

**Analisis Variasi Genetik Anggrek *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume dengan Marka Molekuler RAPD**

**Genetic Variation of *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume Using RAPD Marker**

**Ulfia Nurul Khikmah<sup>1</sup>, Evy Yulianti, M.Sc<sup>2</sup>, Dr. Ixora Sartika M., M.Si<sup>3</sup>, Ratnawati, M.Sc<sup>4</sup>, Prof. Dr. Djukri, M.S<sup>5</sup>, Lili Sugiarto, M.Si<sup>6</sup>**

<sup>1,2,3,4,5,6</sup>Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Yogyakarta

Email : [ulfia.nurul@student.uny.ac.id](mailto:ulfia.nurul@student.uny.ac.id)

**Abstrak**

Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan DNA anggrek *Rhynchostylis retusa* dengan metode Castillo yang telah dimodifikasi. Sumber DNA genom pada penelitian ini adalah delapan sampel daun muda anggrek *R. retusa* yang berasal dari beberapa daerah. Satu sampel berasal dari Temanggung, dua sampel berasal dari Tulungagung, dua sampel berasal dari Semeru, dan tiga sampel berasal dari Yogyakarta. Sampel daun dipilih secara acak tanpa memperhatikan aspek posisi atau letak daun pada tanaman anggrek. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yang dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar FMIPA UNY. Isolasi DNA dilakukan dengan metode Castillo dilanjutkan dengan purifikasi DNA hasil isolasi. Pengecekan kualitas DNA hasil isolasi dan purifikasi dilakukan dengan metode elektroforesis dengan agarose 1,5% menggunakan tegangan 100 Volt selama 30 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa delapan sampel DNA *R. retusa* yang berhasil diisolasi mempunyai kualitas yang cukup baik.

**Kata Kunci:** *R. retusa*, Isolasi DNA, Purifikasi DNA

**Abstract**

The aim of this research is to get DNA of *Rhynchostylis retusa* with Castillo method which has been modified. Sources of genomic DNA in this study were eight samples of young leaves of *R. retusa* from several regions. One sample came from Temanggung, two samples from Tulungagung, two samples from Semeru, and three samples from Yogyakarta. Leaf samples were randomly selected regardless of position or leaf position on orchid plants. This research is an explorative research conducted at Biology Laboratory of FMIPA UNY. DNA isolation was done by Castillo method followed by purification DNA. Checking the quality of isolated DNA and purification was done by electrophoresis method with agarose 1.5% using 100 Volt voltage for 30 minutes. The results showed that eight samples of *R. retusa* DNA successfully isolated had good quality.

**Keyword:** *R. retusa*, DNA isolation, DNA purification

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang dikenal dunia dengan keanekaragaman hayatinya, termasuk keanekaragaman anggrek. Lebih dari 4.000 spesies anggrek dapat ditemukan di Indonesia, terutama di Pulau Jawa, Kalimantan, Sumatera, dan Papua. Anggrek merupakan tanaman hias berbunga sekaligus komoditas hortikultura unggulan dengan nilai ekonomi tinggi karena keindahan bunganya.

Salah satu anggrek yang dapat ditemukan di Indonesia adalah anggrek *Rhynchostylis retusa*. Anggrek ini mempunyai bunga berupa tandan yang menjutai menyerupai ekor tupai sehingga anggrek ini juga disebut sebagai anggrek ekor tupai. *R. retusa* memiliki batang agak pendek, dengan akar yang panjang dan berdaun tebal, dengan panjang daun 11-16 cm dan lebar 3 cm, anggrek jenis ini memiliki tandan biasanya panjang dan banyak bunga, tandan menggantung dan memiliki panjang sekitar 40-50 cm, dengan sekitar 100 bunga setiap tandannya. Bunga berukuran 2-2,5 cm, berwarna putih dengan bercak ungu. Sepal berbentuk oval dengan ukuran 9-12 mm, dan petal membengkok berukuran 8-12 mm, lapisan pada labellum violet dengan dasar putih dan berbulu halus (Fitri, A.S.S dan Santoso, A.M., 2014: 368).

