

**SKRIPSI**

**SELEKSI MARKA MOLEKULER RAPD  
(*Random Amplified Polymorphic DNA*) UNTUK  
ANALISIS KERAGAMAN GENETIK PADA JENIS  
CENDANA (*Santalum album* Linn)**

**Oleh :**

**PUTRA ARURI ABDILLAH BAKRI**

**M111 15 313**



**PROGRAM STUDI KEHUTANAN**

**FAKULTAS KEHUTANAN**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2022**

## HALAMAN PENGESAHAN

Judul Skripsi : Seleksi Marka Molekuler RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) Untuk Analisis Keragaman Genetik Pada Jenis Cendana (*Santalum album* Linn)  
Nama Mahasiswa : Putra Aruri Abdillah Bakri  
Stambuk : M111 15 313

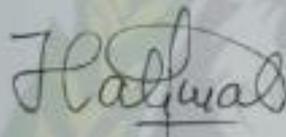
Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kehutanan pada Program Studi Kehutanan Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin

Menyetujui:

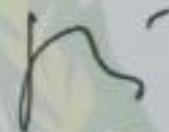
Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II



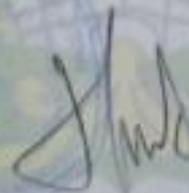
Dr. Ir. Siti Halimah Larekeng, SP., MP.  
NIP. 19820209 201504 2 002



Gusmiaty, S.P., M.P.  
NIP. 19791120 200912 2 002

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kehutanan  
Fakultas Kehutanan  
Universitas Hasanuddin



Dr. Forest. Muhammad Alif K.S., S.Hut., M.Si  
NIP. 19790831 200812 1 002

Tanggal Lulus: 13 April 2022

## PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Putra Aruri Abdillah Bakri

NIM : M11115313

Program Studi : Kehutanan

Jenjang : S1

Dengan ini menyatakan bahwa karya tulisan saya berjudul

Seleksi Marka Molekuler RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) Untuk Analisis Keragaman Genetik Pada Jenis Cendana (*Santalum album* Linn)

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

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

Makassar, 22 April 2022

Yang menyatakan



Putra Aruri Abdillah Bakri

## ABSTRAK

**Putra Aruri Abdillah Bakri (M111 15 313). Seleksi Marka Molekuler RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) untuk Analisis Keragaman Genetik Pada Jenis Cendana (*Santalum album* Linn) di bawah bimbingan Siti Halimah Larekeng dan Gusmiaty.**

Tanaman yang diteliti dalam penelitian ini adalah tanaman cendana (*Santalum album* Linn.) yang berasal dari Balai Perbenihan Tanaman Hutan (BPTH) Kabupaten Gowa. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui berapa banyak primer *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) yang dapat teramplifikasi pada sampel DNA tanaman cendana, sehingga primer yang menghasilkan pita polimorfik, terang maupun jelas dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolasi DNA menggunakan metode KIT ekstraksi *easyDNA* yang menghasilkan DNA murni dari tanaman cendana. Kemudian melakukan seleksi primer RAPD menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Setelah seleksi primer RAPD dengan metode PCR dilakukan, kemudian dilakukan elektroforesis pada sampel yang telah melewati metode PCR. Selanjutnya dilakukan analisis untuk menentukan primer yang akan digunakan dalam analisis keragaman genetik.

Dari hasil penelitian ini diperoleh 4 primer RAPD yang menghasilkan amplifikasi pita yang polimorfik, terang maupun jelas yang dapat digunakan lebih lanjut untuk analisis keragaman genetik.

**Kata Kunci: Cendana, Marka Molekuler, RAPD dan Seleksi Primer**

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas berkat dan karunianya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul “Seleksi Marka Molekuler RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) untuk Analisis Keragaman Genetik Pada Jenis Cendana (*Santalum album* Linn)”.

Penghargaan dan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada Ayah tercinta **Syafruddin** dan Ibu yang kusayangi **Rusmiah** karena telah membesarkan penulis dan selalu melindungi serta menyayangi penulis dimanapun penulis berada.

