
OPTIMASI SUHU ANNEALING MARKA ISSR SEBAGAI LANGKAH AWAL DALAM PENGEJAWANTAHAN KERAGAMAN GENETIK *Ficus fistulosa* DAN *Ficus variegata*

Risqi Aprilianingsih^{1*}, Baiq Farhatul Wahidah¹, Muhammad Rifqi Hariri²

¹Program Studi Biologi,
Fakultas Sains dan Teknologi,
UIN Walisongo Semarang, Jl.
Prof. Dr. Hamka (Kampus II),
Ngaliyan, Semarang, Jawa
Tengah

²Pusat Penelitian Konservasi
Tumbuhan dan Kebun Raya,
Lembaga Ilmu Pengetahuan
Indonesia, Jl. Ir. H. Juanda No.
13, Bogor, Indonesia

*e-mail korespondensi:
risqiaprilianingsih@gmail.com

Abstrak. *Ficus* merupakan marga dengan jumlah anggota terbesar dari suku *Moraceae* yang banyak dijumpai di Indonesia dan memiliki peran signifikan di kawasan tropis sebagai keystone species. *Ficus* memiliki distribusi cukup luas dengan beberapa anggota di antaranya adalah *F. fistulosa* dan *F. variegata* dapat tumbuh di hutan primer hingga kawasan urban seperti Gunung Botol Taman Nasional Gunung Halimun Salak dan Kota Bogor. Perbedaan lokasi tumbuh memungkinkan adanya perbedaan keragaman genetik pada tumbuhan sehingga informasi tersebut perlu digali dan diungkap. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu optimum pada tahapan annealing dan menyeleksi primer dengan amplicon terbaik sebagai langkah awal mengungkap keragaman genetik *F. fistulosa* dan *F. variegata*. Penanda molekuler yang digunakan adalah inter simple sequence repeats (ISSR) yang merupakan penanda molekuler dengan tingkat polimorfisme sangat tinggi dan cukup sering digunakan untuk mengungkap keragaman genetik pada tumbuhan. Sebanyak empat sampel *F. fistulosa* dan *F. variegata* dan 10 primer ISSR digunakan dalam penelitian ini. Modifikasi pada tahapan amplifikasi dapat dilakukan dengan penggantian suhu yang digunakan berdasarkan interval tertentu. Amplicon yang baik dipengaruhi oleh kondisi suhu optimum pada tahapan annealing ketika amplifikasi dilakukan. Tujuh primer ISSR berhasil teramplifikasi pada suhu annealing 52 °C, sedangkan dua primer lainnya pada suhu annealing 53 °C. Primer ISSR 5 belum dapat teramplifikasi bahkan ketika modifikasi suhu annealing ketiga dilakukan, sehingga primer tersebut tidak digunakan dalam penelitian selanjutnya. Sembilan primer ISSR dengan suhu optimum yang telah diketahui dapat digunakan dalam penelitian pengejawantahan keragaman genetik *Ficus* spp. di Kawasan Bogor Kota dan Gunung Botol. **Kata Kunci:** *Ficus*, keragaman genetik, Marka ISSR, *Moraceae*, optimasi

Abstract. *Ficus* is a genus with the largest number of members of the *Moraceae* tribe which are often found in Indonesia and has a significant role in the tropics as a keystone species. *Ficus* has a fairly wide distribution with several members of which *F. fistulosa* and *F. variegata* can grow in primary forests to urban areas such as Mount Botol, Mount Halimun Salak National Park and Bogor City. Differences in growing locations allow for differences in genetic diversity in plants so that information needs to be explored and disclosed. This study aims to determine the optimum temperature at the annealing stage and to select primers with the best amplicon as the first step to reveal the genetic diversity of *F. fistulosa* and *F. variegata*. The molecular marker used is inter

