

Analisis Keragaman Genetik Tanaman Pala (*Myristica* sp.) di Minahasa Utara Menggunakan Penanda Molekuler Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Grentino Christofel Item^{1*}, Orbanus Naharia², Fanny Nella Nanlohy²

¹Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Manado

²Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Manado
Kampus Unima di Tondano

*Korespondensi penulis, email: Grentinoitem@gmail.com

Diterima 1 Maret 2020/Disetujui 2 Juni 2020

ABSTRACT

Search results based on morphology of nutmeg plant there are several types of nutmeg plants that grow in North Sulawesi, especially in North Minahasa Regency. Previous research on nutmeg plants has been done a lot but information about the genetic diversity of nutmeg plants is still lacking, especially in North Minahasa regency is still minimal. This study aims to determine the genetic diversity of nutmeg (*Myristica* sp.) In North Minahasa based on the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) molecular marker. Analysis of genetic diversity of nutmeg plants was carried out through several stages, namely DNA extraction and purification, DNA concentration and purity testing, target gene amplification using PCR (Polymerase Chain Reaction) method and finally visualization of amplification results with 1% agarose gel electrophoresis. Data analysis using IBM SPSS Ver. 20.0. The results of the study using six primers RAPD OPT 07, OPT 16, OPH 06, OPA 18, OPH 01 and OPH 02 showed that North Minahasa regency had a diverse population of nutmeg plants as indicated by the formation of polymorphic bands / samples of nutmeg used. Based on the analysis of dendrogram using SPSS 20 application shows that six samples used from three locations in North Minahasa consist of two different groups, generally based on clusters formed from the six primers used can be said to show polymorphism or variety.

Keywords: Genetic diversity, district North Minahasa, nutmeg, RAPD.

ABSTRAK

Hasil penelusuran berdasarkan pada morfologi dari tanaman pala terdapat beberapa jenis tanaman pala yang tumbuh di Sulawesi Utara khususnya di Kabupaten Minahasa Utara. Penelitian terdahulu terhadap tanaman pala telah banyak dilakukan tetapi informasi tentang keragaman genetik tanaman pala masih kurang khususnya di Kabupaten Minahasa Utara masih minim. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik tanaman pala (*Myristica* sp.) di Minahasa Utara berdasarkan penanda molekuler *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Analisis keragaman genetik tanaman pala dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu ekstraksi dan purifikasi DNA, uji konsentrasi dan kemurnian DNA, amplifikasi gen target menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan terakhir visualisasi hasil amplifikasi dengan elektroforesis gel agarose 1%. Analisis data menggunakan program SPSS IBM Ver. 20.0. Hasil penelitian menggunakan enam primer RAPD OPT 07, OPT 16, OPH 06, OPA 18, OPH 01 dan OPH 02 menunjukkan bahwa Kabupaten Minahasa Utara memiliki populasi tanaman pala yang beragam yang ditunjukkan dengan terbentuknya pita/*band* polimorfis sampel pala yang digunakan. Berdasarkan analisis dendrogram menggunakan aplikasi SPSS 20 menunjukkan bahwa enam sampel yang digunakan dari tiga lokasi yang ada di Minahasa Utara terdiri atas dua kelompok yang berbeda, secara umum berdasarkan cluster yang terbentuk dari keenam primer yang digunakan dapat dikatakan menunjukkan polimorfisme atau beragam.

Kata kunci : Keragaman Genetik, Kabupaten Minahasa Utara, Pala, RAPD.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan pengeksport pala terbesar ke-3 di dunia setelah Guatemala dan India dengan tujuan ekspor terbesarnya adalah Vietnam, Belanda, Amerika Serikat, India, Jerman, Jepang, Italia dan Pakistan pada tahun 2016. Indonesia mampu memenuhi kebutuhan pala dunia sebesar 16 % dari total nilai volume ekspor pala dunia (ITC 2016). Kabupaten Minahasa Utara merupakan salah satu sentra produksi pala di Provinsi Sulawesi Utara. Penghasil pala hampir tersebar di seluruh Kabupaten Minahasa Utara dan sebagian penduduknya bergantung pada sektor pertanian khususnya pada komoditas pala. Bagian tanaman pala yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi adalah biji, buah dan fulinya yang memiliki berbagai manfaat bagi kebutuhan manusia, dan juga merupakan sumber pertumbuhan ekonomi dan pendapatan daerah (Kaunang 2014).

Berdasarkan hasil wawancara masyarakat lokal dan Observasi di Sulawesi Utara khususnya di Kabupaten Minahasa Utara terdapat keragaman dari tanaman pala dilihat dari morfologi daun ada yang berbentuk lonjong, bulat dan lanset demikian juga ujung daun dari tanaman pala ada yang runcing, meruncing dan tumpul. Selain daunnya keragaman morfologi juga terdapat pada buah dari tanaman pala antara lain buahnya ada yang berbentuk bulat, lonjong dan oval oleh sebab itu maka identifikasi keragaman secara molekuler sangat diperlukan untuk mendapatkan informasi dan data ilmiah tentang jenis dari tanaman pala yang ada di Minahasa Utara.

