

## Optimasi Suhu Annealing Primer Degenerate untuk Mengamplifikasi Fragmen Gen Arginine Decarboxylase (ADC) Genom Ubi Kayu Lokal Maluku Tenggara

*Optimization Of The Annealing Temperature With Degenerate Primer For Amplification Of Arginine Decarboxylase (ADC) Fragment Gene From Genomic DNA of Maluku Tenggara Local Cassava*

Siti Kurniawati<sup>\*</sup>, N. Sri Hartati

Puslit Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor KM 46 Cibinong, 16911

<sup>\*</sup>E-mail: kurniawatie@gmail.com

### ABSTRACT

Arginine decarboxylase (ADC) is a key enzyme responsible for polyamines biosynthesis and has been shown to increase resistance to biotic and abiotic stress. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) is able to grow and produce storage roots well on marginal land. The purpose of this study was to optimize annealing temperature of primers in PCR reaction to amplify candidate cassava ADC gene fragments. Annealing temperature is a crucial factor in PCR reaction affecting product (gene fragments) specificity. Four pairs of primers; MeADC1, MeADC2, MeADC3, and MeADC4, were designed using degenerate method from several plants species such as *Jatropha curcas* (Acc XM\_022220421), *Populus trichocarpa* (Acc XM\_002306105.2), *Capsicum annuum* cv Nockwang (Acc KC160547.1) and *Lycopersicon esculentum* (Acc L16582.1). All primer pairs successfully amplified DNA fragments from local cassava genotypes (Maluku Tenggara/Malra) including Malra012 and Malra016. The MeADC1 primer amplified DNA fragment with less than 1,000 base pairs (bp) at annealing temperature of 46°C, 47°C and 48°C. However, analysis of PCR product sequencing results using NCBI BLAST method showed that the amplified DNA fragment encodes for ribosomal protein S3 of *Oryza minuta* (Acc YP\_009242005.1).

**Keywords:** arginine decarboxylase, annealing, ADC, cassava, Maluku Tenggara, PCR

### PENDAHULUAN

Teknik rekayasa genetika semakin maju dan banyak diaplikasikan dalam peningkatan kualitas varietas tanaman. Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) sebagai salah satu komoditas tanaman pangan sumber karbohidrat masih memiliki banyak kekurangan namun juga memiliki banyak keunggulan. Kandungan nutrisi ubi kayu relatif kurang jika dibandingkan dengan sumber karbohidrat lainnya, namun tanaman ubi kayu memiliki keunggulan dari segi ketahanan terhadap cekaman baik biotik maupun abiotik. Tanaman ubi kayu dapat tumbuh dan berproduksi baik pada lahan suboptimum. Menurut Fan *et al.*, (2016), meskipun ubi kayu terlihat tahan terhadap cekaman kekeringan tetapi mekanisme terkait sifat toleransi terhadap kekeringan masih sangat sedikit diketahui dan dipelajari. Salah satu genotipe ubi kayu adaptif terhadap lahan marginal yaitu genotipe ubi kayu lokal yang banyak tumbuh di daerah Maluku Tenggara (Malra). Wilayah Malra dikenal dengan lahan kering, berkarang dengan

lapisan *topsoil* tipis. Menurut Susanto dan Sirappa (2007), desa debut di kepulauan Kei Kecil yang merupakan salah satu sumber koleksi keragaman ubi kayu lokal daerah Malra adalah daerah dengan kondisi lahan bertipe karst, tanah secara umum terbentuk dari bahan batu kapur koral dan alluvium/kolovium. Diperlukan usaha yang tinggi dalam budidaya tanaman pertanian atau hanya jenis dan genotipe tertentu yang mampu tumbuh dengan baik di Malra. Ubi kayu genotipe lokal yang tumbuh baik di Malra berpotensi sebagai sumber daya genetik yang dapat dikembangkan lebih lanjut baik sebagai bahan informasi genetik ataupun menghasilkan varietas tanaman unggul.

