

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Optimasi Primer

RAPD adalah suatu teknik pengembangan dari PCR, dalam pelaksanaan RAPD dianggap mudah dan cepat karena primer yang bersifat random memungkinkan untuk dilakukan PCR meskipun urutan sekuens pada sampel tidak diketahui. Kelemahan RAPD adalah primer yang bersifat random sehingga bisa menempel di bagian mana saja, hal ini menyebabkan beberapa primer mungkin tidak dapat menunjukkan polimorfisme karena pada sekuens yang teramplifikasi tidak terdapat perbedaan sementara perbedaan urutan basa nukleotida terletak pada sekuens yang berbeda. Hal ini dikarenakan RAPD tidak didesain untuk memperbanyak sekuens target spesifik sehingga tidak dapat menjamin bahwa primer tunggal akan menghasilkan marker yang berguna untuk menunjukkan adanya variasi antar sampel.

Primer RAPD bersifat random sehingga perlu dilakukan optimasi primer dengan *screening* primer untuk mendapatkan primer yang sesuai dan memiliki tingkat polimorfis yang tinggi. Optimasi primer dilakukan pada 31 *single* primer dengan menggunakan 3 sampel dan menghasilkan pita DNA yang monomorfik untuk semua primer.

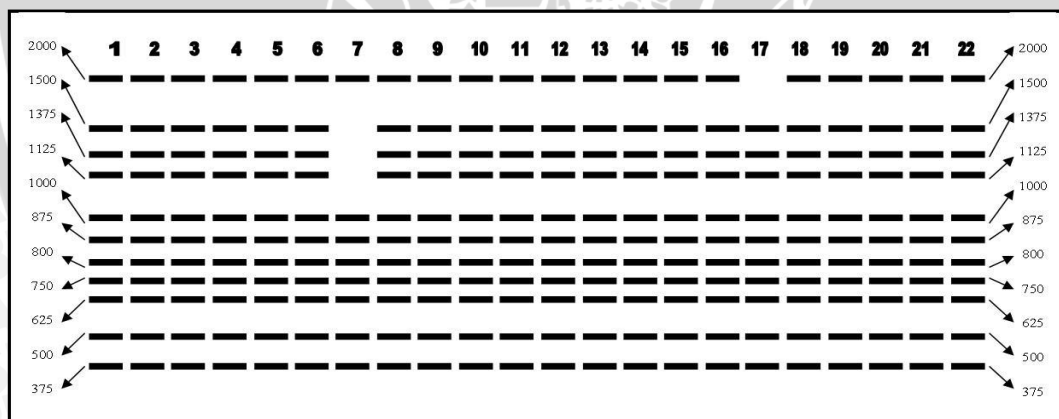
Dalam penelitian Hopskin and Hilton (2001) menunjukkan bahwa penggunaan 2 atau lebih primer yang dikombinasikan dalam optimasi RAPD dapat meningkatkan kapasitas untuk menunjukkan adanya perbedaan. Hu *et al.* (1995) menyatakan bahwa penggunaan gabungan 2 primer dalam RAPD menunjukkan jumlah amplifikasi yang lebih banyak dengan fragmen yang lebih kecil. Hasil amplifikasi menghasilkan *banding* yang berbeda dengan jika menggunakan primer tunggal, hal ini menunjukkan bahwa amplifikasi terjadi pada sekuens yang berbeda. Penggunaan 2 primer dianggap sebagai solusi terhadap terbatasnya primer, jika menggunakan primer tunggal maka jumlah reaksi sama dengan jumlah primer, sementara dengan primer ganda maka akan dapat diperoleh jumlah reaksi sebanyak $n(n-1/2)$ reaksi, dengan n adalah jumlah primer. *Screening* dilakukan pada 8 kombinasi dari dua primer, dari hasil *screening* tersebut juga menghasilkan amplifikasi pita DNA dengan polimorfisme rendah.

Tabel 4. Data Optimasi Primer

Kode	Primer	Sekuens	Σ Pita DNA	Σ Pita Polimorfik
A1-3	OPA 08	GTGACGTAGG	2	0
A4-6	OPB 10	CTGCTGGGAC	5	0
A7-9	OPL 08	AGCAGGTGGA	8	2
A10-12	OPO 04	AAGTCCGCTC	6	0
A13-15	OPO 11	GACAGGAGGT	7	0
A16-18	OPO 12	CAGTGCTGTG	8	1
A19-21	OPP 08	ACATCGCCCA	7	1
A22-24	OPP 11	AACGCGTCGG	7	1
B1-3	OPP 13	GGAGTGCCTC	8	0
B4-6	OPAI 11	ACGGCGATGA	7	0
B7-9	OPA 07	GAAACGGGTG	12	2
B10-12	OPB 08	GTCCACACGG	9	0
B13-15	OPL 12	GGGCGGTACT	14	1
B16-18	OPP 04	GTGTCTCAGG	10	0
B19-21	OPP 15	GGAAGCCAAC	13	0
B22-24	OPP 19	GGGAAGGACA	12	0
C1-3	OPF 13	GGCTGCAGAA	11	0
C4-6	OPH 14	ACCAGGTTGG	10	0
C7-9	OPH 15	AATGGCGCAG	13	2
C10-12	OPK 16	GAGCGTCGAA	10	0
C13-15	OPAA 16	GGAACCCACA	12*	0
C16-18	OPAB 14	AAGTGCGACC	12	0
C19-21	OPAL 08	GTCGCCCTCA	0	0
C22-24	OPAU 03	ACGAAACGGG	10	0
D1-3	OPAI 15	GACACAGCCC	9	0
D4-6	OPA 04	AATCGGGCTG	10*	1
D7-9	OPC 02	GTGAGGCGTC	5	0
D10-12	OPC 05	GATGACCGCC	14	1
D13-15	OPC 08	TGGACCGGTG	5	0
D16-18	OPD 20	ACCCGGTCAC	13	3
D19-21	OPF 12	ACGGTACCAG	9	0
M1	OPO 04 x OPB 10		7	2
M2	OPB 10 x OPA 07		11	0
M3	OPA 07 x OPL 12		11	4
M4	OPO 04 x OPL 12		12	0
M5	OPH 15 x OPK 16		9	0
M6	OPK 16 x OPC 02		7	0
M7	OPC 02 x OPD 20		9	1
M8	OPH 15 x OPD 20		10	1

Penilaian ada atau tidaknya pita DNA hasil amplifikasi dinilai sangat subjektif meskipun intensitasnya dapat secara kuantitatif dibedakan berdasarkan berat molekulnya. Asumsi Grosberg *et al.* (1996) yang berkembang selama ini adalah apabila primer diamplifikasi menghasilkan pita DNA dengan berat molekul sama maka pita DNA tersebut menunjukkan keadaan alel yang sama (sama dominan), sedangkan tidak munculnya pita DNA menunjukkan tidak adanya alel tersebut atau alel resesif.

