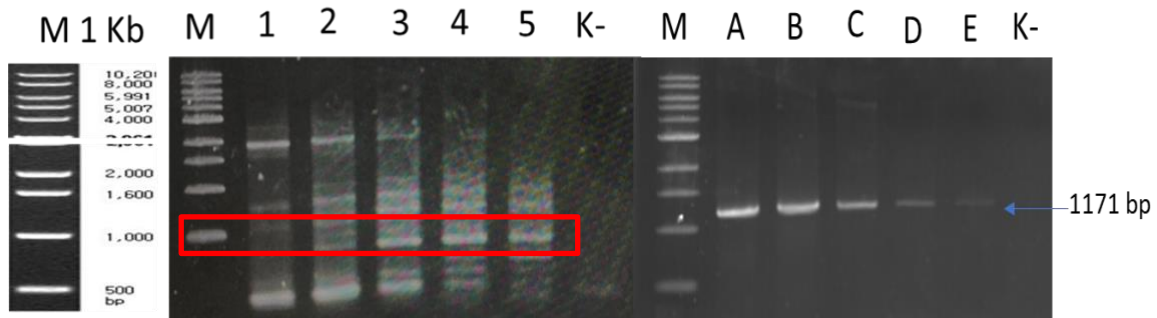
Selain dua primer spesifik FitAF/FitAR dan FitaseF/FitaseR, optimasi deteksi juga dilakukan pada 2 pasang primer lain yang sudah dipublikasikan sebelumnya, yaitu primer *PhyF/PhyR* dan *FiF/FiR*. Optimasi ini bertujuan untuk mendapatkan suhu *annealing* yang optimal dalam penempelan primer pada DNA target (*exogenous DNA*). Kedua primer ini memiliki gen target fitase pada sampel yang berbeda yaitu pada bakteri *Bacillus subtilis* (11). Suhu *annealing* (Ta) dan jumlah siklus PCR yang digunakan untuk optimasi ini sama dengan reaksi PCR dengan primer sebelumnya, yaitu pada suhu 52, 54, 56, 58 dan 60 ($^{\circ}$ C) dengan 35 siklus PCR. Hasil PCR menunjukkan bahwa pasangan primer *FiF/FiR* tidak dapat mengamplifikasi secara spesifik pada gen target (\pm 500 bp), ditandai dengan terbentuknya banyak pita DNA berbagai ukuran yang tidak spesifik dan ada semua kondisi suhu *annealing* (Gambar 5). Meski demikian, pada Ta 52 $^{\circ}$ C tidak ada pita DNA yang dihasilkan.

Optimasi PCR pada pasangan primer *PhyF/PhyR* menggunakan suhu gradien 56 $^{\circ}$ C, 58 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 61 $^{\circ}$ C dan 62 $^{\circ}$ C, dengan 30 siklus PCR. Hasil amplifikasi tersebut menghasilkan pita DNA tunggal pada ukuran target yang sesuai yaitu \pm 1171 bp (Gambar 5). Target gen tersebut teramplifikasi pada semua kondisi suhu *annealing* meski sedikit lebih tipis pada Ta 61 $^{\circ}$ C dan 62 $^{\circ}$ C. Produk target PCR pada ukuran \pm 1171 bp tersebut sesuai dengan ukuran gen target gen fitase pada *Bacillus subtilis* yang berhasil diamplifikasi sebelumnya pada suhu *annealing* optimal (Ta) 61

°C. Gen fitase tersebut juga telah berhasil dikloning kedalam genom *Escherichia coli* (11).



Gambar 4. Hasil amplifikasi PCR gen fitase dalam pada DNA genom *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20 menggunakan primer FitAF/R dan FitaseF/R (M: Marker 1 Kb DNA Ledder) (**Sampel 1-5**) Primer fitaseF/R (1) Ta 52 °C (2) Ta 54 °C (3) Ta 56 °C (4) Ta 58 °C (5) Ta 60 °C (**Sampel A-E**) primer FitAF/R (A) Ta 52 °C (B) Ta 54 °C (C) Ta 56 °C (D) Ta 58 °C (E) Ta 60 °C (K-) kontrol negatif ddH₂O.



Gambar 5. Hasil amplifikasi PCR gen fitase pada DNA genom *Rhodotorula mucilaginosa* PK-S20 menggunakan primer *PhyF/PhyR* dan *FiF/FiR* (M: Marker 1 Kb DNA Ledder) (**Sampel 1-5**) Primer *FiF/FiR* (1) Ta 52 °C (2) Ta 54 °C (3) Ta 56 °C (4) Ta 58 °C (5) Ta 60 °C (**Sampel A-E**) primer *PhyF/PhyR* (A) Ta 56 °C (B) Ta 58 °C (C) Ta 60 °C (D) Ta 61 °C (E) Ta 62 °C (K-) kontrol negatif ddH₂O.

