

SKRIPSI

**SELEKSI PRIMER
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) SEBAGAI
LANGKAH AWAL STUDI KERAGAMAN GENETIK
UNTUK TANAMAN KARET (*Hevea brasiliensis*)**

Disusun dan diajukan oleh

MUH. YUSRIL SURYAMSYAH

M111 16 308



PROGRAM STUDI KEHUTANAN

FAKULTAS KEHUTANAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2022

LEMBAR PENGESAHAN

SELEKSI PRIMER *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)*
SEBAGAI LANGKAH AWAL STUDI KERAGAMAN GENETIK UNTUK
TANAMAN KARET (*Hevea brasiliensis*)

Disusun dan diajukan oleh

MUH YUSRIL SURYAMSYAH

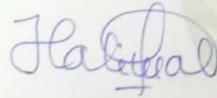
M111 16 308

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Kehutanan Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin pada tanggal 11 Agustus 2022 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

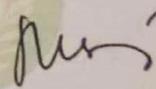
Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping

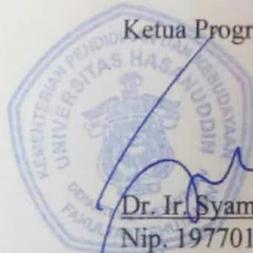


Dr. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P
Nip. 19820209 201504 2 002



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

Ketua Program Studi,




Dr. Ir. Syamsu Rijal, S.Hut., M.Si., IPU
Nip. 19770108 200312 1 003

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Muh Yusril Suryamsyah
NIM : M111 16 308
Program Studi : Kehutanan
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

“Seleksi Primer *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) Sebagai Langkah Awal Studi Keragaman Genetik Untuk Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis*)”

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan 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, 11 Agustus 2022

Yang menyatakan


Muh. Yusril Suryamsyah

ABSTRAK

Muh. Yusril Suryamsyah (M111 16 308). Seleksi Primer *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) Sebagai Langkah Awal Studi Keragaman Genetik Untuk Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis*) di bawah bimbingan Siti Halimah Larekeng dan Gusmiaty.

Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis*) merupakan tanaman perkebunan yang menghasilkan getah sebagai hasil hutan bukan kayu serta dapat menghasilkan kayu sebagai produk untuk industri *furniture*. Permasalahan yang sering ditemukan di perkebunan karet rakyat adalah rendahnya produktivitas tanaman karet akibat serangan penyakit tanaman sehingga peningkatan kualitas tanaman ini perlu dilakukan melalui pemanfaatan keragaman genetik dengan melakukan seleksi primer menggunakan penanda RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan primer RAPD yang dapat menghasilkan pita polimorfik pada tanaman karet yang ada di tegakan Karet Desa Pattiroang, Kec. Kajang, Kab. Bulukumba. Metode yang digunakan yaitu dengan metode isolasi CTAB, uji kualitas DNA, elektroforesis, dokumentasi dan seleksi primer hasil amplifikasi dari penanda RAPD. Hasil seleksi primer pada dokumentasi yang telah dilakukan pada 10 primer RAPD menunjukkan 6 primer yang dapat menghasilkan pita polimorfik yang dapat digunakan lebih lanjut untuk analisis keragaman genetik.

Kata Kunci : Marka Molekuler, RAPD, Seleksi Primer, Tanaman Karet

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas berkat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul “Seleksi Primer *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) Sebagai Langkah Awal Studi Keragaman Genetik Untuk Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis*)”. Shalawat dan salam juga penulis panjatkan kepada Baginda Rasulullah SAW yang menjadi pedoman bagi seluruh umatnya.

Penghargaan dan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Ayah **Syahiruddin** dan Ibu **Sukmawati Jamal** karena telah membesarkan penulis dan selalu melindungi serta menyayangi penulis dimanapun penulis berada. Terima kasih juga untuk saudaraku **Muh. Naufal Fauzan** dan **Muh. Hilmi Raihansyah** atas doa dan dukungan yang selama ini.

