

SELEKSI PRIMER UNTUK ANALISIS KERAGAMAN GENETIK JENIS BITTI (*Vitex coffassus*)

Primary Selection for The Genetic Diversity of Bitti (Vitex coffassus)

Gusmiaty¹✉, Muh. Restu¹ dan Ira Pongtuluran²

¹Lab. Silvikultur, Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin, Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Tamalanrea, Makassar 90245

²Alumni Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin

ABSTRACT

The successful of genomic DNA amplification using RAPD technique was determined by the sequence of primer's base and primer compound in each reaction. The aim of research was finding the best primer for genetic diversity analyses of Bitti (*Vitex coffassus*). The results of amplification showed that number of band between one to five bands (110-600 bp). The primer of OPK-10, OPA-17, OPQ-07 and OPP-08 can be used for genetic diversity analyses of Bitti. The best primer used for genetic diversity analyses of Bitti was OPP-08 because it had the highest number of bands (5 bands).

Key words: OPP-08, Primer Selection, *Vitex coffassus*

PENDAHULUAN

Bitti (*V. cofassus*) merupakan salah satu jenis pohon terpenting di Sulawesi atau di beberapa daerah dikenal pula dengan nama gofasa. Kayu bitti telah dimanfaatkan oleh masyarakat Sulawesi Selatan sebagai bahan pembuat perahu pinisi. Kayu bitti juga banyak dimanfaatkan untuk kegunaan lain, seperti kayu bangunan (tiang, kusen, pintu, jendela, atap, lantai, dan dinding) dan kayu pertukangan. Di tingkat internasional, kayu bitti banyak di ekspor dari Papua Nugini dan beberapa negara di kepulauan Pasifik lainnya ke Jepang.

Tegakan bitti khususnya di Sulawesi Selatan merupakan jenis pionir, yang saat ini banyak ditemukan pada areal hutan sekunder. Kualitas kayu bitti semakin rendah akibat kondisi tempat tumbuh yang kurang bagus. Perbanyak tanaman umumnya menggunakan anakan alam yang dicabut dari bawah tegakan kualitasnya kurang terjamin. Kondisi ini menyebabkan penurunan kualitas dan produksi pada saat panen.

Pemuliaan pohon merupakan suatu upaya yang dapat dilakukan untuk menghasilkan perbaikan

genetik dalam arti peningkatan hasil, baik secara kualitas maupun kuantitas dari generasi ke generasi. Agar program pemuliaan bitti dapat terarah dengan baik, sehingga tujuannya dapat tercapai, diperlukan strategi pemuliaan yang tepat. Strategi pemuliaan pohon bitti disusun berdasarkan parameter tujuan perusahaan, keragaman secara morfologis dan genetik serta potensi hibrida.

Keragaman genetik merupakan faktor yang sangat berpengaruh dalam menyusun strategi pemuliaan pohon. Karakter genetik suatu jenis pohon baik yang terdapat dalam satu tempat tumbuh maupun yang berbeda provenansi dapat berbeda, hal ini disebabkan karena perbedaan genetik. Hal ini akan menunjukkan sifat dan kekhasan suatu tegakan. Sehingga tegakan atau provenansi yang memiliki karakter genetik yang baik dapat menjadi sumber yang tepat untuk kegiatan pemuliaan pohon.

Keragaman genetik dapat diamati dengan pengamatan karakter genetik, sifat yang diamati adalah DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) yang sulit dipengaruhi lingkungan. Oleh karena itu, untuk mengetahui tingkat variasi bitti antar provenansi dan dalam provenansi dapat dilakukan dengan melihat karakter genetik. Selain itu, keragaman genetik sangat penting dalam upaya menyediakan informasi bagi kegiatan pengembangan dan peningkatan hasil

Diterima: 9 September 2011; Disetujui: 5 Desember 2011

✉ Penulis korespondensi (corresponding author):
umyhody@gmail.com

produksi serta upaya konservasi. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mempersingkat waktu pemuliaan adalah menganalisis secara molekuler.

Penanda molekuler banyak digunakan dalam analisis keragaman genetik tumbuhan, salah satunya adalah *Random amplified polymorphic DNA (RAPD)*. RAPD merupakan salah satu marka molekuler berbasis PCR yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman pada tingkat intraspesies maupun antarspesies (Qian *et al.*, 2001, Adam *et al.*, 2002, Jena & Das, 2006). Teknik ini digunakan untuk mengidentifikasi genotip tumbuhan, karena memiliki kelebihan dalam pelaksanaan dan analisisnya. Teknik RAPD lebih murah, mudah dilakukan, cepat memberikan hasil, menghasilkan polimorfisme pita DNA dalam jumlah banyak dan mudah memperoleh primer acak yang diperlukan untuk menganalisis genom semua jenis organisme.

