

**ANALISIS KERAGAMAN GENETIK PADA TANAMAN KELOR  
(*Moringa oleifera*) BERDASARKAN PENANDA MOLEKULER *Random  
Amplified Polimorphic DNA (RAPD)***

Apriliana Ballo, Sonya Titin Nge

*Program Studi Pendidikan Biologi FKIP UKAW Kupang*

**ABSTRAK**

Daun kelor merupakan salah satu tanaman yang telah banyak diteliti kandungan gizi dan kegunaannya. Daun kelor sangat kaya akan nutrisi, diantaranya kalsium, zat besi, fosfor, kalium, zinc, protein, vitamin A, vitamin B, vitamin C, vitamin D, vitamin E, vitamin K, asam folat dan biotin (Syarifah et al., 2015) Selain Kandungan Gizi dan Vitamin yang di miliki, daun kelor juga bisa di gunakan untuk Analisis molekuler salah satunya adalah RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Menggunakan CTAB (*Hexadecyl Trimetgyl Ammonium Bromide*) dengan tiga kali ulangan. Analisis DNA terhadap sampel daun kelor yang diawali dengan Isolasi DNA (Ekstraksi DNA), Uji Kuantitas dan Kualitas DNA, Dilusi DNA, Seleksi Primer dan Amplifikasi menggunakan PCR. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan Elektroforesis menggunakan EtBr yang menghasilkan pita DNA. Pita DNA selanjutnya dianalisis dengan program NTSYS untuk mendapatkan keragaman antar varietas Kelor Merah dan Kelor Putih. Primer yang digunakan adalah sembilan (9) primer yang sudah diseleksi yaitu primer OPB 7, OPC 1, OPC 4, OPC 8, OPC 15, OPC 19, OPD 3, OPD 7, OPD 8.

Amplifikasi DNA dengan menggunakan 9 Primer dan pita DNA yang dihasilkan berbeda-beda dimana primer OPC 1 dengan sampel kelor putih menghasilkan 3 pita DNA, OPB 8 pita DNA kelor merah dan putih (5 pita), OPC 1 sampel kelor merah (2 pita), OPC 15 (4 pita), OPC 15 kelor merah( 5 pita), OPC 19 kelor merah dan putih( 3 pita), OPC 8 kelor merah( 2 pita) dan putih (4 pita), OPC 4 kelor merah( 4 pita), OPC 1 kelor putih ( 2 pita), OPD 3 kelor merah( 4 pita), putih(3 pita), OPD 7 kelor putih (3 pita), OPD 7 kelor merah (2 pita) dan OPD 8 kelor merah (1pita) dan putih (2 pita)

Pola pita DNA hasil amplifikasi menunjukkan adanya keragaman antar varietas Kelor merah dan kelor putih. Dendogram pengelompokkan menunjukkan pembagian dua kelompok yaitu kelompok kelor merah (KM1, KM2, KM3) dengan kelompok kelor putih (KP1, KP2, KP3), memiliki jarak kemiripan genetik sebesar 0,52

**Kata Kunci: Analisis Keragaman, DNA, *Moringa Oleifera*, RAPD**

Tanaman kelor (*Moringa oleifera*) merupakan salah satu jenis tanaman tropis yang mudah tumbuh di daerah tropis seperti Indonesia khususnya daerah Nusa Tenggara Timur. Tanaman kelor merupakan tanaman perdu dengan ketinggian 7-11 meter dan tumbuh subur mulai dari dataran rendah 0 sampai ketinggian 700 meter di atas permukaan laut. Kelor dapat tumbuh pada daerah tropis dan subtropis pada semua jenis tanah dan tahan terhadap musim kering dengan toleransi terhadap kekeringan sampai 6 bulan (Thomas, 2007).