Sebagai salah satu anggrek yang mengalami eksploitasi karena memiliki keindahan dan juga nilai ekonomi yang tinggi, *R. retusa* perlu mendapatkan perhatian agar kelestariannya tetap terjaga. Salah satu langkah awal untuk upaya pelestarian *R. retusa* dapat dilakukan penelitian tentang anggrek tersebut. Salah satunya adalah penelitian molekuler untuk mengetahui genotip *R. retusa* yang dapat membantu upaya konservasi dan pemuliaan anggrek tersebut. Terlebih dengan adanya ilmu bioteknologi tanaman yang semakin berkembang pesat, maka usaha untuk memperoleh informasi genotip *R. retusa* akan menjadi lebih mudah untuk dilakukan.

Berkembangnya ilmu bioteknologi tanaman menghasilkan banyaknya teknik penelitian molekuler tanaman yang dapat dilakukan untuk mengetahui informasi genotip tanaman, termasuk tanaman anggrek. Diantaranya adalah RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) dan AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*).

Penelitian molekuler tanaman pada umumnya didasari oleh teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk menggandakan DNA tanaman yang dijadikan sampel penelitian. Untuk melakukan teknik PCR dibutuhkan kualitas DNA tanaman yang baik sebagai hasil ekstraksi. Hal ini menjadi syarat mutlak untuk melakukan penelitian molekuler tanaman.

Terdapat berbagai macam metode isolasi DNA tanaman, salah satunya adalah metode Castillo yang telah dimodifikasi. DNA hasil isolasi biasanya masih mengandung metabolit sekunder atau kontaminan lainnya dari proses isolasi DNA yang dilakukan sebelumnya. Keberadaan metabolit sekunder serta kontaminan dalam DNA dapat menyebabkan kualitas DNA yang akan dijadikan sebagai template DNA dalam teknik PCR menjadi tidak baik bahkan dapat menyebabkan teknik PCR menjadi tidak maksimal. Sehingga pita DNA yang dihasilkan menjadi tidak jelas atau bahkan tidak terjadi amplifikasi oleh primer saat proses PCR.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan DNA *R. retusa* dengan kualitas baik menggunakan metode Castillo yang telah dimodifikasi dilanjutkan dengan purifikasi DNA hasil isolasi.

## METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Yogyakarta, pada bulan Oktober 2017 sampai dengan November 2017. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yang menggunakan delapan sampel anggrek *R. retusa* dari beberapa daerah, yaitu satu sampel dari Temanggung, dua sampel dari Tulungagung, 2 sampel dari Semeru, dan tiga sampel dari Yogyakarta.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah Peralatan yang digunakan untuk isolasi DNA diantaranya adalah timbangan analitik, *aluminium foil*, *centrifuge*, vortex, kulkas, mikropipet, tip, botol jam, mortar dan alu, *centrifuge tube*, termometer, *waterbath*, tabung ependorf, *gloves*. Peralatan yang digunakan untuk purifikasi DNA adalah *microcentrifuge*, tabung ependorf 1,5 ml, mikropipet, tip, dan tissue. Peralatan yang digunakan untuk visualisasi hasil PCR adalah cetakan gel, *microwave*, *submarine electrophoresis system* (mupid), botol semprot alkohol, spatula, tissue, *gel doc*, komputer.

Bahan yang digunakan adalah daun anggrek *R. retusa* adalah daun *R. retusa*, buffer ekstraksi custillo (CTAB 10% + EDTA + TrisHCl + NaCl), *polyvinylpyrrolidone* (PVP), larutan CI (24 Chloroform: 1 Isoamilalkohol), dan isopropanol. Bahan untuk purifikasi DNA diantaranya adalah larutan PCI (25 Phenol: 24 Chloroform: 1 Isolamilalkohol), dH<sub>2</sub>O, sodium asetat, EtOH absolut, agarose, buffer TBE 0,5x konsentrasi, *loading dye*, agarosa, *fluorosafe*.

