

**ANALISIS VARIASI GENETIK TANAMAN GANDARIA (*BOUEA
MACROPHYLLA GRIFFITH*) MENGGUNAKAN PENANDA SRAP
(*SEQUENCE-RELATED AMPLIFIED POLYMORPHISM*)**

Laporan Tugas Akhir

**Nadya Choerunnisa
11171062**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2021**

ABSTRAK

Analisis variasi genetik tanaman Gandaria (*Bouea macrophylla* Griffith) Menggunakan penanda SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*)

**Oleh :
Nadya Choerunnisa
11171062**

Gandaria merupakan tanaman tropis yang tersebar di Indonesia. Flora identitas Jawa Barat ini memiliki banyak manfaat, tetapi informasi yang terdapat mengenai tanaman ini masih terbatas, salah satunya informasi mengenai variasi genetik. Penelitian ini ditujukan untuk menyediakan informasi genetik tanaman gandaria. Harapannya, dengan adanya penelitian ini dapat membantu dalam pelestarian Gandaria maupun dalam upaya pemuliaannya. Variasi genetik gandaria dianalisis menggunakan *primer Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP)*, dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Sebanyak 5 aksesori Gandaria dari 5 lokasi berbeda diamplifikasi dengan 3 kombinasi primer SRAP. Hasil amplifikasi diterjemahkan menjadi data biner melalui scoring, kemudian dianalisis menggunakan *software NTsys 2.1*. Pembuatan dendrogram dilakukan menggunakan metode *Unweighted Pair Grup Method Using Arithmetic Method (UPGMA)*. Hasil menunjukkan variasi genetik gandaria termasuk kategori rendah, yaitu pada rentang 0-0,10. Keekerabatan terdekat terdapat pada aksesori Kota Serang dan Kota Nganjuk. Keekerabatan terjauh terdapat pada aksesori Kota Sukabumi dan Serang. Primer SRAP efektif digunakan untuk analisis variasi genetik gandaria dengan nilai persen polimorfisme 88,66 %.

Kata Kunci : *Bouea macrophylla* Griffith, Gandaria, SRAP, Variasi genetik, PCR

ABSTRACT***Genetic variation analysis of Gandaria (*Bouea macrophylla* Griffith) using SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) markers***

Oleh :
Nadya Choerunnisa
11171062

Gandaria is a tropical plant that spreads in Indonesia. This West Java identity flora has many benefits, but the information available about this plant is still limited, one of which is information about genetic variations. This research is intended to provide genetic information of gandaria. It is hoped that this research can help in the preservation of gandaria and in its breeding efforts. The genetic variation of gandaria was analyzed using Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) primers, with Polymerase Chain Reaction (PCR). A total of 5 gandaria accessions from 5 different locations were amplified with 3 combinations of SRAP primers. The amplification results were translated into binary data through scoring, then analyzed using NTsys 2.1 software. The dendrogram was made using the Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Method (UPGMA). The results show that the genetic variation of gandaria is in the low category, which is in the range of 0-0.10. The closest relatives are found in the accessions of Serang City and Nganjuk City. The furthest kinship is found in the accessions of Sukabumi and Serang. SRAP primer was effectively used for analysis of genetic variation of gandaria with a polymorphism percent value of 88.66 %.

Keywords : *Bouea macrophylla* Griffith, Gandaria, SRAP, Genetic variation, PCR

LEMBAR PENGESAHAN

Analisis variasi genetik tanaman Gandaria (*Bouea macrophylla Griffith*) Menggunakan penanda SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*)


Laporan Tugas Akhir
Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan Sarjana Farmasi

Nadya Choerunnisa
11171062

Bandung, 13 Agustus 2021

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



(Soni Muhsinin, M.Si.)
NIDN. 0402068407

Pembimbing Serta,



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

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil ‘alamiin, allahumma shalli ‘alaa Sayyidinaa Muhammad. Segala puji hanya bagi Allah SWT, begitupun sholawat dan salam semoga tak lupa untuk selalu dihaturkan pada Baginda Rasulullah SAW. Alhamdulillah hanya berkat segala pertolongan-Nyalah, akhirnya penulis dapat menyelesaikan laporan tugas akhir dengan judul “**Karakterisasi variasi genetik tanaman Gandaria (*Bouea macrophylla Griffith*) Menggunakan penanda SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*)**” sebagai salah satu syarat yang harus dipenuhi sebagai syarat kelulusan Sarjana Farmasi

