

Penggunaan Marka RAPD Sebagai Penduga untuk Membedakan Jenis Kelamin pada Kantong Semar *Nepenthes gymnamphora* Koleksi Kebun Raya Baturraden

Dini Rizki Pertiwi*, Murni Dwiati, Agus Hery Susanto

Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto
Jalan dr. Soeparno 63 Purwokerto 53122

*Email: drizkipertiwi@gmail.com

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 28/08/2019
Disetujui : 30/10/2019

Abstract

Nepenthes gymnamphora is an endemic pitcher plant species in Java Island and one of the plant collections of Baturraden Botanical Garden. *N. gymnamphora* is a dioecious plant but its sex cannot be identified during its vegetative development. Conservating this plant would therefore run in a more efficient way when sex's type have already been identified earlier which tend to effective development of particular sexes. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique is one molecular approach that can be employed in early identification of *N. gymnamphora* sex. The aims of this study are to assess whether there is difference of RAPD patterns between male and female *N. gymnamphora* and to find out how the difference is. Explorative method was applied to this study involving five *N. gymnamphora* individuals of Baturraden Botanical Garden collection of different sexes as samples. Genomic DNAs were extracted from the second leaf of each of the five samples (two males, two females and one individual of unknown sex) and then used as templates to amplify RAPD markers. Five random primers were used in the amplification, i.e. OPK-16, OPP-15, OPA-15, OPP-08, and OPD-20. Two primers, i.e. OPP-08 (5'-ACATCGCCA-3') and OPD-20 (5'-ACTTCGCCAC-3'), produced RAPD bands of approximately 300 bp in males and sexually unknown individual. These bands did not appear in females, so that it can be presumably related to sex determination genes in *N. gymnamphora*. Primer OPP-08 also produced RAPD bands of approximately 250 bp in females individual. These bands did not appear in males, so it can be presumably related to sex determination genes in *N. gymnamphora*.

Keywords: *Nepenthes gymnamphora*, RAPD, sex

Abstrak

Nepenthes gymnamphora merupakan spesies kantong semar endemik di Pulau Jawa dan salah satu koleksi tumbuhan di Kebun Raya Baturraden. *N. gymnamphora* merupakan tumbuhan *dioecious* dan jenis kelaminnya tidak dapat dibedakan pada masa vegetatif. Apabila jenis kelamin tanaman tersebut dapat diketahui secara dini, maka upaya konservasi dapat dilakukan dengan lebih efisien karena pengembangan jenis kelamin tertentu dapat dilakukan secara dini. Salah satu pendekatan yang dapat dilakukan dalam identifikasi jenis kelamin *N. gymnamphora* adalah penggunaan marka *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pola RAPD antara *N. gymnamphora* jantan dan betina, serta mengetahui bagaimana perbedaan pola RAPD tersebut. Penelitian dilakukan secara eksploratif dengan melibatkan lima individu *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden dari jenis kelamin yang berbeda sebagai sampel. DNA genomik diekstraksi dari daun ke dua pada kelima sampel tersebut (dua jantan, dua betina, dan satu sampel yang belum diketahui jenis kelaminnya). Selanjutnya, DNA genomik ini digunakan sebagai templat untuk amplifikasi marka RAPD. Sebanyak lima macam primer acak digunakan untuk amplifikasi marka tersebut, yaitu OPK-16, OPP-15, OPA-15, OPP-08, dan OPD-20. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dua primer, yaitu OPP-08 (5'-ACATCGCCA-3') dan OPD-20 (5'-ACTTCGCCAC-3'), menghasilkan pita RAPD berukuran kurang lebih 300 pb, yang spesifik terdapat pada individu jantan dan individu yang belum diketahui jenis kelaminnya. Pada individu betina tidak dihasilkan pita tersebut sehingga dapat diduga bahwa pita RAPD tersebut berkaitan dengan gen-gen penentu jenis kelamin pada *N. gymnamphora*. Primer OPP-08 juga menghasilkan pita RAPD berukuran kurang lebih 250 pb, yang spesifik terdapat pada individu betina. Pita tersebut tidak terlihat pada individu jantan, sehingga dapat diduga pita tersebut terkait dengan gen-gen penentu jenis kelamin pada *N. gymnamphora*.

Kata kunci: *Nepenthes gymnamphora*, RAPD, jenis kelamin

PENDAHULUAN

Nepenthes gymnamphora merupakan salah satu spesies tumbuhan tropis yang hidup pada ketinggian lebih dari 900 meter di atas permukaan laut (mdpl). Habitatnya berada di hutan dataran tinggi yang miskin nutrisi (Cheek dan Jebb, 2001). *N. gymnamphora* digolongkan sebagai spesies yang dilindungi menurut Undang-Undang Nomor 5 Tahun 1990 tentang Konservasi Sumber Daya Hayati dan Ekosistemnya, Peraturan Pemerintah Nomor 7 Tahun 1999 tentang Pengawetan Jenis Tumbuhan dan Satwa, dan Peraturan Pemerintah Nomor 8 Tahun 1999 tentang Pemanfaatan Jenis Tumbuhan dan Satwa (Mansur, 2006). Oleh karena itu, diperlukan upaya konservasi, baik secara *in situ* maupun *ex situ* untuk mencegah spesies ini dari kepunahan.

