

SKRIPSI

**DETEKSI GEN 4CL UNTUK KARAKTER LIGNIN
DAN AMPLIFIKASI PRIMER *INDELS* PADA KAYU
KEMIRI (*Aleurites moluccana*)**

Disusun dan diajukan oleh :

ADE FIRNA

M011181044



**PROGRAM STUDI KEHUTANAN
FAKULTAS KEHUTANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

LEMBAR PENGESAHAN
DETEKSI GEN 4CL UNTUK KARAKTER LIGNIN
DAN AMPLIFIKASI PRIMER *INDELS* PADA KAYU
KEMIRI (*Aleurites moluccana*)

ADE FIRNA
M011 18 1044

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Kehutanan
Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin

Pada tanggal 10 Oktober 2022

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Syahidah, S.Hut., M.Si., Ph.D
NIP. 19700815200501 2 001

Dr. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P
NIP. 19820209 201504 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 : Ade Firma
NIM : M011 18 1044
Program Studi : Kehutanan
Jenjang : S1

Dengan ini menyatakan bahwa karya tulisan saya berjudul

“Deteksi Gen 4CL untuk Karakter Lignin dan Amplifikasi Primer *InDels* pada Kayu Kemiri (*Aleurites moluccana*)”

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, 11 Oktober 2022

Yang menyatakan

Ade Firma

ABSTRAK

Ade Firna (M011 18 1044) Deteksi Gen 4CL untuk Karakter Lignin dan Amplifikasi Primer *InDels* pada Kayu Kemiri (*Aleurites moluccana*) di bawah bimbingan Syahidah dan Siti Halimah Larekeng.

Kayu kemiri (*Aleurites moluccana*) adalah salah satu jenis tanaman yang umumnya ditanam di hutan tanaman rakyat dan menjadi alternatif untuk memenuhi kebutuhan kayu masyarakat. Disisi lain, kayu tersebut memiliki kualitas yang rendah dan akan berpengaruh pada umur pakai kayu. Kayu kemiri tergolong kelas kuat IV dan kelas awet IV – V. Upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kualitas kayu adalah dengan melakukan inovasi dalam menyediakan bibit yang bagus, melakukan perawatan tanaman serta memberikan perlakuan pada kayu. Salah satu cara yang dapat dilakukan yaitu dengan melakukan tindakan deteksi dan aplikasi peningkatan lignin. Kadar lignin yang tinggi mampu memberikan tambahan serta meningkatkan kekuatan dan keawetan kayu. Diketahui beberapa induksi gen yang berkaitan dengan biosintesis lignin, seperti 4CL, PAL, C4H, F5H, CAD, dan CCR serta InDel sebagai penanda yang efektif melalui pendekatan teknik molekuler. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan gen 4CL dan amplifikasi primer InDel pada DNA kayu kemiri. Metode yang digunakan yaitu analisis molekuler dengan menggunakan KIT isolasi DNA Dneasy (Geneaid), pengujian kuantitas dan kualitas DNA serta amplifikasi primer. Hasil penelitian menunjukkan adanya pita yang teramplifikasi pada kombinasi primer 4CL 1 dan 4CL 3, InDel 1 serta InDel 3. Amplifikasi dari primer tersebut menghasilkan suhu annealing yang berkisar 54.7°C hingga 63.7°C sehingga dapat dilanjutkan untuk proses sekuensing.

Kata Kunci : 4CL (4-coumarate: Coenzyme A ligase), Biosintesis Lignin, Deteksi Gen, Insertion-Deletions, Tanaman Kemiri

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul “Deteksi Gen 4CL untuk Karakter Lignin dan Amplifikasi Primer *InDels* pada Kayu Kemiri (*Aleurites moluccana*)”. Shalawat dan salam juga penulis panjatkan kepada Baginda Rasulullah SAW yang menjadi pedoman bagi seluruh umatnya.

