



PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK MENGGUNAKAN PENANDA MAT-K SECARA *IN SILICO* UNTUK MENDETEKSI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA

DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC PRIMERS USING *IN SILICO* MAT-K MARKERS TO DETECT RARENESS OF PLANT TYPES IN INDONESIA

Hanina Dzikrina, Topik Hidayat*, Siti Sriyati

Jurusan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia, Jl. Dr. Setiabudhi No. 229 Bandung 40154, Indonesia

*Corresponding author: topikhidayat@upi.edu

Naskah Diterima: 9 Agustus 2022; Direvisi: 29 Januari 2023; Disetujui: 7 Juni 2023

Abstrak

Indonesia merupakan negara dengan kekayaan biodiversitas tertinggi di dunia. Terdapat sekitar 40.000 jenis tumbuhan yang tumbuh di Indonesia dan sebagian besar tumbuhan sudah menunjukkan kelangkaan. Penentuan kelangkaan suatu jenis tumbuhan dapat diketahui berdasarkan distribusi populasinya, namun membutuhkan waktu yang cukup lama. Ketidakstabilan genom akan terjadi pada jenis tumbuhan langka, karena tidak mampu beradaptasi pada ekosistem. Banyaknya tumbuhan yang terancam punah dan habitat asli yang rusak, maka mengharuskan para peneliti untuk mengetahui keberadaan dan melakukan pendataan terhadap keragaman jenis tumbuhan di Indonesia secara cepat. DNA *barcoding* merupakan teknik yang dikembangkan untuk mempercepat dan mempermudah proses identifikasi organisme dengan menggunakan potongan DNA tertentu. Tujuan dari penelitian ini adalah mencari primer spesifik untuk mendeteksi status kelangkaan pada tumbuhan menggunakan penanda mat-k secara *in silico*. Gen mat-K merupakan penanda umum yang direkomendasikan untuk analisis pada tumbuhan. Metode yang digunakan, yaitu dengan pendekatan secara *in silico* karena waktu yang diperlukan relatif lebih singkat dan murah. Penelitian ini berhasil mendapatkan sepasang primer *forward* 1:F_1635–1657 dan primer *reverse* 1:R_2093–2113 dengan persentase keberhasilan amplifikasi yang dicapai sebesar 66%. Kedepannya, primer ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi status kelangkaan pada tumbuhan.

Kata Kunci: Desain primer; DNA *barcode*; mat-K; Tumbuhan langka

Abstract

Indonesia is a country with the highest biodiversity wealth in the world. There are around 40,000 types of plants that grow in Indonesia and most of the plants are rare. Determining the rarity of a plant type can be determined based on its population distribution, but it takes quite a long time. Genome instability will occur in rare plant species, because they are unable to adapt to the ecosystem. The large number of plants that are threatened with extinction and their natural habitats are damaged requires researchers to quickly identify the existence and collect data on the diversity of plant species in Indonesia. DNA *barcoding* is a technique developed to speed up and simplify the process of identifying organisms using certain pieces of DNA. The aim of this research is to look for specific primers to detect rarity status in plants using mat-k markers *in silico*. The mat-K gene is a general marker recommended for analysis in plants. The method used is an *in silico* approach because the time required is relatively shorter and cheaper. This research succeeded in obtaining a pair of forward primers 1:F_1635–1657 and reverse primers 1:R_2093–2113 with a successful amplification percentage of 66%. In the future, this primer can be used to identify rarity status in plants.

Keywords: DNA *barcode*; mat-K; Primer design; Rare plants

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v16i2.1.27538>

PENDAHULUAN

Indonesia dikenal dengan sebutan negara kepulauan tropis yang terdiri dari ±17.000 pulau yang tersebar luas, diantaranya sebanyak 13.466 pulau sudah teridentifikasi (Abidin et al., 2020). Indonesia juga dikenal sebagai negara megabiodiversitas dunia mempunyai keragaman spesies yang cukup tinggi (Sulistiani et al., 2020). Oleh karena itu, perlu dilakukan identifikasi atau pengelompokkan terhadap keragaman jenis tumbuhan untuk menyeimbangi laju hilangnya keanekaragaman hayati flora dan fauna yang ada, terutama tumbuhan langka yang terancam punah (Kolondam et al., 2012).

Indonesia juga merupakan negara dengan tingkat darurat kepunahan tertinggi pada jenis tumbuhan yang ada di dunia dan merupakan *hot spot* kepunahan berbagai macam spesies. Di informasikan bahwa sekitar 240 spesies tumbuhan di Indonesia memiliki status terancam punah atau dapat dikatakan langka (Kusmana & Hikmat, 2015). Menurunnya populasi spesies tumbuhan langka di Indonesia diakibatkan oleh faktor manusia dan lingkungan (Widyatmoko, 2019). Selain itu, kurangnya tenaga ahli pada bidang identifikasi tumbuhan menjadi salah satu faktor yang menyebabkan banyaknya tumbuhan di Indonesia punah sebelum teridentifikasi dan menjadi tumbuhan langka karena populasinya menurun.

Akhir abad ke-20, penelitian di bidang biodiversitas dan sistematika tumbuhan terus berkembang didukung dengan adanya perkembangan ilmu biologi molekuler. Salah satunya adalah untuk mengidentifikasi jenis tumbuhan secara molekuler (*barcoding*). Keuntungan dari penggunaan penanda molekuler (*barcode*), yaitu hasil yang diperoleh lebih konsisten dan semua jenis jaringan dapat dideteksi dengan berbagai tahap perkembangan dan tidak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (Nurkamila & Pharmawati, 2014). Semakin pesatnya ilmu pengetahuan dan perkembangan teknologi saat ini, maka terdapat teknik yang cepat untuk identifikasi suatu spesies yaitu teknik DNA *barcoding* yang dapat dijadikan sebagai penanda (Valentini et al., 2009). Menurut Bangol et al. (2014) teknik DNA *barcoding* dapat dijadikan sebagai penanda pada proses identifikasi makhluk hidup dengan mudah dan cepat menggunakan segmen DNA tertentu. Keunggulan dari teknik DNA *barcoding* adalah dapat dipergunakan untuk karakterisasi dan identifikasi berbagai jenis spesies yang tidak dapat dibedakan secara morfologi, membutuhkan jumlah sampel yang sedikit, dan dapat diambil dari semua organ hewan maupun tumbuhan (Rahayu & Jannah, 2019). Menurut Kress (2017) teknik DNA *barcode* dapat digunakan untuk membedakan spesies dan melestarikan spesies yang terancam punah.