Dukungan dari berbagai pihak sangat membantu saya selama proses penelitian hingga penyusunan laporan tugas akhir. Oleh karena itu, ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada:

1. Ibu, sebagai satu-satunya malaikat tanpa sayap dengan kasih tak terhingga yang selalu melindungi dan mendukung saya
2. Orang tua : almarhum Bapa, Ibu, Pak lek, Aip, juga kepada keluarga besar sebagai motivasi terkuat yang telah memberikan doa-doa terbaik, nasihat terbaik, serta dukungan moril maupun materil
3. Bapak Dr. Entris Sutrisno, S.Farm., MH.Kes., Apt sebagai Rektor Universitas Bhakti Kencana
4. Bapak Soni Muhsinin, M.Si sebagai pembimbing utama, Asep Roni, M.Si., Apt sebagai pembimbing serta yang telah memberikan banyak arahan, ilmu, motivasi serta berbagai masukan
5. Sahabat *Good People* yang menemani selama 4 tahun menimba ilmu, Eka rahmawati, Tinna nurutami, Ulfani sandika sah dan Sri meti nila dewi
6. Teman pejuang penelitian, Felia putri anggraeni, Novia purnamasari, dan seluruh angkatan Explosive 2017
7. Kepada Hitam dan Putih, *hiding support* yang bersamanya harapan saya terjaga.

13 Agustus 2021

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR SINGKATAN	ix
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar belakang.....	1
1.2. Rumusan masalah.....	2
1.3. Tujuan dan manfaat penelitian	2
1.4. Hipotesis penelitian.....	2
1.5. Tempat dan waktu Penelitian	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
II.1. Gandaria	3
II.2. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	6
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	12
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN	13
IV.1. Alat.....	13
IV.2. Bahan.....	13
IV.3. Prosedur	14
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
V.1. Isolasi DNA.....	17
V.2. Kualitas DNA.....	20
V.3. Seleksi Primer	21
V.4. <i>Polymerasi Chain Reaction (PCR-SRAP)</i>	22
V.5. Elektroforesis Gel.....	23
V.6. Analisis SRAP.....	25
V.7. Analisis Filogenik	27
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN	29
DAFTAR PUSTAKA	30

LAMPIRAN.....	Error! Bookmark not defined.
Lampiran 1. Surat Pernyataan Bebas Plagiasi	Error! Bookmark not defined.
Lampiran 2. Surat Persetujuan untuk dipublikasikan di media online ...	Error! Bookmark not defined.
Lampiran 3. Dendogram Primer 2 & 3	35
Lampiran 4. Perhitungan PVP, MIX PCR & Pengenceran DNA 10x.....	36
Lampiran 5. Perhitungan Pembuatan Gel agarose & TBE	37
Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian.....	38
Lampiran 7. Surat Determinasi Tumbuhan.....	39
Lampiran 8. <i>Certificate of Analysis Nuclease free water</i>	40
Lampiran 9. <i>Certificate of Analysis Wizard Genomic DNA Purification Kit</i>	41
Lampiran 10. <i>Certificate of Analysis DNA Ladder 100 bp</i>	42
Lampiran 11. <i>Certificate of Analysis blue/ orange loading dye</i>	43
Lampiran 12. <i>Certificate of analysis Agarosa</i>	44
Lampiran 13. <i>Certificate of Analysis Diamond</i>	45

DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI

Gambar 2.1 Daun Gandaria	3
Gambar 2.2 Pohon Gandaria.....	3
Gambar 2.3 Buah Gandaria Mentah	4
Gambar 2.4 Buah Gandaria Matang	4
Gambar 2.5 Daging dan Biji Buah Gandaria Mentah.....	4
Gambar 2.6 Daging dan Biji Buah Gandaria Matang.....	4
Gambar 2.7 Skema prinsip PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)	7
Gambar 5.1 Perbandingan warna larutan isopropanol antara daun tua dan muda.....	17
Gambar 5.2 Sampel gandaria setelah penggerusan.....	18
Gambar 5.3 Penggunaan setengah reaksi pertabung.....	18
Gambar 5.4 Hasil Isolasi DNA sebelum dan sesudah penambahan PVP 2%	19
Gambar 5.5 Hasil isolasi DNA	20
Gambar 5.6 Elektroforegram DNA gandaria menggunakan Ladder DNA 100 bp	21
Gambar 5.7 Elektroforegram produk PCR-SRAP menggunakan konsentrasi berbeda.....	24
Gambar 5.8 Elektroforegram produk PCR-SRAP Gandaria	26
Gambar 5.9 Dendogram kekerabatan gandaria.....	28