Saat ini *N. gymnamphora* menjadi salah satu koleksi tumbuhan di Kebun Raya Baturraden (KRB) yang terletak di kawasan lereng selatan Gunung Slamet, Jawa Tengah, Indonesia. KRB merupakan salah satu kawasan konservasi *ex-situ* yang melindungi berbagai spesies tumbuhan khas pegunungan Jawa. Lokasi KRB berada di Desa Kemutug Lor, Kecamatan Baturraden, Kabupaten Banyumas dengan luas area mencapai 143,5 hektar. Seiring dengan berjalannya waktu, KRB terus berkembang untuk melindungi spesies-spesies tumbuhan yang terdapat di dalamnya (Mandiriati *et al.*, 2016).

Upaya perlindungan spesies secara *ex situ* antara lain dapat didukung dengan identifikasi jenis kelamin (Scharmman *et al.*, 2017). *N. gymnamphora* diketahui merupakan tumbuhan *dioecious* atau memiliki bunga jantan dan betina yang terpisah pada individu yang berbeda (Mansur, 2006). Sehingga pada fase vegetatif jenis kelamin ini tidak dapat ditentukan dengan metode identifikasi morfologi. Oleh karena itu, diperlukan upaya identifikasi jenis kelamin secara dini agar dapat terbentuk populasi dengan jenis kelamin tertentu secara efisien karena pengembangan jenis kelamin tertentu dapat dilakukan secara dini (Parjanto *et al.*, 2006).

Identifikasi jenis kelamin berdasarkan penanda nonmorfologi dapat dilakukan secara molekuler dengan menggunakan penanda atau marka (*marker*) tertentu. Salah satu marka tersebut dapat berupa *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Parjanto *et al.*, 2006). Keuntungan penggunaan marka RAPD adalah dapat menunjukkan polimorfisme DNA dengan probabilitas yang tinggi tanpa harus mengetahui sekuen DNA dari sampel (Zhou *et al.*, 2018). Selain itu, karakterisasi dengan marka ini juga hanya memerlukan kuantitas DNA yang sedikit (Bhau *et al.*, 2009).

Marka RAPD dapat mendeteksi polimorfisme ruas nukleotida pada DNA dengan menggunakan sebuah primer tunggal yang memiliki rangkaian nukleotida acak. Primer akan menempel pada beberapa tempat berbeda secara acak pada DNA

genomik. Masing-masing primer umumnya akan mengamplifikasi beberapa fragmen DNA yang ditempelinya (Williams *et al.*, 1990). Variasi pola pita yang terbentuk dapat dianalisis untuk menentukan pita spesifik yang menunjukkan suatu jenis kelamin (Zhou *et al.*, 2018).

Berdasarkan uraian tersebut di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut: 1) apakah terdapat perbedaan pola pita RAPD antara *N. gymnamphora* jantan dan betina, dan 2) bagaimana perbedaan pola pita RAPD antara *N. gymnamphora* jantan dan betina. Berdasarkan rumusan masalah tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui: 1) ada tidaknya perbedaan pola pita RAPD antara *N. gymnamphora* jantan dan betina, dan 2) bagaimana perbedaan pola pita RAPD antara *N. gymnamphora* jantan dan betina.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Molekuler Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman dari bulan Januari hingga Juni 2019. Penelitian terdiri atas tiga tahap, yaitu ekstraksi DNA genomik *N. gymnamphora*, uji kualitas dan kuantitas DNA genomik, dan amplifikasi marka RAPD. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) menurut Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi. Pengujian kualitas DNA genomik dilakukan dengan langkah elektroforesis gel agarosa 1,5% dalam larutan *buffer* TBE 1x. *Running* elektroforesis dilakukan selama 50 menit pada tegangan 80 V dan kuat arus 400 mA. Pengujian kuantitas DNA genomik dilakukan menggunakan *NanoDrop spectrophotometer*.

Amplifikasi marka RAPD dilakukan dengan teknik PCR. Reaksi PCR RAPD dilakukan menggunakan 12,25 µl volume larutan yang terdiri atas *nuclease free water* 5,25 µl, primer RAPD masing-masing 1 µl (10 pmol), *KAPA Taq PCR Kits* 5 µl, dan 1 µl DNA cetakan (50 ng/µl). PCR dilakukan menggunakan 5 macam primer yang sekuennya dapat dilihat pada Tabel 1. Pengaturan suhu kondisi PCR adalah i) pra-denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, ii) denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 30°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik yang dilakukan sebanyak 35 siklus, iii) ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR kemudian dimigrasikan pada elektroforesis gel agarosa 1,5% dalam larutan *buffer* TBE 1x. Fragmen DNA yang terbentuk kemudian didokumentasikan menggunakan paparan pada *UV transilluminator*.

Analisis data profil pita RAPD dilakukan secara deskriptif. Profil pita RAPD untuk masing-masing primer dianalisis secara terpisah pada masing-masing jenis kelamin. Pita yang hanya muncul pada salah satu jenis kelamin dapat digunakan sebagai penduga jenis kelamin.

