

SKRIPSI

**PERBANDINGAN TINGKAT POLIMORFISME MARKA
RAPD DAN ISSR UNTUK SELEKSI MARKA PADA JAMBU
METE (*Anacardium occidentale*)**

RESKY AMELIA

M01171032



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

2021

HALAMAN PENGESAHAN

**PERBANDINGAN TINGKAT POLIMORFISME MARKA RAPD DAN
ISSR UNTUK SELEKSI MARKA PADA JAMBU METE (*ANACARDIUM
OCCIDENTALE*)**

**RESKY AMELIA
M011171032**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Kehutanan
Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin
pada tanggal 23 Desember 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

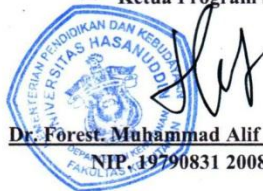
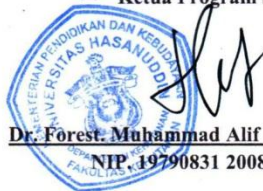
Pembimbing Pendamping



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

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Resky Amelia
NIM : M011171032
Program Studi : Kehutanan
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulis saya berjudul

Perbandingan Tingkat Polimorfisme Marka Raps Dan Issr Untuk Seleksi Marka
Pada Jambu Mete (*Anacardium Occidentale*)

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 atau perbuatan tersebut

Makassar, 23 Desember 2021

Yang menyatakan

A 10,000 Indonesian Rupiah postage stamp with a signature over it. The stamp features the Garuda Pancasila emblem and the text 'METERAL TEMPEL' and '89504AJX575362432'. The signature is in black ink and appears to be 'Resky Amelia'.

Resky Amelia

ABSTRAK

Resky Amelia (M011171032). Perbandingan Tingkat Polimorfisme Marka Rapd Dan Issr Untuk Seleksi Marka Pada Jambu Mete (*Anacardium Occidentale*)

Jambu mete (*Anacardium occidentale*) merupakan komoditas unggulan nasional yang banyak dikembangkan di Daerah Timur Indonesia khususnya Kabupaten Bulukumba, Pangkep, dan Sidrap yang merupakan sentra penghasil utama jambu mete dengan produktivitas rata-rata mencapai 0,82 ton/ha dan produksi sekitar 25.275 ton atau 76 % dari total yang dihasilkan pada 10 kabupaten yang disurvei (Nappu, 2013). Tujuan penelitiann ini untuk mengidentifikasi kemampuan amplifikasi primer *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) dan *Inter-Simple Sequence Reapet* (ISSR) pada tanaman jambu mete. Metode penelitian yang digunakan adalah metode isolasi CTAB (*Cetyl Trimentyl Ammonium Bromide*) dan seleksi primer. Hasil amplifikasi sejumlah primer yang telah dilakukan menunjukkan bahwa primer yang dapat diamplifikasi yaitu primer OPG 06, OPA 18, OPC 11, OPA 15,OPK 20, OPG 19, OPAE 11, dan OPA 02 untuk RAPD, adapun ISSR adalah primer UBC 810, UBC 813, UBC 814, UBC 820, UBC 822, UBC 823, UBC 824, UBC 830 dan UBC 868. Penanda RAPD menghasilkan polimorfisme (80%) dan ISSR sebanyak (90%).

Kunci : Jambu Mete, Marka Molekuler, RAPD, ISSR, dan Seleksi Primer

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas berkat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul " Perbandingan Tingkat Polimorfisme Marka RAPD Dan ISSR Untuk Seleksi Marka Pada Jambu Mete (*Anacardium occidentale*)". Shalawat dan salam juga penulis panjatkan kepada Baginda Rasulullah SAW yang menjadi suri tauladan bagi seluruh umatnya.

Penghargaan dan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada kedua orang tua saya **HASANUDDIN** dan **SYAFRIATI** karena telah membesarkan dan menyayangi penulis. Terima kasih juga untuk kakak **AMIRULLAH** atas dukungan yang selama ini diberikan. Terima kasih penulis ucapkan untuk **Keluarga Besar** yang selalu mendoakan penulis agar tetap sehat dan tidak lupa dengan Sang Maha Pencipta.