Terselesaikannya skripsi ini tidak terlepas dari bantuan banyak pihak, karena itu pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada 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. Kedua orangtua saya, Ibunda **Hj. Jumriah** dan Ayahanda **Naharuddin** yang tanpa henti-hentinya memanjatkan do'a, memberikan semangat dan selalu bekerja keras untuk anak-ananya sehingga dapat bersekolah serta menuntut ilmu agar menjadi orang yang berguna.
2. Kerabat keluarga dan saudari-saudariku tercinta **Ade Irma Naharuddin** dan **Ade Lia** serta keponakanku **Ahmad Hanan Maulana** yang turut mendukung dan memberikan semangat selama ini.
3. Ibu **Syahidah, S.Hut., M.Si., Ph.D** selaku pembimbing utama dan Ibu **Dr. Ir. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P** selaku pembimbing anggota yang dengan tulus membimbing, memberikan arahan dan petunjuk, saran, motivasi serta nasehat selama persiapan, pelaksanaan penelitian hingga sampai ke tahap penyusunan skripsi. Semoga tetap dalam keadaan yang sehat dan sukses selalu Ibu.
4. Ibu **Gusmiaty, S.P., M.P** dan Bapak **Dr. Ir. A. Sadapotto, M.P.** selaku penguji yang telah memberikan masukan dan saran-saran guna penyempurnaan skripsi ini.

5. Ibu **Dr. Risma Illa Maulany, S.Hut., M.NatRest.** selaku dosen pembimbing akademik yang banyak memberikan nasehat dan arahan selama penulis menempuh pendidikan sampai selesai.
6. Kak **Iswanto, S.Hut., M.Si.**, kak **Atisa Muslimin, S.Hut.**, dan Kak **Heru Arisandi, S.T.** yang telah bersedia membantu penulis selama melaksanakan penelitian di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon hingga skripsi ini selesai.
7. Terima kasih untuk **Nur Khofifah Ramdani Sri Putri, Wulandari Ramadani H., Nurul Azila, S.Hut., Della Safira P., Ade Audina Z., Novi Juliyanti, Lia Kerang, dan Besse Sri Putri W.** yang telah memberikan dukungan dan membantu penulis selama penyusunan skripsi.
8. Terima kasih untuk **Fitriaseh, S.Hut., Rika Faradhillah, S.Hut., Andi Nilla Gading, Husnul Hatimah., Alfi Syahriani H., Musdalifah, Lismayani S.Hut., Hesty Pratiwi P. S.Hut., Kurnia Ismail, S.Hut., Selvianty, Andi Wafiqah M. S.Hut., Firdayanti, Sri Wahyuni, dan Nurul Azila, S.Hut** yang telah memberikan dukungan dan membantu penulis selama penyusunan skripsi.
9. Teman-teman **Magang BPTH Wilayah II PP Maros** yang telah memberikan dukungan dan membantu penulis selama penyusunan skripsi.
10. Teman-teman Laboratorium Bioteknologi khususnya **Yusril Suryamsyah, S.Hut., Putra Aruri Abdillah Bakri S.Hut., Andi Mustainah Rusli, S.Hut., Wardah Wahyuni** yang telah memberikan dukungan dan membantu penulis selama penyusunan skripsi.
11. **Keluarga Besar Laboratorium Pemanfaatan dan Pengelolaan Hasil Hutan** serta **Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon Fakultas Kehutanan** yang telah memberikan dukungan dan membantu penulis selama penyusunan skripsi.
12. Terima kasih untuk teman-teman **SOLUM** angkatan 2018, terima kasih atas kerjasamanya dan semangat yang kalian berikan kepada penulis dalam menyelesaikan kuliah di Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin.

13. Terima kasih untuk teman-teman **HIPERMAWA** terkhusus **Nur Sakinah Yunus** yang telah memberikan dukungan dan membantu penulis selama penyusunan skripsi.
14. Terima kasih untuk member **EXO** terkhusus **Oh Sehun** yang selama ini telah menemani penulis menghilangkan kejenuhan dalam penyusunan skripsi.
15. *Last but not least, I wanna thank me, I wanna thank me for believing in me, I wanna thank me for doing all this hard work, I wanna thank me for having no days off, I wanna thank me for, for never quitting.*

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak terdapat kekurangan. Oleh karena itu, penulis sangat 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 skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca khususnya pada mahasiswa. Mohon maaf atas segala kesalahan dan kekeliruan dalam penulisan ini. Wassalamualaikum wr. wb.

Makassar, 11 Oktober 2022

Ade Firna

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan dan Kegunaan	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Kayu Kemiri	3
2.2 Manfaat Kayu Kemiri	3
2.3 Komponen Kimia pada Kayu Kemiri	4
2.4 Lignin	5
2.5 Biosintesis Lignin	6
2.6 <i>Insertion-Deletion (InDel)</i>	7
2.7 DNA (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)	8
2.8 Ekstraksi DNA	9
2.9 Amplikasi DNA	9
2.10 Elektroforesis	11
III. METODOLOGI PENELITIAN	12
3.1 Waktu dan Tempat	12
3.2 Alat dan Bahan	12
3.3 Prosedur Penelitian	12
3.3.1 Pengambilan Sampel	12
3.3.2 Isolasi DNA	13
3.3.3 Uji Kualitas DNA	14

