

## OPTIMASI KONDISI PCR UNTUK ANALISIS VARIASI GENETIK MIKROSATELIT VARIAN JATI ARBORETUM DENGAN MENGGUNAKAN PEWARNAAN PERAK

Imas Cintamulya

Universitas PGRI Ronggolawe-Jl. Manunggal No.61 Tuban Jawa Timur

Email: warli66@gmail.com

### ABSTRAK

Jati merupakan salah satu spesies perkebunan yang menjanjikan di daerah tropis, maka perakitan calon tanaman jati unggul diperlukan. Untuk itu dilakukan penelitian dengan tujuan menganalisis variasi genetik varian jati arboretum dengan penanda mikrosatelit. Sebelum melakukan analisis variasi genetik, terlebih dahulu dilakukan Optimasi kondisi PCR untuk berlangsungnya proses amplifikasi DNA sampel. PCR peka terhadap sejumlah parameter meliputi: magnesium klorida, DNA templat, konsentrasi primer, dan suhu annealing selama amplifikasi. Kondisi reaksi dioptimalkan sebelum amplifikasi guna menghindari produk amplifikasi tidak spesifik seperti ukuran pita DNA yang heterogen. Di samping itu penggunaan pewarnaan perak juga perlu diperhatikan meliputi, komponen-komponen larutan yang digunakan, tahapan-tahapan pewarnaannya harus benar-benar dilakukan sesuai petunjuk dan butuh keterampilan serta kehati-hatian. Hal ini dilakukan untuk memperoleh pola pita DNA yang baik sehingga memudahkan analisis selanjutnya dalam hal ini variasi genetik.

**Kata Kunci:** *Varian Jati Arboretum, Optimasi, PCR, Mikrosatelit, Pewarnaan Perak*

### PENDAHULUAN

Jati (*Tectona grandis*) merupakan kayu yang memiliki nilai ekonomi penting, pada saat ini dianggap salah satu spesies perkebunan yang menjanjikan di daerah tropis. Adanya permintaan dan harga yang tinggi di pasar internasional dan rotasi yang pendek telah memicu program penanaman yang luas di seluruh daerah tropis. Oleh karena itu penting untuk memulai dan melakukan seleksi serta menguji individu yang unggul dalam program breeding lokal. Fofana *dkk.*, (2008) menjelaskan bahwa Indonesia merupakan salah satu pusat keanekaragaman kayu jati. Tersedianya varian jati yang banyak dapat dijadikan sebagai sumber kekayaan materi genetik guna kebutuhan perakitan calon tanaman jati unggul. Melihat segi genetik jati, bisa digunakan pendekatan molekuler berdasarkan sifat polimorfisme DNA, dengan tujuan untuk melihat adanya variasi genetik dan hubungan kekerabatan baik di tingkat kultivar, antar kultivar dan spesies, atau antar spesies (Scott, *dkk.*, 2000).

Penggunaan penanda molekuler berdasarkan variasi dalam urutan DNA semakin terbantu berkat munculnya PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sebagai teknik dasar dalam penelitian molekuler. PCR merupakan teknik yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA secara *in vitro* yang cepat dan kuat. Penggunaan teknik PCR telah diperluas dalam penelitian-penelitian molekuler sebab kemampuan untuk mengamplifikasi daerah target pada templat DNA membutuhkan waktu yang relatif singkat. Pengulangannya biasanya berkisar antara 30-50 siklus replikasi, yang melipat gandakan molekul DNA target pada setiap siklusnya. Oleh karena itu eksplorasi dan pemahaman prinsip-prinsip PCR itu sendiri dapat membantu memastikan produk PCR yang baik dengan waktu dan biaya yang sedikit. Karena interaksi yang kompleks di antara komponen-komponen PCR dan luas berbagai aplikasinya, sangat mungkin bahwa satu set kondisi amplifikasi akan optimal untuk semua situasi (Innis *dkk.*, 1990).

