

**DETERMINASI KEKERABATAN GENETIK BERDASARKAN  
*Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* DARI  
TANAMAN KELOR (*Moringa oleifera* Lam) YANG  
BERPOTENSI SEBAGAI *INHIBITOR*  $\alpha$ -Glukosidase**

*DETERMINATION OF THE GENETIC KINSHIP BASED ON  
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) IN MORINGA  
LEAVES (Moringa oleifera Lam) POTENTIAL AS  
INHIBITOR OF  $\alpha$ -Glukosidase*

**RIZKY RAHMAWATI ALAMI**



**S2 FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**TESIS**

**DETERMINASI KEKERABATAN GENETIK BERDASARKAN  
*Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* DARI  
TANAMAN KELOR (*Moringa oleifera* Lam) YANG  
BERPOTENSI SEBAGAI *INHIBITOR*  $\alpha$ -Glukosidase**

Disusun dan diajukan oleh

RIZKY RAHMAWATI ALAMI

N012181017



**S2 FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**DETERMINASI KEKERABATAN GENETIK BERDASARKAN  
*Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* DARI  
TANAMAN KELOR (*Moringa oleifera* Lam) YANG  
BERPOTENSI SEBAGAI *INHIBITOR*  $\alpha$ -Glukosidase**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

RIZKY RAHMAWATI ALAMI

Kepada

**S2 FARMASI**

**FAKULTAS FARMASI**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2021**

## LEMBAR PENGESAHAN TESIS

### DETERMINASI KEKERABATAN GENETIK BERDASARKAN *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* DARI TANAMAN KELOR (*Moringa oleifera* Lam) YANG BERPOTENSI SEBAGAI INHIBITOR $\alpha$ -Glukosidase

Disusun dan diajukan oleh

RIZKY RAHMAWATI ALAMI

Nomor Pokok N012181017

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Program Magister Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi

Universitas Hasanuddin

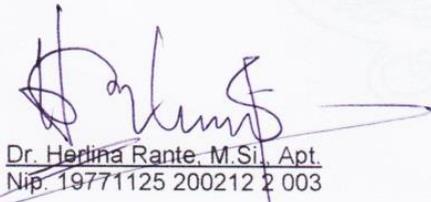
pada tanggal 18 Februari 2021

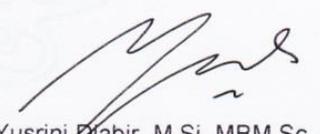
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Pembimbing Utama

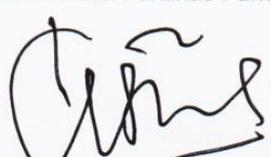
Pembimbing Pendamping

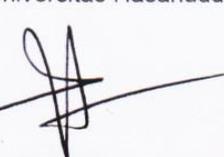
  
Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt.  
Nip. 19771125 200212 2 003

  
Yulia Yusrini Diabir, M.Si., MBM.Sc., Ph.D., Apt.  
Nip. 19780728 200212 2 003

Ketua Program Studi Magister  
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi,

Dekan Fakultas Farmasi  
Universitas Hasanuddin,

  
Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.  
Nip. 19800101 200312 1 004

  
Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.  
Nip. 19750925 200112 1 002



## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertandatangan di bawah ini

Nama : Rizky Rahmawati Alami  
Nomor Mahasiswa : N012181017  
Program studi : Farmasi  
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

Determinasi Kekerbatan Genetik berdasarkan *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* dari Tanaman Kelor (*Moringa oleifera* Lam) yang Berpotensi sebagai *Inhibitor  $\alpha$ -Glukosidase*

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 18 Februari 2021

Yang Menyatakan



  
Rizky Rahmawati Alami

## PRAKATA

Bismillah Alhamdulillah puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah *subhanahu wa ta'ala* dengan selesainya tesis ini. Gagasan yang melatarbelakangi penulis mengambil permasalahan ini untuk memanfaatkan sumber daya alam keanekaragaman hayati dalam meminimalisir efek samping penggunaan obat terhadap organ khususnya pada penggunaan obat jangka panjang.

Banyak kendala yang dihadapi selama penelitian dan penyusunan tesis ini, namun alhamdulillah dapat diselesaikan dengan baik berkat bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt dan Ibu Yulia Yusrini Djabir, M.Si., MBM.Sc., Ph.D., Apt, selaku Komisi Penasihat yang telah banyak memberi bantuan, masukan, arahan dan bimbingan kepada penulis dalam penyelesaian tesis ini. Terima kasih kepada Komisi Penguji Bapak Prof. Dr. H.M. Natsir Djide, M.S., Apt., Bapak Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt., dan Ibu Dr. Risfah Yulianty, M.Si., Apt. yang telah memberi masukan dalam penyusunan tesis ini.

Terima kasih juga penulis sampaikan kepada kedua orang tua, suami, keluarga dan sahabat penulis yang selalu memberikan dukungan, doa dan semangat. Ucapan terima kasih juga kepada saudara serta rekan-rekan magister pascasarjana farmasi yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Semoga Allah *subhanahu wa ta'ala* memberikan balasan atas kebaikan yang telah Bapak/Ibu/Saudara berikan dan semoga tesis ini dapat bermanfaat.

Makassar, Februari 2021

Rizky Rahmawati Alami

## ABSTRAK

RIZKY RAHMAWATI ALAMI. Determinasi Kekerbatan Genetik berdasarkan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) dari Tanaman Kelor (*Moringa oleifera* Lam) yang Berpotensi sebagai *Inhibitor  $\alpha$ -Glukosidase*

Kelor merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang dapat digunakan sebagai antidiabetes, kelor juga diduga memiliki keragaman genetik karena mudah ditemui dan mampu tumbuh dalam berbagai kondisi iklim. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dan hubungan kekerabatan genetik dari tanaman daun kelor yang berasal dari tiga tempat berbeda (Saragi, Bacuhau, Batumatongka) di Buton, Sulawesi Tenggara.

Sampel kelor yang digunakan diperoleh dari tiga tempat tumbuh berbeda. Kemudian dilakukan uji aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dan analisis keragaman genetik dengan metode *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) menggunakan 15 primer yang dipilih secara acak.

Ekstraksi dilakukan menggunakan etanol 95% dengan cara maserasi. Hasil uji aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase terhadap ekstrak etanol daun kelor dari daerah Saragi, Bacuhau dan Batumatongka menunjukkan nilai  $IC_{50}$  secara berturut-turut sebesar 18,6196  $\mu\text{g/mL}$ , 10,1851  $\mu\text{g/mL}$ , 10,5801  $\mu\text{g/mL}$  dan kontrol positif akarbosa sebesar 11,5434  $\mu\text{g/mL}$ . Untuk analisis keragaman genetik diperoleh jumlah pita DNA sebanyak 49 pita DNA sampel satu (Saragi), 50 pita DNA sampel dua (Bacuhau), 56 pita DNA sampel tiga (Batumatongka). Hasil dendogram yang didapatkan memperlihatkan hubungan kekerabatan yang dekat antara sampel B2 (Bacuhau) dan B3 (Batumatongka) (dengan nilai koefisien kemiripan genetik 0,79) Dan hubungan kekerabatan yang jauh antara sampel B1 (Saragi) dan B3 (Batumatongka); B2 (Bacuhau) (dengan koefisien kemiripan 0,62; 0,71) yang berarti sampel B1 dan B3; B2 memiliki nilai keragaman genetik yang tinggi, sedangkan B1 dan B3 memiliki nilai keragaman genetik yang rendah.