Berbagai daerah di Provinsi Sulawesi Utara, pala menjadi salah satu komoditi unggulan yang memberikan kontribusi terhadap pertumbuhan daerah. Ada beberapa daerah di Provinsi Sulawesi Utara yang merupakan penghasil pala, antara lain di daerah Kabupaten Minahasa Utara dan Kabupaten Kepulauan Sitaro yang

merupakan sentra produksi pala. Penghasil pala hampir terbesar di seluruh Kabupaten Minahasa Utara dan hampir sebagian penduduknya bergantung pada sektor pertanian khususnya pada komoditi pala (Pangalima et al. 2016).

Salah satu cara dalam mengetahui keragaman genetik suatu tanaman adalah dengan menggunakan penanda molekuler, penanda molekuler yang digunakan dalam menganalisis keragaman salah satunya adalah teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Metode RAPD digunakan untuk mendeteksi polimorfisme DNA yang digunakan sebagai genetik marker (penanda genetik) dan menentukan hubungan kekerabatan pada bermacam-macam tanaman dan serangga hama. Metode ini mengandalkan menggunakan primer tunggal (oligonukleotida sintetik) untuk mulai PCR. Istilah random agak kurang tepat, hanya komponen random dimulainya pilihan primer untuk PCR, karena primer tunggal memilih secara random daerah-daerah genom urutan DNA tertentu untuk amplifikasi dan biasanya ditemukan dalam kisaran ukuran DNA 0,1 dan 3 kb dengan PCR menghasilkan banyak kopi segmen DNA (Anggereini 2008). Menurut Demeke dan Adams (1994) Analisis RAPD adalah teknik yang sederhana, cepat, akurat dan lebih murah, membutuhkan sampel DNA lebih sedikit (0,5-50 ng), tidak memerlukan radioisotop dan tidak terlalu membutuhkan keahlian untuk pelaksanaannya, teknik ini baik digunakan untuk mengkarakterisasi koleksi plasma nutfah dibandingkan dengan teknik RFLP.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman dari tanaman pala yang ada di Minahasa Utara dengan teknik RAPD. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang keragaman dari tumbuhan pala.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioaktivitas dan Biomolekuler Jurusan Biologi FMIPA UNIMA pada bulan Juli sampai Oktober 2018. Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu ekstraksi dan purifikasi DNA, uji konsentrasi dan kemurnian DNA, amplifikasi gen target menggunakan metode PCR dan visualisasi hasil amplifikasi dengan elektroforesis gel agarose menggunakan QIAxcel Advanced dari QIAGEN.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari pemotretan gel hasil RAPD berupa pita-pita DNA diurutkan dari batas bawah sumur sampai batas bawah pita yang masih tampak. Analisis data didasarkan pada ada atau tidaknya pita. Profil pita diterjemahkan ke dalam bentuk biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada pita dan 1 untuk ada pita pada satu posisi yang sama dari nomor-nomor sampel yang dibandingkan. Analisis data matriks klustering (*cluster analysis*) dilakukan dengan pembuatan dendrogram sesuai dengan (Uyoh et al. 2014). Data ini kemudian disalin dalam bentuk dendrogram menggunakan program SPSS IBM Ver. 20.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1) Preparasi sampel

Sampel berupa daun pala muda diambil dari tiga lokasi atau tiga desa yang dibawa naungan Kabupaten Minahasa Utara yaitu, Desa Wori Kecamatan Wori, Desa Patokaan Kecamatan Talawaan dan Desa Paslaten Kecamatan Kauditan. Daun Pala muda ini dipersiapkan dengan cara penggerusan menggunakan nitrogen cair yang diperoleh dari PT Aneka Gas Bitung. Penggerusan daun memerlukan tiga helai daun untuk di preparasikan, kemudian setelah daun berbentuk serbuk selanjutnya serbuk tersebut ditimbang sebanyak 50 mg yang nantinya sampel tersebut akan dilanjutkan pada tahap ekstraksi dan purifikasi DNA.

2) Ekstraksi dan Purifikasi DNA

Proses Ekstraksi dan Purifikasi DNA dilakukan dengan mengikuti pedoman protokol *Kit Genomic DNA Plant Geneiad* dengan memodifikasinya dibagian tahapan lisis, dalam protocol inkubasi RNA-ase diinkubasi selama 10 menit pada suhu 60° C dan dimodifikasi menjadi 20 menit menggunakan inkubator dengan memperoleh hasil akhir yaitu DNA Total dari sampel daun Pala yang di ekstrak dari jaringan daun muda (Gambar 1).



Gambar 1. DNA hasil ekstraksi dan purifikasi

3) Uji konsentrasi dan kemurnian DNA

Untuk memastikan kualitas dari hasil ekstraksi dan purifikasi DNA yang dilakukan maka kita perlu untuk melakukan pengujian konsentrasi dan kemurnian DNA. Kuantitas hasil pengujian konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan alat Spektrofotometer UV-VIS dapat dilihat pada (tabel 1).