Metode penelitian yang dilakukan adalah metode Castillo yang telah dimodifikasi. Sumber DNA berupa daun muda anggrek *R. retusa* yang berasal dari beberapa daerah, yakni satu sampel dari daerah Temanggung, dua sampel dari daerah Tulungagung, dua sampel dari daerah Semeru, dan tiga sampel dari daerah Yogyakarta yang dipilih secara acak. Daun sebelum ditimbang terlebih dahulu dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran serta bagian tubuh serangga yang mungkin menempel pada daun tersebut.

Selanjutnya daun ditimbang dengan berat 0,8 gram. Masing-masing sampel daun tersebut selanjutnya ditumbuk hingga halus menggunakan mortar dan alu yang telah didinginkan di dalam *freezer* sebelumnya. Penggerusan daun ditambahkan PVP 0,1 gram selanjutnya diekstraksi dengan buffer Castillo 6 ml.

Campuran dimasukkan dalam *centrifuge tube* 15 ml dan diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 65°C selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan CI (24 Chloroform: 1 Isoamilalkohol) sebanyak 1x volume yakni 6 ml kemudian *mix well* dengan membolak-balikkan *centrifuge tube*. Campuran selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 15 menit. Supernatant dipipet dengan mikropipet dan dipindahkan ke dalam *centrifuge tube* lainnya, dan ditambahkan larutan isopropanol dingin 5 ml kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 15 menit.

Supernatant dipindahkan dengan mikropipet ke dalam *centrifuge tube* baru dan disimpan *over night* pada suhu 40C di dalam kulkas. Setelah *over night*, larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3.500 rpm selama 15 menit. Supernatant dibuang dan pelet dikeringanginkan selanjutnya pelet diresuspendensi dengan akuadest steril 500µl.

Selanjutnya dilakukan purifikasi DNA *R. retusa* untuk menghilangkan metabolit sekunder serta kontaminan yang mungkin terdapat pada DNA hasil isolasi. Purifikasi DNA dilakukan dengan memasukkan 200 µl sampel DNA dalam *tube ependorf* 1,5 ml dengan mikropipet kemudian menambahkan larutan PCI 1x volume. Campuran di-*up* and *down* menggunakan mikropipet kemudian *mix well* agar homogen. Selanjutnya campuran disentrifuge menggunakan *microcentrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatant diambil dan dipindah ke dalam tube ependorf 1,5 ml lainnya dan ditambahkan 0,1x volume sodium asetat dan 2,5 kali EtOH absolut kemudian *mix well* agar homogen.

Campuran disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatant dibuang dan pelet dikering anginkan dan selanjutnya diresuspensi dengan 50 µl dH<sub>2</sub>O.

DNA hasil purifikasi selanjutnya divisualisasi dengan metode elektroforesis. DNA hasil isolasi sebanyak 5µl dicampur dengan *loading dye* sebanyak 1µl dengan menggunakan mikropipet pada kertas parafilm. Campuran tersebut selanjutnya di running pada gel agarose dengan konsentrasi 1,5% menggunakan volatase 100 Volt selama 30 menit. Elektroforesis dilanjutkan dengan visualiasi hasil elektroforesis menggunakan *gel doc* dan program Kodak Me.

## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Metode yang digunakan dalam isolasi atau ekstraksi DNA tanaman beragam akibat pesatnya perkembangan ilmu bioteknologi tanaman. Pada dasarnya terdapat tiga faktor yang menentukan keberhasilan isolasi dan purifikasi DNA tanaman, termasuk tanaman anggrek. Diantaranya adalah penghomogenan jaringan tanaman, komposisi penambahan larutan buffer saat dilakukan penggerusan bagian tanaman yang dijadikan sumber DNA, serta penghilangan enzim yang menghambat polisakarida khususnya bagi tanaman tahunan.