Primer yang dipilih untuk digunakan dalam primer campuran adalah primer-primer yang menunjukkan hasil amplifikasi yang stabil, jumlah pita banyak, dan jelas. Dari hasil optimasi 31 primer tunggal dan 8 primer gabungan terpilih 5 primer yang memiliki jumlah pita teramplifikasi paling banyak dan terdapat beberapa pita polimorfik yaitu 3 primer tunggal dan 2 primer gabungan untuk digunakan pada 22 sampel kacang bambara. Sebagai contohnya hasil elektroforesis menggunakan primer gabungan OPA07xOPL12 yang menunjukkan beberapa pita polimorfik salah satunya pada 2000 bp pada galur 17 dan 1500, 1375, 1125 bp pada galur 7 yang tidak teramplifikasi sementara pada genotip lain teramplifikasi seperti ditunjukkan gambar di bawah ini,



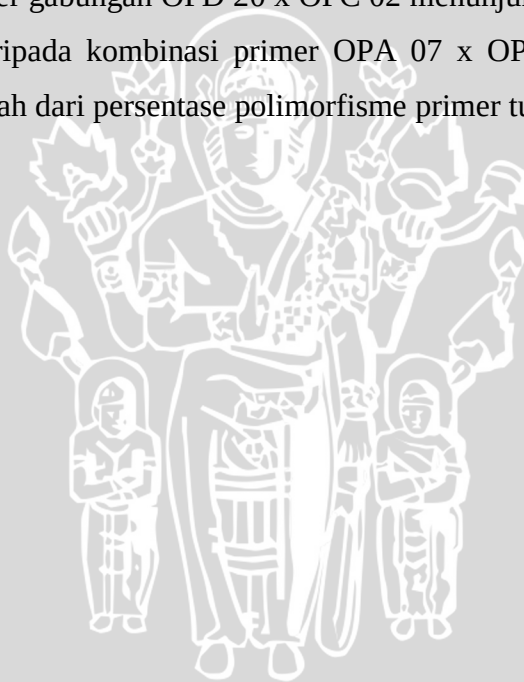
Gambar 4. Zymogram Amplifikasi 22 sampel dengan primer OPA07xOPL12

Tabel 5. Persentase Polimorfisme Primer

Primer	Jumlah Pita	Pita polimorfik	Persentase polimorfik
OPA O7	12	2	16,67 %
OPD 20	13	3	23,08%
OPL 12	14	1	7,14%
OPA 07 x OPL 12	11	4	36,36%
OPD 20 x OPC 02	9	1	11,11%
Jumlah	59	11	18,87%

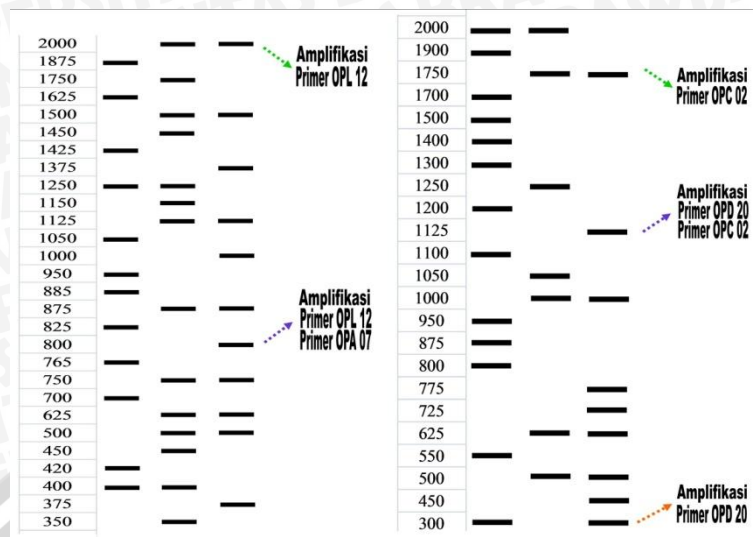
Hasil amplifikasi DNA menunjukkan bahwa presentase polimorfik tertinggi pada primer gabungan OPL 07 x OPL 12 yaitu 36,36% dan terendah yaitu 7,14% OPL 12. Pencampuran primer dilakukan untuk memperbanyak jumlah primer yang mungkin untuk digunakan karena primer tunggal memiliki polimorfisme yang rendah. Meskipun demikian pada primer gabungan memiliki karakter amplifikasi yang tidak selalu sama dengan salah satu atau kedua primer tunggalnya, meskipun pada primer gabungan juga menunjukkan beberapa pita DNA dengan berat molekul sama seperti amplifikasi pada primer tunggal.

Primer gabungan OPA 07 x OPL 12 memiliki polimorfisme yang tinggi 36,36% lebih tinggi dari kedua primer tunggalnya yaitu OPA 07 dengan persentase polimorfisme 16,67% dan OPL 12 dengan persentase polimorfisme 7,14% sementara primer gabungan OPD 20 x OPC 02 menunjukkan polimorfisme yang lebih rendah daripada kombinasi primer OPA 07 x OPL 12 yaitu hanya 11,11% dan lebih rendah dari persentase polimorfisme primer tunggalnya OPD 20 yaitu 23,08%.



Tabel 6. Pita DNA teramplifikasi dari Primer Tunggal dan Gabungan (Bp)

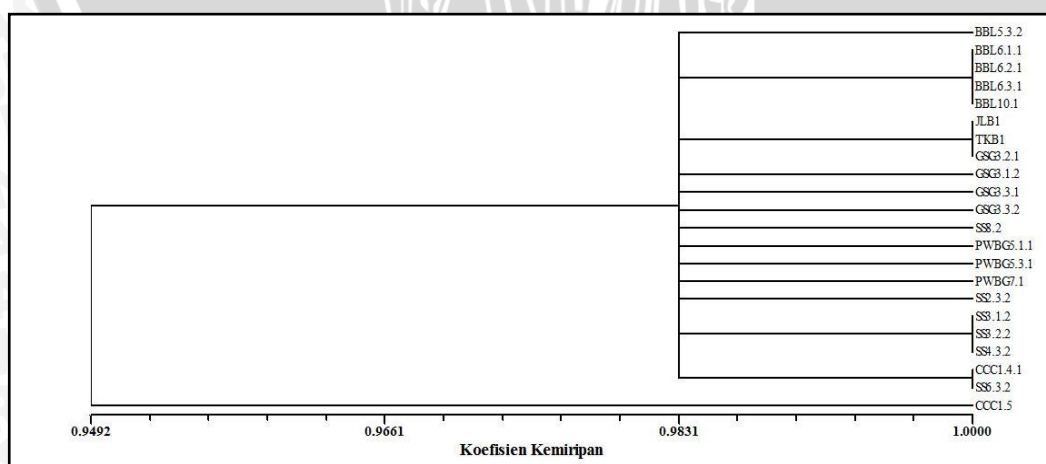
OPA 07	OPL 12	A07xL12	OPD 20	OPC 02	D20xC02
	2000	2000	2000	2000	
			1900		
1875					
	1750			1750	1750
			1700		
1625					
	1500	1500	1500		
	1450				
1425					
			1400		
		1375			
			1300		
1250	1250			1250	
			1200		
	1150				
	1125	1125			1125
			1100		
1050				1050	
		1000		1000	1000
950			950		
885					
	875	875	875		
825					
		800	800		
					775
765					
	750	750			
					725
700					
	625	625		625	625
			550		
	500	500		500	500
	450				450
420					
400	400				
		375			
	350				
			300		300