Berbagai bagian dari tanaman kelor seperti daun, akar, biji, kulit kayu, buah dan bunga bertindak sebagai stimulan jantung dan peredaran darah, memiliki anti tumor, anti hipertensi, menurunkan kolesterol, antioksidan, anti diabetik, anti bakteri dan anti jamur (Krisnadi, 2015). Daun kelor merupakan salah satu bagian dari tanaman kelor yang telah banyak diteliti kandungan gizi dan kegunaannya. Daun kelor sangat kaya akan nutrisi, diantaranya kalsium, zat besi, fosfor, kalium, zinc, protein, vitamin A, vitamin B, vitamin C, vitamin D, vitamin E, vitamin K, asam folat dan biotin (Syarifah et al., 2015) Selain Kandungan Gizi dan Vitamin yang di miliki, daun kelor juga bisa di gunakan untuk Analisis molekuler salah satunya adalah RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Analisis keragaman genetik pada tanaman Kelor (*Moringa Oleifera*) berdasarkan penanda RAPD memiliki tujuan untuk mendapatkan keragaman pola pita DNA tanaman kelor dan untuk pengelompokkan pola pita DNA tanaman

Kelor (*Moringa Oleifera*) berdasarkan Penanda RAPD. Analisis keragaman genetik ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik dan hubungan kekerabatan tanaman yang akan diteliti. Bahan penelitian yang digunakan adalah daun kelor merah dan daun kelor putih yang diperoleh dari Kelurahan Karang Siri Kecamatan Kota Soe Kabupaten Timor Tengah Selatan dan Kecamatan Oebobo Kota Kupang NTT. Penelitian ini mengungkapkan informasi tentang keragaman DNA antar varietas kelor merah, kelor putih dan keragaman DNA Kelor yang ditanam pada wilayah berbeda berdasarkan penanda RAPD.

## **MATERI DAN METODE**

Penelitian ini menggunakan metode CTAB (*Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) dengan 3 kali ulangan. Bahan penelitian adalah daun kelor merah dan daun kelor putih yang muda.

### **Isolasi DNA(Ekstraksi DNA)**

Daun yang digunakan sebagai sampel dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan dikeringkan dengan tissue. Sampel yang digunakan sebanyak 0,1 g sampel segar. Sampel daun sebanyak 0,1 g digerus dengan menggunakan mortar sampai lembut, kemudian ditambahkan 1500 µl larutan *buffer* CTAB (terdiri dari CTAB 2%, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 2% PVP-40 1, 2% *Mercaptoethanol*) yang sebelumnya telah diinkubasi pada waterbath pada suhu 65°C selama 30 menit. Campuran hasil gerusan kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit. Selama 10 menit campuran dibolak-balik agar tetap homogen.

Setelah diinkubasi selama 60 menit, campuran diambil dari waterbath dan didiamkan selama 2 menit kemudian ditambahkan pada setiap sampel 500 µl campuran 24 *chloroform* : 1 isoamil alkohol (CIAA) dan divortex selama 5 menit lalu disentrifuse 15 menit pada 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil dengan hati-hati dan ditambahkan sodium asetat dengan volume 1/10 dari volume supernatant, kemudian ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 2/3 volume total (supernatan + sodium asetat), kemudian dicampur dengan membolak-balik tabung dan didiamkan pada suhu 4°C selama 1 - 24 jam setelah itu disentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan DNA dicuci dengan 500 µl etanol 70% kemudian disentrifuse selama 5 menit pada 12.000 rpm. Supernatan dibuang dan endapan DNA dikeringkan. Setelah kering, endapan DNA dilarutkan dengan 50 µl larutan ddH<sub>2</sub>O (Aquabides), kemudian disimpan pada lemari pendingin pada suhu 4°C.

#### **Kuantifikasi DNA**

DNA yang telah dipurifikasi kemudian dikuantifikasi dengan menggunakan *Gene Quant* untuk mengetahui konsentrasi DNA yang diperoleh. Referensi diset dengan menggunakan ddH<sub>2</sub>O. Faktor dilusi (ddH<sub>2</sub>O) sebanyak 1998 µl dan DNA sebanyak 2 µl dimasukkan dalam kuvet, kemudian dimasukkan dalam *GeneQuant* kemudian diukur penyerapan cahaya pada panjang gelombang 260 nm sehingga diketahui konsentrasi DNA dan rasio DNA-RNA.

#### **Dilusi DNA**

Dilusi dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh konsentrasi DNA yang sesuai untuk proses amplifikasi. Untuk mendapatkan volume akhir dilusi, larutan DNA ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sehingga konsentrasi DNA sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan untuk proses PCR.