Kata Kunci: Kelor, enzim  $\alpha$ -glukosidase, RAPD

## ABSTRACT

RIZKY RAHMAWATI ALAMI. Determination of the Compounds Kinship based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Moringa Leaves (*Moringa oleifera* Lam) which has Potential as Inhibitor of  $\alpha$ -Glucosidase.

Moringa is one of the traditional remedy plants that can be used as antidiabetic and additionally, Moringa has genetic diversity because it is easy to find and able to grow in any climate condition. The objective of this research was to determine the inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase and genetic kinship of Moringa leaves obtained from three different sites (Saragi, Bacuhau, and Batumatongka) in Buton, Southeast Sulawesi.

Moringa's sample was obtained at three different growing sites with different. Then, the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity test and genetic kinship analysis were carried out with the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method using 15 selected primers.

The extraction was carried out using 95% ethanol by maceration. The result of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity test against the ethanol extract of Moringa from Saragi, Bacuhau and Batumatongka area showed the value  $IC_{50}$  of 18,6196  $\mu\text{g/mL}$ , 10,1851  $\mu\text{g/mL}$ , 10,5801  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, and acarbose positive control of 11,5434  $\mu\text{g/mL}$ . For genetic kinship analysis, it was found that the number of DNA bands were 49 DNA bands for sample 1 (Saragi), 50 DNA bands for sample 2 (Bacuhau) and 56 DNA bands for sample 3 (Batumatongka). The dendrogram result obtained showed the level of the less close kinship between sample B2 (Bacuhau) and B3 (Batumatongka) (with the value of the genetic similarity coefficient 0,79) and distant kinship between samples B1 (Saragi) and B3 (Batumatongka); B2 (Bacuhau) (with the similarity coefficient 0,62; 0,71) showing that the samples B1 and B3;B2 had the value of high genetic diversity, while B2 and B3 have low value genetic diversity.

*Keyword: Moringa,  $\alpha$ -glucosidase enzyme, RAPD*

## DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Kelor ( <i>Moringa oleifera</i> Lam)	6
1. Klasifikasi Tanaman	6
2. Deskripsi dan Morfologi Tanaman	6
3. Kandungan Senyawa Bioaktif	9
B. Metode Ekstraksi Bahan Alam	9
C. Enzim $\alpha$ -glukosidase	11
1. Definisi $\alpha$ -glukosidase	11
2. Mekanisme <i>inhibisi</i> $\alpha$ -glukosidase	13
3. <i>Inhibisi</i> Komponen Bioaktif pada <i>Inhibitor</i> $\alpha$ -glukosidase	15
D. Isolasi DNA	16
E. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	17
F. <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD)	19

G. Kerangka Teori	22
H. Kerangka Konsep	23
III. METODE PENELITIAN	24
A. Rancangan Penelitian	24
B. Waktu dan Tempat Penelitian	24
C. Alat dan Bahan	25
1. Alat	25
2. Bahan	25
D. Prosedur Penelitian	26
1. Pengambilan dan Pengolahan Simplisia	26
2. Pembuatan Ekstrak Daun Kelor	27
3. Skrining Fitokimia	27
4. Uji Aktivitas Penghambatan Enzim $\alpha$ -glukosidase	28
5. Analisis <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD)	32
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
A. Senyawa Bioaktif	37
B. Uji <i>Inhibisi</i> Enzim $\alpha$ -Glukosidase	41
C. Analisis dengan <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD)	44
1. Seleksi Primer	44
2. Analisis Hubungan Kekerbatan Genetik	46
V. KESIMPULAN DAN SARAN	52
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	61

## DAFTAR TABEL

<b>nomor</b>		<b>halaman</b>
1.	Hasil ekstraksi daun kelor dengan maserasi	36
2.	Nilai Rf masing-masing spot sampel ekstrak daun kelor setelah disemprot dengan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	38
3.	Hasil identifikasi senyawa bioaktif dengan KLT pada ekstrak etanol daun kelor	39
4.	Hasil uji aktivitas <i>inhibisi</i> α-glukosidase oleh ekstrak daun kelor dan akrbose	41
5.	Primer RAPD dan hasil amplifikasi pada kelor	45
6.	Nilai kesamaan genetik tiga sampel kelor	48

## DAFTAR GAMBAR

nomor	halaman
1.	Tanaman daun kelor ( <i>Moringa oleifera</i> Lam) 8
2.	Reaksi enzimatis $\alpha$ -glukosidase 12
3.	Struktur kimia akarbose 14
4.	Mekanisme <i>Inhibisi</i> $\alpha$ -glukosidase 14
5.	Struktur dasar flavonoid 15
6.	Hasil uji KLT ekstrak daun kelor dengan pereksi H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 38
7.	Hasil identifikasi senyawa bioaktif menggunakan KLT pada ekstrak daun kelor 39
8.	Ektroforegram hasil amplifikasi DNA pada Primer OPAE-11, OPC-11, OPA-09, OPP-08. Baris 1 (Saragi), baris 2 (Bacuhau), baris 3 (Batumatongka) 47
9.	Elektroforegram hasil amplifikasi DNA pada primer OPQ-07, OPD-20, OPA-02, OPD-03, OPY-09. Baris 1 (Saragi), baris 2 (Bacuhau), baris 3 (Batumatongka) 47
10.	Elektroforegram hasil amplifikasi DNA pada primer OPAK-20, OPG-06, OPAD-11, OPA-09. Baris 1 (Saragi), baris 2 (Bacuhau), baris 3 (Batumatongka) 47
11.	Dendogram kekerabatan genetik kelor pada tiga tempat berbeda, B1 (Saragi), B2 (Bacuhau), B3 (Batumatongka) 49
12.	Skema kerja penellian 61
13.	Kurva sampel ekstrak 1 65
14.	Kurva sampel ekstrak 2 66
15.	Kurva sampel ekstrak 3 66
16.	Kurva sampel akarbose 67
17.	Pengambilan sampel 1 (Saragi) 68

18. Pengambilan sampel 2 (Bacuhau)	68
19. Pengambilan sampel 3 (Batumatongka)	68
20. Proses perajangan sampel	68
21. Penimbangan sampel sebelum pengeringan	69
22. Proses pengeringan sampel	69
23. Penimbangan sampel setelah pengeringan	69
24. Proses maserasi	69
25. Preparasi sebelum penotolan sampel ekstrak	69
26. Proses isolasi DNA kelor	70
27. Proses preparasi sampel untuk PCR	70
28. Proses vortex sampel	70
29. Proses memasukkan sampel dalam PCR	70
30. Alat PCR yang digunakan	70
31. Alat untuk elektroforesis	70
32. Alat PCR <i>UV Transiluminator</i>	71
33. Dapar fosfat ph7	71
34. Penimbangan dinatrium hydrogen fosfat	71
35. Penimbangan natrium dihydrogen fosfat	71
36. Penimbangan natrium karbonat	71
37. Penimbangan substrat	71
38. Preparasi sampel sebelum diuji elisa	72
39. Hasil uji elisa sampel ekstrak	72

