

Optimasi Suhu *Annealing* untuk Amplifikasi DNA Padi Hasil Persilangan Varietas Tahan Terendam dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*

Septi Lora Aulia^{1*}, Rujito Agus Suwignyo², Mery Hasmeda³
*e-mail: septiloraaulia2@gmail.com

¹Program Studi Ilmu Tanaman, Pasca Sarjana, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya,
Indonesia

^{2,3}Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya, Indonesia

ABSTRACT

This study aims to optimize the annealing temperature for DNA amplification from crosses of submerged resistant varieties by polymerase chain reaction method. The research was conducted from February until May 2021 at the Plant Physiology Laboratory of the Agronomy Study Program, Faculty of Agriculture, Sriwijaya University, Indralaya. The data obtained in this study is descriptive data by identifying the presence or absence of amplified bands from electrophoresis results. The results of this study can be concluded that all primers can amplify all DNA bands with good quality. There is an effect of annealing temperature on the PCR program on the success of rice DNA amplification. The optimal annealing temperature for 15 SSR primers for rice DNA amplification were Rm 8300 : 55 °C, Rm Sub1c173 : 55 °C, Rm 234 : 54,8 °C, Rm 3459 : 56,8°C, Rm 219: 59,5 °C, Rm 589 : 54,8 °C, Rm 258 : 56,8 °C, Rm 3701 : 55,2°C, Rm 1261: 55,2 °C, Rm 164 : 55,2 °C, Rm 443: 54,4 °C, Rm 266 : 57,8 °C, Rm 248 : 53,5 °C, Rm 282 : 55,7 °C, Rm 241:°C: 53,9 °C.

Keyword : annealing, amplification, rice, PCR

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi suhu *annealing* untuk amplifikasi dna padi hasil persilangan varietas tahan terendam dengan metode *polymerase chain reaction*. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-Mei 2021 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya Indralaya. Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data deskriptif dengan cara mengidentifikasi ada atau tidak adanya band yang teramplifikasi dari hasil elektroforesis. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa semua primer dapat mengamplifikasi semua pita DNA dengan kualitas baik. Ada pengaruh suhu *annealing* pada program PCR terhadap keberhasilan amplifikasi DNA padi. Suhu *annealing* yang optimal untuk 15 primer SSR pada amplifikasi DNA padi yaitu Rm 8300 : 55 °C, Rm Sub1c173 : 55 °C, Rm 234 : 54,8 °C, Rm 3459 : 56,8°C, Rm 219: 59,5 °C, Rm 589 : 54,8 °C, Rm 258 : 56,8 °C, Rm 3701 : 55,2°C, Rm 1261: 55,2 °C, Rm 164 : 55,2 °C, Rm 443: 54,4 °C, Rm 266 : 57,8 °C, Rm 248 : 53,5 °C, Rm 282 : 55,7 °C, Rm 241:°C: 53,9 °C.

Kata kunci : *annealing*, amplifikasi, padi, PCR

PENDAHULUAN

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk tetap meningkatkan produksi padi yaitu dengan cara memanfaatkan lahan rawa. Lahan rawa merupakan lahan sub optimal yang sangat potensial dimanfaatkan untuk berbagai kegiatan pertanian. Indonesia memiliki 33,43 juta ha lahan rawa dan 13,29 juta ha diantaranya merupakan lahan rawa lebak dari total tersebut hanya 9,53 juta ha yang sesuai untuk kegiatan budidaya pertanian, dan baru sekitar 23,8 % yang sudah dimanfaatkan. (Haryono, 2012)

Lahan rawa lebak merupakan salah satu alternatif lahan suboptimal yang dapat dimanfaatkan sebagai penyangga ketahanan pangan nasional. Namun demikian, dibandingkan dengan lahan rawa pasang surut, pengelolaan lahan rawa lebak masih relatif tertinggal karena pola usaha tani yang dilakukan masih sangat tergantung pada kondisi alam (Irmawati *et al.*, 2015). Lahan rawa lebak yang spesifik dengan karakternya yang marjinal memerlukan penanganan yang khusus dan berbeda dengan jenis lahan lainnya (Suwignyo, 2016). Kendala utama pengembangan usaha tani pada lahan rawa lebak adalah genangan pada musim hujan dan kekeringan pada musim kemarau yang belum dapat diprediksi (Djafar, 2013).