Tabel 1. Uji Konsentrasi dan Kemurnian DNA

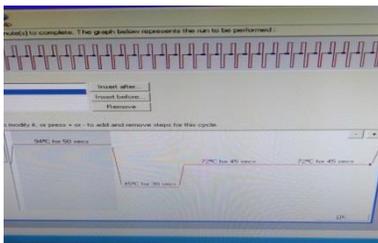
No	Sampel	Konsentrasi (50µg/ml)	Kemurnian
1	Pala Patokaan (PP1)	7,2	144
2	Pala Patokaan (PP2)	4,45	0,797
3	Pala Wori (PW1)	7,2	0,941
4	Pala Wori (PW2)	5,85	0,906
5	Pala Kauditan (PK1)	0,05	0,111
6	Pala Kauditan (PK2)	1,85	0,462

4) Amplifikasi gen target metode PCR

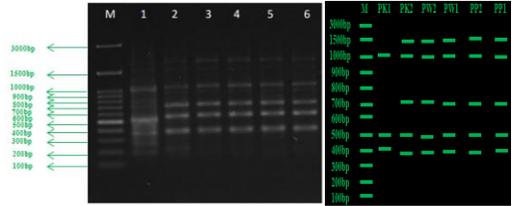
Komponen untuk amplifikasi gen target menggunakan metode PCR dilakukan dalam volume per tube 50µL dengan komposisi 2µL primer RAPD, 2x My Tag HS Red Mix Bioline 21µL, 2 µL DNA template, dan 25µL DdH₂O. Kondisi pada saat PCR setiap siklus terdiri dari tahap Denaturasi 94°C selama 50 detik, Annealing (penempelan primer) 45°C selama 30 detik, Extention (pemanjangan primer) 72°C selama 45 detik dan Final extention (perpanjangan basa nitrogen untuk siklus terakhir) pada suhu 72°C selama 45 menit.

5) Visualisasi hasil amplifikasi menggunakan elektroforesis gel agarose

Penelitian ini menggunakan 6 primer RAPD yaitu OPA 18,OPH 01,OPH 02,OPH 06 OPT 16 dan OPT 07, namun yang digunakan hanya primer OPT 16, OPT 07, OPH 06 dan OPA 18 diseleksi dari 6 primer yang ada ditemukan berdasarkan penelitian dari Uyoh dkk. (2014); Sheeja dkk. (2013) untuk *Myristica*. Keempat primer yang digunakan dalam penelitian mampu memberikan hasil dari produk amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dibuktikan lewat hasil elektroforesis menggunakan gel agarose 1%. Visualisasi dari DNA target hasil elektroforesis menunjukkan pola pita yang cukup baik. Profil pita dari DNA hasil elektroforesis dapat di konversikan kedalam data biner selanjutnya dapat diubah kedalam bentuk dendogram.

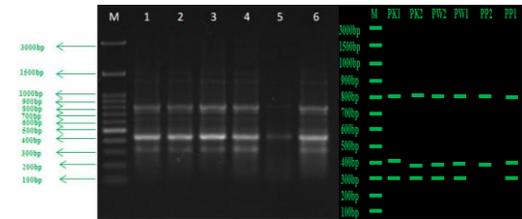


Gambar 2. Proses Amplifikasi Gen Target dengan Metode PCR



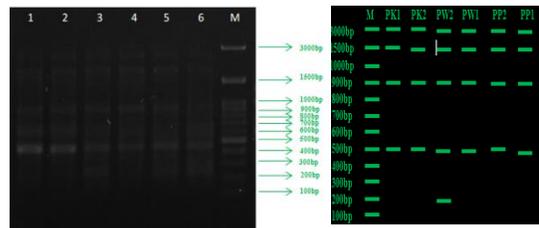
Gambar 3. Visualisasi Hasil Amplifikasi dengan Elektroforesis Gel Agarose

- (a) Profil Pita Hasil Elektroforesis pada Tanaman Pala Kabupaten Minahasa Utara dengan primer OPT 16
- (b) Representatif hasil Elektroforesis Gel Agarose dari Desa Kauditan (PK1 dan PK2) Desa Wori (PW1 dan PW2), Desa Patokaan (PP1 dan PP2).



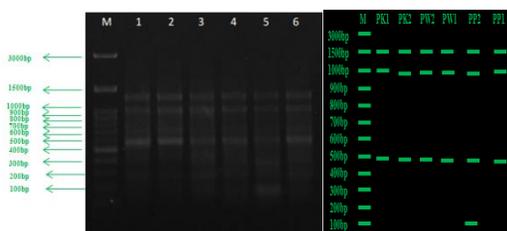
Gambar 4. Visualisasi Hasil Amplifikasi dengan Elektroforesis Gel Agarose

- (c) Profil Pita Hasil Elektroforesis pada Tanaman Pala Kabupaten Minahasa Utara dengan primer OPT 07
- (d) Representatif hasil Elektroforesis Gel Agarose dari Desa Kauditan (PK1 dan PK2) Desa Wori (PW1 dan PW2), Desa Patokaan (PP1 dan PP2).



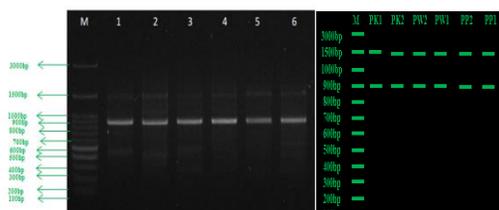
Gambar 5. Visualisasi Hasil Amplifikasi dengan Elektroforesis Gel Agarose

- (e) Profil Pita Hasil Elektroforesis pada Tanaman Pala Kabupaten Minahasa Utara dengan primer OPH 06
- (f) Representatif hasil Elektroforesis Gel Agarose dari Desa Kauditan (PK1 dan PK2) Desa Wori (PW1 dan PW2), Desa Patokaan (PP1 dan PP2).