*Arginine decarboxylase* (ADC) merupakan enzim yang berperan dalam proses biosintesis poliamin, dan poliamin yang terdiri dari putresin, spermidin dan spermin telah terbukti dapat meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman (Gupta *et al.* 2013). Menurut Kusano *et al.* (2008), poliamin pada tanaman juga berperan dalam banyak proses fisiologis, seperti organogenesis, embryogenesis, inisiasi

dan pembungaan, penebaran daun, perkembangan dan pemasakan buah serta respon tanaman ketika terjadi cekaman biotik dan abiotik. Karena perannya yang sangat kompleks, oleh karena itu telah banyak dilakukan penelitian terutama melalui pendekatan molekuler terkait manipulasi biosintesis poliamin. Runutan lengkap basa nukleotida dari genome tanaman *Arabidopsis* telah dipakai sebagai sarana/alat menggunakan pendekatan 'omic' untuk mengidentifikasi gen target yang terlibat dalam jalur sinyal dan biosintesis poliamin (Alcázar *et al.* 2010). Peremarti *et al.* (2010) telah melakukan *cloning* gen ADC dari tanaman padi, Zhao *et al.* (2017), melakukan *cloning* gen SAMDC dari tanaman karet (*Hevea brasiliensis*), namun demikian, informasi mengenai runutan basa nukleotida dan fungsi dari gen ADC pada tanaman ubi kayu masih belum banyak dilakukan. Oleh karena itu sebagai tahap awal, telah dilakukan desain primer untuk memperoleh runutan basa nukleotida pengkode enzim poliamin dari tanaman ubi kayu genotipe lokal Malra.

Reaksi PCR merupakan salah satu bagian dari kegiatan dalam analisis molekuler DNA. Menurut Polz & Cavanaugh (1998), PCR merupakan alat yang sangat berharga karena kecepatan, sederhana dan efisien dalam mengamplifikasi segmen DNA spesifik dari latar belakang genome yang kompleks. Untuk mendapatkan amplifikasi fragmen gen target dalam hal ini gen ADC, maka keberhasilan amplifikasi sangat tergantung pada pemilihan primer yang tepat dan pada saat proses PCR yaitu tahap *annealing* (penempelan) primer pada DNA (Zein & Prawiradilaga, 2013). Optimasi suhu penempelan empat pasang primer *degenerate* dilakukan untuk mendapatkan fragmen gen *arginine decarboxylase* dari cetakan gDNA ubi kayu asal Malra.

## METODE

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juni sampai dengan September 2017 di Laboratorium Genetika Molekuler dan Modifikasi Jalur Biosintesa Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong-Bogor.

### Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genome dari daun muda tanaman ubi kayu dilakukan menggunakan metode yang dikembangkan oleh Doyle & Doyle (1990) yang telah dimodifikasi.

### Perancangan Primer *Degenerate* gen ADC

Perancangan primer diawali dengan mengumpulkan

informasi mengenai sekuen gen ADC dari beberapa tanaman yang telah terdeposit pada database *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primer dirancang sebanyak empat pasang. Sekuen yang dipilih berasal dari daerah *coding* DNA *sequence* (CDS) di mana CDS merupakan bagian dari sekuen DNA yang tersusun atas *exon* dan mengkodekan protein tertentu (Twyman, 2003)

### Amplifikasi DNA Genome dengan Primer *Degenerate* ADC

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR dilakukan sesuai dengan prosedur Kurniawati (2013) menggunakan empat pasang primer *degenerate* untuk mendapatkan fragmen gen ADC. Pasangan primer *degenerate* pertama yaitu *MeADC1* (Forward): 5'-ATG CCK GCC YTR GST TGT TG-3' dan *MeADC1* (Reverse): 5'-TCA AGC ASA GTK HMR TAG GA-3'. Pasangan primer *degenerate* kedua yaitu *MeADC2* (Forward): 5'-DTK GGY GGR GGR YTB CA-3' dan *MeADC2* (Reverse): 5'-TCA GGR ATT GWR GTR AAM AS-3'. Pasangan primer *degenerate* ketiga yaitu *MeADC3* (Forward): 5'-DTK GGY GGR YTB CA-3' dan *MeADC3* (Reverse): 5'-WMR MRS ASW KHM RTA GGA YC-3', dan pasangan primer *degenerate* keempat yaitu *MeADC4* (Forward): 5'-ATG CCK GCC YTR GST TGT TG-3' dan *MeADC4* (Reverse): 5'-TCA SCA CAN GAY GGD CCR GG-3'. Optimasi suhu *annealing* dilakukan mulai dari suhu yang rendah yaitu 40 °C hingga 50 °C selama 45 detik. Proses PCR dilakukan dengan 35 siklus dengan suhu pemanjangan/ekstensi pada 72 °C selama 90 detik.

### Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA

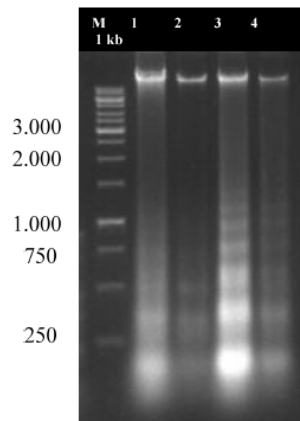
Hasil PCR menggunakan primer *degenerate* divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1% pada 1.0x buffer TAE (Tris Acetate Acid-EDTA). Sebanyak 5.0 µl produk PCR dari masing-masing sampel ditambahkan 0.2 µl loading dye dan dicampur sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam sumur di dalam gel. Untuk menentukan ukuran dari produk PCR disertakan juga DNA standart (1 kb plus ladder universal, KAPPA) sebagai pembanding. Sampel DNA dielektroforesis dengan tegangan 95 volt selama 1 jam 15 menit. Migrasi DNA pada gel agarose, setelah itu diwarnai pada larutan etidium bromide (10 mg L<sup>-1</sup>) selama 10 menit dan dicuci dengan 1x TAE selama 20-30 menit. Gel agarose kemudian divisualisasi menggunakan alat *geldoc*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penilaian Kualitas dan Kuantitas DNA

Kualitas masing-masing dari sampel DNA genome daun ubi kayu yang diekstraksi diverifikasi secara spektrofotometri menggunakan instrument NanoDrop dan elektroforesis gel agarose. Visualisasi hasil ekstraksi DNA genom dari daun ubi kayu lokal Malra terdiri dari dua genotipe dapat dilihat pada gambar 1. Genotipe Malra012 dan

Malra016 menunjukkan hasil yang baik, terlihat dari pendaran yang kuat dan keutuhan pita DNA genome kedua genotipe pada kedua ulangan sampel. Nilai absorpsi nanodrop berguna untuk mendeteksi kontaminan seperti protein, garam dan polisakarida yang dapat menghambat amplifikasi DNA. Rasio pada pembacaan panjang gelombang 260/280 nm sebesar 1.8 menunjukkan bahwa DNA yang diekstraksi memiliki kemurnian tinggi dengan tidak adanya protein dan fenol (Abdel-Latif & Osman, 2017).



Gambar 1. Elektroforegram gDNA daun ubi kayu genotipe Malra012 (1 dan 2) dan Malra016 (3 dan 4)

Hasil keseluruhan DNA genom berada dalam kisaran > 1.000 ng/μl dengan rasio 260/280 sebesar 1.94 - 1.97 (tabel 1). Menurut Pervaiz *et al.* (2011), rasio A260/A280 dengan rentang mulai dari 1.8 hingga 2.0 tidak menunjukkan tingkat kontaminasi yang signifikan.

Tabel 1. Nilai kuatitas DNA genome daun ubi kayu hasil isolasi menggunakan spektrofotometer

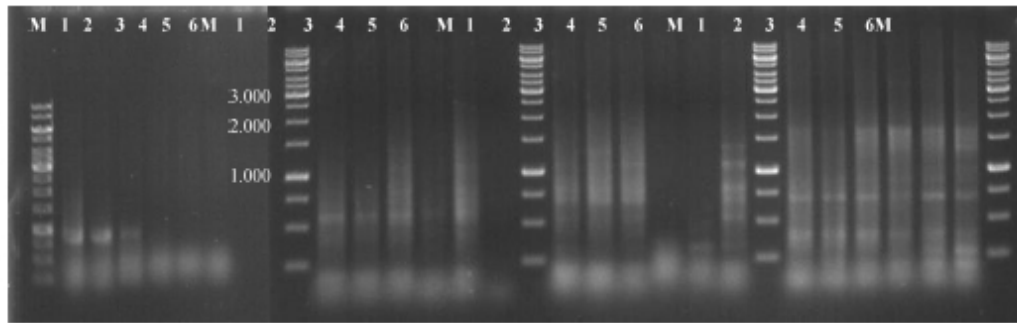
No.	DNA genome ID	Konsentrasi (ng/μl)	Kemurnian (A260/A280)
1.	Malra012 ul.1	1.097	1.948
2.	Malra012 ul.2	1.374	1.972
3.	Malra016 ul.1	1.888	1.955
4.	Malra016 ul.2	1.556	1.942