Kendala yang sering dihadapi petani dalam budidaya padi di lahan rawa lebak adalah sulitnya memprediksi tingginya genangan air, sehingga petani kerap kali menghadapi kondisi dimana tanaman padi akan mengalami kondisi cekaman terendam pada fase vegetatif (Sulaiman *et al.*, 2014). Cekaman terendam akan menyebabkan terganggunya pertumbuhan serta produksi tanaman padi (Suwignyo *et al.*, 2012). Salah satu solusi yang dapat diterapkan untuk mengatasi masalah tersebut adalah menggunakan varietas

padi yang adaptif di lahan rawa lebak (Dirgasari *et al.*, 2019).

Peningkatan produktivitas padi dengan menggunakan varietas padi yang adaptif di lahan rawa lebak dapat dilakukan melalui pendekatan molekuler. Upaya peningkatan produktivitas padi dapat dilakukan melalui pemuliaan varietas khususnya peningkatan adaptasi-adaptasi terhadap kondisi lingkungan lahan rawa lebak. Penggunaan varietas padi yang toleran rendaman merupakan pilihan yang strategis dalam mengatasi permasalahan yang ditimbulkan oleh banjir pada daerah lahan rawa lebak.

Beberapa teknik molekuler yang dapat digunakan untuk mengetahui genotip suatu individu salah satunya adalah dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Analisis genetik dengan menggunakan metode PCR yang memanfaatkan cara replikasi DNA dengan bantuan primer yang mengapit daerah tertentu dan optimasi suhu dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal, sehingga dihasilkan produk PCR spesifik yaitu terbentuk pita DNA tebal. Untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal secara umum dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut. Muladno (2010) mengemukakan bahwa PCR merupakan reaksi yang menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu, dengan cara mensintesis molekul DNA yang baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut.

Untuk mendapatkan pita PCR yang tebal maka perlu dilakukan optimasi suhu annealing pada primer yang akan digunakan T_m akan menjadi dasar dalam menentukan suhu annealing (T_a). T_a

yang terlalu tinggi akan menyebabkan terlepasnya primer yang sudah menempel pada DNA cetakan sehingga produk PCR tidak akan terbentuk, sebaliknya Ta yang terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya penempelan primer yang tidak spesifik pada DNA cetakan. Besarnya suhu annealing dapat ditentukan berdasarkan nilai T_m dari primer yang akan digunakan (Asy'ari et al. 2005). Proses *annealing* merupakan proses yang sangat penting untuk mencari suhu optimum sehingga bisa diperoleh DNA hasil dalam jumlah yang maksimum pada daerah yang ditargetkan sehingga cukup memudahkan bagi analisis DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi suhu *annealing* untuk amplifikasi dna padi hasil persilangan varietas tahan terendam dengan metode *polymerase chain reaction*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-Mei 2021 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya Indralaya. Bahan Penelitian Bahan tanam yang digunakan dalam penelitian ini adalah aksesori BC₁F₁, Inpago 5 dan Inpara 8. Total primer yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 15 primer SSR yang letaknya tersebar pada 12 kromosom yang terdiri dari 2 primer untuk seleksi foreground dan sisanya 13 primer digunakan untuk seleksi *background*. Sekuen untuk primer yang digunakan pada seleksi *foreground* ditampilkan pada Tabel 1 dan sekuen 13 primer *background* ditampilkan pada Tabel 2.

1. Isolasi DNA

Sampel daun tanaman padi berusia 14 HST diambil daunnya untuk

isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan menggunakan KIT isolasi *Wizard Genomic Purification System* Promega. Dipilih daun padi yang muda, bersih, dan tidak rusak. Sampel daun disimpan di dalam *freezer* selama 1 minggu untuk mempermudah penggerusan. Daun yang telah dibekukan diambil sebanyak 0,1 g untuk kemudian digerus sampai halus dan ditambahkan *Nuclei Lysis Solution* sebanyak 600 μ L. Larutan sampel yang terbentuk kemudian dihomogenkan menggunakan alat *vortex* selama 1 sampai 3 detik. Setelah homogen diinkubasi di *waterbath* pada temperatur 65°C selama 15 menit. Larutan sampel selanjutnya ditambahkan 200 μ L *Protein Precipitation Soution*, lalu dihomogenkan menggunakan alat *vortex* selama 20 detik.

Larutan sampel yang terbentuk kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 3 menit. *Supernatant* yang terbentuk selanjutnya dipindahkan ke *microtube* baru dan ditambahkan isopropanol 0,6 volume. Selanjutnya larutan sampel di-*mix* sampai terlihat DNA yang masih berupa benang putih. Larutan sampel yang terbentuk selanjutnya disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya *supernatant* yang terbentuk dibuang untuk kemudian endapan sampel yang tersisa ditambahkan 600 μ L etanol 70%. Larutan sampel selanjutnya disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 1 menit. *Supernatant* yang terbentuk dibuang dan endapan yang tersisa (pelet DNA) dikeringkan selama \pm 15 menit pada suhu ruangan. Endapan yang merupakan sampel DNA kemudian ditambahkan 100 μ L DNA *Rehydration Solution* untuk selanjutnya disimpan pada suhu 2°- 8°C. Hasil isolasi DNA yang diperoleh kemudian dievaluasi kualitas dan kuantitasnya.

