

**ANALISIS KERAGAMAN GENETIK TANAMAN OBAT GANDARIA
(*Bouea macrophylla*) DENGAN MENGGUNAKAN PENANDA *INTER
SIMPLE SEQUENCE REPEAT* (ISSR)**

Laporan Tugas Akhir

**Felia Putri Anggraeni
11171052**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2020**

ABSTRAK

ANALISIS KERAGAMAN GENETIK TANAMAN OBAT GANDARIA (*Bouea macrophylla*) DENGAN MENGGUNAKAN PENANDA *INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT* (ISSR)

Oleh:
Felia Putri Anggraeni
11171052

Gandaria (*Bouea macrophylla*) adalah tumbuhan asli Indonesia yang merupakan familia Anacardiaceae yang memiliki banyak potensi di bidang kesehatan salah satunya sebagai antidiabetika. Namun, sampai saat belum banyak peneliti yang menjadikan Gandaria sebagai objek penelitian ilmiah karena kelangkaannya di Nusantara. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui variasi genetik yang dimiliki oleh tanaman Gandaria yang ada di pulau Jawa dengan menggunakan metode ISSR-PCR. Primer ISSR dapat mendeteksi lebih banyak untai DNA sehingga akurasi identifikasi dan eksplorasi polimorfisme menjadi lebih tinggi. Hasil penelitian didapatkan total pita sebanyak 72 pita dengan 70 (97,3%) adalah pita polimorfik. Pita terbanyak dihasilkan oleh primer (GT)⁹T dan primer (GA)⁹A yaitu sebanyak 17 pita. Primer yang digunakan menghasilkan % polimorfisme diatas 50% sehingga primer ini efektif untuk mendeteksi polimorfisme pada tanaman Gandaria. Hasil analisis hubungan kekerabatan pada tanaman Gandaria didapatkan tingkat kemiripan secara genetik yang paling dekat dimiliki oleh sampel dari Kota Sukabumi dengan Kota Batu sebesar 0,93. Sedangkan tingkat kemiripan yang paling jauh secara genetik dimiliki oleh sampel dari Kota Bogor dengan Kota Serang, Kota Sukabumi, Kota Batu dan Kota Nganjuk yaitu sebesar 0,69 pada Primer (GT)⁹T.

Kata Kunci: *Bouea macrophylla*, Gandaria, ISSR, Variasi genetik

ABSTRACT

**ANALYSIS OF GENETIC VARIATION IN GANDARIA (*Bouea macrophylla*)
USING INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR) MARKERS**

By:
Felia Putri Anggraeni
11171052

*Gandaria (*Bouea macrophylla*) is a plant native to Indonesia which belongs to the Anacardiaceae family which has a lot of potential in the health sector, one of which is as an antidiabetic. However, until now not many researchers have made Gandaria an object of scientific research because of its scarcity in the archipelago. The purpose of this study was to determine the genetic variation of the Gandaria plant on the island of Java by using the ISSR-PCR method. ISSR primers can detect more DNA strands so that the accuracy of identification and exploration of polymorphisms is higher. The results of the study obtained a total of 72 bands of which 70 (97.3%) were polymorphic bands. The most bands were produced by primers (GT)9T and primers (GA)9A, which were 17 bands. The primer used resulted in %polymorphism above 50% so that this primer was effective for detecting polymorphism in Gandaria plants. The results of the analysis of kinship in Gandaria plants obtained the closest genetic similarity level to the samples from Sukabumi City and Batu City of 0.93. Meanwhile, the closest genetic similarity level was owned by samples from Bogor City and Serang City, Sukabumi City, Batu City and Nganjuk City, which was 0.69 in Primer 3 (GT)9T.*

Key words: *Bouea macrophylla, Gandaria, genetic variation, ISSR*

LEMBAR PENGESAHAN

ANALISIS KERAGAMAN GENETIK TANAMAN OBAT GANDARIA (*Bouea macrophylla*) DENGAN MENGGUNAKAN PENANDA *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR)

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi syarat kelulusan Program Strata I Farmasi

Felia Putri Anggraeni
11171052

Bandung, 23 Juni 2021

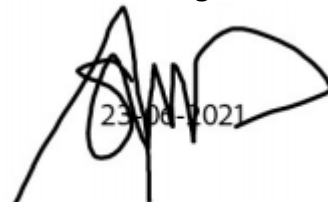
Menyetujui,

Pembimbing Utama,



(Soni Muhsinin, M.Si)
NIDN. 0402068407

Pembimbing Serta,



(apt. Asep Roni, M.Si)
NIDN. 0425128003

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah rabbil ‘alamiin. Puji syukur kehadiran Allah SWT karena atas segala rahmat, taufiq serta hidayahnya-Nya akhirnya penulis dapat menyelesaikan Laporan Tugas Akhir yang berjudul **“ANALISIS KERAGAMAN GENETIK TANAMAN OBAT GANDARIA (*Bouea macrophylla*) DENGAN MENGGUNAKAN METODE *Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)*”** tepat pada waktunya.