Keberhasilan amplifikasi DNA genom menggunakan teknik RAPD sangat ditentukan oleh urutan basa primer yang digunakan serta kualitasnya atau kandungan primer dalam setiap reaksi.

Informasi tentang jenis primer untuk analisis RAPD pada tanaman kehutanan khususnya tanaman bitti masih terbatas sehingga penelitian tentang seleksi beberapa jenis primer perlu dilakukan. Hasil penelitian Pratama (2009) menunjukkan dari 4 jenis primer yang diseleksi, hanya 1 jenis primer yang terbaik yaitu OPD-03 untuk digunakan dalam analisis keragaman genetik. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan primer terbaik untuk analisis keragaman genetik jenis Bitti (*V. cofassus*).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Silvikultur Fakultas Kehutanan, Pusat Kegiatan Penelitian dan di Laboratorium Penelitian Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin.

Prosedur Penelitian

Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun muda dari tegakan Bitti pada provenansi Bone. Sampel daun yang telah diambil kemudian ditutup dengan kertas tisu yang telah dibasahi, lalu kemudian diletakkan dalam plastik gula dan disimpan dalam lemari pendingin. Tujuannya agar daun yang telah diambil tetap segar. Kesegaran daun harus tetap

terjaga karena pada daun yang telah kering akan sulit dilakukan isolasi DNA.

Isolasi DNA

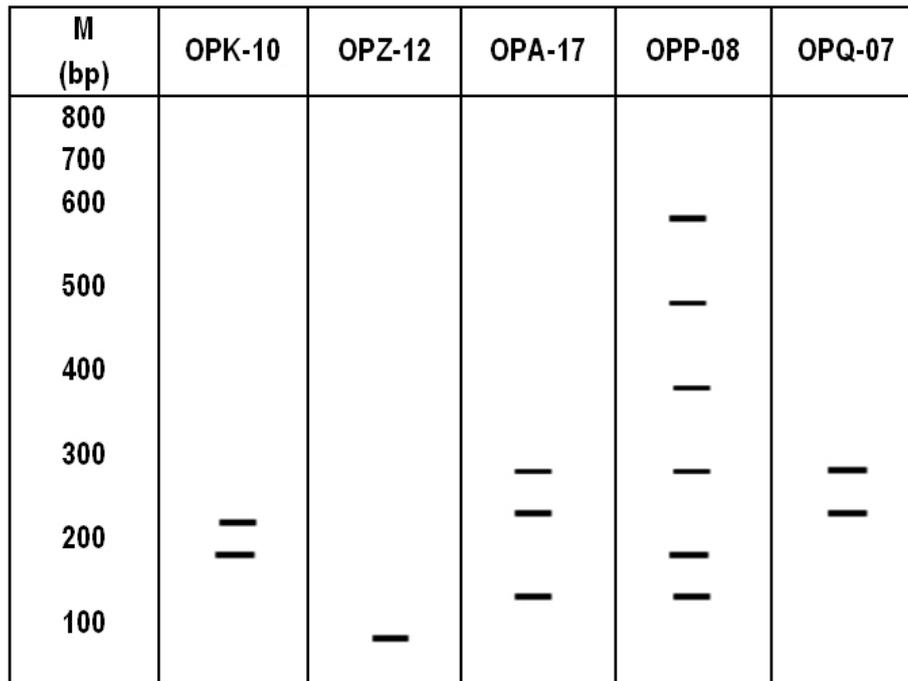
Sampel daun bitti yang masih muda sebanyak 200 mg tanpa tulang daun digerus hingga menjadi halus (tepung). Selanjutnya ditambahkan 500 µl buffer ekstraksi CTAB (100 mM Tris HCl pH 8,0; 20 mM EDTA, 2 % CTAB; 0,2 % β mercaptoetanol) dan divorteks selama 15 menit. Proses selanjutnya adalah proses lisis dinding sel pada sampel dilakukan dengan menginkubasi tabung berisi sampel daun ke dalam *waterbath* suhu 70 °C selama 30 menit.

Sampel yang telah dilakukan inkubasi lalu ditambahkan kloroform : isoamialkohol 100 µl dan dicampur secara perlahan-lahan, lalu disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambahkan 800 µl isopropanol, dan diendapkan semalaman. Sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Endapan DNA yang diperoleh dikeringkan pada suhu 37 °C selama 15 menit. Purifikasi dilakukan dengan menambahkan 500 µl buffer TE 1x (10 mM tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) dan 100 µl fenol, lalu bolak balik secara perlahan lalu disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm.