Mikrosatelit atau *Simple Sequence Repeats* (SSRs) adalah salah satu penanda DNA berdasarkan teknik PCR (Varshney *et al.*, 2005). Penanda ini menggunakan primer (potongan pendek DNA sintetik) yang mengandung motif mikrosatelit pendek pada ujung 3' atau 5' atau mengapit daerah mikrosatelit. Saat ini mikrosatelit dapat dipakai sebagai alat dalam program pemuliaan karena kemampuan yang tinggi dalam mendeteksi perbedaan urutan basa, sampai satu pasang basa. Penggunaan mikrosatelit relatif mudah karena menggunakan teknik PCR. Melalui teknik PCR DNA yang sudah diisolasi diperbanyak secara *invitro* dengan menggunakan urutan nukleotida sebagai *primer* (potongan DNA sintesis yang dibuat pabrik). Proses perbanyakan menggunakan alat yang disebut "*DNA Thermal Cycler*" (*Thermolyne*). Hasil perbanyakan DNA melalui teknik PCR dimulai dari satu molekul DNA kemudian diperbanyak sampai 100 juta molekul DNA yang sama dalam waktu 30 menit (Mullis, 1990).

Analisis genetik dengan menggunakan mikrosatelit meliputi: 1) PCR untuk memperbanyak DNA dengan menggunakan primer oligonukleotida komplementer yang mengapit daerah tertentu lokus mikrosatelit yang terdiri dari satu sampai enam urutan nukleotida (motif) untuk amplifikasi DNA mikrosatelit (Powell, *dkk.*, 1996); 2) mendeteksi fragmen DNA hasil amplifikasi pada gel; 3) analisis ukuran fraksinasi dari

produk pada gel poliakrilamid (Rahman *dkk.*, 2000). Reaksi dalam proses amplifikasi atau PCR peka terhadap sejumlah parameter meliputi: magnesium klorida, DNA templet, konsentrasi primer, dan suhu annealing selama amplifikasi. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini bertujuan menentukan optimasi kondisi PCR untuk analisis mikrosatelit varian jati arboretum dengan teknik deteksi menggunakan pewarnaan perak dan untuk mengetahui pengaruh macam-macam kondisi selama memperbanyak dan mendeteksi DNA. Adapaun manfaat dari penelitian ini untuk memperoleh produk amplifikasi yang spesifik dalam ukuran pita DNA sehingga memudahkan dalam analisis selanjutnya yaitu variasi genetik varian jati arboretum.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Bioteknologi Universitas Muhamadiyah Malang, pada bulan April-Juni 2011. Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Nitrogen Cair, PVP, Tris HCl, EDTA, dH<sub>2</sub>O steril, Na bisulfit, CTAB, Etanol absolut, Kloroform, Isoamil, Aquades, Natrium asetat, Etanol 70%, Tris Buffer, Agarosa, Marker DNA 100bp-2500bp, DNA genom jati, 5 Pasang primer pengapit nukleotida DNA mikrosatelit (*Forward dan Reverse*), PCR Mix, Water PCR, Kertas Parafilm, Etidium Bromida, BPB, Sukrosa, TE, TBE, Acrylamide, Bis Acrylamide, APS, Temed, NH<sub>4</sub>OH, NaOH, Natrium Karbonat, Formalin, Asam asetat, Glycerol, Silver Nitrat. Sedangkan alat yang digunakan terdiri dari mortal martil, tabung gas, centrifuge dingin, PH meter, hot plate, pipet, mikropipet (1000 µl), mikropipet (100 µl), mikropipet (10µl), tip besar, tip kecil, eppendorpf kecil, eppendorpf besar, beker gelas, centrifuge kecil, alat elektroforesis, kamera, shaker, lemari es, gell doc, freezer, labu ukur, neraca analitik digital, vortex, mikrowave, inkubator dan gelas piala.