DAFTAR TABEL

Tabel II.1. Kandungan Senyawa antioksidan pada buah Gandaria masak dan mentah.....	5
Tabel II.2. Primer SRAP acuan.....	11
Tabel IV.1. Konsentrasi <i>mix</i> PCR.....	15
Tabel V.1. Kombinasi Primer SRAP	22
Tabel V.3. Data variasi genetik Gandaria	26

DAFTAR SINGKATAN

SINGKATAN

MAKNA

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SRAP	<i>Sequence-related amplified polymorphism</i>
bp	<i>Base pair</i>
DNA	<i>Deoxyribose Nucleid Acid</i>
TBE	<i>Tris-borate EDTA</i>
PVP	<i>Polivinyliodine</i>
NTSys	Numerical Taxonomy System
UPGMA	<i>Unweight Pair-group Method</i>

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Sebagai negara beriklim tropis, Indonesia memiliki keanekaragaman jenis tumbuhan yang tersebar luas di tiap daerahnya. Gandaria (*Bouea macrophylla* Griffith) merupakan salah satu spesies tanaman yang berasal dari suku anacardiaceae yang tersebar di wilayah malesian, diantaranya Malaysia, Sumatera, Jawa, sunda, Kalimantan, Singapore dan Thailand. Umumnya di Indonesia, tanaman ini tersebar di pulau Ambon dan Saparua (Priyadi et al., 2010, Gower et al., 2012). Tanaman yang menjadi identitas Jawa Barat ini memiliki nama lain Gandaria (Jawa); ma prang, somprang (Thailand); plum mango (Inggris); gandaria, kundang (Malaysia). Tanaman ini dimanfaatkan mulai dari batang, buah, hingga daunnya.

Gandaria memiliki banyak kandungan senyawa yang bermanfaat. Analisis fitokimia yang dilakukan Sukalingam et al., (2018) menunjukkan, buah gandaria memiliki kandungan berupa Alkaloid, Flavonoid, Saponin, Phenol, Tanin, Sterol dan Triterpen, dan Vitamin C. Gandaria memiliki potensi besar dalam dunia kesehatan karena memiliki aktivitas antioksidan (Ganesan et al., 2017), antidiabetes, anticancer, aktivitas pembersihan radikal bebas, dan antibakteri (Kumalasari et al., 2019). Uniknya, Aktifitas antibakteri pada Gandaria ditemukan lebih besar pada sel yang resisten terhadap obat, memungkinkan ditemukannya senyawa obat antibakteri baru untuk mengatasi resistensi obat (Ekklesia et al., 2020).

Variasi genetik merupakan variasi pada kromosom, gen ataupun basa nukleotida pada genom suatu organisme. Perbedaan pada urutan basa nukleotida (adenine, timin, guanine dan sitosin) yang membentuk DNA dalam sel merupakan variasi genetik pada tingkat dasar. Variasi genetik dapat terjadi karena beberapa sumber antara lain, mutase, migrasi dan rekombinasi. Penanda genetik molekuler merupakan alat yang ampuh untuk menganalisis variasi genetik dan identifikasi spesies.

Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), adalah penanda molekuler yang pertama kali diperkenalkan oleh Li dan Quiros (2001), dengan keunggulan seperti polimorfisme tinggi, pengulangan, pengoperasian mudah, universal, dan kombinasi bebas primer positif dan negative (Agarwal et al., 2008; Sun et al., 2013). Teknik SRAP sangat berguna untuk evaluasi keragaman genetik spesies, kultivar dan galur pemuliaan, terutama untuk spesies dengan sistem penanda yang belum berkembang seperti gandaria. SRAP adalah metode molekuler yang cepat, murah dan efisien yang dapat diterapkan pada pemuliaan tanaman. Teknik SRAP dapat

digunakan sebagai alat molekuler alternatif untuk mengetahui keragaman genetik buah Gandaria (Kaewpongumpai et al., 2016). Penelitian ini ditujukan untuk menyediakan informasi genetik tanaman gandaria. Harapannya, dengan adanya penelitian ini dapat membantu dalam pelestarian gandaria maupun dalam upaya pemuliaannya.

1.2. Rumusan masalah

Apakah Metode SRAP dapat menganalisis variasi genetik gandaria.