Rumus Dilusi :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

M<sub>1</sub>= konsentrasi DNA sampel

V<sub>1</sub>= volume awal sampel yang akan diencerkan

M<sub>2</sub>= 2,5 ng/µl

V<sub>2</sub>= volume akhir

Volume pengenceran = V<sub>2</sub> – V<sub>1</sub>

#### **Seleksi Primer**

Untuk mendapatkan primer yang dapat menghasilkan produk amplifikasi dan mempunyai tingkat polimorfisme yang tinggi digunakan seleksi primer dari Operon Technology (Alameda, USA). Beberapa primer yang akan diseleksi, yaitu dari Operon. Seleksi primer menggunakan sampel DNA daun Kelor.

#### **Amplifikasi DNA dan Elektroforesis**

Amplifikasi DNA dilakukan dengan reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang bertujuan untuk menggandakan sekuen DNA berdasarkan primer yang digunakan.

Amplifikasi sampel DNA Kelor Merah dan Kelor Putih masing-masing 3 ulangan. Reaksi PCR dilakukan pada total volume 10 µl untuk setiap tabung PCR.

Setiap reaksi PCR terdiri dari 5 µl PCR mix Go Taq® Green (Promega), 0,25 µl 100 µM primer (Sigma-Proligo), 2,5 µl DNA sampel (*template*) dan 2,25 *nuclease free water*.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan alat PCR System BIO-RAD. Pemanasan pertama dilakukan pada suhu 95°C selama 7 menit, kemudian diikuti 35 siklus dengan suhu dan waktu pada setiap siklus adalah denaturasi pada suhu 95°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 37°C selama 1 menit 45 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 45 detik, diikuti dengan elongasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit.

DNA hasil PCR kemudian dielektroforesis menggunakan 1,5 % (b/v) agarosa yang telah ditambahkan *florosafe DNA stain* sebagai pewarna, dalam TBE *buffer* (yang terdiri dari 0,45 M Tris-HCl pH 8, 0,45 M *Boric acid*, 20 mM EDTA) dengan tegangan 100 volt selama 45 menit. Hasil kemudian divisualisasi dengan sinar UV.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Seleksi Primer

Primer yang digunakan untuk RAPD memiliki kadungan basa 40% basa G+C (umumnya mengandung 50-80% G+C). Sebanyak 15 primer dari operon diseleksi dan diperoleh 9 primer (OPB- 7, OPC-1, OPC-4, OPC 8, OPC 15, OPC 19, OPD 3, OPD 7 dan OPD 8) yang digunakan dalam penelitian ini. Primer RAPD yang digunakan bersifat acak atau random, hal ini disebabkan Jumlah produk amplifikasi PCR mempunyai hubungan langsung dengan jumlah dan orientasi yang komplemen terhadap primer didalam genom tanaman. (Azrai 2005).

Penanda molekuler DNA digunakan sebagai karakter dasar untuk mengetahui hubungan kekerabatan makhluk hidup, semakin banyak karakter yang bisa terungkap semakin baik untuk menentukan hubungan kekerabatannya.

Tabel 1. Daftar primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA

| Primer | Urutan Basa Nukleotida | Kandungan G+C (%) |
|--------|------------------------|-------------------|
| OPB 7  | GGTGACGCAG             | 70 %              |
| OPC 1  | TTCGAGCCAG             | 60%               |
| OPC 4  | CCGCATCTAC             | 60%               |
| OPC 8  | TGGACCGGTG             | 70%               |
| OPC 15 | GACGGATCAG             | 60%               |
| OPC 19 | GTTGCCAGCC             | 70%               |
| OPD 3  | GTCGCCGTCA             | 70%               |
| OPD 7  | TTGGCACGGG             | 70%               |
| OPD 8  | GTGTGCCCCA             | 70%               |

Pada penelitian ini proses amplifikasi menggunakan 9 primer dari 10 primer yang dipilih menghasilkan jumlah pita yang berbeda-beda yaitu jumlah pita antara 2 pita sampai dengan 6 pita DNA. Menurut Hartati, (2003) jumlah pita yang dihasilkan berbeda disebabkan karena perbedaan urutan basa nukleotida primer atau interaksi antar primer dan DNA cetakan. Artinya memungkinkan untuk menempel pada situs penempelan DNA