PEMBAHASAN

Hasil analisa *putative gene* pada penelitian ini antara gen fitase dengan *genomic DNA R. mucilaginosa* sebagai kandidat model primer telah mempunyai parameter terbaik dan sesuai kriteria standar (Tabel 3). Pemilihan gen putatif sebagai kandidat dalam model desain primer dapat ditentukan dengan mengambil sebagian parameter yang cukup mewakili untuk dapat dikatakan sebagai *putative gene* terbaik dalam mendesain primer (14). Adapun parameter yang dapat diperhatikan untuk analisis ini yaitu *length*, *pident* dan *bitscore* (15).

Proses desain primer pada penelitian ini dilakukan dengan *metode in silico* menggunakan

PrimerBLAST dan analisa lebih lanjut untuk mengidentifikasi primer yang paling efisien dengan menggunakan *NetPrimer*. Selain kedua tools tersebut, pilihan software lain yaitu *Oligo Calc*, *Beacon Designer*, dan *Oligo Elevator* (16). Hasil desain primer penelitian ini menghasilkan lima pasang kandidat primer yang memenuhi standar kriteria kelayakan primer secara umum, yaitu 18-30 basa nukleotida (17). Ukuran primer yang terlalu pendek akan mengurangi tingkat spesifitas primer sehingga dapat menempel pada template pada suhu *annealing* yang tidak diinginkan. Sedangkan jika ukuran primer yang terlalu panjang tidak akan menempel pada template yang diinginkan (18).

Pada penelitian ini dipilih pasangan primer 1 dan primer 5 untuk deteksi gen fitase pada yeast *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20 karena kedua pasang primer ini telah memiliki kriteria yang paling baik di antara pasangan primer yang lain. Kriteria desain primer yang baik yaitu pada suhu T_m yang berkisar antara 40–60 °C. Karena primer dengan T_m terlalu tinggi dan melebihi 70°C akan mudah mengalami *mispriming*. (19)

Hasil uji *PCR in silico* dan simulasi elektroforesis pada gel agarose 2% untuk primer FitAF/R dan primer fitaseF/R menunjukkan pita DNA dengan ukuran 502 bp dan ukuran 525 bp (Gambar 3). Produk yang dihasilkan tersebut telah sesuai dengan ukuran analisis *PrimerBLAST*. Metode *PCR in silico* ini dapat membantu dalam pemilihan primer, dalam mengidentifikasi adanya potensi masalah ketidakcocokan pada situs pengikatan primer karena adanya *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), SNP merupakan salah satu bentuk variasi materi genetik yang ditunjukkan oleh perbedaan nukleotida tunggal (adenin, timin, guanin, sitosin) dalam susunan rangkaian basa DNA (20).

Optimasi primer dilakukan dengan uji *trial and error*, yang bertujuan untuk mendapatkan suhu *annealing* (T_a) primer terbaik yang kemudian akan digunakan dalam deteksi dan amplifikasi gen fitase pada genom *Rhodotorula Mucilaginosa* RG-PK20 dengan metode PCR. Optimasi harus dilakukan sebelum deteksi sampel penelitian menggunakan *PCR gradient*, sehingga didapatkan komposisi dan kondisi PCR yang sesuai, hal ini bertujuan untuk mencapai hasil PCR yang optimal. Optimasi dilakukan dengan menggunakan suhu *annealing* dengan suhu terendah 5°C dibawah *melting temperature* (T_m)(21). Kemudian, pada mesin PCR variasi suhu *annealing* ini dilakukan dengan memasukkan program *gradient*. Primer dapat menempel pada DNA template apabila suhu yang digunakan merupakan suhu optimum, sehingga suhu yang digunakan dalam tahap *annealing* merupakan faktor penting keberhasilan amplifikasi DNA dengan metode PCR (22)

Penelitian ini mengoptimasi suhu *annealing* pada rentang suhu 52, 54, 56, 58, 60 (°C). Berdasarkan hasil PCR, amplifikasi gen fitase pada primer fitAF/R memiliki kualitas pita DNA yang terlihat terang dan tebal pada suhu 52 °C sampai 60 °C. Sedangkan pada primer fitaseF/R memiliki kualitas pita produk yang baik (52, 54, 56 °C) namun pada suhu 58 °C terlihat kualitas pita DNA menurun

dan bahkan tidak terlihat di suhu 60 °C (Gambar 4). Kualitas DNA yang terekstraksi ditunjukkan oleh adanya *smear* pada pita DNA, semakin sedikit atau tidak adanya *smear* menunjukkan semakin baik kualitas DNA (23) Pemilihan suhu yang terlalu tinggi dapat menghambat terbentuknya *primer dimer* pada DNA *template*, sedangkan suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan penempelan primer yang tidak spesifik pada DNA *template* (21)

