

Laporan Tugas 3 Bioinformatika (Pembuatan Primer)

Bimo Hadi Permana NPM. 2306157103 (Kelas C Bioinformatika)

1. Buatlah desain primer untuk aplikasi PCR dari keempat sekuen berikut.
2. Jelaskan cara Anda mendesain keempat pasang primer tersebut dengan tools (NCBI, Primer3Plus, atau Ugene) yang digunakan dan alasan pemilihan primer. Sertakan parameternya.

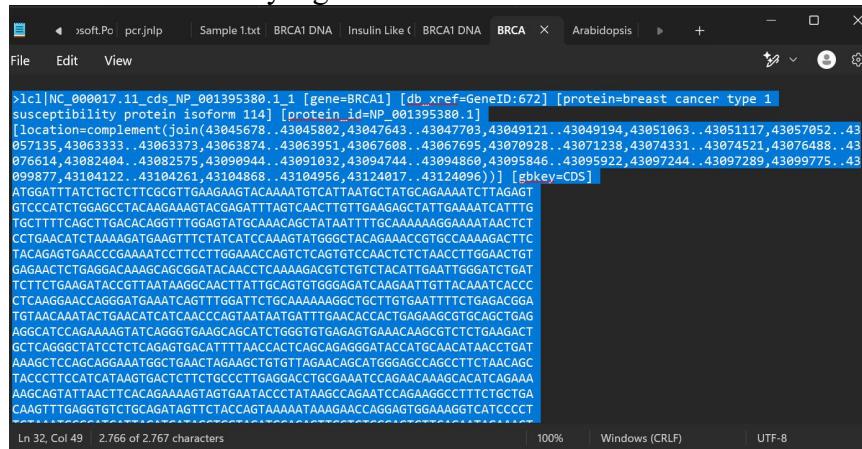
Jawaban:

Dalam penggunaan *tool* NCBI, cara sebagai berikut:

1. Cari sekuen yang akan dibuat primernya.

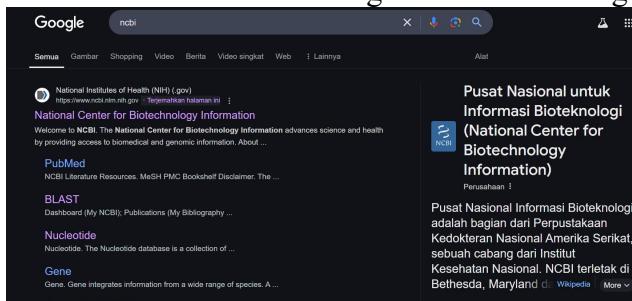


2. Salin seluruh data sekuen yang sudah disediakan.

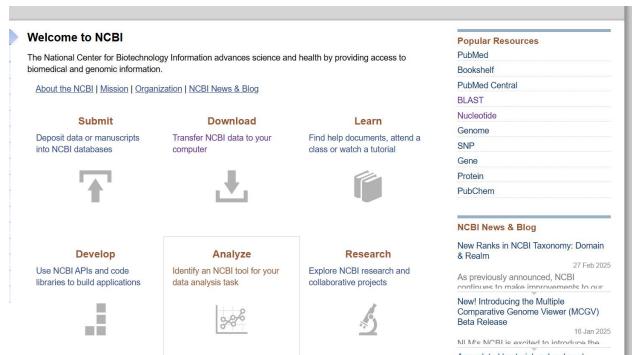


```
>cl|NC_000017.11 cds NP_001395380.1 [gene=BRCA1] [db_xref=GeneID:672] [protein=breast cancer type 1]
susceptibility protein isoform 114] [protein_id=NP_001395380.1]
[location=complement[(join(43045882..43047783,43049121..43049194,43051063..43051117,43057052..43
057135,43063333..43063373,43063374..43063951,43067608..43067695,43070928..43071238,43074331..43074521,43076488..43
076614,43082404..43082575,43090944..43091032,43094744..43094860,43095846..43095922,43097244..43097289,43099775..43
099877,43104122..43104956,43124096)]) [gbkey=CDS]
```

3. Buka tools bioinformatika NCBI untuk mengetahui sekuen target.



4. Cari pencarian BLASTN



5. Salin sekuen sebelumnya, dan taruh pada *query sequences*

Standard Nucleotide BLAST

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

Query subrange

Or, upload file No file chosen

Job Title

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database Standard databases (nr etc.) rRNA/ITS databases Genomic + transcript databases Betacoronavirus Experimental data
Core nucleotide database (core_nt)

Organism exclude

Exclude Models (XMP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to Sequences from type material

Entrez Query

Enter an Entrez query to limit search

6. Atur sedemikian rupa sesuai dengan pilihan (gen yang diuji adalah *Homo sapiens*)

Choose Search Set

Database Standard databases (nr etc.) rRNA/ITS databases Genomic + transcript databases Betacoronavirus Experimental data
Core nucleotide database (core_nt)

Organism exclude

Exclude Models (XMP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to Sequences from type material

Entrez Query

Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast) More dissimilar sequences (discontiguous megablast) Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

BLAST Show results in a new window

+ Algorithm parameters

7. Tekan *highly similar* dan BLAST

Job Title: BRCA1 DNA repair Homo sapiens

Request ID	WNKE2WGY013
Status	Searching
Submitted at	Fri Mar 7 05:43:14 2025
Current time	Fri Mar 07 05:43:20 2025
Time since submission	00:00:05

This page will be automatically updated in 2 seconds

8. Tunggu hingga proses selesai

Your search is limited to records that include: Homo sapiens (taxid:9606)

Job Title: BRCA1 DNA repair Homo sapiens

RID: WNKE2WGY013 Search expires on 03-09 17:43 pm

Download All

Program: BLASTN Citation

Database: core_nt

Query ID: lclQuery_1615981

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 2148

Other reports: Distance tree of results MSA viewer

Filter Results

Organism: only top 20 will appear exclude

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to

Descriptions

Sequences producing significant alignments

select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Acc. Len	Accession
Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1).transcript variant 310 .mRNA	Homo sapiens	3967	3967	100%	0.0	100.00%	3638	NM_001408451.1
Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated isoform p.42 transcript variant sv.60 (BRCA1)mRNA_compl...	Homo sapiens	3934	3934	100%	0.0	99.72%	3531	OP156991.1
Homo sapiens clone sv.52 BRCA1 DNA repair associated isoform p.38 transcript variant sv.52 (BRCA1)m...	Homo sapiens	3821	3821	96%	0.0	100.00%	3522	OP156983.1
Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1).transcript variant 323 .mRNA	Homo sapiens	3821	3970	100%	0.0	100.00%	3716	NM_001408464.1

10. Pilih menu *GenBank* untuk dapat melihat keseluruhan hasil target gen

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1), transcript variant 310, mRNA
Sequence ID: [NM_001408451.1](#) Length: 3638 Number of Matches: 1

Range 1: 108 to 2255 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
3967 bits(2148)	0.0	2148/2148(100%)	0/2148(0%)	Plus/Plus
Query 1 ATGGATTATCTGCTCTTCGGTTGAAGAAAGTACAAAATGTCATTAATGCTATGCAGAAA 60				
Sbjct 108 ATGGATTATCTGCTCTTCGGTTGAAGAAAGTACAAAATGTCATTAATGCTATGCAGAAA 167				
Query 61 ATCTTAGAGTGTCCCCATCTGGAGCCTACAAAGAAAGTACGAGATTTAGTCACATTGTGAA 128				
Sbjct 168 ATCTTAGAGTGTCCCCATCTGGAGCCTACAAAGAAAGTACGAGATTTAGTCACATTGTGAA 227				
Query 121 GAGCTATTGAAAATCATTTGCTTTTCAGCTTGACACAGGTTGGAGTATCAAACAGC 188				
Sbjct 228 GAGCTATTGAAAATCATTTGCTTTTCAGCTTGACACAGGTTGGAGTATCAAACAGC 287				
Query 181 TATAATTTCGAAAAAAGGAAATAACTCTCTGACACATCTAAAGATGAGTTTCTATC 248				
Sbjct 288 TATAATTTCGAAAAAAGGAAATAACTCTCTGACACATCTAAAGATGAGTTTCTATC 347				
Query 241 ATCCAAAGTATGGCTACAGAACCGTGGCCAAAAGACTTCTACAGAGTGACCCGAAAT 308				
Sbjct 348 ATCCAAAGTATGGCTACAGAACCGTGGCCAAAAGACTTCTACAGAGTGACCCGAAAT 407				

