



**POLIMORFISME PENANDA RAPD UNTUK ANALISIS
KERAGAMAN GENETIK KEMIRI *Aleurites mollucana*
DI KABUPATEN MAROS**

**POLYMORPHISM OF RAPD MARKERS FOR THE GENETIC
DIVERSITY OF CANDLENUT *Aleurites mollucana*
IN MAROS DISTRICT**

Gusmiaty*, Sari, N.A., Safira, T.N., dan Budiman, A., Larekeng, S.H.

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

*Corresponding author : gusmiaty@unhas.ac.id ; umyhody@gmail.com

Abstrak

Keragaman genetik kemiri *Aleurites mollucana* perlu dianalisis menggunakan studi molekuler untuk tujuan pemuliaan tanaman. Pemilihan primer adalah langkah dasar untuk studi molekuler terutama dalam analisis keragaman genetik. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan primer RAPD yang mampu mengamplifikasi DNA kemiri, menghasilkan pita polimorfik yang terang dan jelas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tujuh dari 20 primer RAPD mampu menghasilkan pita polimorfik. Ketujuh primer polimorfik tersebut dapat direkomendasikan untuk digunakan dalam analisis keragaman genetik kemiri.

Kata kunci : *Aleurites moluccana*, polimorfik, Primer, RAPD

Abstract

The genetic diversity of candlenut *Aleurites mollucana* need to be analysed using molecular study for plant breeding purpose. Primer selection are basic steps for molecular study especially in analysis of genetic diversity. The aim of this research was to obtain RAPD primers were able to amplify candlenut DNA, produce bright and clear polymorphic bands. The result showed that seven of 20 RAPD primers were able to produce polymorphic band. These seven polymorphic primers can be recommended to use for genetic diversity of candlenut analyses.

Keywords : *Aleurites moluccana*, polymorphic, primer, RAPD

Pendahuluan

Pengembangan kemiri di Indonesia khususnya di Kabupaten Maros memerlukan arah dan kebijakan yang tepat, agar pengembangannya tidak mengalami hambatan. Kemiri yang berkualitas, dapat dihasilkan melalui upaya pemuliaan tanaman. Pemuliaan tanaman merupakan suatu upaya untuk menghasilkan perbaikan genetik dalam arti peningkatan hasil, baik kualitas maupun kuantitas dari generasi ke generasi, dimana langkah awal dalam pemuliaan pohon adalah dengan menganalisis keragaman genetik. Adanya keragaman genetik dapat diketahui melalui dua pendekatan, yakni pendekatan penanda genetik dan morfologi (Na'iem, 2000).

Penanda genetik yang banyak digunakan dalam analisis keragaman genetic tumbuhan, salah satunya adalah RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Marka molekuler ini berbasis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman pada tingkat intra spesies maupun antar spesies. Teknik ini banyak digunakan untuk mengidentifikasi geno tipe tumbuhan, karena memiliki kelebihan dalam pelaksanaan dan analisisnya dibandingkan dengan penanda DNA yang lain.

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. Teknik RAPD tidak membutuhkan informasi awal tentang urutan basa suatu spesies, yang diperlukan adalah DNA yang murni dalam jumlah yang sedikit. RAPD dapat diterapkan pada hampir semua jenis tanaman (Yuwono, 2006). Teknik RAPD tidak membutuhkan informasi awal tentang urutan basa suatu spesies tetapi yang diperlukan adalah DNA yang relative murni dalam jumlah yang relative kecil jika dibandingkan RFLP, RAPD dapat diterapkan pada hampir semua jenis tanaman. Penanda molekuler ini berupa primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA pada analisis genetik.

Primer adalah rantai asam nukleat yang berfungsi sebagai titik awal untuk mensintesis DNA, yang diperlukan untuk replika DNA karena enzim-enzim yang mengkatalisis proses ini yaitu DNA polimerase. Seleksi primer bertujuan untuk mendapatkan tingkat polimorfik yang tinggi, untuk itu digunakan primer dari beberapa spesies tumbuhan yang sefamili dengan tumbuhan yang diteliti. Seleksi primer dilakukan untuk mencari primer acak yang menghasilkan penanda pita, baik dari jelasnya pita yang dihasilkan maupun jumlah lokus (primer) yang diperoleh.

