
Analisis Pola Pita Beberapa Genotipe Kurma (*Phoenix dactylifera* L.) Menggunakan Primer RAPD

*Analysis of PCR Amplification of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Genotypes Based on RAPD Primers*

Annisa Fadhilah Sitepu, Eva Sartini Bayu*, Luthfi Aziz Mahmud Siregar

Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, USU, Medan 20155

*Corresponding author: evagirsang61@gmail.com

ABSTRACT

Date palm cultivation can be done using seeds, offshoot and through tissue culture (in vitro). Propagation through tissue culture also has disadvantages such as genetic changes known as somaclonal variation. The use of molecular markers can help early detection of genetic variation. One type of molecular markers commonly used for genetic variation is RAPD (Random Polymorphic Amplified DNA) markers. The aimed of the research was to analyze the polymorphism of Date Palm genotypes based on three RAPD primers. This research is conducted by taking 8 samples from tissue cultur propagation and 2 samples from seed propagation. A total 15 bands were scored, with the range of band size was 214bp - 1918bp measured using UVITEC Cambridge FireReader software and average of polimorphism was 74.40%. The absorbance value of DNA stock in Å260 / 280 ranged from 1.96 - 2.46

Key words: date palm, polymorphism, RAPD marker

ABSTRAK

Budidaya kurma dapat dilakukan dengan menggunakan biji, cabang (*offshoot*) dan melalui metode kultur jaringan (*in vitro*). Perbanyakan melalui kultur jaringan juga memiliki kelemahan seperti adanya perubahan genetik yang dikenal dengan istilah variasi somaklonal. Penggunaan marka molekuler dapat membantu untuk deteksi dini variasi genetik. Salah satu marka yang umum digunakan untuk mendeteksi variasi genetik adalah marka RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Penelitian ini bertujuan mengetahui tingkat polimorfisme beberapa genotype kurma menggunakan tiga primer RAPD. Materi genetik yang dianalisis merupakan 8 individu dari hasil perbanyakan kultur jaringan dan 2 individu dari hasil perbanyakan biji. Didapatkan 15 pita dengan ukuran berkisar antara 214bp - 1918bp diukur menggunakan *software UVITEC Cambridge FireReader* dan rata-rata persentase polimorfisme 74.40%. Nilai absorbansi stok DNA pada Å260/280 yang didapatkan berkisar antara 1.96 - 2.46

Kata kunci: kurma, polimorfisme, marka RAPD

PENDAHULUAN

Kurma (*Phoenix dactylifera* = date palm) adalah keluarga palma (palem),

diduga berasal dari nama Phoenician, "phoenix" yang berarti pohon kurma, dan "dactylifera" yang berasal dari kata Yunani "daktulos" yang berarti jari, yang

menggambarkan bentuk buah (Augstburger *et al.*, 2002).

Tanaman ini diduga berasal dari dataran Mesopotamia (Iraq) dan Afrika bagian Utara (Maroko) sekitar 4000 tahun sebelum Masehi dan tersebar ke melalui dua arah, yaitu dari Mesopotamia dan Afrika Utara (Rahmadani *et al.*, 2017)

Budidaya kurma dapat dilakukan dengan menggunakan biji, cabang (*offshoot*) dan melalui metode kultur jaringan. Perbanyakan tanaman secara generatif memerlukan bibit dalam jumlah yang besar serta membutuhkan waktu yang lama menghasilkan bibit baru yang seragam. Perbanyakan tanaman secara vegetatif melalui metode *offshoot* juga memiliki kekurangan seperti beberapa varietas kurma tidak menghasilkan *offshoot* (Jazinizadeh *et al.*, 2015).