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 memberikan bimbingan, pengarahan dan nasehat selama penentuan judul penelitian sampai ke tahap penyusunan skripsi ini.
2. Ibu **Budi Arty, S.Hut., M.Si.**, dan Bapak **Iswanto, S.Hut., M.Si.**, selaku penguji yang telah memberikan masukan dan saran-saran guna penyempurnaan skripsi ini.
3. Bapak **Mukrimin, S.Hut., M.P., 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. Baharuddin,MP** selaku dosen pembimbing akademik penulis selama penulis menempuh pendidikan sampai selesai.
6. Ibu **Dr. Ir. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P.**, Kak **Fitriani, S.Hut**, Kak **Iswanto, S.Hut.,M.Si.**, Kak **Yusniar, S.Hut.**, Kak **Aminah, S.P.**, yang telah bersedia membantu penulis selama melaksanakan penelitian di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon hingga skripsi ini selesai.
7. Teman-teman seperjuangan selama penelitian **Kiki Sulo, Iser, Nasrah, Devi Nurvaulasari, Musdalifah, S.Hut., Nurul Musdalifah, Sri Ayu, Marwah Salam, Imelda, Sulas** dan teman-teman lab Bioteknologi lainnya terima kasih atas dukungan, kebersamaan dan motivasi hingga skripsi ini selesai.
8. Terima kasih untuk yang mensupport dibelakang layar **Fadilah Damari, Nur Iqfa, Besse Rahma dan Besse Fajriani** atas dukungan, doa yang selama ini diberikan kepada penulis.
9. Terima kasih untuk **Atisa, Sindi** dan **Nisa** atas support dan semangat yang selalu diberikan kepada penulis.
10. Terima kasih untuk moodboosterku yang memberikan motivasi **BTS** (Jimin, V, Suga, Jk, Jin, J-Hope dan Rm) karena lagu dan keseharian mereka penulis bersemangat mengerjakan dan menyelesaikan skripsi ini.
11. Terima kasih untuk **FRAXINUS angkatan 2017**, terima kasih atas kerjasamanya 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, November 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan dan Kegunaan	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Klasifikasi dan Morfologi Jambu Mete (<i>Anacardium occidentale</i> L.) ...	3
2.1.1 Penyebaran dan habitat	4
2.1.2 Manfaat	5
2.2 Penanda Molekuler	5
2.3 <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD)	7
2.4 <i>Inter-Simple Sequence Repeat</i> (ISSR)	8
2.5 Seleksi Primer	9
III. METODE PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan	11
3.3 Metode Pelaksanaan Penelitian	11
3.3.1 Pengambilan Sampel	11
3.3.2 Isolasi DNA	11
3.3.3 Seleksi primer	12
3.3.4 Elektroforesis RAPD dan ISSR	14
3.4 Analisis Data Seleksi Primer RAPD dan ISSR	14
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Hasil dan Pembahasan	15
4.1.1 Seleksi Primer	15
V. KESIMPULAN DAN SARAN	19
5.1 Kesimpulan	19
5.2 Saran	19
DAFTAR PUSTAKA	20
LAMPIRAN	24

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
Tabel 1.	Jenis Nama Primer yang digunakan dalam analisis RAPD.....	13
Tabel 2.	Jenis Nama Primer yang digunakan dalam analisis ISSR.....	13
Tabel 3.	Nama, jumlah, suhu dan kualitas pita yang dihasilkan pada primer RAPD.....	16
Tabel 4.	Nama, jumlah, suhu dan kualitas pita yang dihasilkan pada primer ISSR.....	16

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
Gambar 1.	Elektroforegram hasil amplifikasi DNA pada Primer OPK 20.....	15
Gambar 2.	Elektroforegram hasil amplifikasi DNA pada Primer UBC 830....	17

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
Lampiran 1.	Dokumentasi Alat yang digunakan.....	24
Lampiran 2.	Dokumentasi Bahan yang digunakan.....	26
Lampiran 3	Dokumentasi Proses Penelitian di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon.....	28
Lampiran 4.	Hasil Elektroforesis Keseluruhan Primer.....	29

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Jambu mete (*Anacardium occidentale*) merupakan komoditas unggulan nasional yang banyak dikembangkan di Daerah Timur Indonesia yang memiliki tipe iklim relatif kering. Menurut Ditjenbun (2008), tanaman ini dikenal mampu tumbuh baik pada berbagai kondisi lahan marginal, sehingga dipilih menjadi salah satu tanaman penghijauan. Pengembangan jambu mete di Sulawesi Selatan, khususnya pada 10 kabupaten yang disurvei mencapai luas 35.793 ha. Kabupaten Bulukumba, Pangkep, dan Sidrap yang merupakan sentra penghasil utama jambu mete dengan produktivitas rata-rata mencapai 0,82 ton/ha dan produksi sekitar 25.275 ton atau 76 % dari total yang dihasilkan pada 10 kabupaten yang disurvei (Nappu, 2013).

Tanaman jambu mete menghasilkan komoditas ekspor yang memiliki nilai jual yang cukup tinggi dan relatif stabil dibanding komoditas ekspor Indonesia lainnya. Selain gelondong dan kacang mete tanaman tersebut menghasilkan pula minyak laka dan produk lain yang diolah dari buah (Karmawati, 2008). Potensi jambu mete perlu dikembangkan dan dipertahankan pelestariannya melalui pemilihan jenis yang berkualitas baik. Program pemuliaan tanaman umumnya hasil seleksi karakter fenotip/morfologi. Saat ini program pemuliaan tersebut telah dilengkapi dengan teknik molekuler, sehingga memungkinkan diperolehnya suatu marka gen yang mengendalikan karakter target dengan cepat dan akurat (Gupta *et al.*, 2002). Hal ini sangat membantu efektivitas maupun efisiensi dari pelaksanaan proses seleksi yang akan dilakukan dalam program pemuliaan tanaman dengan teknik molekuler.

Penanda molekular mampu memberikan akurasi dan keandalan yang superior/unggul dalam melakukan analisis seleksi primer pada tanaman. Perkembangan penanda molekular yang banyak digunakan diantaranya *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) dan *Inter-Simple Sequen Repeat* (ISSR). Teknik RAPD mampu mendeteksi polimorfisme DNA melalui perbedaan urutan basa nukleotida (Fitriani, 2019). Adapun ISSR tersebar di seluruh genom, dan menghasilkan pola polimorfisme yang tinggi (Guo *et al.*, 2009). Penanda genetik ini mampu mengidentifikasi keragaman pada tingkat interspesies maupun

intraspecies. banyak digunakan karena tekniknya sederhana, cepat dan murah (Vijayan, 2005). Penelitian sebelumnya mengemukakan primer-primer RAPD dan ISSR mampu mendeteksi dan mengamplifikasi dalam genom dengan jumlah yang beragam, baik diantara tipe jenis primer satu dan jenis primer lainnya (Poerba dan Ahmad, 2010). Aplikasi RAPD dan ISSR pada aksesori jambu mete mampu mendeteksi keragaman dengan tingkat polimorfisme yang tinggi (Thimmappaiah *et al.*, 2009). Menurut (Randriani *et al.*, 2012) RAPD dan ISSR menjadi salah satu penanda molekuler yang banyak digunakan dalam program pemuliaan tanaman seperti jambu mete dan tanaman lainnya. Oleh karena itu, dalam hal program pemuliaan tanaman seleksi dilakukan dengan menggunakan pendekatan molekuler.

Seleksi primer dilakukan untuk memilih primer-primer dengan cara membuat reaksi PCR terhadap beberapa primer yang berbeda menggunakan sampel DNA yang sama pada kondisi yang sama, sehingga dapat diketahui kondisi optimum serta tingkat variasi pita yang dihasilkan dari setiap primer yang diseleksi. Salah satu syarat utama terjadinya amplifikasi DNA dengan suatu primer adalah apabila primer tersebut mempunyai urutan basa nukleotida yang komplementer dengan kedua DNA genom sebagai cetakan pada posisi yang berlawanan (Pharmawati, 2009). Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui primer yang dapat teramplifikasi polimorfik pada tanaman jambu mete berdasarkan pada perbandingan penanda molekuler RAPD dan ISSR.

1.2 Tujuan dan Kegunaan

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kemampuan amplifikasi primer *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) dan *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR) pada tanaman jambu mete. Adapun kegunaan dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dasar mengenai primer yang dapat digunakan analisis keragaman genetik pada penelitian selanjutnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi dan Morfologi Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L.)

Tanaman jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) berasal dari negara Brazil. Tanaman ini termasuk dalam famili Anacardiaceae yang terdiri dari 60 genus dan 400 spesies, dalam bentuk pohon maupun perdu. Menurut Suhadi (2009) klasifikasi jambu mete dalam taksonomi tumbuhan adalah sebagai berikut.

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Sapindales

Famili : Anacardiaceae

Genus : *Anacardium*

Spesies : *Anacardium occidentale* Linn.

Bagian vegetatif tanaman jambu mete yang memiliki fungsi penting untuk mempertahankan hidup adalah akar, batang, dan daun. Bagian generatif yang memiliki tugas meneruskan keturunan terdiri atas tiga komponen, yaitu bunga, buah dan biji. Akar tanaman jambu mete terdiri atas akar tunggang yang tumbuh tegak lurus dan akar yang tumbuh mendatar. Menurut Suprpti (2004) batang tanaman jambu mete tumbuh tegak dengan ketinggian mencapai 7-20 m dan diameter mahkota pohon 8-15 m seperti Gambar 2.1.

Bunga jambu mete termasuk bunga majemuk yang berbentuk panicula (ibu tangkai mengadakan percabangan monopodial) dan bermunculan di ujung ranting. Tanaman jambu mete mulai berbunga umumnya pada umur 3 - 5 tahun. Bunga jambu mete ukurannya kecil, memiliki aroma harum, dan jumlahnya sangat banyak. Buah jambu mete berbentuk seperti ginjal berukuran panjang 15-25 mm dengan lebar antara 18 - 20 mm. Buah jambu mete terdiri atas tiga lapisan, yaitu lapisan kulit keras (pericarp) yang terletak di bagian paling luar, lapisan kulit ari, dan lapisan kernel (biji mete) (Suhadi, 2009). Daun jambu mete secara keseluruhan berbentuk bulat telur, bagian ujung berbentuk bulat dan bagian pangkal berbentuk runcing. Daun jambu mete merupakan daun tunggal yang letaknya tersebar. Warna daun jambu mete bervariasi, antara hijau tua hingga coklat kemerahan. Panjang daun umumnya mencapai 10 - 12 cm dengan lebar 5 -

10 cm (Suprapti, 2004). Jambu mete termasuk jenis dikotil atau tumbuhan yang berdaun lembaga dua.

Jambu mete termasuk tumbuhan yang berkeping biji dua atau juga disebut tumbuhan berbiji belah. Batang pohon jambu mete memiliki bentuk yang tidak simetris dan berwarna cokelat tua. Tangkai daunnya pendek, lonjong seperti telur dengan tepian berlekuk-lekuk, dan guratan rangka daunnya terlihat jelas. Bunganya berwarna putih. Bagian buahnya memiliki buah semu yang berwarna kuning kemerah-merahan, berdaging lunak, dan berair. Bagian tersebut merupakan tangkai buah yang membesar. Selain itu jambu mete juga memiliki buah sebenarnya yang biasa disebut mete atau mente, yaitu buah batu yang memiliki bentuk seperti ginjal yang kulitnya sangat keras serta bijinya yang berkeping dua yang mengandung getah (Yuniarti, 2008).

Pohon jambu mete memiliki cabang dan ranting yang banyak. Batang melengkung, berkayu, bergetah, percabangan mulai dari bagian pangkalnya. Daun tunggal, bertangkai, panjang 4-22,5 cm, lebar 2,5 - 15 cm. Helai daun memiliki bentuk yang bulat sungsang seperti telur, tepi rata, pangkal runcing, ujung membulat dengan lekukan kecil di bagian tengah, pertulangan menyirip, berwarna hijau. Bunga dari jambu mete berumah satu yang memiliki 2 kelamin yaitu jantan dan betina atau disebut juga bunga sempurna. Bunganya tersusun bentuk malai, berada di luar ketiak daun atau di ujung percabangan. Buah sebenarnya seperti batu, keras, melengkung. Sedangkan tangkai buahnya semakin lama akan membesar lalu menjadi buah semu yang lunak, berwarna kuning kemerah-merahan, rasanya manis agak sepat, banyak mengandung air, dan berserat. Biji berwarna cokelat tua dan bentuknya bulat memanjang, melengkung serta pipih (Dalimartha, 2000).

2.1.1 Penyebaran dan habitat

Jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) merupakan tanaman bukan asli Indonesia, tetapi sudah banyak dikenal dan dibudidayakan secara luas terutama di Kawasan Timur Indonesia. Awal pengembangan tanaman adalah untuk penghijauan, kemudian dikarenakan produk gelondong jambu mete mempunyai nilai ekonomi yang tinggi maka pengembangan selanjutnya berorientasi tidak hanya untuk rehabilitasi tanah kritis melainkan juga untuk tujuan produksi dan

ekspor. Ekspor jambu mete berdasarkan catatan statistik perdagangan luar negeri Indonesia tahun 2002 berupa gelondong dan kacang mete adalah sebesar 51.717 ton dengan nilai \$ 34.810 ribu dengan negara tujuan India, Srilanka, Jepang, Singapura, Taiwan, China, Malaysia, Kanada Inggris, Amerika dan Jerman (Wahyuni, 2006).

2.1.2 Manfaat

Daun jambu mete memiliki beberapa khasiat diantaranya sebagai obat luka bakar, diare, penyakit kulit, hipertensi dan diabetes melitus (Sugeng, 2009). Tanaman jambu mete juga bisa disebut sebagai tanaman multiguna karena hampir seluruh bagian tanamannya memiliki manfaat. Menurut Suprapti (2004) manfaat tanaman jambu mete antara lain:

1. Kulit batang dimanfaatkan sebagai obat diare dan obat kumur untuk penderita sariawan dan obat anti ngengat.
2. Air rebusan akar jambu mete dimanfaatkan sebagai obat pencahar.
3. Buah semu jambu mete baik dikonsumsi karena kandungan vitamin C yang tiga kali lebih tinggi dari kandungan vitamin C jeruk.
4. Daun jambu mete (tua) digunakan untuk mengobati penyakit eksim serta sebagai obat luka bakar. Daun jambu mete yang muda sering digunakan sebagai lalapan atau sayur. Pada beberapa penelitian daun jambu mete juga terbukti dapat menghambat pertumbuhan mikroba.

2.2 Penanda Molekuler

Pemecahan masalah dalam pemuliaan konvensional mulai mendapat titik terang dengan ditemukannya markah/penanda molekuler, suatu penanda (marker) adalah suatu karakter atau sifat yang dapat diturunkan atau diwariskan pada keturunannya dan dapat berasosiasi maupun berkorelasi dengan genotip tertentu, dan dapat digunakan untuk mengkarakterisasi/mendeteksi genotip tertentu. Suatu sifat yang dapat dipakai sebagai penanda apabila sifat tersebut secara tegas diwariskan pada keturunannya dan dengan sifat yang dikehendaki (Nuraida, 2012). Pengembangan markah molekuler yang terpaut dengan karakter-karakter kualitas atau yang disebut dengan pendekatan QTL (*Quantitative Trait Loci*) untuk karakter kualitas, berpotensi sebagai jalan untuk merakit kultivar yang memiliki kualitas unggul. Lebih lanjut, bila fasilitas dan dukungan dana yang

kontinyu, teknik pemuliaan molekuler lainnya dapat digunakan guna menunjang peningkatan kualitas dan daya saing yaitu transformasi gen (Carsono, 2008).

Teknik molekuler, khususnya dalam penggunaan marka molekuler, telah digunakan secara ekstensif oleh Negara maju. Penggunaan marka molekuler utamanya untuk memonitor variasi susunan DNA di dalam spesies serta merekayasa sumber baru variasi genetik dengan mengintroduksi karakter-karakter yang baik. Marka molekuler ini membawa informasi baru yang bermanfaat dalam menentukan variasi karakter dan organisasi dari keragaman genetik di dalam spesies. Selain kelebihan-kelebihan di atas penanda ini bersifat kodominan, tidak terpengaruh oleh faktor luar, dan dapat dilakukan setiap saat tanpa harus menunggu umur tanaman tertentu (Nuraida, 2012). Karena suatu karakter tertentu dari makhluk hidup itu terletak pada DNA, maka hasil yang diperoleh dari teknik markah molekuler ini secara total independen dari pengaruh lingkungan di mana materi tersebut ditanaman (Carsono, 2008).

Prinsip dasar dan metodologi dari marka molekuler yang dapat digunakan, menurut Gupta *et al.* (2002) dapat dikelompokkan dalam empat macam, yaitu: 1. Hibridisasi berdasarkan marka, 2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) berdasarkan marka, 3. Marka molekuler berdasarkan PCR yang dilanjutkan dengan hibridisasi dan 4. Sekuensing dan cip DNA berdasarkan marka. Penanda molekuler DNA dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu, pertama penanda DNA tanpa PCR (*non-PCR based techniques*) seperti RFLP, kedua penanda DNA berdasarkan PCR seperti RAPD, ISSR, DNA Barkoding (Fernandez *et al.*, 2002). Metode berbasis PCR dapat mendeteksi mikroorganisme patogen melalui identifikasi sekuen DNA target yang dapat menghasilkan sensitifitas dan spesifitas cukup tinggi (Diederer *et al.*, 2007). Metode PCR dapat digunakan untuk deteksi patogen secara molekuler dengan membandingkan ukuran DNA target dengan marker atau membandingkan sekuen DNA target dengan sekuen yang terdapat pada gen. Namun, pada PCR konvensional memiliki beberapa kelemahan seperti waktu running yang cukup lama dan berpotensi untuk memberikan hasil positif palsu akibat kontaminasi di laboratorium (Fricker *et al.*, 2007).

2.3 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD adalah salah satu pendekatan berbasis DNA yang paling populer. Uji RAPD dan teknik terkait telah terbukti mendeteksi efek pada DNA. Keunggulan dari teknik analisis menggunakan penanda RAPD diantaranya adalah kuantitas DNA yang dibutuhkan sedikit, lebih menghemat biaya, mudah dipelajari dan primer yang digunakan sudah banyak dikomersialisasikan sehingga mudah diperoleh. Kelemahannya adalah tingkat reproduktibilitas pola marka dari laboratorium ke laboratorium yang berbeda, dan antara hasil percobaan dalam laboratorium itu sendiri yang sama, sangat sensitif terhadap variasi dalam konsentrasi DNA, dan memerlukan konsentrasi primer dan kondisi siklus suhu yang optimal pada saat pengujian (Wolfman, 2013).

RAPD merupakan salah satu penanda yang cukup mudah, efektif, dan ekonomis dimana tujuannya itu untuk melihat variasi somaklonal (keragaman gen). dengan menggunakan penanda RAPD dapat membedakan antara klon, keberadaan mutasi gen, serta jumlah kromosom (Andis, 2018). RAPD salah satu marka molekuler berbasis PCR yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman pada tingkat interspesies maupun antar spesies (Pharmawati, 2001). Teknik RAPD tidak membutuhkan informasi awal tentang urutan basa suatu spesies tetapi yang diperlukan adalah DNA yang relatif murni dalam jumlah yang relatif kecil. RAPD dapat diterapkan hampir pada semua jenis tanaman. DNA sebagai pembawa informasi genetik terdapat pada semua makhluk hidup didalam sel khususnya. DNA dapat diperoleh dari suatu makhluk hidup dengan suatu proses ekstraksi yang memudahkan untuk mengidentifikasi DNA yang disebut proses isolasi DNA (Langga *et al.*, 2012).

Prinsip teknik RAPD didasarkan pada kemampuan primer menempel pada cetakan DNA. Primer yang didesain berupa primer tunggal pendek agar dapat menempel secara acak pada DNA genom organisme. Dengan demikian akan terdapat banyak pola fragmen DNA. Perbedaan ini dapat dilihat dengan adanya pola pita pada gel agarosa setelah diwarnai dengan pewarnaan DNA seperti etidium bromide gel red. Disamping ditentukan oleh ada tidaknya situs penempelan primer, keberhasilan teknik ini ditentukan juga oleh kemurnian dan keutuhan cetakan DNA. Cetakan DNA yang tidak murni akan mengganggu

penempelan primer pada situsnya dan akan menghambat aktifitas enzim polymerase DNA. Enzim ini berfungsi untuk melakukan polimerisasi DNA. Sedangkan cetakan DNA yang banyak mengalami fragmentasi dapat menghilangkan situs penempelan primer. Pemakaian marka molekuler RAPD banyak digunakan untuk menyusun kekerabatan beberapa individu dalam spesies maupun kekerabatan antar spesies. Penggunaan kekerabatan ini dapat dijadikan rujukan dalam pemuliaan persilangan untuk mendapatkan keragaman yang tinggi dari hasil suatu persilangan penanda RAPD yang efektif dalam mengevaluasi silsilah bahan, sementara SSR sangat penting untuk mengenali perbedaan antara karakteristik kuantitatif (Maftuchah, 2001).

2.4 *Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)*

Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) merupakan salah satu penanda molekuler yang menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) berbasis DNA yang mampu memberikan informasi mengenai polimorfisme, hubungan genetik dan keragaman (Anne, 2006). Metode ini banyak digunakan karena tekniknya sederhana, cepat dan murah (Vijayan, 2005).

Penanda ISSR sangat polimorfik bahkan untuk spesies yang berkerabat dekat (mampu mendeteksi variasi genetika pada level sangat rendah). Penanda ini memerlukan DNA dalam jumlah kecil, bersifat universal, kodominan, mudah dalam penggunaan, tingkat keberhasilan tinggi dan tidak perlu lebih dahulu mengetahui susunan basa (sequence) dari genom tanaman (Wahyuni *et al.*, 2004). Penanda ISSR lebih sensitif dibandingkan penanda molekuler lain dalam mendeteksi keanekaragaman genetika di tingkat bawah jenis dan relatif mudah dan ekonomis. Penanda ini mampu melakukan pendeteksian genetika polimorfisme tanpa perlu lebih dahulu mengetahui susunan basa (sekuens) dari genom tumbuhan diantara 12 susunan basa yang berulang. Syaratnya jika susunan basa berulang tersebut sudah mewakili secara luas dan menyebar di seluruh genom (Wahyuni *et al.*, 2004) serta memiliki polimorfisme yang tinggi (Manimekalai *et al.*, 2003).

Keuntungan penggunaan marker ISSR antara lain (1) tidak dipengaruhi musim dan lingkungan (Azrai, 2005), (2) tidak diperlukannya data sekuens terlebih dahulu, (3) hanya membutuhkan 5-50 ng cetakan (template) DNA per reaksi, (4)

ISSR tersebar di seluruh genom (4) dapat menghasilkan pola polimorfisme lebih tinggi dari pada RAPD (Guo *et al.*, 2009), (5) menghasilkan polimorfisme pada tingkat kultivar (Sanjay *et al.*, 2011), (6) bersifat dominan (Kumar, 2009), dan (7) dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik dan analisis kekerabatan (Trojanowska dan Bolibok, 2004). Keuntungan utama dari marka ini adalah dapat menganalisa multiple lokus dalam reaksi tunggal. ISSR telah banyak digunakan untuk mendeteksi keragaman genetik dan kekerabatan genetik (Isshiki *et al.* 2008). Menggunakan penanda ISSR lebih cepat dan memerlukan jumlah DNA yang sedikit (5-50 ng) per reaksi (Nalini *et al.*, 2003). ISSR tidak dipengaruhi musim dan lingkungan (Azrai, 2005), tidak memerlukan data sekuen terlebih dahulu, hanya membutuhkan 5-50 ng cetakan (template) DNA per reaksi, menghasilkan polimorfisme pada tingkat kultivar (Lu *et al.*, 2011), pada umumnya bersifat dominan meskipun kadang-kadang bersifat kodominan (Kumar, 2009). Penggunaan marka molekuler memiliki potensi untuk digunakan sebagai penanda dalam melakukan seleksi.

2.5 Seleksi Primer

Primer (oligonukleotida) adalah molekul nukleotida berukuran pendek sekitar 10-30 basa nukleotida yang diperlukan dalam mengawali proses sintesis DNA. Urutan basa nukleotida pada primer ditentukan agar dapat menempel. Kegiatan seleksi primer dilakukan untuk mencari primer acak yang menghasilkan penanda polimorfik lokus yang diperoleh (Yuwono, 2008). Penanda RAPD dan ISSR juga mampu mendeteksi DNA polimorfisme yang merupakan gambaran amplifikasi yang diperoleh dari perbedaan fragmen DNA yang diobservasi dan diskor yang menunjukkan ada tidaknya variasi (Gregor *et al.*, 2000).

Kegiatan seleksi primer dilakukan untuk mencari primer acak yang menghasilkan penanda polimorfik dengan tanda jelasnya pita polimorfik yang dihasilkan. Optimalisasi primer dengan cara membuat beberapa reaksi PCR terhadap semua primer yang ada pada beberapa kondisi yang berbeda dengan menggunakan beberapa sampel DNA yang sama sehingga dapat diketahui kondisi optimum serta tingkat polimorfik, pita-pita yang dihasilkan jelas, hasil amplifikasi pita DNA relatif stabil, dan mudah dibaca (Hartati *et al.*, 2007).

Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi homolognya, akibatnya dapat teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut. Suhu penempelan (*annealing*) ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan yang dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer (Suryanto, 2003).