Efektivitas 5 Penanda ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) Pada Proses Amplifikasi DNA Spesies Marchantia

Susilo dan Maryanti Setyaningsih

1Pendidikan Biologi, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka,

\*Email: susilo@uhamka.ac.id

ABSTRAK

Informasi tingkat polimorfik marker Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) atau mikrosatelit penting untuk diketahui untuk menentukan marker-marker yang efektif yang digunakan untuk identifikasi sidik jari DNA. Penelitian ini dilakukan untuk memverifikasi keefektifan dari 5 primer mikrosatelit (F218, F231, F209, BS537 dan BS3) dalam mengamplifikasi spesies marchantia. *Marchantia emarginata, Marchantia geminata, Marchantia paleacea, dan Marchantia polymorpha* digunakan sebagai sample yang diambil dari Gunung Gedhe Pangrango, Jawa Barat Indonesia. Analisis Nilai polymorphism information content (PIC) digunakan sebagai dasar penentuan efektivitas dalam proses amplifikasi yang diperoleh dari hasil visualisasi pita DNA dengan GelAnalyzer dan Power Marker. Hasil penelitian kami menunjukkan bahwa tiga primer ISSR (F218, F231, dan F209) yang diuji adalah polimorfik, sementara dua diantaranya monomorfik. Tiga lokus mikrosatelit menunjukkan tingkat keragaman genetic yang tinggi (> 0.5) dengan ukuran fragmen berkisar antara 173 bp – 330 bp. Nilai PIC tertinggi terdapat pada primer F209 yaitu 0,91. Sedangkan nilai PIC pada primer F218 dan F231 masing-masing adalah 0,90 dan 0,64. Hasil ini mengungkapkan bahwa 3 penanda mikrosatelit yang polimorfik (F218, F231, dan F209) dapat digunakan untuk eksplorasi keragaman genetik Marchantia.

**Kata kunci:** Marchantia emarginata, Marchantia geminata, Marchantia paleacea, Marchantia polymorpha, polimorfisme Information Content (PIC), PCR-ISSR

# Introduction

Marcantia merupakan genus yang memiliki anggota cukup banyak yang tumbuh di Indonesia. Gunung Gede Pangrango, West Java menjadi habitat yang sesuai sebagai tempat tumbuhnya jenis lumut ini. Jenis yang paling banyak adalah *Marchantia emarginata, Marchantia geminata, Marchantia paleacea,* dan *Marchantia polymorpha.* Beragamnya jenis marchantia tersebut ternyata masih belum banyak diteliti sumber daya genetiknya. Basis data genetik sangat penting untuk mendukung usaha pemuliaan dan konservasi tanaman. Basis data genetik yang sedikit dapat menjadi masalah utama yang mengancam perkembangan kemajuan genetik tanaman. Keanekaragaman genetic memberikan informasi yang sangat penting dan dibutuhkan untuk mempertahankan dan mengembangkan sumber daya hayati yang ada.

Di Indonesia, data genetic *Marchantia* yang endemic masih belum banyak dikaji. Padahal Indonesia memiliki keanekaragamn lumut yang cukup tinggi, termasuk *Marchantia*. Keragaman genetik berdasarkan sifat-sifat fenologi, morfologi dan biokimia memang pernah dilakukan, namun variasi yang terjadi dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Beberapa peneliti di dunia telah meneliti keanekaragaman genetic jenis lumut dengan berbagai metode molekuler. Teknologi Analisis DNA yang telah berkembang pesat sekarang ini menjadi metode unggulan dalam pembuatan profil genom, pemetaan asosiasi, sidik jari dan menilai keragaman genetik dan struktur di banyak tanaman, termasuk lumut (liverworts).