Terselesaikannya skripsi ini tidak terlepas dari bantuan banyak pihak mulai dari penelitian kultur jaringan, mikroba dan molekuler sehingga banyak ilmu dan pengalaman penulis yang didapatkan, Maka 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 **Prof. Dr. Ir. H. Muhammad Restu, M.P** dan bapak **Chairil A., 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 **Dr. Ir. Syamsu Rijal, S.Hut.,M.Si.,IPU** selaku dosen pembimbing akademik penulis selama penulis menempuh pendidikan sampai selesai.
6. Kak **Iswanto, S.Hut., M.Si., 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.**, Kak **Aminah, Jusri S.Hut, M.Si., Atisa Muslimin, S.Hut., Putra Aruri Abdillah Bakri S.Hut, Syamsumarlin, Nurul Musdalifah S.Hut, Sulastri Indriani S.Hut, Sukriati Andesti Lamanda S.Hut, Nasrah Mawaddah S.Hut**, serta seluruh kakak, teman, dan adik-adik dilab biotek yang telah memberikan dukungan dan membantu penulis selama penyusunan skripsi.
8. Terima kasih untuk **Fahmi, Priyo, Yusran, Irham, Baso, Maman dan Akbar** atas support yang selalu diberikan kepada penulis.
9. Terima kasih untuk teman-teman **LIGNUM** angkatan 2016 karena 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, 11 Agustus 2022

Muh. Yusril Suryamsyah

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUDL.....	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 Tanaman Karet (<i>Hevea brasiliensis</i>).....	4
2.1.1 Sistematika.....	4
2.1.2 Morfologi	4
2.1.3 Fenologi	5
2.1.4 Sebaran dan Tempat Tumbuh	6
2.2 Uji Kualitas DNA.....	6
2.3. Penanda Genetik.....	7
2.4. RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>).....	8
2.5 Seleksi Primer.....	10
III. METODOLOGI PENELITIAN.....	11
3.1 Waktu dan Tempat	11
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	11
3.3 Prosedur Penelitian.....	11
3.3.1. Pengambilan Sampel.....	11
3.3.2. Isolasi DNA	12

3.3.3.	Uji Kualitas DNA	13
3.3.4.	Seleksi Primer	13
3.3.5.	Elektroforesis	14
3.4	Analisis Data RAPD	15
IV.	KEADAAN UMUM LOKASI	16
4.1	Desa Pattiroang.....	16
4.1.1	Letak	16
4.1.2	Kondisi Lokasi Penelitian.....	16
4.1.3	Peta Lokasi Sampel Tanaman Karet di Desa Pattiroang	17
V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	18
5.1	Kualitas DNA Karet	18
5.2	Seleksi Primer.....	19
VI.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	28
6.1	Kesimpulan.....	28
6.2	Saran	28
	DAFTAR PUSTAKA	29
	LAMPIRAN.....	33

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
Tabel 1.	Nama Primer dan Sekuen Primer RAPD	14
Tabel 2.	Nama Primer RAPD dan Hasil Amplifikasi DNA Karet.....	20
Tabel 3.	Nama Primer RAPD dan Suhu Terpilih DNA Karet.....	26

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
Gambar 1.	Proses Seleksi Primer RAPD	15
Gambar 2.	Peta Lokasi Pengambilan Sampel Penelitian Tanaman Karet	17
Gambar 3.	Elektroforegram Hasil Uji Kualitas DNA Karet	18
Gambar 4.	Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR primer OPG-06	21
Gambar 5.	Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR primer OPA-05	21
Gambar 6.	Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR primer OPG-19	22
Gambar 7.	Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR primer OPK-20	22
Gambar 8.	Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR primer OPY-09	23
Gambar 9.	Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR primer OPA-02	23
Gambar 10.	Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR primer OPAE-11	24
Gambar 11.	Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR primer OPP-08	25

