

MIPA

LAPORAN PENELITIAN UNGGULAN UNSRAT



**ANALISIS KERAGAMAN GENETIK TANAMAN
JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* L.) di SULAWESI UTARA
BERDASARKAN PENANDA MOLEKULER**

Oleh:

Agustina Monalisa Tangapo, S.Si., M.Si. (Ketua)

Pience Veralyn Maabuat, S.Si., M.Si. (Anggota)

UNIVERSITAS SAM RATULANGI MANADO

OKTOBER 2013

Dibiayai dari Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA)
Nomor: 023.04.2.415171/2013, Tanggal 5 Desember 2012
Revisi II Tanggal 1 Mei 2013
Tahun Anggaran 2013
Satuan Kerja Universitas Sam Ratulangi
Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan

Halaman Pengesahan

1. Judul Penelitian : Analisis Keragaman Genetik Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) di Sulawesi Utara Berdasarkan Penanda Molekuler

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Agustina Monalisa Tangapo, S.Si., M.Si.
- b. NIP : 19830802 200604 2 004
- c. Jabatan Struktural : Dosen Biasa
- d. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
- f. Bidang Keahlian : Biologi Sel dan Molekuler
- g. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi
- i. Tim Peneliti

No.	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Pience Veralyn Maabuat	Ekologi Tumbuhan	MIPA/Biologi	UNSRAT

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian : 10 Bulan
- b. Biaya total yang diusulkan : Rp. 50.000.000,00
- c. Biaya yang disetujui tahun 2013 : Rp. 50.000.000,00

Manado, 30 Oktober 2013
Ketua Peneliti,



Agustina M. Tangapo, S.Si., M.Si.
NIP. 19830802 200604 2 004



Prof. Dr. Edwin de Queljoe, M.Sc., SpAnd
NIP/NIK 195106121981031006

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian



(Prof. Dr. Ir. John L. Rantung, MS)
NIP/NIK 195305101983031003

ABSTRAK

Penelitian tentang keragaman genetik jarak pagar yang berasal dari berbagai wilayah di Sulawesi Utara berdasarkan penanda molekuler DNA menggunakan teknik RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) telah dilaksanakan secara bertahap selama 10 bulan pada tahun 2013 mulai dari pengambilan sampel, isolasi/ekstraksi DNA genom tanaman jarak pagar, uji kualitas hasil isolasi, PCR dengan primer RAPD dan visualisasi PCR. Dari empat primer RAPD yang diuji (OPE-02, OPB-01, OPB-11, 3880) telah diperoleh total sejumlah pita DNA pada jarak pagar yang diuji, dengan ukuran pita DNA yang dihasilkan antara 200 bp – 2500 bp. Penelitian ini masih perlu dilanjutkan untuk analisis sehingga menghasilkan kurva analisis kekerabatan antara tanaman jarak pagar di Sulawesi Utara.

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan laporan penelitian dengan judul: “Analisis Keragaman Genetik Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) di Sulawesi Utara Berdasarkan Penanda Molekuler”. Dengan selesainya penelitian dan penyusunan laporan ini, diharapkan dapat menambah pengetahuan dan wawasan tentang keragaman genetik dengan menggunakan penanda molekuler.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Dirjen Pendidikan Tinggi yang telah menyediakan pendanaan dalam kegiatan penelitian dan penyusunan laporan;
2. Rektor Universitas Sam Ratulangi Manado beserta seluruh staf dan pegawai yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk meneliti;
3. Dekan FMIPA Unsrat Manado beserta staf dan pegawai yang telah memberikan ijin dan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian ini;
4. Rekan sesama staf pengajar dan peneliti atas dukungan dan bantuannya.

Akhirnya penulis berharap hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Manado, Oktober 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
PRAKATA	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
BAB III. MANFAAT PENELITIAN	9
BAB IV. METODE PENELITIAN	9
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	11
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	15
DAFTAR PUSTAKA	16
LAMPIRAN	18

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Tanaman Jarak Pagar (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	6
2. Elektroforegram DNA hasil genom tanaman jarak pagar.....	11
3. Sidik Jari DNA jarak pagar lokal dengan menggunakan primer RAPD (OPE-02).....	13
4. Sidik Jari DNA jarak pagar lokal dengan menggunakan primer RAPD (OPB-01)	14
5. Sidik Jari DNA jarak pagar lokal dengan menggunakan primer RAPD (OPB-11)	14
6. Sidik Jari DNA jarak pagar lokal dengan menggunakan primer RAPD (3880)	15

Bab 1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) merupakan tumbuhan semak berkayu yang banyak ditemukan di daerah tropik. Tanaman ini dimanfaatkan sebagai bahan baku biodiesel dan potensial dikembangkan menjadi sumber energi masa depan. Potensi energi terbarukan yang berupa bahan bakar nabati saat ini menjadi alternatif menghadapi kelangkaan energi fosil pada masa mendatang. Penggunaan bioenergi/biofuel merupakan pilihan yang dapat digunakan sebagai sumber energi pengganti minyak yang bersifat ramah lingkungan, dapat diperbarui serta mampu mengeliminasi gas buang dan efek rumah kaca sehingga dapat mengurangi efek *global warming* (Morgan, 2005). Salah satu bioenergi alternatif yang dapat digunakan sebagai bahan bakar seperti bahan bakar fosil yaitu biodiesel. Biodiesel merupakan suatu energi alternatif yang diperoleh dari minyak nabati atau minyak hewani dan dapat digunakan sebagai bahan bakar fosil (petrodiesel) yang dapat mengurangi pemanasan global. Perbedaan antara ester minyak nabati dan solar sangat kecil. Pada minyak nabati terdapat banyak oksigen sehingga pembakaran lebih sempurna. Oleh sebab itu, gas buangnya tidak berbahaya, bersih dan ramah lingkungan (Theil, 2005).