3.3.4 Uji Kuantitas DNA.....	15
3.3.5 Elektroforesis	15
3.4 Analisis Data Molekuler.....	15
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Isolasi DNA Tanaman Kayu Kemiri	17
4.2 Uji Kualitas DNA	17
4.3 Uji Kuantitas DNA	19
4.4 Amplifikasi Primer Spesifik Gen 4CL terhadap DNA Kemiri.....	20
4.5 Amplifikasi Primer <i>InDels</i> Pada DNA Kayu Kemiri	21
V. KESIMPULAN DAN SARAN	24
5.1 Kesimpulan.....	24
5.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN.....	29

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
Tabel 1.	Hasil uji kuantitas DNA kemiri menggunakan alat Qubit 3.0 Flourometer	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
Gambar 1.	Diagram alur penelitian.....	16
Gambar 2.	Hasil pengujian kualitas DNA kemiri	18
Gambar 3.	Hasil amplifikasi primer spesifik gen 4CL terhadap DNA kemiri.....	20
Gambar 4.	Hasil amplifikasi primer <i>InDel</i> 1 terhadap koleksi DNA kayu kemiri .	22
Gambar 5.	Hasil amplifikasi primer <i>InDel</i> 3 terhadap DNA koleksi kayu kemiri .	22

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
Lampiran 1.	Dokumentasi Pengambilan Sampel	30
Lampiran 2.	Dokumentasi alat yang digunakan.....	31
Lampiran 3.	Dokumentasi bahan yang digunakan.....	34
Lampiran 4.	Dokumentasi proses penelitian di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon.....	36
Lampiran 5.	Tabel Suhu Annealing temperatur DNA kemiri saat di PCR.....	37

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kayu kemiri adalah salah satu jenis kayu yang umumnya ditanam di hutan tanaman rakyat. Kayu ini termasuk jenis pohon serbaguna, karena hampir seluruh bagiannya seperti kayu, daun, buah, kulit, akar, getah dan bunganya dapat dimanfaatkan (Yusran, 2002). Tanaman ini banyak ditemukan di Sulawesi Selatan, khususnya di Kabupaten Maros yang mencapai luas 9.200 ha.

Hutan kemiri rakyat menjadi alternatif untuk memenuhi kebutuhan kayu masyarakat. Namun, kayu tersebut memiliki kualitas yang rendah dan akan berpengaruh pada umur pakai kayu. Kayu kemiri tergolong kelas kuat IV dan kelas awet IV – V dengan berat jenis 0,3 - 0,6 kg/dm, kuat lentur 300 - 500 kg/cm², kuat tekan 215 - 300 kg/cm² (Paimin, 1997; Martawijaya, *et al.*, 2005; Asmawijaya, 2014). Kayu ini sangat mudah terserang jamur biru (*blue stain*) dan organisme perusak kayu lainnya. Kegunaan kayu tersebut terbatas untuk konstruksi karena tidak dapat menahan beban yang berat (Martawijaya, *et al.*, 2005; Suroto, 2009).

Upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kualitas kayu adalah dengan melakukan inovasi dalam menyediakan bibit yang bagus, melakukan perawatan tanaman serta memberikan perlakuan pada kayu. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kualitas kayu yaitu dengan melakukan tindakan overekspresi lignin (Indrajaya, 2013). Kandungan lignin dalam kayu berkontribusi besar untuk mendukung kekuatan mekanis batang dalam menahan beban dan dapat memberi kestabilan dimensi karena menempati ruang di dinding sel yang bisa diisi oleh air. Kadar lignin yang tinggi mampu memberikan tambahan serta meningkatkan kekuatan dan keawetan kayu (Verma, 2014).

Menurut Hartati (2016), overekspresi mengenai fungsi gen terkait biosintesis lignin dengan memanfaatkan teknik transgenesis yang bersifat meningkatkan ekspresi gen (overekspresi). Ekspresi gen merupakan suatu proses penerjemahan gen menjadi protein atau enzim (Nasir, 2002). Perkembangan teknik biologi molekuler memberikan sumbangan yang berarti untuk aplikasi teknologi DNA (*Deoxyribonucleic acid*) guna mengontrol biosintesis komponen

dinding sel tumbuhan termasuk lignin. Baru-baru ini Varian *InDel* telah diakui sebagai sistem penanda yang efektif untuk studi genomik dalam studi genetik pohon, penyisipan dan penghapusan (*InDels*), sebagai salah satu sumber utama varian genetik struktural (Yang *et al.*, 2014).