2. Analisis Penanda Molekuler PCR

Analisis Penanda Molekuler PCR

Pengamatan molekuler dilakukan dengan tahap persiapan template DNA, amplifikasi DNA, elektroforesis gel, kuantifikasi hasil elektroforesis gel, dan analisis data. Sebelum digunakan dalam proses PCR primer (Tabel 2.) diencerkan menggunakan aquabides steril. Volume yang ditambahkan ke masing-masing tabung utama dihitung dengan berat molekul utama yang tercantum pada setiap tabung. Reaksi PCR dilakukan pada volume total 12 µL untuk setiap mikrotube. Setiap reaksi PCR terdiri dari 6,25 µL MyTag DNA polymerase red mastermix, 0,5 µL primer Forward dan Reverse, 0,5 µL DNA template, dan 4,75 µL aquabides (ddH₂O).

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat PCR (Bio-rad). Pra denaturasi dilakukan pada 94 °C selama 5 menit, diikuti oleh 35 siklus dengan suhu dan waktu setiap siklus denaturasi pada 94 °C selama 1 menit. (Iftekharruddaula *et, al* 2015) Annealing telah dilakukan dengan menggunakan gradien annealing pada 53°C, 53.2 °C, 53.5°C, 53.9 °C, 54.3 °C, 54.8 °C, 55.2 °C, 55.7 °C, 57 °C,

56.1°C, 56.5 °C, 56.8 °C, dan 60°C yang naik secara bertahap, masing-masing 11 siklus selama 1 menit, dan elongasi pada 72 °C selama 2 menit. Siklus terakhir diikuti oleh pasca elongasi pada 72 °C selama 5 menit. Hasil PCR diamati menggunakan perangkat elektroforesis dan disimpan pada -30 °C.

3. Deteksi Produk PCR

Lempeng Produk PCR dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa 1 % b/v (0,3 g agarosa dalam 30 mL buffer TAE 1 kali). Larutan agarosa yang sudah dipanaskan diberikan larutan 1 µl pewarna dna *gel red* lalu dituangkan ke dalam cetakan agar elektroforesis dan dibiarkan mengeras. Setelah mengeras, gel agarosa dipasang dalam chamber elektroforesis dan sisir pada gel dicabut, larutan TAE dituang sampai melebihi permukaan gel. Selanjutnya, 0,5 ladder + 1,5 µL *loading dye*, 1 µL sampel hasil PCR + 3 µL *loading dye* dimasukkan ke dalam sumur yang terbentuk dari sisir. Kemudian dielektroforesis pada tegangan 75 volt selama 35 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi pada UV transilluminator.

Tabel 1. Marka molekuler yang digunakan dalam *Foreground Selection* (Iftekharruddaula *et, al* 2015)

| No | Marker | Nucleotide | Chromosom |
|----|------------|---|-----------|
| 1 | RM8300 F | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>GCT AGT GCA GGG TTG ACA CA</i> | 9 |
| | RM8300 R | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>CTC TGG CCG TTT CAT GGT AT</i> | |
| 2 | Sub1c173 F | 19-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>AAC GCC AAG ACC AAC TTC C</i> | 9 |
| | Sub1c173 R | 19-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>AGG AGG CTG TCC ATC AGG T</i> | |

Tabel 2. Marka molekuler yang digunakan dalam *Background Selection* (Susanto *et al*,2014)

| No | Marker | Nucleotide | Chromosom |
|----|----------|--|-----------|
| 1 | RM234 F | 19-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>ACA GTA TCC AAG GCC CTG G</i> | 7 |
| | RM234 R | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>CAC GTG AGA CAA AGA CGG AG</i> | |
| 2 | RM3459 F | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>ATG GAC TTT CGA GAA TGT TG</i> | 8 |
| | RM3459 R | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>GAG TAC GAA ATG AAG GCA AG</i> | |
| 3 | RM219 F | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>CGT CGG ATG ATG TAA AGC CT</i> | 9 |
| | RM219 R | 18-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>CAT ATC GGC ATT CGC CTG</i> | |
| 4 | RM589 F | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>ATC ATG GTC GGT GGC TTA AC</i> | 6 |
| | RM589 R | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>CAG GTT CCA ACC AGA CAC TG</i> | |
| 5 | RM258 F | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>TGC TGT ATG TAG CTC GCA CC</i> | 10 |
| | RM258 R | 19-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>TGG CCT TTA AAG CTG TCG C</i> | |
| 6 | RM3701 F | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>GAG CTA GAG GGA GGA GGT GC</i> | 11 |
| | RM3701 R | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>TTG ACT GAT AGC CGA TTG GG</i> | |
| 7 | RM1261 F | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>GTC CAT GCC CAA GAC ACA AC</i> | 12 |
| | RM1261 R | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>GTT ACA TCA TGG GTG ACC CC</i> | |
| 8 | RM164 F | 24-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>TCT TGC CCG TCA CTG CAG ATA TCC</i> | 5 |
| | RM164 R | 24-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) <i>GCA GCC CTA ATG CTA CAA TTC TTC</i> | |
| 9 | RM443 F | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) | 1 |