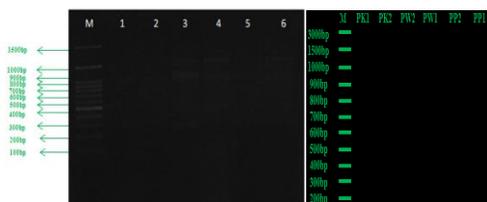
Gambar 6. Visualisasi Hasil Amplifikasi dengan Elektroforesis Gel Agarose

- (a) Profil Pita Hasil Elektroforesis pada Tanaman Pala Kabupaten Minahasa Utara dengan primer OPA 18
- (b) Representatif hasil Elektroforesis Gel Agarose dari Desa Kauditan (PK1 dan PK2) Desa Wori (PW1 dan PW2), Desa Patokaan (PP1 dan PP2).



Gambar 7. Visualisasi Hasil Amplifikasi dengan Elektroforesis Gel Agarose

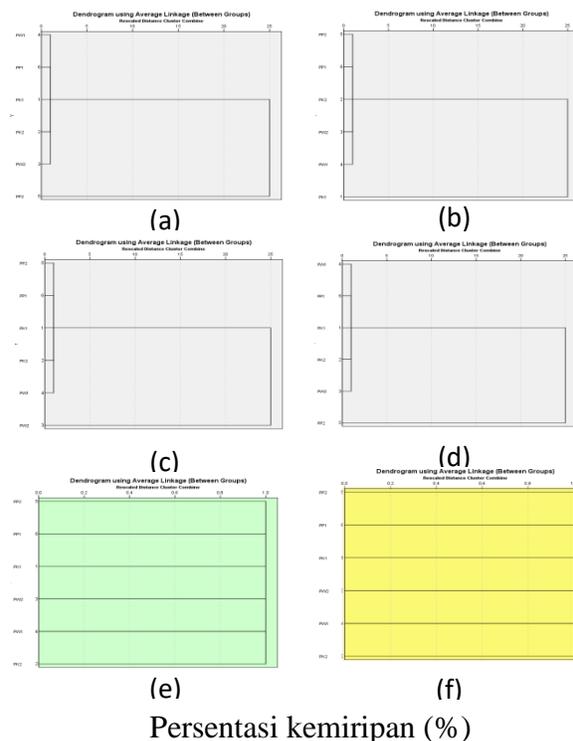
- (c) Profil Pita Hasil Elektroforesis pada Tanaman Pala Kabupaten Minahasa Utara dengan primer OPH 01
- (d) Representatif hasil Elektroforesis Gel Agarose dari Desa Kauditan (PK1 dan PK2) Desa Wori (PW1 dan PW2), Desa Patokaan (PP1 dan PP2).



Gambar 8. Visualisasi Hasil Amplifikasi dengan Elektroforesis Gel Agarose

- (e) Profil Pita Hasil Elektroforesis pada Tanaman Pala Kabupaten Minahasa Utara dengan primer OPH 02
- (f) Representatif hasil Elektroforesis Gel Agarose dari Desa Kauditan (PK1 dan PK2) Desa Wori (PW1 dan PW2), Desa Patokaan (PP1 dan PP2).

Kemiripan hasil dari amplifikasi semua pita DNA dapat dilihat menggunakan program SPSS IBM ver. 20 untuk melihat hasil analisis *cluster*/pengelompokan dapat dilihat pada (Gambar 9)



Gambar 9. Dendrogram yang menunjukkan hubungan similaritas dari enam sampel pala berdasarkan primer (a) OPT 07, (b) OPT 16, (c) OPH 06, (d) OPA 18, (e) OPH 01 dan (f) OPH 02.

Hasil analisis dendrogram pengelompokkan sampel pala pada primer OPT 07, OPT 16, OPH 06 dan OPA 18 menunjukkan bahwa, jarak kemiripan genetik antara 1-25% yang membentuk 2 *cluster*. Pada Primer OPT 07 Cluster pertama yang terbentuk pada sampel pala dari desa Wori (PW1 dan PW2), sampel pala dari desa Patokaan (PP1) dan sampel pala dari Kauditan (PK1 dan PK2) menunjukkan kemiripan genetik dengan membentuk satu kelompok/cluster pada indeks kemiripan 1%

hasil yang sama ditunjukkan pada Primer OPA 18, hasil yang berbeda ditunjukkan pada primer OPT 16 dimana cluster pertama terbentuk pada sampel pala dari desa Patokaan (PP1 dan PP2), sampel pala dari desa Wori (PW1 dan PW2) dan pala dari Kauditan (PK2) menunjukkan kemiripan genetik dengan membentuk satu kelompok/ cluster pada indeks kemiripan 1%, hasil yang berbeda juga ditunjukkan oleh Primer OPH 06 dimana cluster pertama yang terbentuk pada sampel pala dari desa Patokaan (PP1 dan PP2), sampel pala dari Kauditan (PK1 dan PK2) dan pala dari Wori (PP1). Cluster kedua pada primer OPT 07 dan OPA 18 menunjukkan hasil yang sama bahwa pala dari Kauditan (PK1) dan pala dari Patokaan (PP2) membentuk satu kelompok menunjukkan kemiripan genetik pada indeks kemiripan 25%, hasil ini juga berbeda dengan primer OPT 16 dan OPH 06, dimana pada primer OPT 16 pala dari Kauditan (PK1 dan PK2) membentuk satu kelompok menunjukkan indeks kemiripan 25%, sedangkan pada primer OPH 06 pada dari Kauditan (PK1) dan Pala dari Wori (PW2) membentuk satu kelompok menunjukkan kemiripan genetik pada indeks kemiripan 25%. Hasil yang berbeda pula ditunjukkan oleh primer OPH 01 dan OPH 02 dimana semuanya membentuk 1 cluster dengan indeks kemiripan 1%.