Penelitian substansi lignin telah menjelaskan jalur biosintesis lignin pada tanaman untuk menambahkan atau menurunkan jumlah total lignin dan/atau mengubah subunit monolignol dan meningkatkan efisiensi sakarifikasi. Overekspresi gen dapat meningkatkan aktivitas SPS (*Sucrose Phosphate Synthase*) dan kandungan sukrosa pada daun tanaman transgenik tembakau dan tebu (Sugiharto *et al.*, 2003; Miswar *et al.*, 2005). Studi molekuler mengenai enzim-enzim yang terkait dengan biosintesis lignin telah dimulai sejak tahun 1990-an dari tanaman model tembakau (*Nicotiana tabacum*) hingga tanaman berkayu seperti poplar (*Populus alba*) dan pinus (*Pinus taeda*). Diketahui beberapa induksi gen yang berkaitan dengan biosintesis lignin, seperti 4CL, PAL, C4H, F5H, CAD, dan CCR melalui pendekatan molekuler. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk mendeteksi keberadaan gen penyandi lignin 4CL dan amplifikasi primer *InDel* pada DNA kayu kemiri untuk peningkatan kualitas kayu.

1.2. Tujuan dan Kegunaan

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah antara lain yaitu;

1. Mendeteksi keberadaan gen 4CL sebagai gen penyandi lignin yang cocok untuk tanaman kemiri.
2. Amplifikasi primer *InDel* pada DNA kayu kemiri.

Penelitian ini berguna sebagai informasi lanjutan dalam identifikasi gen penyandi lignin yang dapat menjadi dasar bagi penelitian selanjutnya di dalam rekayasa biosintesis lignin.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kayu Kemiri

Kemiri (*Aleurites moluccana*) adalah tumbuhan yang bijinya dimanfaatkan sebagai sumber minyak dan rempah-rempah. Tumbuhan ini masih sekerabat dengan singkong dan termasuk dalam suku *Euphorbiaceae*. Kemiri tumbuh secara alami di hutan campuran dan hutan jati pada ketinggian 150-1000 m di atas permukaan laut tropis (Arlene *et al.*, 2010). Menurut (Noor *et al.*, 2014) kayu kemiri berwarna putih kekuning-kuningan dan tidak dapat dibedakan antara kayu gubal dan teras. Tekstur kayu agak kasar, arah serat lurus, kesan raba agak kesat, permukaan agak mengkilap.

Tanaman kemiri tidak begitu banyak menuntut persyaratan tumbuh, sebab dapat tumbuh di tanah-tanah kapur, tanah berpasir dan jenis tanah-tanah lainnya. Tanaman kemiri sekarang sudah tersebar luas di daerah-daerah tropis (Arlene, *et al.*, 2010). Penghasil kayu kemiri terluas di Sulawesi Selatan adalah Kabupaten Maros yang mencapai luas 9.200 ha. akan tetapi terdapat indikasi penurunan produksi kemiri dikarenakan 79% pohon kemiri atau sekitar 216 pohon/ha sudah berumur tua (rata-rata berumur 45 tahun) dan tidak produktif lagi (Yusran, 2002).

Klasifikasi tanaman kemiri yaitu (Tjitrosoepomo, 2010) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Archichlamydae
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: <i>Aleurites</i>
Species	: <i>Aleurites moluccana</i> (L.) Willd

2.2 Manfaat Kayu Kemiri

Kayu kemiri merupakan jenis pohon serbaguna karena, hampir seluruh bagian dari pohon kemiri seperti kayu, daun, buah, kulit, akar, getah dan bunganya dapat dimanfaatkan. Dalam pemanfaatannya, kayu kemiri dipengaruhi

oleh sifat-sifatnya. Secara teknis sifat-sifat kayu tersebut perlu dipahami dan diketahui sebelum kayu itu digunakan baik sebagai bahan bangunan maupun sebagai bahan baku industri, karena sifat-sifat tersebut pada dasarnya menimbulkan perubahan warna pada kayu sehingga sangat menentukan kualitas kayu bagi suatu peruntukan tertentu (Krisnawati *et al.*, 2011).