Laporan Tugas Akhir ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mengikuti sidang Tugas Akhir II yang merupakan syarat untuk menyelesaikan studi S1 serta untuk memperoleh gelar Sarjana di jurusan Farmasi Universitas Bhakti Kencana (UBK). Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui variasi genetik yang dimiliki oleh tanaman Gandaria yang ada di pulau Jawa dengan menggunakan penanda ISSR.

Penyusunan Laporan Tugas Akhir ini tidak lepas dari dukungan serta bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan penuh syukur kehadiran Allah SWT dan tanpa menghilangkan rasa hormat yang mendalam, saya selaku penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu penulis untuk menyelesaikan Laporan Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT karena atas berkat dan rahmat-Nya dapat memberikan keteguhan hati kepada saya sehingga saya dapat semangat dalam menyusun Laporan Tugas Akhir ini dan menyelesaikannya tepat pada waktunya.
2. My Support System orang tua saya Mama, Bapak serta adik-adik saya Rizky dan Khanza serta keluarga besar tercinta yang selalu mendo’akan dan memberi banyak dukungan.
3. Bapak Dr. Entris Sutrisno, S.Farm., MH.Kes., Apt sebagai Rektor Universitas Bhakti Kencana
4. Bapak Soni Muhsinin, M.Si sebagai pembimbing utama, atas segala saran, masukan, bimbingan serta nasehatnya selama penyusunan Laporan Tugas Akhir ini.

5. Bapak Apt. Asep Roni, M.Si sebagai pembimbing serta yang telah memberikan saran dan masukan serta bimbingannya selama penyusunan Laporan Tugas Akhir ini.
6. My Sugar Boo Bima Ali Mahendra yang telah menemani selama penulisan Laporan Tugas Akhir ini serta selalu memberikan semangat dan motivasinya kepada saya.
7. My Love Alarm Armida, Fellia, Nadhira, Nova, Novia, Teh Ama, dan Cici yang telah menjadi partner belajar serta selalu membantu saya dalam penyusunan ini.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penulisan ini hingga terselesaikannya Laporan Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa Laporan Tugas Akhir ini masih memiliki banyak kekurangan. Untuk itu penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya atas segala kekurangan dalam penyusunannya. Penulis juga mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak demi kesempurnaan Laporan Tugas Akhir ini. Selain itu, penulis berharap semoga ilmu yang terdapat pada Laporan Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi peneliti selanjutnya dan dapat memberikan ilmu yang luas bagi para pembacanya.

Bandung, Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
I.1 Latar belakang	1
I.2 Rumusan masalah.....	2
I.3 Tujuan dan manfaat penelitian	2
I.4 Hipotesis penelitian	2
I.5 Tempat dan waktu Penelitian	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
II.1 <i>Gandaria (Bouea)</i>	3
II.2 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	6
II.3 Siklus PCR.....	8
II.4 <i>Inter-simple sequence repeat-PCR (ISSR-PCR)</i>	9
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	11
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN	12
IV.1 Alat dan Bahan	12
IV.2 Prosedur.....	12
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
V.1 Isolasi DNA	15
V.2 Amplifikasi DNA	17
V.3 Elektroforesis Gel Agarosa.....	19
V.4 Analisis Data Amplifikasi	21
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	26
VI.1 Kesimpulan.....	26
VI.2 Saran.....	26

DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN	30

DAFTAR TABEL

Tabel IV.1 Konsentrasi Komponen PCR 13

Tabel V.1 Sekuens Primer ISSR yang digunakan 18

Tabel V.2 Nama Primer, total pita amplifikasi, pita polimorfik dan persen polimorfik
pada tanaman Gandaria (*Bouea macrophylla*)22