Send to: [Change region shown](#)
 Whole sequence
 Selected region
from: 108 to: 2255 [Update View](#)

[Customize view](#)

Analyze this sequence
[Run BLAST](#)
[Pick Primers](#)
[Highlight Sequence Features](#)
[Find in this Sequence](#)
[Show in Genome Data Viewer](#)

Reference sequence information
[RefSeq alternative splicing](#)
[See 369 reference mRNA sequence splice variants for the BRCA1 gene.](#)

11. Lalu pilih menu *Pick Primer* untuk analisis primer

[GenBank](#) [Graphics](#)

Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1), transcript variant 310, mRNA
NCBI Reference Sequence: NM_001408451.1

Go to: [FASTA](#) [Graphics](#)

Send to: [Change region shown](#)
 Whole sequence
 Selected region
from: 108 to: 2255 [Update View](#)

[Customize view](#)

Analyze this sequence
[Run BLAST](#)
[Pick Primers](#)
[Highlight Sequence Features](#)
[Find in this Sequence](#)
[Show in Genome Data Viewer](#)

Reference sequence information
[RefSeq alternative splicing](#)
[See 369 reference mRNA sequence splice variants for the BRCA1 gene.](#)

12. Hasil nomor *accesion* sudah ada di *query sequence*, lalu atur sedemikian rupa untuk mendapatkan hasil primer yang diinginkan parameternya

[Primers for target on one template](#) [Primers common for a group of sequences](#)

[PCR Template](#) [Retrieve recent results](#) [Publications](#) [Tips for finding specific primers](#) [Save search parameters](#)

Enter accession, gI, or FASTA sequence (a refseq record is preferred) [Clear](#) Range [Clear](#)
NM_001408451.1 From: 108 To: 2255

Forward primer: Reverse primer:

Or, upload FASTA file [Choose File](#) No file chosen

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'-> on plus strand)
 [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'-> on minus strand)
 [Clear](#)

PCR product size: Min: 70 Max: 1000

of primers to return: 10

Max Tm difference: Min: 50 Opt: 60 Max: 70 Max Tm difference: 1

PCR product size: Min: 80 Max: 120

of primers to return: 10

Primer melting temperatures (Tm): Min: 59.0 Opt: 60.0 Max: 64.0 Max Tm difference: 1

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [?](#)

Exon junction span: No preference [?](#)

Exon junction match: Min 5' match: 7 Min 3' match: 4 Max 3' match: 8 Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction [?](#)

Intron inclusion: Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA [?](#)

Intron length range: Min: 1000 Max: 10000 [?](#)

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check: Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template [?](#)

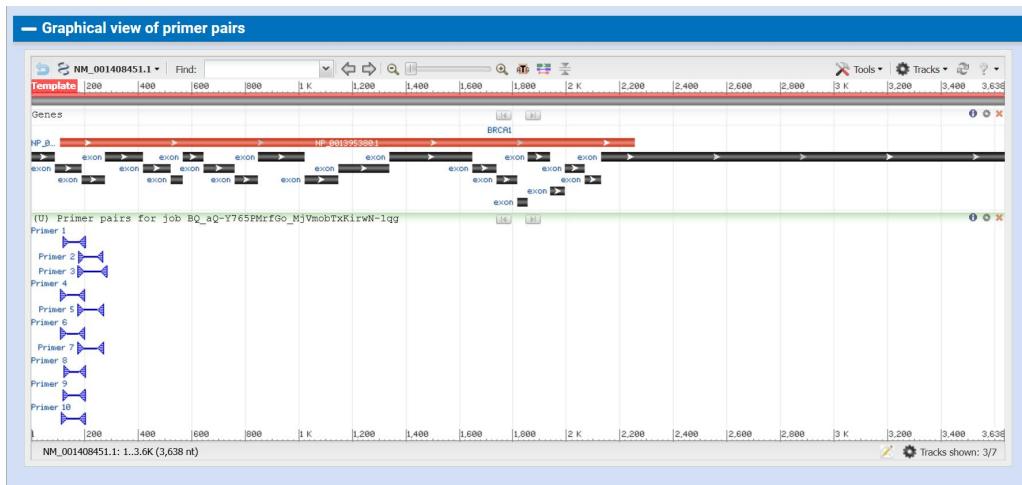
Search mode: Automatic [?](#)

Database: RefSeq mRNA [?](#)

Exclusion: Exclude predicted RefSeq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences [?](#)

Organism: Homo sapiens (taxid:9606) [Add organism](#)

13. Berikut adalah hasil grafik yang menunjukkan pasangan primer pada sekvens



14. Lalu scroll down dan cari primer yang menurut kalian sesuai dengan kriteria yang diinginkan

Reverse primer	Sequence	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
1 TTCTTGAGGCTCCAGATGGG	Template	200	21						
Primer pair 9									
Forward primer CTGCTCTTCGCGTTGAAGAAGT									
Reverse primer TTCTTGAGGCTCCAGATGGGA									
Product length 83									
Products on intended targets									
>NM_001408451.1 Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1), transcript variant 310, mRNA									
product length = 83									
Forward primer 1 CTGCTCTTCGCGTTGAAGAAGT 22									
Template 118									
Reverse primer 1 TTCTTGAGGCTCCAGATGGGA 22									
Template 200									
Primer pair 10									
Sequence (5'->3')									
Forward primer ATTATATCTGCTCTTCGCGTTGAA									
Reverse primer TTCTTGAGGCTCCAGATGGGA									
Product length 90									
Primer pair 9									
Sequence (5'->3')									
Forward primer CTGCTCTTCGCGTTGAAGAAGT									
Reverse primer TTCTTGAGGCTCCAGATGGGA									
Product length 83									
Products on intended targets									
>NM_001408451.1 Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1), transcript variant 310, mRNA									
product length = 83									
Forward primer 1 CTGCTCTTCGCGTTGAAGAAGT 22									
Template 118									
Reverse primer 1 TTCTTGAGGCTCCAGATGGGA 22									
Template 200									

15. Selesai, dan catat parameternya

```
NCBI
>Primer Forward (+)
CTGCTCTTCGCGTTGAAGAAGT
>Primer Reverse (-)
TTCTTGAGGCTCCAGATGGGA
```

Berikut untuk langkah-langkah dalam menggunakan Primer3Plus:

1. Buka tool Primer3Plus dalam website

The screenshot shows the Primer3Plus web interface. At the top, there's a header with the title "Primer3Plus" and a sub-instruction "pick primers from a DNA sequence". Below the header are several input fields: "Load server settings:" set to "Default", "Activate Settings", "Task:" set to "generic", and a dropdown menu for "More...". To the right of these are buttons for "Help", "Source Code", "Pick Primers", and "Reset Default". Below the header is a navigation bar with tabs: Main (selected), General Settings, Advanced Settings, Internal Oligo, Penalties, and Advanced Seq. Under the "Main" tab, there's a "Sequence Id:" input field and a note "Paste template sequence below or upload sequence file: [Choose File] No file chosen". A "Load Example" button is also present. The main content area is a large text input box for pasting sequences. At the bottom of the page are buttons for "Mark selected region:", "Save Sequence", and "Regions from Seq."