Menurut Asdar dan Mody (2006) kayu kemiri di Sulawesi Selatan umumnya digunakan untuk papan mal bangunan serta peti kemas dan sejak tahun 2004 mulai dimanfaatkan untuk pembuatan venir inti, tusuk gigi sumpit makan, peti, barang kerajinan (topeng dan wayang golek) dan mainan anak-anak. Selama ini kayu kemiri belum banyak dimanfaatkan secara maksimal oleh masyarakat dan pihak swasta, serta pada umumnya kayu kemiri digunakan oleh masyarakat untuk bahan bangunan dan kayu bakar. Berdasarkan sifat kayu kemiri dapat diiris atau dikupas tipis sehingga bisa dimanfaatkan sebagai kayu lapis terutama untuk bagian tengahnya dapat dijadikan papan, karena sifat kayunya yang ringan dapat dijadikan sebagai bahan kerajinan. Sehingga mampu meningkatkan nilai ekonomis maupun substitusi bagi kayu lainnya yang sering dijadikan bahan baku bangunan (Krisnawati *et al.*, 2011).

2.3 Komponen Kimia pada Kayu Kemiri

Kayu dari sudut kimia bukan merupakan zat tunggal, melainkan satu kelompok senyawa kompleks yang sifatnya belum diketahui. Komposisi kimia kayu dibedakan menjadi dua komponen yaitu makromolekul dan minor. Komponen makromolekul utama terdapat pada dinding sel yang terdiri atas selulosa, poliosa (hemiselulosa) dan lignin yang terdapat pada semua kayu, sedangkan komponen minor dengan berat molekul kecil, terdiri atas zat ekstraktif dan zat-zat mineral (Fengel dan Wegener, 1995).

Komponen kimia kayu di dalam sebuah kayu diketahui dapat digunakan untuk membedakan jenis-jenis kayu, menentukan pengerjaan dan pengolahan kayu, menentukan kegunaan suatu jenis kayu. Sel kayu utama terdiri atas selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Selulosa membentuk kerangka yang dikelilingi oleh senyawa-senyawa lain yang berfungsi sebagai matriks (hemiselulosa) dan bahan-bahan yang melapisi (lignin). Komponen kimia yang terkandung dalam kayu

kemiri adalah selulosa 44,4%, lignin 24,9%, pentosan 16,1%, serta abu 1,4% (Anwar, 2014).

Selulosa merupakan komponen kimia kayu yang terbesar dengan jumlah biasanya 40-50% dari berat kering kayu dan lokasi selulosa terbesar terdapat pada lapisan sekunder dinding sel. Sifat-sifat kimia dan fisika maupun struktur supramolekul selulosa berfungsi sebagai komponen struktural dinding serat bersama-sama dengan hemiselulosa dan lignin (Supartini, 2011). Abu merupakan zat organik yang terdiri dari beberapa bagian yang terdapat di dalam suatu kayu selain persenyawaan-persenyawaan organik. Kayu hanya mengandung komponen-komponen anorganik dengan jumlah yang agak rendah, diukur sebagai abu yang jarang melebihi 1% dari berat kayu kering (Dumanauw, 1994).

Lignin adalah salah satu substansi terbesar kedua dalam kayu dengan persentase berkisar antara 17%-32% dari berat kayu bebas air. Lignin tidak tersebar secara merata pada keseluruhan kayu baik letak ketinggian maupun penampang melintangnya (Putra *et al.*, 2018). Senyawa lignin sangat erat hubungannya dengan selulosa yang berfungsi untuk memberi kekuatan pada sel disebabkan lignin merupakan senyawa struktural penyusun dinding sel kayu atau bahan serat berlignoselulosa dimana lignin dan selulosa pada kayu terdapat pada setiap lapisan dinding sel dan diantara sel dalam dinding sel (Wibisosno *et al.*, 2018).

Adanya lignin pada kayu dapat meningkatkan sifat-sifat kekuatan mekaniknya. Asdar (2006) dalam penelitiannya menjelaskan sifat mekanik pada kayu kemiri memiliki nilai keteguhan lentur pada batas proporsi rata-rata 414,21 kg/cm², keteguhan lentur pada batas patah 534,63 kg/cm², modulus elastisitas 17.888 kg/cm², keteguhan tekan sejajar serat 215,66 kg/cm², keteguhan tekan tegak lurus serat 48,08 kg/cm² dan keteguhan pukul 0,47 kg/cm² dapat dikatakan tergolong kayu kelas kuat IV-III menurut Den Berger (1923) dalam Martawijaya *et al.* (2005).