Penanda DNA seperti inter-simple sequence repeats (ISSR) dapat digunakan sebagai alternative untuk menilai hubungan dan tingkat keragaman genetic lumut. Beberapa penelitian telah dilakukan dengan metode ini untuk identifikasi keaneragaman lumut. Dalam beberapa kasus, masalah yang ditemui adalah rendahnya tingkat variabilitas banyaknya penanda molekuler yang digunakan pada tingkat takson yang lebih rendah. ISSR menjadi pendekatan yang paling cocok dalam analisis keragaman genetik tanaman karena mereka berlimpah, kodominan, dapat mengungkapkan tingkat polimorfisme yang tinggi dan terdistribusi luas sepanjang kromosom (Carsono, dkk., 2016). Selain itu, ISSR dapat menghasilkan pita yang lebih andal dan dapat direproduksi daripada RAPD karena suhu annealing lebih tinggi dan sekuens primer yang lebih panjang. Teknik ISSR memerlukan primer yang menggabungkan sekuen komplementer spesifik pada DNA sasaran (Vieira, *et al*., 2016). Primer berfungsi untuk sintesis sekuen spesifik DNA secara in vitro (Nilkanta, *et al*., 2017). Dari banyaknya keunggulan pada marka ISSR, masalah yang sering muncul adalah terlalu sulitnya menggunakan penanda yang sesuai karena variasi penanda yang banyak seperti mikrosatelit.

Beberapa kasus memang banyak yang telah berhasil membuat primer spesifik untuk amplifikasi DNA jenis lumut. 12 penanda ISSR telah berhasil mengamplifikasi *Marchantia inflexa* dengan sukses (Brzyski, *et al*., 2012). Namun dari markah-markah tersebut belum tentu dapat mengamplifikasi spesies lain dengan sempurna. Pada penelitian ini kami mencoba mengungkap efektivitas primer ISSR tersebut ke spesies Marchantia lain. Kami mengambil primer terpilih tersebut dari databae NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) secara acak. Penanda kelas ini menunjukkan polimorfisme fragmen DNA yang terletak di antara daerah mikrosatelit. Kami juga mengambil 2 primer polimorfism lain sebagai pembanding. Penelitian ini adalah penelitian pertama yang berusaha membuktikan efektivitas primer yang telah di design sebelumnya yang diamplifikasikan ke DNA target spesies *Marchantia* yang berbeda.

# Material and Methods

* 1. **Ekstraksi DNA**

4 genotipe Marchantia (*Marchantia emarginata, Marchantia geminata, Marchantia paleacea,* dan *Marchantia polymorpha*) yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari Gunung Gedhe Pangrango, Jawa Barat Indonesia. Sample daun muda dan segar diambil dan disimpan dalam silika gel sampai proses ekstraksi di laboratorium sel dan molekuler, BB Biogen Bogor, Indonesia. Sample daun dipotong kecil-kecil lalu masukkan ke dalam mikrotube 2.0 ml dengan menambahkan. Liquid Nitrogen. Setelah 3 menit, sample digiling secara manual hingga lisis kemudian diinkubasi dalam waterbath pada suhu 650C selama 20 menit diikuti dengan penambahan 700 µl buffer extrak. Setelah dingin sample lalu dikocok dengan menambahkan 700 µl Chisam (campuran klorofom : isoamil alkohol dengan perbandingan 24:1). Centrifuge campuran dilakukan selama 10 menit dengan kecepatan 15.000 rpm suhu 200C. Kemudian 500 µl supernatan dipindahkan kedalam mikrotube 1.5 ml dan ditambahkan etanol sampai 1000 µl. Centrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm suhu 200C. Pencucian DNA dilakukan 2 kali dengan menambahkan etanol sebanyak 200 µl. Terakhir, cairan etanol dibuang dan ditambahkan 200 µl TE kemudian diinkubasi dalam waterbath dengan suhu 650C selama 20 menit.

* 1. **PCR Amplifikasi**

Volume akhir sebanyak 15 µl yang terdiri dariultrapure water 3,9 µl, 5 µl mix (kappa 2g fast reading mix), 1 µl dNTPs, 1 µl forward dan reverse primer, 0,1 µl Taq polymerase, 4 µl DNA digunakan untuk 1 kali reaksi pada proses amplifikasi. Reaksi PCR dilakukan 3 tahapan yaitu Pra PCR, PCR, dan Post PCR. Pra PCR dilakukan *pradenaturation* (950) selama 1 menit. Pada reaksi PCR dilakukan sebanyak 40 siklus yaitu: *denaturation* (950) selama 30 detik, *annealing* (550) selama 30 detik, dan *extention* (720) selama 30 detik. Post PCR terdiri dari *final extention* (720) selama 5 menit dan *refrigeneration* (120) selama 20 detik.