Terselesaikannya skripsi ini tidak terlepas dari bantuan banyak pihak, sehingga pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat penulis menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya bagi semua pihak yang telah memberikan bantuan moril maupun materil baik langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan skripsi ini hingga selesai, terutama kepada yang saya hormati:

1. Ibu **Dr. Ir. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P** dan Ibu **Gusmiaty, S.P., M.P** selaku dosen pembimbing yang selalu bijaksana memberikan bimbingan, pengarahan dan nasehat selama penentuan judul penelitian sampai ke tahap penyusunan skripsi ini.
2. Bapak **Iswanto, S.Hut., M.Si.**, dan Ibu **Wahyuni, S.Hut., M.Hut.**, selaku penguji yang telah memberikan masukan dan saran-saran guna penyempurnaan skripsi ini.
3. Bapak **Mukrimin, S.Hut., Ph.D** selaku kepala Lab. Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon yang tidak henti-hentinya memberi semangat dan memberikan motivasi kepada para mahasiswa Lab. Biotek untuk mempercepat penyelesaian studi.
4. **Bapak/Ibu dosen** dan **staff** di lingkungan Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin yang telah membantu dan telah mentransfer ilmunya selama penulis menempuh pendidikan S1.

5. Bapak **A. Siady Hamzah, S.Hut., M.Si** selaku dosen pembimbing akademik penulis selama penulis menempuh pendidikan sampai selesai.
6. Ibu **Dr. Ir. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P.**, Kak **Iswanto, S.Hut.,M.Si.**, **Fitriani, S.Hut.**, **Atisa Muslimin, S.Hut.**, yang telah bersedia membantu penulis selama melaksanakan penelitian di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon hingga skripsi ini selesai.
7. Terima kasih untuk Kak **Iswanto, S.Hut.,M.Si.**, **Atisa Musilimin, S.Hut.**, **Muhammad Yusril**, dan **Syamsumarlin** yang telah memberikan dukungan dan membantu penulis selama penyusunan skripsi.
8. Terima kasih untuk teman-teman **VIRBIUS** angkatan 2015, terima kasih atas kerjasamanya dan semangat yang kalian berikan kepada penulis dalam menyelesaikan kuliah di Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini, masih banyak terdapat kekurangan yang perlu diperbaiki, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penulisan skripsi ini semoga segala amal dan kebaikannya mendapatkan balasan yang berlimpah dari Allah SWT.

Makassar, April 2022

Putra Aruri Abdillah Bakri

# DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan dan Kegunaan.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Sistematika Tanaman Cendana.....	4
2.2. Karakteristik dan Morfologi Tanaman Cendana.....	4
2.3. Metode <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	6
2.4. Penanda Molekuler.....	7
2.5. Penanda <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD).....	7
2.6. Seleksi Primer.....	9
III. METODE PENELITIAN.....	11
3.1. Waktu dan Tempat.....	11
3.2. Alat dan Bahan.....	11
3.3. Prosedur Penelitian.....	11
3.3.1. Isolasi DNA <i>Santalum album</i> Linn.....	11
3.3.2. Seleksi Primer.....	12
3.3.3. Elektroforesis.....	14
3.3.4. Analisis Data.....	14
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	16
4.1. Isolasi DNA.....	16

4.2. Seleksi Primer.....	16
V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	22
5.1. Kesimpulan.....	22
5.2. Saran.....	22
DAFTAR PUSTAKA .....	23
LAMPIRAN.....	25

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
Tabel 1.	Nama primer dan sekuen primer RAPD yang di seleksi.....	13
Tabel 2.	Nama primer dan hasil amplifikasi DNA tanaman cendana.....	17

