

DESAIN PRIMER UNTUK DETEKSI GEN MATURASE K DAN RBCL PADA TANAMAN *DIOSCOREA PENTAPHYLLA* BERBASIS APLIKASI SNAPGENE

Oleh

Zubaidi Bachtiar

Program Studi Rekayasa Hayati, Fakultas Teknik, Institut Teknologi Lombok,
Lombok, Indonesia

E-mail: zubaidibachtiar@lit.ac.id

Article History:

Received: 25-06-2025

Revised: 18-07-2025

Accepted: 28-07-2025

Keywords:

Dioscorea Pentaphylla, PCR,
SnapGene

Abstract: *Dioscorea pentaphylla* merupakan tanaman umbi tropis yang memiliki nilai penting sebagai sumber pangan dan obat tradisional. Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer PCR secara *in silico* untuk gen yang relevan dengan identifikasi taksonomi dan fungsi biologis tanaman ini, yaitu *matK* dan *rbcl*. Perancangan dilakukan menggunakan perangkat lunak SnapGene dengan parameter standar primer, seperti panjang 18–24 basa, kandungan GC 40–60%, dan suhu leleh (T_m) optimal sekitar 50–60°C. Data sekuens gen diperoleh dari GenBank, kemudian dianalisis dan divisualisasikan untuk menentukan posisi optimal primer. Hasil simulasi PCR menunjukkan bahwa semua primer mampu menghasilkan fragmen DNA yang spesifik dan stabil, sehingga layak digunakan dalam analisis molekuler, studi filogenetik, dan aplikasi bioteknologi seperti pengembangan biofertilizer berbasis mikroba rizosfer. Meskipun demikian, keterbatasan data sekuens lengkap dan belum dilakukannya validasi *in vitro* menjadi kendala utama yang perlu diperhatikan dalam penelitian lanjutan. Studi ini memberikan dasar awal yang kuat untuk pengembangan teknik molekuler pada *D. pentaphylla* dalam konteks pertanian berkelanjutan dan pemuliaan tanaman berbasis genetik.

PENDAHULUAN

SnapGene merupakan salah satu perangkat lunak bioinformatika yang digunakan secara luas untuk membantu visualisasi dan analisis sekuens DNA secara interaktif. Dalam penelitian molekuler, SnapGene sangat bermanfaat dalam memverifikasi hasil desain primer secara *in silico* sebelum dilakukan eksperimen PCR di laboratorium (Malau et al., 2025). Perangkat lunak ini memungkinkan pengguna untuk memasukkan sekuens primer dan memetakan posisinya terhadap sekuens target DNA guna memastikan bahwa primer menempel pada lokasi yang tepat tanpa adanya mismatch (ketidakcocokan). Selain itu, SnapGene dapat digunakan untuk mensimulasikan hasil PCR, termasuk memperkirakan ukuran ampikon, sehingga dapat membantu menentukan keberhasilan desain primer

sebelum tahap eksperimental dilakukan. Dengan antarmuka visual yang mudah digunakan dan fitur simulasi yang akurat, SnapGene menjadi alat penting dalam mendukung efisiensi dan keakuratan eksperimen biologi molekuler (Malau et al., 2025).

Desain primer PCR merupakan tahapan penting dalam teknik amplifikasi DNA karena menentukan keberhasilan, spesifisitas, dan efisiensi reaksi PCR. Primer merupakan sekuens pendek DNA yang dirancang untuk mengenali dan melekat pada bagian spesifik dari gen target. Dalam merancang primer yang baik, beberapa parameter utama harus diperhatikan, seperti panjang primer yang idealnya berkisar antara 18–25 basa, kandungan GC sebesar 40–60%, serta suhu leleh (T_m) yang optimal mendekati 60 °C agar primer dapat berikatan secara efisien selama proses annealing. Selain itu, penting untuk menghindari pembentukan struktur sekunder seperti hairpin, self-dimer, atau cross-dimer yang dapat mengganggu proses amplifikasi (Chen et al., 2023). Pada tahap awal, primer dapat dirancang menggunakan perangkat lunak seperti Primer3Plus, kemudian dievaluasi kualitasnya menggunakan alat bantu seperti NetPrimer. Setelah itu, primer yang telah dipilih dapat diverifikasi secara visual menggunakan perangkat lunak SnapGene untuk memastikan bahwa posisi ikatannya terhadap sekuens target benar dan tidak terjadi mismatch (Malau et al., 2025). Validasi lebih lanjut dilakukan dengan analisis melt curve dan elektroforesis gel agarosa untuk memastikan bahwa amplifikasi menghasilkan pita tunggal, yang menunjukkan spesifisitas primer yang tinggi. Dengan prosedur yang tepat, desain primer PCR dapat digunakan secara akurat untuk berbagai keperluan, seperti deteksi DNA spesifik, autentikasi bahan biologis, serta analisis ekspresi gen.

