

**DESAIN DAN AMPLIFIKASI GEN APX DAN POD PADA TANAMAN  
BERPOTENSI FITOREMEDIASI DI AREAL TAMBANG EMAS  
MALUKU UTARA**

**CHERY PRATIWI IRWAN  
M021201031**



**PROGRAM STUDI REKAYASA KEHUTANAN  
FAKULTAS KEHUTANAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**DESAIN DAN AMPLIFIKASI GEN APX DAN POD PADA TANAMAN  
BERPOTENSI FITOREMEDIASI DI AREAL TAMBANG EMAS MALUKU  
UTARA**

CHERY PRATIWI IRWAN

M021201031

UNIVERSITAS HASANUDDIN

SKRIPSI

PROGRAM STUDI REKAYASA KEHUTANAN

pada

**PROGRAM STUDI REKAYASA KEHUTANAN**

**DEPARTEMEN KEHUTANAN**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2024**

**SKRIPSI****DESAIN DAN AMPLIFIKASI GEN APX DAN POD PADA TANAMAN  
BERPOTENSI FITOREMEDIASI DI AREAL TAMBANG EMAS MALUKU  
UTARA****CHERY PRATIWI IRWAN****M021201031**

Skripsi,

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian yang dibentuk dalam Rangka penyelesaian Sarjana S-1 Rekayasa Kehutanan Pada 07 Agustus 2024

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan pada

Program Studi Rekayasa Kehutanan  
Fakultas Kehutanan  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Menyetujui,

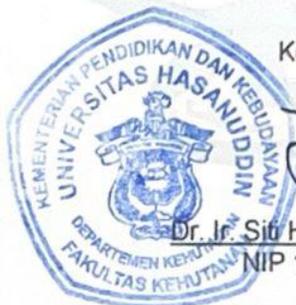
Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Dr. Ir. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P.  
NIP 198202092015042002

Ir. Mukrimin, S.Hut., M.P., Ph.D., IPU  
NIP 197802092008121001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi



Dr. Ir. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P.  
NIP 198202092015042002

## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "DESAIN DAN AMPLIFIKASI GEN APX DAN POD PADA TANAMAN BERPOTENSI FITOREMEDIASI DI AREAL TAMBANG EMAS MALUKU UTARA" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Ibu Dr. Ir. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P. sebagai pembimbing utama dan Bapak Ir. Mukrimin, S.Hut., M.P., Ph.D., IPU. sebagai pembimbing pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan peraturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 07 Agustus 2024

Yang Menyatakan



Chery Pratiwi Irwan

## ABSTRAK

Chery Pratiwi Irwan (M021201031). **DESAIN DAN AMPLIFIKASI GEN APX DAN POD PADA TANAMAN BERPOTENSI FITOREMEDIASI DI AREAL TAMBANG EMAS MALUKU UTARA** (di bawah bimbingan Siti Halimah Larekeng dan Mukrimin).

Pulau obi terletak di Maluku Utara, memiliki sejarah panjang pertambangan, baik nikel maupun tambang emas tradisional. Reklamasi lahan tambang dapat dilakukan dengan menggunakan metode fitoremediasi. Tumbuhan yang digunakan pada proses ini harus memiliki kemampuan menyerap polusi sisa tambang termasuk logam berat. Gen APX dan POD merupakan gen yang berperan terhadap mekanisme toleran terhadap logam berat pada tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi adanya gen APX dan POD pada tanaman sirih hutan, kersen, jambu biji, kloris barbata, pulai, bubulutu daun kecil, bubulutu daun besar, kayu tawa, henna, kayu same, tui-tui, gugura, ketapang, kayu kuning, kangkung, casuarina, gamal, dan paspalum yang berasal dari pulau obi. Desain primer dilakukan menggunakan primer3Plus dan menggunakan sequence gen APX dan POD yang terdeposit di NCBI. Analisis molekular yang dilakukan terdiri atas ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, dan visualisasi hasil amplifikasi DNA. Ada tujuh pasang primer yang berhasil didesain yang terdiri atas tiga pasang primer spesifik gen APX dan 4 pasang primer spesifik gen POD. Hasil analisis menunjukkan primer yang didesain untuk mendeteksi gen APX berhasil mengamplifikasi DNA sampel tanaman gamal. Sedangkan primer POD tidak berhasil mengamplifikasi sampel tanaman kangkung.