2. Salin paste sekuen yang ingin dibuat primernya

This screenshot shows the same Primer3Plus interface as above, but with a very long DNA sequence pasted into the "Sequence" input field. The sequence starts with "TGCTGCTCATACTCTGATACTCGCTGGTATAATGCAATGGAAAGAAGTGTGACGAGGGAGAGCCAGAA" and continues for several lines. The rest of the interface elements are visible but appear smaller due to the large amount of text.

3. Atur parameter yang diharuskan untuk mendapatkan primer yang baik

This screenshot shows the "Advanced Settings" tab of the Primer3Plus interface. It includes sections for "Product Size Range" (with a dropdown menu showing options like 501-600, 601-700, etc.), "Primer Size" (Min: 18, Qty: 20, Max: 24), "Primer Tm" (Min: 59.0, Qty: 60, Max: 64.0), "Primer Bound%" (Min: -10.0, Qty: 97.0, Max: 110.0), "Primer GC%" (Min: 40.0, Qty: 50.0, Max: 60.0), and "Max Tm Difference" (1). There are also sections for "Annealing Temp.", "Concentration of monovalent cations", "Concentration of divalent cations", "DMSO Concentration", and "DMSO Factor". At the bottom, there are buttons for "Misprinting/Repeat Library" (set to "NONE"), "Load and Save" (with a note about uploaded settings files), and "Save only Settings", "Save Everything", "Save as Primer3 input", and "Save Primer3Plus results".

<u>CG Clamp:</u>	0	<u>Use Thermodynamic Primer Alignment:</u>	<input checked="" type="checkbox"/> Activates Settings Starting with TH: <input type="checkbox"/> Activates TH: Settings-VERY SLOW
<u>Max End GC:</u>	5	<u>Max End Stability:</u>	9.0
<u>Number To Return:</u>	10	<u>3 Prime Junction Overlap:</u>	4
<u>5 Prime Junction Overlap:</u>	7	<u>Min Right Primer End Distance:</u>	3
<u>Min Left Primer End Distance:</u>	3	<u>Max Pair Complementarity:</u>	8.00
<u>Max Self Complementarity:</u>	8.00	<u>TH: Max Pair Complementarity:</u>	47.00
<u>TH: Max Self Complementarity:</u>	47.00	<u>Max Pair End Complementarity:</u>	3.00
<u>Max End Self Complementarity:</u>	3.00	<u>TH: Max Pair End Complementarity:</u>	47.00
<u>TH: Max End Self Compl.:</u>	47.00	<u>TH: Max Pair End Complementarity:</u>	47.00
<u>TH: Max Hairpin:</u>	47.00	<u>Pair Max Template Mispriming:</u>	24.00
<u>Max Template Mispriming:</u>	12.00	<u>TH: Pair Max Template Mispriming:</u>	47.00
<u>TH: Max Template Mispriming:</u>	47.00	<u>Pair Max Library Mispriming:</u>	24.00
<u>Max Library Mispriming:</u>	12.00	<u>Primer Must Match 3 Prime:</u>	
<u>Primer Must Match 5 Prime:</u>		<u>Internal Oligo Acronym:</u>	IN
<u>Left Primer Acronym:</u>	F	<u>Right Primer Acronym:</u>	R
		<u>Primer Name Spacer:</u>	
<u>Product Tm</u>	Min: -1000000.0 Opt: 0.0 Max: 1000000.0	<input checked="" type="checkbox"/> Show Secondary Structures	
<u>Product Size</u>	Min: 80 Opt: 100 Max: 120	<input type="checkbox"/> Debug Information	
<input type="checkbox"/> Pick Anyway <input checked="" type="checkbox"/> Liberal Base <input type="checkbox"/> Do not treat ambiguity codes in libraries as consensus <input type="checkbox"/> Use Lowercase Masking			

4. Klik Pick Primer dan pilih primer sesuai dengan yang diinginkan

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

More... Source Code
Help About

Load server settings: Default
Activate Settings
Task: generic

Select all Primers Send Selected Primers to Primer3Manager Go to Primer3Manager
First Primer Pair Previous Primer Pair Next Primer Pair Last Primer Pair

Pair 1: Primer
Left Primer 1: GCCAGAATCCAGAAGGCCCTT
Start: 953 Length: 20 bp Tm: 60.0 C B: 94.548 % GC: 55.0 % Any: 20.6 End: 20.6 TB: 9.0 HP: 39.4 3' Stab: 4.3 Penalty: 0.034
Self Any Secondary Structure:
Tm: 28.6°C dg: -8166 cal/mol dh: -548800 cal/mol ds: -158 cal/mol*K
5' GCCAGAATCCAGAAGGCCCTT 3'
 |||||||
 3' TTCCGGAGACCTAAAGACCCG 5'

Self End Secondary Structure:
Tm: 28.6°C dg: -8166 cal/mol dh: -548800 cal/mol ds: -158 cal/mol*K
5' TCTGAA
 |||||
 3' AGACCCCCGAGACAG

Pair 5: Primer_5
Left Primer 5: TCTGAAGACAGAGCCCCAGA
Start: 1294 Length: 20 bp Tm: 59.9 C B: 94.085 % GC: 55.0 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 10.0 HP: 46.5 3' Stab: 3.9 Penalty: 0.115
Hairpin Secondary Structure:
Tm: 46.5°C dg: -905 cal/mol dh: -30300 cal/mol ds: -95 cal/mol*K
5' TCTGAA
 |||||
 3' AGACCCCCGAGACAG

Right Primer 5: TGAAGGGCCCATAAGAACAG
Start: 1873 Length: 20 bp Tm: 60.0 C B: 94.597 % GC: 55.0 % Any: 27.6 End: 0.0 TB: 10.0 HP: 46.5 3' Stab: 3.2 Penalty: 0.034
Self Any Secondary Structure:
Tm: 27.6°C dg: -9306 cal/mol dh: -60800 cal/mol ds: -166 cal/mol*K
5' TGAAAGGGCCCATAAGAACAG 3'
 |||||
 3' GACAACGATAACCCGGAAAGT 5'

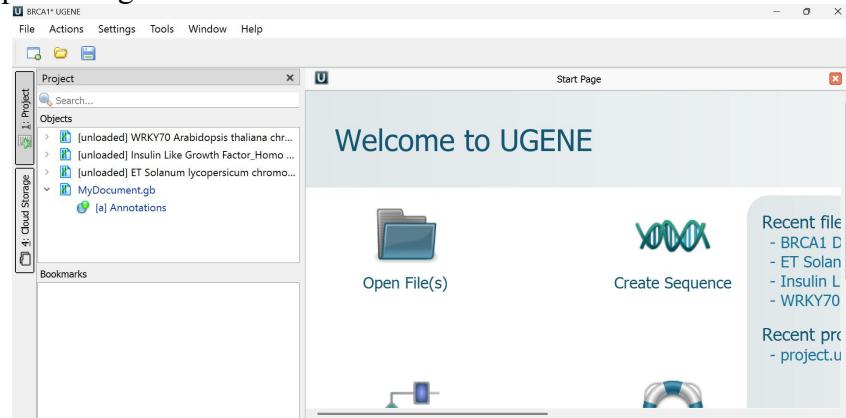
5. Selesai, lalu catat primer yang telah didapatkan

```
Primer3|
>Primer Forward (+) Left
TCTGAAGACAGAGCCCCAGA
>Primer Reverse (-) Right
TGAAGGGCCCATAAGAACAG
```