Dioscorea pentaphylla merupakan salah satu spesies dari genus *Dioscorea* yang tersebar luas di wilayah tropis dan subtropis, termasuk Jepang. Berdasarkan penelitian oleh Noda et al. (2022), spesies ini termasuk dalam kelompok *Dioscorea* asli Jepang yang dianalisis menggunakan penanda DNA plastid (*trnK/matK*, *rbcL*, *atpB*, *trnL-F*) dan penanda nukleat (*PHYC* dan *18S rDNA*) untuk mengungkap hubungan filogenetik dan taksonomi antarspesies. Hasil analisis menunjukkan bahwa meskipun *D. pentaphylla* memiliki variasi morfologis yang luas, spesies ini tetap dapat dibedakan secara genetik dari spesies *Dioscorea* lainnya. Selain itu, tidak ditemukan bukti adanya hibridisasi antarspesies, meskipun beberapa di antaranya tumbuh berdampingan di habitat yang sama. Hal ini menegaskan bahwa *D. pentaphylla* memiliki integritas genetik yang tinggi dan valid secara taksonomi (Noda et al., 2022).

Gen *matK* (maturase K) merupakan bagian dari genom kloroplas yang berperan dalam penyambungan intron tipe II pada RNA dan sering digunakan sebagai penanda DNA barcoding karena tingkat evolusinya yang cukup tinggi dan kemampuan membedakan spesies tanaman secara efisien (Ho et al., 2021; Pratiwi et al., 2023). Bersama dengan *matK*, gen *rbcL* yang mengkode subunit besar enzim Rubisco juga umum digunakan dalam studi taksonomi molekuler karena sifat konservatifnya yang tinggi, meskipun memiliki variasi sekuens yang lebih rendah, namun sangat efektif dalam proses amplifikasi dan pembacaan sekuens (Ho et al., 2021; Pratiwi et al., 2023).

Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer yang cocok untuk gen Maturase K, *rbcL*, *acdS*, *nifH*, dan *pqqC*. Hasil dari studi ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lanjutan dalam bidang identifikasi ekspresi gen, dan potensi aplikasi bioteknologi tanaman untuk memudahkan proses seleksi tanaman unggul berbasis molekuler.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan studi kualitatif dengan pendekatan *in silico* untuk merancang primer PCR spesifik yang dapat digunakan untuk keperluan deteksi molekuler *Dioscorea pentaphylla*. Seluruh tahapan penelitian dilakukan menggunakan perangkat bioinformatika dan basis data molekuler.

Tahap awal dimulai dengan pengambilan data sekuens DNA dari *Dioscorea pentaphylla* melalui website *GenBank*. Gen yang digunakan sebagai sumber utama data genetik dalam penelitian ini, yaitu gen *Maturase K* dan *rbcl*. Gen dari organisme *Dioscorea pentaphylla* dipilih karena telah memiliki data sekuens nukleotida yang tersedia untuk diunduh dari basis data. Fokus pencarian gen diarahkan pada kandidat gen yang diduga terlibat dalam biosintesis senyawa bioaktif, seperti gen pengkode enzim dari jalur biosintesis steroid saponin, termasuk diosgenin.