PCR amplikon dianalisis dengan elektroforesis pada 8.0 % gel polyacrylamide secara vertikal untuk mengkonfirmasi ukuran yang diharapkan dari amplikon dengan merendam pada larutan EtBr. Pola pita divisualisasikan menggunakan ChemiDoc Image Analyzer. Hasil akhir dibaca dengan bantuan software GelAnalyzer dan diskor untuk mendapatkan nilai PIC (*Polymorphism Information Content*) dengan PowerMarker software ver. 3.25.

* 1. **Primer Screening**

Database primer terpilih diambil melalui situs web National Center for Biotechnology Information (NCBI) di http://www.ncbi.nlm.nih.gov/. Urutan yang diambil adalah sebagai berikut: F218, F231, F209, BS537, dan BS3. Urutan sequences primer secara detail disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Primer sequences and genetic characteristics of 5 microsatellite primer pairs developed in *Marchantia inflexa* and *Brachypodium sylvaticum*

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Locus | GenBank accession no. | Primer sequences (5’–3’) | Repeat motif | *Ta* (°C) | Product size (bp) | Referensi |
| F218 | JQ812721 | F:TCCAGACGGACCCGCAATTT | (CT)13 | 55 | 179 | Brzyski, *et al*. 2012 |
| R:TGCACCACGCCCTTCTCTGT |
| F231 | JQ812718 | F:CGGAGCGATTCAGGGCACACC | (CT)13 | 60 | 173 | Brzyski, *et al*. 2012 |
| R:AGCGGGTGGAGCGAGCGATT |
| F209 | JQ812714 | F:CCCAGCAGCCCTCCAGAAGT | (CT)13 | 56 | 286 | Brzyski, *et al*. 2012 |
| R:CACAACGCGCAACTGCACTG |
| BS537 | JQ307463 | F:GGATTGATATTGGCATTGAGTT | (CAG)5 | 55 | 139-190 | Xinchun *et al*. 2013 |
| R:TGGAATGTCACATTGTTTAGGA |
| BS3 | JQ307442 | F:CCTCGGGTGATCGATTCTTA | (GGC)6 | 55 | 117 | Xinchun *et al*. 2013 |
| R:CGTTCAGCTCCTCGTAGTCC |

* 1. **AnalisisData**

Profil ISSR dinilai untuk setiap kehadiran pita (1) dan yang absen (0) dari pita yang terbentuk pada hasil GelAnalyzer dengan PowerMarker software ver. 3.25. Hanya band-band tertentu yang dapat dengan jelas diberi skor digunakan untuk analisis statistik. nilai PIC (Polymorphism Information Content) dihitung dengan rumus PIC = 1 − (**Σ**Pi)2 (Avval, 2017). Pengkategorian nilai PIC menjadi 3 kelas yaitu : PIC > 0.5 (sangat informative) ; 0.25 > PIC < 0.5 (sedang) PIC < 0.25 (Botsein et al., 1980)

# hasil

Dalam studi ini, penanda polimorfik mikrosatelit untuk Marchantia diambil dari pustaka genomik database NCBI untuk diuji tingkat polimorfisnya terhadap target Marchantia lain. Sejauh pengetahuan kami, penanda mikrosatelit polimorfik tersebut belum dilaporkan untuk *Marchantia emarginata, Marchantia geminata, Marchantia paleacea,* dan *Marchantia polymorpha* di Indonesia. Penanda yang kami uji seharusnya memungkinkan untuk mengembangkan studi struktur populasi dan keragaman genetik Marchantia di masa depan. Hasil amplifikasi PCR-ISSR terhadap total DNA genom dari ke empat spesies *Marchantia* dengan menggunakan lima pasang primer ISSR (F218, F231, F209, BS537, dan BS3) menghasilkan pita DNA yang dapat dibaca pada software GelAnalyzer. Di antara 5 pasangan primer, 3 berhasil diamplifikasi, dan 2 sisanya gagal untuk memperkuat produk PCR. Dari 5 pasangan primer yang berhasil, 3 menghasilkan produk amplifikasi dari ukuran yang diharapkan (Figure 1).