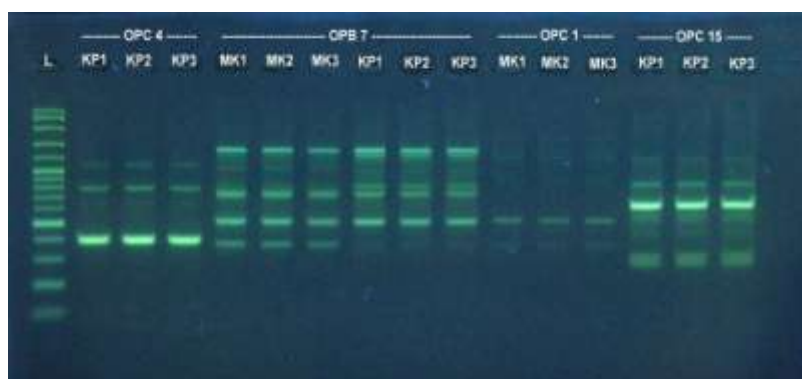
secara acak. primer yang digunakan merupakan primer yang pendek yang Primer yang akan menempel pada DNA kelor dapat diperbanyak dengan menggunakan PCR dengan menggunakan enzim taq polymerase. Enzim ini akan melipat gandakan fragmen DNA sehingga mampu teramplifikasi dan divisualisasikan untuk diketahui ukuran pita DNA nya (Sutantidiana *et all.*, 2009 dan Yuwono, 2007).

**a. Kuantitas DNA**

Tabel 2. Konsentrasi dan kemurnian DNA

| No | Nama Sampel | Kode | Konsentrasi DNA (ng/ul) | Kemurnian DNA |
|----|-------------|------|-------------------------|---------------|
|    | Kelor Merah | KM   | 500                     | 1.667         |
|    | Kelor Putih | KP   | 200                     | 1.000         |

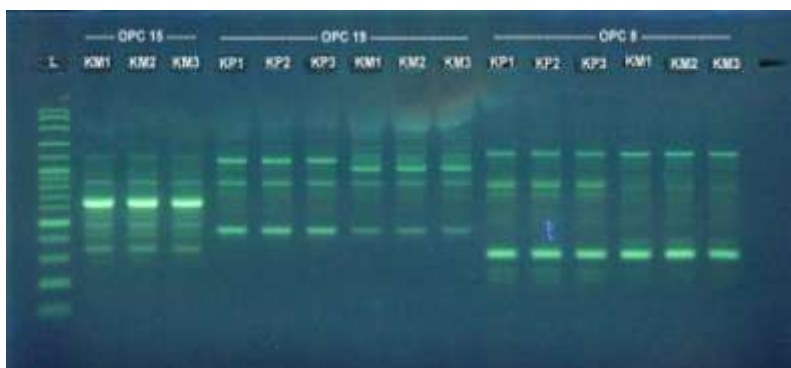
**b. Hasil Amplifikasi DNA**



Gambar 1. Hasil Visualisasi Elektroforesis menggunakan Primer RAPD Primer OPC4 (Kelor Putih); Primer OPB7 (Kelor Merah dan Putih); Primer OPC1 (Kelor Merah); Primer OPC15 (Kelor Putih)

Dari gambar diatas menunjukkan bahwa hasil amplifikasi DNA dari primer yang digunakan secara acak, yaitu OPC 4, OPB 7, OPC 1 dan OPC 15 diperoleh pola pita DNA dengan jumlah yang berbeda. Hasil visualisasi elektroforesis menunjukkan bahwa pola pita DNA yang muncul dan terlihat jelas adalah pada primer OPB 7 dimana pita DNA yang dihasilkan pada kelor merah(KM) 5 pita DNA, Kelor putih(KP) 5 Pita. Ada beberapa pita DNA yang muncul tetapi tidak terlihat dengan jelas. Pada primer OPC 4 dengan sampel kelor putih(KP) pita DNA yang muncul sebanyak 3 Pita DNA, Primer OPC 1 dengan sampel Kelor Merah( KM) pita DNA yang dihasilkan sebanyak 2 pita DNA, Pola pita DNA yang terakhir pada template 1 adalah primer OPC 15 dengan sampel kelor putih(KP) dengan jumlah pita DNA 4. Pita polimorfik merupakan pita yang dimiliki pada beberapa Individu sampel, sedangkan pita monomorfik adalah pita yang dimiliki oleh semua individu sampel.