2.4 Lignin

Lignin ($C_9H_{10}O_2(OCH_3)_n$) merupakan senyawa fenolik berupa heteropolimer kompleks yang terdapat pada dinding sel dan berperan penting dalam strategi adaptasi tanaman terhadap cekaman biotik seperti hama dan

penyakit. Kandungan lignin dalam kayu berkontribusi besar untuk mendukung kekuatan mekanis batang dalam menahan beban dan dapat memberi kestabilan dimensi karena menempati ruang di dinding sel yang bisa diisi oleh air (Verma, 2014). Kayu daun jarum memiliki kandungan lignin yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan kayu daun lebar dan juga terdapat beberapa perbedaan struktur lignin dalam kayu daun jarum dan dalam kayu daun lebar (Sanusi, 2010).

Lignin terletak di antara sel-sel dan di dalam dinding sel yang menyebabkan kayu menjadi keras dan kaku sehingga mampu menahan tekanan mekanis yang besar. Di antara sel lignin berperan sebagai pengikat antara sel, dan di dalam dinding sel, lignin sangat erat hubungannya dengan selulosa dan berfungsi untuk memberikan kekuatan pada sel. Lignin juga bertanggung jawab terhadap perubahan dimensi kayu akibat fluktuasi kadar air (Lempang, 2016). Tidak hanya di dalam kayu, lignin juga terdapat pada bagian daun tumbuhan, hal ini berdasarkan hasil penelitian Wali (2014) yang menyatakan hasil pengujian kimia dari daun jabon mengandung kadar air, serat kasar, serta lignin.

Struktur molekul lignin sangat berbeda dibandingkan polisakarida karena terdiri atas sistem aromatik yang tersusun atas unit-unit fenilpropana yaitu unit *guaiacyl* (G) dari prekursor *trans*-koniferil alkohol, unit *syringyl* (S) dari prekursor *trans*-sinapil alkohol, dan *p*-hidroksipenil (H) dari prekursor *trans*-*p*-kumaril alkohol (Yunanta, 2014). Berdasarkan komposisi unit strukturalnya, lignin diklasifikasikan kedalam beberapa tipe, lignin pada *softwood* (kayu daun jarum) atau disebut lignin guaiasil atau G lignin sebagian besar disusun oleh unit guaiasil (sekitar 90%) dan *p*-kumaril alkohol (sekitar 10%). Lignin pada *hardwood* (kayu daun lebar) atau disebut lignin guaiasil siringil atau G-S lignin disusun oleh unit guaiasil dan siringil dengan perbandingan tertentu, tergantung dari jenis kayu, umur kayu, tempat tumbuh dan iklim (Davin dan Lewis, 2005).

2.5 Biosintesis Lignin

Biosintesis lignin tidak hanya diatur secara progresif namun juga diinduksi sebagai respon terhadap tekanan seperti sinar UV dan serangan patogen. Saat ini aktivasi transkripsional biosintesis lignin yang diakibatkan oleh tekanan masih kurang diketahui. Tanaman yang terpapar tekanan berbeda akan merangsang metabolisme fenil-propanoid untuk mengubah kandungan dan komposisi lignin.

Induksi gen yang berkaitan dengan biosintesis lignin, seperti PAL, C4H, F5H, CAD, CCR dan 4CL biosintesis (Kamdee *et al.*, 2014).

Hartati (2011) menyatakan pada beberapa tanaman telah diketahui enzim-enzim yang berkaitan dengan biosintesis lignin diantaranya *phenylalanine ammonia-lyase* (PAL) (Kao *et al.*, 2002), *o-methyltransferase* (CCoAoMT) (Ibrahim *et al.*, 1998; He *et al.*, 1998); *4-coumarate CoA ligase* (4CL) (Allina *et al.* 1998; Ehling *et al.*, 1999; Chukovic *et al.*, 2000; Ehling *et al.*, 2001; Rogers *et al.*, 2005), *cinnamoyl-CoA reductase* (CCR) dan *cinnamyl alcohol dehydrogenase* (CAD) (Ralph *et al.*, 1998). Enzim-enzim tersebut terlibat di dalam jalur biosintesis lignin yang dimulai dari konversi prekursor fenil alanin hingga pembentukan monolignol (Baucher *et al.*, 2003).

4-coumarate:Coenzyme A ligase (4CL) mempunyai peranan penting dalam biosintesis lignin yang mengkatalisis aktivasi asam kumarat, kafeat atau ferulat menjadi monomer siringil. Pengaturan biosintesis lignin melalui *down* regulasi 4CL akan berguna untuk. Pencarian gen 4CL pada jenis-jenis kehutanan harapannya untuk menjadi informasi bagi para pemulia sehingga mampu dilakukan pemuliaan pohon. Fungsi Gen 4CL juga mampu dijadikan indikator untuk ketahanan penyakit suatu jenis pohon (Chen dkk, 2019).