**Kata Kunci:** Desain primer, Primer APX dan POD, Pulau Obi, Tumbuhan lokal

## ABSTRACT

Chery Pratiwi Irwan (M021201031). **DESIGN AND AMPLIFICATION OF APX AND POD GENES IN PLANTS WITH PHYTOREMEDIATION POTENTIAL IN NORTH MALUKU GOLD MINING AREA** (under the guidance of Siti Halimah Larekeng and Mukrimin)

*Obi Island is located in North Maluku, has a long history of mining, both nickel and traditional gold mines. Reclamation of mining land can be done using the phytoremediation method. Plants used in this process must have the ability to absorb pollution from mining residues, including heavy metals. APX and POD genes are genes that play a role in the mechanism of tolerance to heavy metals in plants. This study aims to detect the presence of APX and POD genes in forest betel plants, kersen, guava, chloris barbata, pulai, small-leaved betel, large-leaved, tawa, henna, same, tui-tui, gugura, ketapang, yellowwood, water spinach, cassuarina, gamal, and paspalum originating from Obi Island. The primary design was carried out using primer3Plus and used the APX and POD gene sequences deposited in the NCBI. The molecular analysis carried out consists of DNA extraction, DNA amplification, and visualization of DNA amplification results. There are seven pairs of primers that have been designed consisting of three pairs of APX gene-specific primers and 4 pairs of POD gene-specific primers. The results of the analysis showed that the primer designed to detect the APX gene successfully amplified the DNA of gamal plant samples. Meanwhile, the POD primer did not succeed in amplifying water spinach plant samples.*

**Keywords:** *Primer design, APX and POD primers, Obi Island, Local plants.*

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT atas anugrah dan kasih yang melimpah sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tugas akhir skripsi yang berjudul “**Desain dan Amplifikasi Gen APX dan POD pada Tanaman Berpotensi Fitoremediasi di Areal Tambang Emas Maluku Utara**” guna memenuhi syarat dalam menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin. Melalui kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya dan secara khusus penulis mempersembahkan karya ini kepada kedua orang tua tercinta yaitu, Ayahanda **Irwan** dan Ibunda **Dinar Dahlan** yang telah mengorbankan begitu banyak hal dalam membesarkan dan mendidik dengan penuh kesabaran, cinta dan kasih, serta doa yang tiada hentinya kepada anaknya dan saudaraku yang selalu memberikan dukungan Israj Muhammad Diarioi, serta keluarga besar atas segala dukungan dan doa kepada penulis selama menjalani proses penyelesaian skripsi hingga sekarang.

Penulis sampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu **Dr. Ir. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P.** selaku pembimbing I dan **Ir. Mukrimin, S.Hut., M.P., Ph.D., IPU.** selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan arahan serta bimbingan dengan penuh ikhlas dan kesabaran kepada penulis. Ucapan terima kasih juga penulis persembahkan kepada tim penguji Bapak **Prof. Dr. Ir. Musrizal Muin, M.Sc.** dan Bapak **Iswanto, S.Hut., M.Si.** atas segala masukan, kritik, dan saran sebagai bahan evaluasi bagi penulis dalam menyempurnakan skripsi ini. Dengan segala kerendahan hati penulis juga mengucapkan terima kasih khususnya kepada:

1. Kepada Ibu **Yuni Fitri Cahyaningsih, S.P., M.Si.** yang telah membantu dan memberikan bimbingan selama penelitian dan penulisan skripsi ini sehingga dapat berjalan dengan lancar.
2. Kepada Ibu **Dr. Retno Prayudyaningsih, S.si., M.Sc.** dan juga kepada **Pusat Kolaborasi Riset (PKR) Mikroba Karst** yang telah memberikan kepercayaan kepada penulis untuk mengerjakan sampel hasil koleksi dari kegiatan **Riset dan Inovasi untuk Indonesia Maju (RIIM).**
3. Kepada Bapak/ibu **Dosen Fakultas Kehutanan**, yang telah memberikan banyak ilmu dan pengetahuan serta **Staf Fakultas Kehutanan**, yang selalu memberikan pelayanan yang terbaik dalam pengurusan administrasi.
4. Terkhusus kepada **Pratama Putra** dan **Sukarno Hatta** yang telah memberikan dukungan, motivasi selama proses penulisan skripsi ini.
5. Kepada seluruh **Keluarga Besar Foren'20** dan **IMPERIUM'20**, penulis ucapkan banyak terima kasih untuk segala bantuan, motivasi, dukungan, kebersamaan, kekeluargaan, dan suka duka di masa perkuliahan hingga masa akhir semester yang telah dilalui bersama. Secara khusus untuk **Veronika Masseng** yang selaku rekan kerja yang sangat membantu dalam penelitian ini. Secara khusus untuk **Muh. Aidin Habib Khair** yang telah banyak membantu selama proses penulisan skripsi ini serta **Mitra Senolinggi, Eunike Christafilia Ruben, Wahyuningsih, Nurfadillah Andriani, dan Misbahuljannah**, terima kasih karena telah kebersamai pada saat pengurusan administrasi.