Genus *Jatropha* memiliki 175 spesies dan lima diantaranya terdapat di Indonesia, yaitu: *J. curcas* L., *J. gossypifolia*, *J. integerrima* Jacq., *J. multifida* dan *J. podagrica* Hook. Biji jarak pagar mempunyai kandungan minyak tertinggi (40-60%) daripada jarak ulung (*J. gossypifolia* L., 28,5%) dan jarak cina (*J. multifida*, 32,4%) (Puslitbang Perkebunan, 2006). Minyak biji jarak pagar tidak termasuk dalam kategori minyak makanan (*edible oil*), sehingga pemanfaatannya sebagai biodiesel tidak mengganggu penyediaan kebutuhan minyak makan nasional dan kebutuhan industri kimia. Selain itu tanaman ini tahan terhadap kekeringan, sehingga mampu berkembang di lahan marginal. Selain sebagai sumber energi alternatif, minyak jarak pagar dapat juga digunakan dalam industri farmasi (Becker dan Makkar, 2008). Meskipun memiliki nilai ekologis dan ekonomi yang penting, taksonomi dan struktur genetik dari *J. curcas* belum seluruhnya diklarifikasi, yang disebabkan oleh terjadinya hibridisasi antar spesies

(Airy Shaw, 1972 *dalam* Gupta *et al.*, 2008). Kendala utama dalam mencapai kualitas hasil minyak yang lebih tinggi dari tanaman ini salah satunya adalah kurangnya informasi tentang variabilitas genetik. Oleh karena itu, peningkatan kualitas tanaman ini perlu dilakukan melalui pemanfaatan keragaman genetik yang tersedia. Evaluasi keragaman genetik dan konstruksi peta keterkaitan akan meningkatkan efisiensi penggunaan variasi genetik dalam program pemuliaan (Paterson *et al.*, 1991).

Jarak pagar tersebar di berbagai wilayah Indonesia, termasuk di Sulawesi Utara dan diperkirakan memiliki keragaman genetik yang tinggi. Informasi mengenai keragaman genetik yang dimiliki oleh aksesori jarak pagar sangat dibutuhkan untuk mengetahui kekerabatan dari aksesori tersebut. Informasi tentang keragaman genetik merupakan modal dasar bagi para ahli pemuliaan dan genetika populasi dalam pengembangan dan perbaikan tanaman, terutama untuk membedakan individu dalam spesies serta identifikasi genotipe secara tepat dan identifikasi gen-gen yang berpotensi pembawa karakter unggul. Perbaikan varietas dapat diimplementasikan jika ada sumber yang memadai plasma nutfah. Dalam pengelolaan plasma nutfah, maka perlu mempelajari karakter masing-masing aksesori melalui kegiatan baik dalam karakterisasi fenotipik dan molekuler, oleh karena itu diperlukan karakterisasi molekuler dalam program pemuliaan. Pengembangan bidang molekuler dengan analisis DNA akhir-akhir ini dapat digunakan untuk mengkarakterisasi variasi genetik dan kekerabatan dalam satu genus, spesies, kultivar atau aksesori. Molekul genetik menggunakan pendekatan karakterisasi DNA telah berhasil menjadi sebuah penanda molekuler yang mampu mendeteksi gen dan sifat-sifat tertentu, evaluasi genetik keragaman, kekerabatan, dan adanya evolusi di tingkat genetik (Sudarmo *et al.*, 2006). Keragaman plasma nutfah lokal akan digunakan untuk berbagai perbaikan jika informasi pada pola genetik keragaman dan hubungan kekerabatan diantara varietas *J. curcas*, baik fenotipik dan molekuler, tersedia. Oleh sebab itu, maka perlu dilakukan analisis keragaman genetik plasma nutfah (lokal) *J. curcas* di Sulawesi Utara.

1.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan mempelajari keragaman genetik jarak pagar yang berasal dari berbagai wilayah di Sulawesi Utara berdasarkan penanda molekuler DNA menggunakan teknik RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*).

1.3 Keutamaan Penelitian

Indonesia adalah negara yang kaya akan keanekaragaman hayati dan dalam tahap pengembangan sumber bahan bakar alternatif sesuai dengan Inpres nomor 1 tahun 1006 tentang penyediaan dan pemanfaatan bahan bakar nabati (biofuel) sebagai bahan bakar alternatif dan Perpres nomor 5 tahun 2006 tentang energi nasional. Pemakaian biodiesel lebih aman bagi lingkungan dan manusia, mengurangi efek rumah kaca yang disebabkan oleh emisi gas buang, karena kandungan zat berbahaya dalam emisi gas buang biodiesel lebih rendah dibandingkan dengan emisi gas buang petrosolar. Beberapa permasalahan yang dihadapi saat ini yaitu belum adanya informasi tentang varietas unggul dan metode yang efektif dalam perbanyakan tanaman jarak pagar. Upaya untuk mengetahui keragaman suatu tanaman dapat dilakukan berdasarkan perbedaan ciri morfologi atau menggunakan penanda molekuler. Penanda molekuler merupakan teknik yang efektif dalam analisis genetik dan telah diaplikasikan secara luas dalam program pemuliaan tanaman. Studi genetika molekuler tanaman jarak pagar akan memberikan informasi tentang latar belakang genetik, keragaman genetik jenis dan populasi dengan teridentifikasinya genotipe beberapa populasi dan individu terpilih sebagai stok *genepool*. Informasi dalam distribusi variasi genetik juga dapat dimanfaatkan dalam usaha seleksi, pemuliaan dan konservasi genetik tanaman.

