

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Suatu Metode Analisis DNA Dalam Menjelaskan Berbagai Fenomena Biologi.

(Random Amplified Polymorphic DNA Analysis Method and Biological Phenomena)

Evita ANGGEREINI¹⁾

¹⁾ Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan P MIPA, FKIP Universitas Jambi Jl. Raya Jambi-Ma. Bulian Km. 15, Mendalo Darat, JAMBI 36124

ABSTRACT. Kemajuan ilmu pengetahuan biologi saat ini mulai merambah ke bidang molekuler. Bidang molekuler sering menjadi acuan untuk menjawab permasalahan-permasalahan biologi yang selama ini tidak bisa dijawab dengan cara analisis pengamatan biasa. Apalagi tingkat keakuratan dengan merujuk ke molekuler sangat tinggi dibandingkan dengan cara yang konvensional. Analisis molekuler dalam hal ini adalah analisis kepada DNA organisme tersebut. Banyak metode yang dapat dilakukan jika kita ingin menganalisis DNA. Salah satu metode analisis DNA adalah Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). RAPD mengidentifikasi polimorfis DNA dari organisme yang diteliti. DNA organisme tersebut diamplifikasi dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Suatu organisme dapat berbeda pada tingkat DNA dalam hal perbedaan urutan nukleotida.

Keyword: DNA, polymerase chain reaction, random amplified plomorphic,

ABSTRAK. Kemajuan ilmu pengetahuan biologi saat ini mulai merambah ke bidang molekuler. Bidang molekuler sering menjadi acuan untuk menjawab permasalahan-permasalahan biologi yang selama ini tidak bisa dijawab dengan cara analisis pengamatan biasa. Apalagi tingkat keakuratan dengan merujuk ke molekuler sangat tinggi dibandingkan dengan cara yang konvensional. Analisis molekuler dalam hal ini adalah analisis kepada DNA organisme tersebut. Banyak metode yang dapat dilakukan jika kita ingin menganalisis DNA. Salah satu metode analisis DNA adalah Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). RAPD mengidentifikasi polimorfis DNA dari organisme yang diteliti. DNA organisme tersebut diamplifikasi dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Suatu organisme dapat berbeda pada tingkat DNA dalam hal perbedaan urutan nukleotida.

Kata kunci: DNA, polymerase chain reaction, random amplified plomorphic

PENDAHULUAN

Penggunaan Random Amplified Polymorphic DNA adalah teknik analisis DNA yang menjadi sangat populer akhir-akhir ini. Pendekatan metoda ini berkenan dengan analisis buta DNA. Hal ini berdasarkan kenyataan bahwa metoda ini tepat digunakan pada tingkat DNA. Disamping itu pekerjaan ini dapat dilakukan dapat dilakukan dengan pengetahuan yang sedikit tentang urutan DNA tertentu atau gen dari organisme yang diteliti. Khusus untuk genetik serangga, hal ini merupakan perkembangan yang menggembirakan karena metoda ini dapat memulai dilakukannya analisis genetik pada spesies baru tanpa menunggu dana yang besar, waktu yang lama dan usaha yang lama. Metoda RAPD itu sendiri melibatkan penggunaan teknik polimerisasi DNA (*Polymerase Chain Reaction*, PCR).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR adalah suatu metode *in vitro* untuk menghasilkan sejumlah besar fragmen DNA spesifik dengan panjang dan sekuens yang telah ditentukan dari sejumlah kecil

template kompleks. PCR merupakan suatu teknik sangat kuat dan sensitive yang dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti biologi molekuler, diagnostic, genetika populasi dan analisis forensik

PCR didasarkan pada amplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang komplementer dengan ujung 5' dari kedua rantai sekuens target. Oligonukleotida ini digunakan sebagai primer (primer PCR) untuk memungkinkan DNA template dikopi oleh DNA polymerase. Untuk mendukung terjadinya annealing primer ini pada template pertama kali diperlukan pemisahan untai DNA yang double stranded melalui pemanasan. Suhu reaksi selanjutnya diturunkan untuk membiarkan terjadinya perpasangan sekuens dan akhirnya reaksi polimerisasi dilakukan oleh DNA polymerase untuk membentuk DNA komplementer. Proses ini dikenal dengan siklus PCR. Oleh karena produk terpolimerisasi baru tersebut berasal dari setiap primer dapat berperan sebagai template untuk primer lain, maka setiap siklus dapat melipat gandakan jumlah fragmen DNA yang dihasilkan pada siklus sebelumnya. Pengulangan siklus denaturasi, annealing primer pada sekuens komplementernya