| | | | |
|----|---------|--|---|
| | | <i>GAT GGT TTT CAT CGG CTA CG</i> | |
| | RM443 R | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) | |
| | | <i>AGT CCC AGA ATG TCG TTT CG</i> | |
| | RM266 F | 19-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) | 2 |
| 10 | | <i>TAG TTT AAC CAA GAC TCT C</i> | |
| | RM266 R | 19-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) | |
| | | <i>GGT TGA ACC CAA ATC TGC A</i> | |
| | RM248 F | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) | 7 |
| 11 | | <i>TCC TTG TGA AAT CTG GTC CC</i> | |
| | RM248 R | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) | |
| | | <i>GTA GCC TAG CAT GGT GCA TG</i> | |
| | RM282 F | 19-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) | 3 |
| 12 | | <i>CTG TGT CGA AAG GCT GCA C</i> | |
| | RM282 R | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) | |
| | | <i>CAG TCC TGT GTT GCA GCA AG</i> | |
| | RM241 F | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) | 4 |
| 13 | | <i>GAG CCA AAT AAG ATC GCT GA</i> | |
| | RM241 R | 20-mer oligo (25 nmole scale, PCR Grade, 3 OD) | |
| | | <i>TGC AAG CAG CAG ATT TAG TG</i> | |

Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data deskriptif dengan cara mengidentifikasi ada atau tidak adanya band yang teramplifikasi dari hasil elektroforesis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

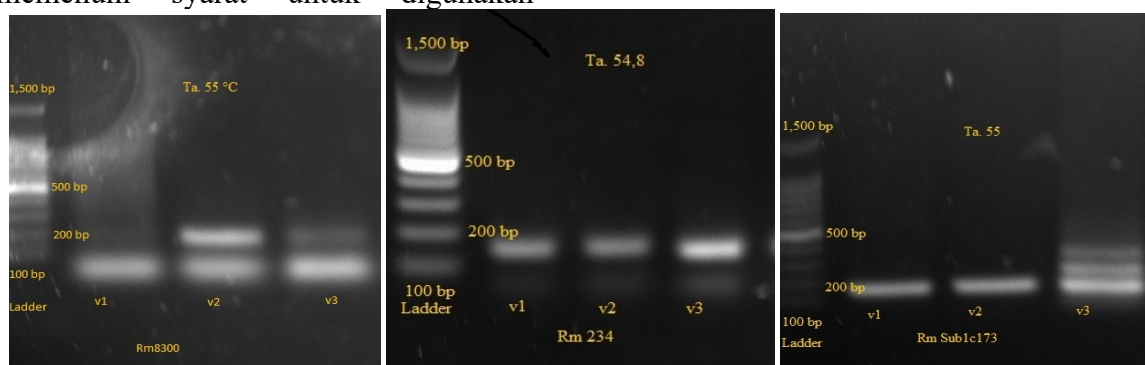
Berdasarkan hasil amplifikasi PCR menunjukkan pita-pita DNA yang jelas dan terang serta tidak ada *smear* yang signifikan mempengaruhi visualisasi pita DNA. Sehingga identifikasi pita DNA dilakukan. *Smear* terjadi karena RNA dan protein ataupun kontaminan lainnya yang kemudian terbawa dalam proses elektroforesis. Hasil analisis PCR juga dipengaruhi oleh penggunaan KIT isolasi DNA serta penggunaan larutan purifikasi DNA. Penggunaan KIT

untuk isolasi DNA sangat mempengaruhi kemurnian DNA (Simarmata & Rustikawati, 2015). Primer memiliki tingkat spesifitas terhadap DNA target. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan *mispriming* atau bahkan tidak dapat mengamplifikasi DNA. Menurut Hairmansis & Aswidinnoor (2005), bahwa dasar dari keberhasilan proses PCR terletak pada kesesuaian primer dan efisiensi serta optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dalam proses PCR dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sebagai sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi.