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
Lampiran 1.	Dokumentasi alat yang digunakan.....	32
Lampiran 2.	Dokumentasi bahan yang digunakan.....	34
Lampiran 3.	Dokumentasi proses penelitian di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon.....	36
Lampiran 4.	Hasil elektroforesis keseluruhan primer RAPD.....	37
Lampiran 5.	Annealing temperatur DNA tanaman karet saat di PCR.....	41
Lampiran 6.	Koordinat titik pengambilan sampel tanaman karet.....	42

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis*) merupakan tanaman perkebunan yang penting, baik dalam konteks ekonomi masyarakat maupun sumber penghasil devisa non migas bagi negara (Subrata *et al.*, 2018). Tanaman karet dapat menghasilkan getah sebagai hasil hutan bukan kayu serta dapat menghasilkan kayu sebagai produk untuk industri *furniture*. Tanaman karet dengan umur 25-30 tahun biasanya sudah tidak produktif menghasilkan getah, sehingga kayu karet dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku perabotan rumah tangga, industri mebel, kayu bakar, dan bioenergi (Admojo *et al.*, 2018).

Indonesia mempunyai potensi untuk menjadi produsen utama karet dunia, apabila berbagai permasalahan utama yang dihadapi perkebunan karet dapat diatasi dan agribisnisnya dikembangkan serta dikelola secara baik (Damanik, 2012). Permasalahan yang sering ditemukan di perkebunan karet rakyat adalah rendahnya produktivitas tanaman karet akibat serangan penyakit tanaman. Program pemuliaan tanaman karet diharapkan akan memperoleh beberapa genotipe unggul berdaya hasil tinggi dengan tingkat adaptasi tanaman yang lebih luas terutama pada daerah-daerah yang memiliki lingkungan spesifik dan endemik dari berbagai macam penyakit yang menyerang tanaman karet (Sayurandi, 2012).

Pemuliaan tanaman merupakan suatu metode yang mengeksploitasi potensi genetik tanaman untuk memaksimalkan ekspresi dari potensi genetik tanaman pada suatu kondisi lingkungan tertentu (Azrai, 2005). Kendala utama dalam mencapai kualitas hasil karet yang lebih tinggi salah satunya adalah kurangnya informasi tentang variabilitas genetik. Oleh karena itu, peningkatan kualitas tanaman ini perlu dilakukan melalui pemanfaatan keragaman genetik yang tersedia. Evaluasi keragaman genetik dan konstruksi peta keterkaitan akan meningkatkan efisiensi penggunaan variasi genetik dalam program pemuliaan (Tangapo *et al.*, 2013).

Keragaman genetik dapat dianalisis dengan menggunakan beberapa penanda molekuler. Penanda molekuler didefinisikan sebagai segmen DNA tertentu yang mewakili perbedaan pada tingkat genom. DNA merupakan sumber informasi genetik yang potensial dan akurat. DNA ditemukan dalam hampir semua sel semua organisme, baik pada jaringan hidup maupun yang mati. Penanda molekuler DNA tersebut dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu, penanda DNA tanpa PCR (*non-PCR based techniques*) seperti RFLP dan penanda DNA berdasarkan PCR yang meliputi RAPD, AFLP, SSR, CAPS, SCAR, SSCP dan DNA Barkoding (Zulfahmi, 2013).

Penanda molekuler berdasarkan PCR dengan penanda RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) merupakan salah satu metode yang banyak digunakan di Indonesia. Teknik RAPD memiliki keunggulan diantaranya adalah murah dan relatif mudah dilakukan karena hanya memerlukan sejumlah kecil DNA. Penggunaan penanda RAPD memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang diseleksi dengan menggunakan satu primer bersifat acak (Siregar, 2012).