Bioinformatika merupakan salah satu disiplin ilmu secara *in silico* dengan menggunakan perangkat lunak dengan bantuan *computer* untuk mengolah data biologi molekuler. Hasil akhir atau *output* yang dihasilkan dari pendekatan *in silico* ini dapat dipastikan dengan pendekatan secara *in vivo* atau *in vitro* di laboratorium. Menurut Witarto dan Sajidan (2010) penelitian dengan menggunakan pendekatan *in silico* dapat mempersingkat waktu pengerjaan dengan menggunakan bantuan perangkat lunak pada *computer*, dan mengurangi biaya sehingga cukup terjangkau jika dibandingkan dengan pendekatan pada penelitian yang lain.

Penanda umum yang direkomendasikan untuk analisis tumbuhan, yaitu penanda genom kloroplas *rbcL* dan *mat-K*. Gen *mat-K* dapat membedakan tumbuhan sampai ke tingkat spesies, maka gen *mat-K* lebih umum digunakan daripada gen *rbcL* pada berbagai penelitian. Gen *mat-K* memiliki urutan sekuen yang lebih bervariasi dan kecepatan evolusi yang tinggi dibandingkan gen *rbcL* (Barthet, 2006). Selain itu, gen *mat-K* memiliki tingkat akurasi tertinggi, yakni sebanyak 97,42%. Tingkat akurasi marka didasari atas jumlah kesesuaian sekuen dengan sekuen pada basis data di GenBank (Xu et al., 2015), sehingga gen *mat-K* lebih baik dan lebih akurat untuk mendeteksi dan membedakan suatu spesies dibandingkan dengan penanda lainnya (Kolondam et al., 2012).

DNA *barcode* merupakan salah satu instrumen yang cukup penting dalam penelitian yang memerlukan adanya ketersediaan *database* untuk proses identifikasi spesies. Menurut Lucas (2012) teknik *barcoding* yang ideal yaitu dengan menggunakan sepasang primer. Primer merupakan untai DNA pendek yang dihasilkan secara buatan dan biasanya terdiri atas 18 sampai 25 nukleotida yang berperan penting pada proses penempelan di daerah spesifik cetakan DNA dan

yang mengawali sintesis rantai DNA selanjutnya (Nuryady et al., 2020). Seleksi primer digunakan untuk mencari primer acak yang membuat penanda atau marker ini menghasilkan pita DNA, berdasarkan jumlah pita DNA yang diperoleh ataupun jumlah lokus yang dihasilkan. Menurut Gusmiaty (2012) pemilihan primer dilakukan dengan cara melakukan beberapa reaksi PCR dengan primer yang berbeda menggunakan sampel DNA yang sama dan dalam kondisi yang sama pula, hal ini dilakukan agar mengetahui kondisi optimum serta tingkat variasi pita yang dihasilkan oleh setiap primer. Berdasarkan pencarian *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) yang merupakan sebuah sistem yang terhubung ke dalam *database* sekuen dari beberapa negara, cukup banyak spesies tumbuhan yang belum tersedia atau tidak cukup lengkap untuk sekuen DNA yang berasal dari gen mat-K. Maka, penelitian ini bertujuan untuk mencari pasangan sekuen primer untuk mendeteksi kelangkaan suatu jenis tumbuhan menggunakan penanda mat-K secara *in silico* untuk dijadikan DNA *barcode* tumbuhan langka.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian ini dilakukan secara *in silico* dengan bantuan *software* komputer ClustalX, BioEdit, dan FastPCR Sebanyak 50 spesies tumbuhan langka yang digunakan sebagai sampel (Tabel 1) dengan tiga kategori status kelangkaan *Critically Endangered* (CR; Kritis), *Endangered* (EN; Genting), dan *Vulnerable* (VU; Rentan) menurut *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). Tumbuhan yang digunakan dipilih dari *Plants of The World Online* (<https://powo.science.kew.org/>) berdasarkan ketersediaan data sekuen DNA daerah mat-K pada laman GenBank *National Center of Biotechnology Information* (NCBI).

Pengolahan data diawali dengan penyusunan sekuen DNA daerah mat-K yang telah diperoleh dari ketersediaan data pada GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekuen DNA disusun dalam FASTA (.txt) format menggunakan program NotePad. *Sequence alignment* atau pensejajaran sekuen DNA gen mat-K menggunakan *software* ClustalX (Thompson et al., 1997), perolehan sekuen konsensus DNA menggunakan *software* BioEdit, dan perancangan primer menggunakan program FastPCR (Kalendar et al., 2017). Program FastPCR juga digunakan untuk uji coba *in silico* menggunakan kandidat primer yang telah diperoleh. Setiap kandidat primer diujicoba terhadap sampel tumbuhan langka menggunakan metode *in silico* PCR. Hasil *in silico* PCR akan terlihat pada kolom *Result Report* berupa munculnya segmen DNA atau *amplicon*.