Me : *M. emarginata*

Ge : *M. geminate*

Pa : *M. paleacea*

Po : *M. polymorpha*

**Gambar 1.** Amplifikasi DNA dengan 5 primer ISSR polimorfik pada 4 spesies Marchantia.

Skrining polimorfik menemukan bahwa jumlah alel yang nampak sekitar 1 hingga 4 pada *Marchantia* ketika menggunakan lima lokus microsatelit polimorfik. Dalam penelitian ini, tingkat polimorfisme tinggi dipengaruhi oleh tiga lokus SSR dengan jumlah total 30 alleles, sedangkan dua pasang primer BS537 dan BS3 tidak dapat mengamplifikasi dengan sukses. (Tabel 1).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Spesies | Number of Allels |  |
| F218 | F231 | F209 | BS537 | BS3 | Na |
| *M. emarginata* | 200, 339, 408, 512 | 250, 275 | 288, 293, 320 | - | - |  |
| *M. geminata* | 172, 200, 300 | 195, 240, 270 | 288, 293 | - | - |  |
| *M. paleacea* | 195, 340 | 187, 195, 240, 270 | 175 | - | - |  |
| *M. polymorpha* | 195 | 195, 240, 270 | 170 | - | - |  |

|  |  |
| --- | --- |
| Spesies | Number of Allels |
| F218 | F231 | F209 | BS537 | BS3 |
| *M. emarginata* | 4 | 2 | 3 | - | - |
| *M. geminata* | 3 | 3 | 2 | - | - |
| *M. paleacea* | 2 | 4 | 1 | - | - |
| *M. polymorpha* | 1 | 3 | 1 | - | - |
|  | 10 | 12 | 7 |  |  |

Hasil penelitian kami, pada primer F218 menunjukkan bahwa terdapat 1 sampai 4 alel yang teramplifikasi sempurna pada semua spesies *Marchantia* dengan total jumlah alel 10. *M. emarginata dan M. geminata* menunjukkan alel tertinggi dengan kisaran ukuran fragmen 173bp–512bp. Sementara pada *M. paleacea* dan *M. polymorpha* hanya mampu memperlihatkan 1 sampai 2 alel dengan dengan kisaran ukuran fragmen 200bp–2252bp. Pada primer F231 menunjukkan amplifikasi yang sangat baik pada semua spesies. 4 alel pada *M. paleacea* dapat terdeteksi paling baik dengan primer ini (ukuran fragmen 187bp–270bp). Sementara spesies lainnya hanya mampu terdeteksi 2-3 alel. Total jumlah allel yang dihasilkan dengan primer F231 dari semua spesies adalah 12 alel. Untuk Primer F209, semua *Marchantia* dapat teramplifikasi dengan total jumlah alel 7. 3 alel tertinggi dapat dimunculkan terhadap *M. emarginata* dengankisaran ukuran fragmen 288bp–320bp*.* Sementara *M. paleacea dan M. polymorpha* hanya mampu dihasilkan 1 alel dengan kisaran ukuran fragmen masing-masing 175bp dan 170bp. Untuk primer BS537 dan BS3 ternyata tidak dapat mengamplifikasi jenis *Marchantia.*

**Tabel 2.** Nilai PIC tiap primer pada 4 spesies Marchantia

|  |  |
| --- | --- |
| Nama primer | Nilai PIC |
| F218 | 0,90 |
| F231 | 0,64 |
| F209 | 0,91 |
| BS537 | 0 |
| BS3 | 0 |

Analisis pita DNA dan nilai PIC menunjukan diantara 5 pasang primer SSR yang digunakan terdapat 3 pasang primer yang dapat mengamplifikasi 4 spesies lumut hati. Primer-primer yang informatif ditunjukkan oleh nilai PIC ≥ 0,5 (Sharma, *et al*., 2009). Nilai PIC tertinggi terdapat pada pasangan primer F209 sebesar 0,91. Nilai PIC pada pasangan primer F218 0,90 dan pasangan primer F231 memiliki nilai primer paling rendah dengan nilai 0,64. Dan dua pasang primer lainnya BS537 dan BS3 tidak dapat mengamplifikasi empat sample lumut hati karena tidak terdapatnya pita DNA.

