

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR**OPTIMASI SUHU ANNEALING PRIMER *matK* dan *ITS1* PADA DNA *Melothria pendula* L. DENGAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)****OPTIMIZATION OF ANNEALING TEMPERATURE FOR *matK* AND *ITS1* PRIMERS IN DNA OF *Melothria pendula* L. USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHOD**

Sitri Hasugian, Brian Rahardi, Turhadi Turhadi*

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang 65145

*Corresponding author: turhadibiologi@ub.ac.id

Abstrak

Melothria pendula L. merupakan tumbuhan merambat dari famili Cucurbitaceae yang memiliki potensi biologis tinggi, namun identifikasinya sulit dilakukan secara morfologi terutama pada fase vegetatif. Identifikasi molekuler berbasis DNA menjadi alternatif yang lebih akurat, dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) sebagai tahap penting untuk mengamplifikasi fragmen gen target. Keberhasilan PCR sangat dipengaruhi oleh optimasi suhu *annealing*, karena suhu yang tidak sesuai dapat menyebabkan amplifikasi nonspesifik atau kegagalan pembentukan produk. Penelitian ini bertujuan menentukan suhu *annealing* optimum primer *matK* dan *ITS1* dalam amplifikasi DNA *M. pendula* menggunakan metode *gradient* PCR. DNA diisolasi dari daun segar menggunakan metode CTAB dengan hasil konsentrasi 1.091,50 ng/ μ L dan rasio kemurnian A_{260}/A_{280} sebesar 1,958. Proses amplifikasi dijalankan pada rentang suhu 40-60°C. Hasil menunjukkan bahwa suhu *annealing* optimum untuk primer *matK* adalah 51,2°C menghasilkan pita target ~900 bp, sedangkan *ITS1* optimal pada 56°C dengan pita target ~300 bp. Kedua suhu menghasilkan pita tunggal yang tebal, jelas, dan tanpa *multiband* atau primer dimer. Optimasi suhu *annealing* berperan penting dalam meningkatkan efisiensi dan spesifisitas amplifikasi PCR untuk mendukung identifikasi molekuler *M. pendula*.

Kata kunci : *ITS1*, *matK*, optimasi, PCR, *Melothria pendula*, suhu *annealing***Abstract**

Melothria pendula L. is a climbing plant from the Cucurbitaceae family with high biological potential; however, its identification is challenging based on morphology, particularly during the vegetative phase. DNA-based molecular identification provides a more accurate alternative, with the polymerase chain reaction (PCR) serving as a crucial technique for amplifying specific gene fragments. The success of PCR is strongly influenced by the optimization of annealing temperature, as inappropriate temperatures can lead to nonspecific amplification or failure to generate PCR products. This study aimed to determine the optimal annealing temperature for *matK* and *ITS1* primers in the amplification of *M. pendula* DNA using a gradient PCR approach. DNA was isolated from fresh leaves using the CTAB method, yielding a concentration of 1,091.50 ng/ μ L with an A_{260}/A_{280} purity ratio of 1.958. PCR amplification was performed across an annealing temperature range of 40-60°C. The results showed that the optimal annealing temperature for the *matK* primer was 51.2°C, producing a single ~900 bp target band, while *ITS1* was optimal at 56°C, producing a single ~300 bp band. Both temperatures yielded clear, distinct, and specific single bands without multiband formation or primer-dimer artifacts. Optimization of the annealing temperature is therefore essential to enhance PCR efficiency and specificity in supporting the molecular identification of *M. pendula*.

Kata kunci : *ITS1*, *matK*, optimization, PCR, *Melothria pendula*, annealing temperature

Pendahuluan

Melothria pendula L. merupakan tumbuhan merambat anggota famili Cucurbitaceae yang merupakan satu-satunya spesies introduksi dari genus *Melothria* di kawasan Asia (de Wilde & Duyfjes, 2006; de Wilde & Duyfjes, 2010; Arifiani dkk., 2024). Spesies ini berasal dari Amerika dengan wilayah distribusi mulai dari Texas, Amerika Utara hingga Argentina, Amerika Selatan, namun telah berhasil menyebar dan beradaptasi di berbagai wilayah tropis Asia, termasuk Indonesia (de Wilde & Duyfjes, 2010; POWO, 2023). Di Indonesia, *M. pendula* telah dilaporkan tumbuh di berbagai daerah seperti Sulawesi Tengah (Laratu dkk., 2014), Jambi (Syafid, 2018), Kalimantan Selatan (Lestari & Maulana, 2020), Sumatera Utara (Mustaqim dkk., 2020), NTT (Randjamandi, 2020), Jawa Timur (Imamah, 2022), Kalimantan Timur (Putera dkk., 2023), Jawa Tengah (Pramadaningtyas dkk., 2023), Jawa Barat (Husaini dkk., 2024), dan Maluku Utara (Arifiani dkk., 2024).

Melothria pendula L. diketahui mengandung protein (12,6%), serat (16,3%), karbohidrat (56,8%), serta berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, saponin, dan terpenoid yang berpotensi memiliki aktivitas farmakologis, antara lain sebagai antimikroba, antidiare, analgesik, dan antiinflamasi (Dianito dkk., 2022; González-Santos dkk., 2024). Di beberapa negara seperti Meksiko dan Filipina, tanaman ini bahkan telah dimanfaatkan dalam pengobatan herbal dan sebagai bahan pangan alternatif (Casas & Vázquez, 2023). Namun, potensi tersebut belum dimanfaatkan secara optimal karena penelitian terhadap spesies ini masih sangat terbatas meskipun persebarannya di Indonesia cukup luas dan menjanjikan untuk dikembangkan lebih lanjut.