Sekuens DNA dari dua gen tersebut kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak *SnapGene*. Analisis ini meliputi proses preparasi sekuens, identifikasi *open reading frame* (ORF), serta anotasi fitur penting seperti coding sequence (CDS), exon, dan intron. Visualisasi struktur gen dilakukan untuk memahami struktur gen dan menentukan wilayah gen yang paling sesuai untuk perancangan primer PCR. Setelah itu, desain primer dilakukan menggunakan perangkat lunak *SnapGene*, dengan penentuan beberapa parameter yaitu panjang primer antara 18–24 basa, suhu annealing (T_m) antara 50–60°C, kandungan GC 40–60%, serta menghindari pembentukan struktur sekunder seperti dimer dan hairpin. Primer dirancang untuk menempel secara spesifik pada wilayah konservatif dari gen target berdasarkan sekuens gabungan ketiga isolat yang dianalisis.

Hasil desain primer kemudian divalidasi secara *in silico* menggunakan fitur simulasi PCR dalam *SnapGene*. Validasi ini bertujuan memastikan spesifisitas primer hanya terhadap gen target tanpa amplifikasi non-spesifik. Primer yang lolos kriteria validasi selanjutnya dikategorikan sebagai kandidat primer terbaik untuk aplikasi molekuler pada tahap penelitian.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dioscorea pentaphylla adalah salah satu jenis tanaman umbi tropis yang dikenal secara lokal sebagai ubi gadung lima jari. Tanaman ini tumbuh secara alami di berbagai wilayah tropis dan memiliki nilai penting sebagai sumber pangan maupun obat tradisional karena kandungan senyawa aktif dan nutrisinya yang tinggi.

DNA *Maturase K* dari *Dioscorea pentaphylla*

DNA *maturase K* (*matK*) merupakan salah satu gen yang terdapat pada genom kloroplas tumbuhan dan berperan penting dalam proses pematangan RNA. Gen ini mengkode enzim *maturase K* yang berfungsi membantu proses splicing atau penyambungan intron Grup II pada RNA, sehingga sangat vital dalam pemrosesan RNA di dalam kloroplas. Selain fungsi biologisnya, *matK* juga dikenal luas sebagai salah satu penanda molekuler (DNA barcode) yang paling banyak digunakan dalam identifikasi dan autentikasi spesies tumbuhan. Hal ini disebabkan oleh sifat gen *matK* yang cukup terkonservasi namun memiliki variasi sekuens yang cukup untuk membedakan spesies pada tingkat genus maupun spesies. Oleh karena itu, *matK* sering digunakan dalam studi filogenetik, analisis hubungan kekerabatan, serta autentikasi bahan baku tanaman obat dan produk herbal (Sumarlina, 2023).

FASTA ▾

Send to: ▾

Dioscorea pentaphylla voucher GUH 5054 maturase K (*matK*) gene, partial cds; plastid

GenBank: KM015514.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>KM015514.1 *Dioscorea pentaphylla* voucher GUH 5054 maturase K (*matK*) gene, partial cds;

Gambar 1. Sekuens DNA Maturase K dari *Discorea pentaphylla*

Berdasarkan Gambar pada DNA Maturase K plastid yang terdapat dalam data tersebut hanya sebagian kecil yakni 898 bp dari total DNA yang diekstraksi dari jaringan tanaman, maka amplifikasi dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) menjadi langkah penting untuk meningkatkan konsentrasi fragmen gen *matK* yang spesifik, sehingga dapat dikenali dan dianalisis lebih lanjut. Proses PCR juga memungkinkan peneliti untuk menargetkan daerah tertentu dari gen tersebut dengan menggunakan primer universal yang telah dirancang sebelumnya. Penggunaan gen *matK* dalam analisis molekuler tumbuhan, termasuk pada genus *Dioscorea*, terbukti memberikan resolusi taksonomi yang tinggi dan mampu mendukung rekonstruksi hubungan filogenetik yang lebih akurat antarspesies (Wilkin et al., 2005).