Perbanyakan tanaman melalui teknik kultur jaringan merupakan salah satu metode yang tepat untuk perbanyakan tanaman secara komersil. Di Indonesia sendiri sudah banyak asosiasi kurma yang menjual bibit kurma hasil kultur jaringan secara komersial. Dengan teknik kultur jaringan diharapkan dapat memproduksi bibit secara masal dalam waktu yang relatif singkat (Widyawati, 2015)

Perubahan genetik pada hasil perbanyakan melalui kultur jaringan yang dikenal dengan istilah variasi somakonal. Salah satu jenis marka molekuler yang umum digunakan untuk mendeteksi variasi genetik adalah marka *Random Amplified Polymorphic DNA*. Pada teknik ini segmen DNA yang diamplifikasi bersifat acak, tidak diperlu diketahui sekuens DNA target (Kumari dan Takhur, 2014).

Berdasarkan penelitian Putri *et al.*, (2017) penggunaan teknik RAPD primer OPD-13 dapat menghasilkan 7 pita dan OPD-20 menghasilkan 2 pita pada tanaman kelapa sawit. Berdasarkan penelitian

Jayusman (2002) teknik RAPD primer OPO-16 dapat menghasilkan 2 pita pada tanaman kelapa sawit.

Deteksi perubahan genetik pada hasil perbanyakan dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan marka RAPD. Dari penelitian ini diharapkan akan didapatkan tingkat polimorfisme DNA tanaman kurma untuk dapat membantu dalam mempersingkat waktu seleksi untuk bahan tanam yang akan digunakan pada tahap selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun kurma hasil perbanyakan kultur jaringan yang diimport dari Inggris (K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, dan K8) dan daun kurma hasil perbanyakan biji (K9 dan K10) yang ditanam dalam polibag di kota Medan. Bahan kimia yang digunakan adalah Polyvinylpyrrolidone (PVPP), nitrogen cair, buffer ekstraksi CTAB (2 gr NaCl, 5 gr CTAB, 100 ml aquades), Buffer TAE (Tris-acetate-EDTA), buffer TE, KIAA (24ml klorofom: 1ml isoamil-alkohol) Hcl p.a, NaOH, Na-EDTA, isopropanol dingin, ethylenediamine tetraacetic (EDTA), β -mercaptoethanol 2%, etanol 70%, etanol absolute, loading dye (Promega), aquades, aquabidest, agarose.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar, alu, mikropipet ukuran 1-10 μ l, 20-100 μ l, 100-1000 μ l, tip pipet, autoklaf, waterbath, magnetik stirer, centrifuge, freezer, komputer, timbangan analitik, vortex, tube eppendorf 2ml dan 1.5ml, chambell well (bak elektroforesis), power supply, Gel-Doc (UV- Cambridge), pH meter.

Daun dibersihkan dengan air bersih kemudian disemprot dengan alkohol dan dilap dengan tisu, lalu dibuang tulang daunnya dan dipotong. Isolasi dilakukan

berdasarkan metode CTAB dari Orozco-Castilo (1994) yang dimodifikasi dengan penambahan PVPP dan β -mercaptoethanol.

Uji kualitas DNA dilakukan dengan elektroforesis metode standar dengan cara memasukkan 3 μ l stok DNA ditambah 2 μ l loading dye dan dihomogenkan. Uji Kuantitas DNA Sebanyak 1 μ l stok DNA diukur menggunakan Spektrofotometer sinar UV. Absorbansi (A) diukur pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer yang tersedia. Sebelum running PCR dilakukan pengenceran DNA dengan mengambil 1 μ l stok DNA dan ditambah 9 μ l ddH₂O. Reaksi PCR sebagai berikut: denaturasi awal (94°C), denaturasi (94°C), annealing (36°C), ekstensi (72°C) dan ekstensi akhir (72°C). Elektroforesis dilakukan pada kondisi 75 volt selama 60 menit dengan konsentrasi agarose 1.3%. Visualisasi DNA yang telah dielektroforesis dilakukan dengan UV transiluminator.