Penelitian keragaman genetik telah dilakukan pada beberapa jenis tanaman, seperti mahoni (*Swietenia mahagoni*) (Iswanto, 2016), Bambu (*Bambusa sp.*) (Fitriani, 2019) dan Pinus (*Pinus sp.*) (Sulo, 2021) dengan menggunakan primer RAPD. Jenis Tanaman karet telah dilakukan penelitian dengan menggunakan primer SSR asal Pusat Penelitian Karet, PT Riset Perkebunan Nusantara oleh Budiani (2014), informasi terkait keragaman genetik dengan menggunakan penanda RAPD pada tanaman karet juga sudah dilakukan oleh Daslin (2012), namun untuk analisis keragaman genetik karet di Desa Pattiroang, Kec. Kajang, Kab. Bulukumba belum pernah dilakukan sehingga perlu dilakukan penelitian keragaman genetik di provenansi tersebut. Langkah awal untuk analisis keragaman genetik yaitu seleksi primer RAPD untuk menentukan primer RAPD yang bisa digunakan dan sebagai informasi dasar dalam pemuliaan tanaman karet yang berbasis penanda molekuler RAPD.

1.2. Tujuan dan Kegunaan

Tujuan dari penelitian ini untuk menentukan primer RAPD yang dapat menghasilkan pita polimorfik pada tanaman karet yang ada di tegakan Tanaman Karet Desa Pattiroang, Kec. Kajang, Kab. Bulukumba. Kegunaan penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi dan rujukan mengenai uji keragaman genetik karet menggunakan penanda RAPD.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis*)

2.1.1 Sistematika

Klasifikasi Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis*) menurut (Sofiani *et al.*, 2018) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: <i>Hevea</i>
Spesies	: <i>Hevea brasiliensis</i>

Tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) termasuk dalam famili Euphorbiaceae, disebut dengan nama lain rambung, getah, gota, kejai ataupun hapea. Kegunaan Tanaman karet sendiri sangat banyak dalam dunia industri. Salah satunya penggunaan industri ban otomotif yang memiliki durasi penggunaan yang pendek sehingga menyebabkan produksi karet terus mengalami peningkatan (Damanik *et al.*, 2010).

2.1.2 Morfologi

Tanaman karet merupakan tanaman tahunan yang tumbuh tinggi dan berbatang cukup besar, tinggi pohon dewasa mencapai 15 – 25 m, tegak, kuat, berdaun lebat dan dapat mencapai umur 100 tahun. Biasanya tumbuh lurus memiliki percabangan yang tinggi di atas. Dibeberapa kebun karet ada kecondongan arah tumbuh tanamannya agak miring ke utara. Batang tanaman ini mengandung getah yang dikenal dengan nama lateks. Daun karet berwarna hijau,

daun ini ditopang oleh daun utama dan tangkai anak daunnya antara 3-10 cm. Pada setiap helai terdapat tiga helai anak daun. Daun tanaman karet akan menjadi kuning atau merah pada saat musim kemarau (Sofiani *et al.*, 2018).

Akar tanaman karet merupakan akar tunggang. Akar ini mampu menopang batang tanaman yang tumbuh tinggi dan besar. Akar tunggang dapat menunjang tanah pada kedalaman 1-2 m, sedangkan akar lateralnya dapat menyebar sejauh 10 m. Bunga karet terdiri dari bunga jantan dan betina. Pangkal tenda bunga berbentuk lonceng. Pada ujungnya terdapat lima taju yang sempit. Panjang tenda bunga 4-8 mm. Bunga betina merambut vilt. Ukurannya lebih besar sedikit dari yang jantan dan mengandung bakal buah yang beruang 3. Kepala putik yang akan dibuahi dalam posisi duduk juga berjumlah 3 buah. Bunga jantan mempunyai 10 benang sari yang tersusun menjadi suatu tiang. Kepala sari terbagi dalam 2 karangan, tersusun satu lebih tinggi dari yang lain. Paling ujung adalah suatu bakal buah yang tidak tumbuh sempurna (Sofiani *et al.*, 2018).