Tabel 2 menunjukkan indeks keanekaragaman diperkirakan untuk kolam renang Austria dan Belgia berdasarkan 1052 penanda DArT. Nilai-nilai kekayaan alel yang langka (A25) yang dicatat di kolam pemuliaan Austria dan Belgia adalah 1,396 dan 1,341, masing-masing, menunjukkan bahwa kolam pembiakan Austria mengandung keragaman yang sedikit lebih tinggi daripada kolam Belgia. Selanjutnya, persentase penanda polimorfik yang tercatat di kolam pemuliaan Austria dan Belgia adalah 93,79% dan 91,46%, masing-masing (Tabel 2). Nilai rata-rata dari jumlah efektif alel per lokus (NE) yang ditemukan di kolam pemuliaan Austria dan Belgia adalah 1,698 dan 1,602, masing-masing. Nilai HE dari kolam renang Austria dan Belgia masing-masing 0,411 dan 0,375. Selanjutnya, nilai-nilai PIC dari kolam renang Austria dan Belgia adalah 0,337 dan 0,298, masing-masing.

# pembahasan

Sebagai pengakuan atas keunggulan relatif SSR dalam mendeteksi polimorfisme DNA [70], kekuatan diskriminatif masing-masing penanda SSR dinilai dengan menghitung konten informasi polimorfik (PIC). Nilai PIC lebih besar dari 0,7 dianggap sangat informatif, sedangkan nilai 0,44 dianggap cukup informatif. Dalam penelitian ini hasilnya menunjukkan nilai rata-rata PIC yang tinggi (rata-rata = 0,66) di semua lokus yang diuji.

Hasilnya lebih lanjut mengungkapkan bahwa dengan pengecualian locus sMg00016 (PIC = 0,47); sMg00087 (PIC = 0,82) akan menjadi yang terbaik dalam menyaring genotip kelapa sawit NIFOR diikuti oleh sMo00102 (PIC = 0,77), dan sMg00179 (PIC = 0,76). Dengan demikian, nilai PIC menunjukkan bahwa sekitar sembilan lokus ini bersifat informatif dan mampu membedakan antar genotipe. Hasil yang sangat mirip diperoleh dalam penelitian yang melibatkan analisis 8 lokus mikrosatelit dalam populasi 48 pohon induk kelapa sawit (E. guineensis) dari perkebunan pemuliaan Univanich Palm Oil Public Company Ltd di mana PIC berkisar antara 0,580 hingga 0,821. [71], mengonfirmasi bahwa microsatellite kelapa sawit sangat informatif. Arias dkk. [40] juga melaporkan nilai PIC maksimum 0,822 dalam studi perbandingan 189 bahan kelapa sawit yang diproduksi oleh perusahaan komersial yang berbeda menggunakan 17 penanda SSR. Hasil dari penelitian ini sesuai dengan laporan sebelumnya dari Billotte et al. [52] dan Singh et al. [39] pada polimorfisme tinggi dari marka mikrosatelit CIRAD dan MPOB kelapa sawit yang digunakan dalam penelitian ini. Pasangan penanda mikrosatelit yang sangat polimorfik ini telah digunakan untuk sidik jari genetik dalam program pemuliaan.

