

**SUHU ANNEALING PRIMER INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR)
PADA DNA *Aglaonema pictum* (Roxb.) Kunth
ANNEALING TEMPERATURE OF *INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT*
(ISSR) PRIMERS ON DNA OF *Aglaonema pictum* (Roxb.) Kunth**

Muh. Fikry Baharuddin¹, Muhammad Rifqi Hariri², Turhadi Turhadi^{1*}

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya

Jl. Veteran, Malang 65415, Jawa Timur, Indonesia

²Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)
Jl. Raya Bogor KM 46, Bogor 16911, Jawa Barat, Indonesia

Corresponding author : turhadibiologi@ub.ac.id

Abstrak

Aglaonema pictum (Roxb.) Kunth merupakan salah satu tanaman hias yang sangat populer di masyarakat. Meskipun demikian, studi tentang keragaman genetik *A. pictum* masih terbatas. Atas dasar hal ini perlu dilakukan studi keragaman genetik *A. pictum* salah satunya menggunakan marka berbasis DNA seperti *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). Agar studi keragaman genetik *A. pictum* dapat berjalan dengan efektif dan efisien, salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah optimasi suhu *annealing* untuk primer ISSR yang akan digunakan. Tujuan penelitian ini adalah melakukan optimasi primer *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) pada sampel DNA *A. pictum*. Metode yang digunakan adalah ekstraksi DNA menggunakan *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB), amplifikasi DNA menggunakan primer ISSR1, ISSR2, ISSR3, ISSR4, ISSR5, ISSR6, ISSR7, ISSR8, ISSR9, ISSR10, ISSR11, dan ISSR12 dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada rentang suhu 52-54 °C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sepuluh dari 12 primer ISSR dapat mengamplifikasi DNA *A. pictum* dengan suhu *annealing* yang optimal. Primer ISSR yang dapat diidentifikasi suhu *annealing* optimalnya adalah ISSR1, ISSR3, ISSR5, ISSR6, ISSR7, ISSR8, ISSR9, ISSR10, ISSR11, dan ISSR12. Primer ISSR1 dan ISSR12 menunjukkan hasil optimal pada suhu 52°C, sementara primer ISSR5 dan ISSR11 pada suhu 52,6°C. Primer ISSR3, ISSR8, dan ISSR9 menunjukkan hasil optimal pada suhu 53,6°C, sedangkan primer ISSR6, ISSR7, dan ISSR10 pada suhu 54°C. Disisi lain, primer ISSR2 dan ISSR4 belum dapat diidentifikasi suhu *annealing* optimalnya.

Kata kunci : *Aglaonema pictum*, Keragaman Genetik, *Inter Simple Sequence Repeat*, Suhu *Annealing*

Abstract

Aglaonema pictum is one of the most popular ornamental plants in the community. However, studies on the genetic diversity of *A. pictum* are still limited. Based on this, it is necessary to study the genetic diversity of *A. pictum*, one of which uses DNA-based markers such as *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). In order to study of genetic diversity of *A. pictum* effectively and efficiently, one of the efforts that can be done is optimizing the annealing temperature for ISSR primers to be used. The purpose of this study was to optimize the effective *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) primers on DNA of *A. pictum*. The methods used include DNA extraction using

cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), DNA amplification using primers ISSR1, ISSR2, ISSR3, ISSR4, ISSR5, ISSR6, ISSR7, ISSR8, ISSR9, ISSR10, ISSR11, and ISSR12) using Polymerase Chain Reaction (PCR) at temperature ranges of 52-54 °C. The results showed that ten out of 12 ISSR primers could amplify the DNA of *A. pictum* using optimal annealing temperatures. ISSR primers which identified optimum annealing temperature were ISSR1, ISSR3, ISSR5, ISSR6, ISSR7, ISSR8, ISSR9, ISSR10, ISSR11, and ISSR12. Primer of ISSR1 and ISSR11 showed optimum annealing temperature at 52,6°C. Primer of ISSR3, ISSR8, and ISSR9 showed optimum annealing temperature at 53,6°C, while primer of ISSR6, ISSR7, and ISSR10 showed optimum annealing temperature at 54°C. in other hands, primer of ISSR2 nad ISSR4 did not yet identified their optimum annealing in all tested temperature range.