Salah satu kendala utama dalam pengkajian dan pemanfaatan *M. pendula* adalah kesulitan dalam proses identifikasi, terutama pada fase vegetatif awal. Hal ini disebabkan karena tingginya tingkat kemiripan morfologi antarspesies dalam famili Cucurbitaceae (Turhadi dkk., 2024; Nurbaiti dkk., 2025). Identifikasi yang akurat sangat penting sebagai dasar dalam kegiatan bioprospeksi dan pemanfaatan sumber daya hayati secara berkelanjutan. Namun, identifikasi berdasarkan karakter morfologi sering terkendala khususnya pada sampel yang sangat bervariasi karena adanya pengaruh lingkungan. Di sisi lain, identifikasi yang mengandalkan karakter morfologi juga memerlukan waktu yang lama hingga mencapai fase generatif. Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, pendekatan berupa teknik identifikasi secara molekuler menjadi solusi yang lebih efektif. Metode ini menggunakan informasi genetik dari sekuens DNA untuk mengenali dan membedakan spesies secara lebih akurat (Hebert & Gregory, 2005). Identifikasi molekuler terbukti mampu mengatasi kendala identifikasi morfologi pada spesimen yang rusak, karakter morfologi yang mirip, atau berada pada tahap pertumbuhan yang sulit dibedakan (Antil dkk., 2023; Kartzinel dkk., 2025).

Keunggulan utama pendekatan molekuler adalah stabilitasnya terhadap pengaruh lingkungan sehingga dapat dilakukan pada semua fase pertumbuhan tanaman. Keberhasilan identifikasi molekuler bergantung pada pemilihan marka genetik yang tepat karena setiap sekuens DNA memiliki karakter spesifik (Rahayu & Jannah, 2019). Beberapa wilayah genetik yang umum digunakan dalam identifikasi tumbuhan meliputi *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnL-trnF*, *psbK-psbI*, *atpF-atpH*, *ITS*, dan *ITS2* (Letsiou dkk., 2024). Selain pemilihan marka genetik, ketersediaan primer yang spesifik dan teroptimasi juga menjadi faktor penting dalam keberhasilan amplifikasi DNA.

Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode yang paling umum digunakan untuk memperbanyak fragmen DNA target secara *in vitro* melalui tiga tahap utama, yaitu denaturasi, *annealing*, dan ekstensi (Yu dkk., 2017; Khehra dkk., 2025). PCR memiliki tingkat sensitivitas yang sangat tinggi, sehingga proses optimasi

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR

kondisi reaksi sering menjadi tantangan untuk memperoleh hasil amplifikasi yang optimal, terutama pada DNA cetakan dengan kandungan GC tinggi. Daerah kaya basa GC cenderung membentuk struktur sekunder yang stabil dan kompleks yang dapat menghambat kerja DNA polimerase dan menurunkan efisiensi amplifikasi (Obradovic dkk., 2013). Dalam proses ini, primer berperan penting sebagai inisiator reaksi yang menentukan keberhasilan amplifikasi (Kurniati dkk., 2025). Primer merupakan oligonukleotida tunggal sepanjang 10-30 nukleotida yang menempel pada daerah spesifik DNA target dan menjadi titik awal bagi enzim DNA polimerase untuk memulai proses replikasi (Kadri, 2020).

Keberhasilan reaksi PCR sangat bergantung pada spesifisitas dan kualitas primer, terutama pada tahap *annealing*, yaitu fase ketika primer berikatan dengan DNA cetakan (Erjavec, 2020). Suhu *annealing* yang tidak sesuai dapat menyebabkan hasil amplifikasi yang tidak spesifik, munculnya pita DNA ganda, atau bahkan kegagalan pembentukan produk PCR (Ruiz-Villalba dkk., 2017). Oleh karena itu, optimasi primer menjadi langkah penting untuk mendapatkan kondisi PCR yang ideal, efektif dan efisien (Maharani dkk., 2025; Baharuddin dkk., 2026). Optimasi suhu *annealing* dilakukan menggunakan teknik *gradient* PCR, yaitu dengan menguji beberapa variasi suhu *annealing* dalam rentang tertentu untuk menentukan suhu optimal yang menghasilkan pita DNA tunggal dengan intensitas jelas dan ukuran sesuai gen target. Kondisi terbaik dipilih berdasarkan hasil amplifikasi yang paling spesifik dan memiliki intensitas pita tertinggi (Kurniati dkk., 2025).

Keberhasilan optimasi suhu *annealing* untuk primer *matK* dan *ITS* telah banyak dilaporkan dalam berbagai penelitian, salah satunya penggunaan *gradient* PCR pada *Durio zibethinus* dan *Citrus maxima* yang berhasil mengidentifikasi kisaran suhu *annealing* yang efektif, yaitu 49–55°C untuk *matK* dan sekitar 58°C untuk *ITS* (Khang dkk., 2021). Temuan lainnya juga pernah dilakukan pada *Nepenthes spathulata* yang menghasilkan pita *matK* yang jelas dan tunggal (Utama dkk., 2023), *Bulbophyllum lobbii* yang menunjukkan pita DNA *matK* dan *ITS2* yang konsisten serta sesuai ukuran target (Su'udi dkk., 2024), serta pada pengembangan protokol amplifikasi *ITS1* yang berhasil diterapkan pada berbagai sampel tumbuhan melalui penentuan suhu *annealing* optimal sebagai faktor kunci (Omelchenko dkk., 2023). Hasil temuan tersebut menegaskan bahwa optimasi suhu *annealing* merupakan tahap awal yang penting untuk memperoleh amplifikasi primer yang akurat, konsisten, dan dapat direplikasi pada berbagai spesies tumbuhan.