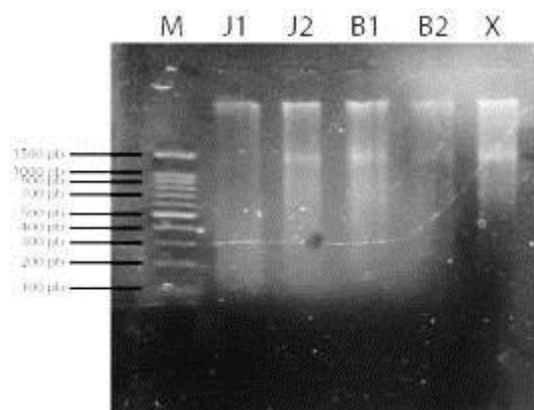
Tabel 1. Primer yang digunakan

	Sekuens (5'-3')	Keterangan
OPK-16	5'-GAGCGTCGAA-3'	Penanda <i>Nepenthes ampullaria</i> ♂
OPP-15	5'-GGAAGCCAAC-3'	Penanda <i>Nepenthes mirabilis</i> ♀
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'	Penanda <i>Nepenthes mirabilis</i> ♂
OPP-08	5'-ACATCGCCCA-3'	Penanda <i>Salacca zalacca</i> ♂
OPD-20	5'-ACTTCGCCAC-3'	Penanda <i>Hippophae rhamnoides</i> ♂

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA Genomik *N. gymnamphora*

Hasil ekstraksi DNA genomik secara kualitatif dapat dilihat pada Gambar 1. Secara kualitatif, semua DNA sampel memperlihatkan pita yang jelas meskipun ada sedikit *smear*. Menurut Murtiyaningsih (2017), *smear* pada hasil isolasi DNA dapat disebabkan oleh kontaminasi RNA yang memiliki ukuran lebih rendah daripada DaNA genom (kurang dari 250 pb).



Gambar 1. Elektroforegram DNA Genomik *N. gymnamphora* Koleksi Kebun Raya Baturraden (M = DNA ladder, J1 = *N. gymnamphora* ♂ 1, J2 = *N. gymnamphora* ♂ 2, B1 = *N. gymnamphora* ♀ 1, B2 = *N. gymnamphora* ♀ 2, X = *N. gymnamphora* belum diketahui jenis kelaminnya)

Pengukuran DNA genomik dilakukan menggunakan *NanoDrop spectrophotometer* untuk melihat kemurnian dan konsentrasinya. Hasil pengukuran kuantitas DNA genomik *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden dapat dilihat pada Tabel 2. Secara kuantitatif semua DNA sampel menunjukkan tingkat kemurnian DNA yang berkisar dari 1,897 hingga 2,034 pada rasio absorbansi 260 nm/ 280 nm dan 1,275 hingga 1,959 pada rasio absorbansi 260 nm/ 230 nm. Menurut Arruda *et al.* (2017), DNA genomik yang baik untuk digunakan sebagai DNA *template* PCR memiliki tingkat kemurnian dari kontaminasi protein

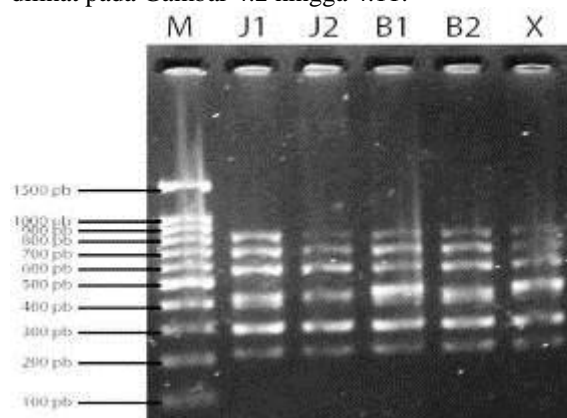
($\frac{A_{260}}{A_{280}}$) sebesar 1,8 hingga 2,0 dan kontaminasi karbohidrat ($\frac{A_{260}}{A_{230}}$) tidak lebih dari 2,0. Data pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa keseluruhan DNA genomik hasil ekstraksi masih berada dalam rentang murni walaupun tingkat kemurnian dari kontaminasi protein pada sampel B1 sedikit melebihi batas 2,0. Sementara itu, konsentrasi DNA genomik yang diperoleh berkisar dari 107 hingga 242 ng/ μ L. Menurut Dhatteval *et al.* (2017), konsentrasi DNA sebagai *template* PCR sebaiknya berkisar sekitar 50 hingga 60 ng/ μ L. Hal ini menandakan konsentrasi DNA yang diperoleh masih di atas konsentrasi yang dibutuhkan untuk PCR dan bisa dilakukan pengenceran sebelum digunakan sebagai *template*. Secara umum, berdasarkan data hasil uji kualitatif dan kuantitatif di atas, DNA genomik yang diperoleh dapat digunakan sebagai *template* PCR untuk mengamplifikasi marka RAPD.

Tabel 2. Hasil uji kuantitas DNA genomik *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden

Nama Sampel	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	$\frac{A_{260}}{A_{230}}$	Konsentrasi (ng/ μ L)
J1	1,954	1,275	107
J2	1,897	1,415	193
B1	2,034	1,959	238
B2	1,940	1,314	161
X	1,984	1,445	242