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>nomor</b>		<b>halaman</b>
1.	Skema kerja	61
2.	Perhitungan bahan-bahan yang digunakan pada penelitian	62
3.	Hasil analisis sampel ekstrak daun kelor	64
4.	Dokumentasi penelitian	68

## DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
AlCl <sub>3</sub>	Aluminium klorida
AlCl <sub>3</sub>	Aluminium klorida
Asp214	Sisi aktif dari enzim α-glukosidase
BM	Berat Molekul
bp	Base pair, pasangan basa; satuan ukuran besar molekul atau Panjang DNA
cm	Sentimeter
CsCl	Cesium Chlorida
CTAB	Cethyltrimethylammonium bromide
dATP	Deoksiadenin trifosfat
dCTP	Deoksisitosin trifosfat
dGTP	Deoksiguanin trifosfat
DM	Diabetes Militus
DNA	Deoxyribonucleic Acid, asam deoksiribonukleat
dNTPs	Deoksinukleotida trifosfat
dpl	diatas permukaan laut
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	et alii
g	Gram

Glu276	Sisi aktif dari enzim $\alpha$ -glukosidase
GPS	Global Positioning System
H <sub>2</sub> O	Air
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Asam sulfat
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration
KgBB	Kilogram berat badan
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
L	Liter
m	Meter
M	Molaritas
mer	Basa, satuan ukuran fragmen DNA
Mesh	Ukuran dari jumlah lubang suatu jaring atau kasa pada luasan 1 inch persegi jaring/ kasa yang bias dilalui oleh material padat
mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnesium Klorida
mL	miliLiter
mm	Milimeter
mM	miliMol (Molaritas)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natrium karbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatrium hydrogen sulfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natrium dihydrogen sulfat
ng	Nanogram
nm	Namo meter

PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Power of hydrogen
PNP	p-Nitrofenil $\alpha$ -D-glukopiranosida
PNPG	p-nitrofenil-alfa-d-glukopiranososa
ppm	Part per million
PPUT	Protein pelindung utas tunggal
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
Rf	Retention faktor
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonukleat Acid
rpm	revolutions per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfata
SSR	Simple Sequence Repeat
TAE	Tris acetate EDTA
Tm	melting Temperature
U	Unit
UV	Ultraviolet
volt	Volta, satuan pengukuran tegangan listrik
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu$ g	Microgram
$\mu$ L	Microliter
$^{\circ}$ C	Celcius, satuan derajat suhu

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### A. Latar Belakang

Indonesia memiliki kekayaan alam yang cukup melimpah. Beraneka ragam tanaman obat tumbuh subur dan sangat potensial untuk dikembangkan. Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah kelor (*Moringa oleifera* Lam). Kelor diduga memiliki keragaman yang cukup tinggi. Hal ini dibuktikan dengan mudahnya tanaman kelor untuk ditemukan dan dapat tumbuh dalam berbagai iklim (Fahey, 2005). Keragaman genetik merupakan salah satu faktor penting dalam mempertahankan keberadaan suatu jenis tanaman.

Penentuan keragaman genetik dilakukan untuk melihat hubungan kekerabatan sampel daun kelor yang diperoleh pada tiga lokasi tumbuh berbeda dengan melihat ketinggiannya, yang berbeda di Kabupaten Buton, Sulawesi Tenggara. Analisis keragaman genetik tanaman dapat diketahui dengan identifikasi secara molekuler DNA. Salah satu teknik molekuler yang dapat digunakan adalah metode RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Dwiatmini *et al.*, 2003). RAPD merupakan salah satu teknik analisa keragaman genetik tanaman yang umum digunakan untuk melihat komponen kimia tanaman berdasarkan kekerabatan genetiknya (Silva *et al.*, 2012) dengan Metode amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan

PCR menggunakan primer acak untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Prosedur RAPD lebih murah (pada teknik RAPD ini tidak perlu diketahui urutan basanya (*sequencing*)), lebih cepat memberikan hasil (mampu menampilkan hasil dalam waktu relatif singkat, hasil dapat segera divisualisasi setelah proses amplifikasi DNA), membutuhkan sampel DNA lebih rendah (Pandey *et al.*, 1998).

Tanaman kelor dikenal luas di Indonesia mulai dari akar, batang, daun, dan juga biji masing-masing memiliki khasiat dan kegunaan sebagai pengobatan secara empiris. Akar tanaman kelor digunakan dalam pengobatan antilithic (pencegah/penghancur terbentuknya batu urine), antifertilitas, anti-inflamasi (peradangan), stimulan bagi penderita lumpuh, bertindak sebagai tonik / memperbaiki peredaran darah jantung. Daun kelor dapat digunakan untuk pengobatan pencahar, sakit tenggorokan, bronhitis, jus daun diyakini untuk mengontrol kadar glukosa. sedangkan biji kelor digunakan sebagai efek perlindungan yang menurunkan lipid peroksida hati dan antihipertensi (Fahey, 2005).

Kelor (*Moringa oleifera* Lam) memiliki beberapa variasi efek farmakologi dalam mencegah atau mengobati sejumlah penyakit seperti antibiotik, antiinflamasi, antioksidan, antidiabetes dan dapat menurunkan kolesterol (Atawodi *et al.*, 2010). Banyak penelitian yang membuktikan bahwa tanaman kelor memiliki potensi sebagai antidiabetes salah satunya, penelitian dari Ambarwati *et al.*, (2014), dalam penelitiannya menunjukkan pemberian ekstrak etanol daun kelor dosis 500mg/KgBB/hari dapat

menunjukkan penurunan kadar gula darah sampai nilai normal pada tikus yang diinduksi streptozotocin dibanding kelompok kontrol.

Enzim  $\alpha$ -glukosidase adalah enzim yang berada pada usus halus yang bertanggung jawab dalam pengubahan karbohidrat menjadi glukosa. *Inhibisi* kerja enzim ini secara efektif dapat mengurangi pencernaan karbohidrat kompleks sehingga memperlambat absorpsi glukosa ke dalam darah dan mengurangi peningkatan kadar glukosa setelah makan pada penderita diabetes melitus (Shinde *et al.*, 2008). Kerja enzim ini tidak mempengaruhi sekresi insulin sehingga tidak menyebabkan efek samping hipoglikemik (Depkes RI, 2005).

Beberapa *inhibitor* yang saat ini telah digunakan secara klinik adalah akarbose dan miglitol yang menghambat glukosidase seperti,  $\alpha$ -glukosidase, dan  $\alpha$ -amilase. Namun banyak agen hipoglikemik memiliki keterbatasan, yaitu menimbulkan efek samping dan meningkatkan komplikasi diabetes. *Inhibitor*  $\alpha$ -glukosidase alami yang berasal dari bahan alam dapat dimanfaatkan menjadi pendekatan terapi untuk mengobati *hiperglikemia postprandial* karena memiliki efek samping yang rendah (Sudha *et al.*, 2011).

Dari uraian di atas maka dilakukan penelitian mengenai keragaman genetik untuk melihat hubungan kekerabatan pada tanaman daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) dari tiga tempat berbeda (Saragi, Bacuhau, Batumatongka) yang berada di kab. Buton Sulawesi Tenggara, yang berpotensi sebagai antidiabetes dengan menghambat  $\alpha$ -glukosidase.