Primer	Length	Binding Sites	Tm
☒ Primer TOP	24-mer	2 .. 25	59°C
/sequence = AGCGCTGAGGGATCCACTAAGATA			
50% GC			
/modification = 5' phosphorylated			
☒ Reversh	45-mer	851 .. 880	56°C
/sequence = GTYRACGCTGGTNACCAAGCTTCCTTCTTAGAGGATAAATCATCA			
43% GC			
/modification = 5' phosphorylated			

Gambar 2. Desain Primer PCR gen *Maturase K* pada aplikasi Snapgene

Tampilan gambar diatas memperlihatkan hasil perancangan primer dan simulasi amplifikasi PCR terhadap gen *matK*. Bagian atas gambar menampilkan spesifikasi primer yang digunakan, yakni Primer TOP (forward) sepanjang 24 pasangan basa dengan kandungan GC sebesar 50% dan suhu leleh (Tm) 59°C, serta Primer Reversh (reverse) sepanjang 45 pasangan basa dengan kandungan GC 43% dan Tm 56°C. Keduanya dimodifikasi dengan fosforilasi pada ujung 5' untuk mendukung proses ligasi lanjutan jika diperlukan. Hasil desain tanda pada forward menunjukkan posisi primer forward yang dirancang untuk menghindari daerah awal sekuens dengan kandungan GC rendah, dimulai dari posisi nukleotida ke-45 hingga ke-69 guna mengoptimalkan kestabilan ikatan primer pada saat proses annealing.

Sementara itu, bagian reverse menampilkan lokasi pengikatan primer reverse yang diletakkan pada ujung akhir sekuens, dekat dengan situs enzim HindIII, sehingga memungkinkan amplifikasi penuh gen target sepanjang 836 bp dan memfasilitasi aplikasi lanjutan seperti kloning atau restriksi fragmen. Berkurangnya panjang total sekuens hasil PCR dibandingkan panjang awal dari GenBank (898 bp) disebabkan oleh penempatan primer yang tidak berada di ujung awal sekuens, melainkan pada wilayah yang lebih stabil secara termodinamik dan tidak rentan terhadap pembentukan struktur sekunder. Strategi ini umum diterapkan dalam desain primer untuk meningkatkan efisiensi, spesifisitas, dan kestabilan amplifikasi PCR (Septiasari et al., 2023).

Berdasarkan seluruh proses perancangan dan simulasi yang telah dilakukan bahwa desain primer untuk amplifikasi gen *maturase K* (*matK*) berhasil menghasilkan amplifikasi

fragmen DNA sepanjang 836 bp dari total panjang sekuens awal sebesar 898 bp. Pemangkasan bagian awal sekuens dilakukan secara sengaja untuk menghindari daerah dengan kandungan GC rendah yang berpotensi menurunkan efisiensi primer. Penempatan primer reverse di ujung akhir sekuens dan penyesuaian suhu leleh antar pasangan primer juga telah dipertimbangkan untuk menjaga kestabilan termodinamika selama proses amplifikasi. Simulasi PCR in silico menunjukkan bahwa produk yang dihasilkan telah mencakup sebagian besar wilayah coding gen *matK*, menjadikannya cukup representatif untuk tujuan identifikasi dan analisis filogenetik.

DNA *rbcl* dari *Dioscorea pentaphylla*

DNA/Gen *rbcl* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) merupakan penanda molekuler penting yang digunakan luas dalam studi taksonomi tumbuhan karena sifatnya yang konservatif dan evolusi yang lambat. Dalam studi Wa Ode Kamillah (2025), gen ini terbukti sangat stabil pada *Dioscorea alata*, dengan identitas sekuens mencapai 100% antar aksesion, mencerminkan homogenitas genetik akibat domestikasi jangka panjang. Meskipun demikian, gen *rbcl* tetap menunjukkan variasi antarspesies dalam genus *Dioscorea*, seperti pada *D. bulbifera*, *D. esculenta*, dan *D. dumetorum*, yang mengalami beberapa substitusi nukleotida pada posisi tertentu. Dengan demikian, *rbcl* cocok digunakan untuk identifikasi dan klasifikasi antarspesies, termasuk untuk spesies lain seperti *Dioscorea pentaphylla*, yang juga merupakan umbi potensial dan tersebar luas di Asia tropis. Penggunaan *rbcl* pada *D. pentaphylla* dapat membantu mengkonfirmasi identitas spesiesnya serta menempatkannya secara filogenetik dalam kerangka genus *Dioscorea*.