Kata kunci : *Aglaonema pictum*, Annealing Temperature, Genetic Diversity, Inter Simple Sequence Repeats

Pendahuluan

Aglaonema pictum (Roxb.) Kunth adalah salah satu tanaman hias yang sangat populer di masyarakat. Keindahan daunnya yang unik dengan pola-pola putih atau keperakan menjadikannya pilihan utama bagi pecinta tanaman hias (Yuzammi, 2018; Muliana, 2022). Meskipun *A. pictum* telah menjadi salah satu tanaman hias terkemuka, pengetahuan tentang keragaman genetiknya masih terbatas. Keragaman genetik merupakan faktor kunci dalam konservasi dan pemuliaan tanaman. Untuk memahami keragaman genetik *A. pictum* dengan baik, salah satu cara yang dapat digunakan yaitu penggunaan marka molekuler yang misalnya marka yang berbasis DNA.

Marka DNA adalah instrumen yang penting dalam penelitian genetik. Beberapa marka DNA yang umum digunakan dan melibatkan reaksi berantai polimerase (PCR), seperti RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), dan SSR (*Simple Sequence Repeat*) (Bidyananda et al., 2024). RAPD memiliki kekurangan berupa reproduktibilitas yang rendah, AFLP memerlukan biaya tinggi, dan SSR memerlukan pengetahuan tentang sekuens-sekuens *flanking* untuk mengembangkan primer spesifik spesies. Selain ketiga jenis marka molekuler tersebut, terdapat marka lain yang telah terbukti dapat digunakan dalam studi keragaman genetik tumbuhan, yaitu ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (Sarwat, 2012).

Marka ISSR digunakan untuk mempelajari keragaman genetik, filogeni, pelabelan gen, pemetaan genom, dan evolusi dalam berbagai spesies tanaman. Dengan marka ISSR, studi keragaman genetik dan studi filogenetik dapat dilakukan dengan lebih efisien dan akurat. Marka ISSR merupakan marka yang sangat informatif untuk analisis genetik, dan hasilnya dapat digunakan dalam penelitian keragaman genetik (Amiteye 2021). Marka ISSR sudah banyak digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada *Amorphophallus* spp. (Anil et al., 2019), koro pedang (*Canavalia ensiformis*) (Rifatunidaudina et al., 2019), koro benguk (*Mucuna pruriens*) (Rifatunidaudina et al., 2019), kacang panjang (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) (Rifatunidaudina et al., 2019), kacang tunggak (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata*) (Rifatunidaudina et al., 2019), kacang Bogor (*Vigna subterranea*) (Rifatunidaudina et al., 2019), kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) (Rifatunidaudina et al., 2019), koro kratok (*Phaseolus lunatus*) (Rifatunidaudina et al., 2019), dan kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus*) (Rifatunidaudina et al., 2019), terung (*Solanum melongena*) (Shafura et al., 2022), dan *Lagenandra* spp. (Parashkumar et al., 2015). Namun meskipun demikian, hingga saat ini belum ada penelitian yang meneliti keragaman genetik dari genus *Aglaonema* menggunakan marka ISSR. Berdasarkan hal ini, kegiatan seleksi

dan optimasi primer ISSR ini penting dilakukan guna mendukung studi keragaman genetik jenis-jenis *Aglaonema* di masa depan, salah satunya *A. pictum*. Tahap optimasi suhu *annealing* juga dilakukan pada empat primer RAPD pada kacang hijau (*Vigna radiata* L.) (Herman et al., 2018) dan 13 primer SSR pada DNA tanaman padi (*Oryza sativa*) (Aulia et al., 2021). Optimasi kondisi reaksi PCR akan memungkinkan penelitian berlanjut yang akurat dan efisien mengenai keragaman genetik spesies ini. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan suhu optimal dua belas primer ISSR pada DNA *A. pictum*.