Optimasi suhu *annealing* sangat penting dilakukan untuk meningkatkan efisiensi proses amplifikasi serta kualitas produk PCR yang dihasilkan (Fatoni dkk., 2025). Penentuan suhu *annealing* yang optimal memungkinkan proses amplifikasi berlangsung secara lebih spesifik dan efisien, sehingga dapat mengurangi pemborosan *reagen*, meminimalkan kesalahan hasil, serta meningkatkan konsistensi amplifikasi, terutama ketika jumlah sampel terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan suhu *annealing* optimum terhadap primer *matK* dan *ITS1* yang digunakan dalam identifikasi molekuler *Melothria pendula* L. Hasil yang diperoleh diharapkan dapat menyediakan kondisi PCR yang terstandar bagi kedua marka tersebut, sehingga proses identifikasi spesies dapat dilakukan secara lebih tepat dan konsisten. Optimalisasi ini juga mendukung pengembangan studi taksonomi, bioprospeksi, dan pemanfaatan sumber daya genetik *M. Pendula* secara lebih luas di masa mendatang.

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan, dan Mikroteknik Tumbuhan, Departemen Biologi, Universitas Brawijaya pada Agustus-Oktober 2025. Kegiatan penelitian meliputi koleksi sampel *Melothria pendula* di kawasan Universitas Brawijaya, isolasi DNA total, uji kualitatif dan kuantitatif DNA, amplifikasi daerah target menggunakan PCR, serta analisis hasil amplifikasi.

Ekstraksi DNA Total

Sampel yang digunakan berupa daun segar *M. pendula*. Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan metode Orozco-Castillo dkk. (1994) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 1000 μL *buffer Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) 2% dipanaskan pada suhu 65°C selama 1 jam. Sampel daun seberat 0,1 gram digerus hingga halus dengan bantuan nitrogen cair, kemudian dimasukkan ke dalam *tube* berkapasitas 2 mL. Serbuk daun yang telah halus dicampurkan dengan 1 mL *buffer* CTAB panas dan sedikit serbuk PVP, kemudian divortex hingga homogen.

Campuran diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dan di-*invert* perlahan, lalu diinkubasi kembali pada suhu ruang selama 5 menit. Larutan disentrifugasi pada suhu 25°C dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam *tube* baru 2 mL, ditambahkan *chloroform isoamyl alcohol* (CI) dengan perbandingan 1:1; v/v, kemudian di-*invert* untuk homogenisasi. Proses sentrifugasi diulangi dua kali dengan kondisi yang sama hingga diperoleh supernatan jernih.

Supernatan dipindahkan ke *tube* baru 1,5 mL, kemudian ditambahkan isopropanol dingin (1:1; v/v) dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 30 menit. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet yang diperoleh dikeringanginkan ± 15 menit. Pelet kemudian dilarutkan dengan 25 μL CH_3COONa 3M pH 5,2 (1/10x volume) dan 250 μL etanol absolut, kemudian dihomogenkan dengan pipet. Campuran diinkubasi pada suhu -20°C selama 24 jam.

Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan 500 μL etanol 70%, kemudian disentrifugasi ulang dalam kondisi yang sama. Pelet dikeringanginkan ± 1 jam, kemudian dilarutkan dalam 30-50 μL *buffer* TE tergantung jumlah pelet. RNase sebanyak 1 μL ditambahkan, lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit. Sampel DNA disimpan dalam *freezer* suhu -20°C.

Uji Kualitatif dan Kuantitatif Kualitas DNA

Kualitas DNA diuji menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Sebanyak 0,4 g agarosa dilarutkan dalam 40 mL TBE 0,5x, dipanaskan hingga homogen, kemudian dituangkan ke dalam cetakan dan dibiarkan memadat ± 30 menit. Gel ditempatkan dalam bak elektroforesis berisi 300 mL *buffer* TBE 0,5x hingga terendam seluruhnya. DNA *ladder* 1 kb (Promega, USA) sebanyak 3 μL dicampurkan dengan 1 μL SYBR DNA dan dimasukkan ke dalam sumuran gel. Sampel DNA sebanyak 3 μL dicampurkan dengan 1 μL SYBR DNA dan 1 μL *loading dye*, lalu dimasukkan ke sumuran berikutnya. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 50 V selama 50 menit. Gel diamati menggunakan alat *DNA Gel Documentation* (LICOR oT 3500-00, LI-COR Bioscience, USA). Kuantifikasi DNA dilakukan di Laboratorium Riset Terpadu, Universitas Brawijaya, menggunakan alat NanoPhotometer® NP80 (Implen, Inc., USA). *Buffer* TE digunakan sebagai blanko. Sebanyak 1 μL DNA diukur pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm untuk menentukan konsentrasi dan kemurnian DNA.

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR

Amplifikasi Daerah Target dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan alat *TaKaRa PCR Thermal Cycles* (USA) dengan primer spesifik untuk *ITS1 (Internal Transcribed Spacer)* dan gen *matK (maturase K)* (Kocyan dkk., 2007) pada (Tabel 1). Campuran reaksi PCR terdiri dari 5 μL *GoTaq® Green Master Mix* (Promega, USA), 0,5 μL primer *forward*, 0,5 μL primer *reverse*, 3 μL *nuclease-free water* (Promega, USA), dan 1 μL DNA total (30 ng/ μL). Program PCR untuk primer *matK* dimulai dengan pra-denaturasi 3 menit pada 95°C, diikuti 35 siklus yang terdiri atas denaturasi 30 detik pada 95°C, *annealing* 30 detik pada suhu gradien, dan ekstensi 1 menit 30 detik pada 72°C. Tahap akhir dilakukan ekstensi 5 menit pada 72°C. Sementara itu, untuk primer *ITS1*, program PCR terdiri dari pra-denaturasi 1 menit pada 95°C, diikuti 35 siklus denaturasi 15 detik pada 95°C, *annealing* 15 detik pada suhu gradien, dan ekstensi 10 detik pada 72°C, serta ekstensi akhir selama 5 menit pada 72°C. Hasil amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1% untuk memvisualisasikan ukuran fragmen DNA yang dihasilkan.