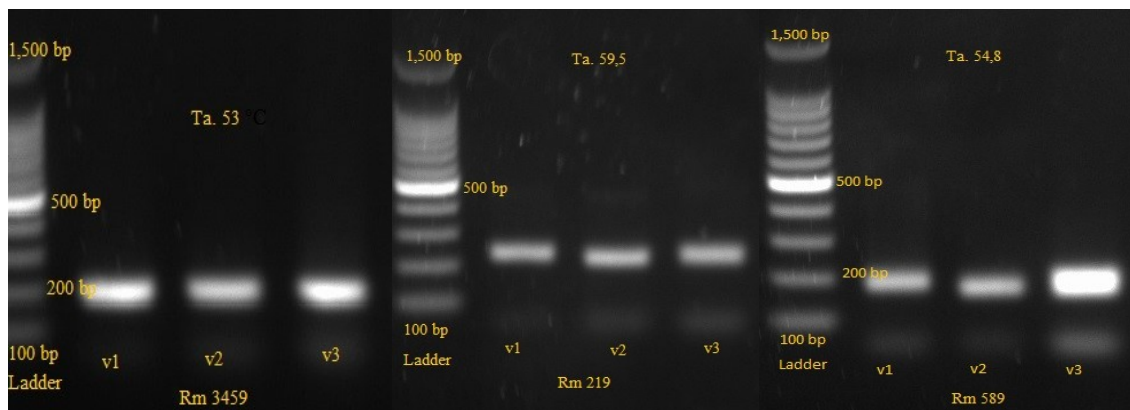
Tahap *annealing* pada penelitian ini memerlukan suhu yang spesifik dan optimum. Untuk mendapatkan suhu annealing yang

spesifik dan optimum maka dilakukanlah optimalisasi dengan cara menggunakan gradien suhu yang terdapat di mesin PCR. Cara kerja gradien suhu yaitu dengan cara mencari suhu spesifik dan optimum pada kisaran suhu tertentu (suhu terendah dan suhu tertinggi) dimana primer dapat mengamplifikasi DNA target. Suhu annealing yang tidak spesifik dan optimum dapat menyebabkan terjadinya mispriming yaitu primer mengamplifikasi daerah yang bukan menjadi target atau bahkan tidak teramplifikasi DNA target. Berdasarkan penelitian Langga *et al.* (2012), didapatkan bahwa proses pelekatan primer pada DNA target sangat dipengaruhi oleh pengaturan suhu pada fase annealing. Perubahan suhu satu derajat akan menyebabkan primer gagal melekat pada DNA target. Menurut Uslan & Pharmawati, (2015), suhu annealing merupakan kisaran suhu yang membuat pasangan primer menempel dengan komplemenya pada DNA target saat proses PCR. Suhu annealing sangat menentukan keberhasilan amplifikasi. Hal ini disebabkan karena proses pemanjangan DNA dimulai dari primer. Suhu yang umum digunakan pada saat annealing yaitu 50-60°C. Metode isolasi DNA Wizard Genome DNA Purification (KIT Promega) telah memenuhi syarat untuk digunakan