Daun muda digunakan sebagai sumber DNA dikarenakan daun muda lebih mudah diekstrak secara teknik dibandingkan organ lain pada tumbuhan anggrek seperti batang, akar, maupun biji. Isolasi DNA genom didasarkan pada prinsip lisis sel, presipitasi (pengendapan) dan purifikasi (pemurnian). Lisis sel dilakukan dengan penggerusan (*grinding*) dengan penambahan PVP dan buffer CTAB. Pemecahan dinding sel secara mekanik dilakukan dengan penggerusan menggunakan alu dan mortar yang sebelumnya telah disimpan di dalam freezer. PVP digunakan sebagai anti fenol,

yakni menghilangkan senyawa fenolik yang terkandung pada sampel daun *R. retusa* (Syafarudin, 2011: 156). Hal ini dikarenakan fenol dapat mempengaruhi kualitas dan kemurnan DNA yang didapatkan dari proses isolasi sehingga harus dihilangkan. Penambahan buffer Castillo berfungsi untuk melisiskan dinding sel maupun membran sel yang memiliki komposisi CTAB 10%, EDTA, TrisHCl, NaCl.

Sampel daun yang telah digerus dan ditambahkan buffer Castillo, diinkubasi pada suhu 65°C yang bertujuan untuk mengoptimalkan kerja buffer Castillo yang ditambahkan ke dalam sampel (Cheng et al, 2003: 451-453). Sentrifugasi pada tahap ini berfungsi untuk memisahkan debris dan komponen sel lainnya yang menjadi penyebab kontaminasi dengan DNA. Presipitasi dilakukan dengan penambahan Chloroform Isoamil alkohol untuk memisahkan DNA dari kontaminan. Chloroform merupakan pelarut organik yang dapat melarutkan protein, lipid, dan molekul lain seperti polisakarida lainnya (Syafarudin, 2011: 154).

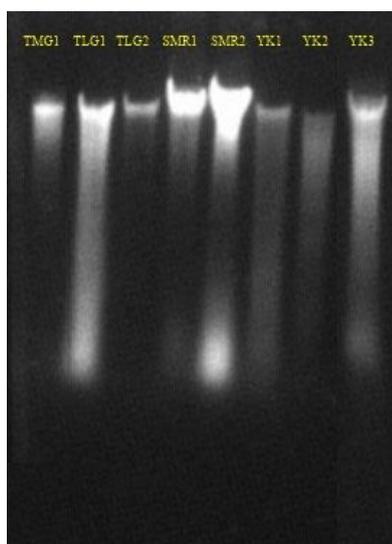
Anggrek alam biasanya memiliki kandungan metabolit sekunder serta fenol yang cukup tinggi (Innaka Ageng Rineksane, 2015: 381) yang dapat menurunkan kualitas DNA. Sehingga sangat diperlukan upaya purifikasi DNA hasil isolasi anggrek alam untuk menghilangkan zat-zat tersebut.

Purifikasi DNA hasil isolasi dilakukan dengan penambahan PCI (Phenol Chloroform Isoamilalkohol) yang mengandung fenol berfungsi untuk memaksimalkan presipitasi, dimana fenol merupakan senyawa yang mampu berikatan dengan protein. Penambahan PCI menghasilkan 3 lapisan yaitu lapisan aquous, protein dan fenol. DNA terdapat pada lapisan aquous yang bebas dari kontaminan, sementara protein membentuk lapisan tengah, dan chloroform terletak di bawah karena

memiliki berat jenis besar. (Syafaruddin, 2011: 11-17).

Etanol absolut dan natrium asetat digunakan sebagai agen presipitasi lanjutan. Etanol memiliki dielektrik lebih rendah daripada air sehingga memudahkan garam yang memiliki muatan positif ( $\text{Na}^+$ ) untuk berinteraksi dengan DNA yang bermuatan negatif. Interaksi tersebut menyebabkan DNA bersifat hidrofob dan mengendap (Syafaruddin, 2011: 11-17).