Tabel 1. Profil primer *ITS1* dan *matK* yang digunakan dalam penelitian

Primer	Sekuen (5'-3')	Panjang Amplikon (bp)	Referensi
<i>ITS1-F</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	~300	Turhadi dkk., 2025
<i>ITS1-R</i>	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	~300	Turhadi dkk., 2025
<i>matK-413f-1</i>	TAATTTACRATCAATTCATTCAATATTTCC	~900	Heckenhauer dkk., 2016
<i>matK-1227r-3</i>	GARGATCCRCRTRTRATAATGAAAAAGATTT	~900	Heckenhauer dkk., 2016

Analisis Data

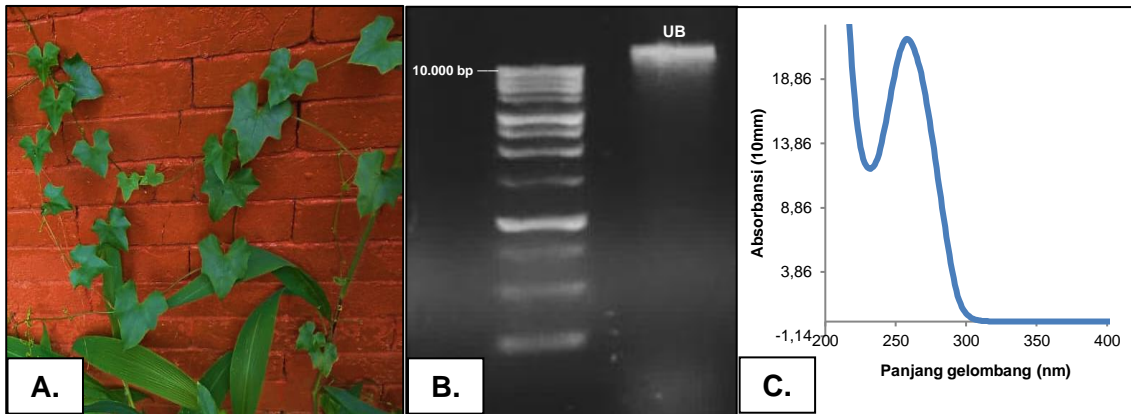
Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif berdasarkan hasil elektroforesis untuk mengamati keberhasilan amplifikasi DNA melalui kemunculan pita DNA target.

Hasil dan Pembahasan

Hasil

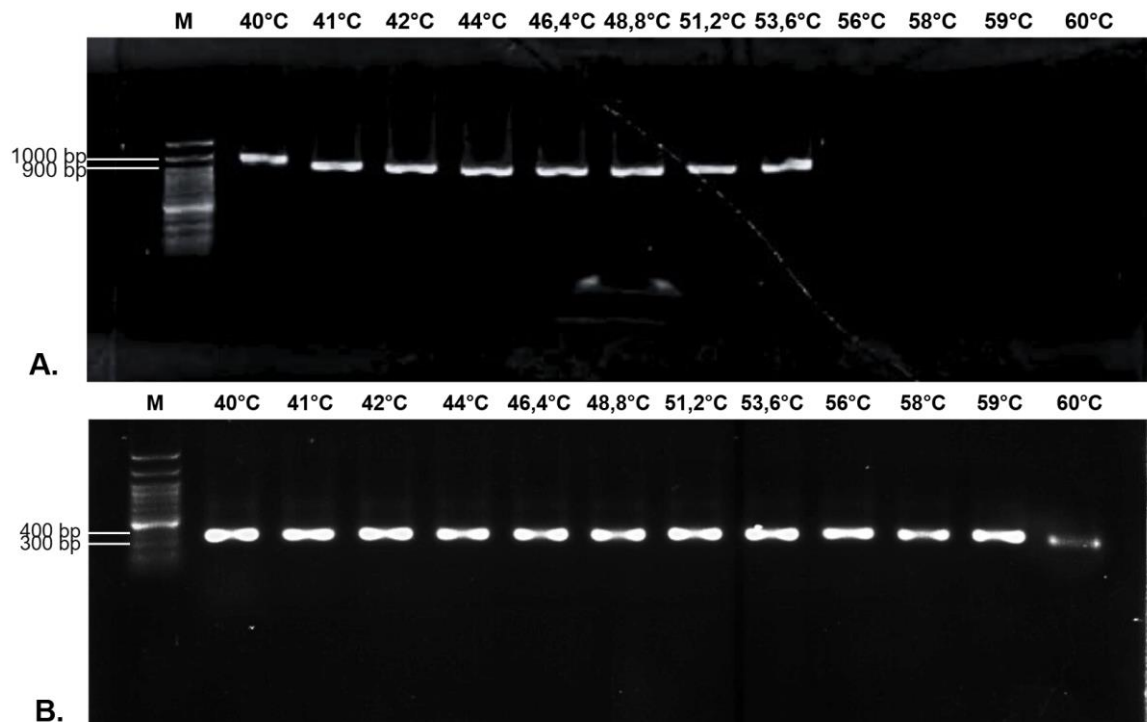
Proses isolasi DNA dari daun segar *M. pendula* (Gambar 1A) menggunakan metode CTAB menghasilkan DNA dengan kualitas yang baik, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Hasil elektroforesis gel agarosa memperlihatkan pita DNA tunggal yang tebal, jelas, dan tanpa *smear* (Gambar 1B). Pita DNA tersebut terletak di atas marker 10.000 bp, yang mengindikasikan bahwa DNA yang diperoleh merupakan genom utuh tanpa fragmentasi selama proses isolasi. Sementara itu, analisis kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan konsentrasi DNA sebesar 1.091,50 ng/ μL dengan rasio kemurnian A_{260}/A_{280} sebesar 1,958 (Gambar 1C). Nilai rasio tersebut mengonfirmasi bahwa DNA hasil isolasi memiliki kemurnian tinggi dan minim kontaminasi protein atau senyawa pengganggu lainnya. Dengan demikian, DNA yang diperoleh layak digunakan untuk tahap optimasi lebih lanjut.