Amplifikasi Marka RAPD

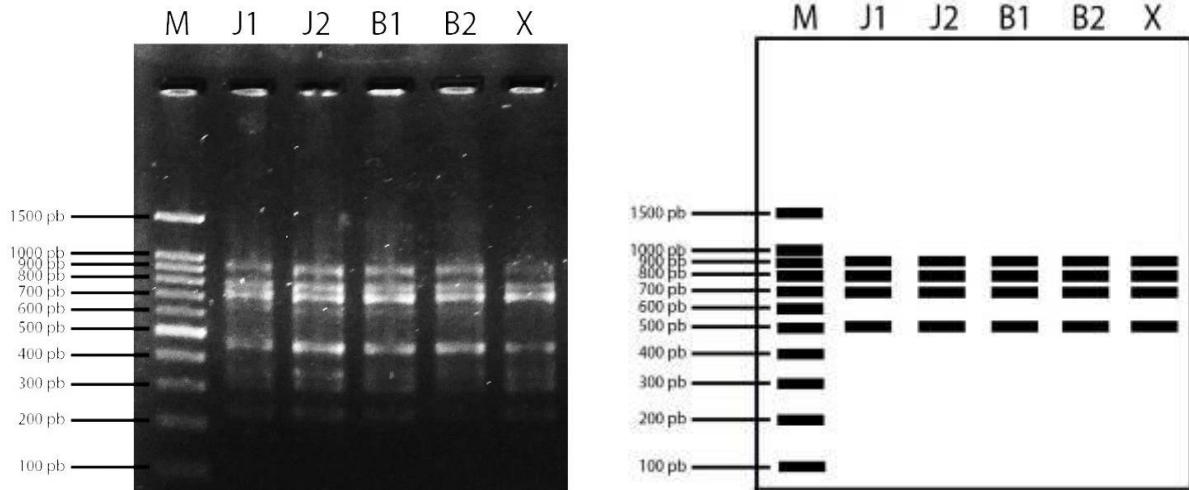
Kelima primer oligonukleotida yang digunakan berhasil memperbanyak marka RAPD pada *Nepenthes gymnamphora*. Hal ini menunjukkan bahwa kelima primer tersebut memiliki urutan basa nukleotida yang komplementer dengan kedua untai DNA genomik (Weaver, 2012). Elektroforegram hasil PCR RAPD beserta interpretasi hasilnya dapat dilihat pada Gambar 4.2 hingga 4.11.



Gambar 2. Elektroforegram PCR RAPD *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden menggunakan primer OPK-16 (M = DNA ladder, J1 = *N. gymnamphora* ♂ 1, J2 = *N. gymnamphora* ♂ 2, B1 = *N. gymnamphora* ♀ 1, B2 = *N. gymnamphora* ♀ 2, X = *N. gymnamphora* belum diketahui jenis kelaminnya)

Amplifikasi marka RAPD pada DNA genomik *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden dengan primer OPK-16 menghasilkan 30 pita DNA dengan 6 pola (Gambar 2). Seluruh pita tersebut bersifat monomorfik dengan ukuran sekitar 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 700 pb, dan 800 pb. Primer ini tidak berhasil mendapatkan pita spesifik yang dapat membedakan individu jantan dengan betina.

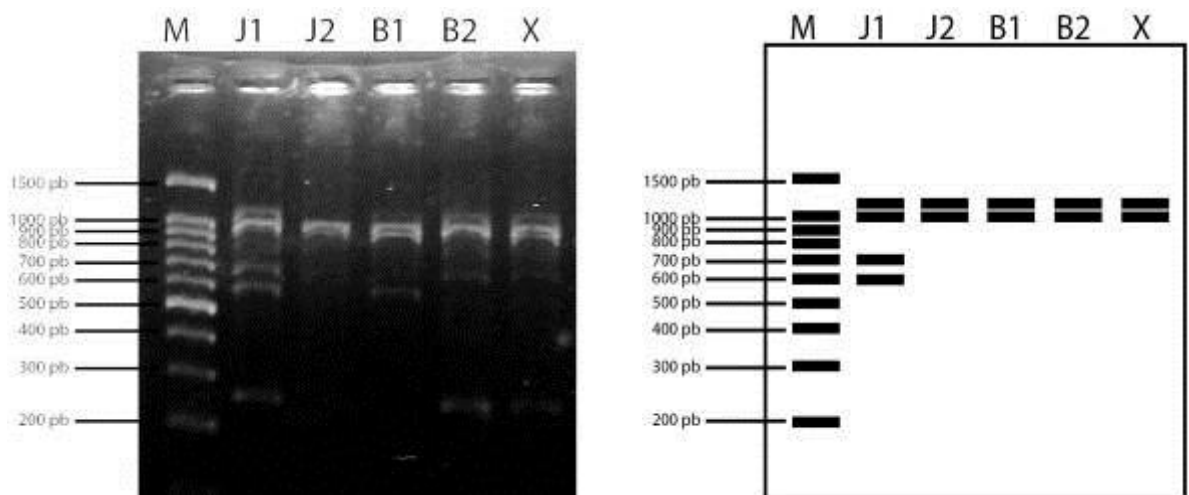
Hasil ini berbeda dengan penelitian Enjelina (2011) yang dapat mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 400 pb, 500 pb, dan 850 pb yang spesifik pada *N. ampullaria* jantan menggunakan primer OPK-16. Primer ini juga dapat mengamplifikasi fragmen DNA spesifik pada *N. adriani* betina dengan ukuran 290 pb (Aziiza, 2018).