1.3. Tujuan dan manfaat penelitian

1.3.1. Tujuan penelitian

Menganalisis variasi genetik tanaman Gandaria (*Bouea macrophylla* Griffith)
Menggunakan penanda SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*).

1.3.2. Manfaat Penelitian

- a. Bagi Universitas Bhakti Kencana (UBK) untuk menambah pengayaan literatur tentang variasi genetik tanaman Gandaria (*Bouea macrophylla* Griffith)
- b. Bagi peneliti menambah wawasan tentang metode karakterisasi dan variasi genetik tanaman Gandaria (*Bouea macrophylla* Griffith)
- c. Bagi industri farmasi memberikan informasi mengenai variasi genetik gandaria dalam pemanfaatan gandaria sebagai sediaan farmasi
- d. Bagi masyarakat umum untuk membantu pelestarian Gandaria sebagai tanaman tropis Indonesia.

1.4. Hipotesis penelitian

Tanaman Gandaria (*Bouea Macrophylla* Griffith) diduga memiliki variasi genetik.

1.5. Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Juni 2021 bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Bhakti Kencana Bandung.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Gandaria

Gandaria (*Bouea macrophylla Griffith*) merupakan tanaman tropis dari keluarga anacardiaceae yang tersebar di daerah Sumatera, Jawa Tengah, Jawa Barat, Kalimantan, Maluku, dan Thailand. Di Indonesia, tanaman ini tersebar di pulau Ambon dan Saparua (Priyadi, 2010). Tanaman ini banyak dibudidayakan di Kawasan Malesiana, diantaranya Sumatera, Malaysia, Thailand dan Ambon. Gandaria memiliki nama lain Gandaria (Jawa); Jatake (Sunda); Pao gandari (Madura); Buwa melawe (Bugis), Kundang rumania; Asam djanar, Ramania pipit; Kedjauw le pang; Ramania hutan; Rengas; Tampusu; Tolok burung; Wetes (Sulawesi Utara), Remieu (Gayo), Umpas (Kalimantan), Barania (Dayak ngaju), Dandoriah (Minangkabau), Kalawasa, Rapo-rapo kebo (Makasar), Ma prang, Somprang (Thailand); Plum mango (Inggris); Kundangan, Gondongan, Kondongan, Rumenia, Si kundangan, Kemenya, Rembungia, Rumia, Setar, Serapoh, Asam suku, Medang asam, Gandaria, Kundang (Malaysia); Gandaria (Filipina) (Priyadi, 2010). Gandaria tumbuh baik di dataran tinggi maupun dataran rendah. Namun, pertumbuhannya cenderung lebih baik pada daerah ketinggian 400-700 mdpl (Tangkuman, 2006).

II.1.1. Ciri-ciri Gandaria

Pohon Gandaria memiliki ukuran yang lumayan besar dan seringkali disebut pohon hutan. Memiliki tinggi yang mencapai 27 m dengan batang yang kuat berdiameter 55 cm. Daun gandaria berbentuk oval dengan bentuk ujung daun Baji (*Cuneate*) dengan diameter 11,5-30 cm dan lebar 4-8 cm. Gandaria memiliki 15-25 pasang tulang daun yang saling bersilangan.



Gambar 2.1. Daun gandaria



Gambar 2.2. Pohon Gandaria



Gambar 2.3. Buah Gandaria mentah



Gambar 2.4. Buah Gandaria Matang



Gambar 2.5. Daging dan biji buah gandaria mentah



Gambar 2.6. Daging dan biji buah gandaria matang

Ukuran tulang daun gandaria berkisar 1-2 mm. Bunga gandaria memiliki jenis bunga majemuk, dengan panjang 4-13 cm. Kelopak tetramerous bunga gandaria berwarna kuning terang atau kuning kehijauan, berukuran kecil dan berbentuk bundar telur dengan ukuran 1,5-2,5 mm x 1 mm, dengan panjang benang sari 0,5-1 mm. Diameter buah gandaria berkisar 3.5-5 cm x 3.4-5 cm, dengan daging buah berair, manis atau asam, berwarna hijau saat mentah dan berwarna kuning oranye setelah matang. Buah Gandaria dapat dimakan dan memiliki satu biji dengan kotiledon berwarna biru keunguan (Lim, 2012).