*simple sequence repeats (ISSR) which is a molecular marker with a very high level of polymorphism and is quite often used to reveal genetic diversity in plants. A total of four samples of *F. fistulosa* and *F. variegata* and 10 ISSR primers were used in this study. Modifications in the amplification stage can be done by changing the temperature used based on certain intervals. A good amplicon is influenced by the optimum temperature conditions at the annealing stage when amplification is carried out. Seven ISSR primers were successfully amplified at an annealing temperature of 52 C, while the other two primers were amplified at an annealing temperature of 53 C. The ISSR 5 primer could not be amplified even when the third annealing temperature modification was carried out, so it was not used in the next study. Nine ISSR primers with known optimum temperatures can be used in the study of embodiment of genetic diversity of *Ficus* spp. in the Bogor City and Mount Botol areas.*

Keywords: *Ficus*, genetic diversity, ISSR markers, Moraceae, optimization

PENDAHULUAN

Ficus merupakan marga dengan jumlah anggota terbesar dari suku Moraceae yang banyak dijumpai di Indonesia. Tumbuhan *Ficus* memiliki peran signifikan di kawasan tropis sebagai *keystone species*. Keragaman bentuk hidup *Ficus* spp. menjadi hal menarik dan mudah dijumpai di berbagai tipe ekosistem. *Ficus* spp. merupakan tumbuhan yang memiliki tingkat adaptasi yang tinggi sehingga persebarannya sangat luas termasuk di Indonesia, semisal daerah Jawa. Beberapa spesies *Ficus* yang tersebar diantaranya adalah *F. fistulosa* dan *F. variegata* dapat tumbuh di hutan primer hingga kawasan urban seperti Gunung Botol Taman Nasional Gunung Halimun Salak dan Kota Bogor. Penelitian molekuler tentang *Ficus* sudah banyak dilakukan mengingat manfaat tumbuhan ini. Perbedaan lokasi tumbuh memungkinkan adanya perbedaan keragaman genetik tumbuhan sehingga informasi tersebut perlu digali dan diungkap. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu optimum pada tahapan *annealing* dan menyeleksi primer dengan amplicon terbaik sebagai langkah awal mengungkap keragaman

genetik *F. fistulosa* dan *F. variegata* melalui metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode amplifikasi (perbanyakan atau penggandaan) DNA dengan menggunakan teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklusnya terjadi duplikasi target DNA untai ganda. Target DNA yang diinginkan akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (long product) akan meningkat secara linier. Produk PCR dapat diidentifikasi menggunakan elektroforesis gel agarose (Yusuf, 2010).

Tahapan penting dalam proses PCR adalah denaturasi, annealing dan ekstensi. Annealing merupakan tahap penempelan primer pada DNA template. Primer dapat menempel pada DNA template pada suhu optimum. sehingga suhu yang digunakan dalam tahap annealing merupakan faktor penting keberhasilan PCR. Suhu annealing yang terlalu tinggi dapat menyebabkan ketidakberhasilan amplifikasi DNA, sedangkan suhu annealing yang terlalu rendah dapat menyebabkan penempelan primer pada tempat yang tidak spesifik (Pertiwi *et al.*, 2019).

Penanda molekuler yang digunakan adalah *inter simple sequence repeats* (ISSR). ISSR merupakan penanda molekuler dengan tingkat polimorfisme sangat tinggi dan merupakan salah satu penanda dengan motif sekuen berulang. ISSR berupa fragmen DNA dengan ukuran 100-3,000bp yang berlokasi di antara wilayah mikrosatelit, wilayah amplifikasi sekuen DNA yaitu pada inter-SSR bagian flanked genom secara berlawanan pada area yang dekat dengan sekuen berulang (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Penanda molekuler DNA dapat digunakan untuk identifikasi taksonomi, hubungan kekerabatan, dan autentikasi tumbuhan obat karena setiap spesies mempunyai komposisi genetik yang unik dan tidak terpengaruh oleh kondisi lingkungan, umur, dan kondisi fisiologis. ISSR merupakan penanda molekuler yang paling banyak digunakan untuk mempelajari genetik populasi, sidik DNA, dan studi filogenetik pada tanaman karena mempunyai sifat yang sangat sensitif, efektif, dengan polimorfisme tinggi, dan reproduksibel. Penanda molekuler ISSR telah banyak digunakan untuk autentikasi beberapa tumbuhan (Wang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2008).