Sampel yang akan diteliti adalah varian jati arboretum dari Puslitbang Perhutani Cepu (sebanyak 23 varian), adapun bahan yang akan digunakan dalam penelitian adalah daun pertama atau kedua jati. Isolasi DNA dari daun pertama atau kedua jati dilakukan dengan menggunakan metode buffer CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimetil Ammonium Bromide*) dikembangkan oleh Doyle dan Doyle (1987) yang sudah dimodifikasi.

Dalam reaksi amplifikasi DNA (reaksi PCR), DNA genom jati digunakan sebagai cetakan (*template*) dengan pasangan primer (*mix*) sekuen pengapit (*flanking sequence*) nukleotida DNA mikrosatelit (*Forward dan Reverse*). Primer mikrosatelit yang digunakan dalam penelitian ini adalah lima (CIRAD1TeakA06, CIRADTeakB03, CIRAD1TeakH10, CIRAD3TeakB02, CIRAD3TeakF01) yang telah diisolasi dari *Jati (Tectona grandis)* oleh Verhaegen *et al.*, (2005). Metode yang digunakan untuk amplifikasi DNA merujuk kepada metode Verhaegen *et al.*, (2005) yang dimodifikasi. Komponen amplifikasi DNA yang dibutuhkan adalah sebagai berikut : 2 µl larutan DNA sampel, 2 µl forward primer mikrosatelit, 2 µl reverse primer mikrosatelit, 12,5 µl fast start/ PCR mix, dan air deion (dH<sub>2</sub>O) 3 µl. Campuran di atas dihomogenkan lalu ditambah dengan 50 µl mineral oil dan ditempatkan dalam *Thermocycler (Thermolyne)*. DNA diamplifikasi pada suhu 94°C selama 4 menit untuk denaturasi awal, kemudian dilanjutkan 30 siklus dengan setiap 1 siklus diprogram untuk denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, “annealing” 51°C selama 45 detik dan “extention” 72 °C selama 45 detik. Siklus terakhir diikuti dengan inkubasi pada suhu 72 °C selama 5 menit (Verhaegen, *et al.*, 2005). Untuk memperoleh pola larik DNA, maka hasil PCR dipisahkan dengan 10 % PAGE(Poly Acrylamid Gell Elektrophoresis) sebanyak 8 ml, yang terdiri dari 2,6 ml acrylamid 30%, 1,56 ml TBE 10 X, 93, 75 µl APS, 11, 25 µl TEMED dan 4500 µl dH<sub>2</sub>O. Larutan yang terbentuk dimasukkan pada cetakan lalu dipasang sisir dan dibiarkan membeku, lalu dipasang pada alat elektroforesis vertikal kemudian dituangkan buffer TAE 1X sampai gel terendam.

DNA hasil PCR sebanyak 5 µl dicampur dengan 2,5 µl BPB. Campuran ini dimasukkan ke dalam sumur pada gel, masing-masing sumur diisi dengan satu sampel DNA hasil PCR, dan disisakan satu sumur untuk diisi dengan 5 µl DNA standar ukuran (100 bp-2500bp). Alat elektroforesis dijalankan dengan kecepatan 70 volt selama 85 menit. Hasil running selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan perak. Proses Pencucian dan pewarnaan gel akrilamid terdiri dari tahapan pertama pembuatan larutan yang terdiri dari: 1) larutan A (CTAB) komponennya 200 mg CTAB ditambah 200 ml dH<sub>2</sub>O; 2) larutan B (NH<sub>4</sub>OH) komponennya 2,4 ml NH<sub>4</sub>OH 25% ditambah 200 ml dH<sub>2</sub>O; 3) Larutan C (*Amoniak Silver Solution*) komponennya 0,32 gr *silver nitrat* ditambah 200 ml dH<sub>2</sub>O, 0,08 ml NaOH 10 N, 0,8 ml NH<sub>4</sub>OH 25%; 4) larutan D komponennya 4 gr *sodium carbonat* ditambah 200 ml dH<sub>2</sub>O dan 100 µl formalin; 5) larutan E komponennya 0,2 ml asam asetat 0,1% ditambah 200 ml dH<sub>2</sub>O; 6) larutan F komponennya 40 ml gliserol ditambah 200 ml dH<sub>2</sub>O



