

Polimorfisme Cabai Rawit dan Cabai Gendot dengan Penanda RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) Menggunakan Primer OPA-8

Eko Purnomo¹⁾ dan Rejeki Siti Ferniah¹⁾

¹⁾Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH Tembalang, Semarang, Indonesia
[E-mail: ferniahmikro@gmail.com](mailto:ferniahmikro@gmail.com)

ABSTRAK

Jenis cabai di Indonesia sangatlah beragam, beberapa di antaranya adalah cabai gendot dan rawit merah. Keberagaman cabai yang tinggi dapat dianalisis secara molekuler melalui pemetaan genetik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik dari sampel cabai gendot dan cabai rawit merah melalui analisis penanda RAPD. Metode yang dilakukan meliputi isolasi DNA dengan menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* Promega dan *buffer Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB), lalu sampel diamplifikasi dengan primer OPA-8. Hasil pengujian dengan penanda RAPD menghasilkan 75% polimorfisme DNA di antara cabai gendot dan cabai rawit merah. Hasil analisis keragaman genetik mendapatkan nilai indeks kesamaan 0,4.

Kata kunci: DNA, RAPD, Polimorfisme, Primer, Similarity Index

ABSTRACT

Indonesia have biodiversity of chilli, includes *cabai gendot* and *cabai rawit merah/setan*. The diversity can be analysed molecularly using genetic mapping. Aim of this research is to determine the genetic diversity between *cabai gendot* and *cabai rawit merah/setan* using RAPD-PCR technique. DNA isolation did using *Wizard Genomic DNA Purification Kit* Promega, then the DNA was amplified using OPA-8 universal primer. The result showed there were 75% polymorphism between *cabai gendot* and *cabai rawit merah/setan* and they have similarity index 0.4.

Keywords: RAPD, Polymorphism, Primer, Similarity Index

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara agraris dengan kekayaan alam yang melimpah. Data dari kajian akademis yang dilaksanakan oleh Direktorat Jenderal Pengelolaan Lahan dan Air, Kementerian Pertanian pada tahun 2015 memperlihatkan bahwa total luas daratan Indonesia adalah sebesar ±192 juta ha, terbagi atas 123 juta ha (64,6 persen) merupakan kawasan budidaya dan 67 juta ha sisanya (35,4 persen) merupakan kawasan lindung. Terdapat 101 juta ha lahan yang berpotensi menjadi areal pertanian. Pertanian merupakan sektor yang memiliki peranan yang penting bagi perekonomian Indonesia dan menyumbang 14.7% bagi GNP Indonesia. Namun potensi pertanian yang begitu luas belum membawa dampak yang signifikan bagi pemenuhan

kebutuhan ekonomi masyarakat Indonesia. Hal ini terlihat dari masih banyaknya komoditas pertanian yang mengalami kelangkaan seperti cabai. Akibat kelangkaan ini terjadilah kenaikan harga 2-3 kali lipat dari harga normal sejak akhir tahun 2016 hingga pertengahan tahun 2017.

Cabai (*Capsicum* spp.) termasuk salah satu komoditi sayuran yang mempunyai nilai ekonomi yang cukup tinggi, karena peranannya yang cukup besar untuk memenuhi kebutuhan pangan dan industri. Ditinjau dari sisi ketersediaan untuk konsumsi cabai berdasarkan perhitungan Neraca Bahan Makanan (NBM), pada periode tahun 2002-2014 menunjukkan indikasi peningkatan konsumsi. Tahun 2002-2014 penggunaan cabai untuk bahan makanan cenderung meningkat,

yaitu dari 654 ribu ton pada tahun 2002 menjadi 1,92 juta ton pada tahun 2013 atau meningkat 10,87% per tahun (Kementrian Pertanian, 2016). Upaya peningkatan produksi cabai ditinjau dari segi kuantitas dan kualitasnya sangat diperlukan.