Dalam penelitian ini salah satu komponen yang sangat penting adalah DNA genom total yang merupakan hasil dari ekstraksi dan purifikasi, karena DNA genom ini yang nantinya menjadi DNA template yang nantinya akan diamplifikasi menggunakan beberapa primer yang dipilih berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya. Tahapan yang dilakukan pada awal penelitian adalah pengumpulan sampel dari beberapa lokasi yang ditentukan, selanjutnya sampel tersebut dilakukan penggerusan menggunakan nitrogen cair. Penggunaan nitrogen cair memiliki keuntungan dalam proses diasosiasi/penghancuran jaringan, karena

nantinya dengan penggunaan nitrogen cair maka sampel tersebut akan terliofilisasi atau membeku, proses ini memudahkan dalam penggerusan sampel penggunaan teknik ini lebih baik dibandingkan dengan teknik penggerusan dengan cara yang konvensional. Djaman dkk (2006) menyatakan bahwa suhu dari nitrogen cair mempunyai suhu -196°C sangat berguna untuk menjaga sampel tetap seperti semula. Pada suhu dingin enzim-enzim menjadi inaktif hal untuk mencegah sampel tidak mengalami denaturasi dan rusak. Tahap selanjutnya yang dilakukan adalah ekstraksi dan purifikasi DNA. Dalam mengisolasi DNA tahapan yang paling penting adalah dalam tahapan lisis atau pemecahan dinding sel untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel. Menurut Langga, dkk (2012) DNA yang kurang murni dan pengenceran yang kurang tepat akan menyebabkan tidak menempelnya primer pada DNA target. Hal ini ditegaskan oleh Young, dkk dalam Langga, dkk (2012) dimana pananda genetik (RAPD) sangat sensitif pada kondisi reaksi serta kualitas DNA templat. Oleh karena itu diperlukan konsentrasi dan kemurnian DNA primer serta prosedur penyiapan DNA genom konsisten.

Data kuantitatif hasil pengujian konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan spektrofotometer UV-VIS dapat dilihat pada (tabel 2). konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh menggunakan spektrofotometer dapat dihitung melalui perkalian nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dikalikan dengan faktor pengenceran $50\mu\text{g/ml}$ (Sambrook, dkk 1989). DNA hasil isolasi menunjukkan perhitungan konsentrasi DNA berkisar antara 0,05 sampai $7,2\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi paling tinggi terdapat pada sampel PP1 dan PW1 sebesar $7,2\mu\text{g/ml}$ dan paling rendah terdapat pada sampel PK1 sebesar $0,05\mu\text{g/ml}$. Beberapa faktor pada saat ekstraksi DNA dapat mempengaruhi kuantitas dari konsentrasi DNA yang dihasilkan. Menurut Komalasari (2009), Konsentrasi hasil

ekstraksi DNA dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu kecepatan ekstraksi dan komposisi penambahan lisis buffer. Faktor kecepatan ekstraksi merupakan faktor paling berpengaruh karena pada tahapan lisis sel dan presipitasi pengambilan supernatan harus dilakukan persampel, sehingga beberapa sampel terjadi pengendapan DNA. Komalasari (2009), menambahkan bahwa kecepatan dan lama sentrifugasi dapat mempengaruhi konsentrasi hasil dari ekstraksi DNA. Kecepatan sentrifugasi 10.000 rpm menghasilkan rata-rata konsentrasi DNA yang relatif lebih tinggi dibandingkan pada kecepatan sentrifugasi 12.000 rpm. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan DNA dan komponen-komponen lain, tetapi kemungkinan DNA dapat tercampur dengan komponen yang lain seperti protein, RNA, lipid, dan polisakarida pada putaran sentrifugasi yang lebih cepat.

Tingkat kemurnian DNA hasil ekstraksi merupakan tahapan lain selain konsentrasi DNA yang menjadi tahapan penting karena sebagai salah satu parameter dari segi penentuan kuantitatif. DNA yang berkualitas baik adalah fragmen DNA dengan ukuran besar. Kemurnian DNA yang digambarkan oleh nilai rasio absorbansi pada 260 dan 280 nm berkisar antara 1.069 dan 1.918. Suatu DNA hasil isolasi dikatakan memiliki kemurnian tinggi jika nilai absorbansinya berkisar antara 1,8-2,0 (Kirby 1990) dalam Palupi (2010). Pada penelitian ini menunjukkan bahwa lima sampel memiliki kemurnian dibawah 1,8 yang berarti lima sampel tersebut telah terkontaminasi dengan protein yaitu pada sampel PP2 0,794; PW1 0,941; PW2 0,906; PK1 0,111 dan PK2 0,462, sedangkan hasil yang menunjukkan kemurniaan diatas 2,0 ditemukan pada sampel PP1 144. Hasil kemurnian diatas 2,0 itu diakibatkan karena DNA hasil ekstraksi telah terkontaminasi dengan senyawa berat seperti molekul kecil RNA. Berdasarkan nilai kemurnian yang