Bahkan pada tanaman kehutanan transgenik subtropis yang cepat tumbuh yaitu aspen (*Populus tremuloides*) mengandung gen penyandi 4CL terbukti memacu pertumbuhan daun, akar dan batang (Sederoff 1999, Harding *et al.* 1999). Gen-gen penyandi enzim yang berkaitan dengan biosintesis lignin telah diisolasi dan dikarakterisasi. Saat ini sudah banyak dilaporkan data sekuen DNA yang berupa fragmen cDNA ataupun sekuen gen utuhnya. Sekuen yang terdaftar pada data gen bank jumlahnya sangat banyak hingga mencapai ratusan jenis sekuen dari berbagai macam tanaman juga organisme lainnya (Hartati, 2011).

2.6 Insertion-Deletion (InDel)

Moghaddam (2014) dalam penelitiannya mengemukakan bahwa *Insertion-deletions* (InDel) adalah salah satu sumber umum variasi yang didistribusikan secara luas di seluruh terdiri dari total 3 juta dari 15 juta varian genetik yang diketahui. Penyisipan dan penghapusan (InDels) adalah adanya DNA hilang

(deletion) atau diperoleh (insertion) dalam skala yang lebih kecil, didefinisikan sebagai <1000 bp.

Indels, memiliki potensi untuk mengubah atau sepenuhnya menghilangkan fungsi protein. *InDel* dapat dikonversi menjadi penanda yang mudah digunakan serta dapat dibedakan dengan mudah berdasarkan ukurannya dengan menggunakan peralatan laboratorium. Penyisipan dan penghapusan (*InDels*), sebagai salah satu sumber utama varian genetik struktural, mendapat perhatian yang meningkat dalam studi genetik manusia dan beberapa spesies model untuk kontribusinya terhadap sifat ekonomi atau pertanian dan penyakit manusia (Yang *et al.*, 2014).

Penanda *InDel* telah digunakan untuk studi filogenetik. Steele *et al.*, (2008) menggunakan polimorfisme *InDel* pada padi untuk memisahkan genotipe Basmati dari genotipe lain. Pengamatan bahwa penanda *InDel* yang dikembangkan dari satu marka menunjukkan polimorfisme, dan marka menunjukkan kegunaannya yang luas. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun penanda *InDel* ini dirancang untuk menangkap variasi dalam setiap marka, kinerja dan aplikasinya dapat diperluas ke seluruh plasma nutfah (Moghaddam, 2015).

2.7 DNA (*Deoxyribonucleic acid*)

DNA (*Deoxyribonucleic acid*) merupakan asam nukleat yang di dalamnya terkandung materi genetik. DNA memiliki fungsi dan peranan yang penting yakni mengatur perkembangan biologis seluruh kehidupan secara seluler. Sehingga penyebutan nama DNA juga didasarkan pada lokasi asalnya. DNA genome inti (nuclear DNA genome) berasal dari inti sel, DNA genom mitokondria (*mitochondrial DNA genome*) berasal dari mitokondria serta DNA genom kloroplast berasal dari kloroplast (Hairuddin, 2013).

Di dalam sel terdapat molekul DNA yang dapat diekstraksi atau diisolasi dan dapat digunakan untuk amplifikasi dan analisis DNA yang dapat dilakukan dengan metode elektroforesis. Tujuan dilakukannya isolasi DNA adalah untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti lemak, protein dan karbohidrat. Isolasi DNA memiliki prinsip utama yang terbagi menjadi tiga yaitu lisis atau penghancuran, ekstraksi atau tahapan memisahkan DNA dari bahan lain dan tahap terakhir yakni pemurnian. Dalam melakukan isolasi DNA terdapat banyak

cara yang dapat dilakukan, akan tetapi tidak semuanya dapat diterapkan pada semua jenis tanaman. Kondisi daun merupakan faktor yang sangat penting dan dapat mempengaruhi DNA yang dihasilkan. Daun yang diambil dan disimpan lama akan menyebabkan meningkatnya aktivitas senyawa tertentu (Turahmi et al., 2021).