Tabel 1. Sampel tumbuhan langka gen mat-K berdasarkan data NCBI

Famili	Spesies	IUCN	Tahun	Nomor akses	Referensi
<i>Araceae</i>	<i>Amorphophallus titanum</i>	EN	2018	KY490479.1	<i>Unpublished</i>
<i>Araucariaceae</i>	<i>Agathis borneensis</i>	EN	2012	AB023975.1	Cheng et al. (2000)
<i>Araucariaceae</i>	<i>A. dammara</i>	VU	2012	AB650545.1	Wu et al. (2011)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>Anisoptera laevis</i>	VU	2017	KY972901.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>A. marginata</i>	VU	2019	KY972903.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>Cotylelobium burckii</i>	EN	2019	KY972911.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>Dryobalanops aromatica</i>	VU	2017	KY972931.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>D. beccarii</i>	EN	1998	KY972933.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>D. rappa</i>	EN	2019	KY972935.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>Hopea centipeda</i>	EN	2019	KY972945.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>H. nervosa</i>	CR	1998	KY972949.1	Heckenhauer et al.

Famili	Spesies	IUCN	Tahun	Nomor akses	Referensi
					(2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>H. pentanervia</i>	VU	2019	KY972953.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>H. vacciniifolia</i>	EN	2019	KY972955.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>Shorea acuminatissima</i>	VU	2019	KY972970.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. albida</i>	VU	2019	KY972975.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. atrinervosa</i>	VU	2017	KY973014.1	Heckenhauer et al., (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. bracteolata</i>	EN	2017	KY972988.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. confusa</i>	VU	2019	KY972973.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. domatiosa</i>	EN	2019	KY973040.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. inaequilateralis</i>	EN	2019	KY973009.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. johorensis</i>	CR	1998	KY973023.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. laevis</i>	VU	2017	KY972983.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. mecistopteryx</i>	VU	2019	KY973033.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. obscura</i>	VU	2019	KY973011.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. ochracea</i>	VU	2019	KY973041.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. ovata</i>	EN	1998	KY973046.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. quadrinervis</i>	VU	2019	KY973058.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>S. smithiana</i>	VU	2019	KY973064.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>Vatica endertii</i>	EN	2019	KY973072.1	Heckenhauer et al. (2017)
<i>Ebenaceae</i>	<i>Diospyros celebica</i>	VU	1998	DQ924004.1	Duangjai et al. (2006)
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Mallotus brachythyrus</i>	VU	2020	EF582634.1	<i>Unpublished</i>
<i>Lauraceae</i>	<i>Litsea fenestrata</i>	VU	2019	AB259076.1	<i>Unpublished</i>
<i>Lauraceae</i>	<i>Phoebe excelsa</i>	VU	2020	AB259099.1	<i>Unpublished</i>
<i>Nepenthaceae</i>	<i>Nepenthes adnata</i>	EN	2013	AF315866.1	Meimberg et al. (2008)
<i>Nepenthaceae</i>	<i>N. dubia</i>	CR	2000	AF315869.1	Meimberg et al. (2008)
<i>Nepenthaceae</i>	<i>N. lavicola</i>	CR	2000	AF315935.1	Meimberg et al. (2008)
<i>Nepenthaceae</i>	<i>N.s mapuluensis</i>	EN	2014	AF315918.1	Meimberg et al. (2008)

Famili	Spesies	IUCN	Tahun	Nomor akses	Referensi
<i>Nepenthaceae</i>	<i>N. miki</i>	VU	2000	AF315911.1	Meimberg et al. (2008)
<i>Nepenthaceae</i>	<i>N.s rhombicaulis</i>	VU	2000	AF315874.1	Meimberg et al. (2008)
<i>Nepenthaceae</i>	<i>N. sumatrana</i>	CR	2013	AF315872.1	Meimberg et al. (2008)
<i>Orchidaceae</i>	<i>Paphiopedilum glaucophyllum</i>	EN	2014	AY557205.1	Kocyan et al. (2004)
<i>Orchidaceae</i>	<i>P. primulinum</i>	CR	2014	JN181451.1	Guo et al. (2012)
<i>Proteaceae</i>	<i>Heliciopsis lanceolata</i>	EN	1998	EU642696.1	Mast et al. (2008)
<i>Taxaceae</i>	<i>Taxus wallichiana</i>	EN	2010	DQ478792.1	<i>Unpublished</i>
<i>Zingiberaceae</i>	<i>Boesenbergia loerzingii</i>	CR	2019	MN803392.1	<i>Unpublished</i>
<i>Zingiberaceae</i>	<i>Burbridgea stenantha</i>	EN	2018	KY620236.1	<i>Unpublished</i>
<i>Zingiberaceae</i>	<i>Etilingera corrugata</i>	EN	2018	KY620239.1	<i>Unpublished</i>
<i>Zingiberaceae</i>	<i>Globba variabilis</i>	VU	2019	AY341098.1	Williams et al. (2004)
<i>Zingiberaceae</i>	<i>Hedychium horsfieldii</i>	VU	2019	AF478859.1	Kress et al. (2002)
<i>Zingiberaceae</i>	<i>Scaphochlamys polyphylla</i>	VU	2019	LC148397.1	<i>Unpublished</i>

Keterangan: CR= kritis; EN= genting; dan VU= rentan)

HASIL

Kandidat Primer Tumbuhan Langka

Sebelum mendapatkan kandidat primer tumbuhan langka, perlu dilakukan pembentukan sekuen konsensus DNA pada program BioEdit. Sekuen consensus DNA yang diperoleh terdiri dari susunan basa A, G, T, C, dan huruf lain yang disebut *single letter code* sesuai dengan kode nukleotida IUPAC. Berdasarkan sekuen konsensus DNA yang diperoleh berhasil didapatkan 251 kandidat primer (121 kandidat primer *forward* dan 130 kandidat primer *reverse*). Diperoleh 20 kandidat primer *forward* dan primer *reverse* tumbuhan langka yang didesain berdasarkan hasil amplifikasi terbanyak dari riset ini pada saat proses *in silico* PCR (Tabel 2).