Proses amplifikasi DNA sangat bergantung pada fase *annealing*. Sedangkan keberhasilan *annealing* bergantung pada pemilihan primer dan suhu, maka perlu dilakukannya optimasi suhu *annealing* mengingat setiap sampel tumbuhan yang akan diamplifikasi memiliki suhu optimum

masing-masing. Optimasi suhu dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal, sehingga proses PCR berhasil yang salah satunya ditunjukkan dengan adanya produk PCR.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), alat dan bahan yang digunakan antara lain: neraca analitik Precisa XT220A, *heatblock* VWR, elektroforesis set-Nyxtech Voltronix, sentrifuge Spectrafuge 24D, Erlenmeyer IWAKI ukuran 100ml, spindown Benchmark, *vortex mixer* VWR, microwave Sharp, GelDoc EZ Imager Bio-Rad, termocycler TAKARA Gradient, mikropipet Eppendorf ukuran 2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, dan 1000µl. Bahan yang digunakan dalam kegiatan ini diantaranya agarose Thermoscientific R0491, sampel tumbuhan *F. fistulosa* dan *F. variegata* terdapat pada tabel 1, 10 Primer ISSR seperti yang tertera pada tabel 2, TAE Thermoscientific 50X HB49, gene ruler 1 Kb Thermoscientific SM0311, kloroform, GelRed Biotium 41003, Mytaq HS Red Mix, KIT GeneJet K0791, pasir silica, dan ddH₂O. Adapun sampel *F. fistulosa* dan *F. variegata* yang digunakan berasal dari Kota Bogor dan Resort Gunung Botol Taman Nasional Gunung Halimun Salak (TNGHS).

Tabel 1. Kode dan Lokasi Sampel

No	Nama	Kode	Lokasi Pengambilan Sampel
1	<i>Ficus fistulosa</i>	PNW034	Kota Bogor
		PNW082	Resort Gunung Botol, TNGHS
2	<i>Ficus variegata</i>	PNW077	Kota Bogor
		PNW195	Resort Gunung Botol, TNGHS

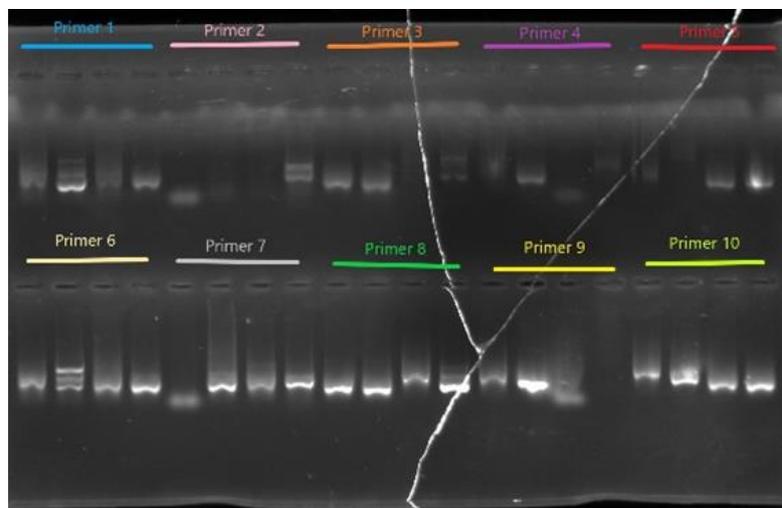
Tabel 2. Daftar Primer yang Digunakan

No	Primer	Sekuen Nukleotida (5'-3')
1.	Gpsb123	CACACACACACACAGAGAGAGAGA
2.	Gpsb151	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
3.	Xcup07	CCACCACCACCACCACCACCACCA
4.	Xcup14	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG

terang dan utuh atau tidak smear. Ukuran amplikon tebal, walaupun tipis pun masih bias dikatakan bahwa proses PCR berhasil. Optimasi PCR terhadap konsentrasi primer dapat memberikan hasil terbaik serta penambahan volume amplikon pada saat elektroforesis untuk meningkatkan kualitas pita. Terdapat perbedaan pita DNA hasil PCR dari tiap konsentrasi primer (Iqbal *et al.*, 2016; Syahputra *et al.*, 2016).