Tanaman Karet merupakan buah berpolong (diselaputi kulit yang keras) yang sewaktu masih muda buah berpaut erat dengan dengan rantingnya. Buah karet dilapisi oleh kulit tipis berwarna hijau dan didalamnya terdapat kulit yang keras dan berkotak. Tiap kotak berisi sebuah biji yang dilapisi tempurung, setelah tua warna kulit buah berubah menjadi keabu-abuan dan kemudian mengering (Sofiani *et al.*, 2018).

2.1.3 Fenologi

Tanaman Karet adalah tanaman berumah satu (*monoceus*). Pada satu tangkai bunga yang berbentuk bunga majemuk terdapat bunga betina dan bunga jantan. Penyerbukan dapat terjadi dengan penyerbukan sendiri atau penyerbukan silang, pohon karet mulai berbunga pada umur ± 7 tahun, dalam pertumbuhan karet diketahui bahwa menjelang berakhirnya musim hujan, daun-daunnya mulai berguguran. Setelah selesai gugur daun pada ranting-ranting, mulai keluar kuncup-kuncup baru bersamaan dengan mulainya pembungaan. Musim pembungaan pada tanaman karet terjadi setelah musim gugur daun. Periode pembungaan dalam satu tahu terjadi dua kali yaitu musim besar (bunga pertama) dan musim kecil (bunga kedua) (Wiratama, 2019).

2.1.4 Sebaran dan Tempat Tumbuh

Tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) berasal dari negara Brazil. Sesuai habitat aslinya di Amerika Selatan, terutama Brazil yang beriklim tropis, maka karet juga cocok ditanam di Indonesia, yang sebagian besar ditanam di Sumatera Utara dan Kalimantan. Tanaman karet memerlukan curah hujan optimal antara 2.000 - 2.500 mm/tahun dengan hari hujan berkisar 100 s/d 150 HH/tahun. Daerah yang cocok adalah pada zone antara 150 LS dan 150 LU, dengan suhu harian 25 - 30°C. Tanaman karet tumbuh optimal pada dataran rendah dengan ketinggian 200 m – 400 m dari permukaan laut (dpl). Sifat-sifat tanah yang cocok pada umumnya aerasi dan drainase cukup, tekstur tanah remah, struktur terdiri dari 35% tanah liat dan 30% tanah pasir, kemiringan lahan <16% serta permukaan air tanah < 100 cm (Damanik *et al.*, 2010).

2.2 Uji Kualitas DNA

Uji kualitas DNA merupakan metode standar yang digunakan untuk identifikasi, pemisahan dan purifikasi fragmen DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa. Kualitas DNA juga merupakan komponen yang cukup berpengaruh dalam amplifikasi DNA pada proses PCR, DNA dengan kualitas yang baik merupakan DNA yang tidak mengalami kontaminasi dari komponen-komponen lain dari sel (Nurislami, 2021). Uji kualitas DNA juga dapat memberikan informasi tentang seberapa banyak DNA yang akan digunakan dalam proses PCR.

Pentingnya uji kualitas pada DNA tanaman adalah untuk memberikan informasi terhadap pita DNA tanaman yang dihasilkan dengan menggunakan *Gel doc*. Uji kualitas DNA dengan metode elektroforesis gel agarose bertujuan untuk mengetahui baik dan tidaknya DNA setelah proses isolasi DNA. Sedangkan fragmen DNA yang tampak pada gel memiliki pita yang bervariasi yaitu memiliki pita yang tebal, terang, serta terlihat *smear* pada beberapa sampel. Munculnya *smear* pada pita DNA dikarenakan ada materi lain yang ikut terisolasi sehingga menyebabkan munculnya *smear* di bawah pita DNA pada gel. *Smear* merupakan sisa dari larutan-larutan yang masih terbawa selama proses isolasi atau juga dapat berupa DNA yang terdegradasi pada proses isolasi. Penentuan metode yang tepat

dapat memberikan hasil yang optimal pada jenis tanaman yang akan di uji (Nirawati, 2021).