6. Kepada **Nurul Fariza Sarief, Aden Mulya Salsabila, Elis Elmasari dan Nabila Balqis Baharuddin, Silviyah Maytasya, Atikah Khaerunnisa, Fatin Salsabila Putri Yuki, Rahmah Dini Irhamna Paradita, Devi Syafirah dan Wiwiek Dwi Pratiwi** terimakasih telah membantu selama proses penelitian, penulisan skripsi, menghibur, menemani, mendengarkan keluh kesah, dan memberikan dukungan kepada penulis.
7. Kepada **Haechan, Jaemin, Mark, Jenso, Chenle, Jisung, Renjun, Chanyeol, Baekhyun, D.O, Sehun, Kai, Chen, Suho, Xiumin** yang telah menemani masa perkuliahan penulis menjadi lebih berwarna, serta memberikan banyak kekuatan kepada penulis sehingga dapat melewati masa-masa sulit dan berada pada tahap ini.
8. Kepada **Chery Pratiwi Irwan** selaku penulis skripsi, terima kasih karena telah berjuang dan tidak mudah menyerah, serta kuat bertahan hingga di titik ini, selalu bersyukur dan libatkan Allah SWT. dalam setiap proses dan perjalanan hidup.
9. Kepada Seluruh pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu penulis dalam proses penelitian dan penulisan skripsi ini.

Makassar, 24 Juli 2024

Chery Pratiwi Irwan

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
SAMPUL .....	iv
LEMBAR PENGESAHAN .....	iv
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA .....	ivv
ABSTRAK .....	iv
ABSTRACT .....	ivi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
2.1 Latar Belakang .....	1
2.2 Teori .....	2
BAB II. METODE PENELITIAN .....	4
2.3 Waktu dan Tempat .....	4
2.4 Alat dan Bahan .....	4
2.5 Pelaksanaan Penelitian .....	5
2.3.1 Preparasi Sampel .....	6
2.3.2 Desain Primer .....	6
2.3.3 Ekstraksi dan Isolasi .....	6
2.3.4 Uji Kualitas dan Kuantitas DNA .....	7
2.3.5 Amplifikasi DNA menggunakan primer spesifik gen APX .....	7
2.3.6 Elektroforesis .....	8
2.4 Analisis Data .....	8
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	9
3.1 Desain Primer .....	9
3.2 Uji Kualitas dan Kuantitas DNA .....	10
3.3 Amplifikasi DNA menggunakan primer spesifik gen APX dan POD .....	12
BAB IV. KESIMPULAN .....	15
4.1 Kesimpulan .....	15
DAFTAR PUSTAKA .....	16
LAMPIRAN .....	19

## DAFTAR TABEL

<b>Nomor Urut</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 1. Sampel Daun Amplifikasi Primer Spesifik APX dan POD .....	4
Tabel 2. Hasil Desain Primer Gen APX dan POD.....	9
Tabel 3. Konsentrasi DNA Setiap Sampel Menggunakan Qubit pada Metode Broad Range .....	12
Tabel 4. Hasil Amplifikasi Primer APX .....	13

**DAFTAR GAMBAR**

<b>Nomor Urut</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 1 . Diagram Alur Penelitian.....	5
Gambar 2. (a). Hasil Uji Kualitas DNA 15 sampel (b). Hasil Uji Kualitas 4 sampel ..	11
Gambar 3. Hasil Amplifikasi primer APX.....	13
Gambar 4. Hasil amplifikasi primer POD.....	14

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Nomor Urut</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Dokumentasi Ekstraksi dan Isolasi DNA.....	20
Lampiran 2. Dokumentasi Uji Kualitas dan Kuantitas DNA.....	20
Lampiran 3. Tabel Hasil uji kuantitas DNA menggunakan alat Qubit 3.0 Fluorometer .....	21
Lampiran 4. Dokumentasi Amplifikasi DNA Menggunakan Primer APX.....	21
Lampiran 5. Hasil Amplifikasi DNA menggunakan Primer APX.....	22
Lampiran 6. Curriculum Vitae .....	23

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pulau obi terletak di Maluku Utara, memiliki sejarah panjang pertambangan, baik nikel maupun tambang emas tradisional. Aktivitas tambang yang memindahkan lapisan tanah *top soil* akan mengakibatkan degradasi lahan. Kerusakan lingkungan yang ditimbulkan seperti lahan terkontaminasi oleh logam berat contohnya merkuri (Hg). Pada proses penambangan emas, merkuri biasanya digunakan untuk memisahkan emas dengan kotoran (Rahman et al. 2021). Setiap gram emas yang dihasilkan, terdapat sekitar 1-3 gram merkuri yang terlepas ke lingkungan (Dewanti et al. 2013). Kerusakan tanah akan menjadi masalah yang sangat serius, karena masyarakat yang sebelumnya dapat memanfaatkan tanah untuk kegiatan perkebunan dan pertanian tidak dapat lagi memanfaatkan tanah tersebut seperti sedia kala. Semua bentuk merkuri, baik dalam bentuk garam organik, unsur maupun dalam bentuk gas memiliki sifat beracun (Rahman et al. 2021). Upaya yang dilakukan untuk memperbaiki kondisi lahan pasca penambangan dapat melalui reklamasi dengan teknologi fitoremediasi.