Cabai merupakan tumbuhan dengan tingkat kerentanan terserang penyakit yang cukup mengkhawatirkan. Penelitian tumbuhan cabai terkait tingkat adaptasi, kerentanan penyakit, peningkatan mutu, dan peningkatan kuantitas produksi sangat perlu dilakukan. Analisis molekuler merupakan salah satu studi yang penting untuk menganalisis tumbuhan cabai dari sisi genetik, mengetahui variasi genetiknya dan menciptakan varietas dengan sifat unggul tumbuhan cabai. Oleh karena itu analisis molekuler sangat penting untuk mengidentifikasi tingkat adaptasi tumbuhan cabai melalui pendekatan analisis genetik. Mengingat masih kurangnya informasi genetik tentang tumbuhan cabai maka perkembangan analisis molekuler tumbuhan cabai sangat diperlukan. Hal ini untuk memperoleh informasi genetik cabai terkait resistensi penyakit, variasi genetik dan pengaruh adaptasi tumbuhan cabai. Penelitian tentang cabai telah banyak dilakukan terkait morfologi, anatomi, fisiologi, biokimia maupun penanganan pasca panennya, namun penelitian tentang studi genetiknya masih jarang dilakukan.

Menurut Ferniah dan Pujiyanto (2013), teknik isolasi DNA sangat penting untuk menpatkan DNA murni sampel. Isolasi DNA merupakan langkah awal dan sangat menentukan dalam studi genetika. Isolasi atau pengambilan DNA terdiri dari tahap penghancuran sel, penghilangan RNA dan protein serta pemurnian dan pengendapan DNA. Menurut Langga, Restu dan Kuswinanti (2012) RAPD merupakan suatu penanda khusus dalam analisis keragaman genetik tanpa mengetahui Informasi DNA sampel yang diteliti, analisis genetik dengan penanda RAPD menggunakan primer khusus dalam proses pengerjaannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme DNA hasil amplifikasi dan keragaman genetik dari sampel cabai gendot dan cabai rawit merah dengan penanda RAPD menggunakan OPA-8.

Marka (penanda) molekuler adalah sekuen DNA yang dapat diidentifikasi. Penanda molekul terdapat pada lokasi tertentu pada genom dan dapat diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya. Marka genetik

merupakan gen yang terekspresi dan membentuk fenotip, biasanya mudah dibedakan, digunakan untuk identifikasi individu atau sel yang membawanya, untuk menandai inti, kromosom, atau lokus. Penanda molekuler dapat dinggap sebagai bagian yang tidak mudah mengalami perubahan akibat aktivitas genetik seperti mutasi dan insersi atau proses seleksi alam. Penanda molekuler tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan sehingga penanda molekuler merupakan daerah yang *conserve*. Penanda molekuler terdapat pada semua genom, dengan sifat *conserve*-nya, penanda molekul dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan suatu organisme. Penanda molekuler pada aplikasinya sangatlah beragam, sehingga untuk memilih penanda molekuler harus disesuaikan dengan organisme yang akan diteliti dan bagian DNA mana yang akan dianalisis sekuennya. Penanda molekuler dibagi atas marka dominan dan marka kodominan. Marka ko-dominan adalah salah satu marka yang dapat mengidentifikasi semua alel yang ada pada suatu lokus tertentu, sedangkan marka dominan hanya mengungkap alel dominan tunggal saja tetapi pada lokus yang sama. Data ko-dominan umumnya lebih tepat daripada data dominan tetapi marka dominan biasanya membutuhkan waktu lebih cepat dan lebih mudah mendapatkan data (Al-Samarai & Al-Kazaz, 2015).