II.1.2. Kandungan

Gandaria memiliki kandungan metabolit sekunder dan beragam khasiat. Analisis fitokimia yang dilakukan (Sukalingam, 2018) pada daun dan buah Gandaria menunjukkan bahwa buah gandaria memiliki kandungan berupa Alkaloid, Flavonoid, Saponin, Phenol, Tanin, sterol, triterpen, dan Vitamin C.

Tabel II.1.
Kandungan Senyawa antioksidan pada buah Gandaria masak dan mentah
(Rajan and Bhat, 2016)

Senyawa	Jumlah	Satuan	Pelarut	Jenis
Tanin	648,28	mg CE 100 g – 1	Metanol	buah mentah
Flavonoid	1.004,30	mg CE 100 g – 1	Etanol	buah mentah
Antosianin	2,24	mg c-3-gE 100 g – 1	Etanol	buah matang
Vitamin C	99,27	mg AA 100 g – 1	Metanol	buah mentah
Fenolat	2.366,27 -5.050,60	mg GAE 100 g – 1	Metanol	buah mentah

II.1.3. Efek Farmakologi

A. Antioksidan

Antioksidan merupakan salah satu senyawa yang dapat mencegah maupun memperlambat kerusakan sel akibat radikal bebas, molekul tidak stabil yang dihasilkan oleh berbagai jenis proses kimia normal tubuh atau hasil radiasi sinar ultra violet (UV), polusi asap rokok dan pengaruh lingkungan lainnya. Aktifitas antioksidan gandaria ditandai dengan ditemukannya agen antioksidan berupa senyawa fenolat, flavonoid, flavonol, tanin, antosianin dan asam askorbat pada ekstrak buah Gandaria (Rajan & Bhat., 2018). Tingginya kadar senyawa fenolik memperkuat aktifitas antioksidan. Senyawa fenolik diakui sebagai antioksidan kuat dan komponen penyusun dominan bahan tumbuhan (Ganesan dan Xu, 2017) Uji anti oksdian dilakukan dan menghasilkan penghambatan DPPH 77,69% dan ABTS 99,76%.

B. Aktivitas pembersihan radikal bebas dan pengkelat logam

Pada penelitian yang dilakukan (Thummajitsakul, 2017), Gandaria masam menunjukkan nilai EC50 terendah yang menunjukkan aktivitas pembersihan radikal bebas tertinggi. Selain itu, aktivitas pengkelat besi paling banyak ditemukan pada ekstrak daun gandaria asam.

C. Anti bakteri

ekstrak biji buah gandaria memiliki efek penghambatan terhadap bakteri gram positif, gram negatif patogen (15 regangan), dan ragi (*C. albican*) dengan MIC berkisar dari 39.0-625.0 µg/ ml. Aktifitas antibakteri yang lebih besar ditemukan pada sel yang resistan terhadap obat daripada pada sel yang sensitif terhadap obat, dengan menghambat pertumbuhan

V.Parahemolyticus, S. boydii, dan E. faecalis yang resisten terhadap vankomisin. (Ekklesia et al., 2020).

D. Anti Cancer

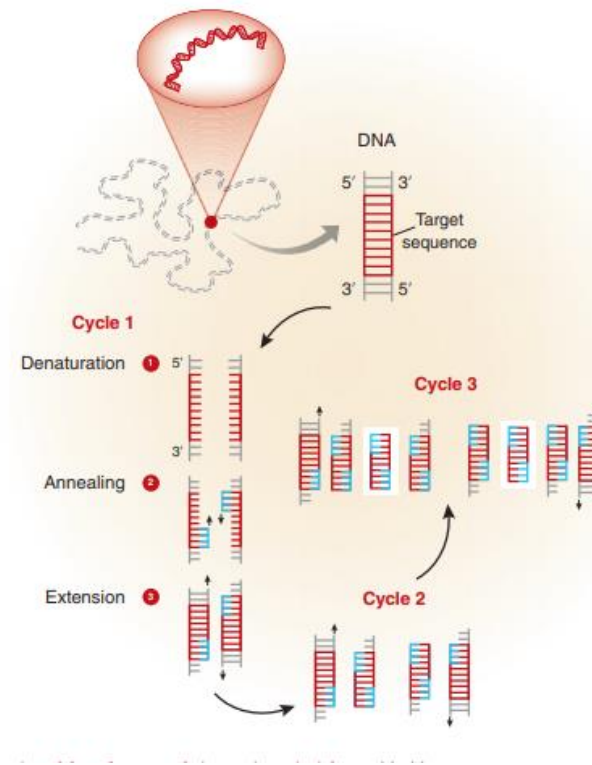
Ekstrak gandarua menunjukkan aktivitas perlawanan terhadap sel kanker. Menurut hasil Uji Viabilitas, sel kanker menunjukkan nilai IC50 dari 24 hingga 29 µg/ mL. Menurut *National Cancer Institute*, ekstrak tumbuhan dengan IC50 ≤ 30 µg/ mL memiliki sifat sitotoksik yang baik. Uji aktivitas antiprolifertive ditemukan bahwa ekstrak air, metanol, kloroform, dan heksana menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap sel karsinoma sel skuamosa manusia dan Hanya ekstrak heksana yang menunjukkan penghambatan terhadap kanker payudara. (Nguyen et al., 2020).