### Amplifikasi Fragmen *MeADC* pada Beberapa Suhu Annealing

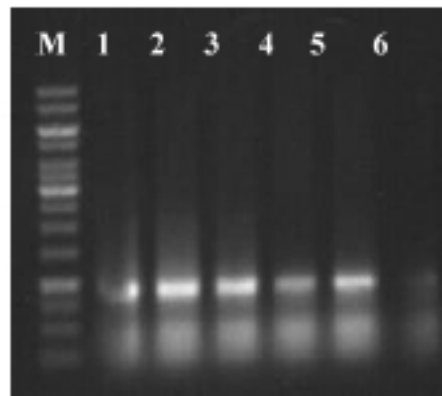
Untuk mendapatkan pita atau fragmen gen ADC dari gDNA ubi kayu lokal asal Malra, maka dilakukan amplifikasi PCR menggunakan empat pasang primer *degenerate* yaitu *MeADC1*, *MeADC2*, *MeADC3* dan *MeADC4*. Hasil perhitungan Suhu *melting* ( $T_m$  dalam °C) berdasarkan runutan basa keempat primer dengan dikurangi sebesar 2°C - 5°C untuk mendapatkan suhu penempelan primer ( $T_a$ ), maka dilakukan optimasi suhu penempelan keempat pasang primer berkisar antara 44.0 – 53.9°C. Keberhasilan amplifikasi sekuen DNA dengan keempat primer ditunjukkan dengan adanya pita yang terdapat pada beberapa suhu *annealing* untuk keempat pasangan primer (gambar 2).

Pasangan primer *MeADC1* dapat mengamplifikasi cetakan gDNA pada beberapa suhu *annealing* yaitu pada suhu rendah 44.0°C, 46.6°C dan 48.3°C sedangkan suhu *annealing* diatas 50°C tidak menghasilkan pita. Demikian halnya pada pasangan primer *MeADC2*, dapat mengamplifikasi cetakan gDNA dengan suhu *annealing* mulai dari 44.0°C hingga suhu 52.6°C. Pasangan primer *MeADC3* menghasilkan banyak pita tidak spesifik pada suhu 53.9°C dan *MeADC4* menghasilkan banyak pita pada semua suhu *annealing*. Suhu *annealing* yang terlalu rendah, akan pengamplifikasi fragmen DNA yang tidak spesifik, hal ini ditandai dengan munculnya banyak pita (Rychlik *et al.* 1990).

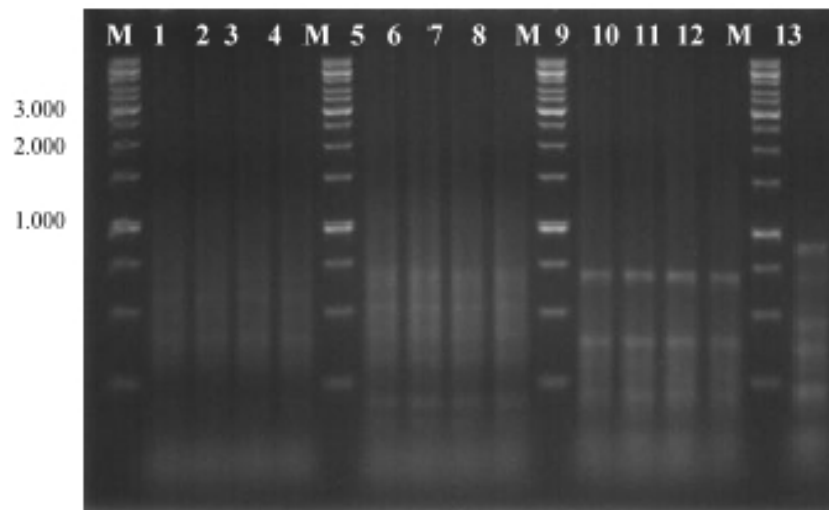
Beberapa pita DNA masih terbentuk dari hasil amplifikasi menggunakan suhu *annealing* dengan rentang 47.5°C hingga 50°C (gambar 4), meskipun pasangan primer *MeADC1* menunjukkan pita yang lebih tajam dan spesifik pada  $T_a$  44.0 °C hingga 48.3 °C (gambar3), namun hasil yang tidak konsisten terjadi ketika dilakukan pengulangan pada  $T_a$  47°C (gambar 4). Suhu pemanjangan umumnya berkisar antara 70°C-72°C selama 0.5 – 3 menit tergantung pada besarnya produk PCR yang ditargetkan atau sekitar satu menit cukup untuk mengamplifikasi runutan basa nukleotida sebesar 2.000 pasang basa (Innis & Gelfand, 1990).