dan pengembangan primer yang teranealing tersebut dengan polymerase DNA mengakibatkan amplifikasi segmen DNA. Hasil dari PCR ini adalah akumulasi eksponensial fragmen target spesifik lebih dari berjuta kali lipat dalam beberapa jam. Teknik ini juga mampu memperbanyak molekul target tunggal dalam suatu campuran RNA dan DNA kompleks. (Nasir, 2002).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Metoda RAPD merupakan metoda baru untuk mengidentifikasi sejumlah besar polimorfisme DNA pada genom dengan cepat dan efisien. Tipe polimorfisme ini membuat RAPD cocok untuk studi keanekaragaman genetik, hubungan kekerabatan, peta genetik, sidik jari DNA. Sidik jari DNA banyak digunakan untuk kasus paternitas dan forensik.

Metoda RAPD menggunakan oligonukleotida pendek (biasanya 10 bp) sebagai primer yang akan berikatan dengan bagian (sites) komplemennya. Metoda RAPD digunakan untuk mendeteksi polimorfisme DNA yang digunakan sebagai *genetik marker* dan menentukan hubungan kekerabatan pada bermacam-macam tanaman dan serangga hama.

RAPD diistilahkan oleh William dkk (1990) untuk Random Amplified Polymorphic untuk menghasilkan berjuta-juta kopi segmen DNA tertentu. Metoda ini mengandalkan menggunakan primer tunggal (oligo nukleotida sintetik) untuk mulai PCR. Istilah random agak kurang tepat, hanya komponen random dimulainya pilihan primer untuk PCR, karena primer tunggal memilih secara random daerah-daerah genom urutan DNA tertentu untuk amplifikasi dan biasanya ditemukan dalam kisaran ukuran DNA 0,1 dan 3 kb

Mekanisme kerja RAPD

William et all (1990) dalam Vierling dan Nguyen berhasil melakukan amplifikasi segmen DNA dengan menggunakan primer tunggal dekanukleotida berisi basa GC sebanyak 50% atau lebih dengan urutan basa yang terdistribusi acak. Penemuan ini dikenal sebagai penanda RAPD. Primer yang berukuran pendek menempel pada daerah penempelan primer yang tersebar acak pada daerah di sepanjang DNA genom. Polimorfisme di daerah tersebut menghasilkan perbedaan amplifikasi. Welsh dan Mc Clelland (1990) menyatakan bahwa larik DNA yang dihasilkan dapat digunakan sebagai penanda molekul karena pola yang dihasilkan memiliki karakteristik tertentu.

Pekerjaan RAPD melibatkan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR). Pilihan awal primer merupakan variable utama untuk menentukan apa dan berapa banyak variasi genetik yang diidentifikasi. Amplifikasi DNA

dengan PCR menghasilkan banyak kopi segmen DNA. Pekerjaan ini menggunakan primer sintetik yang ukurannya pendek (oligonukleotida) adalah urutan-urutan nukleotida yang dikenali oleh primer yang selanjutnya ini disebut lokus RAPD. Produk amplifikasi yang dihasilkan dapat dipisahkan menurut ukurannya secara elektroforesis pada gel agarosa dan divisualisasi melalui pewarnaan dengan etidium bromide. Primer tunggal ini akan menginisiasi proses amplifikasi daerah-daerah DNA genom tertentu secara random.

Kunci RAPD bahwa primer yang digunakan dengan urutan acak, primer tidak spesifik untuk gen tertentu atau dengan urutan tertentu dan mengikat DNA komplemennya dari bermacam-macam specimen DNA. Primer yang digunakan tunggal dan *menganealing* tempat pelekatan primer (*priming site*) dengan arah yang berlawanan untuk terjadinya amplifikasi.

Primer menentukan daerah genom mana yang akan diamplifikasi melalui PCR. Walaupun factor lain pada metoda ini termasuk waktu denaturasi, waktu extension dapat mempengaruhi banyak hasil, Urutan primer yang digunakan dalam analisis ini panjangnya dapat bervariasi, kadang dipakai sebagai standar universal. Primer 10 mer paling sering digunakan.