Reklamasi lahan tambang adalah suatu proses yang dilakukan untuk mengembalikan atau memulihkan lahan yang telah mengalami kegiatan pertambangan agar dapat berfungsi kembali sebagai ekosistem yang berkelanjutan. Salah satu metode untuk memperbaiki tanah yang tercemar merkuri yaitu dengan melakukan proses fitoremediasi. Fitoremediasi adalah pemanfaatan tumbuhan untuk menghilangkan polutan dari tanah atau perairan yang terkontaminasi. Cara ini relatif murah dan memungkinkan sumber pencemar didaur ulang. Proses fitoremediasi dapat terjadi melalui beberapa mekanisme diantaranya biodegradasi dalam rizosfer, fitostabilisasi, fitoakumulasi (fitoekstraksi), rizofiltrasi (sistem hidroponik untuk pembersihan air), fitovolatilisasi, fitodegradasi, pengendalian hidrolis (Neneng and Saraswati, 2019). Juhriah and Alam (2016) lebih lanjut menjelaskan bahwa fitoremediasi tidak hanya efektif dalam membersihkan lingkungan yang terkontaminasi logam berat, tetapi juga merupakan pendekatan yang ramah lingkungan karena mengurangi ketergantungan pada metode kimia atau fisika yang dapat merusak ekosistem serta pemanfaatan tumbuhan lokal atau tumbuhan asli daerah (*native*).

Tumbuhan lokal memiliki daya adaptasi dan kemampuan bertahan hidup terhadap lingkungan yang lebih baik, serta menyerap polutan (Hg) yang dapat menyebabkan aktifnya *superoksida dismutase* (SOD), *katalase* (CAT), *askorbat peroksidase* (APX) dan *peroksidase* (POD) (Elbaz et al. 2010). Gen APX dan POD merupakan enzim yang berperan penting dalam melindungi sel dari kerusakan akibat stres oksidatif. Gen APX dan POD memiliki peran penting dalam fitoremediasi dengan membantu tanaman dalam mengurangi efek berbahaya radikal bebas, meningkatkan toleransi terhadap logam berat, dan meningkatkan efisiensi fitoremediasi (Emamverdian et al. 2015). Gen APX dan POD dapat dikonfirmasi keberadaanya

dalam suatu tumbuhan lokal yang berada di pulau obi dengan tahapan awal melalui desain primer.

Desain primer bertujuan untuk memperoleh primer yang tepat digunakan dalam amplifikasi DNA (*deoxyribonucleic acid*) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Keberhasilan amplifikasi DNA tergantung dari ketepatan primer yang digunakan (Prakoso et al. 2016). Perancangan untuk memperoleh suatu primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk amplifikasi dilakukan secara *in silico*, yaitu merancang atau mendesain primer dengan bantuan suatu program dalam komputer.

Berdasarkan uraian diatas, maka diperlukan suatu penelitian yang bertujuan untuk mendesain primer spesifik gen APX dan POD dan mengidentifikasi adanya gen APX dan POD pada tanaman lokal Pulau Obi. Kegunaan penelitian ini adalah sebagai informasi tentang tumbuhan lokal Pulau Obi yang memiliki gen APX dan POD dan sebagai acuan penelitian pemuliaan selanjutnya khususnya pada tanaman fitoremediasi.

## 1.2 Teori

Penggunaan jenis tanaman lokal secara selektif untuk reklamasi bukanlah tanpa alasan, mengingat beberapa jenis tanaman lokal mempunyai kemampuan untuk menyerap logam alkali yang terdapat dalam tanah dan diakumulasikan ke dalam batang dan organ tubuh tanaman lainnya. Indikator yang paling mudah untuk ditemui adalah adanya perbedaan warna daun sebagai akibat akumulasi sejumlah besar logam berat di daun. Secara langsung, penggunaan jenis tanaman lokal memberikan persentase tumbuh (keberhasilan) yang lebih tinggi dengan kemampuannya menyerap logam alkali yang sekaligus memberikan ruang ekologi yang baik bagi lingkungan sekitar agar tanaman lain dapat tumbuh dengan mengurangi logam alkali yang terdapat dalam tanah (Muslimin and Ulfa, 2022).