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR



Gambar 1. Uji kualitatif dan kuantitatif DNA *M. pendula* hasil isolasi. Tanaman *M. pendula* (A); pita elektroforegram DNA (B); dan *chromatogram* DNA (C).

Pada tahap optimasi, gradien suhu untuk amplifikasi gen *matK* dilakukan pada rentang suhu 40-60°C (Tabel 2). Pada suhu 40°C, teramati munculnya pita DNA yang tebal namun ukurannya tidak sesuai dengan target yang diharapkan (~1000 bp), kemungkinan akibat pelekatan primer yang kurang spesifik. Amplifikasi berhasil menghasilkan pita target dengan ukuran sekitar 900 bp pada rentang suhu 41-53,6°C (Gambar 2A). Intensitas pita pada rentang suhu tersebut sangat tinggi dan tidak ditemukan adanya pita tambahan maupun primer dimer. Kegagalan amplifikasi terjadi pada suhu 56°C ke atas, dimana tidak ada pita yang terdeteksi. Hal ini menunjukkan bahwa pada suhu tinggi, primer tidak mampu berikatan dengan DNA cetakan. Berdasarkan hasil evaluasi, suhu 51,2°C dipilih sebagai suhu *annealing* optimal untuk gen *matK* karena menunjukkan hasil amplifikasi terbaik.



Gambar 2. Hasil PCR dengan primer *matK* (A) dan *ITS1* (B)

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR

Tabel 2. Hasil optimasi PCR dengan primer *matK* dan *ITS1*

Primer	Karakteristik	40	41	42	44	46,4	48,8	51,2	53,6	56	58	59	60	
<i>matK</i>	Kemunculan pita	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	
	Multiband *)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Jumlah pita	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	
	Ketepatan ukuran pita target *)	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	
	Ketebalan/kejelasan pita target **)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
	Primer dimer *)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ITS1</i>	Kemunculan pita	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Multiband *)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Jumlah pita	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Ketepatan ukuran pita target *)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Ketebalan/kejelasan pita target **)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+
	Primer dimer *)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: *) tanda ✓ pita muncul/ *multiband*/ ukuran pita sesuai/ muncul primer dimer; tanda – pita tidak muncul/ tidak *multiband*/ ukuran pita tidak sesuai/ tidak muncul primer dimer. **) tanda +++ sangat tebal, ++ cukup tebal, + tipis.

Berbeda dengan gen *matK*, primer *ITS1* menunjukkan kemampuan amplifikasi pada seluruh rentang suhu yang diuji (40-60°C) (Tabel 2). Pita target berukuran sekitar 300 bp muncul pada semua variasi suhu dengan intensitas yang berbeda-beda (Gambar 2B). Intensitas pita tertinggi diperoleh pada rentang suhu 40-56°C dan 59°C. Penurunan intensitas mulai terlihat pada suhu 58°C dan menjadi semakin tipis pada suhu 60°C. Tidak ditemukan adanya *multiband* atau primer dimer pada seluruh rentang suhu yang diuji. Ukuran pita yang dihasilkan konsisten sesuai dengan target yakni sebesar ~300 bp. Berdasarkan hasil evaluasi, suhu 56°C ditetapkan sebagai suhu *annealing* optimal untuk primer *ITS1* karena menghasilkan pita dengan intensitas paling maksimal.

Pembahasan

Keberhasilan amplifikasi PCR sangat bergantung pada kualitas DNA cetakan yang digunakan. Rasio A_{260}/A_{280} sebesar 1,958 yang diperoleh dari hasil isolasi DNA *M. Pendula* menunjukkan kemurnian yang sangat baik. Nilai tersebut berada dalam rentang standar 1,8-2,0 yang menandakan bahwa DNA bebas dari kontaminan yang dapat menghambat aktivitas DNA polimerase (Lorenz, 2012). Apabila nilai rasio A_{260}/A_{280} berada di bawah 1,8, hal ini menunjukkan adanya kontaminasi protein, fenol, atau senyawa-senyawa lainnya. Sebaliknya, nilai rasio yang melebihi 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi RNA (Lucena-Aguilar dkk., 2016). Selain itu, konsentrasi DNA hasil isolasi mencapai 1.091,50 ng/μl dengan hasil visualisasi gel agarosa menunjukkan pita DNA tebal, jelas, dan tanpa *smear* yang mengindikasikan bahwa DNA yang diperoleh berkualitas tinggi dan tidak mengalami degradasi (Sundari dkk., 2019; Setiati dkk., 2020). Sebelum dilakukan amplifikasi, DNA diencerkan menjadi 30 ng/μl untuk memperoleh efisiensi PCR yang optimal, mengingat konsentrasi DNA yang terlalu tinggi dapat memicu amplifikasi nonspesifik, sedangkan konsentrasi terlalu rendah berisiko

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR

menghasilkan produk amplifikasi minimal (Miller dkk., 2016; Mazlan dkk., 2024). Kualitas DNA yang baik ini menjadi prasyarat penting untuk keberhasilan tahap optimasi suhu *annealing* selanjutnya.