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Daun Buah Gandaria	5
Gambar 2.2 Buah Gandaria Muda.....	5
Gambar 2.3 Biji Buah Gandaria muda	5
Gambar 2.4 Buah Gandaria Matang	5
Gambar 2.5 Biji Buah Gandaria Masak	5
Gambar 2.6 Batang Pohon Buah Gandaria.....	5
Gambar 2.7 Proses Penggandaan DNA pada PCR.....	8
Gambar 2.8 Analisis Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel	9
Gambar 2.9 Gambaran skema ISSR-PCR.....	10
Gambar 4.1 Proses PCR	14
Gambar 5.1 Hasil Isolasi DNA <i>Bouea macrophylla</i>	15
Gambar 5.2 Isolat DNA <i>Bouea macrophylla</i>	17
Gambar 5.3 Elektroforegram DNA <i>Bouea macrophylla</i>	17
Gambar 5.5 Elektroforegram amplifikasi DNA <i>Bouea macrophylla</i> menggunakan primer ISSR	21
Gambar 5.6 Dendogram Hubungan Kemiripan pada <i>Bouea macrophylla</i> berdasarkan ISSR dengan metode UPGMA pada Primer 3 (GT) ⁹ T	23

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Master Mix PCR dan PVP.....30
Lampiran 2 Dendogram Analisis Hubungan Kekerbatan *Bouea macrophylla*.....31
Lampiran 3 Dokumentasi selama Penelitian33
Lampiran 4 *Certificate of Analysis* Kit Isolasi DNA.....35
Lampiran 5 *Certificate of Analysis* NFW36
Lampiran 6 *Certificate of Analysis* Ladder 100 bp37
Lampiran 7 *Certificate of Analysis* Diamond™38
Lampiran 8 *Certificate of Analysis* Loading dye39
Lampiran 9 *Certificate of Analysis* Agarosa40
Lampiran 10 Surat Determinasi *Bouea macrophylla*41

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	MAKNA
<i>B. macrophylla</i>	<i>Bouea macrophylla</i>
Bp	<i>Base pair</i>
DNA	<i>Deoxyribose Nucleid Acid</i>
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PVP	Polyvinylpyrolidone
TBE	Tris-borate EDTA
NTSys	Numerical Taxonomy System
UPGMA	<i>Unweight Pair-group Method</i>

BAB I. PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang

Gandaria terdiri dari dua spesies yaitu *Bouea contritifolia* (Roxb) Adelb dan *Bouea macrophylla* Griffith adalah satu-satunya pengelompokan yang menjadi acuan utama dalam membahas genus ini (Harsono et al., 2018). Gandaria (*Bouea macrophylla*) adalah tumbuhan asli Indonesia dan tersebar di Jawa, Sumatera, Kalimantan dan Maluku yang merupakan familia Anacardiaceae. Tanaman ini juga ditemukan di semenanjung Melayu dan Thailand. *Bouea macrophylla* dapat tumbuh pada daerah tropis basah. Secara alami, Gandaria merupakan tumbuhan khas di Jawa Barat, karena merupakan tumbuhan bernilai budaya dari suku Sunda yang tumbuh dari dataran rendah hingga dataran tinggi pada ketinggian 300 meter. (Harsono et al., 2017).

Gandaria memiliki banyak potensi di bidang kesehatan untuk dijadikan sebagai bahan pengobatan seperti sebagai antibakteri, antikanker, antidiabetik (Kumalasari et al., 2019), antioksidan (Ganesan and Xu, 2017) dan memiliki aktivitas sebagai pembersih radikal bebas dan pengkhelat logam (Thummajitsakul and Silprasit, 2017). Namun, sampai saat belum banyak peneliti yang menjadikan Gandaria sebagai objek penelitian ilmiah karena kelangkaannya di Nusantara. Salah satu yang masih menjadi kendala yaitu kurangnya informasi dan data tentang tanaman Gandaria sehingga perlu adanya tulisan tentang tanaman Gandaria terutama dalam segi varietas.

Variasi genetik merupakan variasi pada kromosom, gen ataupun basa nukleotida pada genom suatu organisme. Perbedaan pada urutan basa nukleotida (adenin, timin, guanin dan sitosin) yang menyusun DNA dalam sel merupakan variasi genetik pada tingkat dasar. Variasi genetik dapat terjadi karena beberapa sumber antara lain mutasi, migrasi dan rekombinasi. Analisis variasi genetik pada suatu organisme dapat dilakukan dengan menggunakan penanda molekuler (*molecular marker*). Penanda molekuler yang dapat digunakan untuk menganalisis variasi genetik salah satunya adalah *inter-simple sequence repeat* (ISSR) (Ghazalli et al., 2015). Menurut beberapa penelitian, ISSR sudah sering digunakan dalam analisis variasi genetik pada beberapa tanaman antara lain; tanaman Mangga (*Mangifera indica*) (González et al., 2002), Selasih (*Ocimum*) (Patel et al., 2015), Selada (*Eruca sativa* L.) (Zafar-Pashanezhad et al., 2020), Kacang Tunggak

(*Vigna aconitifolia* Jacq.) (Bhadkaria et al., 2020), Cherry (*Prunus avium* L.) (Ivanovych et al., 2017).