Tanaman lokal merupakan bahan alami bioaktif tanaman mengandung metabolik sekunder yang terdapat pada daun, akar, batang, bunga, biji, ranting atau kulit batang. Tumbuhan lokal memiliki daya adaptasi yang lebih baik terhadap lingkungan sehingga memiliki kemampuan lebih tinggi bertahan hidup dan menyerap polutan dibandingkan tumbuhan eksotis. Pemilihan jenis tumbuhan ini dilakukan untuk meningkatkan keberhasilan fitoremediasi (Purnomo, 2015).

Salah satu dampak negatif yang ditimbulkan akibat penambangan emas adalah pencemaran merkuri hasil proses pengolahan emas secara amalgamasi. Fitoremediasi merupakan alternatif teknologi pengolahan tanah tercemar yang ramah lingkungan, efektif, dan mempunyai biaya yang lebih rendah dibandingkan pengolahan lainnya (Ghassani and Titah, 2022). Fitoremediasi adalah penggunaan tumbuhan untuk menghilangkan polutan dari tanah atau perairan yang terkontaminasi. Akhir-akhir ini teknik reklamasi dengan fitoremediasi mengalami perkembangan yang sangat pesat. Dengan berkembangnya teknologi fitoremediasi maka tumbuhan hiperakumulator logam menjadi sangat penting. Tanaman hiperakumulator mampu mengakumulasi logam dengan konsentrasi lebih dari 100 kali melebihi tanaman normal, dimana tanaman normal mengalami keracunan logam dan penurunan produksi. Hal ini terjadi karena adanya perbedaan serangkaian proses

fisiologis dan biokimiawi serta ekspresi gen-gen yang mengendalikan penyerapan, akumulasi dan toleransi tanaman terhadap logam (Hidayati, 2013).

*Askorbat peroksidase (APX)* adalah enzim antioksidan penting yang digunakan oleh biostimulan tanaman dalam memediasi toleransi tanaman terhadap kerusakan oksidatif melalui detoksifikasi ROS (*reactive oxygen species*). Selain merangsang akumulasi AsA (*Ascorbic acid*), sehingga memastikan pasokan substrat utama APX yang cukup, beberapa kategori biostimulan mampu memodulasi aktivitas enzim APX secara langsung atau dengan mengendalikan ekspresi transkripsi gen APX. Regulasi aktivitas APX dan ekspresi transkrip yang diinduksi biostimulan diamati pada tanaman yang diobati dengan berbagai kategori biostimulan untuk memperbaiki stres oksidatif yang disebabkan oleh berbagai stresor (Omoarelojie et al. 2021).

*Peroksidase (POD)* merupakan salah satu antioksidan enzimatik yang berperan sebagai pertahanan dalam melawan ROS dengan mengkatalisis konversi  $H_2O_2$  menjadi air dan  $O_2$  (Abedi and Pakniyat, 2010). POD adalah oksidoreduktase tanaman yang mampu mengkatalisis beberapa reaksi fisiologis dan memiliki peran ganda menghilangkan  $H_2O_2$  disistem antioksidan tanaman (Yin et al. 2021). Kemampuan aktifitas enzim POD dalam mengatur kandungan  $H_2O_2$  memungkinkan enzim tersebut dapat mempertahankan tanaman dari cekaman kekeringan (Acemi et al. 2018). POD memiliki fungsi melindungi tanaman dari stres oksidatif, meningkatkan kemampuan detoksifikasi, meningkatkan pertumbuhan tanaman, dan memperluas jangkauan tanaman yang dapat digunakan.

Desain primer adalah proses memilih dan merancang dua urutan nukleotida pendek, yang disebut primer, yang digunakan dalam teknik biologi molekuler seperti *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dan sekuensing DNA. Primer ini melekat pada urutan DNA target yang ingin diamplifikasi atau diurutkan, dan mengarahkan enzim polimerase DNA untuk memulai sintesis DNA baru. Desain primer yang tepat sangat penting untuk reaksi yang sukses, hal tersebut merupakan kunci diperoleh proses amplifikasi spesifik dengan hasil tinggi (Yuniarti and Su'udi, 2021).

Melakukan desain primer sangat penting untuk memastikan spesifisitas, efisiensi, akurasi, dan fleksibilitas dalam berbagai teknik biologi molekuler. Desain primer yang baik dapat meningkatkan kualitas dan keunggulan hasil penelitian, dan memungkinkan penelitian yang lebih luas dalam bidang biologi molekuler. Banyak faktor yang mungkin membatasi keberhasilan pasangan primer dapat dideteksi secara apriori dengan metode komputasi. Untuk mengurangi kegagalan PCR berikutnya, misalnya, deteksi dimer primer, amplifikasi produk alternatif, gangguan batang, suhu leleh ekstrim, dan variasi genotipe spesifik dalam urutan target dapat dipertimbangkan secara komputasi. Penggunaan alat analisis urutan komputasi untuk memilih pasangan primer terbaik dari kandidat yang tersedia tidak hanya akan mengurangi tingkat kegagalan eksperimen tetapi juga menghindari timbulnya hasil yang menyesatkan akibat amplifikasi produk alternatif (Li and Brownley, 2010).