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
Gambar 1.	Elektroforegram hasil amplifikasi PCR primer OPA-15 .....	18
Gambar 2.	Elektroforegram hasil amplifikasi PCR primer OPO-14 .....	19
Gambar 3.	Elektroforegram hasil amplifikasi PCR primer OPC-11 .....	19
Gambar 4.	Elektroforegram hasil amplifikasi PCR primer OPA-02 .....	20
Gambar 7.	Diagram keberhasilan seleksi primer RAPD pada tanaman cendana ..	20

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
Lampiran 1.	Dokumentasi alat yang digunakan.....	26
Lampiran 2.	Dokumentasi bahan yang digunakan.....	28
Lampiran 3.	Dokumentasi proses penelitian di <u>Laboratorium</u> Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon.....	30
Lampiran 4.	Hasil elektroforesis keseluruhan primer RAPD.....	31
Lampiran 5.	Annealing temperatur DNA tanaman cendana saat di PCR.....	36

# I. PENDAHULUAN

## 1.1. Latar Belakang

Cendana (*Santalum album* Linn.) merupakan salah satu sumberdaya hayati yang memiliki potensi penggunaan secara luas, diantaranya sebagai bahan penyedap makanan, senyawa anti karsiogenik dan antiviral (Burdock dan Carabin, 2008), aromatherapy (Kim *et al.*, 2005; George dan Ioana, 2008; Matsuo dan Mimaki, 2010), serta anti kanker (Bommareddy *et al.*, 2012). Perdagangan cendana di Nusa Tenggara Timur (NTT) dimulai sejak tahun 1436 dengan produksi kayu cendana tahun 1910-1916 mencapai 14.674 pikul yang setara dengan 917.125 kg (Ardhana, 2005), produksi tertinggi mencapai 2.458.594 kg (BanoEt, 2001). Tanaman cendana di NTT mempunyai keunggulan kadar minyak dan produksi kayu teras yang tinggi. Kayu cendana menghasilkan kayu teras yang mengandung 1,5 hingga 5%  $\beta$ -santalol, suatu wewangian minyak yang kuat dan spesifik. Kayu terasnya banyak digunakan untuk ukiran kayu, seni, agama dan tujuan pengobatan. Minyaknya sebagai bahan kosmetik, parfum dan aroma terapi, serta dianggap mengandung senyawa anti-melanoma (Rao *et al.*, 2007; Dani *et al.*, 2011; Anonymous, 2012; da Silva *et al.*, 2016).

Potensi ekonomi cendana yang tinggi mengakibatkan eksploitasi terus meningkat, yang pada kenyataannya tidak disertai dengan upaya perbanyakan dan penanaman secara memadai. Meskipun kegiatan rehabilitasi telah dilakukan, namun upaya ini terkendala karena permasalahan ketersediaan benih dan keberhasilan tanaman yang rendah. Penurunan jumlah populasi cendana juga dapat berdampak pada menurunnya keragaman genetik, sedangkan keragaman genetik memainkan peranan yang penting dalam kelestarian jenis maupun program *breeding* suatu spesies.

Analisis keragaman suatu populasi tanaman dapat dilakukan baik secara morfologis yaitu dengan pengamatan langsung terhadap fenotipe tanaman atau juga melalui penggunaan penanda (*marker*) tertentu. Asiedu *et al.* (1989) menyatakan penanda adalah karakter yang dapat diturunkan yang berasosiasi

dengan genotipe tertentu. Penanda dapat digolongkan atas penanda morfologis, sitologis atau yang terbaru penanda molekular (Melchinger, 1990). Pendugaan variasi genetik menjadi semakin meningkat dengan adanya penanda yang didasarkan pada informasi tingkat DNA (Linch *et al*, 1994).

*Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) merupakan salah satu penanda molekular yang dapat digunakan untuk mendeteksi keragaman genetik pada tingkat DNA, baik pada daerah penyandi maupun bukan daerah penyandi protein dengan cara mendeteksi sekuens polimorfik dalam nukleotida. Penanda RAPD dapat memberikan informasi genetik yang akurat karena tidak dipengaruhi oleh lingkungan (Tingey *et al*, 1992). Penggunaan penanda RAPD untuk evaluasi keragaman genetik telah banyak dilaporkan antara lain oleh Restu *et al.*, (2012) untuk tanaman suren; Larekeng *et al.*, (2020) untuk tanaman jabon putih; Gusmiaty *et al.*, (2016) untuk tanaman Pinus merkusii; Restu *et al.*, (2016) untuk tanaman kayu kuku; Syifa *et al.*, (2020) untuk tanaman gula aren; dan Larekeng *et al.*, (2019) untuk tanaman lada katokkon.