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi – Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Bogor, Jawa Barat pada Januari-Februari 2024.

Ekstraksi DNA Genom *Aglaonema pictum*

DNA dari daun *A. pictum* (Gambar 1) diekstraksi dengan menggunakan protokol *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) yang dimodifikasi. Ekstraksi dimulai dengan proses penggerusan sampel daun dengan pasir silika, alu dan mortar yang telah dipotong kecil-kecil terlebih dahulu. Sampel yang telah digerus kemudian dimasukkan ke *tube* 2 ml. *Tube* yang berisi sampel tersebut kemudian ditambahkan dengan *Polyvinylpyrrolidone* (PVP) sebanyak setengah sendok spatula dan larutan buffer ekstraksi (CTAB) sebanyak 1 ml. *Tube* lalu dihomogenasi dengan vortex hingga larut. *Tube* sampel lalu diinkubasi dengan *heat block* dengan suhu 60° C selama 30 menit. Setiap 5 menit pada saat inkubasi, *tube* dibolak-balik lalu dimasukkan kembali ke *heat block*.



Gambar 1. Sampel *Aglaonema pictum* (Roxb.) Kunth

Tabung 2 ml yang berisi sampel yang telah diinkubasi kemudian ditambahkan *chloroform*: isoamil alkohol sebanyak 700 µl. Tabung sampel kemudian dihomogenasi dengan *hula mixer* selama 20 menit. Sampel yang telah dihomogenasi kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 7.200 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi berukuran 1,5 ml dan dihitung volume supernatan yang dipindahkan sedangkan peletnya dibuang. Isopropanol dingin ditambahkan ke dalam *tube* 1,5 ml tersebut sebanyak 2/3

volume sampel. Sampel kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang diperoleh dibuang hingga menyisakan pelet. Pelet yang ada pada *tube* lalu dikeringkan secara terbalik di atas tisu kering selama 5 menit. Pelet yang telah dikeringkan lalu ditambahkan CH₃COONa sebanyak 1 ml. Sampel lalu dimasukkan ke dalam *hula mixer* selama 20 menit. Setelah itu, sampel disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan dan pelet dari hasil sentrifugasi kemudian dibuang. Terakhir, sampel ditambahkan dengan 100 µl TE hangat dan disimpan dalam freezer 4 °C hingga digunakan pada tahap selanjutnya.

Amplifikasi dan Optimasi DNA Menggunakan Primer ISSR Melalui PCR

Optimasi dilakukan pada 12 primer ISSR (Tabel 1) yang berbeda pada rentang suhu 52-54 °C melalui teknik PCR. Komposisi reaksi PCR terdiri atas 1 µl DNA sampel *A. pictum*, 3 µl MyTaqTM HS Red Mix (Meridian Bioscience, USA), 1 µl primer ISSR, dan 1 µl ddH₂O. Volum akhir masing-masing tabung reaksi adalah 6 µl. Program PCR yang digunakan adalah pra-denaturasi pada suhu 94 °C selama 5 menit. Denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik. *Annealing* pada suhu 52-54 °C selama 30 detik. Ekstensi pada suhu 72 °C selama 30 detik, dan *post-ekstensi* pada suhu 72 °C selama 5 menit. Siklus yang digunakan untuk masing-masing reaksi PCR adalah 35 siklus.