Jarak pagar pada dasarnya adalah tanaman yang mengalami penyerbukan silang, yang menghasilkan variasi tingkat tinggi dan menawarkan variasi lingkup yang luas bagi petani untuk melakukan skrining dan pemilihan sumber benih untuk sifat yang. Seleksi merupakan aktivitas yang paling penting dalam program *breeding* semua tanaman pohon (Zobel dan Talbert, 1984 dalam Ram *et al.*, 2008). DNA penanda berbasis sidik jari dapat membedakan spesies secara cepat menggunakan sejumlah kecil DNA dan karena itu dapat membantu untuk

menyimpulkan informasi yang dapat dipercaya pada hubungan filogenetik mereka. DNA penanda ini biasanya tidak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan karena itu dapat digunakan untuk membantu menjelaskan pola variasi genetik di antara populasi tanaman dan untuk mengidentifikasi aksesori dalam koleksi plasma nutfah.

Keragaman genetik dapat dipelajari menggunakan penanda ciri morfologi dan molekular yang meliputi penanda isozim dan penanda DNA. Penggunaan isozim relatif lebih cepat, mudah dan murah, tetapi hasil polimorfisme enzim yang diperoleh terbatas. Sedangkan penanda DNA dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik lebih baik karena hasilnya konsisten dan tidak dipengaruhi oleh lingkungan. Saat ini terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi keragaman genetik pada tingkat DNA. Metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Random Amplified Polimorphic DNA* (RAPD) SSR (*Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), dan RAF (*Randomly Amplified DNA Fingerprinting*) merupakan penanda-penanda DNA yang banyak digunakan untuk mengkarakterisasi suatu populasi tanaman. Metode RAPD merupakan dua teknik yang berdasarkan reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang sederhana dan dapat mendeteksi dengan cepat (Varshney *et al.*, 2005).

Kekayaan keanekaragaman hayati tumbuhan jarak pagar yang dimiliki Sulawesi Utara merupakan potensi pengembangan bioenergi alternatif dan sumberdaya genetika. Potensi ini merupakan keunggulan komparatif, karena pada saat ini terjadi peningkatan kebutuhan akan energi terbarukan. Analisis variasi genetik tanaman jarak pagar secara molekuler belum banyak dilakukan di Sulawesi Utara. Salah satu upaya dalam penelitian seperti ini adalah untuk tujuan konservasi plasma nutfah jarak pagar yang ada Sulawesi Utara. Dengan demikian urgensi (keutamaan) penelitian ini adalah tersedianya informasi keragaman genetik yang sangat penting dalam program pemuliaan karena memberi informasi agar dapat digunakan untuk seleksi tanaman maupun untuk konservasi plasma nutfah jarak pagar.

Bab 2. Tinjauan Pustaka

2.1 Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.)

Jarak pagar tumbuh di dataran rendah hingga ketinggian sekitar 500 m dpl. Tanaman ini dapat tumbuh pada daerah dengan curah hujan 300-2380 mm/tahun. Temperatur udara tahunan rata-rata yang dibutuhkan untuk pertumbuhan 20-28°C (Hambali *et al.*, 2006). Tanaman ini dapat tumbuh pada berbagai struktur tanah seperti tanah berbatu, tanah berpasir dan tanah liat. Pertumbuhan jarak pagar di tanah gembur lebih baik daripada di tanah padat. Selain pada tanah subur jarak pagar dapat tumbuh pada tanah yang ketersediaan air dan unsur-unsur haranya terbatas (lahan marginal). Di Indonesia banyak terdapat lahan marginal yang pemanfaatannya masih kurang optimal. Lahan marginal tersebut dapat digunakan untuk mengembangkan jarak pagar sehingga tidak mengganggu pengembangan tanaman pangan. Waktu yang paling baik untuk menanam jarak pagar adalah pada musim kering atau sebelum musim hujan. Jarak pagar membutuhkan air dan hara yang cukup untuk berproduksi secara optimal (Heller, 1996).

Klasifikasi tanaman jarak pagar adalah sebagai berikut (Cronquist, 1981).

Divisi	:	Spermatophyta
Subdivisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledoneae
Ordo	:	Euphorbiales
Familia	:	Euphorbiaceae
Genus	:	<i>Jatropha</i>
Spesies	:	<i>Jatropha curcas</i> L.

Saat ini jarak pagar tumbuh menyebar di berbagai daerah di Indonesia. Beberapa nama lokal jarak pagar adalah jarak kosta, kalake pagar (Sunda), jarak pager (Jawa), kalekhe paghar (Madura), balacai (Manado), ai huwa kamalo, kadoto (Maluku), nawaih nawas (Nangroe Aceh Darussalam), jarak pager (Bali), paku luba, jarak pageh (Nusa Tenggara), paku kase (Timor), kuman nema (Alor), lulunan (Roti), jarak wolanda, tondoutomene (Sulawesi), bintalo (Gorontalo), dan peleng kaliki (Bugis) (Prihandana dan Hendroko, 2006). Jarak pagar dikenal juga

sebagai *castor oil plant* karena bijinya menghasilkan minyak (Makkar *et al.*, 1997). Jarak pagar adalah tanaman monoecius, memiliki bunga betina dan jantan terpisah tetapi masih di dalam satu infloresen. Pola penyerbukan pada jarak pagar dapat terjadi secara geitonogami (penyerbukan tetangga) maupun xenogami (penyerbukan silang) (Raju dan Ezradanam, 2002). Adanya penyerbukan silang dapat menyebabkan terjadinya keragaman genetik.