Dioscorea pentaphylla isolate PS5027MT03 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (*rbcl*) gene, partial cds; chloroplast

GenBank: HQ637811.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>HQ637811.1 Dioscorea pentaphylla isolate PS5027MT03 ribulose-1,5-bisphosphate
carboxylase/oxygenase (rbcl) gene, partial cds; chloroplast
ATGTACCAACAACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAGCTGGTTAAAGATTATAATTGACTT
ATTATACCTCTGAGTACGAAACCAAGATACTGATATCTTAGCGGCATTCCGAGTAACCTCAACCTGG
GGTTCCGCCCAAGAAGCAGGGGCTGCAGTAGCCGCTGAATCGTCCACTGGTACATGGACAACCTGTGTGG
ACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAGGACGATGCTACCACATCGAGCCCGTTATTGGGGAGG
AAGACCAATATATTGCTTATGTAGCCTATCCTTAGACCTTTTGGAGGAAGGTTCTGTTACCAATATGTT
TACTTCCATTGTAGGTAATGATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCCCTACGCTGGAGGATCTGCCAATT
CCTACTTCTTATTTCAAACTTTCCAAGGCCACCGCACGGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAGTTGAACA
AGTATGGCCCTCCCTATTGGGATGCACTATTAAACCAAAATTGGGTTATCCGCAAGAACTACGGCAG
AGCCGTTTATGAATGCTACGTGGTGGACTTGATTTACCAAGGATGATGAAATGTGAACCTACAACCA
TTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTGATTTTGTGCCGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAAACAGGCG
AAATCAAGGGACATTACTTGAATGCTACTGC
```

Gambar 3. Sekuens DNA *rbcl* dari *Dioscorea pentaphylla*

Gen *rbcl* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) dari tanaman *Dioscorea pentaphylla* merupakan salah satu gen yang terletak pada genom plastid (kloroplas) dan berfungsi penting dalam proses fotosintesis, khususnya pada fiksasi karbon melalui enzim Rubisco. Gen ini termasuk gen konservatif yang sering digunakan dalam studi taksonomi dan barcoding DNA tumbuhan karena kestabilan sekuensnya dan kemudahan dalam proses amplifikasi. Dalam berbagai penelitian, *rbcl* telah terbukti efektif dalam

membedakan spesies tumbuhan pada tingkat genus, meskipun memiliki laju evolusi yang lebih lambat dibandingkan gen plastid lainnya.

Berdasarkan Gambar 3 data sekuens yang diperoleh dari GenBank dengan nomor akses HQ637811.1 menunjukkan bahwa DNA plastid yang berhasil ditampilkan merupakan bagian parsial (partial coding sequence) dari gen *rbcl*, yaitu sepanjang 554 bp. Panjang ini merupakan sebagian kecil dari total genom plastid yang diekstraksi dari jaringan kloroplas tanaman. Oleh karena itu, amplifikasi menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR) menjadi tahap penting untuk memperkuat konsentrasi fragmen gen *rbcl* yang spesifik agar dapat dianalisis lebih lanjut. Proses PCR memungkinkan peneliti untuk menargetkan area tertentu dalam gen tersebut dengan menggunakan primer universal atau spesifik yang telah dirancang sebelumnya. Penggunaan gen *rbcl* dalam analisis molekuler pada genus *Dioscorea*, termasuk *D. pentaphylla*, telah terbukti mendukung resolusi taksonomi dan pemetaan filogenetik antarspesies yang akurat. Kombinasi antara gen *rbcl* dan gen plastid lainnya seperti *matK* sering digunakan untuk meningkatkan efektivitas identifikasi genetik dalam studi keragaman tumbuhan tropis (Wa Ode Kamillah, 2025).



☒	Primer 1	24-mer	2 .. 25	→	55°C
	/sequence = GAATTCYGAATTCCATCATCACCA				
	40% GC				
	/modification = 5' phosphorylated				
☒	Primer 2	24-mer	755 .. 778	←	56°C
	/sequence = AAGCTTGCAGTAGCATTCAAGTAA				
	38% GC				
	/modification = 5' phosphorylated				

Gambar 4. Desain Primer PCR gen rbcL pada aplikasi Snapgene