Pemilihan primer pada analisis genetik berpengaruh terhadap pita polimorfik yang dihasilkan karena setiap primer memiliki situs penempelan tersendiri. Pita DNA polimorfik yang dihasilkan setiap primer menjadi berbeda, baik dalam ukuran banyaknya pasang basa maupun jumlah pita DNA. Intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer sangat dipengaruhi oleh kemurnian dan konsentrasi cetakan DNA yang mengandung senyawa-senyawa seperti polisakarida dan senyawa fenolik, serta konsentrasi DNA cetakan yang

terlalu kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup atau tidak jelas (Weeden., dkk, 1992).

Penelitian sebelumnya tentang seleksi primer telah dilakukan pada jenis tanaman Bitti *Vitex coffassus* (Gusmiaty, dkk., 2012), Uru *Elmerillia tsiampacca* (Abubakar, 2012), Mahoni *Switenia mahagonia* (Mangiwa, 2012), Mahoni *Swietenia macrophylla* (Nurutami, 2018), dan kayu merah *Pterocarpus indicus* (Amir, 2018). Informasi tentang jenis primer yang dapat teramplifikasi pada kemiri masih terbatas sehingga penelitian tentang seleksi primer dengan beberapa jenis primer perlu dilakukan.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan informasi mengenai marka genetik khususnya pada tanaman kemiri untuk dapat diaplikasikan dalam analisis keragaman genetik serta sebagai landasan untuk pengembangan bidang bioteknologi dan pemuliaan pohon untuk mendukung pengelolaan hutan tanaman secara berkelanjutan.

Metode Penelitian

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret hingga November 2020. Pengambilan sampel dilakukan di Desa Rompegading dan Desa Limampocoe, Kec. Cenrana, Kab. Maros. Kemudian dilanjutkan dengan analisis molekuler di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon, Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Prosedur Pelaksanaan Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilaksanakan di Desa Rompegading dan Desa Limampocoe, Kec. Cenrana, Kab. Maros. Sampel yang dipilih sebanyak 30 pohon yang masing-masing tegakan diambil sebanyak 5-6 helai daun muda, Sampel daun yang diambil dimasukkan kedalam amplop dan diberi kode berdasarkan titik pohon. Sampel yang diambil dimasukkan kedalam *Coolbox* yang berisi *ice gel*. Fungsinya agar kualitas sampel daun tetap terjaga hingga analisis DNA di laboratorium.

Isolasi DNA

Ekstraksi DNA atau isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode QDPMK (*Qiagen DNeasy Plant Mini Kit*) dengan beberapa modifikasi. Tahapan pelaksanaannya adalah :

- Sampel daun kemiri digerus kemudian ditimbang sebanyak 0,1 gram.
- Menambahkan *buffer* AP1 400 µl ke setiap sampel lalu ditambahkan RNA-se 4 µl.
- Kemudian divortex dan *spindown* sampai tercampur baik.
- Diinkubasi selama 60 menit di *water bath* dengan suhu 65°C (setiap 10 menit divortex)

- e. Menambahkan P3 130 μ l kemudian vortex 60 detik.
- f. Diinkubasi di *freezer* selama 45 menit. Setelah itu di larutkan dicentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm (*centrifuge* dilakukan sebanyak 2x pengulangan).
- g. Supernatan disedot dan dipindahkan pada *mini spin colum* (warna ungu) pada *tube* 2 ml selanjutnya dicentrifuge selama 2 menit dengan kecepatan 14.000rpm. sedot hingga larutannya habis biasanya 300 sampai 500 ml.
- h. Colum yang digunakan dibuang dan cairan atas diambil.
- i. Larutan dipindahkan ke *tube* bening (*tube* 2 ml) kemudian ditambahkan *buffer* AW1 dengan volume sebanyak 1,5 x volume super natant, jika volume super natant 500 μ l maka, *buffer* yang ditambahkan sebanyak 750 μ l, kemudian bolak balik.
- j. Larutan dipindahkan kemini *spin colum* (*tube* putih berfilter), maksimal 650 μ l jika sampel kurang dari 650 μ l larutan diambil semua, jika lebih dari 650 μ l dilakukan *centrifuge* sebanyak 2x. *Centrifuge* dilakukan selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm.
- k. Colum dipindahkan ke *tube* baru yang tidak bertutup, kemudian ditambahkan AW2 sebanyak 500 ml. *centrifuge* selama 1 menit kecepatan 8.000 rpm (bilasan 1).
- l. Setelah *centrifuge* larutan dibuang kemudian ditambahkan kembali AW2 sebanyak 500 ml (bilasan 2). *centrifuge* selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm.
- m. Membrane colum dipindahkan ke *tube* 2 ml yang baru kemudian ditambahkan *buffer* AE sebanyak 100 ml (yang sudah dipanaskan dalam air mendidih) kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit dan di *centrifuge* selama 1 menit 8.000 rpm.
- n. Buang membrane colum kemudian DNA *template* disimpan dalam lemari *freezer* bersuhu -20°C .