Gambar 1. Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.).

2.2 Analisis Genetik dengan Penanda Molekular

Penanda molekular telah banyak digunakan dalam penelitian berbagai disiplin ilmu (taksonomi, filogeni, ekologi, genetika dan pemuliaan). Penanda molekular pada tingkat DNA mempunyai kelebihan dibandingkan dengan penanda ciri morfologi. Penggunaan penanda DNA dapat mencerminkan perubahan pada tingkat DNA, perbedaan jarak genetik antara individu lebih akurat daripada penggunaan penanda ciri morfologi, karena fenotipe yang sama dapat dimunculkan oleh genotipe yang berbeda (Serret *et al.*, 1997). Keuntungan penggunaan penanda molekular adalah genotipe suatu organisme dapat diuji secara langsung, jumlah polimorfisme yang ada tidak terbatas, dan pengembangan

teknik dapat menghasilkan penanda yang sesuai dengan tujuan penelitian (Weising *et al.*, 1995).

Penanda molekular mempunyai peranan yang sangat luas untuk memperbaiki efisiensi program pemuliaan tanaman. Penanda molekular dalam pemuliaan digunakan dalam analisis pautan dan pemetaan genetik, identifikasi genotipe, estimasi keragaman genetik dan kekerabatan inter dan antar spesies atau varietas (Weising *et al.*, 1996). Keragaman genetik yang dihasilkan dari data sidikjari (*fingerprinting*) dapat digunakan dalam pengelompokan tumbuhan (Ribaut dan Hoisington, 1998). Informasi yang diperoleh dapat digunakan untuk mengidentifikasi tetua yang paling sesuai untuk disilangkan. Pengukuran jarak genetik berdasarkan penanda DNA diperlukan untuk memproduksi kultivar hibrida. Penanda molekular juga dapat digunakan untuk menentukan lokasi gen yang tepat pada kromosom. Kelebihan utama dari pemuliaan tanaman menggunakan penanda molekular dibandingkan seleksi konvensional adalah seleksi dapat dilakukan pada tanaman yang masih muda, tanpa menunggu pertumbuhan generatif.

Dasar penanda molekular adalah polimorfisme pada tingkat protein atau DNA. Polimorfisme yang terdeteksi oleh AFLP dan RFLP mengungkapkan variasi ukuran berdasarkan situs restriksi. Polimorfisme berdasarkan RAPD mencerminkan variasi sekuen DNA pada situs perlekatan primer. RFLP telah digunakan untuk mengevaluasi keragaman genetik pada tanaman, tetapi analisis dengan RFLP membutuhkan DNA dalam jumlah banyak dan kemurnian DNA yang tinggi, selain itu RFLP pada beberapa spesies tanaman kurang baik karena polimorfisme yang terdeteksi rendah (Powell *et al.*, 1996). Teknik RFLP sangat menyita waktu dan relatif mahal, sehingga beberapa peneliti cenderung menggunakan RAPD dan AFLP untuk pemetaan genetik.

2.3 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Metode RAPD merupakan metode berdasarkan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Keuntungan metode RAPD adalah relatif sederhana, membutuhkan kuantitas DNA yang lebih sedikit (5 – 25 ng DNA) dalam setiap siklus PCR. Teknik RAPD memiliki kemampuan yang cepat dalam mendeteksi polimorfisme

pada sejumlah lokus. Teknik ini merupakan teknik yang paling cepat dalam mengumpulkan polimorfisme dalam DNA genom (Soemantri *et al.*, 2002). Karakter yang muncul pada hasilnya tergantung pada primer yang digunakan. Kelemahan metode ini adalah *reproducibility* yang rendah, namun kelemahan ini dapat diatasi dengan konsistensi kondisi PCR (Prana dan Hartati, 2003).

RAPD adalah metode cepat untuk mendeteksi *genomic polymorphisms* dan tidak membutuhkan informasi apapun mengenai genom tanaman, dan telah banyak digunakan untuk mengetahui keragaman genetik pada beberapa tanaman. Analisis RAPD hanya membutuhkan sejumlah kecil DNA genomik dan dapat menghasilkan tingkat tinggi polimorfisme dan dapat memfasilitasi lebih efektif analisis keragaman pada tanaman (Williams *et al.*, 1990). Analisis RAPD memberikan informasi yang dapat membantu menentukan kekhasan spesies dan filogenetik hubungan pada tingkat molekuler. Penggunaan seperti teknik untuk karakterisasi plasma nutfah dapat memfasilitasi konservasi dan pemanfaatan tanaman sumber daya genetik, memungkinkan identifikasi unik genotipe atau sumber genetik beragam genotipe.