Primer yang digunakan dalam ISSR untuk mengamplifikasi urutan DNA antara mikrosatelit dapat dengan cepat membedakan individu-individu yang berkerabat dekat. Primer ISSR mendeteksi lebih banyak untai DNA sehingga akurasi identifikasi dan eksplorasi polimorfisme menjadi lebih tinggi (Patel et al., 2015). Berdasarkan latar belakang tersebut, akan dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui variasi genetik yang dimiliki oleh tanaman Gandaria yang ada di pulau Jawa dengan menggunakan penanda ISSR.

I.2 Rumusan masalah

Bagaimanakah variasi genetik yang dimiliki oleh tanaman Gandaria yang ada di pulau Jawa dengan menggunakan penanda ISSR

I.3 Tujuan dan manfaat penelitian

A. Tujuan

Mengetahui variasi genetik yang dimiliki oleh tanaman Gandaria yang ada di pulau Jawa dengan menggunakan penanda ISSR.

B. Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu untuk melengkapi alat bantu dalam program pemuliaan tanaman Gandaria (*Bouea macrophylla*) di masa depan.

I.4 Hipotesis penelitian

Gandaria memiliki beberapa varietas yang berkerabat dekat dapat dianalisis serta dibedakan menggunakan metode ISSR.

I.5 Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana pada bulan Februari – Juni 2021.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Gandaria (*Bouea*)

Bouea atau yang dikenal sebagai Gandaria di Indonesia merupakan tanaman buah tropis dari Asia Tenggara. Di Indonesia didistribusikan di Sumatera Utara, Jawa, Kalimantan dan Ambon selain di Indonesia, Gandaria juga tersebar di negara Malaysia dan Thailand (Harsono et al., 2017). Gandaria merupakan tanaman buah khas di Maluku yang sering disebut sebagai *exotic fruit* (Susilawati et al. 2017). Tanaman ini termasuk kedalam family Anacardiaceae. Buah Gandaria memiliki cukup banyak kandungan nutrisi dan dapat dieksploitasi untuk tujuan komersial (Anindyawati and Praptiwi, 2019)

Tanaman Gandaria memiliki beberapa nama daerah yang telah digunakan di beberapa tempat diantaranya yaitu jatake (Sunda); Gandaria (Jawa); Kedjauw lempang; Asam djanar, Kundang romania; Ramania pipit; Ramania hutan; Tampusu; Rengas; Tolok burung; Umpas (Kalimantan); baranya (Dayak ngaju); remieu (Gayo); pao gandari (Madura); buwa melawe (Bugis); wetes (Sulawesi Utara); rapo-rapo kebo, Kalawasa, (Makasar); dandoriah (Minangkabau); gondongan, kondongan, kundangan, si kundangan, rumenia, rumia, rembunia, kemenya, setar, serapoh, kundang, medang asam, gandaria, asam suku (Malaysia); plum mango (Inggris); Gandaria (Filipina); ma prang, somprang (Thailand) (Priyadi. et al. 2010).

II.1.1 Klasifikasi Gandaria (*Bouea*)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Sapindales
Family	: Anacardiaceae
Genus	: <i>Bouea</i>
Spesies	: <i>B. macrophylla</i>

II.1.2 Habitat

Gandaria bisa tumbuh pada tanah yang ringan dan subur dan merupakan tanaman tropic basah. Dapat tumbuh liar di hutan dataran rendah pada ketinggian 500 m. Pada ketinggian 5 – 800 mdpl gandaria dapat tumbuh baik namun sampai pada ketinggian 500 mdpl gandaria dapat tumbuh sangat baik dan produktif (Tanasale, 2011).

Menurut seorang peneliti genus *Bouea* memiliki dua species yaitu *Bouea oppitifolia* dan *Bouea macrophylla* (Harsono et al., 2018). Perumbuhan Gandaria cenderung lebih baik pada daerah ketinggian 400 – 700 mdpl, namun Gandaria bisa tumbuh baik di dataran rendah maupun dataran tinggi (Susilawati. 2017).

II.1.3 Pembudidayaan

Pembudidayaan Gandaria di Indonesia masih cukup terbilang langka atau jarang. Sehingga tanaman Gandaria masih cukup di katakana sulit. Budidaya tanaman Gandaria dilakukan melalui biji.