Seleksi Primer

Terdapat 20 jenis primer RAPD yang digunakan dalam seleksi ini. Seleksi primer dilakukan dengan membuat 12 reaksi PCR menggunakan 12 sampel DNA tersebut, sehingga dapat diketahui kondisi optimum serta tingkat variasi pita yang dihasilkan dari setiap primer. Setiap reaksi PCR terdiri atas 2 μ l cetakan DNA, 5 μ l PCR mix (HotStarTaq), 3 μ l ddh₂O dan 1 μ l CL. Larutan tersebut kemudian ditambahkan primer sebanyak 1.5 μ l.

Proses amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR (sensoquest termal cycler). Proses PCR mengikuti prosedur berikut: *preheat* pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 60 detik, aneling (suhu menempelnya primer pada cetakan DNA) spesifik untuk setiap primer, perpanjangan 72°C selama 60 detik, perpanjangan akhir 72°C selama 10 menit. Proses denaturasi hingga perpanjangan diulang sebanyak 35 kali. Suhu primer RAPD berkisar antara 34°C hingga 39°C .

Elektroforesis dilakukan setelah proses amplifikasi DNA. Hasil DNA menggunakan Primer RAPD dielektroforesis menggunakan agarose 2%.

Agarose tersebut dilarutkan dalam buffer TAE 1x. Elektroforesis dilakukan selama 90 menit pada tegangan 100 Volt.

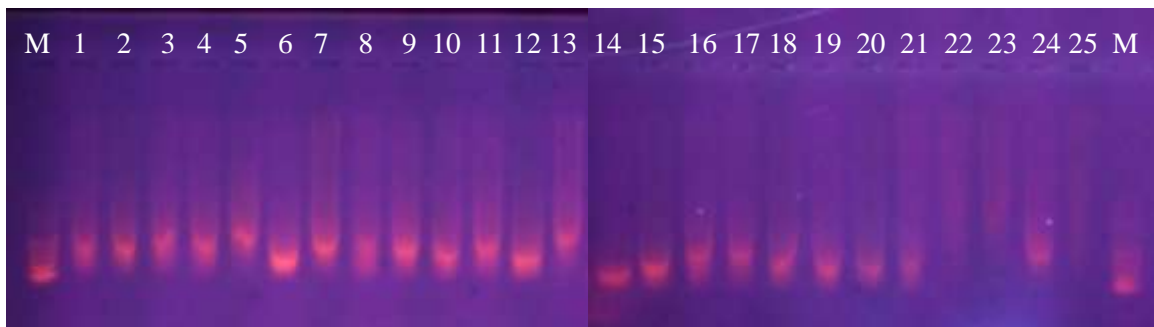
Hasil dan Pembahasan

Hasil Isolasi DNA

Ekstraksi atau isolasi DNA merupakan langkah awal dalam proses analisis molekuler. Isolasi DNA sangat berpengaruh dalam memberikan kualitas yang baik pada DNA tanaman (Gusmiaty, dkk., 2020). Ekstraksi DNA atau isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode QDPMK (*Qiagen DNeasy Plant Mini Kit*) dengan beberapa modifikasi. Isolasi DNA dilakukan dengan terlebih dahulu menggerus daun muda kemiri kemudian menimbang seberat 0,1 gr. Menurut Wulansari (2014), daun yang masih muda banyak mengandung DNA karena bagian ini sedang aktif melakukan proses pembelahan dan pertumbuhan sel. Daun muda juga lebih memudahkan dalam penggerusan karena daun muda memiliki tekstur yang lebih lunak.

Hasil isolasi DNA dilihat dengan elektroforesis gel agarosa 0,8 %. Agarosa diberi warna dengan *gelred*. Sampel DNA sebanyak 2 µl + 1 µl *loading dye* dimasukkan kedalam sumur. Sumur paling ujung berisi *marker*. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 V selama 90 menit. Gel hasil elektroforesis dimasukkan kedalam UV Transiluminator untuk melihat ada atau tidaknya pita DNA yang terbentuk.

Kualitas DNA hasil elektroforesis dengan metode QDPMK dengan beberapa modifikasi dapat dilihat pada Gambar1.