Tabel 1. Daftar primer ISSR untuk optimasi pada DNA *Aglaonema pictum* (Roxb.) Kunth

Primer	Sekuen (5'→ 3')	Referensi
ISSR1	TGAGAGAGAGAGAGAGAGA	Bisoyi et al. (2010)
ISSR2	CTCTCTCTCTCTCTCTT	Bakappa & Gopal (2014)
ISSR3	GTGTGTGTGTGTGTGTA	Khaled et al. (2015)
ISSR4	GTGTGTGTGTGTGTGTT	Smitsen et al. (2003)
ISSR5	AGAGAGAGAGAGAGAGT	Khajudparn et al. (2012)
ISSR6	AGAGAGAGAGAGAGAGC	Khajudparn et al. (2012)
ISSR7	ACACACACACACACT	Khajudparn et al. (2012)
ISSR8	AGAGAGAGAGAGAGAGTC	Gaponenko et al. (2021)
ISSR9	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	Tonk et al. (2014)
ISSR10	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	Tonk et al. (2014)
ISSR11	CACACACACACACARG	Tonk et al. (2014)
ISSR12	ACACACACACACACACYG	Khajudparn et al. (2012)

Setelah amplifikasi DNA melalui PCR selesai maka dilanjutkan dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8%. Sebanyak 5 µl produk PCR dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran gel. Proses elektroforesis dijalankan pada tegangan listrik 100 volt selama 40 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan pada perangkat *Gel Documentation Transilluminator*.

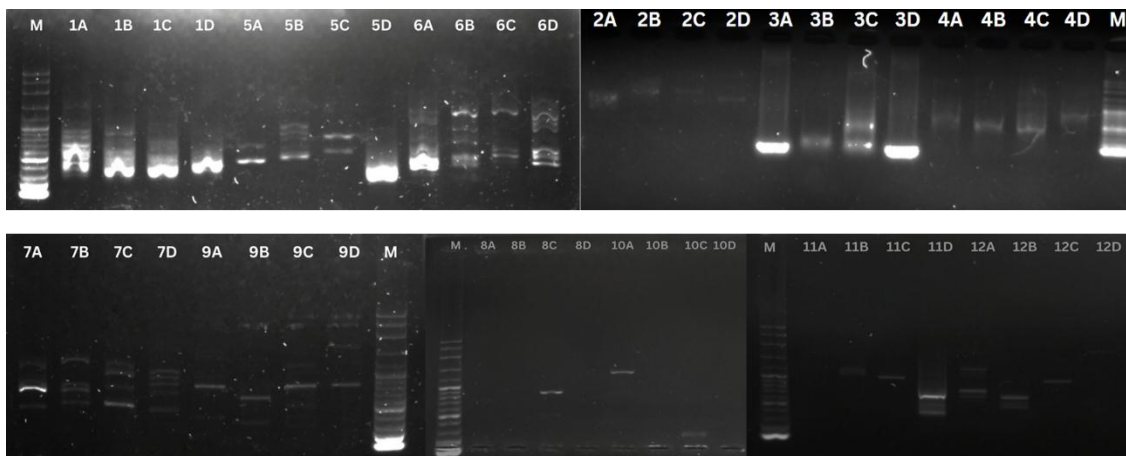
Analisis Data

Data yang diperoleh berupa profil pita DNA hasil PCR yang dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Sebanyak 12 primer ISSR yang dioptimasi menggunakan gradien suhu 52-54°C menunjukkan bahwa semua primer mampu mengamplifikasi DNA *Aglaonema pictum* (Gambar 2; Tabel 2). Primer ISSR1 mampu mengamplifikasi DNA *A. pictum* pada

keempat suhu *annealing* yang diujikan. Pada suhu 52,0 °C, primer ISSR1 menunjukkan pola pita yang lebih banyak dan jelas dibandingkan pola pita yang dihasilkan oleh ketiga suhu *annealing* yang diujikan. Meskipun menunjukkan pita yang tipis, primer ISSR2 menunjukkan keberhasilan mengamplifikasi DNA *A. pictum*. Berdasarkan hasil penelitian ini, mengindikasikan bahwa pada suhu *annealing* optimal untuk primer ISSR2 belum dapat ditentukan karena baik pada suhu 53,6 °C dan 54,0 °C menunjukkan jumlah pita yang sama yaitu satu dengan beda ukuran.