Gambar 2. Elektroforegram hasil optimasi suhu annealing pasangan primer MeADC1 (a), MeADC2 (b), MeADC3 (c) dan MeADC4 (d) pada suhu 44.0°C (1), 46.6 °C (2), 48.3°C (3), 50.2°C (4), 52.6°C (5) dan 53.9°C (6), M: 1 kbplus ladder



Gambar 3. Elektroforegram hasil optimasi suhu annealing pasangan primer MeADC1 pada suhu 44.0 °C (1), 45.1 °C (2), 46.2 °C (3), 47.1 °C (4), 48.3 °C (5) dan 48.9 °C (6), M : 1 kbplus ladder



Gambar 4. Elektroforegram hasil optimasi suhu annealing pasangan primer MeADC2 pada suhu 47.5 °C (1), 48.0 °C (2), 48.5 (3), dan 49.0 (4); pasangan primer MeADC3 pada suhu 48.5 °C (5), 49.0 °C (6), 49.5 (7), dan 50.0 (8); dan pasangan primer MeADC4 pada suhu 48.5 °C (9), 49.0 °C (10), 49.5 (11), 50.0 (12), dan pasangan primer MeADC1 pada suhu 47 °C (13), M : 1 kbplus ladder

```

      10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GACATATTTTGGTTGCGAATTCCTAGTTCTAAAGCTCATATCTGATTACGGAATCGGATA
      70      80      90     100     110     120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TATTCATACTACTGATTGTCTCATACGCATGACTTACCCTTTCTCATGCGCCTATTA
      130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CATTAAAGAGTTTCTATGTTCCGTAATCTGTCAATGATAATCAAGTGGCTTACGCGATCA
      190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TACTTCTGCTCGTGAAACATCAGATTCACTCATTCTAGCCTCTTATCTGCTTTCATAGGC
      250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TATCGATCCTGAACCGATCGGTAAGGTAAAGTTTCTTGTATCCCCCTTCTCTGTTTTC
      310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCTGACCGGCGCATGATCCCTTTTTGGGACATATAAAACTGACTGGCATCTGAAAATCTC
      370     380     390     400     410     420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTCTACAAGGTTTAAACCACTCTACGCGCAGTTGCTTTTTCTACGCTGGCTTCGTACAA
      430     440     450     460     470     480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TACATFGCATTGCAOGCTCGTGCTCTTCCACTTGATAACCACATTAGCAGATACTATGAG
      490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCATCTGTCCCACGCATCTACCAGCTCGCGTGGTTCACCGGTTCCACCAAAGACTCTCAT
      550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGTTGAAGCGGAGCATAGTGCCTTTAGGCGCCGAGCGAGAAACGTCTCTTCTTCGTT
      610     620     630     640     650     660
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCGGTTTATTCACTGATCTGAAACTTAGCACTTGTTTTCTATTGGGGCGGCTTCTAGCTT
      670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGAATGGGTCGGGACCTTGATGCTCCTTCTTTTCTCGTTTTGGCCTGGGCGATAGCGTC
      730     740     750     760     770     780
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGCATGATGATGACCCATCCGGAGCGGTGGAAGCGGCGCGGTCCCTCGGGGAAGGCCTT
      790     800     810     820     830
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTGGAAGTAGCTGCGGCACACAAGACTCTCGGGCCACAACCCAGGACGGTATATATAGT

```

Gambar 5. Runutan basa nukleotida hasil amplifikasi cetakan gDNA Malra016 yang diperoleh dengan primer MeADC1