Teknik ini menggunakan *oligonucleotida* - primer tunggal dan pendek yang akan menempel secara acak - random dalam proses PCR *low stringency*, menghasilkan serangkaian produk untuk dianalisis dengan gel elektroforesis. RAPD digunakan untuk berbagai bidang antara lain : (1) Analisis keanekaragaman, (2) Hubungan antar filogenetik, (3) Identifikasi dan verifikasi galur, (3) Kesehatan dan Epidemiologi, (4) Teknologi Pangan dan (5) Ekologi Molekuler. Metode RAPD juga dapat diterapkan dalam penelitian pada bakteri, jamur, serangga, tanaman, alga, dan manusia. Dengan menggunakan RAPD dapat dibuktikan bahwa hasil yang didapat dapat diandalkan, canggih, dan sangat cepat. RAPD telah banyak digunakan dalam analisis keragaman berbagai jenis tanaman seperti *Colocasia esculenta* L. Schott (Prana dan Hartati, 2003), *Grevillea spp.* (Pharmawati, 2009), dan *Hevea brasiliensis* Muell. Arg (Toruan-Mathius *et al.*, 2002).

Bab 3. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi kekerabatan jarak pagar dari beberapa daerah yang ada di Sulawesi Utara menggunakan penanda molekuler dan melengkapi informasi keragaman genetik plasma nutfah yang ada untuk keperluan perakitan varietas unggul.

Bab 4. Metode Penelitian

1. Pengambilan sampel.

Bahan tanaman jarak pagar yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3 aksesori tanaman jarak pagar yang diambil dari tiga tempat yang berbeda di kota Manado, masing-masing 1 aksesori tanaman jarak pagar yang berasal dari Tomohon dan Kotamobagu.

2. Isolasi DNA dengan innuPREP Plant DNA kit.

3. Uji Kualitas DNA

Uji kualitas DNA dilakukan dengan proses elektroforesis dilakukan dengan tes agarosa untuk melihat kualitas DNA hasil isolasi. Pembuatan gel agarosa 0,8 % dengan jalan melarutkan 0,8 gram agarosa dalam 100 ml larutan TBE 0,5 x dan dipanaskan diatas *hot plate* sampai mendidih. Larutan agarosa yang sudah hangat (suam-suam kuku), dituang dalam cetakan elektroforesis yang telah disiapkan dan dibiarkan sampai agarosa padat. Kemudian gel diletakkan ke dalam wadah elektroforesis yang telah berisi larutan TBE 0,5X sampai gel terendam. Sampel DNA yang akan diuji diambil sebanyak 10 µl dan ditambahkan dengan loading dye sebanyak 2 µl, selanjutnya sampel yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam sumur gel dan dielektroforesis selama lebih kurang satu jam pada voltase 110 V. Hasil elektroforesis tersebut diwarnai dengan melakukan perendaman pada larutan Ethidium Bromide (EtBr 1%). Hasil elektroforesis diamati di bawah UV transluminator.

4. Analisis RAPD

Analisis RAPD dilakukan dengan menggunakan 10 random primer dari Operon Technologies. Amplifikasi RAPD berdasarkan metode Williams *et al.* (1990). Amplifikasi dilakukan menggunakan *thermocycler* dengan tahapan

program sebagai berikut: denaturasi awal pada kondisi 94 °C selama 2 menit dilanjutkan dengan 35 putaran yang terdiri atas denaturasi pada 94 °C selama 1 menit, amplifikasi 53 °C selama 1 menit, dan ekstensi pada 72 °C selama 2 menit. Setelah selesai 35 putaran, proses ini diakhiri dengan ekstensi akhir pada 72 °C selama 7 menit.

Primer RAPD yang digunakan adalah:

RAPD analysis primer 1 - (5'-d[GGTGCGGGAA]-3') => OPE-02

RAPD analysis primer 2 - (5'-d[GTTTCGCTCC]-3') => OPB-01

RAPD analysis primer 3 - (5'-d[GTAGACCCGT]-3') => OPB-11

RAPD analysis primer 4 - (5'-d[AAGAGCCCGT]-3') => 3880

5. Visualisasi hasil PCR.

Hasil amplifikasi DNA dielektroforesis 1% gel agarosa (1 gr agarosa dilarutkan dalam 100 ml TBE 0,5x). Elektroforesis menggunakan buffer TBE 0,5x pada kondisi voltase tetap 110 Volt. Pewarnaan hasil elektroforesis dilakukan dengan merendam agarosa dalam larutan Ethidium Bromide (EtBr 1%) kemudian dilihat di atas lampu UV transluminator dan didokumentasikan dengan kamera digital. Resolusi setiap pita DNA contoh hasil amplifikasi tidak selalu terlihat jelas, tergantung pada jumlah fragmen yang teramplifikasi pada genom tanaman. Makin banyak fragmen DNA contoh teramplifikasi, resolusi pita DNA makin jelas.

6. Analisis Data RAPD

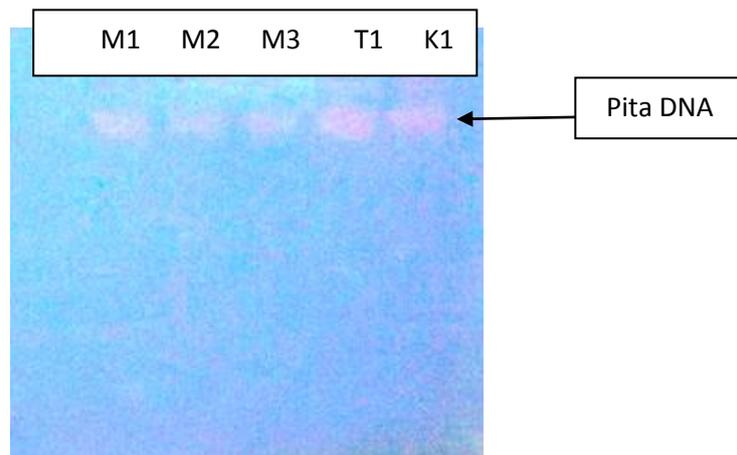
Data RAPD didapat berdasarkan ada (1) atau tidak ada (0) pita yang dimiliki oleh masing-masing aksesori. Data dianalisis dengan menggunakan metode UPGMA (*Unweighted pair group arithmetic average*) dan *similarity matrix* dengan menggunakan program komputer NTSYS-pc atau *Numerical taxonomy and multivariate analysis system* (Rohlf, 1998).