Tabel 2. Kandidat primer *forward* dan primer *reverse* tumbuhan langka hasil *in silico* PCR

Primer ID	Sequence (5'-3')
1:F_1203-1225	ttgcaatcattgtggaattcc
1:F_1600-1622	gtaaccaatcctctcatttacga
1:F_1603-1625	accaatcctctcatttacgatca
1:F_1635-1657	ggagtctttctgaacgaatcca
1:F_1958-1979	ggtacggagtcaaatgctagaa
1:F_2081-2100	cgcaatagggcatccatta
1:F_2087-2106	agggatcccattagtaagc
1:F_2241-2263	tgtgttaaaactttggctcgtaa
1:F_2256-2278	gctcgtaaacacaagagtactgt
1:F_2260-2282	gtaaacacaagagtactgtactgt
1:R_2733-2752	aaccgtgcttgcatctttca
1:R_2352-2374	taagctcttttgggaagatcaa
1:R_2252-2273	actcttggtttacgagccaaa
1:R_2249-2270	cttgtgtttacgagccaaagt
1:R_2093-2113	cagatcggcttactaatggga
1:R_1915-1937	acttgaacgataaccagaaaat

Primer ID	Sequence (5'–3')
1:R_1569–1591	aggaaaatggattcgtattcaca
1:R_1434–1456	aggaaccgtaataaatgcaaaga
1:R_1384–1406	gacttgaatcaggattccagat
1:R_1180–1202	cccagccgatatcatttgagaat

In Silico PCR

Sepuluh pasang kandidat primer *forward* dan primer *reverse* terpilih (Tabel 2) dipasangkan satu-persatu untuk mengetahui universalitas masing-masing primer dalam mengamplifikasi DNA target. Hasil uji coba sepuluh pasang kandidat primer tumbuhan langka, yaitu primer *forward* dan *reverse* dengan primer ID 1:F_1635–1657–1:R_2093–2113 menunjukkan persentase keberhasilan amplifikasi tertinggi, yaitu sebesar 66% atau dapat mengamplifikasi 33 dari 50 sampel tumbuhan langka (Tabel 3).

Tabel 3. Uji coba pasangan primer tumbuhan langka gen mat-K

Primer ID	Sequence (5'–3')	Hasil positif	% Hasil positif
1:F_1203–1225	tttgcaatcattgtggaattcc	26	25%
1:R_1569–1591	aggaaaatggattcgtattcaca		
1:F_1600–1622	gtaaccaatcctctcatttacga	20	40%
1:R_2352–2374	taagctcttttgggaagatcaa		
1:F_1603–1625	accaatcctctcatttacgatca	24	48%
1:R_2252–2273	actcttgtgtttacgagccaaa		
1:F_1635–1657	ggagtctttctgaacgaatcca	33	66%
1:R_2093–2113	cagatcggcttactaatggga		
1:F_1958–1979	ggtacggagtcaaatgctagaa	29	58%
1:R_2249–2270	cttgtgtttacgagccaaagt		
1:F_2081–2100	cgcaataggcatcccatta	0	0%
1:R_1915–1937	acttgaacgataaccagaaaaat		
1:F_2087–2106	agggcattcccattagtaagc	0	0%
1:R_1569–1591	aggaaaatggattcgtattcaca		
1:F_2241–2263	tgtgttaaaactttggctcgtaa	31	60%
1:R_2252–2273	actcttgtgtttacgagccaaa		
1:F_2256–2278	gctcgtaaacacaagagtactgt	25	50%
1:R_2352–2374	taagctcttttgggaagatcaa		
1:F_2260–2282	gtaaacacaagagtactgtacgt	0	0%
1:R_1434–1456	aggaaccgtaataaatgcaaaga		

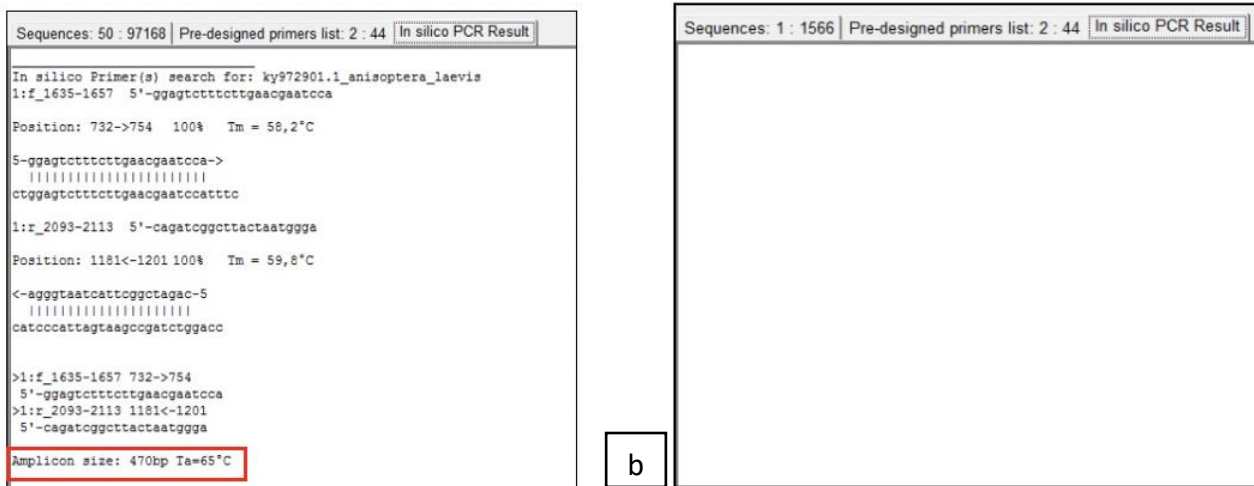
Berdasarkan Tabel 4, diperoleh pasangan primer tumbuhan langka beserta informasi mengenai primer tersebut. Primer *forward* dengan ID 1:F_1635–1657 yang memiliki panjang 23 bp, Tm 60,8 °C, nilai GC sebanyak 43,5%, dan kualitas dari primer ini sebesar 88%, sedangkan primer *reverse* dengan ID 1:R_2093–2113 yang memiliki panjang 21 bp, Tm 59,6 °C, nilai GC sebanyak 47,6%, dan kualitas primer ini sebesar 95%. Masing masing primer ini memiliki *amplicon size* yang sama, yaitu 470 bp.