2.8 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan tahapan awal dari proses isolasi DNA yang bertujuan untuk mendapatkan DNA yang terbebas dari debris sel. Prinsip kerja dalam isolasi DNA mencakup beberapa tahapan reaksi dengan tujuan yang berbeda pada setiap tahapannya. Tahapan awal yang dilakukan ialah penghancuran sel atau jaringan yang dapat dilakukan dengan beberapa cara yakni dengan cara fisik seperti menggerus sampel dengan menggunakan mortar dan *pestle*. Tahapan kedua adalah pemecahan sel yang dapat dilakukan dengan berbagai cara tergantung dari jenis selnya. Tahapan ketiga bertujuan membersihkan debris sel dengan cara sentrifugasi. Pemisahan DNA dapat dilakukan dari hasil pengambilan cairan supernatan pada proses sentrifugasi (Toha, 2001).

Penambahan *buffer* ekstraksi atau *buffer lisis* pada proses ekstraksi DNA dilakukan untuk mencegah rusaknya DNA. Pemisahan DNA dari komponen sel lain termasuk debris sel dilakukan dengan sentrifugasi. Kontaminan yang umum ditemukan pada proses ekstraksi DNA adalah polisakarida yang dapat mengganggu proses lanjutan seperti PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sehingga menghambat kerja enzim *taq polimerase*. Oleh karena itu, untuk menghindari terjadinya hal ini maka suhu jaringan yang digunakan dijaga agar tetap dingin sebelum dan selama proses ekstraksi (Fatchiyah et al., 2011). Pengukuran konsentrasi dan kemurniaan DNA penting dilakukan setelah proses ekstraksi selesai. Menurut Syafarudin (2011), pengukuran ini dapat menggunakan spektrofotometer dan elektroforesis.

2.9 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR bertujuan untuk memperbanyak DNA pada sampel beberapa kali lipat agar sekuens DNA tersebut dapat dianalisis. Teknologi ini juga memiliki fungsi lain diantaranya untuk analisis DNA pada

pelaku kejahatan. Hal yang menjadi penentu keberhasilan PCR adalah suatu bentuk atau jenis polimerase yang mempunyai toleransi terhadap suhu tinggi pada pengulangan siklus PCR di PCR *gene cyclers* (Walker, 2013).

Teknik PCR terdiri atas tiga tahapan dalam satu siklus yaitu *denaturasi*, *annealing*, *polimerasi* (Ekstensi). Tahap *denaturasi* bertujuan untuk memisahkan rantai ganda menjadi dua rantai tunggal agar primer dapat menempel. Tahap *annealing* terjadi penempelan primer dan pembentukan ikatan H baru antara untai tunggal DNA dengan primer. Tahap *polimerase* yang sering disebut tahap ekstensi terjadi pemanjangan rantai tunggal primer dari ujung 3' ke 5' dengan enzim *taq polimerase*. Proses PCR berlangsung dalam beberapa siklus sekitar 30-35 siklus tergantung dari enzim *taq polimerase* dan jumlah sampel (Toha, 2001).

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

a. 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.

b. 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 ekstensi 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).

2.10 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi dan memurnikan molekul DNA/RNA atau protein berdasarkan ukuran dan muatan yang dimiliki. Senyawa yang diinginkan, bermigrasi melalui suatu medium yang berupa gel agarosa atau gel poliakrilamida dengan menggunakan muatan listrik untuk melewati gel tersebut (Walker, 2013). Pada DNA hasil elektroforesis gel agarosa, molekul DNA dianalisa berdasarkan letaknya setelah mengalami migrasi pada proses elektroforesis tersebut. DNA yang akan dianalisa dibandingkan dengan DNA *marker* atau DNA yang telah diketahui. Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (*anion*), dalam hal tersebut DNA, yang bergerak menuju kutub positif (*anode*), sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (*kation*) akan bergerak menuju kutub negatif (*anode*) (Anam *et al.*, 2021).

Menurut Toha (2001) terdapat dua macam gel yang dapat digunakan dalam elektroforesis yaitu gel poliakrilamida dan gel agarose. Perbedaan antara gel agarose dan gel poliakrilamida ialah dari segi peruntukannya. DNA yang berukuran besar sekitar (0.1-20 kb) dapat dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa sedangkan DNA berukuran kecil sekitar (6-2000 bp) dapat dipisah dengan elektroforesis gel poliakrilamida. Penggunaan EtBr (*Ethidium bromide*) yang berfungsi untuk memberi warna pada fragmen DNA agar berpendar saat diberi cahaya *ultraviolet* dapat menurunkan sekitar 15% kecepatan pergerakan fragmen DNA. Proses elektroforesis yang menggunakan *buffer* dengan kekuatan ion yang rendah akan menyebabkan pergerakan DNA relatif lambat, namun jika kekuatan ion terlalu tinggi maka akan terbentuk panas sehingga gel dapat meleleh dan DNA akan tetap *denaturasi* dan rusak.