Gambar 5. Zymogram Hasil Amplifikasi Primer Tunggal dan Gabungan 2 Primer OPA 07 x OPL 12 (kiri) dan OPC 02 x OPD 20 (kanan)

Pita DNA yang teramplifikasi pada reaksi dengan menggunakan gabungan 2 primer dapat berasal dari amplifikasi salah satu primer ataupun merupakan amplifikasi gabungan dari kedua primer yang menghasilkan pita baru dengan ukuran *basepair* yang lebih rendah. Pada primer gabungan OPA 07 X OPL 12 menghasilkan beberapa pita teramplifikasi yang berasal dari primer OPL 12 yaitu pada *basepair* 2000, 1500, 1125, 875, 750, 625 dan 500 kb. Sementara pada primer gabungan OPD 20 X OPC 02 menghasilkan pita teramplifikasi yang berasal dari primer OPC 02 yaitu pada *basepair* 1750, 1000, 625, 500 dan 300 berasal dari primer OPD 20.

4.1.2 Koefisien Keragaman Kacang Bambara



Gambar 6. Dendrogram 22 Galur Kacang Bambara Berdasar Marka RAPD

Hasil analisis kekerabatan dengan menggunakan marka RAPD menunjukkan koefisien kemiripan antara 0,9492-1,00. Pengelompokan galur menunjukkan terdapat 2 kelompok besar dengan koefisien kemiripan 0,9492 yaitu CCC 1.5 dengan genotip lainnya. Pada kelompok kedua terdiri atas galur-galur dengan koefisien kemiripan 0,9831 dan terdapat beberapa galur yang memiliki koefisien kemiripan 1,00 yaitu BBL6.1.1, BBL6.2.1, BBL6.3.1, dan BBL10.1, JLB 1, TKB 1 dan GSG 3.2.1, lalu SS 3.1.2, SS 3.2.2 dan SS 4.3.2 dan juga CCC 1.4.1 dan SS 6.3.2. Koefisien kemiripan dari 22 galur yang digunakan berdasar asal galur yaitu 5 galur BBL (Lamongan) memiliki nilai kemiripan antara 0,9831-1,00, 2 galur CCC (Cianjur) memiliki nilai kemiripan 0,9492, JLB dan TKB (Labang dan Kamal Bangkalan) memiliki nilai kemiripan 1,00, 4 galur GSG (Sedayu Gresik) memiliki nilai kemiripan antara 0,9831, 3 galur PWBG (Bungah Gresik) memiliki nilai kemiripan antara 0,9831 dan 6 galur SS (Sumedang) memiliki nilai kemiripan antara 0,9831-1,00.

Sementara itu, dalam penelitiannya Nuryati *et al.* (2014) menjelaskan bahwa pada 22 galur kacang bambara yang digunakan sebagai bahan penelitian ini memiliki koefisien kemiripan 0,695 sehingga koefisien keragamannya 0,305 atau 30,5% yaitu antara galur SS 3.1.2 dan SS 3.2.2 terhadap 20 galur lainnya. Menurut Nuryati *et al.* (2014) berdasarkan hasil analisis kekerabatan dengan menggunakan penanda morfologi menunjukkan bahwa koefisien kemiripan tertinggi dimiliki oleh galur BBL 6.3.1 dengan GSG 3.3.1 dengan nilai koefisien kemiripan 0,950. Sementara itu pada galur-galur lainnya masih terbagi ke dalam beberapa kelompok dengan koefisien kemiripan genetik berkisar antara 0,695-0,950.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Analisis Hasil Elektroforesis

Amplifikasi DNA menghasilkan fragmen DNA dalam jumlah banyak, tetapi hanya pita dari ukuran 200-2000 bp saja yang kemudian digunakan dalam analisis. Kumari dan Gurusubramanian (2011) berasumsi bahwa primer akan menempel pada DNA sekuens dan akan terbentuk amplifikasi fragmen DNA pada daerah penempelan DNA yang berseberangan dengan hasil amplifikasi berupa fragmen DNA dengan ukuran mencapai 3000 bp. Sementara itu Grosberg *et al.* (1996), Tingey dan del Tufo (1993) menyatakan bahwa ukuran fragmen hasil amplifikasi DNA dengan RAPD adalah 200-2000 bp. Pada praktiknya, menurut Grosberg *et al.* (1996), DNA fingerprinting multilokus seringkali sulit untuk memisahkan band dari berat molekul berbeda yang menunjukkan allele pada lokus yang sama atau lokus yang berbeda. Dengan alasan ini, sebagian besar peneliti dengan sederhana menganggap panjang polimorfisme sebagai lokus tunggal dan melakukan skoring ada atau tidak ada pada berat molekul tersebut.

Persentase pita polimorfik dari hasil penelitian dengan menggunakan primer OPA 07 adalah 16,67% dan OPL 12 adalah 7,14%. Persentase ini termasuk rendah jika dibandingkan dengan hasil penelitian Amadou *et. al* (2001) pada beberapa aksesori kacang bambara dari beberapa negara di Afrika menggunakan primer OPA 07 menghasilkan polimorfisme 75% dan OPL 12 menghasilkan polimorfisme 60%, Mukakalisa (2010) dalam penelitiannya pada kacang bambara yang juga berasal dari Afrika menggunakan OPA 07 menunjukkan polimorfisme 100% dan OPL 12 memiliki polimorfisme 75%. Sementara untuk primer OPD 20 memiliki persentase pita polimorfik sebesar 23,08% yang lebih rendah jika dibandingkan hasil penelitian Rungnoi *et. al* (2012) menggunakan aksesori dari Afrika dan beberapa daerah Asia menunjukkan polimorfisme 50% untuk primer OPD 20. Perbedaan tingkat polimorfisme yang dihasilkan dari beberapa penelitian yang telah dilakukan tersebut dengan penelitian ini dapat dimungkinkan karena perbedaan komposisi genetik pada aksesori-aksesori kacang bambara Afrika dan Asia sehingga menghasilkan pola amplifikasi yang berbeda.