Tabel 4. Pasangan primer tumbuhan langka gen mat-K

Primer ID	Sequence (5'–3')	Length	Tm (consensus)	GC	Primer quality	Amplicon size
1:F_1635–1657	ggagtctttctgaacgaatcca	23	60,8	43,5%	88%	470 bp
1:R_2093–2113	cagatcggcttactaatggga	21	59,6	47,6%	95%	

Hasil in silico PCR akan terlihat pada kolom result report, spesies yang muncul menandakan keberhasilan amplifikasi ditandai dengan adanya segmen DNA atau amplicon size oleh kandidat

primer yang digunakan (Gambar 1a) sedangkan jika pada kolom result report tidak muncul segmen DNA maka primer tersebut belum berhasil mengamplifikasi sampel tumbuhan langka (Gambar 1b).



Gambar 1. Hasil *in silico* PCR primer tumbuhan langka gen mat-K

Uji Efektivitas

Uji efektivitas ini merupakan uji kelayakan. Tujuannya adalah untuk melihat keefektifan primer yang telah diperoleh sebelumnya, yaitu mengetahui tingkat amplifikasi tertinggi terhadap tumbuhan lain yang belum diketahui status kelangkaannya, serta untuk memvalidasi apakah tumbuhan tersebut langka atau tidak. Pada Tabel 5 merupakan hasil yang diperoleh dari uji efektivitas dengan menggunakan 10 jenis tumbuhan langka yang ada di Indonesia.

Tabel 5. Uji efektivitas tumbuhan langka berdasarkan penanda mat-K

Nama spesies	mat-K
<i>Intsiabijuga</i>	-
<i>Pterocarpus indicus</i>	-
<i>Shorealeprosula</i>	+
<i>Shoreaparvifolia</i>	+
<i>Altingiaexcelsa</i>	-
<i>Kandeliacandel</i>	-
<i>Macodespetola</i>	-
<i>Amorphophallus gigas</i>	-
<i>Nepenthes mirabilis</i>	+
<i>Swietenia mahagoni</i>	-

Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya tanda positif (+) dan negatif (-). Tanda (+) menandakan bahwa primer yang diperoleh berhasil mendeteksi adanya kelangkaan pada suatu jenis tumbuhan yang ditandai dengan munculnya *amplicon size*, sedangkan tanda negatif (-) menandakan bahwa primer yang diperoleh tidak mendeteksi adanya kelangkaan pada jenis tumbuhan yang ditandai dengan tidak munculnya *amplicon size*.

PEMBAHASAN

Sekuen konsensus DNA yang diperoleh terdiri dari *single letter code* yang merupakan sistem yang digunakan untuk merepresentasikan variasi atau polimorfisme asam nukleat pada satu posisi karakter. Sekuen konsensus adalah sekuen DNA, RNA, atau protein yang mewakili urutan karakter yang selaras pada kolom karakter (Liljas, 2013). Menurut Johnson (2010) kode lain ini merupakan urutan asam nukleat yang ambigu pada suatu karakter yang termasuk ke dalam kode nukleotida IUPAC. Kode IUPAC sering digunakan untuk identifikasi polimorfisme asam nukleat secara cepat pada kelompok sekuen yang besar.

Untuk memperoleh primer, *single letter code* harus digantikan dengan salah satu basa A, G, T, atau C yang memiliki jumlah paling banyak pada satu kolom karakter. Program FastPCR digunakan untuk mendapatkan kandidat primer. Pada program FastPCR menggunakan fitur *PCR Primer Design*. Sekuen konsensus diinput pada kolom *General Sequences*, selanjutnya *Running*, dan daftar kandidat primer tumbuhan langka akan muncul pada kolom *Result Report*. Terdapat kriteria pembuatan primer yang harus diperhatikan untuk menilai kualitas primer yang baik. Standar pembuatan primer yang baik menurut Kalendar et al. (2011) yaitu *length* (nt) lebih dari 21 basa, T_m berkisar 60–68 °C, nilai GC sebesar 50%, dan *primer quality* lebih dari 95%. Namun menurut Fakhri et al. (2021) nilai T_m 50–65 °C dapat memenuhi kriteria primer yang baik dan dapat berpotensi dijadikan DNA *barcode*.

Primer dapat dikatakan baik jika kedua primer (*forward* dan *reverse*) berhasil mengamplifikasi daerah target. Jika hanya salah satu primer yang dapat mengamplifikasi daerah target atau tidak adanya *amplicon size*, maka pasangan primer tersebut belum memenuhi sebagai pasangan primer yang baik untuk tumbuhan langka. Berdasarkan jumlah persentase uji coba PCR secara *in silico* pada Tabel 3, pasangan primer dengan primer ID 1:F_2081–2100–1:R_1915–1937 dan 1:F_2087–2106–1:R_1569–1591 menunjukkan persentase keberhasilan amplifikasi sebesar 0%. Hal ini dapat terjadi karena kemungkinan primer *forward* dan primer *reverse* tidak cocok bila dijadikan pasangan primer dan atau urutan sekuen tidak cocok dengan semua sampel tumbuhan sehingga tidak dapat digunakan sebagai pengembang primer tumbuhan langka. Jika primer *reverse* yang sama dengan sebelumnya dipasangkan dengan primer *forward* yang baru dengan contoh pasangan primer ID 1:F_1203–1225–1:R_1569–1591 menunjukkan persentase keberhasilan amplifikasi sebesar 52% atau berhasil mengamplifikasi 26 dari 50 sampel tumbuhan langka. Hal ini dapat dikatakan bahwa primer *forward* dan primer *reverse* tersebut cocok bila dijadikan pasangan primer, namun tingkat keberhasilannya masih rendah bila dibandingkan dengan pasangan primer lain.