Penanda mikrosatelit bersifat multi-alelik dan ko-dominan, maka keunggulan relatifnya dalam mendeteksi polimorfisme DNA. Perbandingan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini (4 - 9 alel per lokus dengan rata-rata 6,4 alel / lokus) dengan yang dipublikasikan sebelumnya menunjukkan bahwa rata-rata jumlah alel per lokus relatif lebih tinggi daripada yang sebelumnya dilaporkan untuk dua orang tua ( LM2T dan LM10T) dari populasi siklus minyak seleksi pertama BRT10 dengan perkiraan rata-rata 1,75 alel / lokus [72]. Itu juga lebih tinggi dari yang dilaporkan untuk sampel plasma nutfah Nigeria yang lebih baik dari asal NIFOR dan beberapa bahan survei dari Ayangba dan Bida (5,4 dan 5,3, masing-masing) dipertahankan di Pusat Nasional de la Recherche Agronomique (CNRA) di Pantai Gading [8] dan 9 D x P salib kelapa sawit dari berbagai perusahaan komersial Kolombia (4,5 alel per lokus) menggunakan 16 lokus SSR [40]. Namun, rata-rata alel per lokus dalam penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan 8 alel per lokus yang dilaporkan oleh Thongthawee et al. [71] di antara 132 pohon induk dari program pemuliaan kelapa sawit Thailand yang dilakukan di Univanich Palm Oil Public Company Ltd, menggunakan 8 lokus mikrosatelit.

Beberapa variabilitas ini dapat dijelaskan oleh perbedaan dalam jumlah genotipe yang terlibat, ditambah dengan jumlah penanda SSR yang digunakan. Jumlah alel per lokus dipengaruhi oleh jumlah penanda dan ukuran sampel yang dianalisis. Singh et al. [39] sebelumnya melaporkan jumlah alel per lokus yang lebih rendah (2.2 - 3.2) pada E.

plasma nutfah guineensis menggunakan kumpulan SSR yang lebih kecil dan jumlah alel meningkat (2.8 - 3.9) ketika Ting et al. [51] menggunakan serangkaian SSR yang lebih besar untuk mengevaluasi kumpulan plasma nutfah kelapa sawit yang lebih luas. Bahkan, Augustina dkk. [73] melaporkan total 163 alel (mean = 8.2) di antara 85 aksesi pisifera dari koleksi plasma nutfah asal yang berbeda di Sampoerna Agro Tbk (SA) di Indonesia. Bakoumé et al. [37] mendeteksi total 209 alel, dengan jumlah rata-rata 13,1 alel per lokus dalam sampel dari 494 kelapa sawit yang berasal dari 10 negara Afrika.

Cochard dkk. [8] memperoleh total 202 alel, dengan rata-rata 14,5 alel per lokus dalam 318 sampel minyak sawit dari delapan negara. Rendahnya jumlah alel dalam penelitian ini menunjukkan ukuran kecil bahan yang digunakan, yaitu, beberapa orang tua dari program pemuliaan dan jumlah keturunan yang terbatas untuk persilangan mereka. Hibridisasi dan seleksi ini cenderung mempengaruhi populasi dan menurunkan variabilitas alel. Beberapa penelitian menunjukkan kecenderungan umum hilangnya keragaman setelah beberapa siklus seleksi. Dalam studi terkait, Bakoumé et al.

[37] menyelidiki keragaman alelik dari 3 materi pemuliaan, menggunakan 16 penanda mikrosatelit dan mengamati bahwa alel langka adalah alel umum pada populasi kelapa sawit liar yang menunjukkan penurunan karena bertahun-tahun seleksi dalam bahan.

Hasil visualisasi PCR-ISSR dari lima pasang primer yang digunakan tiga pasang primer mampu mengamplifikasi empat sampel yang digunakan dan dua pasang primer tidak dapat mengamplifikasi empat sample yang digunakan. Pada dasarnya solasi DNA genom terdiri dari tiga langkah utama, yaitu perusakan dinding sel, (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Langga, 2012). Langkah-langkah tersebut menggunakan zat-zat kimia yang memiliki fungsi khusus.

Hasil pengujian kuantitas dengan nanodrop menunjukkan hasil yang cukup baik. Empat sample memperoleh DNA genom dengan kemurnian dan konsentrasi yang tinggi.