Amadou *et al.* (2001), dalam penelitiannya tentang evaluasi kekerabatan kacang bambara dengan menggunakan 50 primer acak RAPD yaitu kit A, B, E, F, L, M, O, P, AI dan AH yang diseleksi dengan menggunakan 2 sampel terlebih dulu untuk mendapatkan primer yang dapat mengamplifikasi *templates*. Berdasarkan hasil seleksi didapatkan hanya 17 primer yang memberikan amplifikasi yang dapat digunakan terhadap 25 sampel yang digunakan. Persentase polimorfisme dari primer berkisar antara 0-86% dengan rata-rata 51%, hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak primer yang digunakan maka peluang untuk mendapatkan pita polimorfik akan semakin besar dan dapat mengurangi bias yang disebabkan sedikitnya pita yang digunakan dalam analisis sehingga jarak genetik yang dihasilkan akan lebih valid.

Menurut Ambika, RAPD adalah teknik amplifikasi dengan menggunakan primer acak tunggal yang direaksikan dengan reaksi PCR yang menghasilkan beberapa produk potongan pita DNA. Teknik ini bertujuan untuk mendeteksi sekuens nukleotida dari hasil amplifikasi DNA yang polimorfik. Pada proses amplifikasi primer akan menempel pada DNA di arah yang berlawanan, apabila daerah penempelan sesuai maka produk fragmen DNA akan dihasilkan melalui amplifikasi termosiklik. Polimorfisme antar individu dihasilkan dari perbedaan sekuens dari satu atau beberapa daerah penempelan primer yang dianalisis sebagai ada tidaknya fragmen pita DNA tertentu pada hasil RAPD.

Menurut Petovicova *et al.* (2014) RAPD adalah marker yang paling banyak digunakan pada banyak program pemetaan genom. Meskipun jumlah lokus yang dapat dipetakan tidak terbatas tetapi untuk menemukan fragmen yang polimorfik akan lebih rendah. Polimorfisme yang rendah dengan menggunakan RAPD juga terjadi pada analisis kekerabatan 48 galur murni rye dengan menggunakan 19 primer hanya menghasilkan 48 band polimorfis atau sekitar 37,4%.

Branka dan Bojka (1993) dalam penelitiannya menunjukkan amplifikasi RAPD pada genus *Fagopyrum* menghasilkan 8 pita DNA produk, jumlah pita monomorfik 6 pita dan hanya ada 2 pita polimorfik. Tanaman yang menyerbuk sendiri memiliki polimorfisme yang rendah dalam aksesori. Sebagian besar marker RAPD menunjukkan level polimorfisme yang berbeda pada sampel kultivar yang

berbeda, dari hasil penelitian Butiuc *et al.* (2010) pada beberapa kultivar menunjukkan bahwa dengan primer yang sama OPA-13, OPB-04, OPB-07, OPB-12, OPB-17 dan OPF-04 menunjukkan level polimorfisme yang berbeda. Pada kultivar *Feteasca* dan *Riesling* menunjukkan polimorfisme yang rendah sampai monomorfik sementara pada *Muscat* menunjukkan polimorfisme.

Kiani *et al.* (2000 dalam Shahnadjad *et al.* 2005), menyatakan bahwa pengelompokan dan klasifikasi berdasarkan RAPD tidak memiliki hubungan dengan pengelompokan berdasarkan karakter morfologi dan agronomi, artinya sampel dengan latar belakang *banding* yang sama dan dikelompokkan dalam satu grup mungkin dapat memiliki karakter morfologi dan agronomi yang sangat berbeda, sehingga hasil analisis kluster dan klasifikasi sampel berbesarkan marker RAPD mungkin tidak memiliki korelasi dengan hasil klasifikasi secara botani dan morfologi. Primer RAPD tidak didesain untuk mengamplifikasi sekuens target yang spesifik, lokus yang teramplifikasi tidak diketahui dan kemungkinan tersebar pada genom. Grosberg *et al.* (1996) menjelaskan bahwa keuntungan dari primer RAPD adalah pengguna tidak perlu mengetahui susunan nukleotida meskipun demikian kelemahannya adalah tidak ada jaminan bahwa primer tunggal RAPD dapat menunjukkan variasi yang ada.

Penggunaan RAPD pada tanaman klonal memiliki kelemahan yang disebabkan rendahnya keragaman genetik pada DNA masing-masing individu sehingga primer tunggal yang digunakan kemungkinan tidak dapat mendeteksi keragaman yang ada. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa penggabungan beberapa primer tunggal RAPD dalam satu reaksi dapat digunakan untuk meningkatkan kemampuan untuk mendeteksi polimorfisme pada sekuens DNA. Menurut Hopskin and Hilton (2001) ukuran produk hasil PCR bervariasi tergantung pada jumlah primer yang digunakan dalam reaksi. Semakin banyak jumlah primer yang digunakan dalam satu reaksi maka ukuran produk PCR akan semakin menurun. Jarak rata-rata antara daerah penempelan pada pita DNA yang berlawanan akan semakin pendek apabila menggunakan dua primer berbeda jika dibandingkan dengan reaksi menggunakan satu primer saja.

Dari amplifikasi primer OPA 07 menghasilkan 12 fragmen pita DNA, 14 fragmen dari OPL 12 dan 11 fragmen teramplifikasi dalam reaksi yang

menggunakan gabungan dua primer OPA 07 X OPL 12. Hasil rekapitulasi berdasarkan ukuran basepair yang teramplifikasi dapat dikatakan bahwa 7 fragmen berasal dari primer OPL 12 dan 0 fragmen berasal dari primer OPA 07, sementara 4 fragmen lainnya diduga berasal dari amplifikasi gabungan kedua primer. Sementara pada primer OPD 20 menghasilkan 13 fragmen pita DNA dan 8 fragmen berasal dari OPC 02, 9 fragmen teramplifikasi dalam reaksi merupakan gabungan dari primer OPD 20 X OPC 02. 4 fragmen berasal dari primer OPC 02 dan 1 fragmen berasal dari OPD 20, sementara 4 fragmen lainnya diduga berasal dari amplifikasi gabungan dua primer. Merujuk pada pendapat Hu, J. *et al.* (1995) bahwa fragmen baru dapat terbentuk dari hasil amplifikasi dua primer yang menempel pada dua arah yang berlawanan.