## BAB II. METODE PENELITIAN

### 2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai April 2024. Pelaksanaan penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan, dimulai dari tahapan preparasi sampel hasil koleksi dari lab PKR mikroba Karst, desain primer untuk mendeteksi gen APX dan POD serta amplifikasi primer berbasis gen sampel dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon, Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin, Makassar.

### 2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *coolbox*, spidol, label, gunting, gala, alat tulis menulis, timbangan analitik, spatula, *mortar* dan *pestle*, Qubit 3.0 Fluometer, mikropipet, *vortex mixer*, *centrifuge*, *waterbath*, *freezer*, *mini centrifuge*, mesin PCR, gelas erlenmeyer, *microwave*, mesin elektroforesis, *UV transilluminator*, kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *glove*, kantong plastik, plastik klip, amplop coklat, tube (2 ml), tube PCR, tube 1.5 ml, *microtip* (biru, kuning, putih), alkohol 70%, aquades, *Plant Genomic DNA Mini KIT* (Geneaid), *reagent* Qubit, *iNtRON 2x PCR Master mix Solution*, ddH<sub>2</sub>O, *Agarose*, *Buffer TAE 1x*, *red safe*, *DNA Ladder 50* dan *100bp* dan juga sampel daun yang berada dalam **Tabel 1**.

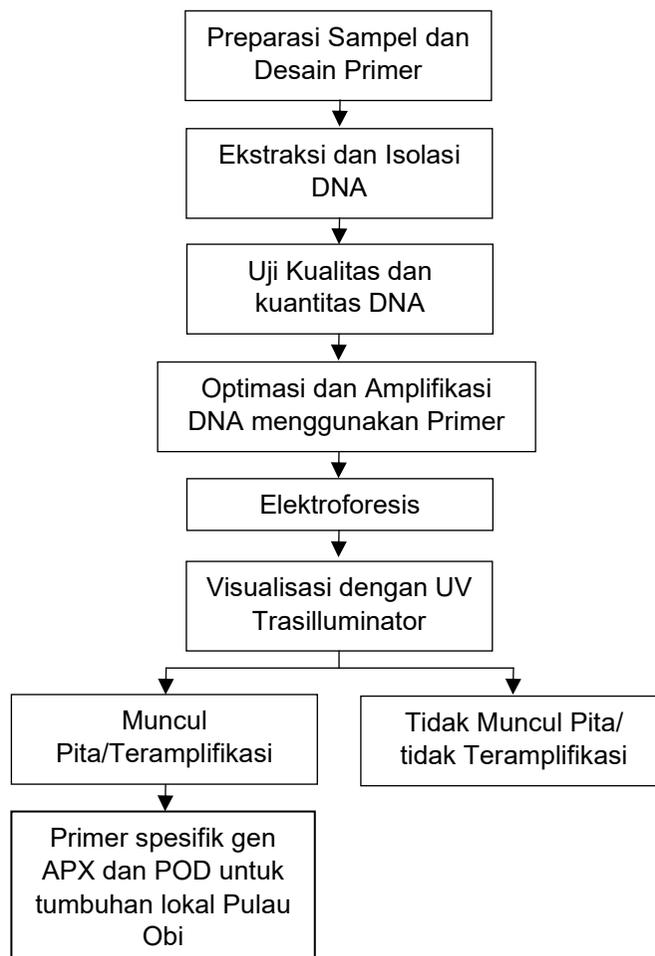
**Tabel 1.** Sampel Daun Amplifikasi Primer Spesifik APX dan POD

No.	Nama Sampel	Famili
1	Sirih Hutan	Piperaceae
2	Kersen	Muntingiaceae
3	Jambu Biji	Myrtaceae
4	Kloris Barbata	Poaceae
5	Pulai	Apocynaceae
6	Bubulutu daun kecil	Moraceae
7	Bubulutu daun besar	Moraceae
8	Kayu Tawa	Fabaceae
9	Henna	Lythraceae
10	Kayu Same	Euphorbiaceae
11	Tui-Tui	Phyllanthaceae
12	Gugura	Fabaceae
13	Ketapang	Combretaceae
14	Kayu Kuning	Menispermaceae
15	Kangkung	Rubiaceae
16	Casuarina	Casuarinaceae