E. Anti Diabetik

Ekstrak etanol daun Gandaria memiliki efektifitas ($p < 0,05$) terhadap penurunan kadar gula darah mencit putih (*Mus musculus*) yang diinduksi aloksan. Pemberian 75 mg/kg BB aloksan pada tikus putih dapat meningkatkan kadar glukosa darah tikus (Irdalisa et al., 2015). Ekstrak etanol dalam dosis 500 mg/kgBB terbukti dapat digunakan untuk menurunkan kadar gula darah (Kumalasari et al., 2019)

II.2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah metode yang dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1985. PCR adalah teknik enzimatik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) untuk menciptakan salinan dari segmen DNA (amplifikasi) secara in vitro (Yusuf, 2011). Segmen DNA *template* dipisahkan dengan denaturasi pada suhu-suhu tertentu (*Denaturation*) dan didinginkan dengan suhu optimum primer sehingga terjadi proses penempelan primer pada daerah target tertentu (*Annealing*). Enzim DNA Polimerase berfungsi untuk memperpanjang primer dan DNA amplicon dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dengan didukung buffer yang sesuai. Umumnya proses pemanjangan DNA dilakukan antara 20 – 40 siklus (*Extension*). Jumlah fragmen target DNA akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target akan meningkat secara linier seperti tampak pada gambar 2.7 (Newton and Graham, 1994 ; handoyo, 2001).



Gambar 2.7. Skema dari prinsip PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Sumber : DOES, W. P. (2013)

II.2.1. Komponen PCR

Menurut Waters dan Shapter (2014), Komponen fisik utama PCR adalah :

A. DNA *template*

Fungsi DNA *template* adalah sebagai cetakan dalam proses pembuatan DNA baru. Templat DNA mengandung fragmen DNA yang akan disalin dan diperbanyak (amplifikasi). Contoh fragmen DNA *template* yaitu DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen-fragmen DNA lain. DNA *template* disiapkan dengan metode isolasi, sintesa DNA, maupun dengan metode lisis sel. Menggunakan metode standar yang ada, proses penyiapan DNA *template* berbeda sesuai dengan sampel yang digunakan, baik itu tanaman, sel, bakteri, darah, maupun sampel-sampel lainnya. DNA *template* Dibuat dengan menggunakan metode isolasi (Handoyo,2001)

B. Deoxynucleotide triphosphates 66 (dNTPs)

Merupakan bahan penyusun DNA, berisi adenin trifosfat (ATP), timin trifosfat (TTP), guanin trifosfat (GTP), dan sitosin trifosfat (CTP). Dalam proses PCR, dNTPs berfungsi sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses pemanjangan DNA (ekstensi). Mekanisme ekstensi DNA yaitu penempelan dNTP pada gugus -OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang sesuai dengan untai DNA *template*. Penentuan konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR sangat penting (handoyo,2001).

C. Taq polimerase

Enzim polimerase (Taq polimerase) yaitu enzim DNA polimerase yang diisolasi dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Berat molekul Taq Polymerase adalah 94kD, dan memperkuat DNA hingga 5kb dengan kecepatan elongasi 0,9-1,2kb/ menit pada 70-75 °C. Sifat thermostabil enzim ini bermanfaat pada proses denaturasi dan elongasi DNA. Enzim ini bersifat thermostabil sampai temperatur 95°C. Penggunaan jenis polimerase DNA berkaitan erat dengan buffer PCR yang dipakai. DNA polimerase yang bersifat termofilik berfungsi menghindari denaturasi enzim selama langkah pemanasan yang diperlukan untuk memisahkan untaian yang baru disintesis, sehingga meningkatkan efektifitas dan efisiensi proses amplifikasi.