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Isolasi DNA

Keragaman plasma nutfah jarak pagar lokal dapat dimanfaatkan untuk perbaikan varietas apabila telah tersedia informasi tentang keragaman genetik dan hubungan kekerabatan antara aksesori tanaman jarak pagar yang satu dengan yang lainnya baik secara fenotipik maupun molekuler. Dalam penelitian ini, DNA genom tanaman jarak pagar diisolasi dari daun muda tanaman jarak pagar. Sampel daun dipilih dari individu tanaman jarak pagar yang sehat dengan pemakaian sampel dari masing-masing aksesori yang diuji (Manado, Tomohon dan Kotamobagu). Proses ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *innuPREP Plant DNA kit*.

Kualitas DNA yang ditunjukkan dari hasil elektroforesis DNA berupa munculnya pita/*band* yang tampak di atas lampu UV transluminator. Hasil isolasi DNA selanjutnya digunakan untuk amplifikasi dengan primer RAPD yang telah dioptimasi berdasarkan penelitian sebelumnya. Jumlah sampel DNA yang didapatkan dari hasil isolasi dengan *innuPREP Plant DNA kit* cukup untuk dilanjutkan analisis RAPD. Hasil isolasi DNA ditampilkan pada gambar di bawah ini:



Gambar 2. Elektroforegram DNA hasil genom tanaman jarak pagar.

Salah satu keuntungan penggunaan analisis keragaman genetik tanaman dengan menggunakan teknik molekuler yang memanfaatkan teknologi amplifikasi

PCR adalah kuantitas DNA yang diperlukan hanya sedikit. Selain itu, dalam pelaksanaan teknik RAPD tingkat kemurnian DNA yang dibutuhkan tidak perlu terlalu tinggi, atau dengan kata lain teknik amplifikasi PCR relatif toleran terhadap tingkat kemurnian DNA.

B. Hasil Analisis RAPD

Analisis data didasarkan pada ada atau tidaknya pita. Profil pita DNA diterjemahkan ke dalam data biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada pita dan nilai 1 untuk adanya pita DNA pada satu posisi yang sama dari individu-individu yang dibandingkan. Data yang diperoleh dari dokumentasi gel hasil RAPD berupa pita-pita diskrit dengan ukuran tertentu dari masing-masing aksesi jarak pagar. Jarak pita diukur dari batas bawah sumur sampai batas bawah pita yang masih tampak. Nomor pita diurutkan dari jarak pita terdekat dengan batas bawah sumur. Pengukuran potongan DNA genom dilakukan dengan membandingkannya dengan berat molekul standar 1 kB DNA ladder.

Keragaman plasma nutfah jarak pagar di Indonesia sangat tinggi namun variasi tersebut diduga hanya disebabkan perbedaan wilayah yang melahirkan ekotipe-ekotipe tertentu (Hasnam, 2006). Oleh sebab itu, pemilihan tetua persilangan sebaiknya tidak hanya dilaksanakan dengan menggunakan karakter morfologi dan pemanfaatan penanda molekuler diharapkan akan sangat membantu dalam identifikasi plasma nutfah sebagai calon tetua persilangan.

Analisis RAPD dapat digunakan untuk menetapkan dan melihat karakteristik variabilitas genetik diantara genotip tanaman dan dapat melihat kekerabatan pada tanaman tingkat tinggi. Hasil RAPD dapat mendeteksi tanaman melalui genotip lebih baik daripada hanya melihat fenotipnya. Selain itu, variabilitas genetik yang dihasilkan berbeda dari polimorfisme isozim atau protein, karena DNA merupakan komponen alel. Variabilitas yang diperlihatkan DNA pada alel lebih banyak daripada variabilitas berdasarkan biokimia dan morfologi. Polimorfisme RAPD merupakan hasil dari perbedaan panjang DNA antara sekuen DNA yang berkaitan dengan primer sehingga menyebabkan jumlah DNA yang teramplifikasi dan jarak migrasi pita DNA berbeda dan diikuti dengan tingginya variasi pola pita DNA. Penanda RAPD memiliki beberapa kelebihan,

diantaranya tidak membutuhkan latar belakang pengetahuan tentang genom yang akan dianalisis, primer universal dapat digunakan untuk organisme prokariotik maupun eukariotik, mampu menghasilkan karakter yang relatif tidak terbatas jumlahnya, bahan-bahan yang digunakan relatif lebih murah, mudah dalam preparasi, dan memberikan hasil lebih cepat dibandingkan dengan analisis keragaman molekuler lainnya. . Kelebihan lain yang lebih spesifik adalah teknik RAPD lebih sederhana, yaitu : (1) DNA tidak perlu dipotong dengan enzim restriksi, (2) sampel DNA yang diperlukan relatif sedikit, (3) tidak memerlukan pemindahan DNA ke membran nilon, (4) tidak memerlukan hibridisasi DNA, dan (5) tidak memerlukan prosedur *labelling* (Barahma, 2006). Prosedur RAPD lebih murah, lebih cepat karena tidak memerlukan banyak tahapan, membutuhkan sampel DNA lebih rendah (0,5 5.0 ng), tidak memerlukan radioisotop, dan tidak terlalu membutuhkan keahlian untuk pelaksanaannya. Teknik RAPD mempunyai keunggulan karena prosedurnya sederhana, mampu menyajikan hasil dalam waktu relatif singkat dan cepat karena setelah proses amplifikasi DNA hasil dapat segera divisualisasi dan akurat untuk tujuan identifikasi dan klasifikasi berbagai plasma nutfah (Griffin and Griffin, 1994).