II.1.4 Ciri-ciri

Batang Gandaria kuat memiliki tinggi mencapai 27 m dan diameter batangnya sebesar 55 cm. Gandaria memiliki bentuk daun oval lonjong dengan lebar 4-8 cm, diameternya sebesar 11,5-30 cm serta berbentuk baji. Tulang daun Gandaria mempunyai warna coklat saat muda dan hijau muda saat tua dan mempunyai panjang tulang daun 1-2 mm dengan 15-25 pasang tulang daun yang saling bersilangan. Gandaria memiliki jenis bunga majemuk dengan panjang 4-13 cm. Pada bunganya Gandaria mempunyai empat kelopak, kecil dan berbentuk telur bulat dengan ukuran 1,5-2,5 mm x 1 mm, yang berwarna kuning muda atau kuning kehijauan dan benang sari 0,5-1 mm. Gandaria memiliki bentuk buah agak bulat yang berwarna hijau saat muda, dan berubah menjadi kuning atau jingga saat dewasa dengan diameter 3,5-5 cm x 3,4-5 cm. Kulit buah Gandaria bisa dimakan, manis atau asam, berair. Gandaria memiliki daging buah berwarna kuning jingga, dan setiap buah memiliki biji gandaria dengan kotiledon berwarna biru keunguan (Lim, 2012).



Gambar 2.1 Buah Gandaria Muda



Gambar 2.4 Buah Gandaria Matang



Gambar 2.2 Daun Buah Gandaria



Gambar 2.5 Biji Buah Gandaria Masak



Gambar 2.3 Biji Buah Gandaria muda



Gambar 2.6 Batang Pohon Buah Gandaria

II.1.5 Kandungan Gandaria

Analisis fitokimia yang dilakukan pada daun, buah mentah dan buah Gandaria masak menggunakan pelarut air, etanol, methanol dan hexana, menunjukkan bahwa buah gandaria memiliki kandungan berupa Alkaloid, anthraquinone, Flavonoid, Saponin, Phenol, Tanin, sterol dan triterpen, dan Vitamin C (Rudiana, et al. 2018).

II.1.6 Aktivitas Farmakologi

A. Antioksidan

Etil asetat yang terkandung pada batang *B. macrophylla* sangat kuat dengan IC50 4,89 µg/mL (Rusdiana, 2018). Dari ekstrak buah mentah *B. macrophylla* ditemukan beberapa agen antioksidan (fenolat, flavonoid, flavonol, tanin, antosianin dan asam askorbat) dengan kapasitas antioksidan [16.290,91 µM Fe (II) 100 g – 1] (Rajan & Bhat, 2016). Kadar fenolik yang dimiliki oleh buah gandaria sangat tinggi (Ganesan and Xu, 2017).

B. Aktivitas Pembersihan Radikal Bebas dan Pengkelat Logam

Aktivitas pembersihan radikal bebas dan pengkelat logam ekstrak etanol daun *B. macrophylla* Griffith. Gandaria masam menunjukkan nilai EC50 terendah yang menunjukkan aktivitas pembersihan radikal bebas tertinggi. Selain itu, aktivitas pengkelat metal paling banyak ditemukan pada ekstrak daun gandaria asam (Thummajitsakul and Silprasit, 2017).

C. Antikanker

Ditemukan ekstrak air, methanol, kloroform dan heksana menunjukkan aktivitas penghambatan yang menjanjikan terhadap sel karsinoma. Dari hasil penelitian kanker payudara hanya dapat dihambat oleh ekstrak heksana.

D. Antidiabetik

Ekstrak etanol yang terkandung pada daun *Ramania (Bouea macrophylla* Griffith) berpengaruh sekitar ($p < 0,05$) terhadap penurunan kadar gula darah mencit putih yang diinduksi aloksan. 500 mg/kgBB adalah dosis efektif pada ekstrak etanol daun ramania yang dapat digunakan sebagai penurun kadar gula darah (Kumalasari et al., 2019).

II.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) adalah metode in vitro untuk mensintesis urutan tertentu dari DNA menggunakan dua primer oligonukleotida yang berhibridisasi ke pita yang berlawanan dan menjepit dua target DNA. PCR didasarkan pada amplifikasi enzimatik dari fragmen DNA menggunakan dua primer oligonukleotida yang melengkapi ujung 5' sampai 3' dari dua urutan target. Oligonukleotida digunakan sebagai primer PCR yang memungkinkan DNA template dicopy oleh DNA polymerase dan merupakan bagian awal dimana proses amplifikasi berjalan ditandai dengan penempelan DNA

primer pada template DNA. Template DNA digunakan sebagai pendukung terjadinya annealing primer dan memisahkan untaian DNA substrat melalui pemanasan.