Gambar 1. Elektroforegram Hasil Isolasi DNA menggunakan metode QDPMK tanaman kemiri; Keterangan: M= Marker dan 1-25 DNA total tanaman kemiri

Elektroforesis DNA total pada sampel tanaman kemiri yang ditunjukkan pada Gambar diatas menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA kemiri telah berhasil, dapat dilihat dari fragmen DNA yang menunjukkan DNA memiliki pita yang terang dan tebal terdapat pada sampel nomor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, dan 24. Sedangkan pita yang agak tipis dan kurang terang terdapat pada sampel nomor 8, 20, 21, 22, 23, dan 25.

Seleksi primer marka RAPD

Seleksi primer dilakukan untuk mencari primer acak yang menghasilkan penanda pita yang baik, baik dari jelasnya pita yang dihasilkan maupun jumlah lokus yang diperoleh (Gusmiaty,dkk., 2012). Seleksi primer dengan cara membuat beberapa reaksi PCR terhadap beberapa primer yang berbeda pada kondisi yang sama, sehingga dapat diketahui kondisi optimum serta tingkat variasi pita yang dihasilkan setiap primer. Terdapat 20 jenis primer RAPD yang digunakan dalam seleksi ini.

DNA hasil isolasi diamplifikasi dengan menggunakan mesin PCR (*Applied Biosystem Thermal Cycler*) dengan kondisi pre PCR 1 menit 94 °C, tahap PCR sebanyak 35 siklus terdiri dari fase denaturasi selama 30 detik pada suhu 94 °C, fase *annealing* selama 50 detik, dan fase elongasi selama 60 detik pada suhu 97 °C. Tahapan PCR diakhiri dengan final elongasi selama 300 detik pada suhu 97 °C.

Hasil proses amplifikasi kemudian dielektroforesis pada gel agarose konsentrasi 2 %. Gel lalu diamati diatas paparan sinar UV Transiluminator untuk melihat pita DNA yang teramplifikasi. Menurut Gusmiaty, dkk (2016), hasil amplifikasi DNA menunjukkan tingkat ketebalan pita yang bervariasi pada setiap sampel. Hal ini disebabkan oleh kualitas DNA hasil ekstraksi yang berbeda-beda pada setiap sampel sehingga sangat menentukan dalam tahapan PCR.

Hasil seleksi primer dari 20 primer RAPD, terdapat 7 primer yang dapat teramplifikasi dengan baik. Ketujuh primer tersebut menghasilkan pita DNA dengan ukuran, jumlah dan intensitas yang berbeda-beda diantaranya OPA 02, OPD 03, OPP 08, OPC 11, M.29, OPAC 12, dan OPG 19. Hasil seleksi primer dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nama primer dan hasil seleksi primer marka RAPD

No.	Nama Primer	Jumlah Sampel yang teramplifikasi	Kualitas pita yang dihasilkan
1.	OPA 02	11	Jelas dan polymorfik
2.	OPD 03	9	Jelas dan polymorfik
3.	OPAA 20	-	Tidakada pita
4.	OPAE 11	-	Tidakada pita
5.	OPA 09	-	Tidakada pita
6.	OPP 08	6	Kurang jelas dan polymorfik
7.	OPQ 07	-	Tidakada pita
8.	OPY 09	-	Tidakada pita
9.	OPK 20	-	Tidakada pita
10.	OPA 15	-	Tidakada pita
11.	OPA 18	-	Tidakada pita
12.	OPD 20	-	Tidakada pita
13.	OPD 14	-	Tidakada pita
14.	OPZ 05	-	Tidakada pita
15.	OPC 11	7	Jelas dan polymorfik
16.	M.29	10	Jelas dan polymorfik
17.	OPAC 12	3	Jelas dan polymorfik
18.	OPAD 12	-	Tidakada pita
19.	OPG 06	-	Tidakada pita
20.	OPG 19	12	Kurang jelas dan polymorfik

Hasil seleksi dari 20 primer RAPD terdapat 7 primer yang teramplifikasi polymorfik dengan jumlah sampel yang teramplifikasi 3-12 sampel. 20 primer diatas menghasilkan pita yang berbeda-beda, 5 primer menghasilkan pita yang jelas dan terang yaitu primer OPA 02, OPD 03, OPC 11, M.29, dan OPAC 12, 2 primer yang menghasilkan pita yang tipis dan kurang jelas yaitu pada primer OPP 08, dan OPG 19, sedangkan 13 primer lainnya yang tidak menghasilkan pita diantaranya primer OPAA 20, OPAE 11, OPA 09, OPQ 07, OPY 09, OPK 20, OPA 15, OPA 18, OPD 20, OPD 14, OPZ 05, OPAD 11, dan OPG 06.