Berikut elektroforegram hasil amplifikasi PCR dengan primer RAPD dalam penelitian ini:



Gambar 3. Sidik Jari DNA jarak pagar lokal dengan menggunakan primer RAPD (OPE-02) : Manado1 (Baris 1), Manado2 (Baris 2), Manado3 (Baris 3), Tomohon (Baris 4), Kotamobagu (Baris 5), Ladder 1 kb (Baris 6).



Gambar 4. Sidik Jari DNA jarak pagar lokal dengan menggunakan primer RAPD (OPB-01) : Ladder 1 kb (Baris 1), Manado1 (Baris 2), Manado2 (Baris 3), Manado3 (Baris 4), Tomohon (Baris 5), Kotamobagu (Baris 6).



Gambar 5. Sidik Jari DNA jarak pagar lokal dengan menggunakan primer RAPD (OPB-11) : Manado1 (Baris 1), Manado2 (Baris 2), Manado3 (Baris 3), Tomohon (Baris 4), Kotamobagu (Baris 5), Ladder 1 kb (Baris 6).

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1 Kesimpulan

Dari empat primer RAPD yang diuji (OPE-02, OPB-01, OPB-11, 3880) telah diperoleh total sejumlah pita DNA pada jarak pagar yang diuji, dengan ukuran pita DNA yang dihasilkan antara 200 bp – 2500 bp.

VI.2 Saran

Perlu dilanjutkan untuk analisis sehingga menghasilkan kurva analisis kekerabatan antara tanaman jarak pagar di Sulawesi Utara.

DAFTAR PUSTAKA

- Becker, K., dan Makkar, H.P.S. 2008. Feature: *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel. *Lipid Technology*, 20 (5), 104-107.
- Cronquist, A. (1981) : *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press, New York.
- Heller, J. 1996. Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). Promoting the conservation and use of underutilised and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 66 pp.
- Hambali, E., A. Suryani, Dadang, Hariyadi, H. Hanafie, I. K. Reksowardojo, M. Rivai, M. Ihsanur, P. Suryadarma, S. Tjitrosemito, T. H. Soerawidjaja, T. Prawitasari, T. Prakoso, dan W. Purnama. 2006. *Jarak Pagar Tanaman Penghasil Biodiesel*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Makkar, H.P.S, Becker, K., Sporen, F., dan Wink, M. 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas* L. *Agric Food Chem*, 45, 3152-3157.
- Morgan, D. 2005. Brazil Biofuel strategy pays off as gas price. Oil substitutes include sugar cane, corn, soybeans, beets, cornstalls. The Washington Post. MSNNBC.
- Paterson, A.H., Tanksley, S.D. dan Sorrells, M.E. 1991. DNA markers in plant improvement. *Adv. Agron.*, 46, 39-90.

- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi Ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea spp.* (Proteaceae). *Jurnal Biologi*, XIII (1), 12-16.
- Prana, K.D., dan N.S. Hartati. 2003. Identifikasi sidik jari DNA Talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan teknik RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). *Skrining primer dan optimalisasi kondisi PCR*. *J. Natur Indonesia* 5(2):107-112.
- Prihandana R, dan Hendroko, R. 2006. *Petunjuk budi daya jarak pagar*. Jakarta: Agromedia Pustaka .
- Puslitbang Perkebunan. 2006. Infotek Jarak Pagar Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Februari 2006. 1(2).
- Raju, S., dan Ezradanam, V. 2002. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Curr Sci* 83: 1395-1398.
- Ram, S.G., Parthiban, K.T., Kumar, S., Thiruvengadam, V., dan Paramathma, M. 2008. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol*, 55, 803–809.
- Ribaut, J.M., dan Hoisington, D. 1998. Marker-assisted selection : New tools and strategies. *Trend in Plant Sci* 3: 236-239.
- Rohlf, R.I.M. 1998. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Verson 2.0. Department of Ecology and Evolution State of New York.
- Serret, N.D., Udupa, S.M, dan Weigand, F. 1997. Assessment of genetic diversity of cultivated chickpea using microsatellite-derived RFLP markers : Implication for origin. *Plant Breeding* 116: 573-578.
- Soemantri, H.I, Santoso, T.J., Minantyorini, Ambarwati, A.D., Sisharmini, Apriana, A. 2002. Karakterisasi molekuler plasma nutfah tanaman pangan. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*.
- Sudarmo, H., Heliyanto, B., Suwarso, dan Sudarmadji. 2006. Akses potensial jarak pagar (*J. curcas* L.). *Prosiding Lokakarya II: Status Teknologi Tanaman Jarak Pagar di Bogor, 29 Nopember 2006*. Badan Litbang Pertanian. Puslitbang Perkebunan.
- Theil, S. 2005. The Next Petroleum with Oil Prices Going through the Roof, so called Biofuels are at least becoming a viable alternative to gasoline and Diesel. *Newsweek International*.
- Toruan-Mathius, N., Lalu, Z., Soedarsono, dan Aswidinnoor, H. 2002. Keragaman Genetik klon-klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) yang resisten dan rentan terhadap *Corynespora cassicola* berdasarkan penanda RAPD dan AFLP, *Menara Perkebunan*, 70(2), 35-49.