No.	Nama Sampel	Famili
17	Gamal	Fabaceae
18	Paspalum	Commelinaceae

### 2.3 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan, dimulai dari tahapan pengambilan sampel dan desain primer, ekstraksi dan isolasi DNA, uji kualitas dan kuantitas DNA, optimasi dan amplifikasi DNA menggunakan primer, elektroforesis, visualisasi dengan *UV transilluminator*, lalu melihat muncul pita atau teramplifikasi atau tidak muncul pita atau tidak teramplifikasi. Adapun skema tahapan penelitian yang akan dilakukan dapat dilihat pada **Gambar 1**:



**Gambar 1.** Diagram Alur Penelitian

### 2.3.1 Preparasi Sampel

Sampel daun diperoleh dari hasil koleksi di lab PKR mikroba Karst berupa tanaman lokal dari Pulau Obi, Maluku utara yang terdiri atas 18 spesies yaitu sirih hutan, kersen, jambu biji, kloris barbata, pulai, bubulutu daun kecil, bubulutu daun besar, kayu tawa, henna, kayu same, tui-tui, gugura, ketapang, kayu kuning, kangkung, casuarina, gamal, dan paspalum.

### 2.3.2 Desain Primer

Desain primer dilakukan dengan menggunakan *sequence* gen APX (*ascorbate peroxidase*) dari tanaman *Pisum sativum* dengan nomor aksesori M93051.1 dan tanaman *Vicia sativa* dengan nomor aksesori OR756531.1 dan menggunakan gen POD (peroxidase) dari tanaman *Ipomoea batatas* dengan nomor aksesori AF453791.1 yang diambil dari database NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Kedua *sequence* tersebut disejajarkan menggunakan perangkat lunak Geneious prime. *Sequence* yang akan digunakan sebagai primer diuji menggunakan perangkat lunak online yaitu Primer3plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>). *Sequence* primer yang dihasilkan dari perangkat lunak Primer3plus diuji menggunakan perangkat lunak online *Blast* dari NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Karakter primer yang digunakan meliputi ukuran PCR produk 900-1000bp, GC%, suhu minimal 50°C-60°C dengan suhu optimum 55°C. Perbedaan antara *primer forward* dan *reverse* maksimal 5°C. Proses ini diulang sebanyak empat kali untuk dapat mengamplifikasi seluruh sekuen gen POD pada spesies *Ipomoea batatas* yang memiliki ukuran 3721bp. Sedangkan pada gen APX diulang sebanyak 3 kali karena panjang *sequence* hasil *alignment* berukuran 2424bp.

### 2.3.3 Ekstraksi dan Isolasi

Tahapan ekstraksi DNA menggunakan metode KIT yang dilakukan mengikuti petunjuk manual dari produsen. Proses tersebut mengikuti prosedur sebagai berikut:

- a. Daun dari setiap sampel dipotong dan ditimbang seberat 50-100 mg yang merupakan jaringan daun segar tanpa tulang daun kemudian digerus hingga berbentuk bubuk.
- b. Sampel yang telah berbentuk bubuk dimasukkan ke dalam tube 2 ml, lalu ditambahkan larutan *buffer* GP1 sebanyak 400 µL kemudian *vortex* hingga larutan menyatu.
- c. Tube yang berisi larutan sampel diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit. Selama diinkubasi tube di *vortex* setiap 10 menit. Bersamaan dengan proses ini larutan *elution* dihangatkan.
- d. Tube yang berisi larutan diberi *buffer* GP2 sebanyak 100 µL kemudian di *vortex* dan diinkubasi di dalam *freezer* (suhu -20°C) selama 10 menit.
- e. Tube kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10,000 G selama 5 menit.
- f. Larutan yang telah terpisah dari komponen lain dipipet dan dipindahkan pada tube 2 ml baru yang telah diletakkan *filter Column* (putih) di atasnya kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10,000 G selama 1 menit, kemudian *Column* (putih) dibuang. Tambahkan 1,5 *buffer* GP3 750 µL dan segera dihomogenkan dengan cara dibolak-balik.

