

## **RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)**

*Diah Kusumawaty, M.Si*

*MK: Praktikum Biologi Molekul*

*Program Studi Biologi Jurusan Pendidikan Biologi UPI*

Terdapat tiga jenis penanda genetik dalam menganalisis genom, yaitu penanda morfologi, penanda protein dan penanda DNA. Untuk menjadi penanda genetik, lokus dari penanda harus lokus yang secara eksperimen dapat mendeteksi variasi diantara individu di dalam pengujian populasi. Perbedaan jenis penanda bisa mengidentifikasi polimorfisme yang berbeda juga (Liu, 1998).

Penanda morfologi yang selama ini digunakan merupakan penanda yang berdasarkan pada hereditas Mendel yang sederhana, seperti bentuk, warna, ukuran dan berat. Karakter morfologi (fenotip) bisa digunakan sebagai indikator yang signifikan untuk gen yang spesifik dan penanda gen dalam kromosom karena sifat-sifat yang mempengaruhi morfologi dapat diturunkan. Dalam jumlah besar penanda morfologi dipelajari dan dipetakan untuk manusia, mencit, *Drosophila*, jagung tomat serta hewan dan tumbuhan lainnya (Liu, 1998).

Protein merupakan alternatif yang dapat digunakan sebagai penanda genetik karena protein merupakan produk dari ekspresi gen. Perbedaan alel pada gen akan menghasilkan produk yang berbeda dalam hal komposisi asam amino, ukuran dan modifikasinya. Salah satu protein yang populer sebagai penanda genetik adalah isozym. Enzim ini digunakan menjadi penanda genetik karena selalu berbeda dalam mobilitas elektroforesis tetapi memiliki aktivitas enzim yang sama (Liu, 1998).

Sejak ditemukan penanda DNA, penanda ini menjadi populer digunakan dalam mempelajari filogenetik molekuler. Penanda DNA adalah sebagian kecil DNA yang dapat menunjukkan polimorfisme diantara individu yang berbeda. Ada dua macam pendekatan yang dilakukan pada analisis penanda DNA ini, diantaranya pendekatan dengan hibridisasi dan PCR. Larik DNA bisa dideteksi menggunakan hibridisasi asam nukleat, larik DNA yang digunakan harus berasal dari lokus yang sama hasil isolasi dan pemurnian. Larik DNA yang sama lokus berasal dari spesies yang sama atau spesies yang lain tapi berkaitan. Hal ini menjadi dasar untuk penanda RFLP (*Restriction Fragment Length polymorphism*). Pendekatan melalui PCR merupakan teknik mengamplifikasi segmen target, dua primer didesain menggunakan segmen yang dibutuhkan setelah disekuensing. Mikrosatelit, STSs (*Sequence tagged sites*), ESTs (*Expressed sequence tags*) dan lain-lain biasa digunakan sebagai penanda genetik dengan PCR. Pemilihan primer yang belum diketahui sebelumnya bisa digunakan secara acak pada penanda genetik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Penanda RAPD adalah suatu teknik yang dikembangkan dan merupakan modifikasi dari teknologi PCR ("Polymerase Chain Reaction") untuk mengamplifikasi genom dengan menggunakan "arbitrary primer" atau primer acak (Welsh & Mc Cleland, 1990; Williams *et al*, 1990 dalam Kelly.1995). Perbedaan urutan DNA di antara individu-individu pada daerah pengikatan primer oligonukleotida menyebabkan terjadinya perbedaan-perbedaan (polimorfisme) pada pola larik yang dihasilkan dari proses amplifikasi. Hal ini merupakan gambaran adanya keanekaragaman genetik (Rafalski *et al.*, 1994). Williams *et al* (1990, dalam Kelly, 1995) adalah peneliti yang pertama kali menemukan polimorfisme DNA dengan menggunakan metode "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD).