Gambar 3. Elektroforegram dan interpretasi hasil PCR RAPD *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden menggunakan primer OPP-15 (M = DNA ladder, J1 = *N. gymnamphora* ♂ 1, J2 = *N. gymnamphora* ♂ 2, B1 = *N. gymnamphora* ♀ 1, B2 = *N. gymnamphora* ♀ 2, X = *N. gymnamphora* belum diketahui jenis kelaminnya)

Amplifikasi marka RAPD pada DNA genomik *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden dengan primer OPP-15 menghasilkan 20 pita DNA dengan 4 pola (Gambar 3). Pola pita tersebut terdiri atas ukuran sekitar 500 pb, 700 pb, 800 pb, dan 900 pb. Seluruh pita tersebut bersifat monomorfik. Primer ini tidak berhasil mendapatkan pita spesifik

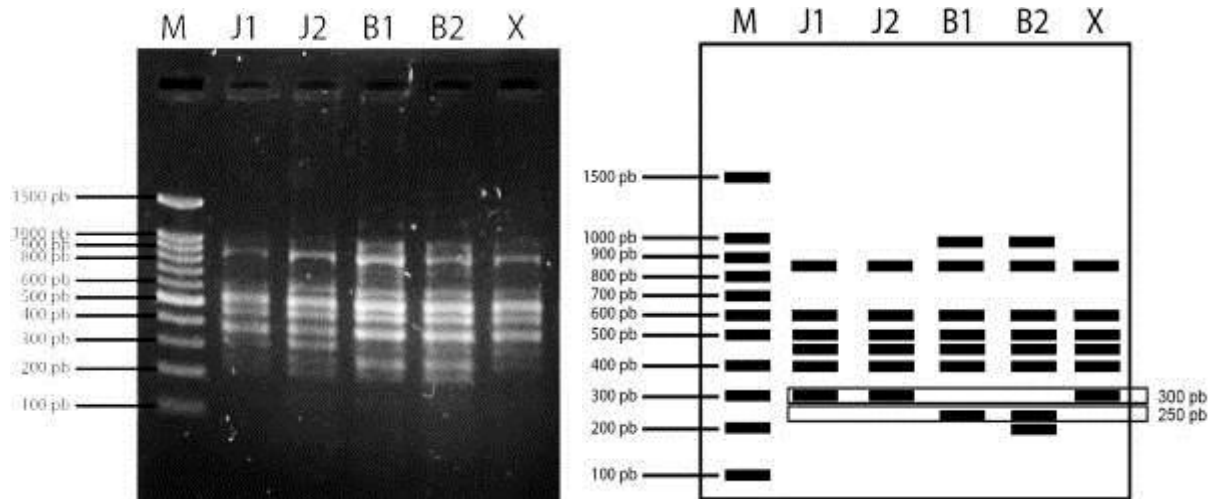
yang dapat membedakan individu jantan dengan betina. Hasil ini berbeda dengan penelitian Enjelina (2011) yang dapat mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 650 pb yang spesifik pada *N. mirabilis* betina menggunakan primer OPP-15.



Gambar 4. Elektroforegram dan interpretasi hasil PCR RAPD *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden menggunakan primer OPA-15 (M = DNA ladder, J1 = *N. gymnamphora* ♂ 1, J2 = *N. gymnamphora* ♂ 2, B1 = *N. gymnamphora* ♀ 1, B2 = *N. gymnamphora* ♀ 2, X = *N. gymnamphora* belum diketahui jenis kelaminnya)

Primer OPA-15 berhasil mengamplifikasi marka RAPD pada DNA genomik *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden sebanyak 12 pita DNA dengan 4 pola (Gambar 4). Pola pita ini terdiri atas ukuran sekitar 600 pb, 700 pb, 1.000 pb, dan lebih dari 1.000 pb. Terdapat dua kelompok pita, yaitu pita monomorfik dan pita polimorfik. Pita monomorfik berukuran sekitar 1.000 pb dan lebih

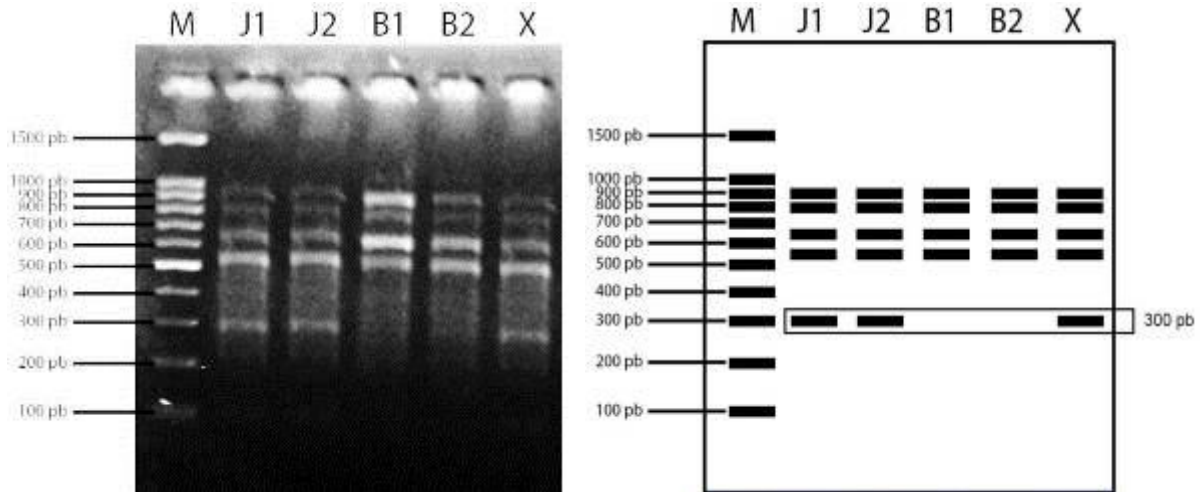
dari 1.000 pb. Pita polimorfik hasil amplifikasi dengan primer OPA-15 juga tidak berhasil membedakan individu jantan dengan betina. Hasil ini berbeda dengan penelitian Mokkaumul *et al.* (2007) yang berhasil memperoleh fragmen DNA spesifik berukuran 750 pb pada *N. gracilis* dan *N. mirabilis* jantan menggunakan primer OPA-15.