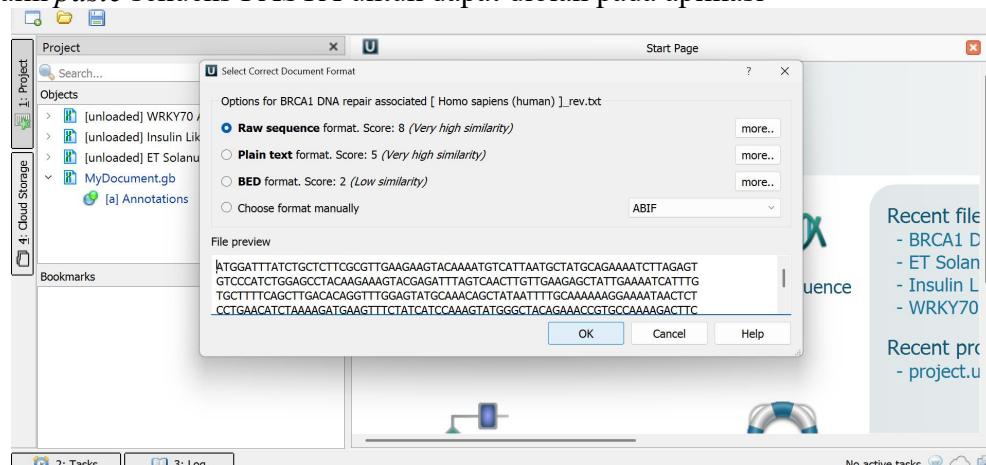
1. **B (Base Composition Percentage)** – Likely refers to the percentage of bases that match a certain criterion, such as overall similarity to the template or a specific nucleotide ratio. In your case, it's 95.098%, indicating high base match fidelity.
2. **Any (Self-Complementarity Score)** – Measures the likelihood of secondary structures (such as primer-dimer formation) within the primer sequence. A score of 0.0 means no self-complementarity, which is ideal.
3. **End (3' Complementarity Score)** – Measures the likelihood of self-dimerization or primer-dimer formation at the 3' end of the primer. A value of 0.0 suggests no significant risk of self-dimerization, which is good for efficient PCR amplification.
4. **TB (Terminal Base Stability or "Tm Balance")** – Likely represents the stability of the primer's 3' end, which is crucial for successful polymerase binding and extension. A value of 8.0 suggests moderate stability.
5. **HP (Hairpin Score)** – Evaluates the potential for hairpin loop formation within the primer. A value of 45.1 suggests a moderate tendency to form a hairpin, which might need optimization depending on your PCR conditions.
6. **3' Stab (3' Stability)** – Measures the thermodynamic stability of the 3' end of the primer in kcal/mol. A value of 2.8 means the primer has a reasonably stable 3' end, allowing efficient polymerase extension.
7. **Penalty (Primer Quality Score)** – This is a calculated score that helps determine how well a primer meets design criteria. A lower penalty score is better (closer to zero is optimal). Your value of 0.039 suggests an excellent primer.

Berikut adalah cara untuk menggunakan aplikasi Ugene untuk mendapatkan primer yang baik:

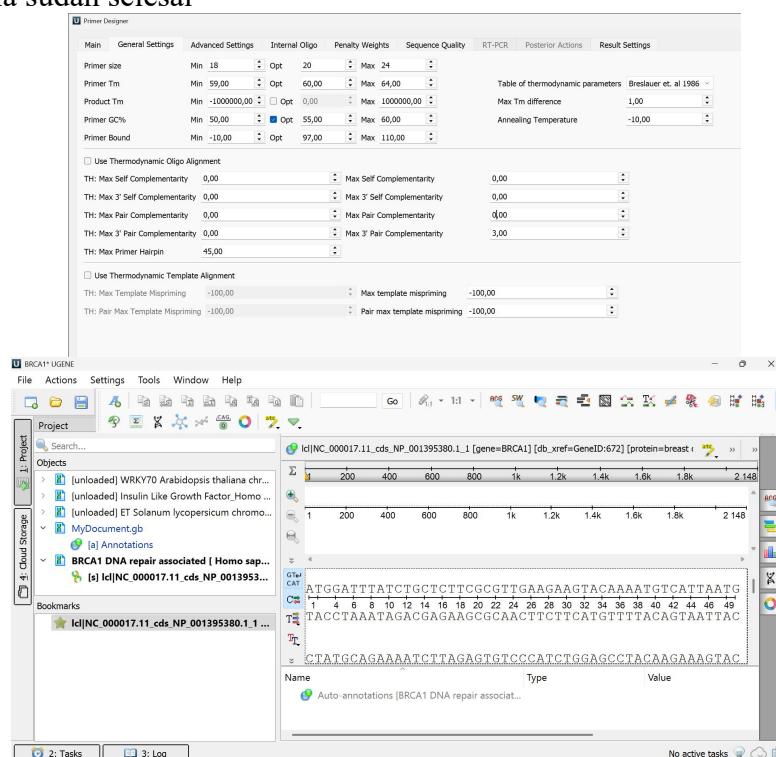
1. Buka aplikasi Ugene



2. Salin paste sekuen FASTA untuk dapat diolah pada aplikasi



3. Masuk menu Primer3, lalu pilih parameter yang diinginkan pada menu dan tekan enter apabila sudah selesai



4. Setelah itu akan tampil beberapa primer yang sudah diolah, tanda panah menunjukkan arah polimerase ekstensinya

Name	Type	Value
Annotations [M]	Annotations	[19:26:53] Report for task: 'Find primers with target sequence task'
Auto-annotation		

5. Dengan cara menekan tahan pada primer akan menampilkan hasil analisis primer seperti GC content, Tm, any, penalty dan lainnya (seperti pada Primer3Plus)

Name	Type	Value
top_primers	Primer	1076..1095
top_primers	Primer	complement(1296..1315)

6. Selesai, catat primer yang sudah diolah

```

Ugene
>Primer Forward (+) Left
GGTGGTACATGCACAGTTGC
>Primer Reverse (-) Right
GGTGGTACATGCACAGTTGC
  
```

Penjelasan untuk penggunaan aplikasi maupun *tools* bioinformatika yang digunakan pada tata cara, yaitu NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) adalah *platform* yang menyediakan berbagai *database* dan alat bioinformatika untuk analisis sekuens biologis. Salah satu fitur penting dari NCBI adalah Primer-BLAST, yang digunakan untuk mendesain dan memvalidasi primer PCR. Primer-BLAST adalah alat berbasis NCBI yang menggabungkan fitur desain primer (seperti Primer3) dengan algoritma BLAST untuk memeriksa spesifitas primer. Alat ini sangat berguna untuk memastikan bahwa primer hanya mengikat pada target yang diinginkan dan tidak pada sekuens lain dalam genom yang sama atau berbeda.

Lalu setelah *tool* kedua yang digunakan pada praktikum bioinformatika, yaitu Primer3Plus. Primer3Plus adalah alat bioinformatika berbasis *web* yang digunakan untuk mendesain primer PCR secara otomatis. Primer3Plus merupakan pengembangan dari Primer3, dengan tampilan antarmuka yang lebih *user-friendly* dan fitur tambahan untuk penyesuaian parameter primer. Lalu saya sebagai pengguna pemula merekomendasikan dan senang atas *tool* yang dibawakan Primer3Plus dibandingkan dengan NCBI dan Ugene. Primer3Plus memiliki kemudahan seperti menampilkan detail dari hasil sekuens yang diperlukan (NCBI tidak sedetail Primer3Plus), menyesuaikan dengan parameter secara detail dan tampilan akses tidak membutuhkan waktu yang terlalu lama.

Setelah itu, aplikasi UGENE (*Unipro GENE*) adalah perangkat lunak bioinformatika *open-source* yang digunakan untuk analisis data biologis, termasuk desain primer PCR. UGENE memiliki fitur yang mendukung pembuatan primer secara otomatis serta visualisasi sekuens, yang memudahkan pengguna dalam memilih primer yang optimal. Kemudahan yang ditampilkan yaitu gratis, dapat dilakukan dengan *online* dan paling penting bagi saya yaitu berintegrasi dengan Primer3Plus serta menampilkan primer-primer yang tertampil seperti pada NCBI.