Supernatan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf baru dan ditambahkan 100 µl kloroform, kemudian dibolak-balik. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil lalu ditambahkan 100 µl natrium asetat 3 M dan 800 µl isopropanol, lalu disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Endapan diambil dan dikeringkan selama semalaman lalu ditambahkan 100 µl ddH₂O dan disimpan dalam lemari pendingin (-4 °C).

Seleksi Primer

Seleksi primer dilakukan untuk mencari primer acak yang menghasilkan penanda pita, baik dari jelasnya pita yang dihasilkan maupun jumlah lokus yang diperoleh. Seleksi primer dengan cara membuat beberapa reaksi PCR terhadap beberapa primer yang berbeda pada kondisi yang sama dan menggunakan sampel DNA yang sama, sehingga dapat diketahui kondisi optimum serta tingkat variasi pita yang dihasilkan setiap primer. Primer yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah primer OPK-10, primer OPZ-12, primer OPA-17, primer OPP-08 dan primer OPQ-07.



Gambar 1. Pola Pita Zimogram

Proses PCR (Polymerase Chain Reactions)

DNA hasil isolasi diamplifikasi menggunakan primer acak. Primer acak yang digunakan adalah primer acak dengan panjang 10 nukleotida. Primer yang dipilih adalah primer yang dapat menghasilkan minimal 2 pita. Volume final reaksi adalah 25 µl dengan komposisi 16,88 µl MegaMix Blue, 5,62 µl primer dan 2,5 µl DNA template.

Selanjutnya dilakukan proses amplifikasi dengan menggunakan mesin PCR (*Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler*) dengan kondisi pre PCR 1 menit 94 °C, Tahap PCR sebanyak 45 siklus terdiri dari fase denaturasi selama 30 detik pada suhu 94 °C, fase *annealing* selama 30 detik pada suhu 37 °C, dan fase *extension* selama 90 detik pada suhu 72 °C. Tahapan PCR diakhiri dengan *final extension* selama 7 menit pada suhu 72 °C.

Hasil proses amplifikasi kemudian dielektroforesis bersama DNA *marker* 100 bp

(DNA *ladder*) pada gel agarose konsentrasi 2 % (1,6 g agarose dalam 70 ml TAE 1X, 7,5 µl etidium bromide), voltase 100 volt selama 35 menit di dalam larutan penyangga TAE 1X (0,04 Tris-asetat, 0,001 M EDTA). Gel lalu diamati di atas sinar UV. Pemotretan dilakukan menggunakan kamera digital.

Analisis Data

Analisis yang digunakan adalah analisis deskriptif dengan melihat jumlah pita yang dihasilkan untuk masing-masing primer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil amplifikasi, kelima primer yang digunakan menghasilkan pita DNA dengan ukuran, jumlah dan intensitas pita yang berbeda-beda. Jumlah dan intensitas pita DNA yang dihasilkan setelah amplifikasi DNA dengan PCR sangat tergantung bagaimana primer mengenal

Tabel 1. Jenis primer dan jumlah pita nilai amplifikasi DNA

No	Primer	Sekuens (5'-3')	Kandungan G+C (%)	Jumlah Pita	Lokus (bp)
1	OPK-10	GTG CAA CGT G	60	2	200,25
2	OPZ-12	TCA ACG GGA C	60	1	110
3	OPA-17	GAC CGC TTG T	60	3	120,230,300
4	OPP-08	ACA TCG CCC A	60	5	120,200,300,400,600
5	OPQ-07	CCC CGA TGG T	70	2	230,3

urutan DNA komplementernya pada cetakan DNA (DNA *template*) yang digunakan (Tingey *et al.*, 1994). Visualisasi hasil elektroforesis DNA bitti pada beberapa jenis primer dapat dilihat pada pola pita Zimogram (Gambar 1).

Hasil amplifikasi dari sejumlah primer menunjukkan bahwa ada 1 primer yang menghasilkan 1 pita. Hal ini disebabkan oleh kurang murninya DNA genom yang digunakan pada saat proses ekstraksi DNA, sehingga proses pengenceran dan komposisi bahan-bahan yang kurang tepat, menyebabkan tidak menempelnya primer pada DNA target. Hal ini ditegaskan oleh Young *et al.* (2000) dalam Husnaeni (2008) dimana penanda genetik RAPD sangat sensitive pada kondisi reaksi serta kualitas DNA *template*. Oleh karena itu diperlukan konsentrasi dan kemurnian DNA, primer serta prosedur penyiapan DNA genom yang konsisten. Adapun Hasil Seleksi Primer dapat dilihat pada Tabel 1.