- Varshney, R.K., Graner, A., dan Sorrells, M.E. 2005. Genic Microsatellite Markers in Plants: Feature and Applications. *Trends in Biotechnology*, 23 (1), 48–56.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., dan Meyer, W. 1995. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. Boca Raton: CRC Press.
- Weising, K., Fung, R.W.M., Keeling, D.J., Atkinson, R.G., dan Gardner, R.C. 1996. Characterization of microsatellites from *Actinidia sinensis*. *Mol Breeding* 2: 117-131.
- William, J.G., Kubeli, A.R., Livak, K.J., Ravalsky J.A., dan Tingey. 1990. DNA Polimorphism Amplified by Arbitrary Primer are Useful as Genetic Marker. *Nuc.Acid Res* 18(22):6531-6535.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., dan Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

LAMPIRAN

Biodata Peneliti

BIODATA KETUA PENELITI

1. Identitas

- a. Nama Lengkap : Agustina Monalisa Tangapo, S.Si., M.Si.
b. Tempat/Tanggal Lahir : Poso, 2 Agustus 1983
c. Jenis Kelamin : Perempuan
d. NIP : 19830802 200604 2 004
e. Pangkat/Golongan : Penata Muda/IIIa
f. Pusat Penelitian : Universitas Sam Ratulangi
g. Alamat : Jl. Kampus Kleak, Manado, 95115
h. Telepon/Faks : 0431-827932
i. Alamat Rumah : Jl. W.Z. Yohanes, Lingk. V, Bumi Nyiur,
Kec. Wanea, Manado, 95119
j. Telepon : 08124417209
k. Email : iin_truly@yahoo.co.id

2. Pendidikan

No.	Pendidikan	Tempat	Tahun Selesai	Bidang
1	SD : Kr. GKST I Poso	Kab.Poso-Sulteng	1995	-
2	SMP : Negeri I Poso	Kab.Poso-Sulteng	1998	-
3	SMUN 2 Manado	Manado	2001	IPA
4	Sarjana (S1)	Universitas Sam Ratulangi	2005	Biologi
5	Pascasarjana (S2)	Institut Teknologi Bandung	2011	Biologi (Biologi Sel dan Molekul)

3. Pengalaman Penelitian

No.	Judul Penelitian	Tahun
1.	Efektivitas Antibakteri Ekstrak Tumbuhan Daun Sendok (<i>Plantago major</i>) Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	2004
2.	Studi Awal Transformasi Genetik <i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Wallich ex Nees. dengan Perantara <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain LBA4404	2010

4. Publikasi Ilmiah

No.	Judul	Nama Jurnal	Keterangan
1.	Efektivitas Antibakteri Ekstrak Tumbuhan Daun Sendok (<i>Plantago major</i>) Terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	<i>Eugenia</i> , Tahun 2006.	Penulis Anggota
2	Transformasi dan ekspresi transien gen pelapor <i>gusA</i> pada <i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Wallich ex Ness (<i>in progress</i>).	Jurnal Bios Logos, Tahun 2012	Penulis Utama

Manado, 30 Oktober 2013

Peneliti Utama,

**Agustina Monalisa Tangapo, S.Si., M.Si.
NIP. 19830802 200604 2 004**

BIODATA PENELITI ANGGOTA

1. Identitas

- a. Nama Lengkap : Pience Veralyn Maabuat, S.Si., M.Si.
b. Tempat/Tanggal Lahir : Manado, 8 Februari 1980
c. Jenis Kelamin : Perempuan
d. NIP : 19800208 200701 2 002
e. Pangkat/Golongan : Penata Muda/IIIa
f. Pusat Penelitian : Universitas Sam Ratulangi
g. Alamat : Jl. Kampus Kleak, Manado, 95115
h. Telepon/Faks : 0431-827932
i. Alamat Rumah : Bukit Doa Meras, Kec. Bunaken, Manado
j. Telepon : 08124434845
k. Email : thealyn@yahoo.co.id

2. Pendidikan

No	Tingkat	Pendidikan	Jurusan	Tahun	Tempat
1	SD	SD Negeri 53 Manado		1992	Manado
2	SLTP	SMP Kristen Eben Haezar 02		1995	Manado
3	SMU	SMU Negeri 2 Manado	IPA	1998	Manado
4	Sarjana	Fakultas MIPA Unsrat	Biologi	2005	Manado
5	Pascasarjana	UNSRAT	Agronomi	2011	Manado

3. Penelitian dan Pengabdian

No	Judul Penelitian	Tahun	Posisi Peneliti	Pemberi Dana
1	Sumberdaya Padang Lamun di Pulau Kemujang dan sekitarnya	2009	Anggota	Ditjen Dikti
2	Distribusi dan kelimpahan padang lamun di Pantai Molas, Kecamatan Bunaken	2009	Anggota	Sendiri
3	Penyuluhan Demam Berdarah di Kelurahan Meras	2011	Ketua	Dikti

Manado, 30 Oktober 2013
Peneliti Anggota,

Pience Veralyn Maabuat, S.Si., M.Si.
NIP. 19800208 200701 2 002