Hasil yang diperoleh pada *in silico* PCR pada Tabel 3 menunjukkan primer *forward* dan primer *reverse* dengan primer ID 1:F_1635–1657–1:R_2093–2113 menunjukkan persentase keberhasilan amplifikasi tertinggi, yaitu sebesar 66% atau dapat mengamplifikasi 33 dari 50 sampel tumbuhan langka. Kemampuan kedua pasangan primer tersebut untuk mengamplifikasi tumbuhan langka cukup baik, namun memiliki kekurangan karena tidak semua spesies teramplifikasi dengan baik. Menurut Hidayat (2011) dalam komunikasi pribadi menyatakan bahwa struktur sekuen DNA pada daerah mat-K sangat konservatif, sehingga cukup sulit untuk mendesain primer yang spesifik untuk digunakan mendeteksi kelangkaan suatu tumbuhan. Pernyataan ini sesuai dengan pendapat Shabrina et al. (2020) yang menyebutkan bahwa gen yang berasal dari DNA kloroplas bersifat *conserved region* atau yang memiliki daerah sekuen yang lestari.

Berdasarkan Tabel 4 bahwa panjang dari masing-masing sekuen primer spesifik *forward* dan *reverse* tumbuhan langka memenuhi standar kriteria primer yaitu di atas 21 basa (Kalendar et al., 2011). Menurut Borah (2011) primer yang ideal memiliki panjang antara 18–30 basa. Panjang primer yang ideal ini cukup untuk mengikat *template* pada suhu *annealing* dan menghasilkan primer yang spesifik. Jika primer terlalu pendek, maka akan mengurangi spesifitas primer dan membuat primer lebih mudah menempel pada *template* yang tidak ditargetkan (*misspriming*) atau suhu *annealing* yang tidak diinginkan (Pradnyaniti et al., 2010). Sedangkan menurut Handoyo dan Rudiretna (2001) jika primer terlalu panjang maka tidak akan memengaruhi spesifitas primer. *Melting temperature* (T_m) masing-masing primer menunjukkan rentang suhu yang berbeda. T_m merupakan suhu leleh di mana setengah dari dupleks DNA akan berdisosiasi atau lepas ikatan menjadi untai tunggal (Borah, 2011). T_m yang dihasilkan primer *forward* dan primer *reverse* berturut-turut yaitu 60,8 °C dan 59,6 °C yang berarti telah memenuhi standar kriteria primer yang ideal menurut Fakhri et al. (2021) dengan rentang suhu 50–65 °C. T_m yang terlalu tinggi di atas 65 °C akan mengurangi keefektifitas *annealing* sehingga mengganggu proses amplifikasi DNA. Jika T_m terlalu rendah, maka memiliki kecenderungan menempel di tempat lain dan menghasilkan produk yang tidak spesifik (Yustinadewi et al., 2018). Pemilihan T_m suatu primer sangat penting

dilakukan karena memiliki pengaruh terhadap pemilihan suhu *annealing* dalam proses PCR (Borah, 2011).

Menurut Yustinadewi et al. (2018) *annealing temperature* (T_a) adalah suhu di mana primer secara stabil mengikat DNA *template*. Jika suhu *annealing* terlalu tinggi, maka primer dan DNA *template* sulit berikatan sehingga menghasilkan produk PCR yang kurang efisien (rendah). Namun jika T_a terlalu rendah, maka akan terjadi penempelan primer pada DNA *template* yang non-spesifik. Persentase GC merupakan persentase guanin dan sitosin di dalam primer. %GC yang dihasilkan pada primer *forward* dan primer *reverse* berturut-turut adalah 43,5% dan 47,6%. Persentase GC sebaiknya berada pada kisaran 40–60% (Borah, 2011). Jika primer menghasilkan %GC yang rendah, maka primer tidak dapat berkompetisi secara efektif untuk menempel pada DNA *template* sehingga dapat menurunkan efisiensi primer pada proses PCR (Handoyo & Rudiretna, 2001). Panjang amplicon yang dihasilkan pasangan primer tumbuhan langka yaitu 470 bp, sedangkan panjang amplicon standar PCR menurut Fakhri et al. (2021) yaitu berkisar 100–500 bp. Hal ini menandakan bahwa pasangan primer yang dihasilkan telah memenuhi standar kriteria desain primer, sehingga primer tersebut dapat memberi kontribusi dalam mendeteksi kelangkaan jenis suatu tumbuhan.

Berdasarkan Tabel 5 spesies *Shorea leprosula*, *Shorea parvifolia*, dan *Nepenthes mirabilis* menunjukkan hasil positif (+), hal ini menandakan bahwa ketiga spesies tersebut termasuk tumbuhan yang terancam punah atau menunjukkan status kelangkaan. Sebaliknya, jika menunjukkan hasil negatif (-) maka spesies *Intsia bijuga*, *Pterocarpus indicus*, *Altingia excelsa*, *Kandelia candel*, *Macodes petola*, *Amorphophallus gigas*, dan *Swietenia mahagoni* termasuk tumbuhan yang aman dan belum menunjukkan status kelangkaannya untuk saat ini menggunakan penanda daerah mat-K.

Hasil positif (+) yang didapatkan pada sampel tumbuhan langka menunjukkan hanya pada genus *Shorea* dan *Nepenthes* saja. Hal ini terbukti pada hasil *in silico* PCR yang menunjukkan 251 kandidat primer pada sampel tumbuhan langka yang dihasilkan berhasil mengamplifikasi spesies terbanyak pada genus *Anisoptera*, *Dryobalanops*, *Shorea*, *Hopea*, dan *Nepenthes*. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan penanda pada daerah mat-K untuk uji kelangkaan suatu tumbuhan hanya spesifik pada beberapa genus saja.