Optimasi suhu *annealing* merupakan tahap penting dalam menentukan keberhasilan amplifikasi PCR karena secara langsung memengaruhi spesifisitas dan efisiensi penempelan primer pada DNA cetakan. Suhu *annealing* yang tidak optimal dapat menimbulkan dua permasalahan. Pertama, suhu yang terlalu rendah menyebabkan *mis-priming* atau penempelan primer secara nonspesifik sehingga menghasilkan *multiband* atau *smear* pada gel. Kedua, suhu yang terlalu tinggi justru menghambat hibridisasi primer dengan DNA cetakan sehingga produk amplifikasi tidak terbentuk (Lorenz, 2012; Obradovic dkk., 2023). Oleh karena itu, penentuan suhu *annealing* yang tepat menjadi kunci untuk memperoleh hasil amplifikasi yang spesifik dan efisien.

Berdasarkan hasil optimasi, diperoleh suhu 51,2°C sebagai kondisi optimal untuk primer *matK*, sedangkan suhu 56°C optimal untuk primer *ITS1*. Pada kedua suhu tersebut, visualisasi gel agarosa menunjukkan satu pita target yang tebal dan jelas tanpa adanya *multiband* atau primer dimer. Ketebalan pita mencerminkan tingginya efisiensi amplifikasi DNA, sementara keberadaan pita tunggal tanpa pita tambahan mengindikasikan bahwa primer menempel dengan spesifik pada urutan target (Mazlan dkk., 2024). Penetapan kedua suhu optimal ini mempertimbangkan keseimbangan antara efisiensi hibridisasi dan pencegahan amplifikasi nonspesifik. Menurut Mubarak dkk. (2020) dan Asif dkk. (2021), suhu *melting* (T_m) yang optimal umumnya berada dalam rentang 52-60°C, sehingga suhu *annealing* (T_a) ditetapkan sekitar 5°C di bawah suhu *melting* (T_m) primer. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat menghambat penempelan (hibridisasi) primer pada DNA cetakan, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat meningkatkan risiko amplifikasi nonspesifik (Lorenz dkk., 2012; Mubarak dkk., 2020). Oleh karena itu, suhu yang dipilih berada pada rentang tersebut untuk menghindari risiko penempelan nonspesifik yang cenderung terjadi pada suhu yang terlalu mendekati ~40°C. Meskipun demikian, rentang suhu 40-53,6°C untuk *matK* dan 40-59°C untuk *ITS1* masih dimungkinkan sebagai alternatif, bergantung pada kondisi reaksi dan karakteristik DNA cetakan yang digunakan.

Perbedaan suhu optimal antara primer *matK* dan *ITS1* juga dapat dijelaskan melalui karakteristik molekuler kedua gen tersebut. Gen *matK* merupakan gen kloroplas berukuran ±900 bp pada kelompok Cucurbitaceae yang berperan sebagai katalis dalam pemotongan intron tipe-II (Mathew & Ramesh, 2020; Ahmad & Asif, 2023; Letsiou dkk., 2024). Gen ini memiliki tingkat substitusi yang tinggi pada daerah penempelan primer (*primer binding sites*), sehingga seringkali menyulitkan proses amplifikasi karena primer universal gagal menempel secara spesifik akibat variasi basa antarspesies (Miao dkk., 2019). Berbeda dengan *matK*, *ITS1* merupakan wilayah non-koding pada DNA ribosom inti berukuran 200-300 bp yang berperan dalam pematangan rRNA (Sarvananda, 2018; Ahmad & Asif, 2023; Letsiou dkk., 2024). Fragmen *ITS* umumnya lebih mudah diamplifikasi dan menunjukkan performa PCR yang lebih baik dibandingkan dengan DNA *barcode* lainnya (Osman, 2024).

Penentuan suhu *annealing* optimal bagi primer *matK* dan *ITS1* pada DNA *Melothria pendula* merupakan langkah penting dalam memastikan keberhasilan identifikasi molekuler *M. Pendula*. Kondisi PCR yang telah dioptimalkan memungkinkan kedua primer tersebut bekerja secara efisien untuk mengamplifikasi fragmen DNA *barcode* yang diperlukan dalam studi taksonomi molekuler, autentifikasi spesies, analisis filogenetik pada famili Cucurbitaceae, maupun aplikasi penelitian lainnya. Hasil optimasi ini dapat dijadikan acuan bagi penelitian selanjutnya, sehingga mendukung peningkatan akurasi dan konsistensi dalam identifikasi molekuler berbasis PCR.

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR

Kesimpulan

Penelitian ini berhasil menentukan suhu *annealing* optimum untuk identifikasi molekuler *Melothria pendula* L. menggunakan dua primer DNA *barcoding*, yaitu *matK* dan *ITS1*. Hasil menunjukkan bahwa, suhu *annealing* optimal untuk primer *matK* adalah 51,2°C, sedangkan untuk primer *ITS1* adalah 56°C, karena keduanya menghasilkan pita DNA tunggal yang tebal, jelas, dan spesifik tanpa adanya *multiband* maupun primer dimer. Suhu tersebut dinilai paling efisien untuk memperoleh amplifikasi PCR yang optimal dan spesifik.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya atas Pendanaan Penelitian melalui Hibah Internal Skema B dengan Nomor Kontrak 06455.9/UN10.F0901/B/PT/2025. Selain itu, penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Riset Terpadu-Universitas Brawijaya (LRT-UB) telah memfasilitasi penulis untuk mengukur konsentrasi dan kualitas sampel DNA menggunakan instrumen Nanodrop Implen NP80.