Primer memiliki basa GC pada ujung 3'. GC *clamp* yang di maksud adalah ujung C,G,CG atau GC yang dapat membuat hibridisasi menjadi stabil dan perlu dihindari lebih dari 3 basa G atau C pada 5 basa terakhir diujung 3' karena bisa melipat membentuk struktur dimer yang mengakibatkan primer tidak terikat pada template DNA (24). Penggunaan primer *FiF/FiR* pita DNA muncul di berbagai ukuran di semua suhu *annealing* (52, 54, 56, 58 dan 60°C). Hal ini menandakan primer tidak spesifik pada sekuen gen fitase karena dapat menempel dibanyak *region* pada genom *Rhodotorula mucilaginosa* PK-S20 dengan target ukuran ± 500 bp. Namun berbeda dengan pasangan primer *PhyF/PhyR* menghasilkan produk PCR dengan pita DNA tunggal (± 1171 bp) (Gambar 5). Hal ini dapat di simpulkan primer *PhyF/PhyR* spesifik untuk gen fitase diberbagai spesies. Penelitian sebelumnya oleh Saadi dkk primer *PhyF/PhyR* berhasil mengamplifikasi gen fitase pada genom *Bacillus subtilis* dengan ukuran 1171 bp dan berhasil dikloning kedalam plasmid pGEM-T easy dengan prinsip TA-Cloning (11). Primer yang tidak spesifik dapat menempel dibanyak daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sebagai sasaran gen target. Untuk itu, di perlukan desain *in silico* untuk menemukan primer yang memenuhi kriteria amplifikasi primer yang tepat (25).

KESIMPULAN

Penggunaan empat pasang primer spesifik untuk mendeteksi gen fitase pada DNA genom *Rhodotorula mucilaginosa* RG-PK20 dengan 2 pasang primer (FitAF/FitAR dan FitaseF/FitaseR). Hasil desain penelitian kedua pasang primer berhasil mengamplifikasi gen fitase pada suhu *annealing* optimal (T_a) (52, 54, 56, 58 dan 60 °C) dengan terbentuknya pita DNA yang tebal ukuran ± 500 bp. Sedangkan primer *PhyR/F* menghasilkan pita DNA spesifik dengan ukuran ± 1171 bp dengan (T_a) suhu *annealing* optimal pada 56, 58, 60 °C. Namun

berbeda dengan pasangan primer *FiF/FiR* menunjukkan tidak spesifik pada gen target fitase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Esa Unggul atas dana penelitian yang di berikan melalui Hibah Internal 2022 dan Laboratorium Terpadu Fakultas Ilmu – Ilmu Kesehatan atas fasilitas penelitian yang disediakan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Singh B, Boukhris I, Pragya, Kumar V, Yadav An, Farhat-Khemakhem A, et al. Contribution of microbial phytases to the improvement of plant growth and nutrition: A review. *Pedosphere* [Internet]. 2020;30(3):295–313. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60010-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60010-8) [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60010-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60010-8)
- [2] Gessler NN, Serdyuk EG, Isakova EP, Deryabina YI. Phytases and the Prospects for Their Application (Review). *Appl Biochem Microbiol.* 2018;54(4):352–60. <https://doi.org/10.1134/S0003683818040087>
- [3] Mullaney EJ, Ullah AHJ. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312(1):179–84.
- [4] Rochmawati AM, Arief M, Prayogo. Penambahan Enzim Fitase Pada Pakan Buatan Terhadap Nilai Kecernaan Protein Dan Energi Ikan Baung (*Mystus nemurus*) Dengan Teknik Pembedahan The Addition of Phytase Enzyme of Artificial Feed on the Digestibility Values Protein and Energy Baung Fish (*Myst.* *J Aquac Fish Heal.* 2016;6(1):1–7.
- [5] Sajidan S. Isolasi dan Karakterisasi Fitase pada Mikrobial yang Terdapat pada Pupuk Kompos, Rumen Sapi, Ragi dan Tanah Sawah. *Sains Peternak.* 2017;5(1):10. <https://doi.org/10.20961/sainspet.v5i1.4902>
- [6] Chanklan R, Jindamorakot S, Limtong S. mucilaginoso ZML2 - 31 และสมบัติ Optimal Conditions for Phytase Activity from Epiphytic Yeast *Rhodotorula mucilaginoso ZML2 - 31 and Their Properties for Phosphate Liberation.* 2021; <https://doi.org/10.14456/tjst.2021.31>
- [7] Yu P, Wang XT, Liu JW. Purification and characterization of a novel cold-adapted phytase from *Rhodotorula mucilaginoso* strain JMUY14 isolated from Antarctic. *J Basic Microbiol.* 2015;55(8):1029–39. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400865>
- [8] Sattarova RK, K. Sattarova R. Endophytic Yeast *Rhodotorula rubra* Strain TG-1: Antagonistic and Plant Protection Activities. *Biochem Physiol Open Access.* 2013;02(01):1–5. <https://doi.org/10.4172/2168-9652.1000104>
- [9] Seprianto S, Wahyuni FD, Novianti T, Turnip ON, Saputra IK. Isolation and identification of yeast from fermented raisins extract as probiotic candidates. *4TH Int Conf LIFE Sci Technol.* 2023;2634(January):020093. <https://doi.org/10.1063/5.0111410>
- [10] Fakhri TM, Wijaya S, Priani SE. Desain Primer Gen 12S rRNA dari DNA Mitokondria Babi (*Sus scrofa*) secara In Silico sebagai Kandidat Primer dalam Analisis Molekuler Kehalalan Produk. *J Sains Farm Klin.* 2021;8(3):316. <https://doi.org/10.25077/jsfk.8.3.316-322.2021>
- [11] Saadi MI, Doosti A, Jalali H, Abdolyousefi EN, Hooshiyar M, Tabrizi R, et al. Cloning of bacillus subtilis phytase gene construct in escherichia coli. *Iran J Microbiol.* 2021;13(5):664–70.
- [12] Wang X, Upatham S, Panbangred W, Isarangkul D, Sumppunn P, Wiyakrutta S, et al. Purification, Characterization, Gene Cloning and Sequence Analysis of a Phytase from *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY-5. *ScienceAsia.* 2004;30:383–90.
- [13] Latif AA, Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods.* 2017;1–9. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- [14] Fraser-Smith S, Czislawski E, Meldrum RA, Zander M, O'Neill W, Balali GR, et al. Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Pathol.* 2014;63(5):1044–52.