Tingkat ketebalan pita yang bervariasi pada setiap sampel disebabkan oleh kualitas DNA hasil ekstraksi yang berbeda-beda pada setiap sampel sehingga sangat menentukan dalam tahapan PCR (Gusmiaty *et al.*, 2016). Pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh. Sedangkan, pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang dapat terjadi dalam proses pemipetan, pada saat dibolak-balik dalam ependorf, disentrifus, atau bahkan karena temperature yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu (Harahap, 2017).

2.3. Penanda Genetik

Penanda genetik merupakan urutan DNA yang dapat diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya. Urutan basa nukleotida yang beragam antar spesies dapat digunakan sebagai penanda spesifik yang memberikan pengetahuan mengenai hubungan filogenetik untuk mengatasi keraguan dalam sistematika (Sulo, 2021).

Penggunaan penanda molekuler berupa DNA (*Deoxyribonucleic acid*) digunakan seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan tentang biologi molekuler. Penanda DNA yang digunakan sejak tahun 1980-an, merupakan pendekatan untuk lebih meningkatkan informasi genetik yang belum dapat diperoleh dengan penanda protein. Kelebihan penanda DNA adalah dapat digunakan untuk jumlah yang tidak terbatas dan dapat mencakup seluruh genom tanaman, tidak dipengaruhi oleh regulasi perkembangan tanaman, serta memiliki kemampuan tinggi untuk menggambarkan keragaman karakter antar individu. Kelemahannya adalah masih membutuhkan biaya yang besar dibanding dengan analisis isozim dalam pemanfaatannya serta peralatan yang tersedia masih terbatas pada lembaga atau institusi tertentu (Langga *et al.*, 2012).

Penanda molekuler DNA terdapat dikelompokkan menjadi dua yaitu, pertama, penanda DNA tanpa PCR (*non-PCR based techniques*) seperti RFLP, kedua, penanda DNA berdasarkan PCR yang meliputi RAPD, AFLP, SSR, CAPS, SCAR, SSCP dan DNA Barkoding. PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA cetakan dengan bantuan enzim DNA Polymerase dan primer dalam suatu *thermocycler* (Zulfahmi, 2013).

Kekurangan dari penanda RFLP adalah membutuhkan DNA dengan kualitas tinggi sehingga perlu melakukan ekstraksi DNA dalam skala besar, relatif mahal, prosedurnya panjang dan menggunakan radioaktif. Terkait dengan keterbatasan tersebut, penanda RFLP tidak banyak digunakan dalam skala luas, sedangkan Teknologi PCR terus disederhanakan dan dikembangkan, sehingga biaya relatif rendah, kecepatan tinggi, membutuhkan contoh uji sangat sedikit, metode ekstraksi dan amplifikasi yang sederhana sehingga membuat penanda berdasarkan PCR dapat diaplikasikan pada semua spesies (Zulfahmi, 2013). Penanda molekuler yang banyak digunakan dalam analisis keragaman genetik 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 intraspesies maupun antarspesies (Langga *et al.*, 2012).

2.4. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Marka RAPD merupakan salah satu marka berbasis PCR dan data molekuler yang diperoleh mampu digunakan sebagai penanda DNA *fingerprinting*. Identifikasi dengan penggunaan marka molekuler dapat dilakukan pada fase awal pertumbuhan tanpa merusak spesies karena hanya membutuhkan sedikit sampel. RAPD sangat umum digunakan untuk menganalisis keragaman genetik pada berbagai spesies pohon (Gusmiaty *et al.*, 2016).

RAPD merupakan teknik pengujian polimorfisme DNA berdasarkan pada amplifikasi dari segmen-segmen DNA acak menggunakan primer tunggal yang sekuen nukleotidanya ditentukan secara acak. Teknik RAPD merupakan teknik penanda molekuler pengembangan dari teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

untuk mengetahui hubungan kekerabatan suatu spesies maupun kekerabatan atau keragaman genetik antar spesies (Murtiyaningsih, 2017).