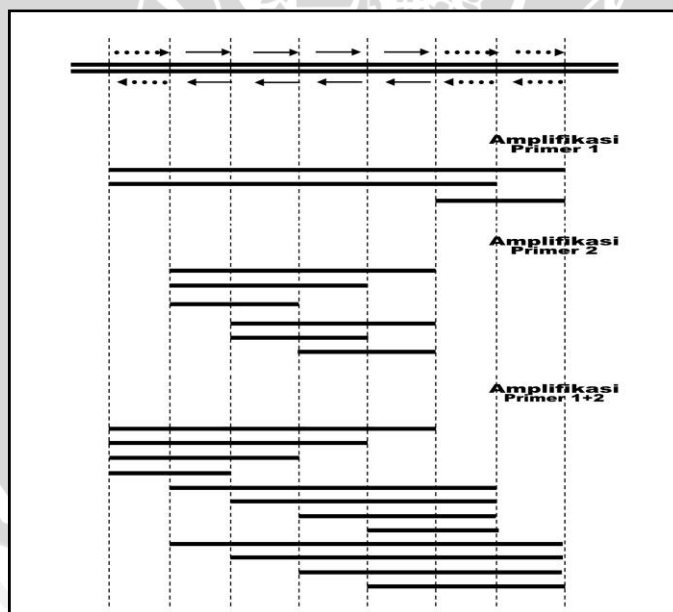
Fragmen teramplifikasi yang merupakan gabungan dari kedua primer berukuran lebih kecil dari kedua primer asalnya, sementara jumlah pita teramplifikasi lebih banyak dari salah satu primer dan atau lebih sedikit dari primer yang lainnya, hal ini dimungkinkan ada beberapa daerah penempelan yang tidak teramplifikasi pada reaksi gabungan dua primer. Hal ini didukung dengan pendapat Hu *et al.* (1995) bahwa fragmen DNA yang diamplifikasi oleh primer tunggal seringkali tidak jelas atau bahkan tidak muncul pada hasil amplifikasi primer gabungan, hal ini sangat mungkin disebabkan adanya kompetisi antar dua primer, namun demikian sangat sulit untuk mengkuantifikasi pengaruh dari kompetisi antar dua primer terhadap hasil amplifikasi.

Ditinjau dari segi jumlah pita DNA teramplifikasi yang dapat diskoring maka pada primer gabungan keduanya memiliki jumlah yang lebih rendah dari asal primer tunggalnya. Hal ini bertentangan dengan pendapat yang dikemukakan oleh Sall *et al* (2000) bahwa dari hasil perbandingan antara produk amplifikasi primer tunggal dan gabungan dua primer menunjukkan bahwa amplifikasi pada reaksi gabungan dua primer RAPD menunjukkan rata-rata amplifikasi 1,3 kali lebih banyak dari hasil reaksi amplifikasi pada primer tunggal.

Rendahnya amplifikasi yang terbentuk disebabkan karena jarak penempelan dua primer berjauhan. Semakin dekat letak penempelan dua primer maka amplifikasi yang terbentuk semakin banyak dengan ukuran bp kecil, semakin jauh letak penempelan primer maka jumlah amplifikasi semakin sedikit.

Ilustrasi yang dibuat oleh Hu *et al.* (1995) menunjukkan bahwa apabila primer menempel pada sekuens DNA dengan jarak yang berjauhan, meski dengan arah yang berlawanan maka fragmen DNA amplifikasi tidak akan terbentuk.

Prosedur standar dalam penggunaan RAPD adalah dengan menggunakan primer tunggal yang terdiri atas 10 basa nukleotida acak untuk mengamplifikasi genom dengan PCR. Hu *et al* (1995) melakukan modifikasi dalam prosedur dengan menggunakan dua primer pada setiap reaksi pada *Brossico* nnpus dan menemukan bahwa dengan menggunakan dua primer RAPD pada reaksi menghasilkan amplifikasi yang lebih banyak dengan ukuran fragmen yang lebih kecil daripada RAPD dengan teknik standar (menggunakan satu primer). Pita baru selalu teramplifikasi pada reaksi dua primer dan hasil analisis *Southern blot* menunjukkan bahwa pita-pita tersebut tidak memiliki kemiripan dengan hasil amplifikasi pada reaksi primer tunggal sebagai penyusunnya. Pita penanda yang baru tidak berkaitan dengan pita penanda yang teramplifikasi dari primer yang sama pada reaksi RAPD standar, hal ini dapat digunakan sebagai petunjuk bahwa pita yang dihasilkan dari reaksi dua primer dan primer tunggal berasal dari daerah penempelan yang berbeda.



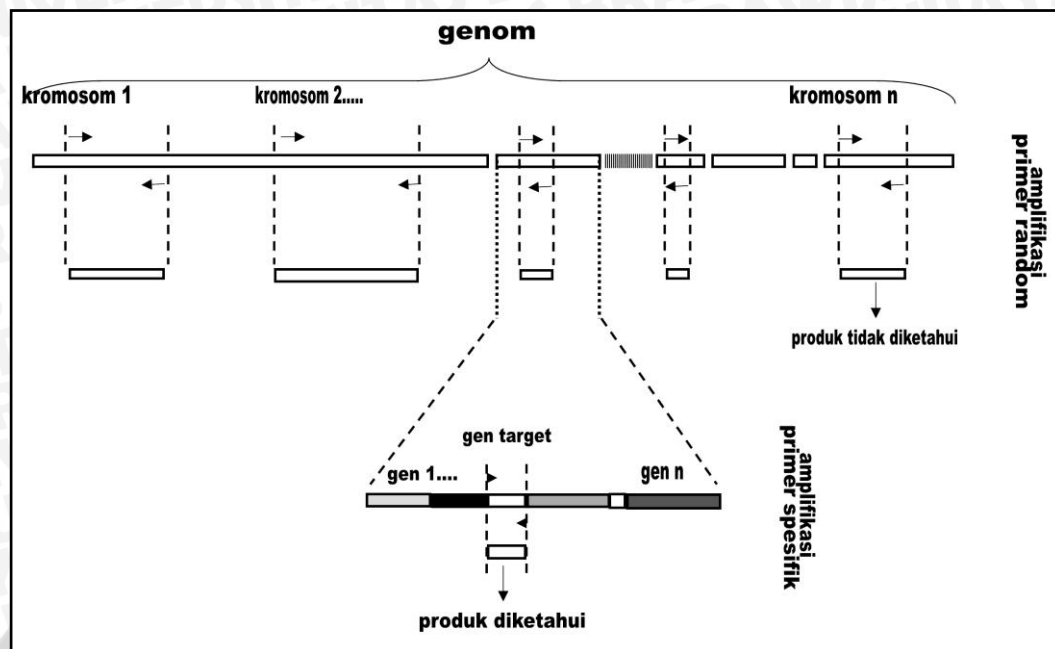
Gambar 7. Mekanisme Amplifikasi Primer Tunggal dan Gabungan 2 Primer

Menurut Hu *et al* (1995), pita DNA hasil amplifikasi dari reaksi dua primer tidak bergabung dengan hasil amplifikasi dengan primer tunggal. Meskipun demikian beberapa fragmen dari reaksi dua primer kemungkinan

merupakan gabungan dari beberapa produk dari reaksi primer tunggal, hal ini menunjukkan bahwa beberapa fragmen yang teramplifikasi oleh primer tunggal juga teramplifikasi dalam reaksi dengan dua primer. Rendahnya gabungan dari hasil amplifikasi primer tunggal dengan reaksi dua primer yang menghasilkan ukuran produk yang berbeda menunjukkan rendahnya kemiripan produk. Meskipun demikian pita baru yang terbentuk merupakan pita yang berasal dari daerah penempelan yang tidak teramplifikasi pada reaksi primer tunggal.