Keberhasilan aplikasi DNA genom dengan menggunakan mikrosatelit sangat ditentukan oleh urutan basa primer yang digunakan serta kualitasnya atau kandungan primer dalam setiap reaksi. Beberapa syarat diperlukan untuk mendapatkan penanda RAPD yang cocok untuk suatu spesies. Primer tidak hanya dapat mengamplifikasi sampel DNA tetapi juga pita yang dihasilkan harus polimorfik dan jelas (Larekeng *et al*, 2019). Primer yang menghasilkan pita polimorfik dan bening akan digunakan kemudian dalam analisis keragaman genetik katokkon.

Penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui berapa banyak primer RAPD yang dapat teramplifikasi pada sampel DNA tanaman cendana yang berasal dari Balai Perbenihan Tanaman Hutan (BPTH) Kabupaten Gowa, Sulawesi Selatan, sehingga Primer yang menghasilkan pita polimorfik, terang ataupun jelas dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik dari sampel cendana itu sendiri.

## **1.2. Tujuan dan Kegunaan**

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan primer RAPD yang dapat digunakan untuk keragaman genetik tanaman cendana. Adapun kegunaan dari penelitian ini dapat dijadikan sebagai rujukan primer untuk mengevaluasi keragaman genetik cendana.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Sistematika Tanaman Cendana

Holmes (1983) menyebutkan bahwa dalam taksonomi tumbuhan, pohon cendana diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisio	: Spermatophyta
Sub Divisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Santalales
Suku/Famili	: Santalaceae
Marga/Genus	: Santalum.
Jenis/Spesies	: <i>Santalum album</i> Linn.

### 2.2. Karakteristik dan Morfologi Tanaman Cendana

Secara morfologis tanaman cendana memiliki karakteristik diantaranya pohon kecil sampai sedang, menggugurkan daun, dapat mencapai tinggi 20 m dan diameter 40 cm, tajuk ramping atau melebar, batang bulat agak berlekuk-lekuk, akar tidak berbanir (Rudjiman, 1987). Daun cendana merupakan daun tunggal, berwarna hijau, berukuran kecil-kecil yaitu (4–8) cm x (2–4) cm dan relatif jarang. Bentuk daun bulat memanjang, ujung daun lancip, dasar daun lancip sampai seperti bentuk pasak, pinggiran daunnya bergelombang dan tangkai daun kekuning-kuningan dengan panjang 1 - 1,5 cm.

Pohon cendana mempunyai ciri-ciri arsitektur tanaman berupa batang monopodial, mengarah ke atas, pertumbuhan kontinyu. Bunga tumbuh di ujung dan atau di ketiak daun. Berdasarkan ciri-ciri ini Rudjiman (1987) menyimpulkan bahwa *Santalum album* Linn. termasuk model arsitektur ROUX. Bentuk bunga seperti

payung menggarpu atau malai, dengan hiasan bunga seperti tabung, berbentuk lonceng dan panjangnya  $\pm 1$  mm, yang pada awalnya berwarna kuning, kemudian berubah menjadi merah gelap kecoklat-coklatan.

Inti kayu (empulur) cendana keras, serat-seratnya rapat, berwarna coklat kekuningkuningan. Gubalnya berwarna putih dan tidak berbau. Pembentukan kayu teras dimulai pada umur 4 – 6 tahun dan terbentuk sempurna pada umur setelah 30 – 80 tahun. Teras kayu cendana ada yang berwarna gelap dan ada pula yang berwarna terang. Teras cendana yang berwarna terang mengandung minyak lebih banyak daripada yang berwarna gelap. Pertumbuhan lingkaran batang agak lambat yaitu sekitar 1 cm per tahun dan pembentukan teras mencapai 1-2 kg per tahun.