Dari lima pasang primer yang digunakan tiga pasang primer berhasil mengamplifikasi DNA genom yaitu primer F218, F231, F209 (Brzyski, *et al*., 2012). Primer yang digunakan pada penelitian ini telah digunakan pada spesies *Marcantia infexa.* Hasil amplikon yang dihasilkan pada penelitian menunjukkan hasil yang sesuai dengan primer yang digunakan pada *Marcantia infexa* yang digunakan sebagai referensi (Brzyski, *et al*., 2012). Dua pasang primer lainnya tidak dapat mengamplifikasi DNA genom yaitu primer BS537 dan BS3 (Mo, *et al*., 2013). Primer ini digunakan pada spesies  *Brachypodium sylvaticum*. Hasil penelitian menunjukkan primer ini tidak dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA lumut hati karena tidak dihasilkan amplikon yang sesuai dengan primer yang digunakan sebagai referensi (Mo, *et al*., 2013).

Secara umum, hasil amplifikasi total DNA genom sampel *Marchantia* dengan menggunakan primer terpilih menghasilkan serangkaian pita-pita. Hasil amplifikasi dengan lima pasang primer ISSR menghasilkan pita-pita DNA yang bersifat polimorfik dan monomorfik. Pita-pita tersebut dapat diskor untuk mendapatkan nilai PIC. Nilai PIC merupakan standar untuk mengevaluasi marka genetik berdasarkan pita DNA hasil amplifikasi PCR, nilai PIC terbagi tiga yaitu PIC > 0,5 = sangat informatif, 0,25 > 0,5 = sedang, dan PIC 0,25 = rendah (Carsono, dkk., 2014).

Semakin besar nilai PIC sebuah primer maka menunjukkan primer tersebut baik digunakan sebagai penanda molekuler. Primer F209 merupakan primer yang paling baik digunakan pada empat spesies lumut hati karena memiliki nilai PIC yang tinggi yaitu 0,91. Primer F218 memiliki nilai PIC 0,90 dan primer F231 memiliki nilai PIC yang paling rendah yaitu 0,64. Sedangkan dua pasang primer BS537 dan BS3 tidak dapat mengamplifikasi empat spesies lumut hati. Ini mungkin disebabkan oleh program PCR yang tidak tepat. Hal lain yang dapat menyebabkan sampel DNA lumut hati tidak dapat teramplifikasi dikarenakan primer yang tidak sesuai dengan DNA lumut hati yang diteliti karena tidak terdapat kecocokan antara DNA lumut hati dengan sekuen primer yang digunakan (Carsono, dkk., 2014).

# kesimpulan

Sepuluh pembuat mikrosatelit secara independen membedakan rata-rata 8 genotipe dari 15 genotipe yang dievaluasi dalam penelitian ini. Oleh karena itu, analisis lebih lanjut menggunakan sejumlah besar penanda mikrosatelit dan sampel diusulkan. Selain itu, melibatkan lebih banyak penanda SSR untuk genotip diharapkan untuk mengelompokkan genotipe orangtua dengan cara yang lebih baik. Nilai PIC yang tinggi menunjukkan bahwa penanda mikrosatelit sangat bermanfaat untuk analisis keragaman genetik. Loci mEgCIR0790, mEgCIR0793, sMg00087, sMg00154 dan sMo00102 adalah penanda mikrosatelit yang paling efisien dalam mendeteksi variasi genetik di antara genotipe induk. Koefisien disimilaritas genetik pairwise terendah tercatat antara induk genotipe AD4 dan T8. Sebagai hasilnya, genotip induk ini dapat digunakan untuk mempelajari korelasi antara jarak genetik dan heterosis dalam Program Pemuliaan Utama kelapa sawit NIFOR. Secara umum, hasil penelitian ini akan membantu untuk merancang persilangan di antara para orang tua ini untuk program pemuliaan dan seleksi di masa depan.

Tiga pasang primer yang dapat mengamplifikasi sample Marchantia yaitu primer JQ812721 (F+R) dapat mengamplifikasi sample Em dan Ge. Primer JQ812718 (F+R) dapat mengamplifikasi sample Ge, Pa, dan Po. JQ812714 (F+R) dapat mengamplifikasi sample Pa dan Po. F218, F231, F209

Nilai PIC primer F209 merupakan nilai tertinggi sebesar 0,91 menunjukkan primer ini sangat informatif. Primer F218memiliki nilai PIC sebesar 0,90 menunjukkan primer ini sangat informatif dan Primer F231 memiliki nilai PIC terendah sebesar 0,64 menunjukkan tiga primer ini sangat informatif digunakan pada empat sampel Marchantia karena nilai PICnya lebih dari 0,5.