Untuk menentukan keragaman genetik, produk PCR – RAPD diskoring berdasarkan muncul tidaknya pita DNA. Pita yang muncul pada gel diasumsikan sebagai alel RAPD. Berdasarkan ada atau tidaknya pita, profil pita diterjemahkan kedalam data biner. Pita yang muncul diberi kode -1 (ada) dan -0 (tidak ada).

Analisis persentase alel polimorfis dihitung untuk melihat berapa persen alel polimorfisme yang terbentuk di setiap primer yang digunakan. Untuk menghitung persentase pita polimorfis, digunakan rumus:

$$\% \text{ Pita Polimorfik} = \frac{\sum \text{lokus yang polimorfik}}{\sum \text{lokus semuanya}} \times 100$$

Berdasarkan data hasil uji kuantitas DNA (tabel 1) menunjukkan absorbansi stok DNA pada λ 260/280 berkisar antara 1.96 - 2.46. Hasil kemurnian diatas 2.0 menunjukkan adanya kontaminan protein dan fenol. Hal ini dapat disebabkan karena adanya sisa-sisa etanol pada

Ukuran fragmen basa produk PCR ditentukan dengan menggunakan *software UVITEC Cambridge FireReader*. Fragmen DNA yang digunakan yaitu 1 kb DNA ladder Promega. Dengan menggunakan *software UVITEC Cambridge FireReader* maka ukuran pita DNA hasil amplifikasi dapat terukur. Program ini akan mengukur pita yang muncul berdasarkan ukuran ladder dimana data ukurannya harus diinput terlebih dahulu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Materi genetik yang digunakan untuk analisis berasal dari 10 daun kurma yang telah diisolasi menggunakan metode Orozco–Castillo (1994). Berikut data sampel terkait identitas dan hasil uji kualitas dan uji kuantitas pada Gambar 1 dan Tabel 1.

Uji kualitas DNA (Gambar 1), menunjukkan DNA yang dihasilkan solid, utuh dan mempunyai konsentrasi yang tinggi. Widiastuti (2017) menyatakan bahwa kualitas DNA dinyatakan baik bila hasil elektroforesis menunjukkan pola pita yang terang dan fokus. Artinya DNA yang dihasilkan cukup solid, utuh dan mempunyai konsentrasi yang tinggi.



Gambar 1. Visualisasi hasil uji kualitas 10 sampel DNA kurma

saat pengeringan yang tidak sempurna dan adanya sisa kandungan metabolit sekunder pada bagian tanaman yang diekstrak.

Tabel 1. Hasil uji kuantitas 10 sampel DNA kurma.

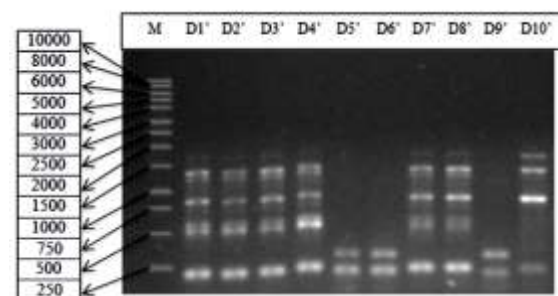
No.	Nama Sampel	A _{260/280}	Konsentrasi DNA (µg/ml)
1	K1	2,46	556,4
2	K2	2,07	434,6
3	K3	1,96	240,3
4	K4	2,36	251,2
5	K5	2,05	370,4
6	K6	2,01	438,9
7	K7	2,42	257,4
8	K8	2,33	493,7
9	K9	2,24	992,5
10	K10	2,24	883,3