Menurut Kumar dan Gurusubramanian (2011), teknik RAPD dapat digunakan tanpa harus diketahui sekuens DNA gen target karena primer akan menempel pada urutan sekuens acak yang tidak diketahui. Marker RAPD bersifat dominan yang artinya primer tidak dapat membedakan alel homozigot dan heterozigot. Kumari dan Thakur (2014) menambahkan bahwa primer yang menempel pada daerah penempelan tidak spesifik pada sekuens gen karena tidak dilakukan sekuensing gen target sehingga penempelan primer bersifat random dan produk yang dihasilkan tidak diketahui identitasnya. Pita DNA yang teramplifikasi dengan ukuran yang sama dari individu berbeda tidak selalu menandakan bahwa individu tersebut memiliki fragmen DNA yang sama.

Pada teknik amplifikasi DNA lain misalnya QTL (*Quantitative Trait Loci*) telah dilakukan sekuensing DNA gen target lebih dulu sehingga primer yang dibuat spesifik pada sekuens gen yang akan diamplifikasi, sehingga produk yang dihasilkan diketahui ukuran basepairnya dan dapat dibuktikan secara morfologi. Primer RAPD bersifat random sehingga menyebabkan hasil produk amplifikasi tidak selalu berupa sekuens gen tertentu sebab primer dapat menempel di daerah penempelan mana saja, sehingga peristiwa pita polimorfik yang rendah dapat terjadi akibat pita teramplifikasi bukan merupakan gen penyandi karakter tertentu. Hal ini ditunjang dengan pernyataan Grosberg *et al.* (1996) yaitu bahwa pita DNA yang muncul pada semua individu dalam populasi umumnya monomorfik, tetapi pada sampel populasi menunjukkan hasil polimorfik. Pita DNA dengan ukuran *basepair* berbeda dianggap sebagai karakter tertentu, meskipun demikian pada teknik *southern blot* menunjukkan bahwa pita DNA berbeda yang teramplifikasi oleh primer tunggal mengandung sekuens homolog yang menunjukkan bahwa pita DNA berbeda tidak seharusnya merupakan karakter yang independen.



Gambar 8. Model Amplifikasi DNA dengan Primer Spesifik dan Random

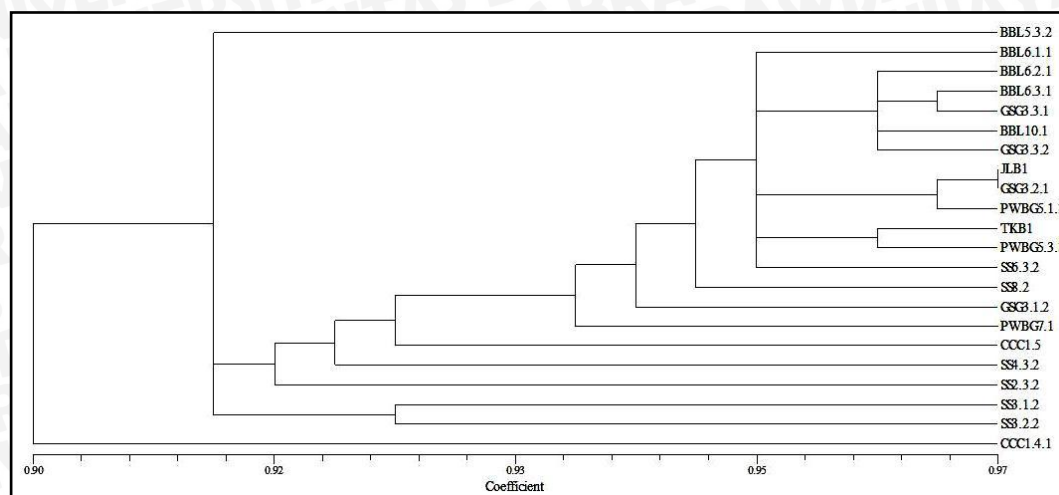
Jika ditinjau dari marka morfologi, galur kacang bambara memiliki koefisien keragaman antar galur yang lebih tinggi daripada dari hasil analisis menggunakan marka molekuler seperti RAPD, hal ini karena pada marka morfologi terdapat beberapa karakter yang digunakan sebagai penanda yang terdiri dari satu atau lebih gen dengan sekuens yang tidak diketahui. Pada teknik RAPD dengan primer yang terdiri dari 10 basa nukleotida tidak dapat mengamplifikasi semua gen yang menyandikan semua karakter morfologi, oleh sebab itu dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa tidak ada hubungan antara penanda morfologi dengan RAPD.

Kumar dan Gurusubramanian (2011) menjelaskan bahwa keseluruhan materi genetik disebut sebagai genom, sementara gen adalah segmen dari molekul DNA. Terdapat perbedaan dalam model amplifikasi primer yang spesifik dan random (Gambar 5). Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa primer yang spesifik seperti pada teknik QTL mampu untuk mengamplifikasi gen target dan menghasilkan produk amplifikasi berupa fragmen DNA dengan ukuran basepair yang telah diketahui. Amplifikasi dengan primer random seperti RAPD terjadi pada keseluruhan genom yang artinya semua materi genetik akan diamplifikasi berdasarkan penempelan primer secara random sehingga tidak diketahui produk yang dihasilkan, karena pada kromosom terdapat susunan

nukleotida yang menyandikan banyak gen, sehingga kita tidak bisa memastikan apakah hasil amplifikasi tersebut pada gen atau bukan gen. Permasalahan rendahnya polimorfisme pada kacang bambara dapat pula disebabkan karena primer-primer yang digunakan dalam amplifikasi telah menempel pada basa nukleotida dengan urutan yang sama pada daerah penempelan yang sama sehingga menghasilkan fragmen DNA yang homolog.