Tahapan kedua adalah proses pencucian gel akrilamid pada larutan A selama 15 menit, dalam larutan B selama 15 menit. Gel setelah direndam dalam larutan B, langsung direndam dalam larutan C selama 6 menit. Selanjutnya gel langsung direndam dalam larutan D sampai pita terlihat sambil dishaker lalu buang supernatan. Tahap berikutnya adalah pencucian gel dengan larutan E selama 10 menit. Tahapan terakhir gel direndam dalam larutan F selama 24 jam. Setelah proses pencucian gel yang sudah memperlihatkan pita-pita DNA yang jelas, selanjutnya ditiriskan dalam plastik mika untuk dipress, dan gel siap untuk dilakukan analisis

## HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA smir merupakan masalah yang paling sering dan umum dijumpai pada PCR. Heckel *et al.* (1995) mengatakan DNA smir dapat disebabkan oleh berlebihan pemakaian  $Mg^{++}$ , dNTP, *Taq* polimerase, primer dan DNA templat. Konsentrasi magnesium merupakan faktor penting yang mempengaruhi kinerja *Taq* polimerase. Komponen-komponen reaksi yang meliputi DNA template, hadirnya agen-agen penghelat di dalam sampel (seperti EDTA atau sitrat), dNTP dan protein dapat mempengaruhi jumlah magnesium bebas. Dengan tidak adanya magnesium bebas yang memadai *Taq* polimerase tidak aktif. Sebaliknya magnesium bebas yang berlebih mengurangi aktivitas enzim dan dapat meningkatkan amplifikasi non spesifik. Berdasarkan hal ini maka penting menentukan konsentrasi magnesium yang optimal untuk masing-masing reaksi. Ada dua langkah penting dalam penggunaan  $Mg^{++}$ , pertama benar-benar mencairkan larutan magnesium sebelum digunakan, dan kedua vortexing larutan  $Mg^{++}$ , selama beberapa detik sebelum pipetting. Larutan magnesium klorida membentuk gradien konsentrasi ketika dibekukan dan vortexing diperlukan untuk mendapatkan larutan yang sama. Kedua langkah tersebut meskipun tampaknya sederhana, tapi akan menghilangkan sumber yang menyebabkan eksperimen banyak yang gagal. Konsentrasi  $Mg^{++}$  yang berlebih ( $\geq 6$  mM) akan menghasilkan DNA smir, sebaliknya bila  $Mg^{++}$  terlalu rendah (1 mM) tidak akan terjadi amplifikasi. Konsentrasi optimal untuk  $Mg^{++}$  antara 3-4 mM (Heckel *et al.*, 1995).

Smir merupakan hasil amplifikasi yang tidak spesifik selama awal siklus PCR. Mengurangi DNA smir dapat dilakukan dengan menurunkan konsentrasi *Taq* polimerase dan DNA templat. Konsentrasi *Taq* polimerase yang berlebihan dapat mengakibatkan amplifikasi DNA non Target (Haley, *et al.*, 1994). Konsentrasi dNTP untuk reaksi PCR adalah 200  $\mu$ M. Ada interaksi antara  $Mg^{++}$  dan dNTP. Perubahan konsentrasi dNTP akan menyebabkan perubahan konsentrasi  $Mg^{++}$  yang ada dalam reaksi. Bila digunakan konsentrasi dNTP yang tinggi, konsentrasi  $Mg^{++}$  sebaiknya juga dinaikkan. Bila konsentrasi dNTP berlebih, dNTP akan berikatan  $Mg^{++}$  dengan sehingga mengurangi konsentrasi  $Mg^{++}$  (Taylor, 1991). Pada penelitian DNA smir di asumsikan bukan karena pengaruh komponen-komponen tersebut di atas, karena pada saat pelaksanaan PCR menggunakan PCR Mix, yang komposisinya sudah di atur. DNA smir bisa di akibatkan oleh komponenlainnya.