II.2.1 Komponen PCR

Menurut Handoyo dan Rudretna (2001) komponen PCR terdiri dari sebagai berikut:

A. Primer

Primer merupakan urutan nukleotida dengan rantai pendek yang menentukan target DNA. Pada saat proses eksistensi DNA, primer diperlukan untuk bertindak sebagai penghalang pada fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan menyediakan gugus hidroksi (-OH) di ujung 3'.

B. Enzim Polimerase DNA

Enzim Polimerase DNA merupakan suatu enzim untuk mensintesi untaian DNA baru yang juga dapat berfungsi sebagai katalisis pada reaksi polimerse DNA di tahap perpanjangan DNA.

C. dNTPs

dNTPs adalah suatu bahan campuran yang terdiri dari dTTP (deoksitimidin trifosfat), dGTP (deoksiguanin trifosfat), dCTP (deoksicitidin trifosfat) dan dATP (deoksiadenosin trifosfat). dNTPs berfungsi sebagai *building block* DNA yang dibutuhkan dalam proses eksistensi DNA. dNTPs akan menempel ke ujung 3' dari gugus -OH primer untuk membentuk untai baru yang melengkapi dengan untai DNA cetakan.

D. Buffer PCR dan MgCl₂

Buffer PCR berfungsi untuk memastikan pH media. Selain buffer PCR, ion Mg²⁺ yang diturunkan dari MgCl₂ juga diperlukan. MgCl₂ digunakan sebagai kofaktor yang merangsang aktivitas DNA polymerase. Kehadiran MgCl₂ akan meningkatkan interaksi primer dengan *template* yang membentuk kompleks larut dengan dNTPs.

E. *Template* DNA

Template DNA merupakan fragmen DNA ini berfungsi sebagai cetakan untuk membentuk DNA baru yang sama. *Template* DNA dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid atau fragmen DNA.

II.3 Siklus PCR

II.3.1 Denaturasi

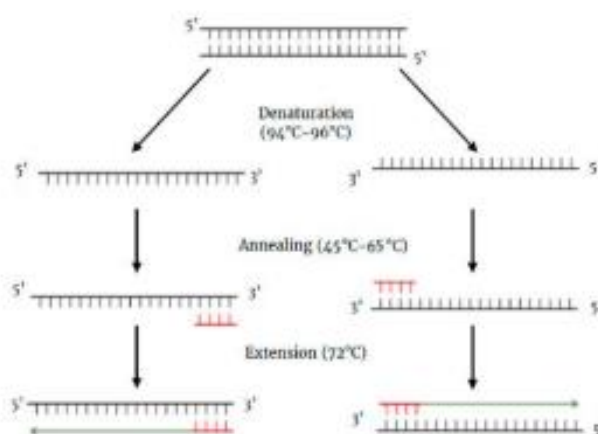
Denaturasi adalah proses pertama pada PCR, yaitu proses pemisahan DNA dari DNA beruntai ganda menjadi DNA beruntai tunggal. Waktu yang dibutuhkan untuk denaturasi biasanya sekitar 3 menit dan terjadi pada suhu 90°C. Apabila terjadi kegagalan denaturasi maka akan mengakibatkan renaturasi (pembentukan DNA untai ganda kembali) yang akan menggagalkan proses PCR.

II.3.2 Annealing

Tahap ini merupakan proses pendinginan DNA untai tunggal yang terjadi pada suhu 45-65°C. Suhu annealing tergantung pada primer yang digunakan, semakin panjang primer yang digunakan maka suhu yang diperlukan semakin tinggi. Tahap annealing berkisar selama 30-45 detik.

II.3.3 Extension

Tahap *extension* merupakan tahap dimana Taq polymerase memulai aktivitasnya untuk memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Suhu yang digunakan pada saat proses *Extension* yaitu 72°C dengan kisaran perpanjangan 35-100 nukleotida/detik, tergantung pada molekul DNA target, konsentrasi garam dan pH. Reaksi ini membutuhkan waktu hingga 25-30 siklus untuk mendapatkan molekul DNA beruntai ganda baru yang merupakan hasil reaksi polimerasi dan jumlahnya melebihi jumlah *template* DNA yang digunakan.