Pengecekan kualitas DNA *R. retusa* yang telah diisolasi dan dipurifikasi dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5% bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya DNA, keutuhan DNA hasil isolasi dan tingkat kemurnian DNA dari kontaminan RNA (Karp, 1996: 144). Penambahan *loading dye* berfungsi sebagai pemberat dan pewarna karena mengandung gliserol sebagai pemberat dan bromphenol blue sebagai pewarna. Visualisasi dilakukan dengan penambahan *sybr safe* pada gel agarose yang akan menyisip di antara basa nitrogen DNA sampel dan memendarkan DNA saat dilihat di bawah sinar UV pada *gel doc*. Pendaran DNA akan terlihat sebagai pita-pita yang bermigrasi pada gel dari kutub negatif ke kutub positif, karena DNA yang bermuatan negatif.



Gambar 1. Visualisasi Hasil Isolasi DNA *R. retusa* pada Gel Agarose 1,5%. TMG: sampel dari Temanggung, TLG 1,

2: sampel dari Tulungagung, SMR 1, 2 : sampel dari Semeru, YK 1, 2, 3: sampel dari Yogyakarta.

Gambar 1 menunjukkan kualitas DNA hasil isolasi yang telah dipurifikasi. Masing-masing sampel DNA *R. retusa* yang berhasil diisolasi memiliki ketebalan pita DNA yang berbeda. Sampel DNA *R. retusa* TLG1 dan TLG2 memiliki intensitas pita DNA yang paling tebal diantara pita DNA dari sampel lainnya. Sementara itu, sampel YK2 memiliki intensitas pita DNA yang paling tipis diantara ketujuh sampel lainnya. Perbedaan intensitas pita yang dihasilkan oleh masing-masing sampel dapat diakibatkan oleh beberapa faktor. Diantaranya adalah perbedaan tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi. Semakin tinggi konsentrasi dan kemurnian DNA maka intensitas pita akan semakin terang (Saleha, 2004: 4).

Selain itu visualisasi menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi utuh dan tidak terpotong namun memiliki *smear*.

## SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa delapan sampel daun *R. retusa* berhasil diisolasi DNANYA dan telah dilakukan purifikasi DNA. Visualisasi menunjukkan bahwa delapan sampel DNA memiliki intensitas pita DNA berbeda. DNA hasil isolasi dianggap memiliki kualitas yang cukup baik karena menghasilkan pita yang jelas dan tidak terpotong.

## DAFTAR PUSTAKA

Cheng, K.T., Su, C.H., Chang, H.C., & Huang, J. Y. (1998). Differentiation of genuines and counterfeits of *Cordyceps* spesies using Random Amplified Polymorphic DNA. *Planta Medica*, 64(5): 451- 453.

Fitri A. S. S. & Santoso, A. M. (2013). Ragam Orchidaceae Epifit di Kawasan Ubalan Kediri dan Prospeknya Sebagai

Modal Bioekonomi Lokal. *Seminar Nasional Pendidikan Biologi FKIP UNS*.

Hannum, S. (2004). Kemiripan *Genetik Kelapa Genjah Hijau Jombang dan Genjah Hijau Nias Berdasarkan Penanda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*. Makalah Falsafah Sains (PPS 702), tidak diterbitkan, Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Karp, A., Seberg, O., & M. Buiatti. (1996). Molecular techniques in the assesment of botanical diversity. *Ann. Bot.* 78: 144.

Rineksane, I. A. & Sukarjan, M. (2015). *Regenerasi Anggrek Vanda tricolor Pasca Erupsi Merapi Melalui Kultur In Vitro*. Makalah disajikan dalam Seminar Nasional Universitas PGRI Yogyakarta.

Syafaruddin & Santoso, T. J. (2011). Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemirisan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*, 17(1):11-17.

Syafaruddin, Randriani, E., & Santoso, T. J., (2011). Efektivitas dan Efisiensi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA pada Jambu Mete. *Buletin RISTRRI*, Vol 2(2): 151-160.