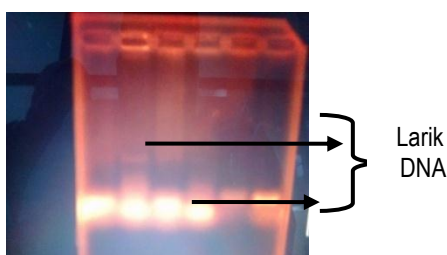
Weising *et al.* (1995) melaporkan konsentarsi DNA templat terlalu rendah (5pg/50  $\mu$ l reaksi) tidak akan menghasilkan amplifikasi, sedangkan PCR dengan konsentrasi 10 pg-1 ng/ 50  $\mu$ l reaksi menghasilkan pola amplifikasi DNA berbeda. DNA templet terdegradasi akibat *freezing* dan *thawing*, sehingga ukuran fragmen DNA menjadi pendek, terjadi amplifikasi nonspesifik (Black, 1993). Penyimpanan DNA sampel dalam TE (tris/EDTA), menyebabkan kemungkinan ada sisa EDTA dalam reaksi amplifikasi. EDTA dapat mengikat  $Mg^{++}$ , sehingga konsentrasi  $Mg^{++}$  berkurang, akibatnya kerja enzim terhambat dan dihasilkan larik DNA yang tidak jelas dan smir. DNA smir bahkan tidak ada larik DNA yang tampak pada saat running dalam penelitian ini, salah satunya akibat penyimpanan DNA sampel yang terlalu lama dalam larutan TE (sekitar 3 minggu) tetapi untuk masalah ini telah dilakukan isolasi lagi sehingga sampel DNA dalam keadaan segar. Sejumlah DNA template sangat mempengaruhi produk reaksi. Konsentrasi DNA template lebih dari 30 ng/25  $\mu$ l menyebabkan amplifikasi yang tinggi. Larutan DNA sampel yang digunakan dalam optimasi sebanyak 2  $\mu$ l.

Bagaimanapun juga suhu annealing merupakan parameter yang penting, yang perlu dioptimasi. Pada penelitian ini menggunakan lima macam primer yaitu CIRAD1TeakA06, CIRAD1TeakB03, CIRAD1TeakH10, CIRAD3TeakB02, dan CIRAD3TeakF01, dengan suhu *annealing* 51°C (Verhaegen, *et al.*, 2005). Terlebih dahulu di lakukan uji pendahuluan untuk mengecek suhu *annealing* yaitu pada suhu 51°C dan 53°C, dan hasilnya pada suhu 51°C menghasilkan larik DNA yang lebih jelas. Uji pendahuluan selain untuk mengecek suhu annealing juga untuk melihat pemisahan dari larik-larik DNA. Pertama menggunakan gel agarosa dengan pewarnaan etidium bromida. Konsentrasi agarosa ditingkatkan secara bertahap tetapi

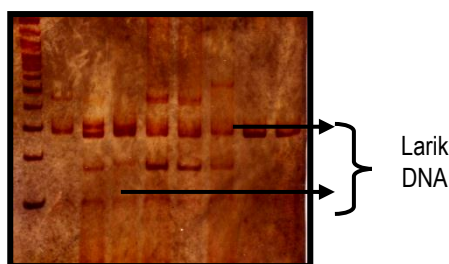


hasilnya tidak tampak adanya pemisahan dari larik-larik DNA seperti tampak pada Gambar 1. Kemudian diganti dengan menggunakan gel akrilamid dengan pewarnaan perak, hasilnya tampak adanya pemisahan larik-larik DNA dari setiap varian jati, seperti terlihat pada Gambar 2. Hal ini disebabkan karena lokus mikrosatelit mengandung dinukleotida yang berulang yang mengamplifikasi produk PCR pada kisaran 130 sampai 200 bp, dimana jika susunannya berbeda setiap 2 bp maka pada kisaran tersebut gel agarose tidak mampu digunakan. Peningkatan resolusi gel akrilamid lebih tinggi dari pada gel agarose menyebabkan gel tersebut mampu mendeteksi sejumlah besar alel per lokus (Maculay, *et al.*, 2001).