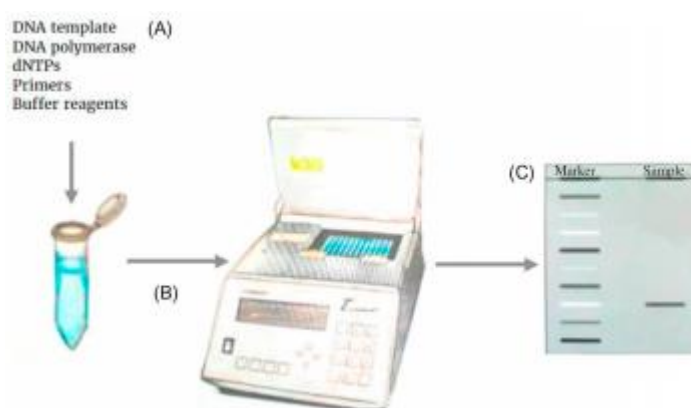


Gambar 2.7 Proses Pengandaan DNA pada PCR

(Sumber: Jalali et al., 2017)

II.3.4 Elektroforesis Gel

Elektroforesis gel adalah teknik pemisahan molecular (DNA) berdasarkan ukuran dan muatan yang prosesnya melibatkan medan listrik yang diaplikasikan pada medium yang berisi sampel. Ketika arus listrik dialirkan ke medium yang telah mengandung protein maka komponen protein akan berpindah. Kecepatan perpindahan dari molekul DNA bergantung pada ukuran molekul DNA, konsentrasi agarose, konfirmasi DNA, tegangan, dan Ethidium Bromide sebagai zat warna.



Gambar 2.8 Analisis Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel

(Sumber: Jalali et al., 2017)

II.4 *Inter-simple sequence repeat-PCR (ISSR-PCR)*

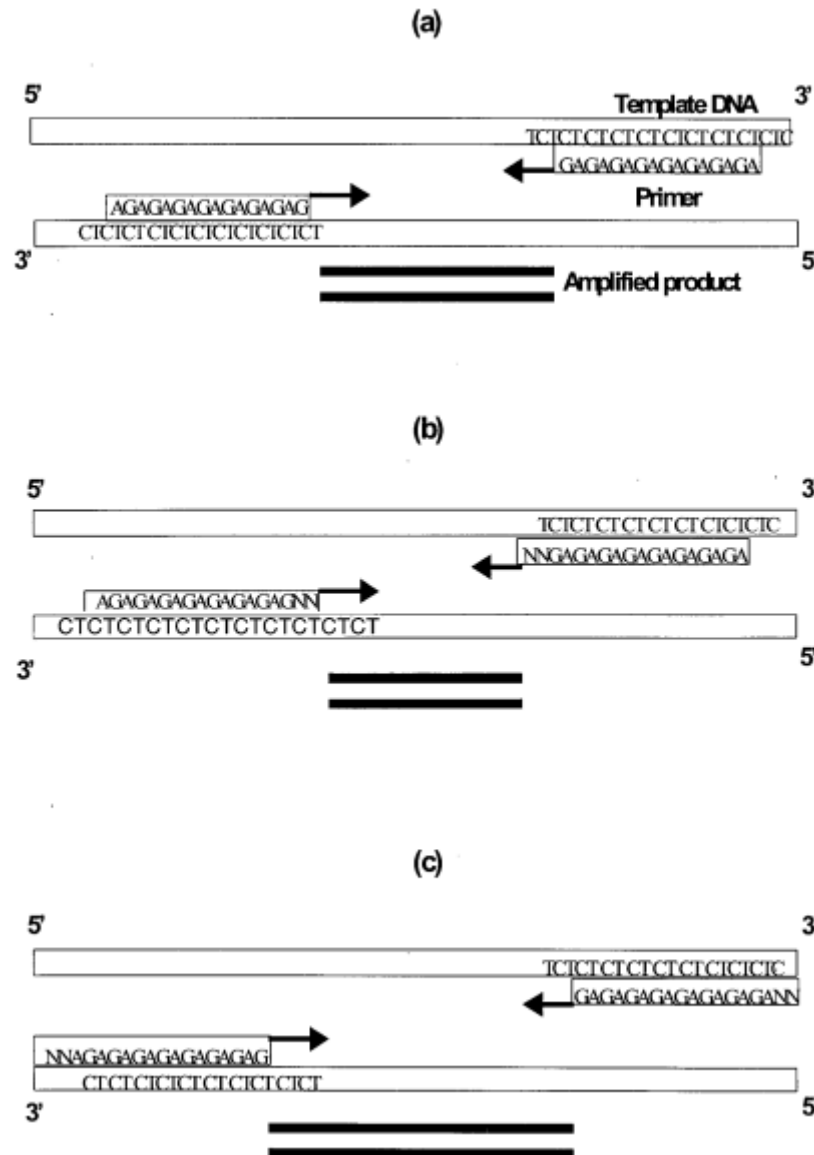
ISSR adalah penanda berbasis DNA, yang primernya dikembangkan menurut nukleotida penta, dinukleotida atau tetra nukleotida berulang. Penanda ini memiliki reproduktifitas, stabilitas dan kesederhanaan yang telah digunakan dalam berbagai penelitian yang melibatkan pemetaan gen, variasi genetik, kontruksi sidik jari dan identifikasi plasma nutfah dengan hasil yang sukses (Zafar-Pashanezhad et al., 2020).