- [15] Megléc E, Pech N, Gilles A, Dubut V, Hingamp P, Trilles A, et al. QDD version 3.1: A user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: Experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Mol Ecol Resour.* 2014;14(6):1302–13. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12271>
- [16] Naroeni A, Seprianto S, Moda KF. In Silico Analysis of Sox2 Gene for Pluripotency Detection at Mouse Embryonic Fibroblast and induced Pluripotent Stem Cell (iPSC). *Nusant Sci Technol Proc.* 2022;2022:1–10. <https://doi.org/10.11594/nstp.2022.2101>
- [17] Seprianto SW. FD. Analisis Bioinformatika Gen Potensial Penyandi Halichondrin B Dari Spons Laut Sebagai Kandidat Anti Kanker. *Indones J Biotechnol Biodivers.* 2018;II:57–66.
- [18] Carriço JA, Sabat AJ, Friedrich AW, Ramirez M. Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: Databases, tools and the next-generation sequencing revolution. *Eurosurveillance.* 2013;18(4):1–8. <https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20382-en>
- [19] Wahyuni FD, Seprianto, Saraswati H. Detection of cryII gene from *Bacillus thuringiensis* using Polymerase Chain Reaction (PCR). *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2021;743(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/743/1/012093>
- [20] Seprianto ., Wahyuni F, Saraswati H, Praptiwi R. In Silico Analysis for Detection of CryII Gene from Local Isolates of *Bacillus thuringiensis*. 2020;(9):127–32. <https://doi.org/10.5220/0009568301270132>
- [21] Nabila TT, Wasiati AR, Jati AP, Khumaira A. The design of Indonesian SARS-CoV-2 primers based on phylogenomic analysis of the SARS-CoV-2 clades. *Indones J Biotechnol.* 2022;27(1):19–28. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.66854>
- [22] Seprianto S, Feliatra F, T Nugroho T. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik Dari Usus Udang Windu (*Penaeus monodon*) Berdasarkan Sekuens Gen 16S rDNA. *Biog J Ilm Biol.* 2017;5(2):83–92. <https://doi.org/10.24252/bio.v5i2.3943>
- [23] Jang HK, Jo DH, Lee SN, Cho CS, Jeong YK, Jung Y, et al. High-purity production and precise editing of DNA base editing ribonucleoproteins. *Sci Adv.* 2021;7(35):1–12. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg2661>
- [24] Eling KS D, Kurniawan R, Muhimmah I. Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction(PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Semin Inform Medis 2014 [Internet].* 2014;93–102. Available from: <http://snimed.fit.uui.ac.id/>
- [25] Saraswati H, Wahyuni FD, Seprianto S. Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Gen cryIII dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indones J Biotechnol Biodivers.* 2019;3(1):33–8.