Tabel 2. Hasil analisis penyejajaran fragmen MeADC dengan gen atau DNA yang telah terdeposit pada Genbank menggunakan program BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<u>ribosomal protein S3 [Oryza minuta]</u>	70.5	70.5	36%	8e-10	49%	<u>YP_009242005.1</u>
<u>ribosomal protein S3 [Oryza minuta]</u>	70.1	70.1	17%	9e-10	75%	<u>YP_009241985.1</u>
<u>hypothetical protein AEK19_MT0893 [Utricularia reniformis]</u>	58.2	58.2	9%	2e-07	96%	<u>YP_009381295.1</u>
<u>PREDICTED: uncharacterized protein LOC105852994 [Cicer arietinum]</u>	50.8	50.8	9%	0.002	89%	<u>XP_012575409.1</u>
<u>hypothetical protein T459_26246 [Capsicum annuum]</u>	40.0	40.0	8%	2.1	68%	<u>PHT71142.1</u>

Berdasarkan beberapa hasil penelitian untuk mendapatkan fragmen gen ADC dari beberapa tanaman menggunakan suhu annealing berkisar lebih dari 50°C, yaitu 51°C pada *Poncirus trifoliata* (Wang *et al.*, 2011), 55°C pada tanaman padi (Peremarti *et al.*, 2010), dan 58°C pada *Hevea brasiliensis* (Zhao *et al.*, 2017). Belum diperolehnya pita amplifikasi yang spesifik dan tajam menggunakan keempat pasang primer diduga karena suhu annealing yang digunakan masih terlalu rendah sehingga banyak pita amplifikasi yang dihasilkan. Menurut Green *et al.*, (2015) reaksi PCR merupakan reaksi yang sensitif terhadap ketidaksesuaian antara primer dan cetakan, dan ketidakcocokan dapat menyebabkan amplifikasi yang tidak efisien pada daerah cetakan DNA yang ditargetkan.

Pita dengan ukuran terbesar hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer *MeADC1* dengan ukuran >1.000 pb yang diperoleh pada suhu annealing 47°C dilakukan proses peruntutan basa nukleotida/*sequencing* sebesar 839 pasang basa (Gambar 5). Analisis penyejajaran menggunakan program BLAST pada database GenBank menunjukkan kemiripan 49% dengan ribosomal protein S3 tanaman *Oryza minuta*

(Acc YP\_009242005.1)(gambar 6) dan bukan fragmen DNA target yaitu ADC.

Menurut Gao dan Hardwidge (2011), ribosomal protein S3 (RPS3) merupakan komponen subunit ribosom 40S eukariotik. Fungsi RPS3 selain berperan pada translasi protein, juga berperan pada banyak aktifitas ektraribosomal (Blumentha dan Carmichael, 1979) termasuk pada perbaikan DNA, kematian sel, inflamasi, tumor dan regulasi transkripsi (Warner dan McIntosh, 2009).

#### KESIMPULAN

Amplifikasi sekuen DNA genom ubi kayu asal Malra dengan menggunakan empat pasang primer *degenerate* yang dirancang berdasarkan sekuen gen ADC telah menghasilkan pita DNA hasil amplifikasi. Namun demikian kondisi PCR perlu dioptimasi lebih lanjut untuk memperoleh pita DNA yang spesifik. Hasil analisis penyejajaran runutan basa nukleotida menggunakan program BLAST terhadap fragmen runutan basa nukleotida berukuran 839 pasang basa yang diperoleh dengan primer *MeADC1* tidak menunjukkan fragmen gen penyandi ADC. Untuk memperoleh fragmen sekuen DNA ubi kayu yang memiliki homologi tinggi dengan gen ADC, Selain optimasi