Sebanyak 10 primer digunakan dalam proses optimasi suhu *annealing*nya menggunakan 4 sampel DNA *Ficus* yaitu PNW034 dan PNW082 (*Ficus fistulosa*), PNW077 dan PNW195 (*Ficus variegata*). Diketahui bahwa 70% primer berhasil mengamplifikasi DNA sampel pada suhu 52°C (Tabel 1). Hasil amplifikasi menggunakan suhu *annealing* pada primer 1 dari keempat sampel semuanya terlihat pita DNA cukup jelas, artinya pada primer pertama optimasi suhunya tepat. Untuk primer kedua dari keempat sampel semuanya

terdapat pita DNA dua diantaranya terlihat hasil pita yang jelas dan dua diantaranya juga terdapat pita DNA tetapi tipis, optimasi pada primer dua dikatakan berhasil dan *annealing* secara otomatis berjalan baik. Berdasarkan hasil visualisasi, terdapat 3 primer yang tidak menghasilkan pita DNA tetapi terdapat *debris*, hal tersebut dikarenakan fase *annealing* tidak berjalan sempurna pada ketiga primer (Gambar 1). Primer tersebut diantaranya primer 5, 6, dan 7. Setiap primer memiliki karakteristik berbeda-beda termasuk tipe suhu yang menjadikannya teramplifikasi secara sempurna. Selain primer itu sendiri, faktor lain yang mempengaruhi hasil pita DNA adalah suhu *annealing* yang digunakan. Maka bisa disimpulkan dari kesepuluh primer dengan 4 sampel ada 3 primer yang tidak teramplifikasi atau tidak cocok pada suhu 52°C, hal tersebut harus dilakukan pengulangan optimasi suhu lagi terhadap ketiga primer dengan menaikkan suhunya..



Gambar 1. Visualisasi optimasi suhu 52° C pada Xcxp15(6), Xcxp136(7)

Optimasi lanjutan terhadap ketiga primer yang belum teramplifikasi secara sempurna yaitu dengan menaikkan suhu *annealing* menjadi 53°C. Pada suhu *annealing* tersebut, primer 5 dari keempat sampel tidak

terlihat adanya pita DNA, hal ini menunjukkan bahwa suhu 53°C tidak tepat atau belum optimum untuk proses *annealing* primer 5 (Tabel 3, Gambar 1).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kami ucapkan kepada Laboratorium Treub Kebun Raya Bogor yang memberikan fasilitas penelitian, Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang yang telah memberikan izin penelitian, dan seluruh pihak yang membantu dalam penelitian ini sehingga penelitian bisa berjalan lancar

DAFTAR PUSTAKA

- Iqbal, M. S., & Reni, P. (2016). Suhu Annealing Pada Marka ISSR. *Jurnal Biologi* 19(3): 34-42.
- Pertiwi, P.D., Mahardika, & Watiniasih. (2019). Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR Pada Ikan Karang Anggota Famili Pseudochromidae Untuk Identifikasi Spesies Secara Molekuler. *Jurnal Biologi* 19(2):1-5.
- Syahputra, A., Mutaqin, K.H., & Damayanti, T.A., (2016). Komparasi Metode Isolasi DNA Patogen Antraknosa dan Bulai untuk Deteksi PCR. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 12,
- Wang, H.Z., Feng, S.G., Lu, J.J., Shi, N.N. Liu, J.J. (2009). Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simpel sequent repeat (ISSR) markers. *SciHort.* 122:440-447
- Yusuf, R. (2011). Sebaran ekologi dan keanekaragaman *Ficus* spp. DiIndonesia. Berk. Penel. *Hayati edisi Khusus: 5A* (83-91). Puslitbang Biologi LIPI
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.
- Zhou, M., Liu, H., Deng, Z., Chen, J., Yang, H., Li, H., Xia, Z., Li, D. (2017). Molecular Cloning and Characterization of S-adenosylmethionine Decarboxylase Gene in Rubber Tree (Hevea