Menurut Hartati 2006, Jumlah pita DNA polimorfik yang dihasilkan menentukan keragaman suatu populasi, karena pita DNA polimorfik menggambarkan keadaan genom tanaman. Pita DNA yang dihasilkan sedikit disebabkan oleh i penempelan primer secara random sehingga mampu teramplifikasi oleh primer itu sendiri. Amplifikasi pita DNA pada gel menunjukkan berat molekul DNA kelor berdasarkan DNA lamda sebagai kontrolnya. Berdasarkan tebal tipisnya pita yang dihasilkan dapat dilihat bahwa hasil amplifikasi pada pada Primer OPC 4 (KP),OPC 15 (KP),OPB 7(KM) menghasilkan pita yang tebal dibandingkan dengan ketebalan pita pada basa lainnya,hal ini disebabkan oleh kemurnian dari DNA masing-masing sampel. Hasil amplifikasi yang menghasilkan pita DNA yang tipis bisa disebabkan berbagai faktor adanya kontaminan pada saat melakukan ekstraksi, konsentrasi dan jenis gel yang digunakan.

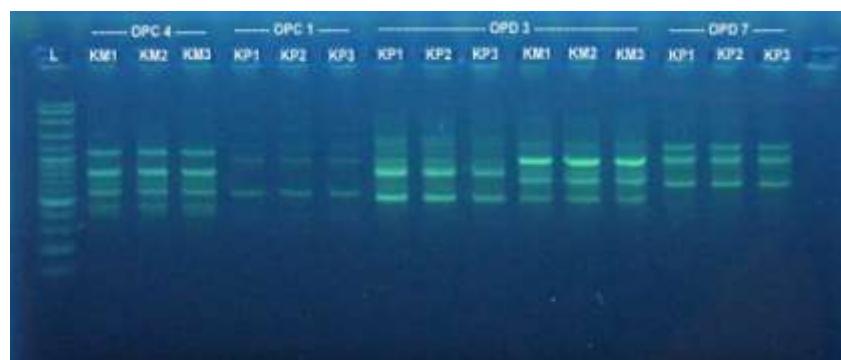


Gambar 2. Hasil Visualisasi Elektroforesis menggunakan Primer RAPD Primer OPC15 (Kelor Merah); Primer OPC19 (Kelor Merah dan Putih); Primer OPC8 (Kelor Merah dan Putih).

*Hasil Penelitian*

Hasil amplifikasi kelor pada gambar 2 menunjukkan jumlah pita yang berbeda antara setiap primer yang digunakan. Pada primer OPC 15 dengan sampel kelor merah (KM) pita DNA yang dihasilkan 5 pita DNA, OPC 15 Kelor Merah(KM) menghasilkan 3 pita DNA dan Kelor Putih (KP) menghasilkan 3 Pita DNA, pada primer OPC 8 Pita DNA yang dihasilkan Kelor Merah (KM) 2 pita sedangkan sampel Kelor putih (KP) dengan primer yang sama Menghasilkan 4 Pita DNA. Pola Pita Dna yang dihasilkan menunjukkan adanya keragaman pola pita DNA antara kedua varietas kelor.

Berdasarkan ketebalan Pita DNA yang dihasilkan dapat dilihat bahwa hasil amlifikasi pola pita DNA yang dihasilkan oleh primer OPC 8 memiliki ketebalan yang berbeda dengan ketebalan pita pada basa lainnya,hal ini disebabkan oleh kemurnian dari DNA masing- masing sampel. Hasil amplifikasi yang menghasilkan pita DNA yang tipis bisa disebabkan berbagai faktor adanya kontaminan pada saat melakukan ekstraksi, konsentrasi dan jenis gel yang digunakan. Menurut Powel *et all*, Marka DNA seperti RFLP, SSR, AFLP banyak digunakan sebagai penciri genotip suatu tanaman, Marka tersebut mampu membedakan genotip antar individu pada tingkat antar spesies maupun kerabat jauhnya.