Teknik RAPD sangat cepat, menghasilkan lokus polimorfik yang banyak, tidak memerlukan pengetahuan tentang urutan DNA serta otomatisasi mudah dan cepat, alelnya bersifat dominan, sehingga metode ini tidak dapat menunjukkan heterozigositas suatu individu (Weissing *et al.*, 1995; Liu, 1998; Glaubitz & Morgan, 1999). Metode RAPD telah berhasil digunakan untuk melihat kekerabatan genetik pada tanaman dan ikan, di antaranya

pada tanaman *Lycopersicon lycopersicum* (Kusumawaty, 1996), ikan *Oryzias latipes* (Wada *et al.*, 1995), ikan eel (*Anguilla sp*) (Qiu & Li, 1999), dan ikan *Silurus asotus* (Man Yoon & Woong Kim, 2001). Penanda RAPD juga mampu mendeteksi gen ketahanan utama terhadap penyakit tumbuhan (Kelly.1995)

Tabel.1 Contoh Urutan Primer RAPD Kit OPA1-OPA5

Kode	5'-----3'
OPA1	CAGGCCCTTC
OPA2	TGCCGAGCTG
OPA3	AGTCAGCCAC
OPA4	AATCGGGCTG
OPA5	AGGGGTCTTG

### Cara Kerja

Setiap tabung PCR berisi 12,5 µl larutan reaksi PCR. Komponen reaksi PCR seperti yang terdapat pada tabel 2. Pembuatan komponen reaksi PCR tersebut dilakukan secara hati-hati dan cepat di dalam wadah berisi es untuk menjaga keefektifan kerja beberapa zat yang digunakan seperti dNTPs dan enzim *Taq* polimerase yang mudah rusak.

Selanjutnya, tabung yang sudah berisi komponen reaksi dimasukkan ke dalam alat DNA *Thermal Cycler* yang telah dinyalakan sebelumnya selama 30 menit. Karena alat sudah diprogram sebelumnya, maka alat dapat langsung digunakan. Alat *Thermal Cycler* melakukan proses amplifikasi pada suhu 94°C untuk denaturasi awal selama 2 menit terhadap DNA ikan gurame, kemudian dilanjutkan dengan 45 siklus yang diawali dengan denaturasi pula pada 94°C selama 1 menit, *annealing* (penempelan primer) dilakukan pada suhu 34°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan polimerisasi pada suhu 72°C selama 2 menit. Rangkaian proses dari denaturasi sampai polimerisasi disebut dengan satu siklus. Pada siklus yang terakhir dilakukan inkubasi pada suhu 72°C selama 5 menit

Tabel .2 Komposisi reaksi PCR RAPD

Larutan stok	Konsentrasi akhir	Volume/ ½ reaksi (µl)
DNA		1 µl
Buffer PCR 10 x	Buffer PCR 1x	12,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 mM	1 µl
5U/µl <i>Taq</i> DNA polimerase	1 U	0,1µl
100 mM dNTP	200 µM (untuk masing-masing dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,1 µl
32 ng/µl primer	32 µl	1 µl
Air deion		Hingga volume total 12,5 µl

Hasil amplifikasi selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa 1.5 % pada tegangan 50 Volt selama 1-2 jam. Dokumentasikan hasil elektroforesis dengan menggunakan kamera Polaroid atau digital. Pita-pita yang dihasilkan selanjutnya diinterpretasikan dengan angka 1/0. Angka "0" mewakili ketidakhadiran pita, sedangkan angka "1" mewakili kehadiran pita. Selanjutnya dilakukan perhitungan koefisien kesamaan untuk menguji pasangan objek.

Secara matematis rumus koefisien kesamaan Nei & Li adalah:

$$S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

Keterangan:

$S_{xy}$  = koefisien kesamaan genetik

$N_{xy}$  = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu x dan individu y

$N_x$  = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu x

$N_y$  = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu y

Dari hasil perhitungan kedua koefisien tersebut, dendogram dikonstruksi dengan metode kluster "Unweighted Pair-Group-Method With Arithmetic Averages" (UPGMA).