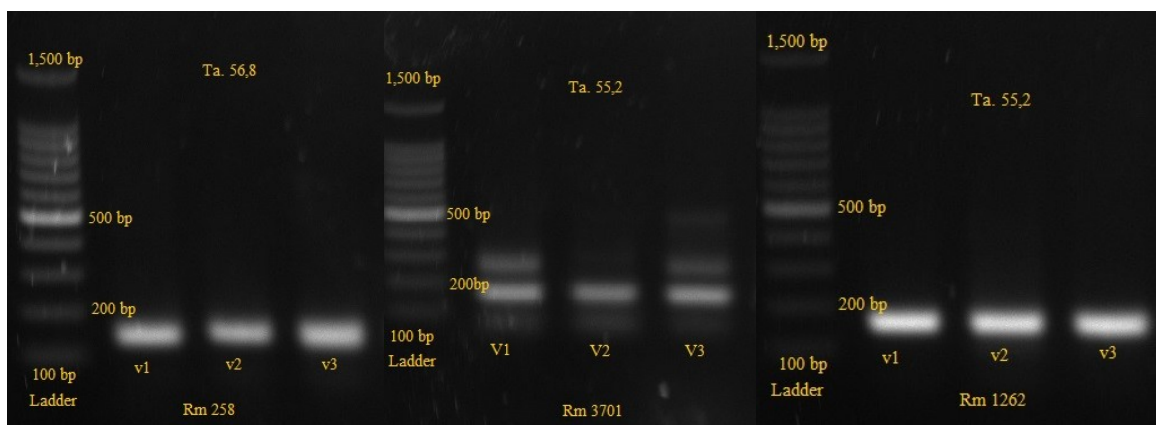
pada penelitian molekuler. Hasil amplifikasi PCR menggunakan 15 primer dengan berbagai suhu annealing yang berbeda. Annealing telah dilakukan dengan menggunakan gradien annealing pada 53°C, 53.2 °C, 53.5°C, 53.9 °C, 54.3 °C, 54.8 °C, 55.2 °C, 55.7 °C, 57 °C, 56.1°C, 56.5 °C, 56.8 °C, dan 60°C yang naik secara bertahap, masing-masing 11 siklus selama 1 menit, dan elongasi pada 72 °C selama 2 menit. Siklus terakhir diikuti oleh pasca elongasi pada 72 °C selama 5 menit telah didapat suhu annealing yang optimum untuk amplifikasi DNA padi hasil persilangan padi varietas tahan rendam (tabel 3). Suhu annealing yang optimal untuk 15 primer pada amplifikasi DNA padi yaitu Rm 8300 : 55 °C, Rm Sub1c173 : 55 °C, Rm 234 : 54.8 °C, Rm 3459 : 56,8°C, Rm 219: 59,5 °C, Rm 589 : 54,8 °C, Rm 258 : 56,8 °C, Rm 3701 : 55,2°C, Rm 1261: 55,2 °C, Rm 164 : 55,2 °C, Rm 443: 54,4 °C, Rm 266 : 57,8 °C, Rm 248 : 53,5 °C, Rm 282 : 55,7 °C, Rm 241:°C: 53,9 °C Hasil dari setiap elektroforesis dengan suhu annealing optimum ditunjukkan pada gambar (1-5). Pada visualisasi pita hasil elektroforesis disetiap primer yang diuji ada semua band dna sehingga dapat dilanjutkan ke analisis molekuler selanjutnya yaitu *foreground* dan *background* selection DNA padi dengan suhu annealing optimum yang didaapat dari hasil optimasi.



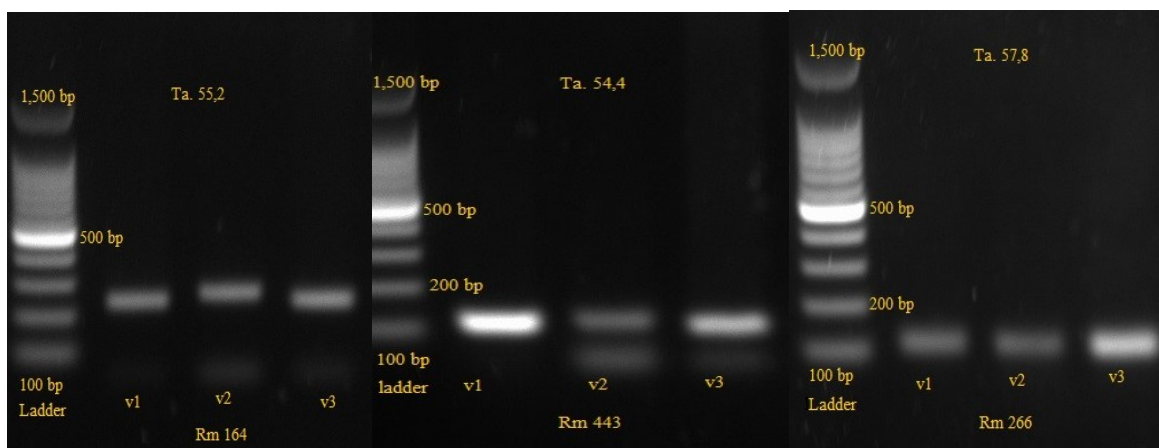
Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA pada primer Rm 8300, Rm Sub1c173, dan Rm 234 (Keterangan : Ta = Suhu Annealing, v1 = BC₁F₁, v2=Inpago 5, dan v3 = Inpara 8)