Gambar 5. Elektroforegram dan interpretasi hasil PCR RAPD *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden menggunakan primer OPP-08 (M = DNA ladder, J1 = *N. gymnamphora* ♂ 1, J2 = *N. gymnamphora* ♂ 2, B1 = *N. gymnamphora* ♀ 1, B2 = *N. gymnamphora* ♀ 2, X = *N. gymnamphora* belum diketahui jenis kelaminnya)

Amplifikasi marka RAPD menggunakan primer OPP-08 menghasilkan 33 pita DNA dengan 9 pola (Gambar 5). Ukuran pita-pita tersebut bervariasi, mulai dari sekitar 200 pb, 250 pb, 300 pb, 400 pb, lebih dari 400 pb, 500 pb, 600 pb, lebih dari 800 pb hingga 1.000 pb. Kedua gambar di atas menunjukkan bahwa primer OPP-08 menghasilkan pita DNA spesifik berukuran kurang lebih 300 pb pada fragmen DNA individu-individu jantan. Pita ini tidak terlihat pada individu-individu betina. Sementara itu, pita berukuran sekitar 300 pb tersebut juga dijumpai pada individu yang belum diketahui jenis kelaminnya. Namun, terdapat pula pita berukuran kurang lebih 250 pb pada individu betina, yang tidak muncul baik pada individu jantan maupun pada individu yang belum diketahui jenis kelaminnya.

Berdasarkan hasil amplifikasi pita 300 pb menggunakan primer OPP-08 dapat diperkirakan bahwa pita tersebut berkaitan dengan gen-gen penentu jenis kelamin jantan pada *N. gymnamphora*. Selain itu, munculnya pita 300 pb pada sampel individu yang belum diketahui jenis kelaminnya mengindikasikan bahwa individu ini cenderung berjenis kelamin jantan. Dugaan bahwa individu ini cenderung berjenis kelamin jantan didukung oleh ketidakhadiran pita 250 pb yang hanya dijumpai pada individu betina. Pita 250 pb ini dapat diduga berkaitan dengan gen-gen penentu jenis kelamin betina pada *N. gymnamphora*. Menurut Parjanto *et al.* (2006), primer OPP-08 dilaporkan telah berhasil mengamplifikasi pita DNA spesifik jenis kelamin jantan pada *Salacca zalacca* dengan ukuran sekitar 400 pb.



Gambar 6. Elektroforegram dan interpretasi hasil PCR RAPD *N. gymnamphora* koleksi Kebun Raya Baturraden menggunakan primer OPD-20 (M = DNA ladder, J1 = *N. gymnamphora* ♂ 1, J2 = *N. gymnamphora* ♂ 2, B1 = *N. gymnamphora* ♀ 1, B2 = *N. gymnamphora* ♀ 2, X = *N. gymnamphora* belum diketahui jenis kelaminnya)

Marka RAPD berhasil diamplifikasi dengan primer OPD-20 yang terdiri atas 23 pita DNA dengan 5 pola (Gambar 6). Ukuran pita-pita tersebut bervariasi, mulai dari sekitar 300 pb, lebih dari 500 pb, lebih dari 600 pb, 800 pb, dan 900 pb. Kedua gambar di atas menunjukkan bahwa primer OPD-20 menghasilkan pita DNA spesifik berukuran kurang lebih 300 pb pada individu-individu jantan, yang tidak terlihat pada individu-individu betina. Seperti halnya pada primer OPP-08, pita spesifik jantan ini teramplifikasi juga oleh primer OPD-20 pada individu yang belum diketahui jenis kelaminnya.

Berdasarkan hasil tersebut dapat diperkirakan bahwa pita DNA spesifik berukuran kurang lebih 300 pb tersebut berkaitan dengan gen-gen penentu jenis kelamin jantan pada *N. gymnamphora*. Oleh karena pita DNA spesifik ini terdapat pula pada individu yang belum diketahui jenis kelaminnya, maka individu ini diduga memiliki jenis kelamin jantan. Primer OPD-20 diketahui telah berhasil mengamplifikasi pita DNA spesifik jenis kelamin jantan pada *Hippophae rhamnoides* dengan ukuran sekitar 911 pb (Sharma *et al.*, 2010) dan pita DNA spesifik jenis kelamin betina pada *Encephalartos natalensis* dengan ukuran sekitar 850 pb (Prakash dan van Staden, 2006).