Tergantung pada daerah pelekatan primer yang komplemen yang dicampuri pada genom individu tersebut dan panjangnya urutan DNA yang diintervensi, primer mengamplifikasi 0 sampai 30 produk amplifikasi. Beratus-ratus primer RAPD tersedia secara komersial dari Teknologi Operon Inc. Alameda dan beberapa primer digunakan secara bebas. Banyak penanda polimorfisme bisa diidentifikasi. Spesies yang berbeda dapat menunjukkan tingkat polimorfisme yang berbeda, sebanding dengan variasi lokus RAPD dan jumlah lokus yang diamplifikasi.

PCR adalah suatu tehnik amplifikasi fragmen DNA secara in vitro, atau disebut juga dengan reaksi rantai polymerase. Sebenar PCR hampir sama dengan replikasi DNA secara in vivo yang bersifat semi konservatif.

Aplikasi RAPD dalam menjelaskan fenomena Biologi

Pengidentifikasian polimorfisme DNA digunakan sebagai penanda genetik untuk membedakan populasi tersebut dan menentukan hubungan kekerabatan pada bermacam-macam tanaman dan spesies serangga. Penanda genetik digunakan untuk menentukan variabilitas genetik diantara spesies-spesies yang diselidiki. Metoda RAPD PCR merupakan suatu pendekatan untuk menganalisis polimorfisme DNA dan menganalisis variasi genom dari populasi spesies serangga ataupun spesies-spesies organisme lain.

Khusus pada serangga telah dilakukan beberapa penelitian sehubungan dengan metode RAPD.. Metode ini dapat menentukan variabilitas genetik populasi lalat buah dari lokasi geografi yang berbeda. Penggunaan primer yang berbeda dalam metode RAPD ini memungkinkan dapat mendeteksi perbedaan-perbedaan tiap populasi.

Pada kasus invansi suatu serangga hama yang menyerang suatu daerah (seperti serangan lalat buah Mediteranian). Lalat ini merupakan hama yang sangat merusak tanaman pertanian lebih dari 200 macam komoditi penting tanaman pertanian. Spesies ini menyebar luas keseluruh bagian dunia dalam 100 tahun terakhir. Lalat ini mengancam daerah sensitive pertanian dan mentebakkan kerusakan . Gangguan ini menyebabkan kerugian apat mencegah atau paling sedikit membatasi kerusakan yang diakibatkan oleh hama ini.

Melalui penelitian ini dapat dideteksi nantinya hubungan genetik antara populasi yang ada dengan populasi yang baru. Sumber asal datangnya hama dapat diketahui dengan segera sehingga program pengendalian hama lebih ditekankan pada daerah sumber asal serangan hama. Sebab jika tidak dikendalikan langsung pada sumbernya, maka serangan hama akan selalu berulang-ulang untuk merusak tanaman pertanian. Hal ini dikarenakan penanganan hama adalah pada daerah-daerah sebaran serangga hama bukan pada sumber datangnya serangga hama tersebut.

Dengan menggunakan metoda PCR (Polymerase Chain Reaction) dan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) dapat diidentifikasi polimorfisme DNA yang nantinya digunakan sebagai penanda genetik untuk mengenal ciri khas populasi lalat buah Mediteranian, *Ceratitis capitata*. (Haymer , 1993). Pada penelitian ini penanda genetik yang diperoleh dari RAPD ini, digunakan untuk menentukan variasi genetik dari lalat buah yang telah dikumpulkan dari lokasi geografi yang berbeda. Sehingga dapat diketahui apa ciri khas variasi genetik dari sample organisme kita dari lokasi tertentu.

Hal ini juga sangat efektif pada serangga hama yang jarak migrasinya sangat jauh seperti pada belalang (*Locusta migratoria*). Jadi dapat diketahui variasi genetik setiap populasi, antara populasi yang berhubungan dari hama tersebut. Dengan adanya penanda genetik tersebut dapat diketahui sumber asal populasi.

Resistensi atau tidaknya serangga Lepidoptera terhadap *Bacillus thuringiensis* dapat diketahui dengan menggunakan penanda genetik RAPD ini. (Heckel , 1995). Metode ini juga dapat mengidentifikasi bermacam-macam pathogen seperti bakteri, Protozoa, Nematoda, serangga dan nyamuk. Metode ini cepat, mudah dan hanya membutuhkan sedikit material DNA.