Bentuk buah cendana merupakan buah batu (*drupe*), jorong, kecil, berwarna merah kehitam-hitaman dengan diameter  $\pm 0,75$  cm. Pada waktu masak daging kulit buah berwarna hitam, mempunyai lapisan eksocarp, mesocarp berdaging, endocarp keras. Buah terletak di ujung ranting berjumlah 4 – 10 buah. Pohon cendana mulai berbunga dan berbuah pada umur 5 tahun serta dan dalam 1 tahun berbuah sebanyak 2 kali.

Cendana tumbuh optimal pada daerah dengan ketinggian 600-1000 m di atas permukaan laut (mdpl) dengan curah hujan antara 600-1.000 mmm/tahun dimana terdapat bulan kering antara 9 - 10 bulan. Tanaman cendana tumbuh sangat baik pada daerah beriklim kering bertipe D3, D4 dan E4 (Oldeman *et al*, 1982) seperti di pulau Timor dan pulau Sumba. Cendana yang tumbuh di daerah dengan curah hujan tinggi tidak menghasilkan kayu dengan kualitas baik walaupun secara baik secara pertumbuhan vegetatifnya. Di propinsi Nusa Tenggara Timur, terdapat banyak daerah dengan tipe iklim D3, D4 dan E4 sehingga sangat potensial untuk pengembangan budidaya cendana dimasa mendatang diantaranya di Pulau Sumba dan Pulau Timor yang diperkirakan mencapai > 1,7 juta ha (Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Kupang, 2011).

### 2.3. Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

PCR adalah salah satu teknik dalam biologi molekuler untuk mengamplifikasi atau menggandakan fragmen DNA spesifik yang akan menghasilkan ribuan hingga jutaan salinan dari urutan DNA. Metode ini dikembangkan oleh Kary B. Mullis pada tahun 1985 di Amerika Serikat. PCR merupakan teknik umum dan sangat diperlukan dalam laboratorium penelitian medis dan biologi untuk berbagai aplikasi (Yu *et al.*, 2017). Muladno (2010) mengemukakan bahwa PCR merupakan reaksi yang menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu, dengan cara mensintesis molekul DNA yang baru dan berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut.

Menurut Handoyo *et al.*, (2001), komponen-komponen yang dibutuhkan pada PCR yaitu:

1. Template DNA

Fungsi template DNA yaitu sebagai cetakan dalam pembentukan molekul DNA yang sama. Untuk memperoleh DNA template untuk proses PCR maka harus menggunakan metode lisis sel untuk mengisolasi baik DNA kromosom maupun DNA plasmid juga menggunakan metode isolasi sesuai standar yang ada.

2. Primer

Peran primer dalam keberhasilan proses PCR sangat penting karena berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA serta dalam menentukan spesifisitas dan sensitivitas PCR. Pasangan primer terdiri dari dua oligonukleotida yang mengandung 18-28 nukleotida.

PCR ini dimulai dengan proses denaturasi yaitu pemisahan dua utas DNA yang saling bergabung (*double helix*) menjadi dua utas DNA yang dilakukan pada suhu tinggi. Setelah proses denaturasi kemudian dilanjutkan dengan proses *annealing* yaitu penempelan primer pada DNA *template* untuk awal pembentukan basa nitrogen pasangannya. Setelah proses *annealing* kemudian dilanjutkan

dengan proses extension yaitu perpanjangan pembentukan DNA *template* (Wahyudi, 2007).