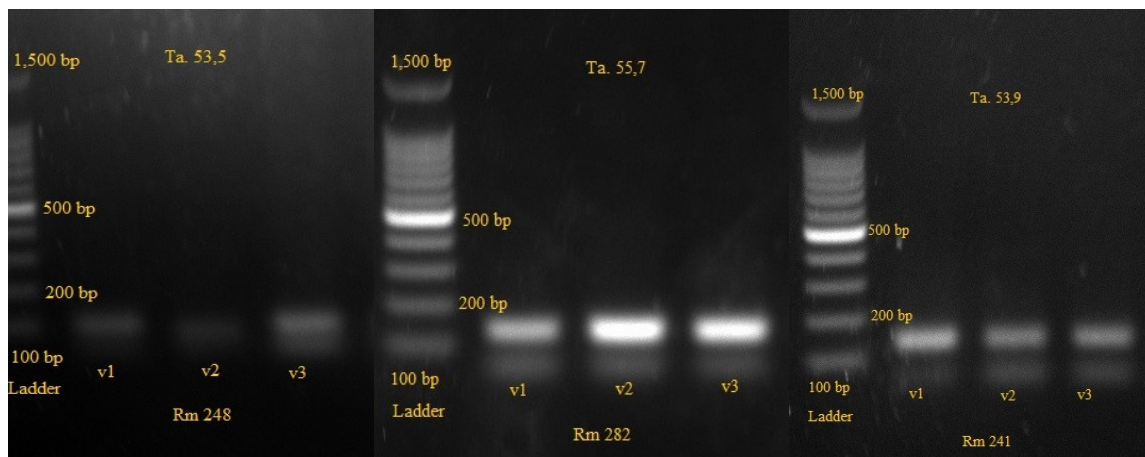
Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA pada primer Rm 3459, Rm 219, dan Rm 589
(Keterangan : Ta = Suhu Annealing, v1 = BC₁F₁, v2=Inpago 5, dan v3 = Inpara 8)



Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA pada primer Rm 258, Rm 3701, dan Rm 1261
(Keterangan : Ta = Suhu Annealing, v1 = BC₁F₁, v2=Inpago 5, dan v3 = Inpara 8)



Gambar 4. Hasil amplifikasi DNA pada primer Rm 164, Rm 443, dan Rm 266
(Keterangan : Ta = Suhu Annealing, v1 = BC₁F₁, v2=Inpago 5, dan v3 = Inpara 8)



Gambar 5. Hasil amplifikasi DNA pada primer Rm 248, Rm 282, dan Rm 241
(Keterangan : Ta = Suhu Annealing, v1 = BC₁F₁, v2=Inpago 5, dan v3 = Inpara 8)

Tabel 3. Suhu *annealing* yang optimal untuk 15 primer SSR

| No | Primer | Suhu <i>Annealing</i> yang optimal (°C) |
|----|----------|---|
| 1 | RM8300 | 55 |
| 2 | Sub1c173 | 55 |
| 3 | RM234 | 54,8 |
| 4 | RM3459 | 53 |
| 5 | RM219 | 59,5 |
| 6 | RM589 | 54,8 |
| 7 | RM258 | 56,8 |
| 8 | RM3701 | 55,2 |
| 9 | RM1261 | 55,2 |
| 10 | RM164 | 55,2 |
| 11 | RM443 | 54,4 |
| 12 | RM266 | 57,8 |
| 13 | RM248 | 53,5 |
| 14 | RM282 | 55,7 |
| 15 | RM241 | 53,9 |

Pada sumur 1 (*Ladder*) dan sumur 2 (sampel dari BC₁F₁) sumur 2 (sampel dari Inpago 5), sumur 3 (sampel dari Inpara 8) terlihat pita DNA yang terbentuk dan mengumpul (tidak menyebar). Tingkat ketebalan pita DNA ditentukan dari kemurnian atau proses ekstraksi yang kurang tepat pada sampel yang diamati, sehingga menyebabkan sampel tersebut tidak memiliki kualitas yang

bagus. Ketebalan pita DNA padi yang paling bagus terdapat pada sampel 1, 2, dan 3 pada optimasi primer Rm 589. Menurut Irmawati (2003) mengatakan bahwa pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang

terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang dapat terjadi dalam proses pemipetan, pada saat dibolak-balik dalam *ependorf*, disentrifus, atau bahkan karena temperatur yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu. Variasi genetik berdasarkan pola pita DNA hasil amplifikasi ini dapat dijadikan dasar dalam proses penyusunan pemuliaan tanaman atau perakitan varietas unggul. Variasi genetik merupakan informasi dasar dalam menyusun strategi konservasi pemuliaan, pengelolaan, dan pemanfaatan sumber daya genetik secara berkelanjutan

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Semua primer dapat mengamplifikasi semua pita DNA dengan kualitas baik. Ada pengaruh suhu *annealing* pada program PCR terhadap keberhasilan amplifikasi DNA padi. Suhu *annealing* yang optimal untuk 15 primer pada amplifikasi DNA padi yaitu Rm 8300 : 55 °C, Rm Sub1c173 : 55 °C, Rm 234 : 54.8 °C, Rm 3459 : 56,8°C, Rm 219: 59,5 °C, Rm 589 : 54,8 °C, Rm 258 : 56,8 °C, Rm 3701 : 55,2°C, Rm 1261: 55,2 °C, Rm 164 : 55,2 °C, Rm 443: 54,4 °C, Rm 266 : 57,8 °C, Rm 248 : 53,5 °C, Rm 282 : 55,7 °C, Rm 241:°C: 53,9 °C. suhu *annealing* optimal yang didapat akan digunakan pada analisis MABc (*Marker Assisted Backcrossing*) dengan analisis *foreground* dan *background* selection pada DNA padi hasil Persilangan varietas tahan terendam