Adapun penggunaan FastPCR pada praktikum kali ini untuk dapat mengetahui perbandingan perhitungan pada Tm (suhu leleh) pada primer yang sudah dicari. Pengertian FastPCR adalah perangkat lunak bioinformatika yang digunakan untuk desain primer PCR, termasuk konvensional PCR, qPCR, *multiplex* PCR, mutagenesis, dan desain primer untuk *sequencing*. FastPCR menyediakan fitur analisis primer yang lebih canggih dibandingkan dengan alat lain, karena dapat mengevaluasi kemungkinan dimerisasi, *hairpin*, serta efisiensi PCR secara komprehensif. FastPCR dapat mengetahui titik leleh primer, menurut dari materi yang telah disampaikan pada kelas Bioinformatika tanggal 5 Maret 2025. Rekomendasi primer yang baik adalah dengan memiliki selisih suhu leleh yang 1°C saat menggunakan Primer3Plus dan dilanjutkan dengan perbandingan pada FastPCR. Apabila nilai pada FastPCR memiliki selisih satu derajat celcius sama dengan hasil pada Primer3Plus, maka hasil primer yang didapatkan baik.

Pada saat pemilihan dapat disertakan sumber acuan yang sudah dibuat terkait beberapa gen seperti pada jurnal atau artikel terkait sehingga dapat dengan mudah mengetahui primer yang kompatibel untuk PCR. Saya mencari jurnal sama dengan primer atau berbeda berkaitan dengan apakah sama atau beda pada *number accession* sekuens.

Pada pencarian saya dalam mencari primer yang sesuai menggunakan satu atau dua dari *tools* yang sudah disinggung sebelumnya, terutama Primer3Plus. Untuk desain primer adalah sebagai berikut:

➤ BRCA1 DNA repair associated [*Homo sapiens (human)*]_rev

Primer3Plus

>Primer Forward

TCAGGGTGAAGCAGCATCTG

>Primer Reverse

AAATCGTGTGCCAGACTC

Hasil data & parameter

Pair 10: Primer_10

Left Primer 10: TCAGGGTGAAGCAGCATCTG

Start: 686 Length: 20 bp Tm: 60.0 C B: 94.750 % GC: 55.0 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 10.0 HP: 33.1 3' Stab: 2.9 Penalty: 0.036

Hairpin Secondary Structure:

Tm: 33.1°C dg: 276 cal/mol dh: -21500 cal/mol ds: -70 cal/mol*K
5' TCAGGGTGA | || A
3' GTCTACGACG'

Right Primer 10: AAATCGTGTGCCAGACTC

Start: 1234 Length: 20 bp Tm: 60.3 C B: 95.306 % GC: 55.0 % Any: 9.6 End: 0.0 TB: 8.0 HP: 0.0 3' Stab: 3.4 Penalty: 0.322

Self Any Secondary Structure:

Tm: 9.6°C dg: -5029 cal/mol dh: -63800 cal/mol ds: -189 cal/mol*K
5' AAATCGTGTGCCAGACTC 3'
3' CTCAGACCCGGTGTGCTAAA 5'

Data In-silico FastPCR

```
primer forward1 5'-tcagggtaagcagcatctg
Position: 648->667 100% Tm = 61,9°C
5'-tcagggtaagcagcatctg->
||||||| ||||| ||||| |
tatcagggtaagcagcatctgggtg

primer reversel 5'-aaatcggtggccagactc
Position: 1177<-1196 100% Tm = 61,6°C
<-ctcagacccggtgtgtctaaa-5
||||||| ||||| ||||| |
aagagtctggccacacgatttgacg
```

Alasan pemilihan primer yang paling baik untuk BRCA1 DNA *repair associated* [*Homo sapiens (human)*] adalah primer yang dianalisis terdiri dari primer kiri (*Left Primer 10*) dengan sekuens TCAGGGTGAAGCAGCATCTG dan primer kanan (*Right Primer 10*) dengan sekuens AAATCGTGTGCCAGACTC, masing-masing memiliki panjang 20 pasangan basa. Primer kiri dimulai dari posisi 686 dengan temperatur leleh (Tm) 60,0°C dan persentase GC sebesar 55,0%. Primer kanan dimulai dari posisi 1234 dengan Tm 60,3°C dan persentase GC yang sama, yaitu 55,0%. Persentase kecocokan basa untuk primer kiri adalah 94,750%, sedangkan primer kanan memiliki kecocokan yang sedikit lebih tinggi, yaitu 95,306%. Lalu dibandingkan dengan FastPCR dan Primer3Plus mendapatkan selisih Tm kurang satu derajat celcius (direkomendasikan), oleh karena itu saya memilih primer tersebut.

Dari segi struktur sekunder, primer kiri menunjukkan skor komplemen diri (*Any*) sebesar 0,0, menandakan tidak adanya risiko pembentukan dimer sendiri. Selain itu, skor komplemen ujung 3' (*End*) juga 0,0, yang berarti tidak ada risiko pembentukan dimer di ujung 3', sehingga primer ini optimal untuk PCR. Stabilitas ujung terminal (TB) sebesar 10,0 menunjukkan tingkat stabilitas yang cukup baik untuk pemanjangan oleh polimerase. Skor *hairpin* (HP) primer kiri adalah 33,1, yang menunjukkan kecenderungan moderat untuk membentuk *hairpin*, namun masih dalam batas yang dapat dioptimalkan. Stabilitas ujung 3' (3' Stab) primer kiri sebesar 2,9 kcal/mol menunjukkan kestabilan yang cukup untuk efisiensi pemanjangan

polimerase. Skor penalti primer kiri hanya 0,036, yang sangat rendah, menandakan bahwa primer ini memiliki kualitas yang sangat baik.

Sementara itu, primer kanan memiliki skor komplemen diri (*Any*) sebesar 9,6, menunjukkan adanya kecenderungan lebih tinggi untuk membentuk dimer sendiri dibandingkan dengan primer kiri. Namun, skor komplemen ujung 3' (*End*) tetap 0,0, sehingga tidak ada risiko pembentukan dimer di ujung 3'. Stabilitas ujung terminal (TB) sebesar 8,0, sedikit lebih rendah dibandingkan primer kiri, tetapi masih dalam kategori moderat. Skor *hairpin* (HP) primer kanan adalah 0,0, yang berarti tidak ada kecenderungan membentuk *hairpin*, sehingga stabilitasnya lebih baik dalam hal ini. Stabilitas ujung 3' (3' Stab) sebesar 3,4 kcal/mol sedikit lebih tinggi dibandingkan primer kiri, yang mengindikasikan ujung 3' lebih stabil. Namun, skor penalti primer kanan adalah 0,322, lebih tinggi dari primer kiri, yang menunjukkan bahwa primer kanan masih tergolong baik, tetapi perlu diperhatikan risiko pembentukan dimer sendiri.

Secara keseluruhan, pasangan primer ini memiliki karakteristik yang cukup baik untuk digunakan dalam PCR. Primer kiri memiliki kualitas yang lebih unggul dengan skor penalti yang sangat rendah dan kestabilan yang optimal, serta memiliki suhu Tm yang kurang satu derajat celcius (direkomendasikan) pada FastPCR dan Primer3Plus. Primer kanan juga cukup baik, meskipun memiliki kecenderungan lebih tinggi untuk membentuk dimer sendiri. Oleh karena itu, jika digunakan dalam PCR, perlu dilakukan optimasi lebih lanjut, terutama pada primer kanan untuk mengurangi kemungkinan interaksi yang dapat mengganggu efisiensi amplifikasi.