Gambar 2. Elektroforegram hasil PCR optimasi primer *Inter Simple Sequence Repeat* ISSR1, ISSR2, ISSR3, ISSR4, ISSR5, ISSR6, ISSR7, ISSR8, ISSR9, ISSR10, ISSR11, dan ISSR12 dengan suhu gradien 52-54 °C pada DNA *Aglaonema pictum* (Roxb.) Kunth. Keterangan M: *DNA ladder*; A: 52,0 °C, 52,6 °C, 53,6 °C, 54,0 °C.

Tabel 2. Suhu *annealing* optimal untuk 12 primer ISSR pada DNA *Aglaonema pictum* (Roxb.) Kunth

Primer	Suhu <i>annealing</i> optimal (°C)
ISSR1	52,0
ISSR2	-
ISSR3	53,6
ISSR4	-
ISSR5	52,6
ISSR6	54,0
ISSR7	54,0
ISSR8	53,6
ISSR9	53,6
ISSR10	54,0
ISSR11	52,6
ISSR12	52,0

Keterangan: tanda strip (-) artinya suhu *annealing* optimal belum teridentifikasi

Primer ISSR3 dan ISSR9 mampu mengamplifikasi DNA *A. pictum* pada keempat suhu *annealing* yang diujikan (Gambar 2; Tabel 2). Pada suhu 53,6 °C merupakan suhu *annealing* optimal untuk primer ISSR3 dan ISSR9 karena menunjukkan jumlah pita yang lebih banyak dan jelas dibandingkan ketiga suhu *annealing* lainnya yang diujikan. Sama halnya seperti ISSR2, primer ISSR4 meskipun mampu mengamplifikasi DNA *A. pictum* pada keempat suhu *annealing* yang diujikan tetapi suhu optimalnya

belum dapat ditentukan. Pita DNA yang tipis dan *smear* ditunjukkan hasil amplifikasi oleh ISSR4.

Primer ISSR5, ISSR6, dan ISSR7 juga mampu mengamplifikasi DNA *A. pictum* pada keempat suhu *annealing* yang diujikan (Gambar 2; Tabel 2). Untuk primer ISSR5 menunjukkan pola pita yang banyak, tegas, serta terseparasi dengan baik pada suhu 52,6 °C. Di sisi lain primer ISSR6 dan ISSR7 menunjukkan pola pita yang banyak, tegas, serta terseparasi dengan baik pada suhu 54,0 °C.

Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa pada primer ISSR8, ISSR10, ISSR11, dan ISSR12 tidak mengamplifikasi DNA *A. pictum* semua suhu *annealing* yang diujikan (Gambar 2; Tabel 2). Meskipun tidak menunjukkan adanya pita DNA pada keempat suhu *annealing* yang diujikan, suhu *annealing* optimal dapat ditentukan untuk primer ISSR8, ISSR10, ISSR11, dan ISSR12. Primer ISSR8 hanya mampu mengamplifikasi DNA *A. pictum* dengan jelas dan pemisahan antar pita yang baik pada suhu *annealing* 53,6 °C, sedangkan primer ISSR10 hanya mampu mengamplifikasi DNA *A. pictum* dengan jelas dan pemisahan antar pita yang baik pada suhu *annealing* 54,0 °C. Primer ISSR11 menunjukkan suhu *annealing* optimal pada 52,6 °C, sedangkan ISSR12 pada suhu *annealing* 52,0 °C. Suhu *annealing* untuk primer ISSR11 dan ISSR12 diindikasikan dengan pita yang jelas dan pemisahan jelas antar pita dibandingkan suhu *annealing* lainnya yang diujikan.