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterimah kasih atas pendanaan yang diberikan oleh rektor Universitas Sriwijaya yang membiayai penelitian ini dibawah skema Penelitian Unggulan Profesi dengan menggunakan dana hibah Universitas Sriwijaya SP DIPA023.17.2.677515/2020, Keputusan Rektor No 0687/UN9/SK.BUK.KP/2.

DAFTAR PUSTAKA

- Asy'ari M, Noer AS. (2005). Optimasi konsentrasi MgCl₂ dan suhu annealing pada proses amplifikasi multifragmens mtDNA dengan metode PCR. JKSA VIII(1):24-28.
- Dirgasari, K. D. E., M. Hasmeda., dan U. Harun. (2019). Pengujian Berbagai Varietas Padi (*Oryza Sativa* L.) terhadap Kondisi Cekaman Fe²⁺ di Lahan Pasang Surut. *Agrosainstek: Jurnal Ilmu dan Teknologi Pertanian* 3(1): 30–35.
- Djafar, Z.R. (2013). Kegiatan agronomis untuk meningkatkan potensilahan lebak menjadi sumber pangan. *Jurnal Lahan Suboptimal* 2(1): 58–67
- Haryono. (2012). Lahan Rawa Lumbung Pangan Masa Depan Indonesia. IAARD Press. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Jakarta.
- Iftekharuddaula, Khandakar Md, Ahmed, H. U., Ghosal, S., Moni, Z. R., Amin, A., & Ali, M. S. (2015). Development of New Submergence Tolerant Rice Variety for Bangladesh Using Marker-Assisted Backcrossing. *Rice Science*, 22(1), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2015.05.003>
- Irmawati. (2003). Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok Hatchery. *Thesis*. Bogor: IPB

- Irmawati, H. Ehara, Rujito A. Suwignyo, and Jun-Ichi Sakagami. (2015). Swamp rice cultivation in South Sumatera, Indonesia: an Overview. *Trop. Agr. Develop.* 59(1):35-39.
- Muladno. (2010). *Teknologi Rekayasa Genetik Edisi Kedua*. Bogor : IPB Press.
- Sulaiman, F., R. A. Suwignyo., dan M. Hasmeda. (2014). Studi Peningkatan Ketahanan Bibit Padi Lebak terhadap Kondisi Cekaman Terendam melalui Perlakuan Zn dan Pemupukan N. *Jurnal Lahan Suboptimal.* 3(2): 145–51.
- Susanto, Untung., Satoto, Nofi A Rohmah, dan Made Jana Mejaya. (2014). *Similarity of 26 New Released Rice Varieties and Rice Parental Hybrids Based on 36 SSR Markers* .Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan 33(2):71-75
- Suwignyo, R. A., A.Wijaya., dan H. Sihombing. (2012). Modifikasi Aplikasi Unsur Hara Untuk Perbaikan Vigorasi Bibit Padi Dalam Cekaman Terendam. *Jurnal Lahan Suboptimal.* 1(1): 1–11.
- Suwignyo, R.A. (2016). *Efforts and strategy to improve productivity of suboptimal land in Indonesia*. ICCAE 5th Open Seminar in AY2016, December 13 2016. International Center for Research and Education in Agriculture (ICREA). Nagoya University, Nagoya Japan.
- Simarmata M& Rustikawati. (2015). Identifikasi Genetik Kultivar Padi Gogo dengan Menggunakan Marka RAPD. *Akta Agrosia*, 18(2):1–10.
- Hairmansis A & AswidinnoorH. (2005). Evaluasi Daya Pemulih Kesuburan Padi Lokal dari Kelompok Tropical Japonica, *Jurnal Agronomi Indonesia* 6(4):1–6.
- Langga I.F, Restu M & Kuswinanti T. (2012). Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitti (*Vitex CofassusReinw*) serta Analisis Keragaman Genetik. *J Sains & Teknologi*, 12(3):265–276.
- Uslan & PharmawatiM. (2015). Optimasi Konsentrasi DNA dan MgCl₂ pada Reaksi *Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA* untuk Analisis Keragaman Genetik Tanaman Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) (*Optimization of DNA and MgCl₂ Concentrations in Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Bioslogos*, 5(1):1639.