Pada penelitian yang dilakukan oleh CBOL (2009) pada pengkode daerah plastid yang menunjukkan tingkat diskriminasi tumbuhan *Angiospermae* paling tinggi dan yang lebih cepat berkembang adalah penanda mat-K. Dalam studi kode batang DNA saat ini, keberhasilan amplifikasi tumbuhan *Angiospermae* menggunakan penanda mat-K sebesar 90%. Hal ini dapat terjadi karena mat-K memiliki tingkat resolusi yang lebih tinggi dibandingkan dengan penanda *rbcL*. Penanda mat-K masih membutuhkan pengembangan yang lebih lanjut khususnya pada tingkat universalitas mat-K terhadap beberapa tumbuhan lain.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh pasangan primer *forward* dan *reverse* yang berpotensi dijadikan sebagai DNA *barcode* untuk mendeteksi tumbuhan langka, yaitu primer ID 1:F_1635–1657 dan 1:R_2093–2113 berdasarkan penanda daerah mat-K dengan panjang *amplicon size* yang dihasilkan sebesar 470 bp dan menunjukkan persentase keberhasilan amplifikasi sebesar 66%. Hasil uji coba *in silico* PCR ini telah menunjukkan bahwa sekuen DNA daerah mat-K dapat dikembangkan menjadi kode batang DNA untuk kebutuhan identifikasi kelangkaan suatu tumbuhan.

Penelitian ini merupakan penelitian *in silico* yang menggunakan bantuan perangkat lunak komputer sehingga hasil yang diperoleh belum tentu akurat jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan di laboratorium. Maka pada penelitian selanjutnya dapat berupa uji coba pasangan primer tumbuhan langka yang dilakukan secara *in vitro* di laboratorium serta dapat melakukan validasi kembali apakah primer yang diperoleh dapat mengamplifikasi spesies yang tidak langka dalam famili yang sama.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan untuk kepala lab riset Bioteknologi Prodi Biologi FPMIPA UPI.

REFERENSI

- Abidin, D. Z., Purnomo., & Pradhana, C. (2020). *Keanekaragaman hayati sebagai komunitas: Berbasis Autentitas kawasan*. Jombang: Penerbit Fakultas Pertanian Universitas KH Wahab Hasbullah Jombang Press.
- Bangol, I., Momuat, L. I., & Kumaunang, M. (2014). Barcode DNA tumbuhan pangi (*Pangium edule* R.) berdasarkan gen matk. *Jurnal MIPA*, 3(2), 113. doi: 10.35799/jm.3.2.2014.5862.
- Barthet, M. M. (2006). Expression and function of the chloroplast-encoded gene matk (Disertasi doctoral). Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, US.
- Borah, P. (2011). Primer designing for pcr. *Science Vision*, 11(3), 134-136.
- CBOL. (2009). A DNA barcode for land plants: Supporting information. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12794-12797.
- Cheng, Y., Nicolson, R. G., Tripp, K., & Chaw, S. M. (2000). Phylogeny of *Taxaceae* and *Cephalotaxaceae* genera inferred from chloroplast matk gene and nuclear rdna its region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(3), 353-65. doi: 10.1006/mpev.1999.0710. PMID: 10712841.
- Duangjai, S., Wallnofer, B., Samuel, R., Munzinger, J., & Chase, M. W. (2006). Generic delimitation and relationships in *Ebenaceae sensu lato*; evidence from six plastid dna regions. *American Journal of Botany*, 93(12), 1808-1827.
- Fakih, T. M., Wijaya, S., & Priani, S. E. (2021). Desain primer gen 12s srna dari dna mitrokondria babi (sus scrofa) secara in silico sebagai kandidat primer dalam analisis molekuler kehalalan produk. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 8(3), 316. doi: 10.25077/jsfk.8.3.316-322.2021.
- Guo, Y. Y., Luo, Y. B., Liu, Z. J., & Wang, X. Q. (2012). Evolution and biogeography of the slipper orchids: Eocene vicariance of the conduplicate genera in the old and new world tropics. *PLoS One*, 7(6), e38788. doi: 10.1371/journal.pone.0038788. Epub 2012 Jun 7. PMID: 22685605; PMCID: PMC3369861.
- Gusmiaty, ., Restu, M., & Pongtuluran, I. (2012). SELEKSI PRIMER UNTUK ANALISIS KERAGAMAN GENETIK JENIS BITTI (*Vitex coffassus*). *Perennial*, 8(1), 25. <https://doi.org/10.24259/perennial.v8i1.211>
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (pcr). *Unitas*, 9(1), 17-29.
- Heckenhauer, J., Salim, K. A., Chase, M. W., Dexterr, K. G., Pennington, R. T., Tan, S., ... Samuel, R. (2017). Plant dna barcodes and assessment of phylogenetic community structure of a tropical mixed dipterocarp forest in Brunei Darussalam (Borneo). *Plos one*, 1-24.
- Hidayat, T., Pancoro, A., & Kusumawaty, D. (2011). Utility of matk gene to assess evolutionary relationship of genus *Mangifera (Anacardiaceae)* in Indonesia and Thailand. *BIOTROPIA*, 18(2), 74-80.
- Johnson, A. D. (2010). An extended iupac nomenclature code for polymorphic nucleic acids. *Bioinformatics*, 26(10), 1386-1389. doi: 10.1093/bioinformatics/btq098.
- Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A. H. (2011). Java web tools for pcr, in silico pcr, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, 98(2), 137-144. doi: 10.1016/j.ygeno.2011.04.009.
- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., & Ivanov, K. I. (2017). FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*, 109(3-4), 312-319. doi: 10.1016/j.ygeno.2017.05.005.
- Kolondam, B. J., Lengkong, E., Polii-Mandang, J., Pinaria, A., Runtunuwu, S., Biologi, J., ... Program, S. A. (2012). Barcode DNA berdasarkan gen rbcl dan matk anggrek payus limondok (*Phaius tancarvilleae*) (dna barcode of payus limondok orchid (*Phaius tancarvilleae*) based on the rbcl and matk genes). Retrieved from www.boldsystems.org.