Gambar diatas menunjukkan tampilan hasil analisis sekuens DNA linear sepanjang 778 pasangan basa menggunakan perangkat lunak SnapGene. Di dalamnya ditunjukkan dua primer PCR, yaitu Primer 1 (forward) yang terletak pada posisi awal sekuens, dan Primer 2 (reverse) yang berada di bagian akhir, tepat sebelum nukleotida ke-778. Primer 1 memiliki urutan GAATTCYGAATTCCACCATCACCA, dengan kode "Y" menunjukkan adanya degenerasi basa (C/T), yang berguna untuk menyesuaikan primer dengan variasi sekuens target. Sementara itu, Primer 2 memiliki urutan AATGGAATTCACGGAAGTACGT, dirancang untuk menempel pada untai komplementer dan memperluas amplifikasi ke arah berlawanan. Di antara kedua primer ini, ditampilkan pula berbagai situs enzim restriksi, seperti EcoRV, HindIII, PstI, EcoNI, dan lainnya, yang masing-masing memotong pada lokasi spesifik dalam sekuens DNA. Informasi ini sangat berguna dalam perencanaan kloning gen, pemotongan DNA, atau manipulasi genetik lebih lanjut. Penempatan primer yang mencakup hampir seluruh panjang sekuens menunjukkan bahwa desain ini bertujuan untuk mengamplifikasi fragmen DNA secara penuh, dan pemilihan situs yang menghindari daerah kompleks atau tidak stabil menandakan pendekatan yang tepat dan strategis dalam rekayasa genetik berbasis bioinformatika.

Primer 2 merupakan primer reverse dengan panjang 24 basa (24-mer) yang menempel pada posisi nukleotida 755 hingga 776. Urutan primer ini adalah AAGCTTCGAGTACATTCAAGGTAA, dengan kandungan GC sebesar 38% dan suhu leleh (T_m) sebesar 56°C. Kandungan GC yang mendekati batas bawah ideal (yakni 40%) masih dapat diterima, tetapi menunjukkan bahwa primer ini mungkin kurang stabil jika digunakan dalam kondisi PCR yang kurang optimal. Meskipun demikian, T_m yang cukup mendekati suhu optimal (55–60°C) menjadikan primer ini masih cocok digunakan dalam reaksi PCR, terutama jika disandingkan dengan primer forward yang memiliki T_m seimbang. Modifikasi 5' phosphorylated yang ditambahkan menunjukkan bahwa primer ini dirancang untuk aplikasi lanjutan seperti ligasi atau kloning DNA.

Primer 3, di sisi lain, merupakan primer dengan panjang 57 basa (57-mer), yang jauh lebih panjang dari primer standar (18–30 basa). Urutannya adalah GAATTTCTGAATTCCATTCCACATCACACCACGAAATTGCAGTGTGTCACCAACAAAGAG, dengan kandungan GC sebesar 44% dan suhu leleh (T_m) 67°C. T_m yang tinggi sejalan dengan panjang primer yang besar, memberikan ikatan yang kuat dan spesifik pada target DNA. Namun, panjang yang terlalu berlebihan dapat meningkatkan risiko pembentukan struktur sekunder seperti hairpin atau dimer, serta dapat mengurangi efisiensi PCR jika tidak dioptimalkan dengan baik. Seperti Primer 2, primer ini juga dimodifikasi dengan 5' phosphorylated, memperjelas bahwa desain ini diarahkan untuk aplikasi kloning atau manipulasi genetik lanjut yang memerlukan ujung yang termodifikasi.

Mode filogenetik MatK yang jarang serta tingkat substitusi yang relatif tinggi pada level asam amino dan nukleotida telah menimbulkan pertanyaan tentang fungsi maturase K. MatK