Pembahasan

Penanda molekuler telah digunakan secara luas untuk studi keragaman genetik tumbuhan dan genetika populasi. Penanda molekuler sangat penting untuk program pemuliaan dan perbaikan tanaman, konservasi, perlindungan, introduksi, serta reintroduksi tumbuhan langka (Tikendra et al., 2019; Hussain et al., 2020). Hingga saat ini telah banyak berkembang penanda molekuler yang mempunyai karakteristik masing-masing, salah satunya *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). Menurut Bidyananda et al. (2024), penanda molekuler ISSR menggunakan primer spesifik untuk wilayah inter-mikrosatelit untuk mengamplifikasi fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda. Guna meningkatkan spesifitas primer ISSR pada sampel DNA saat PCR maka diperlukan suhu *annealing* yang sesuai. Tahap *annealing* merupakan salah satu tahapan penting dalam proses amplifikasi DNA karena membutuhkan suhu yang spesifik dan optimal agar produk PCR yang dihasilkan lebih maksimal (McDonald et al., 2024). Untuk mencapai suhu *annealing* yang spesifik dan optimal, maka perlu dilakukan optimasi dengan menggunakan rentang suhu tertentu pada mesin PCR. Rentang suhu ini berfungsi untuk mendapatkan suhu yang paling sesuai dimana primer dapat mengamplifikasi DNA target secara efektif. Pengaturan suhu *annealing* yang tidak tepat dapat mengakibatkan *mispriming*, dimana primer dapat mengamplifikasi daerah yang bukan target atau bahkan gagal mengamplifikasi DNA target itu sendiri (Hikmatyar et al., 2015).

Hasil dari penelitian ini mengindikasikan bahwa 10 dari 12 primer ISSR yang diujikan dapat diidentifikasi suhu *annealing* optimalnya (Gambar 2; Tabel 2). Sepuluh primer yang dapat ditentukan suhu *annealing* optimalnya meliputi ISSR1, ISSR3, ISSR5, ISSR6, ISSR7, ISSR8, ISSR9, ISSR10, ISSR11, dan ISSR12. Menurut Sauer et al. (1998), indikator kualitas DNA yang baik adalah adanya pita DNA yang tampak tegas, memiliki ketebalan yang cukup dan tidak menunjukkan adanya *smear* saat diamati dengan bantuan sinar ultraviolet melalui perangkat *UV transilluminator*. Pita *smear* seperti ditunjukkan oleh primer ISSR4, sehingga belum bisa diidentifikasi suhu *annealing* optimalnya. Sepuluh primer ISSR yang dioptimasi dalam penelitian ini menunjukkan hasil amplifikasi optimal pada DNA *A. pictum* dalam suhu sekitar 55 °C (Tabel 2). Hasil ini juga sesuai dengan Hussain et al. (2025) yang menyatakan bahwa syarat penting dalam tahap *annealing* adalah suhu sekitar 55°C. Variasi suhu di luar

kisaran tersebut berpotensi menyebabkan penempelan primer yang tidak tepat pada situs acak atau bahkan tidak terjadi penempelan sama sekali pada sampel DNA. Menurut Asif et al. (2021) amplifikasi DNA sampel melalui PCR membutuhkan penempelan primer pada situs target pada suhu leleh (T_m) tertentu. Suhu T_m optimal sebaiknya berada antara 52-60 °C. Suhu *annealing* (T_a) biasanya ditetapkan 5 °C lebih rendah dari suhu leleh yang dihitung.