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuen di antara mikrosatelit pada ISSR dapat dengan cepat membedakan individu yang memiliki hubungan dekat. Primer ISSR dapat mendeteksi lebih banyak pita DNA sehingga akurasi identifikasi dan eksplorasi polimorfisme lebih tinggi. Dalam amplifikasi, primer ISSR dapat memperlihatkan sejumlah lokus per primer. Segmen DNA hadir pada jarak yang dapat diperkuat dalam antara dua daerah berulang mikrosatelit identik atau masuk ke arah yang berlawanan (Patel et al., 2015).

Penanda ISSR menghasilkan pita yang lebih polimorfisme daripada RAPD, bahkan 6,5 kali lebih tinggi dibanding RAPD karena panjang primer yang lebih panjang dari primer

RAPD (Qian et al., 2001). Penanda ini merupakan dominan marker, tidak memerlukan desain primer yang khusus karena primer ISSR bekerja secara acak.

Panjang primer ISSR 16-25 bp menghasilkan polimorfisme yang lebih tinggi. Penanda ISSR biasanya menghasilkan produk amplifikasi 200 – 2000 bp, produk yang dihasilkan panjang serta dapat divisualisasi dengan baik menggunakan elektroforesis gel agarosa dan poliakrilamida (Reddy et al., 2002).



Gambar 2.9 Gambaran skema ISSR-PCR pada primer tunggal (AG)₈, (a) *unanchored*, (b) *anchored* pada 3', (c) *anchored* pada 5' dengan DNA target (TC)_n.

(Sumber: Reddy et al., 2002)

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana pada bulan Februari – Juni 2021. Penelitian ini didesain untuk menganalisis variasi genetik yang dimiliki oleh Gandaria (*Bouea macrophylla*) dengan menggunakan penanda molekuler ISSR. Tahapan penelitian diawali dengan persiapan alat dan bahan, pengumpulan sampel Gandaria (*Bouea macrophylla*), isolasi DNA dengan menggunakan protokol Wizard[®] *Genomic DNA Purification Kit* (Promega) yang dimodifikasi, amplifikasi DNA dengan penanda molekuler ISSR, visualisasi hasil produk PCR dengan gel agarosa 2% dan analisis data.

Tahap pertama dimulai dengan pengumpulan dan penyiapan sampel Gandaria berupa daun dari tanaman Gandaria yang diambil dari beberapa daerah yang mewakili pulau Jawa diantaranya yaitu Jawa Barat (Bogor, Sukabumi, Serang) dan Jawa Timur (Kota Batu dan Nganjuk). Tahap kedua isolasi DNA pada daun Gandaria yang dilakukan dengan mengikuti protokol Wizard[®] *Genomic DNA Purification Kit* (Promega) yang dimodifikasi meliputi beberapa tahapan yaitu penggerusan, penambahan PVP (*Polyvinylpyrrolidone*) pada *Nuclei Lysis Solution*, penambahan RNase *Solution*, inkubasi pada suhu 37°C, penambahan *Protein Precipitation Solution*, sentrifugasi, penambahan DNA *Rehydration Solution*. Tahap ketiga amplifikasi DNA dengan penanda molekuler ISSR dengan total volume PCR 25µL meliputi tahapan denaturasi, annealing dan ekstensi. Primer yang digunakan adalah primer diambil dari literatur yang berasal dari Makrogen Korea Selatan. Tahap keempat visualisasi produk PCR dengan menggunakan gel agarose 2% dalam buffer TBE 1X dengan pewarna yang digunakan Diamond (Promega). Tahap kelima analisis data dengan melakukan penilaian polimorfisme pita DNA yang dilakukan dengan menggunakan program Gel Analyzer dengan melalui skoring data biner. Analisis jarak genetik diantara Gandaria dilakukan dengan menggunakan *Unweight Pair-group Method* (UPGMA) serta analisis cluster menggunakan Numerical Taxonomy System (NYSys-pc) versi 2.02. Pengelompokan pola individu berdasarkan matriks kesamaan genetik tercermin dalam bentuk dendogram dengan kisaran kesamaan genetik 0,00 (0%) sampai 1,00 (100%).