Primer OPP-08 merupakan primer yang paling banyak mengamplifikasi marka RAPD *N. gymnamphora*, yaitu sebanyak sembilan pita. Sementara itu, primer OPP-15 dan OPK-16 mengamplifikasi marka RAPD *N. gymnamphora* dengan jumlah yang sama, masing-masing sebanyak empat pita. Secara keseluruhan, ukuran pita yang teramplifikasi dari sampel *N. gymnamphora* berkisar dari 200 pb hingga lebih dari 1000 pb. Mayangsari *et al.* (2017) melaporkan bahwa ukuran pita RAPD pada berbagai spesies *Nepenthes* koleksi Kebun Raya Baturraden berkisar dari 130 pb hingga 1.500 pb. Perbedaan pola pita yang teramplifikasi

disebabkan oleh perbedaan situs penempelan primer (Gusmiaty *et al.*, 2012). Pola pita RAPD yang dihasilkan juga dapat disebabkan oleh ukuran primer yang pendek (sekitar 10 pb) sehingga situs penempelannya dapat sangat bervariasi (Korpelainen *et al.*, 2008).

Penggunaan Marka RAPD sebagai Pembeda Jenis Kelamin

Pita RAPD berukuran 300 pb hasil amplifikasi dengan primer OPP-08 dan OPD-20 dapat digunakan sebagai pembeda jenis kelamin pada *N. gymnamphora*. Demikian pula, pita ini dapat digunakan untuk menduga jenis kelamin *N. gymnamphora* yang belum diketahui. Parjanto *et al.* (2006) mengatakan bahwa penggunaan marka RAPD sebagai pembeda jenis kelamin *N. gymnamphora* dapat dilakukan pada individu yang belum memasuki masa reproduktif. Menurut Avise (1994), karakter molekuler yang terdapat di dalam marka molekuler memiliki keistimewaan, yaitu marka tidak terpengaruh oleh faktor lingkungan dan tahap pertumbuhan sehingga dapat menggambarkan struktur genetik yang terdapat di dalam satu spesies. Walaupun mekanisme penentuan jenis kelamin pada *Nepenthes* belum diketahui secara pasti, belum terdapat laporan tentang ada tidaknya perubahan jenis kelamin *Nepenthes* seiring dengan waktu, baik di alam maupun pada kondisi dibudidayakan (Clarke, 2001). Hal ini menunjukkan bahwa penentuan jenis kelamin sejak tahap awal perkembangan cenderung stabil hingga tahap reproduktif (Scharmann *et al.*, 2017).

Jenis kelamin suatu tumbuhan *dioecious* secara umum dapat ditentukan oleh kromosom seks atau ekspresi gen-gen terkait dengan jenis kelamin yang terdapat pada autosom (Durrand *et al.*, 1990). Marka yang terkait dengan jenis kelamin tidak hanya dapat membedakan jenis kelamin pada tumbuhan

dioecious, tetapi juga dapat memberikan gambaran mengenai struktur genom dan homologi struktur genom antara individu jantan dan betina (Grewal dan Goyat, 2015). Oleh karena itu, penggunaan marka RAPD dapat memberikan pandangan yang lebih luas mengenai mekanisme penentuan jenis kelamin pada tumbuhan *dioecious*.

Penggunaan marka RAPD sebagai pembeda jenis kelamin merupakan salah satu langkah yang mudah, murah, dan cepat untuk dianalisis. Amplifikasi marka RAPD hanya membutuhkan sampel DNA dalam jumlah sedikit sehingga memungkinkan untuk dilakukannya pencarian marka RAPD dengan primer yang banyak (Bhau *et al.*, 2009). Hasil amplifikasi marka RAPD spesifik dapat dianalisis lebih lanjut dengan penggunaan marka *Sequence Characterized Amplified Region* (SCAR) (Busconi *et al.*, 2006). Tujuan penggunaan marka SCAR adalah untuk memvalidasi keberadaan marka RAPD spesifik terkait jenis kelamin (Maki, 2009). Marka RAPD yang terkait dengan jenis kelamin diambil lalu dimurnikan. Setelah itu, hasil pemurnian tersebut diligasikan ke dalam plasmid. Plasmid ini selanjutnya ditanam di sel kompeten untuk dikloning. Hasil kloning kemudian disekuensing dan urutan basa yang diperoleh digunakan untuk merancang primer SCAR. Jika primer SCAR ini berhasil mengamplifikasi marka spesifik yang didapatkan sebelumnya (dengan ukuran yang sama), maka marka spesifik ini menjadi valid (Bhagyawant, 2016). Penggunaan marka SCAR ini telah diterapkan pada beberapa spesies *Nepenthes*, yaitu *N. ampullaria*, *N. gracilis*, dan *N. kampoiana* (Anuniwat *et al.*, 2009).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan tersebut di atas dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan pola pita RAPD antara *Nepenthes gymnamphora* jantan dan betina, khususnya jika diamplifikasi menggunakan primer OPP-08 dan OPD-20. Primer OPP-08 dan OPD-20 menghasilkan pita DNA spesifik jantan berukuran kurang lebih 300 pb. Sementara itu, primer OPP-08 juga dapat menghasilkan pita DNA spesifik betina berukuran kurang lebih 250 pb.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada skema Riset Terapan Unggulan Universitas Jenderal tahun anggaran 2018 Soedirman sebagai penyanggah dana atas penelitian ini.

DAFTAR REFERENSI

Anuniwat, A., Chaveerach, A., Tanee, T., & Sudmoon, R. 2009. Development of SCAR Markers for Species Identification of the Genus *Nepenthes* (Nepenthaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(22), pp. 1455-1461.