## B. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah

1. Apakah tanaman daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) dari tiga tempat berbeda (Saragi, Bacuhau, Batumatongka) di Buton, Sulawesi Tenggara memiliki hubungan kekerabatan genetik?
2. Apakah tanaman daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) dari tiga tempat berbeda (Saragi, Bacuhau, Batumatongka) di Buton, Sulawesi Tenggara memiliki aktivitas sebagai antidiabetes dengan menghambat  $\alpha$ -glukosidase?

## C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui hubungan kekerabatan genetik pada tanaman daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) yang berasal dari tiga tempat berbeda (Saragi, Bacuhau, Batumatongka) di Buton, Sulawesi Tenggara
2. Untuk menguji aktivitas penghambatan  $\alpha$ -glukosidase dari ekstrak tanaman daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) yang berasal dari tiga tempat berbeda (Saragi, Bacuhau, Batumatongka) di Buton, Sulawesi Tenggara

## D. Manfaat Penelitian

### 1. Untuk pengembangan ilmu

Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai data lanjutan dan informasi ilmiah tentang hubungan kekerabatan genetik dari daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) yang tumbuh pada lokasi yang berbeda, serta informasi tentang efek aktivitas *inhibisi* enzim  $\alpha$ -glukosidase dari daun kelor (*Moringa oleifera* Lam).

### 2. Untuk pemanfaatan

Dengan adanya penelitian ini, maka diharapkan daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) dapat digunakan dan dimanfaatkan dengan baik sebagai pendekatan terapi untuk mengobati *hiperglikemia postprandial* pada pasien diabetes melitus tipe II karena memiliki efek samping yang rendah dan mudah diperoleh dari pada obat antihiperglikemik sintetik.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Kelor (*Moringa oleifera* Lam)

##### 1. Klasifikasi tanaman

Berikut ini adalah klasifikasi tanaman kelor (Fahey, 2005) :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Magnoliophyta
Subdivisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Capparales
Famili	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Spesies	: <i>Moringa oleifera</i> Lam

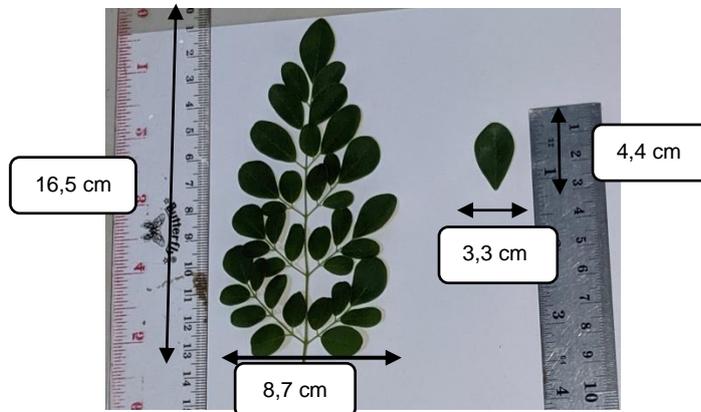
##### 2. Deskripsi dan morfologi

Kelor awalnya banyak tumbuh di India, namun kini kelor banyak ditemukan di daerah beriklim tropis (Grubben, 2004). Pada beberapa Negara kelor dikenal dengan sebutan benzolive, drumstick tree, kelor, marango, mlonge, mulangay, nebeday, saijhan, dan sajna (Fahey, 2005).

Moringaceae terdiri dari satu marga dengan beberapa jenis yaitu *M. oleifera*, *M. arabica*, *M. pterygosperma*, *M. peregrina*. Pohon dengan daun majemuk menyirip ganda 2-3 posisinya tersebar, tanpa daun penumpu, atau daun penumpu telah mengalami metamorphosis sebagai kelenjar-kelenjar pada pangkal tangkai daun. Bunga banci, zigomorf, tersusun dalam malai yang terdapat dalam ketiak daun, dasar bangun mangkuk, kelopak terdiri atas lima daun kelopak, mahkotapun terdiri atas lima daun mahkota, lima benang sari. Bakal buah, bakal biji banyak, buahnya buah kendaga yang membuka dengan tiga katup dengan panjang sekitar dengan panjang sekitar 30 cm, biji besar, bersayap, tanpa endosperm, lembaga lurus. Dari segi anatomi mempunyai sifat yang khas yaitu terdapat sel-sel mirosin dan buluh-buluh gom dalam kulit batang dan cabang. Dalam musim-musim tertentu dapat menggugurkan daunnya (meranggas). Daun sebesar ujung jari berbentuk bulat telur, tersusun majemuk dan gugur di musim kemarau, tinggi pohon mencapai 5-12 m, bagian ujung membentuk payung, batang lurus (diameter 10-30 cm) menggarpu, berbunga sepanjang tahun berwarna putih/krem, buah berwarna hijau muda, tipis dan lunak. Tumbuh subur mulai dataran rendah sampai ketinggian 700 m diatas permukaan laut (Roloff *et al.*, 2009).

*Moringa oleifera* Lam merupakan tumbuhan asli sub-Himalaya di India, Pakistan, Banglades, dan Afganistan. Termasuk pohon yang mudah tumbuh, telah digunakan oleh penduduk asli Roma, Yunani, dan Mesir. Saat ini telah banyak tumbuhan perenial dengan kualitas kayu rendah, tetapi

beberapa negara menggunakan sebagai obat tradisional dan penggunaan industry (Fahey, 2005).



Gambar 1. Tanaman daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) (dokumentasi pribadi)

Kelor merupakan tanaman yang dapat mentolerir berbagai kondisi lingkungan, sehingga mudah tumbuh meski dalam kondisi ekstrim seperti temperatur yang sangat tinggi, di bawah naungan dan dapat bertahan hidup di daerah bersalju ringan. Kelor tahan dalam musim kering yang panjang dan tumbuh dengan baik di daerah dengan curah hujan tahunan berkisar antara 250 sampai 1500 mm. Meskipun lebih suka tanah kering lempung berpasir atau lempung, tetapi dapat hidup di tanah yang didominasi tanah liat. Perbanyakan Kelor dapat dilakukan dengan metode penyemaian langsung dengan biji atau menggunakan stek batang. Daun Kelor dapat dipanen setelah tanaman tumbuh 1,5 hingga 2 m, yang biasanya memakan waktu 3 sampai 6 bulan. Namun dalam budidaya intensif yang bertujuan untuk produksi daunnya, Kelor dipelihara dengan ketinggian tidak lebih dari 1 m. Pemanenan dilakukan dengan cara memetik batang daun dari cabang

atau dengan memotong cabangnya dengan jarak 20 sampai 40 cm di atas tanah (Fahey, 2005).

### 3. Kandungan senyawa bioaktif

Kelor mempunyai kandungan senyawa bioaktif antara lain flavanoid, tannin, anthraquinon, cardiac glycosides alkaloids, *triterpenoids*, *saponins*, and *reducing sugars* (Tende *et al.*, 2011). Komponen bioaktif *Moringa oleifera* pada daun adalah 4-(*alpha-l-rhamnopyranosyloxy*) *benzylglucosinolate*, *quercetin-3-O-glucoside*, *quercetin-3-O-(6''-malonyl-glucoside)* dan yang lebih rendah ialah *kaempferol-3-O-glucoside*, dan *kaempferol-3-O-(6''-malonyl-glucoside)*, *3-caffeoylquinic-acid*, *5-caffeoylquinic-acid* (Mishra *et al.*, 2011). Ekstrak daun kelor dapat menurunkan kadar gula darah meningkatkan kadar antioksidan dalam jaringan pankreas dan secara signifikan memulihkan kerusakan histoarsitektural pada islet pankreas (Tende *et al.*, 2011, Gupta *et al.*, 2012, Jaiswal *et al.*, 2009).