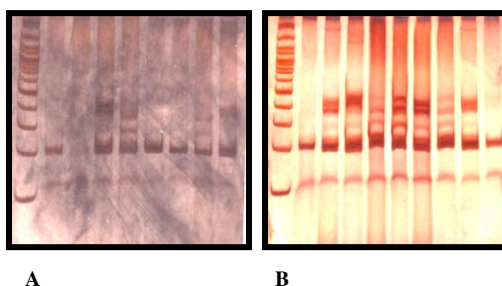
Hal lain dari running produk PCR dengan menggunakan gel akrilamid, adalah pewarnaan. Pewarnaan yang digunakan pada penelitian ini adalah pewarnaan perak yang terdiri dari lima tahapan. Ada beberapa sampel yang kelihatan lebih hitam, akibat pencucian pada larutan D, terlalu lama, dan larutan yang digunakan sudah dipakai berkali-kali. Untuk lebih jelas perbandingan hasil running produk PCR dengan gel akrilamid dan pewarnaan perak dapat dilihat pada Gambar 3, dimana gambar A. yang dicuci pada larutan D yang agak lama, sedangkan gambar B. Pencuciannya cukup, setelah terlihat pita langsung diangkat, serta larutan yang digunakan baru diganti.



Gambar 1. DNA Jati Hasil Amplifikasi dengan Suhu Annealing 51°C Dirunning pada Gel Agarosa  
Sumber: Cintamulya, 2011



Gambar 2. DNA Jati Hasil Amplifikasi dengan Suhu Annealing 51°C Dirunning pada gel akrilamid  
Sumber: Cintamulya, 2011



Gambar 3. Hasil running pada gel akrilamid dengan pewarnaan perak  
Sumber: Cintamulya, 2011

Ketiga tahap PCR (denaturasi, annealing dan polimerisasi) membutuhkan pengaturan waktu dan suhu yang berlainan. Satu siklus amplifikasi memerlukan waktu < 7.5 menit. Pada penelitian ini digunakan suhu denaturasi 94°C, suhu *annealing* 51°C dan suhu polimerisasi 72°C. Umumnya suhu serta waktu denaturasi dan polimerisasi yang dipakai adalah: 94°C selama 1 menit dan 72°C selama 2 menit, sedangkan suhu *annealing* yang digunakan umumnya 5°C lebih rendah dari *melting temperature* (T<sub>m</sub>). Nilai T<sub>m</sub> dapat dihitung dengan mengalikan 2°C untuk setiap nukleotida adenin dan timin serta 4°C untuk setiap nukleotida guanin dan sitosin.

## KESIMPULAN

Sebelum dilakukan analisis lebih lanjut dalam hal ini analisis variasi genetik varian jati arboretum dengan menggunakan penanda mikrosatelit. Terlebih dahulu harus dilakukan optimasi kondisi PCR, dengan tujuan untuk mencegah terjadi amplifikasi yang non spesifik, yang hasilnya berupa pola pita DNA yang smir. Hal ini tentu saja akan menyulitkan dalam analisis variasi genetik karena pola pita sukar untuk dianalisis, sehingga akan berpengaruh terhadap hasil yang kita harapkan.



Optimasi PCR yang harus diperhatikan antara lain konsentrasi larutan yang diperlukan untuk proses amplifikasi, suhu annealing yang dibutuhkan oleh masing-masing primer. Selain itu untuk pewarnaan perak perlu juga diperhatikan komponen-komponen larutan yang digunakan sebaiknya dalam keadaan baru, tahapan-tahapannya harus benar-benar tepat sesuai waktu yang ditentukan, butuh keterampilan dan kehati-hatian.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Prof. Dr. H. Yusuf Abdurrajaq, Prof. Dr. Agr. H. Mohamad Amin, M.Si., dan Dr. H. Fatchur Rohman, M.Si., yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan dalam kegiatan penelitian ini. Kepada Dr. Ir. Aris Winaya, M.P., Dr. Ir. Maftuchah, M.P. yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan selama kegiatan penelitian di laboratorium bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang. Juga kepada Kepala Puslibang Perhutani Cepu yang telah memberikan ijin pengambilan sampel varian jati arboretum.