- Arruda, S.R., Pereira, D.G., Silva-Castro, S.S., Brito, M.G., & Waldschmidt, A.M. 2017. An Optimized Protocol for DNA Extraction in Plants with A High Content of Secondary Metabolites, Based on Leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae). *Genetics and Molecular Research*, 16(3), pp. 1-9.
- Avise, J.C., 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman and Hall.
- Aziiza, Z. 2018. Verifikasi Genetik Jenis Kelamin *Nepenthes adrianae* Koleksi Kebun Raya Baturraden. *Skripsi*. Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Bhagyawant, S.S. 2016. RAPD-SCAR Markers: An Interface Tool for Authentication of Traits. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4, pp. 1-9.
- Bhau, B.S., Medhi, K., Sarkar, T., & Saikia, S.P. 2009. PCR Based Molecular Characterization of *Nepenthes khasiana* Hook. f.—Pitcher Plant. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, pp. 1183-1193.
- Busconi, M., Sebastiani, L., & Corrado, F. 2006. Development of SCAR Markers for Characterization in Olive Tree (*Olea europaea* L.). *Molecular Breeding*, 17, pp. 59-68.
- Cheek, M., & Jebb, M. 2001. *Nepenthaceae*. Flora Malesiana, Series 1-Seed Plants, Vol. 15. Foundation Flora Malesiana.
- Clarke, C.M. 2001. *Nepenthes of Sumatra and Peninsular Malaysia*. Kinabalu: Natural History Publications.
- Dhatterwal, P., Mehrotra, S., & Mehrotra R. 2017. Optimization of PCR Conditions for Amplifying an AT-Rich Amino Acid Transporter Promoter Sequence with High Number of Tandem Repeats from *Arabidopsis thaliana*. *BMC Research Notes*, 10(1), pp. 1-4.
- Doyle, J.J., & Doyle, J.L. 1990. A Rapid Total DNA Preparation Procedure for Fresh Plant Tissue. *Focus*, 12: 13–15.
- Durrand, R., Durrand, B., Jacobs, M. 1990. Sexual Determination & Sexual Differentiation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9(4), pp. 295-316.
- Enjelina, W. 2011. Analisis Hibrid Alam Kantong Semar di Bukit Taratak Kabupaten Pesisir Selatan. FMIPA Universitas Andalas.
- Grewal, A., Goyat, S. 2015. Marker Assisted Sex Differentiation in Dioecious Plants. *Journal of Pharmacy Research*, 9(8), pp. 531-549.
- Gusmiaty, Restu, M., Asrianny, Larekeng, S.H. 2012. Seleksi Primer untuk Analisis Keragaman Genetik Jenis Bitti (*Vitex coffassus*). *Jurnal Perennial*, 8(1), pp. 25-29.
- Korpelainen, H., Bisang, I., Hedenäs, L., Kolehmainen, J. 2008. The First Sex-Specific

- Molecular Marker Discovered in the Moss *Pseudocalliergon trifarium*. *Journal of Heredity*, 99(6), pp. 581-587.
- Maki, M. 2009. Development of SCAR Markers for Sex Determination in the Dioecious Shrub *Aucuba japonica* (Cornaceae). *Genome*, 52, pp. 231-237.
- Mandiriati, H., Marsono, D., Poedjirahajoe, E., Sadono, R. 2016. Konservasi Keanekaragaman Jenis Tumbuhan Jawa di Kebun Raya Baturraden di Kawasan Bekas Hutan Produksi Terbatas. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 14(1), pp. 33-38.
- Mansur, M. 2006. *Nepenthes Kantong Semar yang Unik*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Mayangsari, R., Susanto, A.H., Yuniaty, A. 2017. Profil RAPD Tanaman Kantung Semar Beberapa Koleksi Kebun Raya Baturraden. *Biosfera*, 34(2), pp. 89-97.
- Mokkamul, P., Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T. 2007. Species Identification and Sex Determination of the Genus *Nepenthes* (Nepenthaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(4), pp. 561-567.
- Murtiyaningsih, H. 2017. Isolasi DNA Genom dan Identifikasi Kekerbatan Genetik Nanas Menggunakan RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*). *Agritop*, 15(1), pp. 1-15.
- Parjanto, Moeljopawiro, S., Artama, W.T., Purwantoro, A. 2006. Identifikasi Penanda RAPD untuk Penentuan Jenis Kelamin Tanaman Salak (*Salacca zalacca* GART. VOSS.). *Berkala Ilmiah Biologi*, 5(1), pp. 57-63.
- Prakash, S., van Staden, J. 2006. Sex Identification in *Encephalartos natalensis* (Dyer and Verdoorn) using RAPD Markers. *Euphytica*, 152, pp. 197-200.
- Scharmann, M., Grafe, T.U., Metali, F., Widmer, A. 2017. Sex-determination and Sex Chromosomes are Shared Across the Radiation of Dioecious *Nepenthes* pitcher plants. *bioRxiv*.
- Sharma, A., Zinta, G., Rana, S., Shirko, P. 2010. Molecular Identification of Sex in *Hippophae rhamnoides* L. using Isozyme and RAPD Markers. *Forestry Studies in China*, 12(2), pp. 62-66.
- Weaver, R. 2012. *Molecular Biology*. New York: McGraw Hill.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18, pp. 6531-6535.
- Zhou, W., Wang, Y., Zhang, G., Luan, G., Chen, S., Meng, J., Wang, H., Hu, N., Suo, Y. 2018. Molecular Sex Identification in Dioecious *Hippophae rhamnoides* L. via RAPD and SCAR Markers. *Molecules*, 23(5), pp. 1-9.