RAPD merupakan metode untuk mengidentifikasi polimorfisme DNA pada genom. RAPD merupakan suatu metode yang cepat dan efisien dalam produksi dan menyediakan karakteristik *fingerprints* dari genom kompleks tanpa informasi sekuen sebelumnya. Metode RAPD menyediakan metode yang efektif dalam menyajikan informasi genetik dalam bentuk pola pita karakteristik. Metode ini sangat efektif dan efisien untuk proses evaluasi variabilitas dengan ketepatan yang baik. Sebagian besar pita DNA informatif pada RAPD biasanya berjarak 300-3000 bp. Metode RAPD telah digunakan dalam proses genetika *fingerprinting*, menyajikan peta hubungan kekerabatan, menemukan gen ketahanan penyakit, identifikasi penanda spesifik kromosom dan karakterisasi hibrida somatik. Metode RAPD sangat penting dalam bidang pemuliaan tanaman. Metode ini mampu menganalisis keragaman genetik dari tumbuhan dengan baik dan mampu menyajikan

pola hubungan kekerabatan yang penting dalam proses analisis genetik (Cheema & Pant, 2013).

Penanda RAPD adalah penanda pilihan, karena kesederhanaan dan sifatnya rendah, sistem yang cepat, murah dan efektif untuk mempelajari hubungan genetik tanaman. Penanda RAPD juga dapat digunakan dalam studi keragaman genetik spesies atau populasi alami dan studi identifikasi genotip. Penilaian variasi genetik berbasis RAPD didasarkan pada metode PCR melalui amplifikasi DNA genom dengan urutan nukleotida yang berubah-ubah. Penanda RAPD dapat mendeteksi polimorfisme DNA tingkat tinggi dan dapat menghasilkan penanda genetik yang baik. Prosedur RAPD lebih murah, lebih cepat, membutuhkan sampel DNA yang sedikit (0,5-5 ng), tidak membutuhkan radioisotop dan tidak memerlukan keahlian yang rumit dalam pelaksanaannya dibandingkan dengan metode lain (Ashraf *et al.*, 2014).

2. METODE

Penelitian ini menggunakan sampel daun cabai. DNA diperoleh dari daun cabai yang masih muda berupa daun ketiga dari pucuk. Sampel daun cabai yang telah diperoleh, dimasukkan ke dalam wadah steril dan disimpan dalam suhu -20°C . Sampel daun ukuran $1-2\text{ cm}^2$ ditimbang masing-masing 100 mg. Isolasi DNA dilakukan dengan *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) sesuai protokol. Konsentrasi dan kemurnian DNA diukur dengan spektrofotometer *nanovue*.

RAPD-PCR diawali dengan pembuatan koktail PCR yang terdiri dari DNA cetakan, primer, *PCR mix green* dan *nuclease-free water*. DNA cetakan dibuat dengan mengencerkan DNA menjadi $25\text{ ng}/\mu\text{L}$. Primer OPA 8 (5' GTGACGTAGG 3') dengan konsentrasi $100\mu\text{M}$ diencerkan menjadi $20\mu\text{M}$. Koktail PCR untuk satu sampel dibuat dengan komposisi yaitu DNA cetakan sebanyak $3\mu\text{L}$, $1,5\mu\text{L}$ primer, $12,5\mu\text{L}$ *PCR Mix Green* dan $8,5\mu\text{L}$ *nuclease-free water*. Total pada setiap *microtube* yaitu $25,5\mu\text{L}$. Setelah koktail siap, kemudian diamplifikasikan dengan menggunakan *Thermocycler* dengan pengaturan $25\mu\text{L}$ pada menu volume, tahap pra-denaturasi diatur 95°C selama 3 menit, tahap denaturasi diatur 94°C selama 1 menit, tahap *annealing* diatur 40°C selama 1 menit,

tahap elongasi diatur 72°C selama 2 menit, pengulangan tahap denaturasi hingga elongasi 1 sebanyak 39x, tahap *extension* diatur 72°C selama 5 menit. Hasil RAPD-PCR diamati dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak NTSYS. Pita DNA diubah ke dalam angka biner satu (1) dan nol (0) di dalam lembar kerja *microsoft excel* berdasarkan ada atau tidaknya pita. Selanjutnya data dipindah ke NTSYS dan dihitung indeks kesamaan antarsampel.