Tidak semuanya primer ISSR yang dioptimasi pada rentang suhu yang digunakan menunjukkan keberhasilan mengamplifikasi DNA *A. pictum* dengan baik. Primer ISSR2 dan ISSR4 meskipun mampu mengamplifikasi DNA *A. pictum* tetapi hasilnya *smear* (Gambar 2; Tabel 2), sehingga belum dapat ditentukan suhu *annealing* optimalnya. Pembentukan *smear* pada elektroforesis gel terdiri dari dua jenis, yaitu *smear* dengan berat molekul rendah dan *smear* dengan berat molekul tinggi. Penggunaan *template* DNA yang berlebihan sering menyebabkan munculnya *smear* pada hasil PCR. Penyebab lainnya dapat berupa kontaminasi atau terlalu banyaknya siklus PCR yang akhirnya menghasilkan produk non-spesifik (Asif et al. 2021). Selain itu, Mulyani et al. (2011) juga menyatakan bahwa *smear* yang dihasilkan pada proses elektroforesis dapat disebabkan oleh adanya kontaminasi pada produk DNA atau adanya degradasi pada DNA. Disamping itu, amplifikasi pita DNA hanya akan terjadi jika urutan DNA pada primer ISSR sesuai dengan urutan basa pada bagian inter mikrosatelit genom sampel tanaman (Wang et al., 2009). Hal ini diperkuat oleh Tingey et al. (1994) yang menyatakan bahwa keberhasilan amplifikasi bergantung pada keberadaan atau ketiadaan urutan DNA yang bersifat komplementer atau homolog dengan urutan pada primer. Guna mengatasi terjadinya *smear* pada saat proses PCR menurut Asif et al. (2021) meliputi menggunakan campuran reaksi baru dan *nuclease-free water*, mengurangi jumlah DNA cetakan yang digunakan, menggunakan siklus PCR antara 25-35 kali, dan mengurangi waktu tahap ekstensi serta meningkatkan suhu *annealing*.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil optimasi, diketahui bahwa sepuluh dari 12 primer ISSR dapat mengamplifikasi DNA sampel *A. pictum* dengan suhu *annealing* yang optimal yaitu primer ISSR1, ISSR3, ISSR5, ISSR6, ISSR7, ISSR8, ISSR9, ISSR10, ISSR11 dan ISSR12. Primer ISSR1 dan ISSR12 menunjukkan hasil optimal pada suhu 52°C, sementara primer ISSR5 dan ISSR11 pada suhu 52,6°C. Primer ISSR3, ISSR8, dan ISSR9 menunjukkan hasil optimal pada suhu 53,6°C, sedangkan primer ISSR6, ISSR7, dan ISSR10 pada suhu 54°C. Disisi lain, primer ISSR2 dan ISSR4 belum dapat diidentifikasi suhu *annealing* optimalnya.

Daftar Pustaka

- Amiteye, S. 2021. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon* 7: e08093.
- Anil S.R., Siril, E.A., Beevy, S.B.S. 2019. Genetic diversity and structure in *Amorphophallus* spp. Blume ex Decne. using morphological and ISSR markers. *International Journal of Vegetable Science*. 25(5): 457-481.
- Asif, S., Khan, M., Arshad, M.W., Shabbir, M.I. 2021. PCR optimization for beginners: a step by step guide. *Research in Molecular Medicine*. 9(2): 81-102.
- Bakappa, S., Gopal, S. 2014. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers for assessment of genetic polymorphism and phylogenetic relationships of the silkworm *Bombyx mori* L. *Annual Research & Review in Biology*. 4(6): 897-905.