D. Larutan buffer dan MgCl₂

Salah satu fungsi larutan buffer adalah menyediakan kondisi lingkungan yang mendukung proses reaksi. PCR akan berlangsung dengan suhu dan pH tertentu. Oleh karena itu untuk menstabilkan proses PCR diperlukan buffer PCR. Ion Mg²⁺ yang berasal dari MgCl₂ diperlukan dalam proses PCR sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. MgCl₂ bertindak sebagai katalis interaksi antara primer dengan DNA *template* yang membentuk kompleks larut dengan dNTPs. Hasil produk PCR dan sensitivitas reaksi dipengaruhi oleh konsentrasi MgCl₂. Umumnya, MgCl₂ telah terkandung pada larutan buffer PCR. Pemisahan antara larutan buffer dan MgCl₂ dilakukan untuk meningkatkan efektifitas proses PCR dengan membuat variasi konsentrasi MgCl₂ sesuai yang dibutuhkan (handoyo, 2001).

II.2.2. Tahapan PCR

Menurut Waters (2013), Proses PCR dibagi menjadi tiga tahap, yaitu denaturasi, hibridisasi (penempelan primer), perpanjangan/ elongasi dan visualisasi dengan elektroforesis yang diuraikan sebagai berikut :

A. Denaturasi

Merupakan proses pemisahan dua untai DNA. Denaturasi dapat dilakukan menggunakan panas, pH, zat kimia dan cara mekanik. Pada proses denaturasi PCR, proses dilakukan dengan menaikkan suhu dengan dua tahap. Tahap pertama dilakukan denaturasi awal pada suhu 94°C. Pada suhu ini, DNA *template* yang berfungsi sebagai *template* selama replikasi didenaturasi menjadi dua DNA *single stranded*. Ikatan hydrogen dipecahkan dengan inkubasi dengan suhu tinggi (> 80°C). Hasil denaturasi berupa DNA untai tunggal yang siap untuk proses penempelan primer.

B. Hibridisasi/ *Annealing*

Langkah kedua adalah hibridisasi/ *annealing*. Tahapan dilakukan berkisar pada suhu 40°C dan 70°C, yang disebut suhu optimum penempelan primer. Penurunan suhu memungkinkan pembentukan kembali ikatan hydrogen sehingga proses penempelan primer pada DNA *template* dapat dilakukan. Primer, sekuens untai tunggal akan berinteraksi dengan DNA yang akan diamplifikasi, lebih mudah berhibridisasi daripada matriks untai panjang DNA. Modifikasi dengan menggunakan variasi suhu *annealing* sangat penting dalam penentuan hasil produk PCR.

C. Perpanjangan/ Elongasi

Merupakan proses pembentukan dan pemanjangan rantai DNA baru oleh enzim polymerase. Tahapan elongasi dilakukan pada suhu 72°C, atau disebut sebagai suhu optimum pemanjangan untai DNA. Pada suhu ini, Taq Polimerase akan mengikat DNA *template* untai tunggal. Proses replikasi dikatalisis menggunakan deoksiribonukleosida trifosfat yang terdapat dalam campuran reaksi.

Setelah penempelan primer pada DNA *template* diujung urutan basa nukleotida, fragmen akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dan menghasilkan fragmen-fragmen DNA yang telah di amplifikasi. Pada siklus berikutnya, fragmen hasil amplifikasi dijadikan *template* untuk amplifikasi lebih banyak. Umumnya proses elongasi membutuhkan 20–40 siklus untuk mensintesis DNA dengan ukuran sekitar 0,1 µg.

Produk hasil setiap siklus secara otomatis menjadi substrat/ *template* bagi siklus berikutnya. Suhu 72°C, ditambahkan sebagai tahapan akhir proses elongasi untuk meningkatkan efektifitas amplifikasi terutama jika urutan yang diinginkan besar (lebih dari 1 kilobase), dengan kecepatan 2 menit per kilobase. Urutan yang berukuran kurang dari 6 kilobase memungkinkan untuk diperkuat dengan PCR. Proses Amplifikasi PCR sangat cepat, perlu waktu beberapa jam (< 24 jam) untuk mendapatkan ratusan sampai milyaran fragmen DNA hasil amplifikasi.