didapat maka dapat diketahui bahwa masih terdapat kontaminan berupa protein dan phenol pada DNA yang berhasil diisolasi. Selain kontaminasi protein dan phenol, rasio DNA yang kurang dari 1,7 disebabkan adanya kontaminasi bahan kimia lainnya seperti Tris, EDTA, etanol, sodium asetat yang akan menyebabkan kontaminasi pada sampel (Khosravinia, dkk 2007) dalam Komalasari (2009). Beberapa faktor yang menyebabkan kemurnian dari DNA hasil isolasi rendah. Selain sampel terkontaminasi dengan bahan kimia, selain itu RNA dan protein juga menjadi penyumbang besar dalam kontaminasi sampel, sehingga hasil yang didapatkan tidaklah murni. Dalam meningkatkan kemurnian DNA hasil ekstraksi perlu dilakukan pemurnian pada DNA hasil isolasi dengan penambahan RNA-ase, selain itu faktor penentu lainnya adalah tingkat ketelitian dalam bekerja harus diperhatikan. Dalam penelitian Porebski, dkk (1997) beberapa faktor yang mempengaruhi tingkat kemurnian DNA yaitu seperti DNA hasil ekstraksi yang tidak terlarut secara sempurna sehingga berpengaruh terhadap pembacaan pada alat spektrofotometri, adanya polifenol dan tingginya viskositas hasil isolasi hal ini merupakan agen-agen oksidator yang menyebabkan penurunan kemurnian dari DNA hasil isolasi.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan primer OPT 07, OPT 16, OPH 06, OPA 18, OPH 01 dan OPH 02 yang merupakan 6 primer hasil seleksi yang terpilih diambil berdasarkan penelitian sebelumnya dari Uyoh, dkk (2014); Sheeja dkk. (2013) untuk *Myristica*. Keempat primer yang digunakan dalam penelitian ini mampu menghasilkan produk hasil amplifikasi dengan menggunakan metode pcr dan dibuktikan dengan adanya hasil elektroforesis pada gel agarose 1%. Hasil dari visualisasi DNA hasil elektroforesis menunjukkan adanya profil pita yang cukup baik. Kedua primer tidak dipilih

karena berdasarkan pada hasil elektroforesis tidak menunjukkan hasil yang baik. Menurut Sinaga, dkk (2017) Untuk menentukan keragaman genetic, produk PCR – RAPD diskoring berdasarkan muncul tidaknya pita DNA. Pita yang muncul pada gel diasumsikan sebagai alel RAPD. Keragaman alel RAPD ditentukan dari perbedaan jumlah pita yang terbentuk dari masing-masing individu sampel.

Hasil elektroforesis dari primer OPT 07, OPT 16, OPH 06 dan OPA 18 didapatkan pita-pita polimorfis yang dapat membedakan dan mengelompokan variasi atau keragaman dari tanaman pala. Profil pita yang terlihat pada hasil elektroforesis kemudian dikonversikan kedalam bentuk data biner. Menurut Karsina, dkk (2002), Analisis data didasarkan pada ada atau tidaknya pita. Profil pita DNA diterjemahkan kedalam bentuk data biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak adanya pita dan nilai 1 untuk adanya pita DNA pada satu posisi yang sama dari individu-individu yang dibandingkan. Amplifikasi DNA dari beberapa sampel tanaman Pala dengan menggunakan Primer OPT 07 menghasilkan amplikon berupa pita dengan pola yang berbeda. Seluruh sampel berjumlah enam dengan primer OPT 07 membentuk Pita berjumlah 17 pita DNA dengan ukuran yang beragam berkisar 100bp-3000bp. Sampel dari Kauditan, Wori dan Patokaan (PK1, PK2, PW1, PW2 dan PP1 sampel no. 1, 2 ,3 , 4 dan 6) menghasilkan pita sebanyak 3 pita masing-masing berukuran 800bp, 400bp, 300bp; Hasil ini berbeda dengan sampel dari Patokaan (PP2 sampel no. 5) yang hanya menghasilkan 2 pita masing-masing berukuran 800bp, 400bp. Pada primer OPT 16 membentuk pita berjumlah 28 pita DNA dengan ukuran yang beragam pula berkisar 100bp-300bp. Sampel dari Kauditan, Wori dan Patokaan (PK2, PW1, PW2 dan PP1 sampel no. 2,3 , 4, 5 dan 6) menghasilkan pita sebanyak 5 pita masing-masing berukuran 1500bp, 1000bp, 700bp,

500bp, 400bp; Sampel dari Kauditan (PK1 sampel no. 1) menghasilkan pita sebanyak 3 pita masing masing berukuran 1000bp; 500bp; 400bp; Pada Primer OPH 06 membentuk pita berjumlah 25 pita DNA dengan ukuran yang beragam berkisar 100bp-3000bp. Sampel dari Kauditan, Wori dan Patokaan (PK1, PK2, PW1,PP 1 dan PP2 sampel no. 1, 2 , 4,5 dan 6) menghasilkan pita sebanyak 4 pita masing-masing berukuran 3000bp, 1500bp, 900bp, 500bp; sampel dari Wori (PW 2 sampel no. 3) menghasilkan pita sebanyak 5 pita masing-masing berukuran 3000bp, 1500bp, 900bp, 500bp, 200bp; Pada Primer OPA 18 membentuk pita berjumlah 19 pita DNA dengan ukuran yang beragam berkisar 100bp-3000bp. Sampel dari Kauditan, Wori dan Patokaan (PK1, PK2, PW1,PW2 dan PP1 sampel no. 1, 2, 3, 4 dan 6) menghasilkan pita sebanyak 3 pita masing-masing berukuran 1500bp, 1000bp,500bp; sampel dari Patokaan (PP2 sampel no. 5) menghasilkan pita sebanyak 4 pita masing-masing berukuran 1500bp, 1000bp,500bp, 100bp dapat dilihat pada gambar 6,7,8 dan 9. Pada primer OPH 01 menghasilkan pita sebanyak 12 pita masing-masing berukuran 1500bp dan 900bp sedangkan, pada primer OPH 02 tidak ada pita yang terbentuk.