### B. Metode Ekstraksi Bahan Alam

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif tersebut terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan sel hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya (Ditjen POM, 1986).

Tujuan ekstraksi adalah untuk memisahkan senyawa dari campurannya atau simplisia dan juga untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat pada simplisia. Peranan ekstraksi dalam analisis fitokimia sangat penting, karena merupakan tahap awal dalam skrining senyawa aktif tanaman (Hanani, 2015). Proses terekstraksinya zat aktif dalam sel adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel tanaman atau hewan yang mengandung zat aktif (osmosis). Zat aktif tersebut akan terlarut sehingga akan terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan larutan organik di luar sel. Maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel, dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel (Depkes RI, 1986).

Pelarut polar akan menarik komponen polar, sedangkan pelarut nonpolar akan menarik komponen nonpolar. Prinsip "*like dissolves like*" inilah yang digunakan dalam teknik ekstraksi. Metode ekstraksi terbagi atas dua yaitu (Depkes RI, 1986):

- a. Secara panas seperti refluks dan destilasi uap air karena sampel langsung dipanaskan dengan pelarut; dimana umumnya digunakan untuk sampel yang mempunyai bentuk dan dinding sel yang tebal.
- b. Secara dingin misalnya maserasi, perkolasi, dan soxhlet. Dimana untuk maserasi dilakukan dengan cara merendam simplisia, sedangkan soxhlet dengan cara cairan penyari dipanaskan dan uap cairan penyari

naik ke kondensor kemudian terjadi kondensasi dan turun menyari simplisia

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Pemilihan metode ini dikarenakan metode ekstraksi yang sederhana sehingga paling banyak digunakan. Metode ini juga cocok baik untuk skala kecil maupun skala industri. Caranya yaitu sampel dimasukkan kedalam wadah inert yang berisi pelarut lalu ditutup rapat-rapat dan sesekali di aduk dan disimpan pada suhu kamar. Proses ini di lakukan hingga kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dan simplisia tercapai. Terakhir pelarut dan sampel dipisahkan dengan melakukan penyaringan (Tetti, 2014).

### **C. Enzim $\alpha$ -Glukosidase**

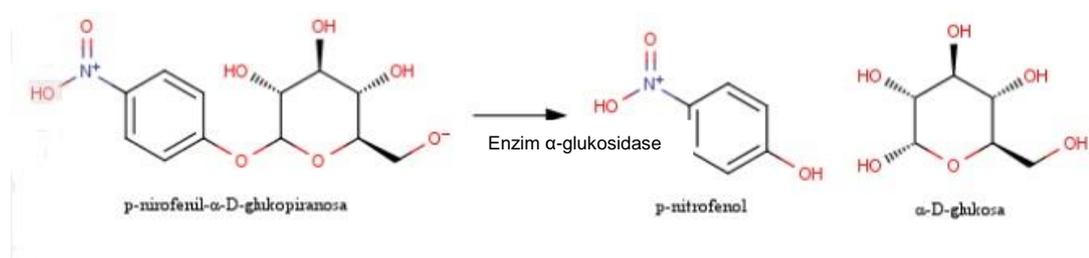
#### **1. Definisi $\alpha$ -glukosidase**

Enzim  $\alpha$ -glukosidase adalah enzim yang berperan pada konversi karbohidrat menjadi glukosa. Karbohidrat akan dicerna oleh enzim di dalam mulut dan usus menjadi gula yang lebih sederhana yang kemudian akan diserap ke dalam tubuh dan meningkatkan kadar gula darah. Proses pencernaan karbohidrat tersebut menyebabkan pancreas melepaskan enzim  $\alpha$ -glukosidase ke dalam usus yang akan mencerna karbohidrat

menjadi oligosakarida yang kemudian akan diubah lagi menjadi glukosa oleh enzim  $\alpha$ -glukosidase yang dikeluarkan oleh sel-sel usus halus yang kemudian akan diserap ke dalam tubuh. Dengan dihambatnya kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase, kadar glukosa darah dapat dikembalikan dalam batas normal (Bosenberg *et al.*, 2008).

Enzim  $\alpha$ -glukosidase merupakan golongan enzim ekso alfa glukosidase yang menghidrolisis ikatan 1,4-glikosidik dan melepaskan D-glukosa dari hasil akhir subtract. Reaksi hidrolisis terjadi dengan memisahkan ikatan antara karbon anomerik dari residu glukosil dan oksigen glukosida (C<sub>1</sub>-O). Kemudian terjadi reaksi pertukaran antara residu glukosil dan proton dikedua hidrolisis dan transglukosilasi dimana residu glukosil digantikan oleh proton dari air atau akseptor.  $\alpha$ -glukosidase menghasilkan produk anomer  $\alpha$ -glukosidase. Secara umum, setiap hidrolisis ikatan glikosidik oleh glikosidase merupakan reaksi yang menghasilkan produk tetap ( $\alpha$  -  $\alpha$ ,  $\beta$  -  $\beta$ ) atau membalikkan konfigurasi anomerik substrat ( $\alpha$  -  $\beta$ ,  $\beta$  -  $\alpha$ ) (Chiba, 2007).

Enzim  $\alpha$ -glukosidase menghidrolisis p-nitrofenil-alfa-d-glukopiranosida (PNPG) menjadi p-nitrofenol (berwarna kuning) dan D-glukopiranosida. Ilustrasi reaksi dapat dilihat pada gambar sebagai berikut.



Gambar 2. Reaksi enzimatik  $\alpha$ -glukosidase (Ngadiwiyana *et al.*, 2011)

## 2. Mekanisme penghambatan $\alpha$ -glukosidase

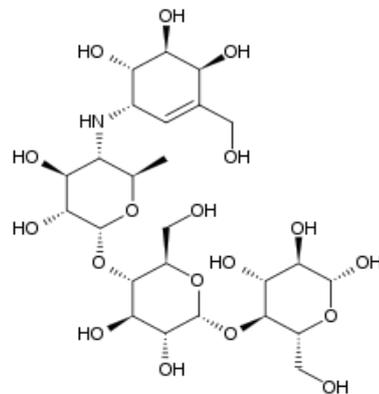
Pati atau karbohidrat dipecah oleh enzim-enzim pencernaan yaitu  $\alpha$ -amilase yang berada dipankreas dan  $\alpha$ -glukosidase yang berada diusus. Proses pemecehan ini bertujuan untuk memecah gula yang kompleks contohnya polisakarida dan oligosakarida menjadi gula yang lebih sederhana yaitu monosakarida (Hikmah, 2015).