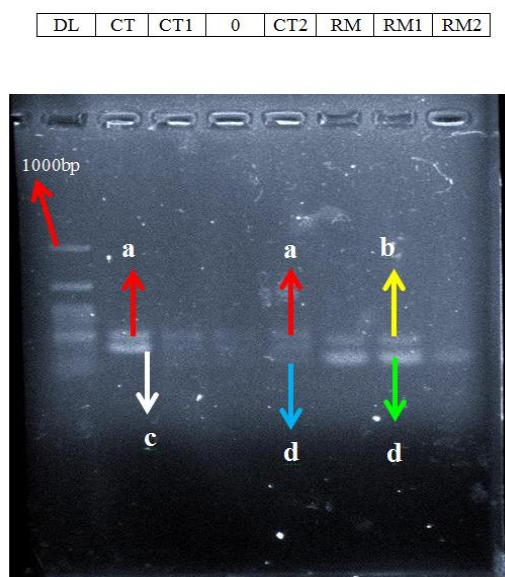
3. Hasil dan Pembahasan

Isolasi DNA menggunakan daun yang tidak terlalu muda dan tua, hal ini agar mempermudah dalam proses penggerusan sampel. Menurut pendapat Meryalita (2012), penggunaan bagian daun karena daun merupakan bagian dengan dinding sel yang lebih tipis, memiliki aktivitas biosintesis yang baik dan kualitas DNA yang baik. Hal ini sesuai dengan pendapat Restu, Mukrimin dan Gusmiaty (2012), Organ daun didominasi oleh jaringan parenkim yang memiliki dinding sel tipis, sehingga hal ini mempermudah dalam proses penggerusan untuk mengisolasi sampel DNA cabai. Sampel daun yang digunakan terdiri dari sampel daun cabai gendot yang diberi simbol CT dan cabai rawit merah dengan simbol RM. Konsentrasi dan kemurnian DNA ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji kuantitatif DNA pada sampel CT, CT1, CT2, RM, RM1, RM2. Kolom 260/280 menunjukkan tingkat kemurnian DNA.

Jenis Sampel	Konsentrasi (ng/ μL)	A260	A280	260/280	260/230
CT	34.7	0.694	0.444	1.58	0.71
CT1	199.2	3.984	2.754	1.45	1.24
CT2	82.0	1.641	0.983	1.67	1.05
RM	26.8	0.535	0.233	2.30	0.84
RM1	79.4	1.587	0.942	1.69	1.09
RM2	178.2	3.564	2.009	1.77	1.11

Hasil RAPD-PCR menggunakan primer OPA 8 menunjukkan adanya perbedaan pita DNA yang diperoleh (Gambar 1). Perbedaan pita merupakan polimorfisme, yaitu perbedaan pita-pita yang diperoleh akibat adanya perbedaan tempat penempelan primer pada masing-masing genom tanaman.



Gambar 1. Hasil penentuan panjang pita DNA dengan domain huruf, dengan DL= DNA ladder, CT=cabai gendot dan RM= cabai rawit merah

Tabel 2. Hasil pita polimorfisme yang terbentuk; terdapat 3 pita polimorfik dan 1 pita monomorfik

Pita	CT	RM	Polimorfisme
a	1	0	Ada
b	0	1	Ada
c	1	0	Ada
d	1	1	-
Total:			75%

Berdasarkan hasil visualisasi enam sampel DNA cabai yang telah di PCR menunjukkan hasil positif yaitu adanya pita DNA. Terdapat empat jenis pita yang terbentuk yang masing-masing telah diberi kode huruf berdasarkan jaraknya dari sumur gel agarosa. Berdasarkan tabel 2 menunjukkan adanya polimorfisme pita DNA sebesar 75% pada sampel uji. Sampel cabai CT dan CT1 memiliki pita DNA a dan c, sedangkan sampel CT2 memiliki pita DNA d, c dan a. Sampel cabai RM dan RM1 memiliki pita DNA b dan d, sedangkan sampel RM2 memiliki pita DNA d. Menurut Subositi dan Widiyastuti (2013) setiap sampel DNA memiliki pola fragmen DNA spesifik, fragmen DNA yang muncul pada sampel DNA tertentu dapat digunakan sebagai penanda untuk karakterisasi ataupun identifikasi aksesori, namun perlu dikaji lebih lanjut terkait jenis penanda molekuler dan jumlah sampel yang digunakan.