#### **2.4. Penanda Molekuler**

Penanda molekuler atau penanda DNA merupakan suatu sekuen pendek DNA yang menunjukkan adanya polimorfisme antar individu yang berbeda dalam satu spesies. Penanda molekuler mempunyai tingkat polimorfisme yang sangat tinggi, jumlahnya tidak terbatas, tidak dipengaruhi oleh lingkungan dan tingkat heritabilitasnya hampir 100%. Suatu penanda dikatakan efektif apabila dapat membedakan antara dua tetua yang berbeda genotipnya dan dapat dideteksi dengan mudah dalam populasi yang diuji (Wirnas, 2015).

Pabendon (2004), penerapan teknologi marka molekuler utamanya untuk memonitor variasi susunan DNA di dalam spesies tanaman. Marka molekuler yang umum digunakan di Indonesia antara lain *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*, *Simple Sequence Repeat (SSR)*, *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*, *Amplified Length Polymorphism (AFLP)* dan mikro satelit. Penanda molekuler memiliki kemampuan yang luar biasa dalam mentargetkan asam nukleat tertentu. Penanda asam nukleat ini rekayasa melalui teknik profiling dan sidik jari (*fingerprinting*) yang mampu mensampling molekul asam nukleat yang kaya informasi (Nasir, 2002).

Penanda molekuler akan menganalisis hubungan pada tingkat DNA sehingga perubahan yang tidak terlihat pada penanda lainnya dapat diketahui. Hal ini bermanfaat untuk identifikasi suatu individu tau genotipe, derajat kekerabatan antar genotipe, adanya variasi genetika dalam suatu populasi tanaman, determinasi gen atau kompleks yang diinginkan dalam suatu genotipe spesifik, dan pengembangan varietas tanaman baru melalui transformasi (Brown *et al*, 1996).

#### **2.5. Penanda *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)***

Metode *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* merupakan metoda baru untuk mengidentifikasi sejumlah besar polimorfisme DNA pada genom

dengan cepat dan efisien. Tipe polimorfisme ini membuat RAPD cocok untuk studi keanekaragaman genetik, hubungan kekerabatan, peta genetik, sidik jari DNA. Sidik jari DNA banyak digunakan untuk kasus paternity dan forensik.

Metode RAPD menggunakan oligonukleotida pendek (biasanya 10 bp) sebagai primer yang akan berikatan dengan bagian (*sites*) komplemennya. Metode RAPD digunakan untuk mendeteksi polimorfisme DNA yang digunakan sebagai genetik marker dan menentukan hubungan kekerabatan pada bermacam-macam tanaman dan serangga hama.

RAPD diistilahkan oleh William *et al.*, (1990) untuk menghasilkan berjuta-juta kopi segmen DNA tertentu. Metode ini mengandalkan menggunakan primer tunggal (oligo nukleotida sintetik) untuk mulai PCR. Istilah random agak kurang tepat, hanya komponen *random* dimulainya pilihan primer untuk PCR, karena primer tunggal memilih secara *random* daerah-daerah genom urutan DNA tertentu untuk amplifikasi dan biasanya ditemukan dalam kisaran ukuran DNA 0,1 dan 3 kb

William *et al.*, (1990) dalam Vierling *et al.* berhasil melakukan amplifikasi segmen DNA dengan menggunakan primer tunggal dekanukleotida berisi basa GC sebanyak 50% atau lebih dengan urutan basa yang terdistribusi acak. Penemuan ini dikenal sebagai penanda RAPD. Primer yang berukuran pendek menempel pada daerah penempelan primer yang tersebar acak pada daerah sepanjang DNA genom. Polimorfisme di daerah tersebut menghasilkan perbedaan amplifikasi. Welsh *et al.*, (1990) menyatakan bahwa larik DNA yang dihasilkan dapat digunakan sebagai penanda molekul karena pola yang dihasilkan memiliki karakteristik tertentu.