Disamping itu tidak membutuhkan informasi urutan nukleotida dari DNA genom yang diselidiki. unakan untuk membedakan suatu spesies serangga yang tidak bisa dibedakan secara morfologi. Analisis RAPD juga dapat mendeteksi keberadaan parasitoid pada Aphid 6 hari awal post infeksi.(Mills, 1994).

Metode ini juga dapat menghasilkan profil diagnosa lima spesies *Aedes* , tentunya fragmen DNA yang spesifik untuk spesies. Metoda RAPD yang berdasarkan PCR digunakan untuk membedakan spesies nyamuk dan populasi nyamuk. dapat mengidentifikasi secara cepat epidemic vector malaria. Analisis RAPD sangat efektif untuk membedakan dua spesies nyamuk dapat berguna untuk memonitor dan menentukan keanekaragaman genetik dari suatu benih. Produk RAPD juga berguna untuk pengelompokan genotip yang asalnya tidak diketahui.

Analisis RAPD secara cepat dan efektif dapat mengidentifikasi penanda genetik untuk membedakan spesies-spesies yang berhubungan erat. .RAPD digunakan sebagai alat untuk pembuatan peta genetik, identifikasi suatu strain, spesies, populasi dan sistematis bermacam-macam organisme. Penanda RAPD dapat membedakan populasi laboratorium yang secara morfologi tidak bisa dibedakan. .Metode RAPD merupakan metode yang penting untuk menyelidiki fenomena genetik pada organisme yang tersebar luas pada berbagai macam organisme termasuk bakteri, tanaman tingkat tinggi, Vertebrata dan Invertebrata termasuk nyamuk dan serangga lainnya.Metode ini mengidentifikasi sejumlah besar polimorfisme genetik pada beberapa serangga

Banyak aplikasi analisis RAPD sangat membantu memecahkan masalah taksonomi dan biologi populasi organisme. RAPD digunakan untuk :

1. Pendeteksian polimorfisme pada parasitoid
2. Pola pewarisan dengan marker RAPD
3. Pemeriksaan asal populasi
4. Pemetaan genom local dan global suatu spesies
5. Asal geografi serangga hama
6. Diagnosis spesies yang saling berhubungan
7. Menentukan berapa banyak spesies yang dikumpulkan di suatu daerah
8. Membantu mengenal karakter morfologi untuk membedakan bermacam-macam spesies.
9. Membantu menetapkan suatu spesies
10. Mengidentifikasi etahui keanekaragaman genetik suatu organisme

11. Konstruksi peta genetic suatu organisme

Metoda RAPD dapat diaplikasikan pada berbagai bidang ilmu. Salah satu contohnya pada bidang ekologi molekuler, termasuk menentukan identitas taksonomi. Beberapa polimorfisme dalam penelitian populasi dapat digunakan untuk membuat peta pautan pada organisme yang sama

PENUTUP

Banyak yang dapat dilakukan dengan metoda RAPD dalam memecahkan masalah-masalah biologi. Penggunaan metoda ini dapat menjadi suatu alternatif untuk mencari jawaban yang paling tepat dan akurat dari permasalahan yang ada. Mengingat banyak manfaat RAPD maka metoda ini dapat dikembangkan untuk dipakai pada penelitian-penelitian biologi dengan merujuk kepada polimorfisme DNA dari organisme yang diselidiki.

DAFTAR PUSTAKA

- Campbell. 2002. *Biologi*. edisi kelima, jilid 1 (terjemahan). Penerbit Erlangga. Jakarta
- Heckel D. T. 1995. Randomly Amplified Polymorphic DNA Differences Between Strains of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) Susceptible or Resistant to *Bacillus thuringiensis*. *Journal Annal of the Entomological Society of America*. 88 (4): 20 - 34
- S Haymer David. 1993, Resolution of Population of the Mediteranean Fruit Fly at the DNA Level Using Random Primers for Polymerase Chain Reaction. *Journal Genom* 37 (1) : 994
- Nasir. 2002. *Bioteknologi Molekuler, Teknik Rekayasa Genetik Tanaman*. PT Citra Aditya Bakti. Bandung