juga memiliki sinyal evolusi yang kuat, yang menjadikannya gen yang sangat bermanfaat dalam studi evolusi tumbuhan dan sistematika (Michelle, et al., 2007). Mat K digunakan sebagai penanda molekuler dalam sistematika tumbuhan untuk mengidentifikasi keragaman yang muncul antara spesies hewan dan tumbuhan. Dalam studi tumbuhan, wilayah spacer transkripsi internal (ITS) dari cistron ribosomal nuklir biasanya digunakan sebagai lokus urutan untuk sistematika molekuler (Kress, et al., 2005). Gen nuklear, kloroplas, dan mitokondria yang melimpah telah digunakan untuk menganalisis perbedaan urutan pada tingkat genus. Maturase K adalah intron sepanjang 1500 bp di dalam trnK dan mengkode protein yang mirip dengan maturase, yang berperan dalam pemotongan intron Grup II (Chase et al., 1993; Thakar, et al., 2021). Maturase K juga memiliki tingkat substitusi yang tinggi di antara spesies, dan ia muncul sebagai kandidat yang mungkin untuk melakukan evaluasi sistematis tanaman dan evolusinya (Notredame, et al., 2000).

Sementara itu, menurut studi marka rbcL cukup baik untuk menganalisis hubungan filogenetik pada Mangifera pada tingkat genus, spesies, dan infraspecies karena gen rbcL sangat konservatif dan mampu membedakan antar spesies (Juliantari et al., 2018; Trivedi et al., 2018). Untuk menilai keragaman genetik suatu spesies, Barcode of Life Database (BOLD) menetapkan tanda ini sebagai barcode sekuen DNA. Penanda ini berlaku untuk semua gen tanaman (Trivedi et al., 2018). Gen rbcL (base pair) memiliki panjang sekitar 1400 bp, sehingga menyediakan banyak karakter untuk penelitian filogenetik (CBOL, 2009).

Sangat sulit untuk menemukan penanda barcode DNA yang universal dan konsisten pada spesies tanaman. Hasilnya, banyak barcode DNA tanaman memiliki efisiensi yang berbeda untuk berbagai spesies tanaman. Barcode ini termasuk spacer internal transcribed (ITS1 dan ITS2), spacer intergenic (trnH-psbA, atpF-atpH, dll.), dan daerah coding chloroplast (rbcL, matK, dll.). Di antara barcode tanaman ini, kombinasi keduanya disarankan untuk digunakan sebagai barcode utama untuk spesies tumbuhan tertentu. Selain mudah diamplifikasi dan diurutkan, gen rbcL dapat melacak hubungan evolusi spesies tumbuhan (Hollingsworth et al., 2011). Sehingga ini memberikan informasi penting terhadap hasil analisis desain primer menggunakan aplikasi snapgene untuk memudahkan dalam deteksi molekuler gen.

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil merancang primer PCR secara *in silico* untuk gen matK dan rbcL pada *Dioscorea pentaphylla* menggunakan perangkat lunak SnapGene. Hasil simulasi menunjukkan bahwa primer yang dirancang memiliki parameter optimal (panjang, GC content, dan suhu leleh) dan mampu menghasilkan fragmen DNA spesifik sesuai target, sehingga berpotensi digunakan dalam identifikasi molekuler, studi filogenetik, dan aplikasi bioteknologi seperti pengembangan biofertilizer. Namun, penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, antara lain keterbatasan data sekuens lengkap dari isolat *D. pentaphylla* di GenBank, yang menyebabkan analisis hanya dilakukan pada sekuens parsial, serta belum dilakukannya uji *in vitro* untuk memvalidasi efektivitas primer secara eksperimental. Oleh karena itu, hasil penelitian ini perlu ditindaklanjuti dengan validasi laboratorium dan eksplorasi genetik lanjutan agar dapat diimplementasikan secara lebih luas dalam bidang pertanian berkelanjutan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Barthet, Michelle M., and Khidir W. Hilu. "Expression of matK: functional and evolutionary implications." *American Journal of Botany* 94, no. 8 (2007): 1402-1412.
- [2] CBOL Plant Working Group. "A DNA barcode for land plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2009): 12794-12797.