➤ ET *Solanum lycopersicum* chromosome 7, SLM_r2.1

NCBI

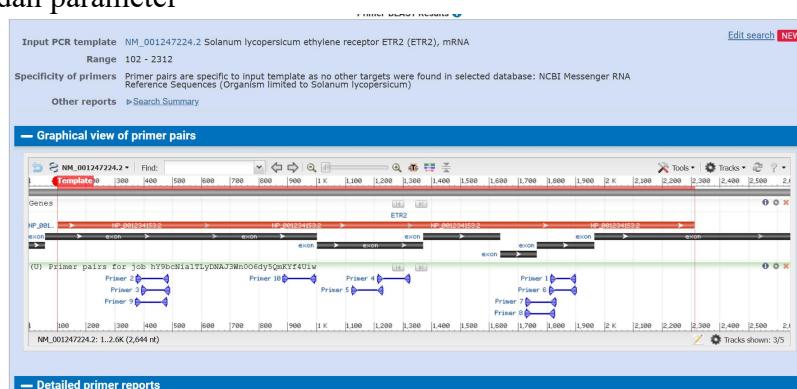
>Primer Forward

ATGATTGGCCCCGAACCTCTCG

>Primer Reverse

CGGCTACCACATCAACAAAGC

Hasil data dan parameter



Primer pair 10						
Sequence (5'-3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer ATGATTGGCCCCGAACCTCTCG	Plus	20	883	902	60.18	55.00
Reverse primer CGGCTACCACATCAACAAAGC	Minus	20	996	977	59.55	55.00
Product length		114				
Products on intended targets						
>NM_001247224.2 Solanum lycopersicum ethylene receptor ETR2 (ETR2), mRNA						
product length = 114						
Forward primer 1 ATGATTGGCCCCGAACCTCTCG	20					
Template 883	902					
Reverse primer 1 CGGCTACCACATCAACAAAGC	20					
Template 996	977					

Primer3Plus

>Primer Forward

TCGCCGAAGAGCTATGCTTT

>Primer Reverse

TACAGCTGCAACAGGCCTGA

Hasil data dan parameter

Left Primer 6: TCGCCGAAGAGCTATGCTTT

Start: 844 Length: 20 bp Tm: 59.8 C B: 94.502 % GC: 50.0 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 10.0 HP: 39.9 3' Stab: 3.5 Penalty: 0.176

Hairpin Secondary Structure:

Tm: 39.9°C dg: -152 cal/mol dh: -16500 cal/mol ds: -53 cal/mol*K
5' TCGCCGAAGAGCTT¹
||| A
3' TTTCGT¹

Right Primer 6: TACAGCTGCAACAGGCCTGA

Start: 1347 Length: 20 bp Tm: 59.9 C B: 94.445 % GC: 50.0 % Any: 15.3 End: 0.0 TB: 8.0 HP: 45.1 3' Stab: 3.0 Penalty: 0.108

Self Any Secondary Structure:

Tm: 15.3°C dg: -7856 cal/mol dh: -55200 cal/mol ds: -155 cal/mol*K
5' TACAGCTGCAACAGGCCTGA 3'
|||||
3' AGTCGGACAACGTCGACAT 5'

Hairpin Secondary Structure:

Tm: 45.1°C dg: -507 cal/mol dh: -19800 cal/mol ds: -62 cal/mol*K
5' TACAGCTGCAA¹
||| C
3' AGTTCGGAA¹

Pair: Product Size: 504 bp Tm: 85.8 C Any: 0.0 End: 1.0 TB: 17.0 Penalty: 0.284

Hasil In-silico FastPCR

primer forwardl 5'-tcgccgaagagctatgcttt

Position: 799->818 100% Tm = 62,2°C

5-tcgccgaagagctatgcttt->
|||||||
tctcgccgaagagctatgctttgatg

primer reversel 5'-tacagctgcaacaggcttga

Position: 1283<-1302 100% Tm = 62,3°C

<-agtccggacaacgctcgacat-5
|||||||
aatcaagcctgttgcagctgtaaaaga

Alasan pemilihan primer yang paling baik untuk ET *Solanum lycopersicum* chromosome 7, SLM_r2.1 adalah data Primer3Plus. Primer yang dianalisis terdiri dari primer kiri dengan sekuen TCGCGGAAGAGCTAGCTCTTT dan primer kanan dengan sekuen TACAGCTGCAACAGGCCTGA, masing-masing memiliki panjang 20 pasangan basa. Primer kiri dimulai dari posisi 844 dengan temperatur leleh (Tm) 59,8°C dan persentase GC sebesar 50,0%. Sementara itu, primer kanan dimulai dari posisi 1347, memiliki Tm sebesar 59,9°C dengan persentase GC sebesar 50,0%. Persentase kecocokan basa (B) untuk primer kiri adalah 94,502%, sedangkan primer kanan sedikit lebih tinggi, yaitu 94,445%. Lalu dibandingkan dengan FastPCR dan Primer3Plus mendapatkan selisih Tm kurang satu derajat celcius (direkomendasikan), oleh karena itu saya memilih primer tersebut.

Dari segi struktur sekunder, primer kiri memiliki skor komplemen diri (Any) sebesar 0,0, yang berarti tidak ada kecenderungan membentuk dimer sendiri. Skor komplemen ujung 3' (End) juga 0,0, yang menunjukkan tidak adanya risiko pembentukan dimer di ujung 3', sehingga primer ini baik untuk PCR. Stabilitas ujung terminal (TB) sebesar 10,0, yang cukup stabil untuk memungkinkan pemanjangan oleh polimerase. Skor hairpin (HP) primer kiri adalah 39,9, yang menunjukkan

kecenderungan cukup tinggi untuk membentuk hairpin, sehingga mungkin perlu dioptimalkan dalam kondisi PCR tertentu. Stabilitas ujung 3' (3' Stab) sebesar 3,5 kcal/mol, menunjukkan bahwa ujung 3' cukup stabil. Skor penalti primer kiri adalah 0,176, masih dalam batas yang baik, tetapi sedikit lebih tinggi dibandingkan primer dengan skor mendekati nol.

Pada primer kanan, skor komplemen diri (*Any*) sebesar 15,3, yang menunjukkan bahwa primer ini memiliki kecenderungan yang lebih besar untuk membentuk dimer sendiri dibandingkan primer kiri. Skor komplemen ujung 3' (*End*) tetap 0,0, menunjukkan bahwa tidak ada risiko pembentukan dimer di ujung 3'. Stabilitas ujung terminal (TB) adalah 8,0, sedikit lebih rendah dari primer kiri, tetapi masih dalam kategori stabil. Skor *hairpin* (HP) primer kanan adalah 45,1, yang menunjukkan bahwa primer ini memiliki kecenderungan tinggi untuk membentuk struktur hairpin, yang mungkin memerlukan optimasi dalam PCR. Stabilitas ujung 3' (3' Stab) sebesar 3,0 kcal/mol, sedikit lebih rendah dibandingkan primer kiri tetapi tetap cukup stabil untuk pemanjangan polimerase. Skor penalti primer kanan adalah 0,108, yang masih dalam kategori baik.

Dari analisis keseluruhan, pasangan primer ini memiliki produk PCR dengan ukuran 504 bp dan temperatur leleh (Tm) sebesar 58,5°C, serta memiliki suhu Tm yang kurang satu derajat celcius (direkomendasikan) pada FastPCR dan Primer3Plus. Oleh karena itu saya memilih primer tersebut. Primer kiri memiliki kualitas yang cukup baik dengan skor penalti yang relatif rendah dan kestabilan yang baik, tetapi memiliki kecenderungan tinggi untuk membentuk *hairpin*. Sementara itu, primer kanan memiliki skor penalti yang rendah, namun memiliki kecenderungan lebih tinggi untuk membentuk dimer sendiri dan hairpin, yang dapat memengaruhi efisiensi PCR. Oleh karena itu, jika digunakan dalam PCR, perlu dilakukan optimasi lebih lanjut, terutama untuk mengurangi pembentukan struktur sekunder yang berlebihan.