Mekanisme *inhibitor* enzim  $\alpha$ -glukosidase diusus yaitu menghambat pemecahan reaksi enzimatik pati atau karbohidrat larut sehingga dapat memodulasi penurunan penyerapan glukosa dari makanan (Hikmah, 2015). Contoh obat yang sebagai *inhibitor*  $\alpha$ -glukosidase adalah akarbose yang merupakan inhibitor  $\alpha$ -glukosidase pertama yang dikenalkan dipasaran. Kemudian dua *inhibitor* lainnya yaitu voglibose di Jepang, dan miglitol di Amerika Serikat. Akarbose terbukti menghambat aktivitas alfa-amilase dan aktivitas di usus yaitu  $\alpha$ -glukosidase, sukarase, maltase, dan isomaltase. Miglitol dan voglibose lebih menghambat aktiitas  $\alpha$ -glukosidase dari pada alfa-amilase (Sim, 2010).

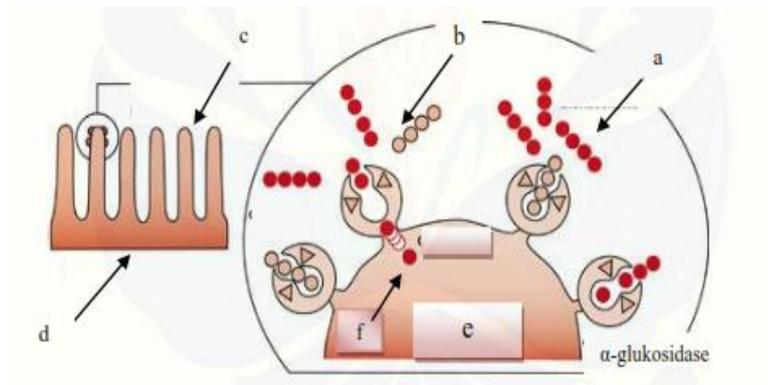
Struktur akarbose dapat dilihat pada gambar 3. karena kehadiran intramolekil nitrogen, akarbose melekat pada tempat pengikatan karbohidrat enzim  $\alpha$ -glukosidase (misalnya sukrosa) dengan factor 104-105. Reaksi enzimatik berhenti karena ikatan C-N di unit acarviosine dari akarbose tidak dapat di pecah. Selama akarbose tetap terikat pada enzim

$\alpha$ -glukosidase, karbohidrat yang masuk tidak dapat dicerna dan glukosa tidak bisa dilepaskan untuk penyerapan (Bischoff, 1994).

Namun terlepas dari afinitas yang tinggi  $\alpha$ -glukosidase, ikatan akarbose bersifat reversible dan inhibisinya bersifat kompetitif. Oleh sebab itu, dalam mekanisme penyerapan karbohidrat adalah tidak melalui pencernaan diusus kecil tetapi diangkut ke ileum. Hal ini memungkinkan ileum distal untuk mengambil bagian dalam proses pencernaan karbohidrat. Sehingga akarbose menunda pencernaan karbohidrat, memperpanjang waktu pencernaan, dan mengurangi tingkat penyerapan glukosa. Akibatnya, kenaikan post prondial glukosa darah menurun. Namun, akarbose tidak berinteraksi dengan transporter glukosa  $\text{Na}^+$  di usus sehingga tidak mempengaruhi penyerapan glukosa oral (Bischoff, 1994). Mekanisme inhibisi  $\alpha$ -glukosidase dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 3. Struktur kimia akarbose (Bischoff, 1994)



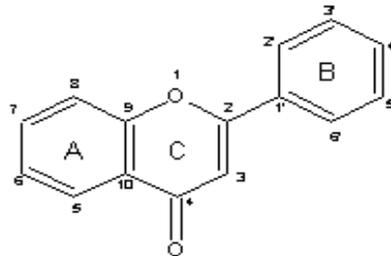
Gambar 4. Mekanisme *Inhibisi*  $\alpha$ -glukosidase (Bischoff, 1994).  
Keterangan: a. oligosakarida b. akarbose c. mikrovili d. enterosit e. mikrovili f. glukosa

### 3. Penghambatan komponen bioaktif pada Inhibitor $\alpha$ -glukosidase

Senyawa fitokimia memiliki kemampuan untuk menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase, seperti senyawa dari golongan alkaloid (Patel *et al.*, 2012), triterpenes (Lai *et al.*, 2012), dan flavonoid (Wang *et al.*, 2010). Penghambatan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase oleh berbagai senyawa fenolik juga telah banyak dijelaskan dalam literature, dimana antara lain disebutkan bahwa  $\alpha$ -glukosidase secara efektif dihambat oleh flavonol (Lee *et al.*, 2008), luteolin, myricetin, dan quercetin (Tadera *et al.*, 2006).

Flavonoid merupakan pigmen tumbuhan yang disintesis dari fenilalanin. Flavonoid merupakan kelompok senyawa polifenol yang ditandai dengan struktur *benzo-y-pyrone*. Sifat kimia flavonoid tergantung pada struktur, tingkat hidroksilasi, substitusi lain dan konjugasi, dan derajat polimerasi. Secara umum, semua flavonoid merupakan turunan dari 2-fenilkromon

yang terdiri dari tiga cincin fenolik yaitu cincin A, B dan C (Gambar 5) (Yao, 2004)



Gambar 5. Struktur dasar flavonoid (Kumar *et al.*, 2011)

Gugus flavonoid yang berperang dalam menghambat inhibitor  $\alpha$ -glukosidase adalah 3',4'-dihidroksi pada cincin B dan 3-OH pada cincin C. gugus 3' dan 4' dihidroksi di cincin B berperan dalam interaksi dengan sisi aktif dari enzim  $\alpha$ -glukosidase, sedangkan gugus 3-OH di cincin C berfungsi untuk mempertahankan pengikatan yang tepat pada molekul flavonoid (Xu, 2010). Sisi aktif dari enzim  $\alpha$ -glukosidase adalah Asp214 dan Glu276. Asam amino ini dikenal sebagai kunci katalitik dalam enzim. Asp214 berperan sebagai nukleofilik sedangkan Glu276 berperan sebagai donor proton (Phan *et al.*, 2013)

#### D. Isolasi DNA

Penggunaan DNA untuk analisis atau rekayasa genetik mengharuskan DNA untuk diisolasi dan dimurnikan. Tahapan umum yang dilakukan dalam isolasi DNA adalah lisis sel, pemisahan debris sel, dan penghilangan protein (*deproteinasi*). Dinding sel (pada sel tanaman) rusak secara fisik dan enzimatis, sedangkan membran sel rusak dengan penambahan

detergen. Perusakan secara fisik dapat dilakukan pada suhu 4°C untuk menjaga DNA agar tetap utuh. Detergen yang digunakan dapat berupa *sodium dodecyl sulfate* (SDS) atau *cethyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) (Deshmukh *et al.*, 2007; Harini *et al.*, 2008). Proses isolasi DNA juga dapat menggunakan *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) yang berfungsi mengkelat Mg<sup>2+</sup>, senyawa ionik yang dibutuhkan oleh enzim *deoksiribo nuklease* (DNase) (Wilson *et al.*, 2000 dalam Dyah, 2010).