Berdasarkan gambar 1 didapatkan 3 pita polimorfik atau sekitar 75%. Tingginya angka ini menunjukkan perbedaan yang cukup signifikan antara sampel CT dan RM.

Sementara itu nilai indeks kesamaan yang didapatkan pada gambar 3 menunjukkan nilai 0.4 tingkat kesamaan. Menurut pendapat Meryalita (2012) analisis keragaman genetik digunakan untuk mendapatkan hubungan kekerabatan antar suatu spesies, penilaian dalam analisis genetik menggunakan nilai kesamaan, dimana semakin tinggi tingkat kesamaan genetik maka semakin kecil tingkat keragaman genetiknya. Hal ini selaras dengan pendapat Juniarti dan Olivia (2012), dimana semakin tinggi nilai jarak genetik pada matriks kesamaan genetik, maka tingkat kesamaan semakin besar dan sebaliknya, sedangkan semakin tinggi nilai jarak genetik maka tingkat perbedaan semakin kecil demikian pula sebaliknya.

4. Kesimpulan

Isolasi dan purifikasi sampel DNA dari tumbuhan cabai Gendot dan rawit merah telah berhasil dilakukan. Hasil amplifikasi menghasilkan 75% pita polimorfik dan 25% pita monomorfik DNA. Tingkat keragaman genetik cabai Gendot dan rawit merah tergolong rendah berdasarkan indeks kesamaan genetik sebesar 0,4.

Daftar pustaka

- Al-Samarai, F. R., & Al-Kazaz, A. A. (2015). Molecular Markers: An Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, IX(3), 118-130.
- Ashraf, K., Ahmad, A., Chaudhary, A., Mujeeb, M., Ahmad, S., Amir, M., et al. (2014). Genetic Diversity Analysis of *Zingiber Officinale* Roscoe by RAPD Collected from Subcontinent of India. *Saudi Journal of Biology Science*, XXI(2), 159-165.
- Cheema, & Pant. (2013). Rapd Analysis of the Seven Cultivated Varieties of Capsicum. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, II (1), 152-158.
- Ferniah, R. S., & Pujiyanto, S. (2013). Optimasi Isolasi DNA Cabai (*Capsicum annum* L.) Berdasar Perbedaan Kualitas dan Kuantitas Daun serta Teknik Penggerusan. *BIOMA*, CLVI(01), 14-19.

- Kementrian Pertanian. (2016). *Komoditas Pertanian Sub Sektor Holtikultura Cabai*. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian.
- Kumar, P., Thakur, S., Mattu, & Dutta, R. (2014). Standardization and Optimization of RAPD Assay for Genetic Analysis of Noctuid Species. *Journal of Entomology and Zoology*, II(3), 111-117.
- Meryalita, R. (2012). *Analisis Keragaman Genetik Kunyit (Curcuma longa Linn) dan Temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb.) Budidaya Tanah Jawa Berdasarkan Penanda Molekuler RAPD*. Bogor: IPB.
- Restu, M., Mukrimin, & Gusmiaty. (2012). Optimalisasi Teknik Ekstraksi dan Isolasi DNA Tanaman Suren (*Toona Sureni* Merr.) untuk Analisis Keragaman Genetik berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal Natur Indonesia*, XIV(2), 138-142.
- Subositi, D., & Widiyastuti, Y. (2013). Keragaman Genetik Aksesori Kinase (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) Hasil Seleksi Masa Tahun I Melalui Analisis RAPD. *Buletin Kebun Raya*, XVI(2), 93-100.