- *Insulin Like Growth Factor_Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p14 Primary Assembly_rev*

NCBI

>Primer Forward

TGGATTATCTGCTCTCGCGT

>Primer Reverse

TGTAGGCTCCAGATGGGACA

Hasil Data & Dokumentasi

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGGATTATCTGCTCTCGCGT	Plus	22	2	23	60.16	45.45	4.00	2.00
Reverse primer	TGTAGGCTCCAGATGGGACA	Minus	20	89	70	59.96	55.00	5.00	1.00
Product length	88								
Products on intended targets									
>NM_001408451.1 Homo sapiens BRCA1 DNA repair associated (BRCA1), transcript variant 310, mRNA									
product length = 88									
Forward primer	1	TGGATTATCTGCTCTCGCGT	22						
Template	109	138						
Reverse primer	1	TGTAGGCTCCAGATGGGACA	20						
Template	196	177						

Primer3Plus

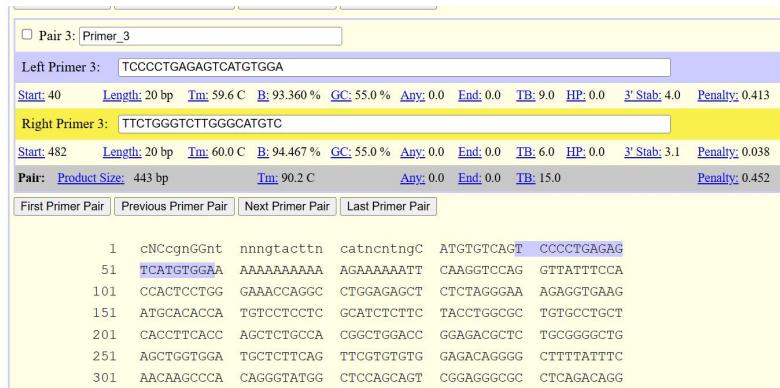
>Primer Forward

TCCCCTGAGAGTCATGTGGA

>Primer Reverse

TTCTGGGTCTGGGCATGTC

Hasil data dan parameter



Hasil In-silico FastPCR

```

primer forwardl 5'-tcccctgagagtcatgtgga
Position: 10->29    100%   Tm = 62,2°C
5-tcccctgagagtcatgtgga->
|||||||||||||||||  
agtcccctgagagtcatgtggaaaaaa

primer reversel 5'-ttctgggtcttgggcatgtc
Position: 433<-452    100%   Tm = 61,1°C
<-ctgtacgggttctgggtctt-5
|||||||||||||||||  
ccgacatgccaaaggaccagaaggaa

```

Alasan pemilihan primer yang paling baik untuk *Insulin Like Growth Factor_Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p14 Primary Assembly* adalah memiliki nilai selisih Tm pada FastPCR dan Primer3Plus yang sama-sama kurang lebih satu derajat celcius. Primer yang dianalisis terdiri dari primer kiri dengan sekuens TCCCCTGAGAGTCATGGTGGGA dan primer kanan dengan sekuens TTCTGGGCTTGGGCAGTGTG, masing-masing memiliki panjang 20 pasangan basa. Primer kiri dimulai dari posisi 40 dengan temperatur leleh (Tm) 59,6°C dan persentase GC sebesar 55,0%. Sementara itu, primer kanan dimulai dari posisi 452, memiliki Tm sebesar 60,0°C dengan persentase GC sebesar 55,0%. Persentase kecocokan basa (B) untuk primer kiri adalah 93,360%, sedangkan primer kanan sedikit lebih tinggi, yaitu 94,467%.

Dari segi struktur sekunder, primer kiri memiliki skor komplemen diri (*Any*) sebesar 0,0, yang berarti tidak ada kecenderungan membentuk dimer sendiri. Skor komplemen ujung 3' (*End*) juga 0,0, yang menunjukkan tidak adanya risiko pembentukan dimer di ujung 3', sehingga primer ini baik untuk PCR. Stabilitas ujung terminal (TB) sebesar 9,0, yang cukup stabil untuk memungkinkan pemanjangan oleh polimerase. Skor *hairpin* (HP) primer kiri adalah 0,0, menunjukkan tidak adanya kecenderungan membentuk hairpin. Stabilitas ujung 3' (*3' Stab*) sebesar 4,0 kcal/mol, menunjukkan bahwa ujung 3' cukup stabil. Skor penalti primer kiri adalah 0,413, masih dalam batas yang baik, meskipun sedikit lebih tinggi dibandingkan primer dengan skor mendekati nol.

Pada primer kanan, skor komplemen diri (*Any*) sebesar 0,0, yang berarti tidak ada kecenderungan membentuk dimer sendiri. Skor komplemen ujung 3' (*End*) tetap 0,0, menunjukkan bahwa tidak ada risiko pembentukan dimer di ujung 3'. Stabilitas ujung terminal (TB) adalah 15,0, lebih tinggi dibandingkan primer kiri, menunjukkan kestabilan yang baik di ujung 3'. Skor *hairpin* (HP) primer kanan adalah 0,0,

menunjukkan tidak adanya kecenderungan membentuk struktur *hairpin*. Stabilitas ujung 3' (3' *Stab*) sebesar 3,1 kcal/mol, sedikit lebih rendah dibandingkan primer kiri tetapi tetap cukup stabil untuk pemanjangan polimerase. Skor penalti primer kanan adalah 0,038, yang sangat rendah, menunjukkan kualitas primer yang sangat baik.

Dari analisis keseluruhan, pasangan primer ini memiliki produk PCR dengan ukuran 443 bp dan temperatur leleh (Tm) sebesar 90,2°C, serta memiliki suhu Tm yang kurang satu derajat celcius (direkomendasikan) pada FastPCR dan Primer3Plus. Primer kiri memiliki kualitas yang cukup baik dengan skor penalti yang relatif rendah dan kestabilan yang baik. Sementara itu, primer kanan memiliki skor penalti yang lebih rendah, menunjukkan kualitas yang sangat tinggi. Dengan tidak adanya kecenderungan pembentukan struktur sekunder yang berlebihan, pasangan primer ini sangat cocok untuk digunakan dalam PCR tanpa perlu optimasi tambahan. Dikarenakan hal tersebut saya memilih primer tersebut dan juga saya pilih primer tersebut karena memiliki rentang konten GC yang sama yaitu 55%, *any* dan *end* 0,0 sehingga tidak membentuk primer dimer. Lalu nilai panjang primer yang sama-sama 20 *base pair* dan memiliki nilai penalti yang kecil mendekati nol.

Dari modul yang sudah saya temukan, bahwa untuk primer yang disarankan adalah menggunakan suhu *anneal* 60°C selama 1 menit. Dengan urutan sekuens yakni (Origene, 2024) pada *number accession* NM_000875 sebagai contoh referensi walaupun untuk tidak menggunakan primernya karena adanya perbedaan sekuens dengan yang sedang diteliti NC_000012.12.