Teknik RAPD melibatkan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pilihan awal primer merupakan variabel utama untuk menentukan apa dan berapa banyak variasi genetik yang diidentifikasi. Amplifikasi DNA dengan PCR menghasilkan banyak kopi segmen DNA. Pekerjaan ini menggunakan primer sintetik yang ukurannya pendek (oligonukleotida) adalah urutanurutan nukleotida yang dikenali oleh primer yang selanjutnya ini disebut lokus RAPD. Produk amplifikasi yang dihasilkan dapat dipisahkan menurut ukurannya secara

elektroforesis pada gel agarosa dan divisualisasi melalui pewarnaan dengan etidium bromide. Primer tunggal ini akan menginisiasi proses amplifikasi daerah-daerah DNA genom tertentu secara random.

Kunci RAPD bahwa primer yang digunakan dengan urutan acak, primer tidak spesifik untuk gen tertentu atau dengan urutan tertentu dan mengikat DNA komplementernya dari bermacam-macam specimen DNA. Primer yang digunakan tunggal dan menganealing tempat pelekatan primer (*priming site*) dengan arah yang berlawanan untuk terjadinya amplifikasi.

Primer menentukan daerah genom mana yang akan diamplifikasi melalui PCR. Walaupun faktor lain pada metoda ini termasuk waktu denaturasi, waktu extension dapat mempengaruhi banyak hasil, Urutan primer yang digunakan dalam analisis ini panjangnya dapat bervariasi, kadang dipakai sebagai standar universal. Primer 10 mer paling sering digunakan.

Tergantung pada daerah pelekatan primer yang komplemen yang dicampuri pada genom individu tersebut dan panjangnya urutan DNA yang diintervensi, primer mengamplifikasi 0 sampai 30 produk amplifikasi. Beratus-ratus primer RAPD tersedia secara komersial dari *Tekhnologi Operon Inc.* Banyak penanda polimorfisme bisa diidentifikasi. Spesies yang berbeda dapat menunjukkan tingkat polimorfisme yang berbeda, sebanding dengan variasi lokus RAPD dan jumlah lokus yang diamplifikasi.

PCR adalah suatu tehnik amplifikasi fragmen DNA secara in vitro, atau disebut juga dengan reaksi rantai polimerase. Sebenarnya PCR hampir sama dengan replikasi DNA secara in vivo yang bersifat semi konservatif.

## **2.6. Seleksi Primer**

Primer *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) adalah sekuens DNA yang komplemen terhadap sekuens yang akan diamplifikasi, terutama dalam reaksi berantai *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Primer adalah molekul oligonukleotida untai tunggal yang terdiri atas sekitar 30 basa. Batasannya, primer ini akan menempel pada kedua ujung sekuens DNA yang ingin diamplifikasi dengan arah yang berkebalikan. Dalam satu reaksi berantai polimerase digunakan dua primer,

yaitu primer maju (*forward*) dan primer mundur (*reverse*) yang bekerja berlawanan arah. Molekul primer dapat berupa molekul DNA, sRNA, atau bahkan protein spesifik (Joshni *et al*, 2012).

Primer biasanya terdiri dari 10-20 nukleotida dan dirancang berdasarkan daerah konservatif dalam genom tersebut. Makin panjang primer, makin spesifik daerah yang teramplifikasi. Jika satu kelompok organisme memang berkerabat dekat, maka primer dapat digunakan untuk mengamplifikasi daerah tertentu yang sama dalam kelompok genom tersebut. Beberapa faktor seperti konsentrasi DNA contoh, ukuran panjang primer, komposisi basa primer, konsentrasi ion Mg, dan suhu hibridisasi harus dikontrol dengan hati-hati agar dapat diperoleh pita-pita DNA yang utuh dan baik (Suryanto, 2003).

Kegiatan seleksi primer dilakukan untuk mencari primer acak yang menghasilkan penanda polimorfik, baik dari jelasnya pita polimorfik yang dihasilkan maupun jumlah polimorfik lokus yang diperoleh. Optimalisasi primer dengan cara membuat beberapa reaksi PCR terhadap semua primer yang ada pada beberapa kondisi yang berbeda dan menggunakan beberapa sampel DNA yang sama, sehingga dapat diketahui kondisi optimum serta tingkat polimorfisme (variasi yang dihasilkan setiap primer) (Haryanti *et al*, 2007).