4.2.2 Sejarah dan Fakta

Secara umum koefisien kemiripan antara 0,9492-1,00 dan koefisien keragaman 0,051-0,00. Meskipun hasil dari analisis RAPD menunjukkan terdapat beberapa band yang polimorfis tetapi hasil analisis menunjukkan koefisien keragaman yang rendah hanya 0,051 atau kergaman antar galur hanya 5,1%. Sementara itu berdasarkan hasil konversi data karakter kualitatif yang diambil dari hasil penelitian Nuryati *et al.* (2014) menunjukkan bahwa dari 22 galur kacang bambara yang digunakan sebagai bahan penelitian ini memiliki koefisien kemiripan antara 0,695-0,950 dan koefisien keragamannya antara 0,305-0,050. Berdasarkan hasil analisis kekerabatan dengan menggunakan penanda morfologi menunjukkan bahwa koefisien kemiripan terendah pada galur SS 3.1.2 dan SS 3.2.2 terhadap 20 galur lainnya. Koefisien kemiripan tertinggi 0,950 yaitu antara BBL 6.3.1 dengan GSG 3.3.1. Koefisien kemiripan galur SS 3.1.2 dan SS 3.2.2 pada hasil analisis RAPD menunjukkan 0,9831 terhadap galur lain, sementara koefisien kemiripan antara galur BBL 6.3.1 dengan GSG 3.3.1 adalah 0,9831. Hal ini menunjukkan bahwa dengan menggunakan materi genetik yang sama dapat memberikan hasil analisis yang berbeda nilai koefisien kemiripan dan keragaman dengan menggunakan metode analisis yang berbeda yaitu metode pengamatan secara morfologi dengan molekuler. Meskipun demikian, tidak terdapat perbedaan koefisien kemiripan yang berbeda nyata karena dari koefisien kemiripan baik menggunakan hasil RAPD ataupun koefisien kemiripan hasil morfologi menunjukkan koefisien diatas 50%.



Gambar 9. Dendrogram 22 Galur K. Bambara Berdasar RAPD dan Morfologi

Apabila data biner RAPD digabungkan dengan data karakter kualitatif Nuryati *et al.* (2014) yang dibinerkan maka didapatkan koefisien kemiripan 0,90-0,97. Koefisien kemiripan terendah antara galur CCC1.4.1 dengan 21 galur lainnya. Koefisien kemiripan tertinggi antara galur JLB1 dengan GSG3.2.1. Hasil analisis menggunakan marka gabungan RAPD dan morfologi menunjukkan koefisien kemiripan yang lebih tinggi daripada menggunakan marka morfologi saja dan lebih rendah daripada menggunakan marka RAPD saja. Koefisien kemiripan tertinggi pada hasil gabungan RAPD dan morfologi adalah JLB1 dengan GSG3.2.1 yaitu 0,97 yang juga memiliki koefisien tertinggi pada marka RAPD yaitu 1,00. Koefisien kemiripan BBL6.3.1 dengan GSG 3.3.1 juga termasuk tinggi pada hasil gabungan RAPD dan morfologi yang juga memiliki koefisien tertinggi pada marka morfologi yaitu 0,95. Koefisien kemiripan terendah RAPD adalah CCC1.5 yaitu 0,9492 terhadap 21 galur lain yang setara dengan koefisien kemiripan CCC1.5 yaitu antara sekitar 0,935-0,95 pada gabungan penanda RAPD dan morfologi.

Baik menggunakan penanda RAPD, morfologi (Nuryati *et al.* 2014) dan gabungan antara data biner RAPD dan morfologi menunjukkan hasil yang tidak menunjukkan keragaman tinggi. Koefisien kemiripan cenderung menunjukkan kekerabatan yang dekat antar 22 galur yang digunakan. Pada hasil RAPD koefisien kemiripan antara 0,9495-1,00, koefisien kemiripan hasil morfologi antara 0,695-0,950 dan pada hasil gabungan menunjukkan koefisien kemiripan antara 0,90-0,97. Hal ini dapat dikatakan bahwa semua galur berkerabat dekat.

Meskipun ada beberapa galur yang memiliki nilai koefisien yang relatif sama baik pada penanda RAPD, morfologi ataupun gabungan, akan tetapi dengan koefisien kemiripan yang tinggi tersebut sulit untuk dapat dilakukan pengelompokan untuk galur-galur yang memiliki nilai koefisien yang konstan pada berbagai penanda yang digunakan karena urutan nilai koefisien yang berubah-ubah dan relatif tinggi pada semua galur. Koefisien gabungan yang lebih rendah dari koefisien RAPD dan lebih tinggi dari koefisien morfologi menunjukkan bahwa hasil perhitungan hanya merupakan korelasi antara kedua penanda yaitu RAPD dan morfologi.

Araujo *et al.* (2010) berpendapat bahwa RAPD dapat digunakan sebagai alternatif dalam mengurangi waktu yang dibutuhkan untuk mengidentifikasi marker yang berhubungan dengan gen tujuan. Keberhasilan teknik RAPD bergantung pada kemampuan masing-masing primer untuk mendeteksi lokus. Korbin *et al.* (2011) menggambarkan proses identifikasi gen menggunakan RAPD. Marker RAPD umumnya tidak dapat membedakan individu homozigot dan heterozigot, namun beberapa strategi telah disusun untuk meningkatkan efisiensi seleksi MAS. Konfirmasi ekspresi genetik dan metabolisme dapat dilakukan terhadap beberapa marker salah satunya adalah RAPD. Hasil dari identifikasi menggunakan RAPD dapat digunakan sebagai informasi untuk pembentukan QTL gen yang spesifik. Avila *et al.* (2003) dari hasil seleksi primer-primer RAPD didapatkan petunjuk mengenai ukuran basepair yang merujuk pada karakter ketahanan monogenik pada basepair tertentu. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa RAPD dapat pula digunakan sebagai marker untuk pemetaan kromosom dan seleksi terhadap karakter monogenik ataupun poligenik dengan membandingkan antara karakter yang tuju dengan primer yang terseleksi.

Menurut Fufa *et al.* (2005 dalam Abdollah *et al.* 2012) karakter morfologi biasanya digunakan dalam evaluasi keragaman genetik karena perhitungannya yang sederhana, meskipun demikian evaluasi keragaman genetik menggunakan karakter morfologi mungkin terdapat bias oleh lingkungan dan karena terbatasnya jumlah karakter yang dapat diamati. Marka molekuler dapat digunakan untuk mengevaluasi keragaman genetik pada berbagai spesies tanaman. Abdollah *et al.* (2012) menambahkan bahwa dalam penelitiannya tentang perbandingan evaluasi keragaman gandum dengan menggunakan karakter morfologi dan molekuler

menunjukkan bahwa tidak ada korelasi yang ditemukan antara variasi genetik yang didapatkan dari hasil identifikasi karakter kuantitatif dan molekuler. Apabila pohon filogeni menunjukkan perbedaan antara hasil evaluasi morfologi dan molekuler maka sangat dimungkinkan bahwa hasil evaluasi keragaman molekuler harus lebih diutamakan.