**UCAPAn terima kasih**

Terimakasih kepada Kepala Laboratorium Laboratorium Sel dan Molekuler Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika Pertanian (BB-Biogen) Cimanggu-Bogor.

# Daftar Pustaka

Avval, S. E. 2017. Assessing Polymorphism Information Content (PIC) Using SSR Molecular Markers on Local Species of *Citrullus Colocynthis.* Case Study: Iran, Sistan-Balouchestan Province. *Journal of Molecular Biology Research*. Vol. 7 (1).

Brzyski, J. R., Kelly J. Adams, Charlotte M. Walter, Kristin H. Gale, & D. Nicholas M. 2012. Characterization of 12 Polymorphic Microsatellite Markers in The Liverwort *Marchantia Inflexa* (Marchantiaceae). American *Journal of Botany.* Vol. 0: 440–442.

Carsono, N., Pradita N. L., Farida D., Untung S., & Santika S. 2014. Identifikasi Polimorfis Marka-Marka Molekuler yang Diduga Berkaitan dengan Karakter Daya Hasil Tinggi pada 30 Genotip Padi. *Jurnal Chimica et Natura Acta*. Vol. 2: 91-95.

Carsono, N., Gigih I. P., Neni R. & Danar D. 2016. Seleksi Berbasis Marka Molekuler pada Padi Generasi F2 Guna Merakit Galur Padi Harapan Tahan Wereng Coklat. *Jurnal Agrikultura*. Vol. 27 (1): 9-15.

He Ping, Huang., [Li JC](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20JC%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25804198), [Huang LQ](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Huang%20LQ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25804198), [Wang DL](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wang%20DL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25804198), [Huang P](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Huang%20P%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25804198), [Nie JS](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nie%20JS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25804198). 2015. The Application of Biotechnology in Medicinal Plants Breeding Research in China. Journal of Chin J Integr Med. Vol. 21(7): 551-560. doi: 10.1007/s11655-015-2072-y.

Mo, X., Ju Gao, dan Lizhi Gao. 2013. Characterization of Microsatellite Markers and Their Application to Genetic Diversity Analysis of *Brachypodium sylvaticum* var. breviglume from Yunnan, China. *American Journal of Plant Sciences*. Vol. 4: 1427-1434.

Nilkanta, Heikrujam., Thoungamba Amom, Leimapokpam Tikendra, Hamidur Rahaman, and Potshangbam Nongdam. 2017. ISSR Marker Based Population Genetic Study of *Melocanna baccifera* (Roxb.) Kurz: A Commercially Important Bamboo of Manipur, North-East India. *Journal of Hindawi Scientifica*. Vol. 0: 1-9. doi:10.1155/2017/3757238.

Pathak, M. R. & Mohammad S. A. 2014. The Role of Biotechnology in The Conservation of Biodiversity. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences.* Vol. 2(4): 352-363.

Sharma, M. V,. S. K. Kantartzi, & J. M. Stewart. 2009. Molecular Diversity and Polymorphism Information Content of Selected Gossypium hirsutum Accessions. *Journal Summaries of Arkansas Cotton Research.* Vol. 1(2): 124-127.

Shimamura, Masaki. 2016. Marchantia polymorpha: Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Journal* of Plant and Cell Physiology. Vol. 57(2): 230–256. [doi:10.1093/pcp/pcv192](https://doi.org/10.1093/pcp/pcv192).

Vieira, Maria Lucia Carneiro.,[Luciane Santini](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Santini%20L%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27561112), [Augusto Lima Diniz](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Diniz%20AL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27561112),& [Carla de Freitas Munhoz](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Munhoz%20Cd%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=27561112). 2016. Microsatellite Markers: What They Mean And Why They Are So Useful. *Journal of* [*Genet Mol Biol*](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5004837/). Vol. 39(3): 312–328. doi: [10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027](https://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027).

El-Esawi, M.A. SSR analysis of genetic diversity and structure of the germplasm of faba bean (Vicia faba L.). C. R. Biol. 2017, 340, 474–480