Setelah mengeluarkan asam nukleat (DNA dan RNA) dari sel, DNA dan RNA harus dipisahkan dari pengotor berupa protein dan pecahan sel. Pemisahan ini dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan larutan fenol-kloroform. Penambahan larutan ekstraksi ini yang dilanjutkan dengan sentrifugasi akan membagi larutan menjadi fase organik dan fase air yang dipisahkan oleh lapisan protein. DNA dan RNA terdapat dalam fase air, sedangkan fase organik berisi lipid dan pecahan sel. RNA dapat dihilangkan dengan penambahan *ribonuklease* (RNase) atau sentrifugasi *gradien* CsCl. (Adams *et al.*, 1986). Langkah terakhir, ditambahkan etanol absolut untuk memekatkan DNA yang diperoleh dan selanjutnya disimpan beku dalam pendingin bersuhu -20°C sampai siap digunakan (Dyah, 2010).

### **E. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

PCR merupakan metode untuk mengamplifikasi fragmen DNA spesifik dalam jumlah besar secara *in vitro* dari sejumlah kecil cetakan awal. Komponen PCR terdiri atas sepasang primer, DNA cetakan, enzim

polimerase, dNTPs (*deoksinukleotida trifosfat*) yang terdiri atas dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP, bufer PCR, dan MgCl<sub>2</sub> (Mikkelsen *et al.*, 2004).

Perbanyakan fragmen DNA dilakukan secara selektif dan spesifik oleh sepasang polinukleotida (15-25 mer) yang dikenal sebagai primer. Enzim polimerase berasal dari bakteri *Thermus aquaticus* yang digunakan untuk mengatalisis penempelan dua buah primer melalui sekuen yang komplemen. Enzim polimerasa juga dapat menggabungkan DNA cetakan tunggal, membentuk untaian molekul DNA yang Panjang. Enzim polimerase memiliki stabilitas termal yang tinggi, aktivasinya pada saat siklus pemanasan pada suhu 95°C (Mikkelsen *et al.*, 2004), dan memiliki aktivitas maksimum pada suhu 75-80°C (Innis, 1990). Proses PCR memiliki tiga tahapan utama, yaitu denaturasi, penempelan primer (*annealing*), dan pemanjangan sekuen (*extension*) (Dyah, 2010).

Tahap denaturasi merupakan tahap awal reaksi yang berlangsung pada suhu tinggi, yaitu 94°C hingga 96°C. Umumnya tahap ini dilakukan sampai 5 menit untuk memastikan semua utas DNA terpisah. Tahap denaturasi bertujuan memisahkan utas ganda DNA menjadi utas tunggal dengan memutuskan ikatan hidrogen antar pasang basa (Dyah, 2010). (Chakrabarti, 2004) menyebutkan bahwa peran energi panas dapat menggantikan fungsi enzim helikase, girase, dan protein pelindung utas tunggal (PPUT) sekaligus pada proses *replikasi* DNA di dalam sel (*in vivo*).

Tahap yang kedua adalah penempelan primer atau *annealing* pada suhu sekitar 42°C-65°C. Suhu penempelan ini bersifat spesifik yang

merupakan rata-rata dari nilai *tm* (*melting temperature*) yang dimiliki masing-masing primer, yaitu *forward* (5'-end) dan *reverse* (3'-end). Primer menempel pada bagian DNA cetakan yang memiliki urutan basa komplementer dengan urutan basa primer. Tahap ini di dalam replikasi sel berfungsi sebagai inisiasi sintesis DNA oleh primase untuk membentuk RNA primer pada situs ori (Chakrabarti, 2004).

Tahap ketiga adalah perpanjangan primer atau primer *extension* yang bertujuan memberikan kondisi optimum bagi kerja enzim Taq polimerase dalam memanjangkan primer guna membentuk utas DNA baru. (Chakrabarti, 2004) menyebutkan bahwa peran Taq polimerase dapat menggantikan fungsi enzim DNA polimerase III, DNA polimerase I, dan ligase di dalam replikasi sel. Amplifikasi DNA dilakukan dengan pengulangan tahapan PCR sebanyak 30-40 siklus.

#### **F. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Seiring dengan kemajuan-kemajuan dalam teknik biologi molekuler, sejumlah metode penanda molekuler telah banyak dikembangkan untuk mengidentifikasi keragaman genetik suatu tanaman, salah satu teknik molekuler yang dapat digunakan adalah metode RAPD yang berdasarkan pada amplifikasi DNA dengan PCR merupakan salah satu dari teknik-teknik yang paling banyak digunakan dalam perkembangan penanda molekuler (Dwiamini *et al.*, 2003).

RAPD merupakan metode amplifikasi sekuen DNA yang tidak diketahui, menggunakan primer oligonukleotida tunggal yang mengamplifikasi sekuen DNA secara acak. RAPD dikembangkan pertama kali oleh (Williams *et al.*, 1990) yang mengamplifikasi DNA genom dari manusia, kedelai, jagung, bakteri, dan *Neurospora crassa* menggunakan primer oligodeoksinukleotida tunggal. Komponen yang digunakan dalam analisis RAPD tidak jauh berbeda dengan analisis berbasis PCR pada umumnya, dengan jumlah siklus lebih banyak yaitu 45 siklus, menggunakan transisi tercepat di antara tiap temperatur (Williams *et al.*, 1990 dalam Anggraini, 2008).

Analisis RAPD berbeda dengan kondisi PCR standar, yaitu hanya menggunakan satu primer dan tidak memerlukan informasi sekuen DNA awal (Bardakci, 2001). Prinsip dasar RAPD adalah komplementasi urutan basa primer dengan urutan basa DNA cetakan. Prinsip kerja marka RAPD adalah berdasarkan perbedaan amplifikasi PCR pada sampel DNA dari sekuen oligonukleotida pendek yang secara genetik merupakan marka dominan (Williams *et al.*, 1990; Welsh and McClelland, 1990). Primer RAPD bersifat random dengan ukuran panjang biasanya 10 nukleotida. Jumlah produk amplifikasi PCR berhubungan langsung dengan jumlah dan orientasi sekuen yang komplementer terhadap primer di dalam genom tanaman (Azrai 2005). Macam primer yang digunakan pada teknik RAPD berkaitan dengan suhu penempelan primer dalam reaksi amplifikasi. Primer yang biasanya digunakan mengandung basa G+C antara 60%-70%, karena