Hasil visualisasi elektroforesis menunjukkan bahwa setiap sampel teramplifikasi dan menunjukkan perbedaan pada jumlah pita yang terbentuk pada primer OPT 16 menghasilkan 3-5 pita dan memiliki perbedaan antara sampel, yang tidak memiliki perbedaan terdapat pada sampel PK2, PW1, PW2,PP1 dan PP2 yang menghasilkan jumlah pita yang sama yaitu sebanyak 5 pita dan merupakan sampel dengan jumlah pita tertinggi, sedangkan jumlah pita terendah terdapat pada sampel PK1 yang menghasilkan jumlah pita sebanyak 3 pita. Hasil yang berbeda ditunjukkan pada primer OPT 07 yang menghasilkan pita antara 2- 3 pita dan memiliki perbedaan antar sampel. Jumlah pita tertinggi terdapat pada sampel PK1, PK2,

PW1, PW2 dan PP1 yang menghasilkan jumlah pita sebanyak 3 pita, sedangkan jumlah pita terendah terdapat pada sampel PP2 yang menghasilkan jumlah pita sebanyak 2 pita, pada Primer OPH 06 menghasilkan pita antara 4-5 pita dan memiliki perbedaan antar sampel. Jumlah pita tertinggi terdapat pada sampel PK1, PK2, PW1, PP1 dan PP2 yang menghasilkan jumlah pita sebanyak 5 pita, sedangkan jumlah pita terendah terdapat pada sampel PW2 yang menghasilkan jumlah pita sebanyak 4 pita, pada Primer OPA 18 menghasilkan pita antara 3-4 pita dan memiliki perbedaan antar sampel. Jumlah pita tertinggi terdapat pada sampel PK1, PK2, PW1, PW2 dan PP1 yang menghasilkan jumlah pita sebanyak 4 pita, sedangkan jumlah pita terendah terdapat pada sampel PP2 yang menghasilkan jumlah pita sebanyak 3 pita. Hasil yang ditunjukkan pada primer OPH 01 menghasilkan 2 pita yang semuanya seragam, sedangkan pada primer OPH 02 tidak ada pita yang terbentuk. Menurut Sinaga (2017) Semakin banyak pita polimorfik yang dihasilkan akan semakin mudah untuk mengamati adanya variasi. Pita polimorfik terbentuk dari perbedaan ukuran pita yang terbentuk pada setiap sampel yang diteliti. Pola pita yang terbentuk oleh setiap sampel unik dan berbeda-beda. Hal ini menunjukkan adanya keragaman atau variasi genetik dari sampel pala yang diteliti. Agustian (2008) dalam Sinaga (2017) menyatakan perbedaan pola pita dapat ditunjukkan dalam perbedaan jumlah pita yang dihasilkan. Perbedaan pola pita dapat menggambarkan perbedaan genetik sampel.

Pada empat primer yaitu OPT 07, OPT 16, OPH 06 dan OPA 18 yang digunakan menunjukkan perbedaan pola pita yang terbentuk ini merupakan prinsip kerja dari RAPD dimana situs penempelan dari primer yang sembarang tempat tergantung pada daerah genom dari tanaman pala tersebut, oleh sebab itu semakin banyak jenis primer yang digunakan akan semakin terwakili bagian-

bagian genom dari tanaman pala (Palupi 2010). Pada primer OPH 01 menunjukkan pola yang terbentuk seragam atau tidak ada perbedaan pada pita yang terbentuk atau tidak teramplifikasi. Menurut (Pramudita 2016) Primer yang tidak bisa teramplifikasi menunjukkan bahwa primer tersebut tidak mampu melakukan annealing ketika PCR dilakukan karena tidak ada urutan basa yang merupakan komplemen antara primer dan DNA tanaman, sedangkan pada primer OPH 02 hasil menunjukkan tidak ada pita sama sekali yang terbentuk ini menandakan bahwa primer tersebut tidak teramplifikasi juga. Kemungkinan primer yang digunakan memiliki situs penempelan yang homolog yang jarang pada tanaman pala bahkan tidak ada pada genom dari tanaman pala. Menurut (Pandin 2009) beberapa faktor yang menyebabkan DNA tidak teramplifikasi oleh suatu primer disebabkan tidak adanya situs homolog antara primer tersebut dengan DNA cetakan atau DNA *template* dari tanaman tersebut dan kemungkinan lainnya adalah primer acak yang digunakan menempel pada dua situs DNA cetakan yang memiliki jarak yang cukup jauh sehingga enzim *taq* polimerase tidak dapat mengamplifikasinya.