Forward Sequence:	CCTGCACAACTCCATCTTCGTG
Reverse Sequence:	CGGTGATGTTGTAGGTGTCCTGC

➤ WRKY70 *Arabidopsis thaliana* chromosome 3, partial sequence

NCBI (pilihan primer 2)

>Primer Forward

CAAGGGTGCAAGGCAACAAA

>Primer Reverse

TTGGGAGTTCTGCGTTGGT

Hasil data dan parameter

Data NCBI

Primer pair 2								
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CAAGGGTGCAAGGCAACAAA	Plus	20	665	684	59.82	50.00	4.00
Reverse primer	TTGGGAGTTCTGCGTTGGT	Minus	20	774	755	60.11	50.00	2.00
Product length	110							0.00
Products on intended targets								
>NM_115498.4 <i>Arabidopsis thaliana</i> WRKY DNA-binding protein 70 (WRKY70), mRNA								
product length = 110								
Forward primer	1 CAAGGGTGCAAGGCAACAAA	20						
Template	665	684						
Reverse primer	1 TTGGGAGTTCTGCGTTGGT	20						
Template	774	755						

Data In-silico FastPCR

```
[location=complement(join(20909082..20909547,20909734..20909835,20910093..20910409)) [gbkey=cds]
primer forward1 5'-caagggtgcaggcaacaaa
Position: 451->470 100% Tm = 60,5°C
5'-caagggtgcaggcaacaaa->
|||||||||||||||||||
cccaagggtgcaggcaacaaa
primer reverse1 5'-ttggagttctcgcttgg
Position: 541<-560 100% Tm = 63,1°C
<-ttggagttctcgcttgg-5
|||||||||||||||
acaccaacgcagaaactccaaagac
>primer forward1 451->470
5'-caagggtgcaggcaacaaa
>primer reverse1 541<-560
5'-ttggagttctcgcttgg
```

Primer3Plus

>Primer Forward

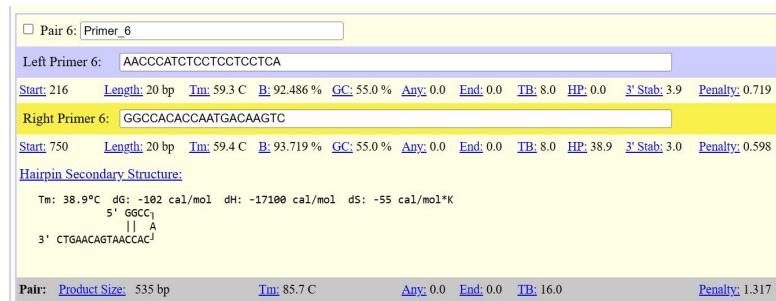
TGGATTATCTGCTCTCGCGT

>Primer Reverse

TGTAGGCTCCAGATGGGACA

Hasil data dan dokumentasi

Data Primer3



Data In-silico FastPCR

```
In silico Primer(s) search for: lcl|nc_003074.8_cds_np_191199.1_1 [gene=wryky70] [locus_tag=at3g56400] [db_xref=tairz:at3g56400,geneid:824807]
[protein=wryky dna-binding protein 70] [protein_id=np_191199.1] [location=complement(join(20909082..20909547,20909734..20909835,20910093..20910409))]
[gbkey=cds]
primer forward1 5'-aacccatcttcctctca
Position: 173->192 100% Tm = 62,0°C
5'-aacccatcttcctctca->
|||||||||||||||
cgaaccatcttccttcctcatcc
primer reverse1 5'-ggccacaccaatgacaagtgc
Position: 685<-707 100% Tm = 59,9°C
<-ctgacacatgtaccacacgg-5
|||||||||||||||
atgacttgtcatgtgtgtggccagaa
```

Alasan pemilihan primer dari Primer3Plus, yaitu Primer yang dianalisis terdiri dari primer kiri dengan sekuens AACCATCTCCTCCTCTCA dan primer kanan dengan sekuens GGCACACACAATGACAAGTC, masing-masing memiliki panjang 20 pasangan basa. Primer kiri dimulai dari posisi 216 dengan temperatur leleh (Tm) 59,3°C dan persentase GC sebesar 55,0%. Sementara itu, primer kanan dimulai dari posisi 750, memiliki Tm sebesar 59,4°C dengan persentase GC sebesar 55,0%. Persentase kecocokan basa (B) untuk primer kiri adalah 92,486%, sedangkan primer kanan memiliki kecocokan yang lebih tinggi, yaitu 93,719%.

Dari segi struktur sekunder, primer kiri memiliki skor komplemen diri (*Any*) sebesar 0,0, yang berarti tidak ada kecenderungan membentuk dimer sendiri. Skor komplemen ujung 3' (*End*) juga 0,0, menunjukkan tidak adanya risiko pembentukan dimer di ujung 3', sehingga primer ini baik untuk PCR. Stabilitas ujung terminal (*TB*) sebesar 8,0, yang menunjukkan stabilitas cukup baik untuk pemanjangan oleh polimerase. Skor *hairpin* (*HP*) primer kiri adalah 0,0, yang berarti tidak ada

kecenderungan membentuk struktur *hairpin*, menjadikannya ideal untuk PCR. Stabilitas ujung 3' (3' *Stab*) sebesar 3,9 kcal/mol, menunjukkan bahwa ujung 3' cukup stabil. Skor penalti primer kiri adalah 0,719, yang menunjukkan primer ini masih perlu dioptimalkan lebih lanjut.

Pada primer kanan, skor komplemen diri (*Any*) sebesar 0,0, yang berarti tidak ada kecenderungan membentuk dimer sendiri. Skor komplemen ujung 3' (*End*) tetap 0,0, menunjukkan bahwa tidak ada risiko pembentukan dimer di ujung 3'. Stabilitas ujung terminal (TB) adalah 8,0, yang menunjukkan kestabilan yang cukup baik. Skor *hairpin* (HP) primer kanan adalah 38,9, yang menunjukkan kecenderungan yang lebih tinggi untuk membentuk struktur hairpin, yang mungkin memerlukan optimasi lebih lanjut dalam PCR. Stabilitas ujung 3' (3' *Stab*) sebesar 3,0 kcal/mol, sedikit lebih rendah dibandingkan primer kiri tetapi masih dalam kategori stabil untuk pemanjangan polimerase. Skor penalti primer kanan adalah 0,598, yang menunjukkan kualitasnya lebih baik dibandingkan primer kiri, tetapi tetap memerlukan optimasi.

Dari analisis keseluruhan, pasangan primer ini memiliki produk PCR dengan ukuran 535 bp dan temperatur leleh (Tm) sebesar 85,7°C, serta memiliki suhu Tm yang kurang satu derajat celcius (direkomendasikan) pada FastPCR dan Primer3Plus. Primer kiri memiliki kestabilan yang baik dengan skor *hairpin* 0, tetapi skor penalti yang cukup tinggi menunjukkan bahwa masih ada aspek yang perlu diperbaiki. Sementara itu, primer kanan memiliki kecenderungan tinggi membentuk hairpin yang dapat mempengaruhi efisiensi PCR. Oleh karena itu, jika digunakan dalam PCR, perlu dilakukan optimasi lebih lanjut untuk mengurangi kemungkinan struktur sekunder yang berlebihan.

Lalu, terdapat referensi dari jurnal yang saya dapatkan pada bahasan AtWRYK70 (*Arabidopsis thaliana* WRYK70).

AT3G56400	WRKY70	162	5' CAGGATCTCATGGTGTTGGAA
			5' TGTTTCCACTCTACATGGCC

Untuk sekuens atas adalah sekuens forward dan sekuens bawah adalah sekuens bawah adalah sekuens reverse. Suhu RT-PCR yang digunakan 60°C dalam 1 menit untuk suhu *annealing* dan dilakukan selama 40 siklus RT-PCR (Saenz-Mata dkk, 2014).

Daftar Referensi

- Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schäffer (2008), "Database Indexing for Production Lestari, R. & W. Fajira. PowerPoint Presentation: Primer Design in Bioinformatics: A Comprehensive Guide. FMIPA UI: Depok.MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* **24**:1757-1764.
- NCBI Resource Coordinators. 2017. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* (46): D8-D13.
- ORIGENE. 2024. IGF1 Receptor (IGF1R) Human qPCR Primer Pair (NM_000875). *OriGene Technologies*, Inc.: 1.
- Rachmania, M. K. PowerPoint: Primer Design and In Silico PCR. FMIPA UI: Depok. Sáenz-Mata, J., Salazar-Badillo, F. B., & Jiménez-Bremont, J. F. (2014). Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* WRKY genes under interaction with beneficial fungus *Trichoderma atroviride*. *Acta Physiologiae Plantarum*, **36**(5), 1085–1093. doi:10.1007/s11738-013-1483-7.
- Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; **7**(1-2):203-14.