Perbedaan hasil evaluasi keragaman secara molekuler dan morfologi dapat terjadi karena beberapa hal, diantaranya karena adanya pengaruh dari bias lingkungan sebagai hasil adaptasi tanaman, epigenetik dan primer yang kurang sesuai. Epigenetika adalah peristiwa perubahan fenotipe akibat mekanisme selain perubahan susunan DNA dasar dan perubahan pada ekspresi fenotip terjadi karena faktor selain genetik. Perubahan ekspresi atau fenotip tanaman dapat disebabkan karena peristiwa adaptasi terhadap lingkungan. Fenotip adalah ekspresi karakter berdasarkan genetik dan dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga pada lingkungan yang berbeda mungkin akan menghasilkan penampilan yang berbeda sebagai akibat interaksi antara genetik dan lingkungan yang disebut sebagai ekotipe. Grosberg *et al.* (1996) menambahkan bahwa terjadinya variasi pada hasil RAPD terkadang dapat menimbulkan kesalahan dalam penafsiran hubungan antara tetua dengan anakan atau dalam hal ini adalah hubungan antar galur mengenai level keragaman pada tingkat alelik dan jarak genetik. Meskipun demikian apabila populasi menunjukkan adanya perbedaan pada variasi non genetik, hal ini mungkin dikarenakan jarak yang sama pada populasi berbeda.

Nusifera (2007) menjelaskan bahwa epigenetik menyebabkan semua perubahan-perubahan yang terjadi baik secara meiosis dan mitosis pada ekspresi gen yang terjadi namun tidak disandikan oleh sekuens DNA organisme yang bersangkutan. Epigenetik juga bertanggung jawab terhadap semua mekanisme yang dapat menyebabkan perbedaan ekspresi gen pada sel tertentu. Mekanisme yang terjadi dalam epigenetik adalah metilasi DNA, modifikasi histon dan RNA inferase. Sebagai hasil dari mekanisme epigenetik adalah keberadaan gen yang aktif dan tidak aktif pada setiap tipe sel yang ada.

Epigenetik mengubah protein pada kromosom dan metilasi DNA, menurut Martienssen and Colot (2001 dalam Tsaftaris *et al.* 2005) dapat menyebabkan konsekuensi fenotip yang besar pada organisme. Epigenetik pada tanaman dapat

terjadi dari satu generasi ke generasi selanjutnya. Kakutani (2002 *dalam* Tsaftaris *et al.* 2005) juga menambahkan apabila epigenetik telah stabil maka alel-alel epigenetik dapat diwariskan melalui transmisi epigenetik pada alel (epialel) dari satu generasi ke generasi selanjutnya. peristiwa epialelik dapat menjadi sumber bagi variasi polimorfisme fenotip dan menghasilkan fenotip baru. Peristiwa epigenetik juga dapat menghasilkan genom yang responsif terhadap kondisi stres lingkungan sehingga memungkinkan tanaman untuk dapat toleran terhadap stres.

Selain karena adanya pengaruh lingkungan dan mekanisme epigenetik, dapat dimungkinkan bahwa galur-galur kacang bambara yang dignakan pada dasarnya memiliki asal tetua yang sama. Jika ditinjau dari daerah asal galur, koefisien kemiripan terkecil yaitu 0,9492 antar galur yang berasal dari CCC 1.5 (Cianjur) dan koefisien kemiripan terbesar 1,00 yaitu BBL6.1.1, BBL6.2.1, BBL6.3.1, dan BBL10.1 (Lamongan), JLB 1, TKB 1 dan GSG 3.2.1 (Bangkalan-Gresik), SS 3.1.2, SS 3.2.2 dan SS 4.3.2 (Sidayu Sumedang) dan juga CCC 1.4.1 dan SS 6.3.2 (Cianjur-Sumedang), koefisien kemiripan dalam satu daerah asal termasuk besar, begitu pula dengan koefisien kemiripan antar 22 galur. Hal ini didukung dengan pernyataan Amadou *et al.* (2001 *dalam* Ntundu *et al.* 2004) tentang penelitian keragaman genetik 25 galur kacang bambara dari IITA menggunakan RAPD menunjukkan bahwa aksesori-aksesori tersebut terbentuk menjadi dua grup yang umumnya akan mengelompok berdasarkan asal geografis.

Sebaliknya analisis yang dilakukan oleh Pasquet *et al.* (1999) menunjukkan bahwa baik pada kacang bambara liar atau yang telah didomestikasi memiliki keragaman genetik yang rendah, hal ini menunjukkan bahwa semua galur domestikasi berawal dari galur liar yang sama. Selain itu, Nuryati *et al.* (2014) juga menjelaskan bahwa selama eksplorasi benih kacang bambara telah didapatkan informasi dari petani-petani bahwa benih yang ditanam di lahan mereka juga dibeli dari daerah lain, misalnya petani di daerah Gresik jawa timur juga membeli benih yang berasal dari jawa barat.

Menurut teori *vavilov*, semua plasma nutfah memiliki daerah domestikasi yang merupakan tempat plasma nutfah tersebut berlimpah. Daerah asal kacang bambara adalah Sub-Sahara Afrika, di daerah ini plasma nutfah kacang bambara berlimpah. Hasil elektroforesis yang dilakukan oleh Howell (1990 *dalam* Heller *et*

al. 2005) menunjukkan hasil yang berbeda nyata untuk setiap genotip yang diujikan, hal ini dapat dikatakan bahwa beberapa genotip liar mengalami kepunahan sementara yang berkembang hanya beberapa genotip saja. Pendapat tersebut dapat dijadikan dasar bahwa kemungkinan galur-galur yang diteliti berasal dari latar belakang genetik yang sama namun hanya karena pengaruh lingkungan sehingga menghasilkan ekspresi yang berbeda.

Rendahnya keragaman genetik dapat pula terjadi karena jenis tanaman autogami. Penyebarluasan oleh manusia dari satu tempat ke tempat lain dan rendahnya tingkat peningkatan keragaman secara seksual dapat menyebabkan rendahnya variasi antar populasi. Selain itu, 22 galur kacang bambara yang digunakan masih melewati proses penggaluran-penggaluran sehingga memungkinkan untuk dilakukan penggabungan beberapa galur dengan kemiripan tinggi menjadi satu galur, misalnya pada galur BBL6.1.1, BBL6.2.1, BBL6.3.1, dan BBL10.1, JLB 1, TKB 1 dan GSG 3.2.1, lalu SS 3.1.2, SS 3.2.2 dan SS 4.3.2 dan juga CCC 1.4.1 dan SS 6.3.2 dengan koefisien kemiripan 1,00. Menurut Ren *et al.* (2004) tidak ada korelasi yang nyata antara jarak secara geografis dengan jarak genetik pada populasi beberapa jenis tanaman karena persebaran yang terjadi disebabkan karena introduksi yang dilakukan oleh manusia.