Hasil Penelitian ini menunjukkan bahwa keenam sampel yang diambil dari tiga lokasi yang berada di Kabupaten Minahasa Utara terdiri atas dua kelompok yang berbeda, kelompok yang berbeda dari penggunaan empat primer secara umum menunjukkan polimorfisme atau keragaman pada tanaman pala yang ada di Minahasa Utara berdasarkan data tersebut sedangkan dua primer yang digunakan tidak teramplifikasi.

KESIMPULAN

Penggunaan penanda molekuler RAPD dalam penelitian ini menggunakan empat primer yang diseleksi dari keenam primer yaitu primer OPT 07, OPT 16, OPH 06 dan OPA 18 menunjukkan bahwa populasi tanaman

pala dari tiga lokasi yang berbeda di Kabupaten Minahasa Utara yaitu di desa Kauditan, Wori dan Patokaan menunjukkan adanya keragaman ini dibuktikan dari adanya pita polimorfis yang terbentuk dari enam sampel yang digunakan. Analisis dendrogram untuk primer OPT 07, OPT 16, OPH 06 dan OPA 18 menunjukkan bahwa pengelompokan individu setiap sampel tanaman pala memiliki dua kelompok yang berbeda dilihat dari indeks kemiripan antara sampel sedangkan pada primer OPH 01 dan OPH 02 memiliki 1 kelompok yang sama. Kelompok atau *cluster* yang berbeda dari keenam primer yang digunakan secara umum berdasarkan pada primer yang digunakan dapat dikatakan menunjukkan polimorfisme atau beragam.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggereini E.2008. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Suatu Metode Analisis DNA dalam Menjelaskan Berbagai Fenomena Biologi*. Jambi: Biospecies Volume 1 No 2, Juni 2008 hlm 73 – 76.
- Demeke T, Adams RP. 1994. *The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution*. Di dalam: Griffin HG, Griffin AM, editor. PCR Technology Current Innovations. London: CRC Pr. hal 184.
- Djaman,dkk. 2006. Penyimpanan Benih Damar (*Agathis damara* Salisb.) dalam Nitrogen Cair . *Jurnal Biodiversitas* Volume 7, Nomor 2 Halaman: 164-16.
- [ITC] International Trade Centre. 2016. List of exporter for nutmeg, mace and cardamons. [Internet]. [diambil 2017 Agustus 28]. Tersedia di http://www.trademap.org/Country_SelProductCountry.aspx.
- Karsinah, dkk. 2002. Keragaman genetik plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* Volume 7, Nomor 1.Hal: 8-16.
- Kaunang, A. 2014. *Perbandingan Pendapatan Petani Pala pada Berbagai Saluran Pemasaran di Kecamatan Kauditan Kabupaten Minahasa Utara*. Manado *Jurnal Fakultas Pertanian Universitas Samratulangi*.
- Komalasari, K. 2009. Pengaruh perbandingan volume darah dan lisis buffer serta kecepatan sentrifugasi terhadap kualitas produk DNA pada sapi Frensian Holstein (FH). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Langga,dkk. 2012. Optimalisasi Suhu Dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi Dna Tanaman Bitti (*Vitex Cofassus Reinw*)Serta Analisis Keragaman Genetik Dengan Teknik Rapd-Pcr. *J. Sains & Teknologi*, Desember 2012, Vol.12 No.3 : 265 – 276.
- Pandin, D. S. 2009. Keragaman Genetik Kultivar Kelapa Dalam Mapanget (DMT) dan Dalam Tenga (DTA) Berdasarkan Penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).Manado: *Buletin Palma* No.36, hal 20.
- Palupi D.L.N. 2010. Analisis Keragaman Genetik *Ganoderma* spp. Menggunakan Penanda Molekuler *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA* (RAPD). Skripsi . Bogor. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam .Institut Pertanian Bogor.
- Pangalima, Pakasi dan Benu. 2016. *Analisis Sub-Sektor Perkebunan Pala Di Provinsi Sulawesi Utara*. Sulawesi Utara: *Jurnal ASE – Volume 12* Nomor 1, hal 67 – 76.
- Pramudita.L. 2016. Keseragaman Benih Dan Pohon Induk Di Kebun Sumber Benih Pala (*Myristica Fragans* Houtt.) Berdasarkan Karakter Morfologi Dan

- Molekuler. Tesis. Bogor. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Porebski, S., Bailey, L.G. and Baum, B.R. (1997) *Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15, 8-15.
- Sambrook J, Russel DW. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition. New York: Cold-Spring Harbor Laboratory Pr.
- Sheeja TE, Sabeesh C, Shabna OV, Shalini RS, Krishnamoorthy B. 2013. Genetic diversity analysis of *Myristica* and related genera using RAPD and ISSR markers. *JOSAC*. 22(1):28-46.
- Sinaga, dkk. 2017. Analisis Pola Pita Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* D.C) Berdasarkan Primer OPD 03, OPD 20, OPC 07, OPM 20, OPN 09. Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, USU, Medan. *Jurnal Agroekoteknologi FP USU* Vol.5.No.1, hal : 55- 64.
- Uyoh EA, Umego C, Alkpokpodlon PO. 2014. Genetic diversity in Africa nutmeg (*Monodora myristica*) accessions from South Eastern Nigeria. *AJB* .13(42):4105-4111. doi: 10.5897/AJB 2014.14075.