Tabel 2. Hasil amplifikasi tiga primer RAPD

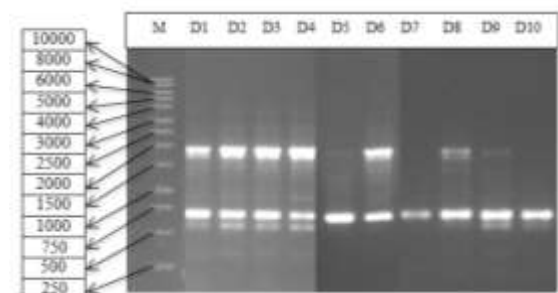
No.	Primer	Urutan Basa (5'-3')	Jumlah DNA Teramplifikasi	Ukuran Fragmen DNA
1.	OPD – 13	GGGGTGACGA	8	214–1755
2.	OPD – 20	ACCCGGTCAC	4	518–1918
3.	OPO – 16	ACACACGCTG	3	452–1162

Kandungan metabolit tersebut ditandai dengan kekentalan pada hasil isolasi DNA yang menyebabkan kesulitan dalam pengerjaan pemipetan DNA. Fatchiyah., *et al* (2009) menyatakan nilai kemurnian DNA yaitu 1.8 - 2.0 DNA yang tidak murni disebabkan karena adanya sisa-sisa etanol saat pengeringan yang tidak sempurna.

Hasil amplifikasi dengan menggunakan tiga primer RAPD yaitu OPD – 13, OPD – 20, dan OPO – 16 dapat mengamplifikasi 10 sampel DNA tanaman kurma. Hasil amplifikasi kemudian di elektroforesis, visualisasi hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 2, Gambar 3, dan Gambar 4. Primer OPD-13 mampu mengamplifikasi 10 DNA kurma dengan jumlah pita sebanyak 8 pita dan ukuran pita 214bp - 1755bp.



Gambar 2. Profil pita DNA kurma hasil amplifikasi menggunakan primer OPD-13; M=marker ladder 1kb (Promega), Dn'=sampel ke-n



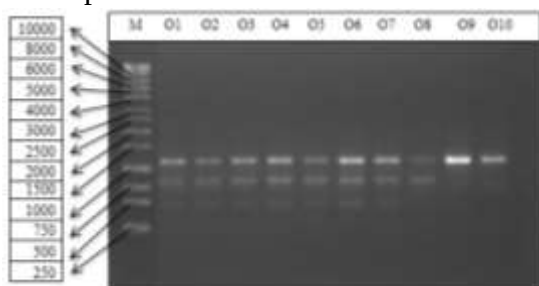
Gambar 3. Profil pita DNA kurma hasil amplifikasi menggunakan primer OPD-20; M=marker ladder 1kb (Promega), Dn=sampel ke-n



Tabel 3. Persentase polimorfisme 10 DNA Kurma

No	Nama Primer	Ukuran Pita (bp)	Σ Pita	Σ Pita Polimorfis	Σ Pita Monomorfis	% Polimorfis
1	OPD-13	214–1755	8	7	1	87,5%
2	OPD-20	518–1918	4	3	1	75%
3	OPO-16	452–1162	3	2	1	66,7%
		Rata-rata	5	4	1	74,40%

Primer OPD-20 mampu mengamplifikasi 10 DNA kurma dengan jumlah pita sebanyak 3 pita dan ukuran pita 452bp - 1162bp.



Gambar 4. Profil pita DNA kurma hasil amplifikasi menggunakan primer OPO-16; M=marker ladder 1kb (Promega), On=sampel ke-n

Berdasarkan hasil ketiga primer yang digunakan terdapat perbedaan pada jumlah pita yang dihasilkan berbeda-beda. Hal ini terjadi karena pada primer OPD-13 mampu mengenali keberadaan situs penempelan pada DNA template. Sehingga secara terus-menerus menghasilkan beberapa produk amplifikasi yang berbeda dengan bantuan enzim DNA polimerase. Prana dan Hartati (2003) menyatakan bahwa keberhasilan reaksi amplifikasi DNA ditentukan oleh suhu annealing.