Pita DNA hasil amplifikasi berukuran antara 110-600 bp (pasang basa). Hasil seleksi primer menunjukkan bahwa primer OPZ-12 menghasilkan pita yang paling sedikit yaitu 1 pita pada lokus 110 bp, sedangkan jenis primer yang menghasilkan jumlah pita yang paling banyak (5 pita) yaitu primer OPP-08 dengan ukuran 120-600 bp.

Perbedaan ukuran fragmen DNA atau polimorfisme fragmen DNA hasil amplifikasi disebabkan oleh sebaran lokasi basa nukleotida di dalam genom yang menjadi tempat atau situs penempelan primer. Perbedaan profil pita DNA hasil amplifikasi, terutama jumlah dan ukuran pita sangat berperan dalam menentukan tingkat keragaman populasi. Pengaturan suhu fase *annealing* pada proses PCR sangat berpengaruh pada proses pelekatan primer sehingga perubahan suhu satu derajat akan menyebabkan primer gagal melekat. Menurut Prana *et al.* (2003) dalam Pratama (2009), keberhasilan amplifikasi DNA genom menggunakan teknik RAPD selain ditentukan oleh urutan basa primer yang digunakan serta kuantitasnya (kandungan primer dalam setiap reaksi), ditentukan pula oleh kesesuaian kondisi PCR yang meliputi suhu *annealing* primer dan ekstensi.

Selain faktor yang telah dijelaskan di atas, PCR juga sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor lain yaitu: (1) kondisi deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP), (2) oligonukleotida primer, (3) DNA *template* (cetakan), (4) komposisi larutan buffer, (5) jumlah siklus reaksi, (6) enzim yang digunakan, dan

(7) faktor teknis dan non-teknis lainnya, misalnya kontaminasi (Yuwono, 2006).

Jumlah pita ini diperoleh berdasarkan hasil pengamatan pada gel agarose 2 % setelah di elektroforesis selama 35 menit. Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan dan purifikasi fragmen DNA, RNA, atau protein. Prinsip dasar dari elektroforesis adalah memisahkan molekul berdasarkan muatan listrik intrinsik. Elektroforesis DNA biasanya digunakan untuk memisahkan DNA berdasarkan perbedaan ukurannya. Pemisahan DNA dalam hal ini adalah menggunakan gel agarosa. Agarosa merupakan polisakarida yang diekstrak dari rumput laut. Ukuran pori agarosa sesuai untuk pemisahan polimer asam nukleat yang tersusun dari ratusan nukleotida (Clark, 2005 dalam Firdausi, 2008).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil amplifikasi dari kelima primer yang digunakan diperoleh jumlah pita satu sampai lima pita yang berukuran 110-600 bp.
2. Jenis primer yang dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik jenis Bitti (*V. cofassus*) adalah primer yang menghasilkan jumlah pita minimal 2 yaitu primer OPK-10, OPA-17, OPQ-07 dan OPP-08.
3. Primer OPP-08 merupakan primer yang terbaik digunakan dalam analisis keragaman genetik jenis Bitti (*V. cofassus*) karena memiliki jumlah pita terbanyak (5 pita).

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, R. P., C. Hsieh, J. Murata and R. N. Pandey. 2002. Systematics of *Juniperus* from eastern Asia based on Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem. Sys. Ecol.* 30, 231-241.
- Husnaeni, A. 2008. Variasi Genetik Jati Pada Hutan Tanaman di Jawa Berdasarkan Penanda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Skripsi Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor, Bogor (Tidak dipublikasikan).
- Jena, S. N. and A. B. Das. 2006. Inter-population variation of chromosome and RAPD markers of *Suaeda nudiflora* (Wild.) Moq. a mangrove species in India. *African J. Agric. Res.* 1, 137-142.
- Pratama, B. A. 2009. Analisis Keragaman Genetika Bitti (*Vitex cofassus* Reinw.) pada Provenansi Bulukumba berdasarkan Penanda Molekuler Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Skripsi Jurusan Kehutanan

- Fakultas Kehutanan. Universitas Hasanuddin. Makassar (Tidak dipublikasikan)
- Qian, W., S. Ge. and D.Y. Hong. 2001. Genetic Variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. App. Genet.* 102, 440-449.
- Tingey, S.V., J.A. Rafalski and M.K. Hanafey. 1994. Genetic analysis with RAPD markers. In: Coruzzi, C. and P. Puidormenech (eds.). *Plant Molecular Biology*. Berlin: Springer-Verlag.
- Young A., D. Boshier and T. Boyle, editor. 2000. *Forest Conservation Genetics*. Colling wood: CSIRO Publishing.
- Yuwono, T. 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Laboratorium Mikrobiologi. Fakultas Pertanian. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.