- Kocyan, A., Qiu, Y. L., Endress, P. K., & Conti, E. (2004). A phylogenetic analysis of *Apostasioideae* (*Orchidaceae*) based on its trnL-f and matk sequences'. *Plant Systematics and Evolution*, 247, 203-213.
- Kress, W. J. (2017). Plant dna barcodes: Applications today and in the future. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4), 291-307. doi: 10.1111/jse.12254.
- Kress, W. J., Prince, L. M., & Williams, K. J. (2002). The phylogeny and a new classification of the ginger (Zingiberaceae): Evidence from molecular data. *American Journal of Botany*, 89, 1682-1696.
- Kusmana, C., & Hikmat, A. (2015). The biodiversity of flora in Indonesia. *Journal of Natural Resources and Environmental Management*, 5(2), 187-198. doi: 10.19081/jpsl.5.2.187.
- Liljas, L. (2013). Consensus sequences. In S. Maloy, & K. Hughes (Eds.). *Brenner's encyclopedia of genetics: Second edition vol. 2* (pp. 163). Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00325-9.
- Lucas, C., Thangaradjou, T., & Papenbrock, J. (2012). Development of a DNA barcoding system for seagrasses: Successful but not simple. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029987>
- Mast, A. R., Willis, C. L., Jones, E. H., Downs, K. M., & Weston, P. H. (2008). A smaller macadamia from a more vagile tribe: Inference of phylogenetic relationships, divergence times, and diaspore evolution in macadamia and relatives (tribe *Macadamieae*; *Proteaceae*). *American Journal of Botany*, 95(7), 843-70. doi: 10.3732/ajb.0700006. PMID: 21632410.
- Meimberg, H., Wistuba, A., Dittrich, P., & Heubl, G. (2008). Molecular phylogeny of *Nepenthaceae* based on cladistic analysis of plastid trnK intron sequence data. *Plant Biology*, 3(2), 164-175. doi: 10.1055/s-2001-12897.
- Nurkamila, U. S., & Pharmawati, M. (2014). Ekstraksi dna dari herbarium anggrek. *Simbiosis: Journal of Biological Sciences*, 2(1).
- Nuryady, M. M., Husamah, H., Miharja, F. J., Hindun, I., & Patmawati, P. (2020). Desain dan Optimasi Primer Gen Pengkode MRPA Trypanosoma evansi dan Penerapan pada Pembelajaran Biologi Molekuler. *Jurnal Penelitian Dan Pengkajian Ilmu Pendidikan: E-Saintika*, 4(2), 223-233. <https://doi.org/10.36312/e-saintika.v4i2.217>.
- Pradnyaniti, D., Wirajana, I., & Yowani, S. C. (2010). Desain primer secara in silico untuk amplifikasi fragmen gen rpoB *Mycobacterium tuberculosis*. *Jurnal Farmasi Udayana*, 124-130.
- Rahayu, D. A., & Jannah, M. (2019). *Dna barcode hewan dan tumbuhan Indonesia*. Jakarta: Yayasan Inspirasi Ide Berdaya.
- Shabrina, H., Siregar, U. J., Matra, D. D., & Siregar, I. (2020). Konfirmasi jenis dan keragaman genetik sengon resisten dan rentan infeksi karat tumor menggunakan penanda dna kloroplas. *Jurnal Penelitian Hutan Tanaman*, 17(2), 117-130.
- Sulistiani, E. S., Hesti, H. S., & Rony, I. (2020). Inventarisasi dan persebaran tumbuhan langka di Kebun Raya Purwodadi. *Prosiding Seminar Nasional Biologi FMIPA UNM Inovasi Penelitian Biologi dan Pembelajarannya di Era Merdeka Belajar*, 7(1), 186-195.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The clustal x windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882. doi: 10.1093/nar/25.24.4876.
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), 110-117. doi: 10.1016/j.tree.2008.09.011.
- Widyatmoko, D. (2019). *Strategi dan inovasi konservasi tumbuhan Indonesia untuk pemanfaatan secara berkelanjutan*. Paper presented at the Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Saintek (SNPBS) Ke-IV 2019, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Indonesia. Retrieved from <https://publikasiilmiah.ums.ac.id/handle/11617/11287>.
- Williams, K. J., Kress, W. J., & Manos, P. S. (2004). The phylogeny, evolution, and classification of the genus *Globba* and tribe *Globbeae* (*Zingiberaceae*): Appendages do matter. *American Journal of Botany*, 91(1), 100-114. doi: 10.3732/ajb.91.1.100.

- Witarto, A. B., & Sajidan. (2010). Bioinformatika: Trend dan prospek dalam pengembangan keilmuan biologi. *Prosiding Seminar Biologi*, 7(1), 15-16.
- Wu, C. S., Wang, Y. N., Hsu, C. Y., Lin, C. P., Chaw, S. M. (2011). Loss of different inverted repeat copies from the chloroplast genomes of *Pinaceae* and Cupressophytes and influence of heterotachy on the evaluation of gymnosperm phylogeny. *Genome Biology and Evolution*, 3, 1284-95. doi: 10.1093/gbe/evr095. Epub 2011 Sep 19. PMID: 21933779; PMCID: PMC3219958.
- Xu, S., Li, D., Li, J., Xiang, X., Jin, W., Huang, W., & Huang, L. (2015). Evaluation of the dna barcodes in dendrobium (*Orchidaceae*) from Mainland Asia. *PLoS ONE*, 10(1). doi: 10.1371/journal.pone.0115168.
- Yustinadewi, P. D., Yustiantara, P. S., & Narayani, I. (2018). Mdr-1 gene 1199 variant primer design techniques in pediatric patient buffy coat samples with Ila. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 5(1), 105. doi: 10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16.