## DAFTAR PUSTAKA

- Black, W. C. (1999). PCR with Arbitrary Primers: Approach with Care. *Insect Molecular Biology* 2 (1): 1-6.
- Cintamulya, I. (2011). *Analisis Variasi Genetik Varian Jati Arboretum Dengan Penanda Mikrosatelit Sebagai Bahan Untuk Penyusunan Buku Pengayaan Dasar-Dasar Molekuler Tumbuhan*. Disertasi tidak Diterbitkan. Malang: Program Studi Pendidikan Biologi Program Pascasarjana UM.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Fofana, I. J., Lidah, y.J., Diarrassouba, N., N'guetta S.P.A., Sangare, A., And Verhaegen. (2008). Genetic Structure and Conservation of Teak (*Tectona grandis*) Plantations in Cote d'Ivoire Revealed by Site Specific Recombinase (SSR). *Tropical Conservation Science* Vol (1): 279-292.
- Haley, S. D., Miklas, P. N., Afanador, L., and Kelly, J. D. (1994). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker Variability Between and Within Gene Pools of Common Bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 199 (1):122-125
- Heckel, D. G., Gahan, L. J., Tabashnik, B. E., dan Johnson, M. W. (1995). Randomly Amplified Polymorphic DNA Differences Between Strains of Diamondbackmoth (Lepidoptera: Plutellidae) Susceptible or Resistant to *Bacillus thuringiensis*. *Ann Entomol. Soc. Am.* 88:247-257.
- Innis, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J., and White, T.J. (1990). *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press Inc.
- Macaulay, M., Ramsay, L., Powerl, W., and Waugh, R. (2001). A Representative Highly Informative Genotyping Set of Barley SSRs. *Theor. Appl. Genet.* Vol (102): 801-809.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalski, A. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trend Plant Sci.* Vol(1): 215-222.
- Rahman, M. U., T. A. Malik, N. Aslam, M. Asif, R. Ahmad, I. A. Khan, and Y. Zafar. (2002). Optimization of PCR Conditions to Amplify Microsatellite Loci in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Genomic DNA. *International Journal of Agriculture & Biology*. Vol. 4 (2): 282-284.
- Scott, K.D., Eggler, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E. M., Lee, L.S., and Henry, R.J. (2000). Analysis of SSRs Derived From Grape ESTs. *Theor. Appl. Genet.* Vol (100): 723-726.
- Taylor, G. R. (1991). Polymerase Chain Reaction: Basic Principle and Automation. In: *PCR Vol 1: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Varshney, R. K., Graner, A., Sorrells, M. E. (2005). Genic Microsatellite Markers in Plants: Feature and Applications. *Trends in Biotechnology*. Vol (23): 48-56.
- Verhaegen, D., Ofori, D., Fofana, I., Poitel, M., and Vaillant, A. (2005). Development and Characterization of Microsatellite Markers in *Tectona grandis* (Linn.f). *Molecular Ecology Notes*. Vol.(5): 945-947.

## DISKUSI

**Penanya: Nur Aeni Riyanti – Universitas Negeri Yogyakarta**

1. Apakah belum ada penelitian pendahuluan sehingga harus ada optimasi?
2. Dalam proses optimasi itu, bagaimana bisa pitanya langsung terlihat?

### Jawab

1. Sudah, hanya saja memastikan manakah suhu yang paling tepat. Dan ternyata diperoleh pada suhu 51°C.
2. Karena jika dengan pewarnaan perak sudah bisa langsung dilihat tanpa harus menggunakan UV