Daftar Pustaka

- Ahmad, A. & A. Asif. 2023. Omics studies of medicinal plants. CRC Press, Boca Raton.
- Antil, S., Abraham, J.S., Sripoorna, S., Maurya, S., Dagar, J., Makhija, S., Bhagat, P., Gupta, R., Sood, U., Lal, R. & Toteja, R., 2023. DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. *Rev. Mol. Biol. Rep.*, 50(1): 761-775.
- Arifiani, D., L. D. Sulistyaningsih, Rugayah, & D. Sahroni. 2024. A new record of the creeping cucumber, *Melothria pendula* L. (Cucurbitaceae) from Halmahera, North Maluku, Indonesia. *Biotropia*, 31(3): 432-437.
- Asif, S., Khan, M., Arshad, M. W. & Shabbir, M. I. 2021. PCR optimization for beginners: a step-by-step guide. *Res. Mol. Med.*, 9(2): 81-102.
- Baharuddin, M.F., Hariri, M.R. Turhadi, T. 2026. Suhu annealing primer inter simple sequence repeat (ISSR) pada DNA *Aglaonema pictum* (Roxb.) Kunth. *Bioma* 11(1): 1-9.
- Casas, A. & J. J. B. Vázquez. 2023. *Ethnobotany of the mountain regions of Mexico*. Springer, Switzerland, hal. 1336-1337.
- de Wilde, W. J. J. O. & B. E. E. Duyfjes. 2006. Redefinition of *Zehneria* and four new related genera (Cucurbitaceae), with an enumeration of the Australasian and Pacific species. *Blumea*, 51: 1-88.
- de Wilde, W. J. J. O. & B. E. E. Duyfjes. 2010. *Flora Malesiana Cucurbitaceae*. The Netherlands Centre for Biodiversity Naturalis, Leiden University, The Netherlands.
- Dianito, N. A., F. M. S. Dagalea, M. C. G. Vicencio, & K. M. C. Lima. 2022. Physicochemical properties and antibacterial activity of biosynthesized silver nanoparticles from *Melothria pendula* Linn. (Pipinong-Gubat) leaf extract. *Asian J. Chem. Sci.*, 12(1): 1-11.
- Do, T. K., T. G. Huy, & T. T. Men. 2021. Improvement of DNA barcode amplification using gradient PCR. *Int. J. Agric. Biol. Sci.*, 14-19.
- Erjavec, M. S., 2020. Annealing temperature of 55°C and specificity of primer binding in PCR reactions. IntechOpen, doi: 10.5772/intechopen.85164.
- Fatoni, N.A., Djuminar, A., Hardiana, A.T. & Merdekawati, F., 2025. Optimization of annealing temperature and primer concentration of cytochrome B (cyt b) gene for pig DNA detection with real-time PCR method. *J. Voc. Health Stud.*, 8(3): 164-170.

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR

- González-Santos, R., L. Hernández-Sandoval, & M. Parra-Quijano. 2024. Spatial analysis of the ecogeographic diversity of wild creeping cucumber (*Melothria pendula* L.) for in situ and ex situ conservation in Mexico. *Plants*, 13(18): 2572.
- Haikal Mazlan, A., Muhamad Najib, M. H. A., Hassan, M. H., Mohd Hatta, F. H. & Mohd Yusoff, R. 2024. Effect of DNA template concentration on standard polymerase chain reaction. *Int. J. Pharm. Nutr. Cosmet. Sci.*, 7(1): 1-11.
- Hebert, P. D. N. & T. R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.*, 54(5): 852-859.
- Husaini, L. P., A. H. Widjaya, Saripudin, P. Yuliyanto, D. Latifah, A. S. D. Irsyam, D. Rosleine, & M. R. Hariri. 2024. *Melothria pendula* L. (Cucurbitaceae): first report from Java and range extension in Sumatra, Indonesia. *Check List The Journal of Biodiversity Data*, 20(2): 553-558.
- Imamah, S. 2022. Upaya penanggulangan gulma secara kimiawi dan mekanik terhadap indeks keanekaragaman jenis gulma pada fase pertumbuhan tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) varietas PS 881. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Kadri, K., 2020. Polymerase chain reaction (PCR): principle and applications. IntechOpen, doi:10.5772/intechopen.86491.
- Kartzinel, T. R., H. K. Hoff, T. J. Divoll, B. L. Littleford-Colquhoun, H. Anderson, M. K. Burak, M. L. Kuzmina, P. M. Musili, H. Rogers, A. J. Troncoso, & R. Y. Kartzinel, 2025. Global availability of plant DNA barcodes as genomic resources to support basic and policy-relevant biodiversity research. *Mol. Ecol.*, 34: e17712.
- Khehra, N., I.S. Padda, & M. Zubair., 2025. Polymerase Chain Reaction (PCR). StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>.
- Kurniati, D.E., Riani, C. & Hardiyanti, R., 2025. Optimization of PCR primers for detection of extended-spectrum beta-lactamase targeting CTX-M and TEM genes. *3BIO: J. Biol. Sci. Technol. Manage.*, 7(1): 326-333.
- Laratu, M. I. N., R. Pitopang, & S. M. Suleman. 2014. Keanekaragaman jenis tumbuhan herba pada dua tipe hutan di Desa Bobo Kawasan Taman Nasional Lore Lindu Sulawesi Tengah. *Biocelebes*, 8(2): 13-25.
- Lestari, N. C. & F. Maulana. 2020. Bioprospek Sungai Biuku Desa Selanjung sebagai desa wisata edukasi alam. *J. Pend. Hay.*, 6(4): 179-188.
- Letsiou, S., P. Madesis, E. Vasdekis, C. Montemurro, M. E. Grigoriou, G. Skavdis, V. Moussis, A. E. Koutelidakis, & A. G. Tzakos. 2024. DNA barcoding as a plant identification method. *Appl. Sci.*, 14(4): 1415.
- Lorenz, T. C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. Vis. Exp.*, (63): 3998.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A. & Aguilar-Quesada, R. 2016. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreserv. Biobank.*, 14(4): 264-270.
- Maharani, F. S. B., Hariri, M. R., Turhadi, T. 2025. Optimasi suhu annealing marka molekuler simple sequence repeat (SSR) untuk studi keragaman genetik *Aglaonema pictum* (Roxb.) Kunth. *Biosense* 8(4): 594-605.
- Mathew, D. & Ramesh, G. A. 2020. A universal system for *matK* gene-based diagnostic markers to identify the species in Cucurbitaceae. *Indian J. Hort.*, 77(4): 733-735.
- Miao, L., Li, X. W., Liao, B. S., Luo, L. & Ren, Y. Y. 2019. Species identification of poisonous medicinal plant using DNA barcoding. *Chin. J. Nat. Med.*, 17(8): 585-590.