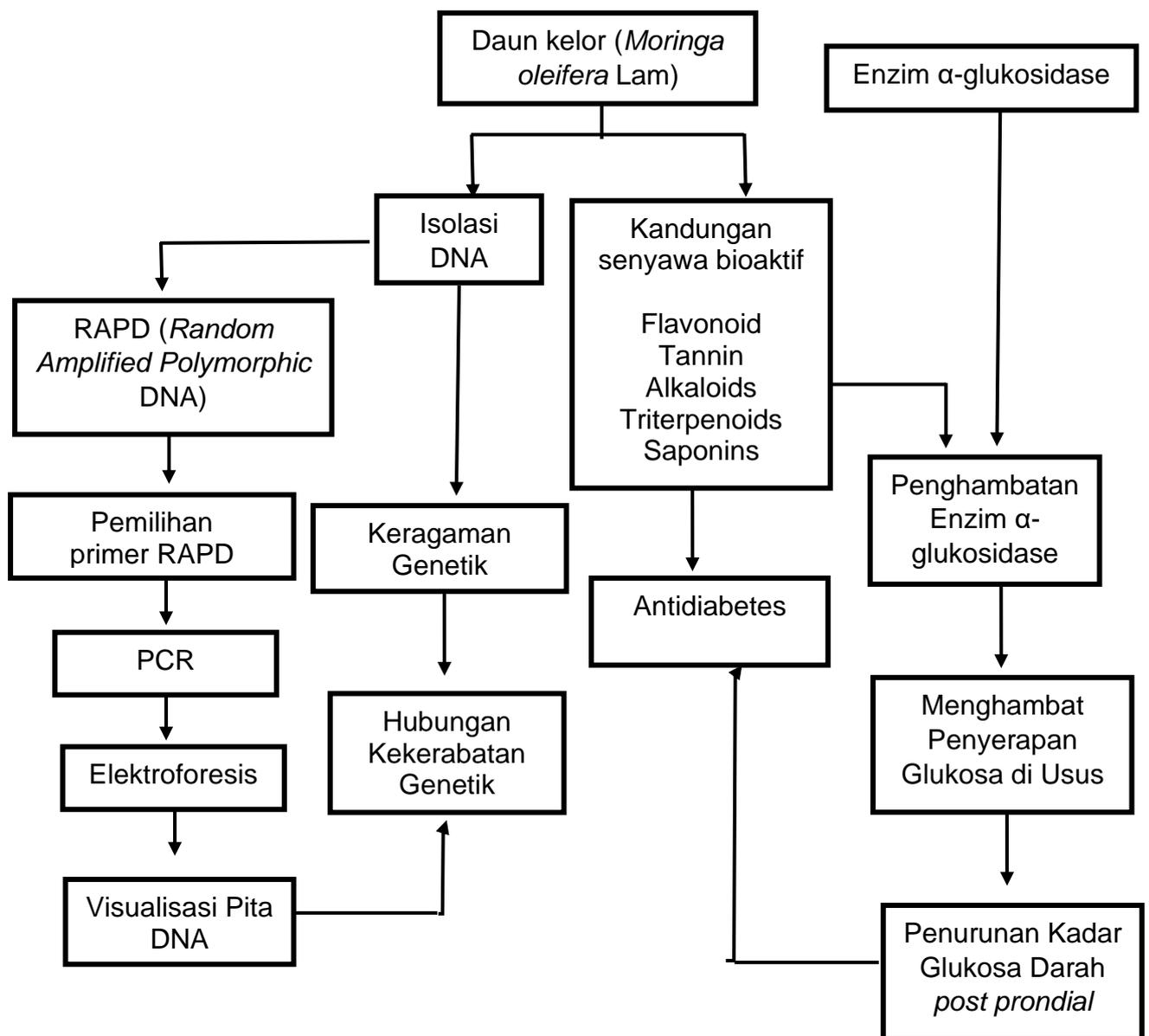
semakin banyak kandungan basa Guanin dan Cytosin, maka ikatan antara primer dengan DNA cetakan semakin kuat dan stabil. Basa Guanin dan Cytosin mempunyai tiga ikatan hidrogen, lebih banyak dari pada basa Timin dan Adenin yang hanya mempunyai dua ikatan hidrogen. Primer oligo-mer secara komersial tersedia di berbagai sumber (misalnya Operon Technologies Inc., Alameda, California atau University of British Columbia, Canada). Profil amplifikasi DNA tergantung pada homologi sekuen nukleotida antara cetakan DNA dengan oligonukleotida primer. Variasi nukleotida antar DNA menghasilkan ada tidaknya fragmen karena perbedaan tempat menempelnya primer (priming site). Produk amplifikasi PCR dipisahkan dengan gel agarosa dan diwarnai dengan etidium bromida (EtBr) (Anggraini, 2008).

Penanda RAPD memiliki beberapa kelebihan, diantaranya tidak membutuhkan latar belakang pengetahuan tentang genom yang akan dianalisis, primer universal dapat digunakan untuk organisme prokariotik maupun eukariotik, mampu menghasilkan karakter yang relatif tidak terbatas jumlahnya, bahan-bahan yang digunakan relatif lebih murah, mudah dalam preparasi, dan memberikan hasil lebih cepat dibandingkan dengan analisis keragaman molekuler lainnya (Weising *et al.*, 2005).

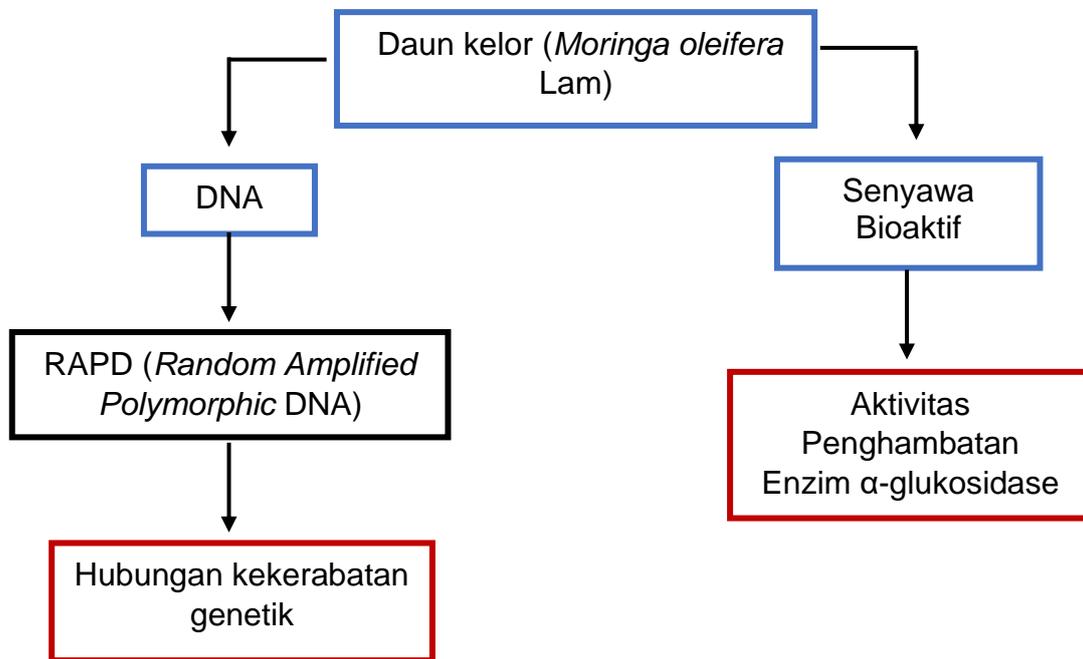
Menurut (Demeke *et al.*, 1994) dalam (Kasinah *et al.*, 2002), prosedur RAPD lebih murah, lebih cepat karena tidak memerlukan banyak tahapan, membutuhkan sampel DNA lebih rendah (0,5 - 5.0 ng), tidak memerlukan radioisotop, dan tidak terlalu membutuhkan keahlian untuk

pelaksanaannya. Teknik RAPD mempunyai keunggulan karena prosedurnya sederhana, mampu menyajikan hasil dalam waktu relatif singkat dan cepat karena setelah proses amplifikasi DNA hasil dapat segera divisualisasi dan akurat untuk tujuan identifikasi dan klasifikasi berbagai plasma nutfah (Anggraini, 2008).

### G. Kerangka Teori



## H. Kerangka Konsep



Keterangan:

