

PEMILIHAN PRIMER RAPD (*RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*) PADA PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*) TANAMAN KAMBOJA (*Plumeria* sp.)

RAPD (*RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*) PRIMER SELECTION IN PCR OF FRANGIPANI PLANT (*PLUMERIA* SP)

Vanesa Martida, Made Pharmawati

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Bali, Indonesia
pharmawati@hotmail.com

INTISARI

Di Bali, ditemukan banyak kultivar kamboja (*Plumeria* sp.), dan identitasnya perlu dilihat secara molekuler untuk menentukan calon tetua dalam persilangan. Ekstraksi DNA dan pemilihan primer merupakan suatu hal mendasar yang harus dilakukan dalam studi molekuler, terutama dalam identifikasi dan penentuan keragaman genetik. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan primer RAPD yang menghasilkan produk PCR yang jelas dan dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut pada kamboja. Metode ekstraksi DNA yang digunakan adalah metode CTAB yang telah dimodifikasi. Sumber material adalah daun muda kultivar kamboja yang dikeringkan dengan silika gel. Primer yang digunakan berasal dari University of British Columbia dan Operon Primer Technology. Hasil ekstraksi DNA dari bahan kering setelah purifikasi menggunakan NucleoSpin® Gel dan PCR Clean Up Kit memiliki konsentrasi 33-267 ng/μl. Tiga dari tujuh primer yang dicoba yaitu UBC-127, UBC-250, dan OPH-06 dapat mengamplifikasi fragmen DNA kamboja dan menghasilkan produk yang dapat diskor untuk analisis lebih lanjut.

Kata kunci: DNA, *Plumeria* sp., primer RAPD

ABSTRACT

There are many variation of *Plumeria* sp. that grown in Bali. The genetic identity of *Plumeria* sp. need to be analysed using molecular study for plant breeding purpose. DNA extraction and primer selection are basic steps for molecular study especially in identification and analysis of genetic diversity. The aim of this research was to determine RAPD primers suitable for molecular analysis of *Plumeria* sp. This research used CTAB method with modification for DNA extraction. The samples were young leaves of *Plumeria* sp. dried using silica gel. The primers used were produced by University of British Columbia and Operon Primer Technology. The results showed that DNA concentration of *Plumeria* sp from dried leaves was between 33-267 ng/μl. Out of seven primers tested, three primers UBC-127, UBC-250, and OPH-06 produced clear and scorable amplification products for further analyses.

Keywords: DNA, *Plumeria* sp., RAPD primer

PENDAHULUAN

Tanaman kamboja (*Plumeria* sp.) dengan variasi yang beragam banyak ditemukan di Bali. Umumnya tanaman kamboja digunakan sebagai tanaman hias. Bunga kamboja dimanfaatkan sebagai sarana upacara umat Hindu dan bunga kamboja yang kering digunakan sebagai sarana aromaterapi, pengharum sabun, dan produk spa. Manfaat lainnya adalah kandungan zat tertentu pada bunga kamboja yang dapat digunakan sebagai obat (Wrasati, dkk., 2010).

Plumeria merupakan salah satu genus yang termasuk di dalam famili Apocynaceae. Diperkirakan terdapat lebih dari 15.000 kultivar *Plumeria* sp. di seluruh dunia yang sedang dikembangkan oleh pengoleksi dan pembudidaya (Little, 2006). Keragaman kultivar kamboja perlu dianalisis secara molekuler untuk keperluan pemuliaan tanaman kamboja. Salah satu teknik molekuler yang dapat digunakan adalah metode RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Dwiatmini dkk., 2003).

Metode RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) merupakan suatu aplikasi standar dari PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Keuntungan metode RAPD adalah relatif sederhana, membutuhkan kuantitas DNA yang sedikit (5 - 25 ng DNA) dalam setiap rantai PCR (Pandey *et al.*, 1998). Metode RAPD memiliki kemampuan yang cepat dalam mendeteksi polimorfisme pada sejumlah lokus (Soemantri dkk., 2002).

Pada analisis RAPD, perlu dilakukan pemilihan primer yang dapat mengamplifikasi fragmen DNA dan menghasilkan polimorfisme. Penelitian ini bertujuan menentukan primer RAPD yang dapat digunakan untuk analisis keragaman kultivar kamboja.

METODE PENELITIAN

Bahan Tanaman

Materi dalam penelitian ini adalah 7 kultivar *Plumeria* sp. koleksi Bali Frangipani Palace, yaitu *Plumeria acuminata* 'Sudamala Bali', *P. acuminata* 'Maroon', *P. acuminata* 'Bali Mas', *P. alba* 'Bali Hai

Gold', *P. Obtusa*, *Plumeria* sp. 'Madam Poni' dan *Plumeria* sp. 'Jack Purple'.

Daun yang diambil adalah daun yang berwarna hijau segar (nomor 3 dari pucuk), dibuang getahnya dengan cara dijemu selama 5 menit, lalu dimasukkan ke dalam kantong plastik yang berisi silika gel.

Ekstraksi dan Elektroforesis DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) yang modifikasi. Doyle dan Doyle (1990) yang telah dimodifikasi yaitu menggunakan 50 mM EDTA (Pharmawati, 2009) dengan buffer ekstraksi yang terdiri dari 2% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 50 mM EDTA, 100 mM Tris-HCL (pH 8), 0,2% (v/v) 2-mercaptoetanol. Sampel daun dipotong tanpa mengikutsertakan tulang daun, ditimbang hingga mencapai berat sekitar 0,1 g dan ditambah 1 ml buffer ekstraksi lalu dilakukan penggerusan kemudian dimasukkan ke dalam tabung. Tabung diinkubasi pada suhu 65°C di dalam *water bath* selama 30 menit Selanjutnya ditambahkan 1x volume kloroform: isoamilalkohol (24:1), dan divortex, lalu disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru disertai dengan penambahan isopropanol dingin dan diinkubasi selama satu malam pada suhu -20°C. Setelah inkubasi, dilakukan sentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 8.000 rpm. Larutan isopropanol dibuang, pellet DNA dicuci dengan 500 μl ethanol 70% dan disentrifugasi selama 5 menit. Kemudian ethanol dibuang secara hati-hati, dan DNA dikering-anginkan. Untuk melarutkan pellet DNA ditambahkan 100 μl aquadest steril. Purifikasi DNA dilakukan menggunakan NucleoSpin® Gel dan PCR Clean Up Kit berdasarkan instruksi perusahaan.

Elektroforesis dilakukan dengan 1% gel agarosa dalam buffer 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM asam asetat, dan 1 mM EDTA) dengan pewarna Ethidium bromida (Etbr). Sebanyak 3 μL sampel DNA dielektroforesis dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Lambda DNA 100 ng dan 200 ng digunakan untuk memperkirakan konsentrasi DNA. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt

selama 30 menit. Visualisasi dilakukan dengan UV transluminator.

Sebanyak tujuh primer RAPD dicoba dalam reaksi PCR-RAPD untuk amplifikasi fragmen DNA kamboja. Nama primer dan urutan basa tiap primer disajikan pada Tabel 1.

PCR-RAPD (Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA)

Tabel 1. Jenis primer yang digunakan dalam analisis RAPD

No.	Nama Primer	Urutan Basa 5' - 3'
1.	UBC-106	CGTCTGCCCG
2.	UBC-127	ATCTGGCAGC
3.	UBC-250	CGACAGTCCC
4.	OPD-14	CTTCCCAAG
5.	OPF-11	TTGGTACCCC
6.	OPH-02	TCGGACGTGA
7..	OPH-06	ACGCATCGCA

Reaksi PCR dilakukan pada total volume 20 µL yang mengandung campuran 0,25 mM dNTPs (MDBio, Inc.), 4,375 mM MgCl⁻² (Vivantis), 1 U Taq DNA Polymerase (Vivantis), 1X buffer polymerase (Vivantis), 3 µM primer, 50 ng DNA, dan air steril sampai volume 20 µL. Amplifikasi dilakukan dalam mesin PCR (Infinigen) dengan kondisi program siklus menurut Uslan dan Pharmawati (2015) sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94° C selama 1 menit (sebanyak 1 kali), dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 94° C selama 2 menit, annealing pada suhu 36° C selama 2 menit, elongasi pada suhu 72° C selama 2 menit (diulangi 40 siklus), lalu elongasi akhir pada suhu 72° C selama 10 menit sebanyak 1 kali.

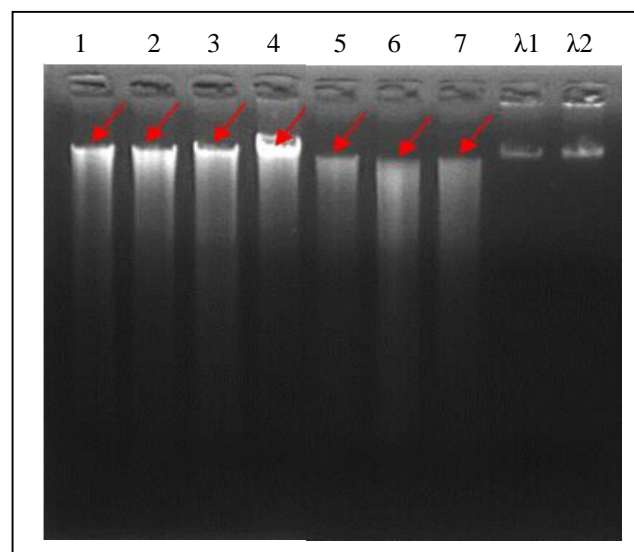
100 volt selama 50 menit. Sebagai *size marker* digunakan DNA ladder 100bp (VC 100bp DNA Ladder Plus). Pengamatan DNA dilakukan dengan menggunakan GelDoc.

Hasil PCR dielektroforesis dengan gel agarosa 1,5% dengan pewarna ethidium bromida pada tegangan

HASIL

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA *Plumeria* sp. sebanyak sembilan sampel menggunakan metode CTAB oleh Doyle dan Doyle (1990) yang telah dimodifikasi dan dilanjutkan dengan purifikasi menggunakan NucleoSpin® Gel dan PCR Clean Up Kit menghasilkan DNA yang tampak mengoles (Gambar 1) dengan konsentrasi berkisar antara 33-267ng/µl.

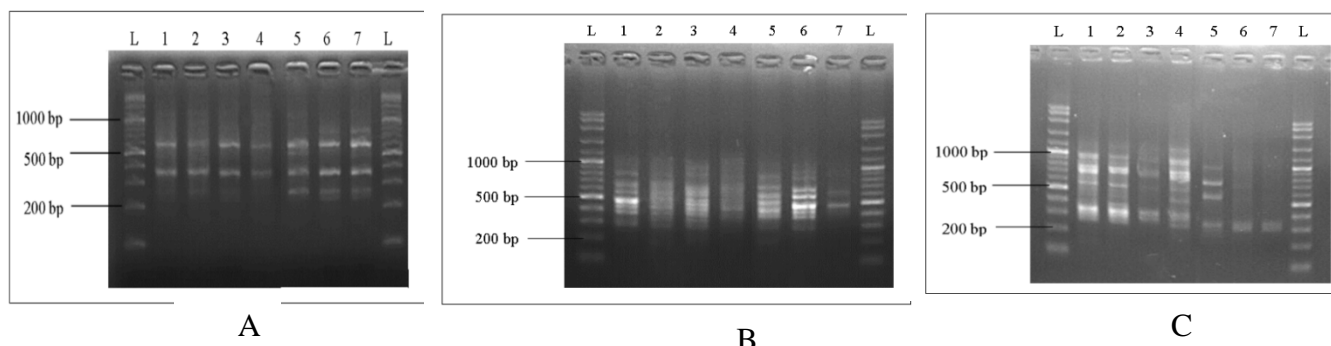


Gambar 1. Hasil elektroforesis tujuh sampel *Plumeria* sp. setelah purifikasi.
 1: *Plumeria acuminata* 'Sudamala Bali', 2: *P. acuminata* 'Bali Mas'
 3: *P. acuminata* 'Maroon', 4: *P. alba* 'Bali Hai Gold', 5: *Plumeria obtusa*,
 6: *Plumeria* sp. 'Jack Purple', 7: *Plumeria* sp. 'Madam Poni', λ1: 100 ng lambda DNA,
 λ2: 200 ng lambda DNA

PCR-RAPD (Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA)

(Gambar 2a), UBC-250 (Gambar 2b), dan OPH-06 (Gambar 2c).

Dari tujuh primer yang dicoba, hanya 3 primer yang menghasilkan produk PCR yaitu primer UBC-127



Gambar 2. Visualisasi hasil PCR sampel *Plumeria* sp. a. Primer UBC-127, b. Primer UBC-250, c. Primer OPH-06.
 Ket. L: VC 100bp Plus DNA Ladder, 1: *Plumeria acuminata* 'Sudamala Bali', 2: *P. acuminata* 'Bali Mas' 3: *P. acuminata* 'Maroon',
 4: *P. alba* 'Bali Hai Gold', 5: *Plumeria obtusa*, 6: *Plumeria* sp. 'Jack Purple', 7: *Plumeria* sp. 'Madam Poni'

Amplifikasi PCR-RAPD dengan primer UBC127 menghasilkan pita DNA dengan kisaran 220-700 bp ditunjukkan pada Gambar 2a. Hasil amplifikasi primer UBC-250 ditampilkan pada Gambar 2b dengan kisaran pita DNA 350-950 bp. PCR-RAPD dengan primer OPH-06 dapat mengamplifikasi fragmen DNA pada tujuh kultivar kamboja dengan kisaran ukuran fragmen 250-1100 bp (Gambar 2c).

PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA kamboja menggunakan buffer ekstraksi CTAB (Doyle dan Doyle, 1990) dengan modifikasi (Pharmawati, 2009) yang dilanjutkan dengan purifikasi menggunakan NucleoSpin® Gel dan PCR Clean Up Kit menghasilkan pita DNA yang disertai dengan *smear*. Hal ini berarti telah terjadi degradasi DNA. Kerusakan DNA genom dapat terjadi akibat degradasi senyawa sekunder yang dilepaskan ketika sel dihancurkan atau kerusakan akibat penanganan fisik. Keberadaan polisakarida dan metabolit sekunder dalam sel tanaman sering menyulitkan dalam isolasi asam nukleat (Wilkins and Smart, 1996).

Degradasi DNA dapat diminimalkan dengan penggunaan *liquid nitrogen* dan penambahan senyawa pereduksi β -merkaptotanol. Senyawa β -merkaptotanol berfungsi untuk mencegah proses oksidasi senyawa fenolik sehingga dapat menghambat aktivitas radikal bebas oleh oksidasi fenol terhadap asam nukleat (Wilkins & Smart, 1996).

Pada penelitian ini, PCR menggunakan konsentrasi sampel DNA sebanyak 50 ng, konsentrasi $MgCl_2$ 1,6 μM , konsentrasi primer 3 μM , dan konsentrasi dNTP 0,1 mM. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Randriani, dkk. (2012), penggunaan konsentrasi DNA *template* sebanyak 50 ng berhasil mengamplifikasi 17 sampel kultivar jambu mete menggunakan 24 primer dengan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA*. Penggunaan konsentrasi DNA sampel 50 ng juga dipergunakan oleh Uslan dan Pharmawati (2015) pada analisis keragaman tanaman Faloak menggunakan teknik PCR-RAPD.

Primer UBC-106, OPD-14, OPF-11 dan OPH-02 yang digunakan pada penelitian ini tidak menghasilkan produk amplifikasi DNA pada tanaman kamboja. Hal ini dapat disebabkan rendahnya kualitas DNA. Kemurnian yang rendah, misalnya karena adanya metabolit sekunder, akan menghambat penempelan primer pada susunan basa pada rantai DNA (Padmalatha dan Prasad, 2006).

Rendahnya konsistensi hasil PCR-RAPD juga disebabkan oleh beberapa faktor, di antaranya penempelan primer pada cetakan genom DNA tidak sempurna disebabkan karena tidak tepatnya konsentrasi komponen-komponen PCR RAPD dan pengaruh kualitas DNA templat (Pharmawati, 2009).

Menurut Ali *et al.* (2006), konsentrasi templat DNA sangat berkaitan dengan konsentrasi primer, sehingga perlu dicari optimalisasi rasio antara konsentrasi templat DNA dengan primer. Rasio yang tidak sesuai antara primer dan DNA cetakan dapat menyebabkan produk RAPD yang dihasilkan tidak konsisten.

Proses penempelan primer pada DNA cetakan dipengaruhi oleh ion Mg^{2+} . Masing-masing pasangan primer memerlukan konsentrasi ion Mg^{2+} yang berbeda untuk dapat menempel pada DNA cetakan dengan optimal sehingga menghasilkan produk PCR yang spesifik (Kramer & Coen, 2001).

Sambrook dan Russell (2001) melaporkan bahwa konsentrasi dNTP yang tinggi juga dapat menghambat reaksi PCR dan menghasilkan produk yang tidak spesifik. Konsentrasi dNTP yang rendah dapat mengurangi jumlah produk PCR, oleh karena itu diperlukan konsentrasi dNTP yang tepat dan optimal.

SIMPULAN

Ekstraksi DNA dari daun kamboja yang dikeringkan dengan silika gel setelah purifikasi menggunakan NucleoSpin® Gel dan PCR Clean Up Kit memiliki konsentrasi DNA berkisar antara 33-267 ng/ μl . Pada reaksi PCR-RAPD primer UBC-127, UBC25, dan OPH-06 berhasil mengamplifikasi DNA tanaman kamboja sehingga dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut.

KEPUSTAKAAN

- Ali, B.A., T.H. Huang, H.H.Salem, Q.D. Xie. 2006. Influence of Thermal Cycler day to day Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprints. *Biotechnology* 5: 324-329.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. A Rapid DNA Isolation Prosedur for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Dwiatmini, K., N.A. Mattjik, H. Aswidinor, N.I.T. Matus. 2003. Analisis pengelompokan dan hubungan kekerabatan spesies Anggrek *Phalaenopsis* berdasarkan kunci determinasi fenotifik dan marka molekuler RAPD. *J. Hort.* 13(1):16-27.
- Kramer M.F., D.M. Coen. 2001. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. *Current Protocols in Molecular Biology* 15.1.1- 15.1.14.
- Little, J. 2006. *Growing Plumerias in Hawai'i*. Mutual Publishing: Honolulu, Hawai'i.
- Padmalatha, K., M.N.V. Prasad. 2006. Optimization of DNA Isolation and PCR Protocol for RAPD Analysis of Selected Medical and Aromatic Plants of Conservation from Peninsular India. *African J. Biotech.* 5: 230-234.
- Pandey, R.N., R.P. Adam, L.E. Flournoy. 1998. Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) by Plant Polysaccharides. *Plant Molec. Biol. Rep.* 14:15-22.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi Ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. (Proteaceae). *J. Biologi* 13(1): 12-16.
- Randriani, E., C. Tresniawati, Syafaruddin. 2012. Pemanfaatan Teknik Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) untuk Pengelompokan secara Genetik Plasma Nutfah Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L.). *Bul. RISTRI* 3 (1): 1-6.
- Sambrook, J., D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 1-3. 3rd Ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York.
- Soemantri, H.I, T.J. Santoso, Minantyorini, A.D. Ambarwati, Sisharmini, A. Apriana. 2002. *Karakterisasi Molekuler Plasma Nutfah Tanaman Pangan*. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman.
- Uslan dan M. Pharmawati. 2015. Optimasi Konsentrasi DNA dan $MgCl_2$ pada Reaksi *Polymerase Chain Reaction-Random Amplified Polymorphic DNA* untuk Analisis Keragaman Genetik Tanaman Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br). *J. Bioslogos* 5 (1): 26-34.
- Wilkins, T.A., L.B. Smart. 1996. *Isolation of RNA from plant tissue*. A laboratory guide to RNA: isolation, analysis, and synthesis. New York, NY: Wiley-Liss, Inc. pp. 21-42.
- Wrasiati, L.P., A. Hartati, D.A.A.Yuarini. 2010. Kandungan Senyawa Bioaktif dan Karakteristik Sensoris ekstrak Simplisia Bunga Kamboja (*Plumeria* sp.). *J. Biologi* 15 (2):39 – 43.