RAPD digunakan untuk mengidentifikasi genotipe tumbuhan, karena memiliki kelebihan dalam pelaksanaan dan analisisnya. Dibandingkan dengan penanda DNA yang lain, seperti *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RELFP) dan *Simple Sequence Repeats* (SSR), 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 (Langga *et al.*, 2012).

Teknik RAPD tidak membutuhkan informasi awal tentang urutan basa suatu spesies. Yang diperlukan adalah DNA yang relatif murni dan dalam jumlah yang relatif kecil dibandingkan RFLP. Oleh karenanya RAPD dapat diterapkan pada hampir semua jenis tanaman (Langga *et al.*, 2012). Pemilihan primer pada analisis RAPD berpengaruh terhadap polimorfisme pita yang dihasilkan karena setiap primer memiliki situs penempelan tersendiri, akibatnya 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. 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 (Gusmiaty *et al.*, 2016).

Salah satu keuntungan pemakaian analisis keragaman genetik tanaman dengan menggunakan teknik molekuler yang memanfaatkan teknologi amplifikasi PCR adalah kuantitas DNA yang diperlukan hanya sedikit. Disamping itu, dalam pelaksanaan teknik RAPD tingkat kemurnian DNA yang dibutuhkan tidak perlu terlalu tinggi, atau dengan kata lain teknik amplifikasi PCR relatif toleran terhadap tingkat kemurnian DNA (Tobing, 2014).

Muncul atau tidaknya pita pada setiap primer berpengaruh terhadap konsentrasi primer yang juga berpengaruh terhadap intensitas produk PCR-RAPD. Konsentrasi primer yang terlalu rendah atau terlalu tinggi menyebabkan tidak terjadinya amplifikasi. Rasio yang rendah antara primer dan DNA cetakan dapat menyebabkan produk RAPD yang dihasilkan tidak konsisten. Pita yang

muncul memiliki ukuran basa dan intensitas yang bervariasi. Perbedaan intensitas pita DNA dipengaruhi oleh sebaran situs penempelan primer pada genom, kemurnian dan konsentrasi genom dalam reaksi. Banyaknya pita yang dihasilkan oleh setiap primer tergantung pada sebaran situs homolog pada genom (Simbolon *et al.*, 2017).

2.5 Seleksi Primer

Seleksi primer RAPD dilakukan setelah dilakukan dokumentasi foto pada alat *Geldoc*. Primer yang baik digunakan untuk RAPD adalah primer yang memiliki kandungan basa G+C antara 60%-70%. Basa G dan C tersebut akan membentuk ikatan hidrogen rangkap tiga dengan basa komplementernya, sehingga dapat mengikat kuat pada urutan DNA target sepanjang genom (Widyatmoko *et al.*, 2010). Primer RAPD terdiri dari 10 basa nukleotida yang digunakan untuk mengawali situs pemanjangan DNA pada proses PCR.

Primer RAPD bisa saja tidak terjadi amplifikasi karena sifat DNA yang spesifik. Primer hanya akan menempel pada bagian DNA *single strand* yang cocok urutannya. DNA yang ditempel primer akan menjadi DNA template dan berlipat jumlahnya sesuai banyak siklus yang dilakukan (amplifikasi) (Adeputri *et al.*, 2016). Alasan masing-masing primer memiliki situs penempelan yang berbeda yang menyebabkan intensitas pita serta jelas atau tidaknya pita pada setiap primer beragam.

Kriteria primer yang dapat digunakan untuk analisis RAPD adalah primer yang dapat menghasilkan pita-pita polimorfik, pita-pita yang dihasilkan jelas, reproduksibilitas baik, hasil amplifikasi pita DNA relatif stabil, dan mudah dibaca (Hartati *et al.*, 2007). Hasil seleksi primer kemudian dapat dilanjutkan untuk analisis keragaman genetik.