Primer yang menghasilkan pita jelas, terang, dan polymorfik merupakan primer yang dapat digunakan dalam analisis lanjutan (Larekeng,dkk., 2017). Primer polymorfik dibutuhkan dalam menganalisis keragaman genetic suatu tanaman dengan memperlihatkan keragaman pola

pita yang dihasilkan dari proses amplifikasi. Keberhasilan amplifikasi DNA menggunakan primer tertentu yang berdasarkan kesamaan sequens antara genom dan primer.

Kesimpulan

Hasil seleksi dari 20 primer RAPD terdapat 7 primer yang teramplifikasi polimorfik, 5 primer diantaranya menghasilkan pita yang jelas dan terang yaitu primer OPA 02, OPD 03, OPC 11, M.29, dan OPAC 12, 2 primer yang menghasilkan pita yang tipis dan kurang jelas yaitu pada primer OPP 08, dan OPG 19, sedangkan 13 primer lainnya yang tidak menghasilkan pita yaitu primer OPAA 20, OPAE 11, OPA 09, OPQ 07, OPY 09, OPK 20, OPA 15, OPA 18, OPD 20, OPD 14, OPZ 05, OPAD 11, dan OPG 06.

UcapanTerima Kasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Universitas Hasanuddin yang telah mendukung dan membiayai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Dosen Penasihat Akademik (PDPA) Tahun Anggaran 2020.

Daftar Pustaka

- Abubakar, M. H. 2012. Seleksi Primer Untuk Analisis Keragaman Genetik Uru (*Elmerillia tsiampacca*). Skripsi Sarjana Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin.
- Amir, F. 2018. Seleksi Marka Genetik Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Mikrosatelit dan Genom Kloroplas pada Kayu Merah (*Pterocarpus indicus* Willd.) di Lima Provenan Nusa Tenggara Timur. Skripsi Mahasiswa Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin.
- Fatchiyah, 2011. Pelatihan analisis finger printing DNA tanaman dengan metode RAPD. Modul. Laboratorium sentral ilmu hayati Universitas Brawijaya, Malang.
- Larekeng, S.H, Nur a'ida, Fitri, Y., Gusmiaty dan Restu,M., 2017.Keragaman Genetik Jati Berbagai Provenans pada Kebun Pangkas BPTH Wilayah 2 di Kabupaten Gowa. Prosiding Seminar Nasional Silvikultur IV 2016 ISBN 978-602-61183-1-8
- Mangiwa, S. T. 2012. *Seleksi Primer untuk Analisis Keragaman Genetik Tanaman Mahoni (Swietenia mahagoni)*. Skripsi Sarjana Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin.
- Na'iem, M. 2000. *Training Course On Basic Forest genetiks : Characteristic of Forest Genetik Variation*.Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta:9-10.

- Nurutami, K. 2018. *Seleksi Primer Mikrosatelit Mahoni (Swietenia macrophylla)*. Skripsi Sarjana Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin.
- Gusmiaty, M. Restu dan Pongtuluran, I. 2012. Seleksi Primer untuk Analisis Keragaman Genetik Jenis Bitti (*Vitex coffassus*). *Jurnal Perennial*. 8 (1): 25-29.
- Gusmiaty, Muh. Restu, Asrianny dan S.H. Larekeng. 2016. Polimorfisme Penanda RAPD untuk Analisis Keragaman Genetik *Pinus merkusii* di Hutan Pendidikan Unhas. *Jurnal Natur Indonesia*, 16 (2), ISSN 1410-9379; e-ISSN 2503-0345 (<https://ejournal.unri.ac.id/index.php/JN/article/view/3971/3855>)
- Gusmiaty, Nurhafidah and S.H. Larekeng. 2020. Description of correlation between quantitative and qualitative assays on candlenut DNA. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, The 2nd International Conference on Global Issue for infrastructure, environment & socio-economic development 12-13 September 2019. 473 (1). DOI:10.1088/1755-1315/473/1/012116
- Weeden, N. F. G. M., Timmerman, M., Hemmat, B. E., Kneen, M. A., and Lodhi. 1992. Inheritance and Reliability of RAPD Markers. In *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Symposium Proceedings. Crop Science Society of America, Madison, pp. 12-17.*
- Wulansari, R. 2014 Kinship study and paddy morphology and gamma ray mutations results (Bogor Agricultural Institute).