Berdasarkan hasil visualisasi pita DNA dengan menggunakan *Gel-doc* terlihat adanya perbedaan intensitas pita yang dihasilkan, sebagian pita samar-samar (*blur*) dan sebagian terang dan tegas. Perbedaan intensitas pita DNA dipengaruhi oleh sebaran situs penempelan primer pada genom, kemurnian dan konsentrasi genom dalam reaksi. Menurut Apriyani (2005)

intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer sangat dipengaruhi oleh kemurnian dan konsentrasi DNA template dan situs penempelan primer pada DNA cetakan.

Berdasarkan data persentase polimorfisme (Tabel 3) pola pita yang muncul dari sampel yang berhasil teramplifikasi menunjukkan tingkat polimorfisme diatas 65% dengan jumlah pola pita yaitu, primer OPD – 13 sebanyak 8 pita dengan persen polimorfis sebesar 87,5%, primer OPD – 20 sebanyak 4 pita dengan persen polimorfis 75%, dan primer OPO – 16 sebanyak 3 pita dengan persen polimorfis sebesar 66,7%. Nilai polimorfisme yang tinggi ini dapat memberikan informasi bahwa 10 sampel tanaman kurma yang diuji memiliki tingkat keragaman genetik yang tinggi. Menurut Azizah (2009) persentase pita polimorfik yang tinggi menunjukkan tingginya variasi pada setiap individu yang diteliti.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil amplifikasi DNA 10 tanaman kurma yang memiliki nilai kemurnian DNA A260/A280 antara 1,96 – 2,46 menggunakan 3 primer RAPD, primer OPD-13 menghasilkan 8 pita dengan persen polimorfis 87,5%, primer OPD-20 menghasilkan 4 pita dengan persen polimorfis 75%, dan primer OPO-16 menghasilkan 3 pita dengan persen polimorfis 66,7%.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriyani, S. I. 2005. Analisis Keragaman Nenas Koleksi PKBT Berdasarkan Penanda Morfologi dan Penanda RAPD. IPB, Bogor
- Augstburger, F., J. Berger, U. Censkowsky, P. Heid, J. Milz, C. Streit. 2002. *Date Palm*. Naturland e. V 1st Edition, Germany
- Fatchiyah, E. L. Arumingtyas, S. Widyarti, S. Rahayu. 2009. Dasar-Dasar Analisa Biologi Molekuler. Brawijaya Press. Malang.
- Jayusman. 2002. Variabilitas Genetik Antar Populasi dan Interpopulasi Plasma Nutfah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Berdasarkan Marka Isoenzim dan Random Amplified Polymorphic DNA. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Jazinizadeh, E., R. Zarghami, A. Majd, A. Iranbakhsh, G. Tajaddod. 2015. In vitro production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. 'Barhee' plantlets through direct organogenesis. *Biological Forum – An International Journal* 7(2): 566-572(2015)
- Kumari, N., S.K. Thakur. 2014. *Random amplified polymorphic DNA*. American Journal of Animal and Veterinary Sciences. 9(1): 6-13.
- Prana T.K., N.S. Hartati. 2003. Identifikasi Sidik Jari DNA Talas (*C. esculata* L. Schoot) Indonesia dengan Teknik RAPD. *Jurnal Natur Indonesia* 5(2):107- 112.
- Putri, L. A. P., H. Laia., K. Lubis. 2017. Analisis Keragaman Genetik Klon Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Plasma Nutfah Pt. Socfindo Menggunakan Marka Rapd (Random Amplified Polymorphic DNA). Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Rahmadani, R. A., S. Bulkis, M. A. Budiman. 2017. Potensi Budidaya Kurma di Indonesia Ditinjau dari Perspektif Ekonomis dan Ekologis. Prosiding Seminar Nasional ASBIS. Politeknik Negri Banjarmasin
- Widiastuti, A. 2017. Prinsip Umum Pengujian DNA. Benih Tanaman Balai Besar PPMB-TPH
- Widyawati, H. 2015. Induksi Pertunasan *In Vitro* Pada Jaringan Pucuk Apikal Tanaman Kurma (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Barhee. IPB.