Gambar 3. Hasil Visualisasi Elektroforesis menggunakan Primer RAPD Primer OPC4 (Kelor Merah); Primer OPC1 (Kelor Putih); Primer OPD3 (Kelor Merah dan Putih); Primer OPD7 (Kelor Putih).

### Hasil Penelitian

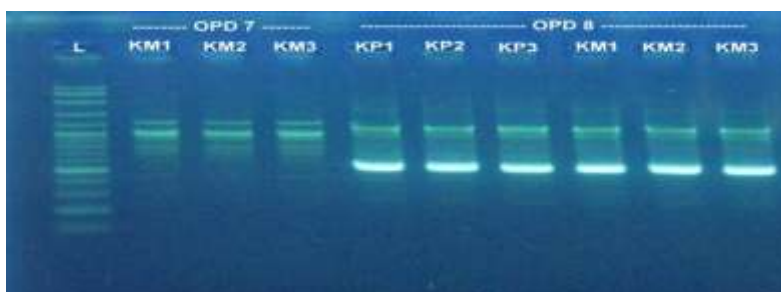
Amplifikasi dengan OPC 4 sampel kelor merah (KM) menghasilkan jumlah 4 pita DNA, OPC 1 kelor putih (KP) menghasilkan 2 pita DNA, primer OPD 3 dengan sampel kelor merah pita yang dihasilkan sebanyak 4 pita ,dan kelor putih pita DNA yang dihasilkan sebanyak 3 pita DNA, OPD 7 dengan sampel kelor putih pita DNA yang dihasilkan 3 pita DNA. Penampilan hasil amplifikasi menunjukkan ada beberapa pita yang kurang tebal/ tipis. Masing- masing varietas menghasilkan 2-4 pita DNA. Panjang pendeknya primer mempengaruhi hasil amplifikasi dan kespesifikan pita DNA (Yang *et., all* (1990). Berdasarkan tebal tipisnya pita DNA yang dihasilkan dapat lihat bahwa sampel kelor merah dengan primer OPD 3 memiliki pita yang tebal dan jelas.

Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa kelor merah dan kelor putih mempunyai pola pita yang hampir sama, pengelompokkan ini menunjukkan bahwa keragaman morfologi belum tentu menunjukkan keragaman genetik yang berbeda (Cahyarini *et all*,2004)

Amplifikasi OPD 7 dengan sampel kelor merah (KM) mempunyai susunan basa TTGGCACGGG menghasilkan jumlah total pita DNA sebanyak 2 pita, sedangkan amplifikasi pada OPD 8 dengan sampel kelor merah dan kelor putih (KM dan KP) total pita yang dihasilkan berbeda yaitu pada kelor merah sebanyak 1 pita dan kelor putih 2 pita DNA.

Hasil amplifikasi dengan OPD 7 dan OPD 8 menunjukkan adanya keragaman antara varietas Kelor merah dan kelor putih. Pita DNA yang dihasilkan OPD 7 berbeda dengan pita DNA yang dihasilkan oleh OPD 8. Pita DNA yang dihasilkan tebal berbeda dengan Ukuran DNA mempengaruhi keragaman suatu spesies dan sangat berpengaruh pada hubungan kekerabatannya.

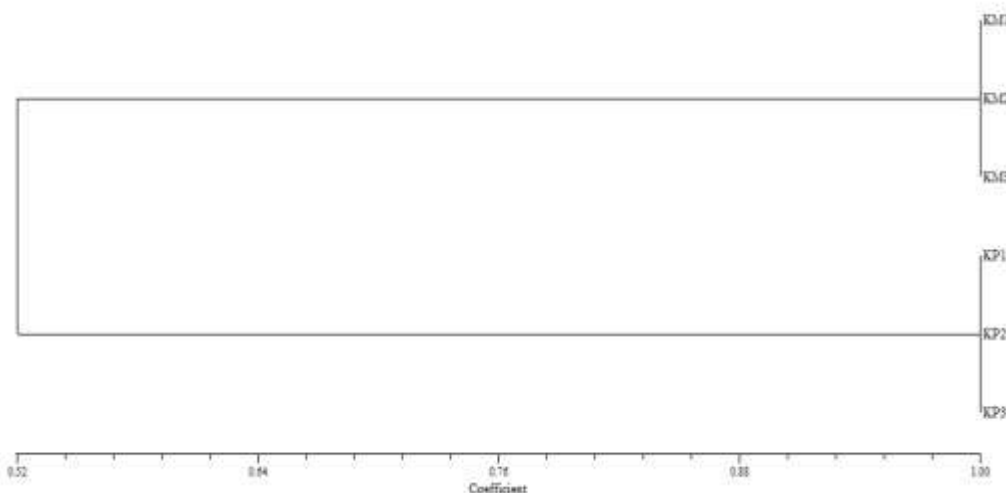
Menurut Karsinah *et.,all* (2002) menjelaskan bahwa pita-pita spesifik yang dihasilkan dapat memberikan harapan sebagai identifikasi varietas, adanya pita yang spesifik sngat penting sebagai pembeda dengan varietas lainnya, karena identifikasi varietas pada umumnya didasarkan pada karakter morfologi dari tanaman dewasa.