D. Elektroforesis gel

Elektroforesis gel merupakan teknik pemisahan fragmen (DNA) berdasarkan ukuran dan muatan dengan menggunakan aliran listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel. Apabila arus listrik dialirkan pada medium, maka komponen-komponen protein akan bermigrasi. Kecepatan migrasi dari molekul DNA bergantung pada ukuran molekul DNA, konsentrasi agarose, konfirmasi DNA, tegangan, dan Ethidium Bromide sebagai zat warna.

II.3. SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*)

Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) adalah penanda molekuler yang pertama kali diperkenalkan oleh Li dan Quiros (2001), dengan keunggulan seperti polimorfisme tinggi, pengulangan, pengoperasian mudah, universal, dan kombinasi bebas primer positif dan negatif. Primer SRAP terdiri dari kombinasi primer *forward* dan *reverse*. Primer yang mengamplifikasi daerah ekson DNA yaitu *forward* primer dan primer *reverse* mengamplifikasi daerah intron DNA dan daerah DNA yang memiliki promoter. Polimorfisme SRAP terlihat dari variasi panjang daerah intron, ekson, promoter dan daerah spacer DNA antar spesies, intraspecies maupun kultivar (Li & Quiros 2001).

Saat ini, teknik SRAP telah berhasil diterapkan pada banyak spesies tumbuhan (Agarwal et al., 2008; Sun et al., 2013). SRAP sangat berguna untuk evaluasi keragaman genetik spesies, kultivar dan galur pemuliaan, terutama untuk spesies dengan sistem penanda yang belum berkembang seperti *gandaria*. SRAP adalah metode molekuler yang cepat, murah dan efisien yang dapat diterapkan pada pemuliaan tanaman (Kaewpongumpai et al., 2016). Primer SRAP merupakan jawaban atas kelemahan dari teknik molekuler sebelumnya dimana teknik SRAP lebih reproduibel, stabil, dan lebih sederhana (Subositi & mujahid, 2013). Dibandingkan

dengan teknik SSR dan ISSR, teknik SRAP dapat digunakan sebagai alat molekuler alternatif untuk mengetahui keragaman genetik Gandaria (Kaewpongumpai et al., 2016).

Tabel II.2. Primer SRAP acuan
Sumber : (Kaewpongumpai et al., 2016)

Forward primer

Sequence (5'-3')

me1	TGAGTCCAAACCGGATA
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
me4	TGAGTCCAAACCGGACC
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG

Reverse primer

Sequence (5'-3')

em1	GACTGCGTACGAATTAAT
em2	GACTGCGTACGAATTTGC
em3	GACTGCGTACGAATTGAC
em4	GACTGCGTACGAATTTGA
em5	GACTGCGTACGAATTAAC
em6	GACTGCGTACGAATTGCA

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Bhakti Kencana pada bulan Februari – Juni 2021. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis variasi genetik tanaman Gandaria Menggunakan penanda SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*). Penelitian diawali dengan penyiapan alat, pengumpulan aksesori daun gandaria, isolasi DNA menggunakan protokol Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) dengan modifikasi, amplifikasi DNA melalui PCR (*Polimerase Chain Reaction*) dengan primer SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*), visualisasi produk PCR dengan gel agarose 2%, dan analisis data.

Tahap pertama penyiapan alat dan pengumpulan aksesori daun Gandaria yang diambil dari beberapa daerah di pulau Jawa, yaitu kota Serang, Bogor, Sukabumi, Nganjuk dan Batu. Tahap kedua isolasi DNA daun Gandaria mengacu pada protokol Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Tahapan diawali dengan penambahan nitrogen cair dan penggerusan, penambahan *Nuclei Lysis Solution*, *RNase Solution*, penambahan *Protein Precipitation Solution*, sentrifugasi, penambahan *DNA Rehydration Solution* dan inkubasi.

Tahap ketiga amplifikasi DNA dengan primer SRAP dengan total volume PCR 25µL meliputi tahapan denaturasi, annealing dan ekstensi. Primer yang digunakan adalah 3 kombinasi primer yang diambil dari literatur yang berasal dari Macrogene. Tahap keempat visualisasi produk PCR dengan menggunakan gel agarose 2% dalam buffer TBE dengan pewarna Diamond (Promega). Gel dianalisis dengan *software Gel Analyzer*.

Tahap kelima analisis data dengan melakukan *Scoring* secara manual menggunakan *software* Microsoft Excel (2016). Pembuatan dendrogram dan analisis kekerabatan menggunakan *software* NYSYSpc 2.1.