- Bidyananda, N., Jamir, I., Nowakowska, K., Varte, V., Vendrame, W.A., Devi, R.S., Nongdam, P. 2024. Plant genetic diversity studies: insights from DNA marker analyses. *International Journal of Plant Biology*. 15(3): 607-640.
- Bidyananda, N., Jamir, I., Nowakowska, K., Varte, V., Vendrame, W.A., Devi, R.S., Nongdam, P. 2024. Plant genetic diversity studies: insights from DNA marker analyses. *International Journal of Plant Biology*. 15: 607-640.
- Bisoyi, K.M., Acharya, L., Mukherjee, A.K., Panda, P.C. 2010. Study of inter-specific relationship in six species of *Sesbania* Scop. (Leguminosae) through RAPD and ISSR markers. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 2(2): 11-17.
- Hikmatyar, M.F., Royani, J.I., Dasumiati. 2015. Isolasi dan amplifikasi DNA keladi tikus (*Thyponium flagelliform*) untuk identifikasi keragaman genetik. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 2(2): 42-48.
- Hussain, H., Nisar, M. 2020. Assessment of plant genetic variations using molecular markers: a review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 8: 99-109.
- Hussain, S.M., Sharif, A., Bashir, F., Ali, S., Javid, A., Hussain, A.I., Ghafoor, A., Alshehri, M.A., Naeem, A., Naeem, E., Amjad, M. 2025. Polymerase chain reaction: a toolbox for molecular discovery. *Molecular Biotechnology*. 2025 Feb 15.
- Khajudparn, P., Prajongjai, T., Poolsawat, O., Tantasawat, P.A. 2012. Application of ISSR markers for verification of F1 hybrids in mungbean (*Vigna radiata*). *Genetic and Molecular Research*. 11(3): 3329-3338.
- Khaled, A., Khalaf, H. 2015. Association of molecular markers with phenotypic traits of bread wheat genotypes. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*. 44: 115-130.
- McDonald, C., Taylor, D., Linacre, A. 2024. PCR in forensic science: a critical review. *Genes*. 15: 438.
- Muliana, G.H. 2022. Tentang *Aglaonema*. Sukabumi: CV Jejak Publisher.
- Mulyani, N.A., Purwanto, I., Nurruhwati. 2011. Perbandingan beberapa metode isiasi DNA untuk deteksi dini koi herpes virus (KHU) pada ikan mas (*Crypinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*. 2(1): 1-15.
- Parashkumar, R., Anoop, K.P., Sivu, A.R., Ansari, R., Pradeep, N.S., Madhusoodanan, P.V. 2015. Analysis of genetic diversity of *Lagenandra* spp. (Araceae) of Kerala (South India) using ISSR markers. *Botany*. 4(6): 775-777.
- Rif'atunidaudina, R., Sobir, Maharijaya, A. 2019. Keanekaragaman sumberdaya genetik sayuran polong potensial di Indonesia berdasarkan penanda molekuler ISSR. *Jurnal Hortikultura Indonesia*. 10(3):161-172.
- Sarwat, M. 2012. ISSR: A Reliable and Cost-Effective Technique for Detection of DNA Polymorphism. In: Sucher, N., Hennell, J., Carles, M. (eds) *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding. Methods in Molecular Biology*, vol 862. New Jersey: Humana Press.
- Sauer P., Muller, M.M., Kang, J.1998. Quantitation of DNA. *Qiagen News*. 2(1): 23- 26.
- Shafura, N., Rabbani, A., Daryono, B.S. 2022. Genetic variability of eggplant (*Solanum Melongena* L. 'Nasubi') based on ISSR markers and phenotypic characters. *Journal of Biodiversity and Biotechnology*. 2(2): 53–62.
- Smitsen, R.D., Breitwieser, I., Ward, J.M., McLenachan, P.A., Lockhart, P.J. 2003. Use of ISSR profiles and ITS-sequences to study the biogeography of alpine cushion plants in the genus *Raoulia* (Asteraceae). *Plants Systematic and Evolution*. 239: 79-94.
- Tikendra, L., Koijam, A.S., Nongdam, P. 2019. Molecular markers based genetic fidelity assessment of micropropagated *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. *Meta Gene*. 20: 100562.
- Tingey, S.V., Rafalski, J.A., Hanafey, M.K. 1994. Genetic analysis with RAPD markers. *Plant Molecular Biology*. 81: 491-500.

- Tonk, F.A., Tosun, M., Ilker, E., Istiqliler, D. Tatar, Q. 2014. Evaluation and comparison of ISSR and RAPD markers for assessment of genetic diversity in triticales genotypes. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 20(6): 1413-1420.
- Wang, H.Z., Feng, S.G., Lu, J.J., Shi, N.N., Liu, J.J. 2009. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*. 122(3): 440-447.
- Yuzammi, Y. 2018. The diversity of aroids (Araceae) in Bogor Botanic Gardens, Indonesia: collection, conservation and utilization. *Biodiversitas*. 19(1): 140-152.