Gambar 4. Hasil Visualisasi Elektroforesis menggunakan Primer RAPD Primer OPD7 (Kelor Merah); Primer OPD8 (Kelor Merah dan Putih).



## Dendogram



Gambar 5. Dendogram sampel Kelor

Berdasarkan dendrogram diatas, menunjukkan pembagian dua kelompok yaitu kelompok kelor merah (KM1, KM2, KM3) dengan kelompok kelor putih (KP1, KP2, KP3), memiliki jarak kemiripan genetik sebesar 0,52.

Analisis amplifikasi DNA merupakan bagian dasar dari semua proses yang berkaitan dengan molekuler. Ekstraksi, purifikasi dan amplifikasi DNA adalah suatu kesatuan awal untuk mengetahui DNA suatu spesies. Amplifikasi pada tanaman dapat juga digunakan untuk menentukan hubungan kekerabatan suatu tanaman yang kedepannya akan digunakan sebagai dasar untuk penyusunan peta genetik, pemuliaan tanaman, genetika populasi, mengetahui penanda khas dan berbagai rekayasa (Nandariyah, 2007).

## PENUTUP

Amplifikasi DNA menggunakan Primer OPB 7, OPC 1, OPC 4, OPC 8, OPC 15, OPC 19, OPD 3, OPD 7 dan OPD 8 menghasilkan pola pita yang menunjukkan adanya keragaman antara kelor merah dan kelor putih. Dendrogram Pengelompokan dengan metode UPGMA pada kelor merah dan putih memiliki jarak kemiripan genetik sebesar 0,52.

## DAFTAR PUSTAKA

Anonim. 1996. Deskripsi varietas buah-buahan dan sayuran. Direktorat Bina Pembenihan. Direktorat. Jendral Tanaman Pangan dan Hortikultura. Jakarta

- Azrai, M.2005. Pemanfaatan Markah Molekuler dalam Proses Seleksi Pemuliaan Tanaman, *Jurnal AgroBiogen.1(1): 26-37* Tanaman (P3HT). Yogyakarta
- Karsinah, Sudarsono, Setyobudi L, Aswidinnoor H. 2002. Keragaman genetic plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. *J Bioteknol Pert 7 (1) : 8- 16*
- Martasari, C dan A. Sugiyatno.2007. Karakterisasi Morfologi dan Analisa Keragaman Genetik Plasma Nutfah Apel (Malussp). *Prosiding Seminar Nasional Hortikultura. Surakarta 17 November : 71-77*
- Maftuchah, Zainudin, A. 2007. Variasi genetik kultivar mangga dengan menggunakan penanda molekuler Random Amplified Polymorphic DNA. *Prosiding Seminar Nasional Hortikultura. UNS Surakarta, 17 November 2007.*
- Nandariyah. 2007. Identifikasi Keragaman Genetik Kultivar Salak Jawa Berdsarkan Analisis RAPD. *Agrosains 9 (2): 70-76*
- Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Acid Res.,18, 6531-6535*
- Cahyarini, RD, Yunus A, Purwanto E. 2004. Identifikasi Keragaman genetik beberapa varietas local kedelai di Jawa berdsarkan analisis isozim. *Agrosains 6 (2): 79-83*
- Hartati, D.2006. Keragaman genetik Sengon (*Albazia falcataria L. Fosberg*). Melalui DNA Marker. *Pusat Penelitian dan Pembangunan Hutan*