kondisi PCR khususnya suhu annealing baik pada pasangan primer *MeADC1* maupun primer lainnya, juga perlu didesain primer lainnya yang memiliki sekuen *consensus clamp* yang lebih panjang dan menurunkan persentase degenerasi nukleotidanya.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh kegiatan Unggulan LIPI Tahun Anggaran 2017. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Husni Ahmad Sidiq (Mahasiswa Universitas Negeri Semarang) untuk inisiasi dan preparasi analisis molekuler ubi kayu asal Malra di Laboratorium Genetika Molekuler dan Modifikasi Jalur Biosintesa Tanaman.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Latif, A., G. Osman. 2017. Comparison of Three Genomic DNA Extraction Methods to Obtain High DNA Quality from Maize. *Plant Methods*13(1):1-9.
- Alcázar, R., T. Altabella., F. Marco., C. Bortolotti., M. Reymond., C. Konez., P. Carrasco., A. F. Tiburcio. 2010. Polyamines: Molecule with Regulatory Functions in Plant Abiotic Stress Tolerance. *Planta* 231:1237-1249.
- Blumenthal, T., G.G. Carmichael. 1979. RNA Replication: Function and Structure of Qbeta-replicase. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 525–548.
- Doyle, J.J., J.L. Doyle. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*.12:13-15.
- Gao, X., P.R. Hardwidge. 2011. Ribosomal Protein S3: A Multifunctional Target of Attaching/Effacing Bacterial Pathogens. *Front. Microbio.* 2:137. doi: 10.3389/fmicb.2011.00137
- Green, S. J., R. Venkatramanan., A. Naqib. 2015. Deconstructing the Polymerase Chain Reaction: Understanding and Correcting Bias Associated with Primer Degeneracies and Primer-template Mismatches. *PlosOne* 10(5):e0128122.
- Gupta, K., A. Dey., B. Gupta. 2013. Plant Polyamines in Abiotic Stress Responses. *Acta Physiol Plant*.35:2015-2036.
- Innis, M. A., D. H. Gelfand. 1990. *Optimization of PCRs*. Pp 3-12 in: PCR Protocols (Innis, Gelfand, Sninsky and White, eds.); Academic Press, New York.
- Kusano, T., T. Berberich., C. Tateda., Y. Takahashi. 2008. Polyamines: Essential Factors for Growth and Survival. *Planta* 228:367-381.
- Peremarti, A., L. Bassie., C. Zhu., T. Capell. 2010. Molecular Characterization of The Arginine Decarboxylase Gene Family in Rice. *Transgenic Res* 19:785-787.
- Pervaiz, Z., N. Turi.,I. Khaliq., M. Rabbani., S. A. Malik. 2011. Modified Method Forhigh-Quality DNA Extraction for Molecular Analysis in Cereal Plants. *Genet Mol Res J.* 10:1669–1673.
- Polz, M F., C. M. Cavanaugh. 1998. Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 64:3724-3730.
- Rychlik, W., W. J. Spencer., R. E. Rhoads. 1990. Optimization of The Annealing Temperature for DNA Amplification *In Vitro.* *Nucleic Acids Research* 18(21):6409-6412.
- Susanto, A.N., M.P. Sirappa. 2007. Karakteristik dan Ketersediaan Data Sumber Daya Lahan Pulau-pulau Kecil Untuk Perencanaan Pembangunan Pertanian di Maluku. *Jurnal Litbang Pertanian* 26(2): 41-53.
- Waas, E.D., J.B. Alfons. 2012. The Evaluation of Land Suitability to Support the Food Crops Farming on Dry Land Agriculture at Debut Village, Kei Kecil Sub District, Southeast Maluku District – Maluku Province. *Jurnal Budidaya Pertanian* 8: 109-116.
- Wang, J., P. P. Sun., C. L. Chen., Y. Wang., X. Z. Fu., J. H. Liu. 2011. An Arginine Decarboxylase Gene *PtADC* from *Poncirus Trifoliata* Confers Abiotic Stress Tolerance and Promotes Primary Root Growth in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 62(8):2899-2914.
- Warner, J. R., K.B. McIntosh. 2009. How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins? *Mol Cell.* 34: 3–11.
- Zein, M..S.A., D. M. Prawiradilaga. 2013. *DNA Barcoding Fauna Indonesia*. Kencana Press, Jakarta, pp. 9-21.
- Zhao, M., H. Liu., Z. Deng., J. Chen., H. Yang., H. Li., Z. Xia., D. Li. 2017. Molecular Cloning and Characterization of S-adenosylmethionine Decarboxylase Gene in Rubber Tree (*Hevea Brasiliensis*). *Physiol Mol Biol Plants.*: 1-11. DOI 10.1007/s12298-017-0417-z.