- [3] Chase, Mark W., Douglas E. Soltis, Richard G. Olmstead, David Morgan, Donald H. Les, Brent D. Mishler, Melvin R. Duvall et al. "Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene rbcL." *Annals of the Missouri Botanical Garden* (1993): 528-580.
- [4] Chen, Zhiwei, Nigel G. Halford, and Chenghong Liu. "Real-time quantitative PCR: primer design, reference gene selection, calculations and statistics." *Metabolites* 13, no. 7 (2023): 806.
- [5] Ho, Viet The, Thi Kim Phuong Tran, Thi Thanh Tram Vu, and Sasanti Widiarsih. "Comparison of matK and rbcL DNA barcodes for genetic classification of jewel orchid accessions in Vietnam." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19, no. 1 (2021): 93.
- [6] Hollingsworth, Peter M., Sean W. Graham, and Damon P. Little. "Choosing and using a plant DNA barcode." *PloS one* 6, no. 5 (2011): e19254.
- [7] Juliantari, Erwina, Nery Sofiyanti Fitmawati, and Nery Sofiyanti. "Phylogeny of mango (*Mangifera*) in Eastern Sumatra using molecular markers of cpDNA rbc L." *International Journal of Science and Applied Technology* 3, no. 1 (2018): 17-24.
- [8] Kress, W. John, Kenneth J. Wurdack, Elizabeth A. Zimmer, Lee A. Weigt, and Daniel H. Janzen. "Use of DNA barcodes to identify flowering plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, no. 23 (2005): 8369-8374.
- [9] Malau M, Sembiring RJ, and Sinaga E. Pengembangan Primer Spesifik Spesies yang Menargetkan Gen *Cyt b* Mitokondria untuk Deteksi DNA Babi. *Jurnal Nukleus*, 11(2025), 351-360.
- [10] Noda T, Watanabe Y, Okuyama Y, Sugawara T, Ito T, Yokota M, and Murakami N. Phylogenetic relationships of Japanese *Dioscorea* species and their taxonomic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 198(202), 186-204.
- [11] Notredame, Cédric, Desmond G. Higgins, and Jaap Heringa. "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." *Journal of molecular biology* 302, no. 1 (2000): 205-217.
- [12] Ode, Kamillah Wa. "Eksplorasi In Silico Gen Rbcl Pada *Dioscorea Alata*: Keragaman Genetik Untuk Ketahanan Pangan Masa Depan." *Bioma: Jurnal Biologi Makassar* 10, no. 2 (2025): 31-44.
- [13] Pratiwi, Apriliana, Anggiresti Kinasih, Maura Indria Meidianing, Febri Yuda Kurniawan, and Endang Semiarti. "In Silico Approach for DNA Barcoding using Phylogenetic Analysis of *Coelogyne* spp. based on the mat K, rpo C1, rbc L, and nrDNA Markers." *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology* 8, no. 3 (2023): 73130.
- [14] Septiasari NPS, Junitha IK, and Wirasiti NN. Optimasi digesti enzim restriksi untuk deteksi mutasi daerah D-loop DNA mitokondria dengan metode PCR-RFLP. *Jurnal Biologi Udayana*, 27(2023), 65-72.
- [15] Sumarlina, Napitupulu T S, Nadhirah A, and Mulyadi F. Analisis molekuler tanaman

- fungsi genus *Momordica* berdasarkan DNA barcode region matK. *Jurnal Agriment*, 8(2023). 51-59.
- [16] Thakar, S. B., M. J. Dhanavade, and K. D. Sonawane. "Phylogenetic, Sequence Analysis And Structural Studies Of Maturase K Proteins From Fern Species." (2021).
- [17] Trivedi, Subrata, Hasibur Rehman, Shalini Saggu, Chellasamy Panneerselvam, and Sankar K. Ghosh, eds. *DNA barcoding and molecular phylogeny*. Springer, 2020.
- [18] Wilkin, Paul, Peter Schols, Mark W. Chase, Kongkanda Chayamarit, Carol A. Furness, Suzy Huysmans, Franck Rakotonasolo, Erik Smets, and Chirdsak Thapayai. "A plastid gene phylogeny of the yam genus, *Dioscorea*: roots, fruits and Madagascar." *Systematic Botany* 30, no. 4 (2005): 736-749.

HALAMAN INI SENGAJA DIKOSONGKAN