- g. *Column* (hijau) diletakkan pada tube 2 ml yang baru, sebanyak 700  $\mu$ L larutan dipindahkan ke dalam *Column* (hijau), kemudian disentrifugasi selama 2 menit. Kemudian larutan yang berada pada tube dibuang. Proses ini diulangi hingga larutan habis.
- h. *GD column* (hijau) diberi larutan *buffer* W1 sebanyak 400  $\mu$ L, kemudian disentrifugasi pada 10,000 G selama 1 menit, Kemudian larutan yang berada pada tube dibuang.
- i. *Column* (hijau) diberi 600  $\mu$ L larutan *buffer* wash, lalu disentrifugasi pada 10,000 G selama 1 menit, Kemudian larutan yang berada pada tube dibuang.
- j. *Column* (hijau) disentrifugasi pada kecepatan 10,000 G selama 6 menit.
- k. *Column* (hijau) dipindahkan ke tube 1,5 ml baru kemudian ditambahkan *elution buffer* 100  $\mu$ L yang telah dihangatkan tepat pada tengah *Column* (hijau), tube dibiarkan pada suhu ruang selama 3-5 menit. Kemudian disentrifugasi pada 10,000 G selama 1 menit.
- l. *Column* (hijau) dibuang sehingga diperoleh larutan DNA murni, kemudian ditambahkan 3  $\mu$ L RNase pada DNA. Larutan DNA disimpan dengan kode DNA master pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3.4 Uji Kualitas dan Kuantitas DNA

Kualitas DNA diuji menggunakan metode elektroforesis horizontal. Metode ini menggunakan *agarose* dengan konsentrasi 0,8% dalam *buffer* TAE 1 $\times$ . Kuantitas DNA diuji menggunakan alat Qubit 3.0 Fluometer (*Thermo Fisher Scientific*) dengan *reagent Broad Range*. Pengujian ini dimulai dengan membuat larutan qubit *working* dengan mencampurkan dsDNA *reagent* sebanyak 1  $\mu$ l x jumlah sampel dan qubit *buffer* sebanyak 199  $\mu$ l x jumlah sampel. Kemudian DNA master dimasukkan ke dalam tube qubit sebanyak 1  $\mu$ l lalu ditambahkan larutan qubit *working* sebanyak 199  $\mu$ l. Selanjutnya sampel uji diinkubasi di dalam tempat gelap selama 2 menit, setelah itu sampel diuji pada Qubit 3.0 Fluometer.

#### 2.3.5 Amplifikasi DNA menggunakan primer spesifik gen APX

Proses amplifikasi DNA mengikuti prosedur sebagai berikut ini:

- a). Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan dengan mesin PCR (*Sensoquest*). Setiap reaksi PCR terdiri atas iNtRON 2x PCR *Master mix Solution* 6,25  $\mu$ l, 1  $\mu$ l primer (1  $\mu$ l Primer *Forward* dan 1  $\mu$ l Primer *Reverse*), 2-3  $\mu$ l DNA *working* dan 3  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O sehingga total volume reaksi 12,5  $\mu$ l.
- b). Reaksi PCR kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR. Prosedur amplifikasi dimulai dengan denaturasi awal 95  $^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit, setelah itu siklus PCR dilakukan sebanyak 35 kali yaitu proses tahap denaturasi 95 $^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, tahap penempelan primer spesifik untuk setiap primer selama 1 menit (optimasi primer dilakukan dengan gradien suhu  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), tahap perpanjangan 72  $^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit. Tahap akhir pada proses ini adalah perpanjangan terakhir pada suhu 72  $^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit. Hasil PCR bisa disimpan pada suhu 4  $^{\circ}\text{C}$  atau  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk pemakaian dalam jangka waktu yang lama.
- c). Hasil amplifikasi DNA kemudian diseparasi (elektroforesis) menggunakan agar *agarose* 1,5% (0,9 gram + 60 *buffer* TAE 1 $\times$ ).

### 2.3.6 Elektroforesis

Proses elektroforesis mengikuti prosedur sebagai berikut ini:

- a. *Agarose* ditimbang sesuai konsentrasi yang dibutuhkan dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 500 ml kemudian ditambahkan *buffer* TAE 1×.
- b. Larutan dipanaskan menggunakan *microwave* selama 3 menit.
- c. Setelah agar larut, ditambahkan gel red sebanyak 1,5 µl kemudian didiamkan sampai hangat.
- d. Larutan agar dituang ke dalam cetakan agar dan diberi sisir kemudian didiamkan hingga agar mengeras.
- e. Sisir dilepas kemudian agar dimasukkan ke dalam tank yang berisi larutan *buffer* TAE 1×.
- f. Untuk sampel DNA sebanyak 2 µl + 1 µl *loading dye* dimasukkan ke dalam lubang (sumur).
- g. Untuk sampel hasil PCR dimasukkan sebanyak 5 µl ke dalam sumur.
- h. Sumur paling ujung (kiri dan kanan) diisi DNA ladder 50bp sebanyak 3,5 µl.
- i. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit pada tegangan 100 volt.
- j. *Agarose* kemudian divisualisasi di UV transiluminator dan didokumentasikan.

### 2.4 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa gambar dokumentasi hasil elektroforesis dari hasil separasi PCR produk menggunakan primer yang telah didesain. Pengamatan ada tidaknya pita dilihat pada elektroforegram.