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR

- Miller, B. R. III., Beese, L. S., Parish, C. A. & Wu, E. Y. 2015. The closing mechanism of DNA polymerase I at atomic resolution. *Structure.*, 23(9): 1609-1620.
- Mubarak, S. M. H., Al-Koofee, D. A. F., Radhi, O. A., Ismael, J. M. & Al-Zubaidi, Z. F. 2020. An optimization and common troubleshooting solving in polymerase chain reaction technique. *Syst. Rev. Pharm.*, 11(2): 427-436.
- Mustaqim, W. A. & H. F. Putra. 2020. *Melothria* (Cucurbitaceae): a new genus record of naturalized cucumber in Sumatra. *Floribunda*, 6(5): 183-187.
- Nurbaiti, D. I. Roslim, & Herman, 2025. A DNA barcoding multilocus analysis in the Cucurbitaceae family. *J. Biol. Tropis.*, 25(2): 1221-1230.
- Obradovic, J., Jurisic, V., Tomic, N., Mrdjanovic, J., Perin, B., Pavlovic, S. & Djordjevic, N. 2013. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-rich EGFR promoter sequence. *J. Clin. Lab. Anal.*, 27: 487-493.
- Omelchenko, D. O., A. S. Speranskaya, A. A. Ayginin, K. Khafizov, A. A. Krinitsina, A. V. Fedotova, D. V. Pozdyshev, V. Y. Shtratnikova, E. V. Kupriyanova, G. A. Shipulin, & M. D. Logacheva. 2019. Improved protocols of ITS1-based metabarcoding and their application in the analysis of plant-containing products. *Genes.*, 10(2): 122.
- Osman, S. A. 2024. The power of DNA barcoding for plant identification. *Egypt. J. Chem.*, 67(1): 633-646.
- POWO. 2023. *Plants of the World Online*. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:293293-1/general-information>. Diakses 15 September 2025.
- Pramadaningtyas, P. S., N. Chandrasari, R. S. Izdihar, W. M. Iqbal, A. P. Cahyaningsih, & A. D. Setyawan. 2023. Analysis of riparian vegetation in the Siwaluh River, Karanganyar District, Central Java, Indonesia. *Intl. J. Bonorowo Wetl.*, 13(2): 45-56.
- Putera, V. A. V. H., S. Suryanti, & F. Wilisiani. 2023. Keragaman vegetasi bawah di perkebunan kelapa sawit tanaman menghasilkan pada berbagai tahun tanam. *Agroforetech*, 1(3): 1310-1318.
- Rahayu, D. A. & M. Jannah. 2019. *DNA Barcode hewan dan tumbuhan Indonesia*. Yayasan Inspirasi Ide Berdaya, Jakarta Selatan.
- Randjamandi, O., Y. Makaborang, & A. T. Ina. 2022. Keanekaragaman tumbuhan liana di hutan Bulla Kecamatan Umalulu Kabupaten Sumba Timur. *EJIDLH*, 22(2): 53-64.
- Ruiz-Villalba, A., E. van Pelt-Verkuil, Q. D. Gunst, J. M. Ruijter, & M. J. B. Hoff., 2017. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.*, 14: 7-18.
- Sarvananda, L. 2018. Short introduction of DNA barcoding. *Int. J. Res.*, 5(4): 673-686.
- Setiati, N., Partaya & Hidayah, N. 2020. The use of two pairs primer for CO1 gene amplification on traded stingray at fish auction Tasik Agung Rembang. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 1567(3): 032056.
- Sundari, S. & Priadi, B. 2019. Teknik isolasi dan elektroforesis DNA ikan tapah. *Bull. Tek. Litkayasa Akuakultur.*, 17(2): 87-90.
- Su'udi, M., F. B. Ulum, M. Ardiyansah, & N. E. Fitri. 2024. Evaluasi lokus potensial *matK* dan *ITS2* untuk DNA barcoding anggrek *Bulbophyllum lobbii* Lindl. *Al-Kaunyah: J. Biol.*, 17(2): 406-418.
- Syafid, N. A. 2018. Inventarisasi tumbuhan bawah di Kawasan Hutan Kampus Pinang Masak Universitas Jambi sebagai bahan pengayaan mata kuliah taksonomi tumbuhan. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jambi, Jambi.
- Turhadi, B. N., Sudarjayanti, F. M. Solihah, R. Azrianingsih, M. Afiyanti, & E. L. Arumingtyas. 2024. Molecular identification of *Scopellaria marginata* from East

BIOMA : JURNAL BIOLOGI MAKASSAR

- Java, Indonesia, based on *trnL-UAA* and *trnL-trnF* intergenic spacer regions. *Nus. Biosci.*, 16(1): 111-118.
- Utama, M. N., N. Etikawati, Sugiyarto & A. Susilowati. 2024. New specific primer *matK* and *rbcL* region for DNA barcode pitcher plant *Nepenthes spathulata*. *Biodiversitas*, 25(6): 2515-2523. doi: 10.13057/biodiv/d250621.
- Yu, M., Y. Cao, & Y. Ji., 2017. The principle and application of new PCR technologies. *IOP Conf. Series*, 100(1): 012065.