

Analisis Keragaman Genetik Tumbuhan Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dengan Marker RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Shinda Salsabila Khalifatunnisa^{1*}, Imam Safir Alwan Nurza², Rinda Mulmeyda¹

¹Universitas Negeri Jakarta, Indonesia

²Institut Pertanian Bogor, Indonesia

ABSTRACT

Pineapple plants (*Ananas comosus* (L.) Merr.) are shrubs from the Bromeliaceae family. These plants are known to have many similarities both in morphology and anatomy. However, genetically there are many differences. The many genetic differences make pineapple plants a source of genetic diversity. Sources of genetic diversity can be obtained from the population in an area. Genetic diversity can be identified based on markers. One marker of genetic diversity that can be used is RAPD. RAPD markers amplify DNA polymorphism randomly and can be observed based on polymorphic bands. So, this research aimed to analyze and identify the genetic diversity of pineapple plants with the RAPD marker. The method used was PCR DNA with three primers, namely OPA 4, 9, and 13. After PCR amplification of DNA, the three primers were scored with a matrix of 0 and 1. The matrix values were 0 (no band) and 1 (band). Matrix values were analyzed with the NTSYS-pc program using the Similarity for Quantitative Data (SIMQUAL) procedure. The results showed that many polymorphic bands were formed with primers OPA-4 and 13 rather than OPA-9. Because OPA-9 forms a monomorphic band which indicates that there is no genetic diversity. Because genetic diversity can be obtained in polymorphic bands.

ABSTRAK

Tumbuhan Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) adalah tumbuhan semak dari famili Bromeliaceae. Tumbuhan ini diketahui memiliki banyak kesamaan baik secara morfologi maupun anatomi. Tetapi, secara genetik memiliki banyak perbedaan. Perbedaan genetik yang banyak menjadikan tumbuhan nanas sebagai sumber keragaman genetik. Sumber keragaman genetik dapat diperoleh dari populasi pada suatu wilayah. Keragaman genetik dapat diidentifikasi berdasarkan marker atau penanda. Salah satu marker keragaman genetik yang dapat digunakan adalah RAPD. Marker RAPD mengamplifikasi DNA polimorfisme secara acak dan dapat diamati berdasarkan pita polimorfik. Sehingga, tujuan penelitian ini dilakukan untuk menganalisis dan mengidentifikasi keragaman genetik tumbuhan nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dengan marker RAPD. Metode yang digunakan adalah PCR DNA dengan tiga primer, yaitu OPA 4, 9, dan 13. Ketiga primer setelah amplifikasi PCR DNA dilakukan skoring matriks 0 dan 1. Nilai matriks 0 (tidak ada pita) dan 1 (ada pita). Nilai matriks dianalisis dengan program NTSYS-pc menggunakan prosedur *Similarity for Quantitative Data* (SIMQUAL). Hasil penelitian menunjukkan terbentuk banyak pita polimorfik dengan primer OPA-4 dan 13 daripada OPA-9. Karena OPA-9 terbentuk pita monomorfik yang mengindikasikan bahwa tidak ada keragaman genetik. Karena keragaman genetik dapat diperoleh pada pita polimorfik.

KONTAK

salsabilashinda21@gmail.com

KATA KUNCI

Keragaman Genetik, Nanas,
RAPD

PENDAHULUAN

Keanekaragaman genetik merupakan variasi materi genetik (DNA) dalam suatu spesies. Hasil dari perubahan urutan DNA yang terjadi selama replikasi sel atau pindah silang. Perubahan tersebut dapat memberikan manfaat bagi individu dan dapat diwariskan kepada keturunannya. Sehingga, memungkinkan populasi tersebut berevolusi dan beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang baru. Keanekaragaman genetik yang tinggi dikaitkan dengan peningkatan ketahanan dan kemampuan beradaptasi. Karena memberikan lebih banyak sifat yang dapat berguna di lingkungan yang berbeda. Keanekaragaman genetik penting bagi kelangsungan hidup spesies, karena memungkinkan populasi beradaptasi terhadap perubahan lingkungan dan mempertahankan populasi dengan varietas gen berbeda yang tahan terhadap stres abiotik dan biotik (Larson *et al.*, 2014; Gilman dan Wright, 2013; Peterson *et al.*, 2014).

Keanekaragaman genetik juga dapat disebabkan oleh faktor mutasi, kawin acak, variasi geografi, penyimpangan genetik, ukuran populasi, migrasi, heterozigositas, epigenetik, dan kondisi lingkungan. Mutasi terjadi ketika kesalahan saat penyalinan DNA yang menyebabkan perubahan kode genetik. Mutasi dapat menciptakan alel baru yang merupakan versi gen yang berbeda dan berkontribusi terhadap keanekaragaman genetik dari waktu ke waktu (Barton, 2010).

Kawin acak dapat menghasilkan keanekaragaman genetik karena terjadi pindah silang ketika pencampuran antara gamet jantan dan betina. Hasil keturunannya akan memiliki rekombinan dari kedua tetua genotipe (Lenormand dan Duthiel, 2005). Variasi geografi karena hambatan wilayah memiliki perbedaan genetik antar populasi baik pada spesies yang sama maupun berbeda. Setiap sifat yang dihasilkan bermacam-macam tergantung adaptasi lingkungan (Filho *et al.*, 2020). Penyimpangan genetik merupakan fluktuasi acak frekuensi alel antar generasi dalam suatu populasi, terlepas dari tekanan selektif. Hal ini dapat menyebabkan perubahan frekuensi alel dalam suatu populasi (Ellegren dan Galtier, 2016). Besar kecilnya suatu ukuran populasi dapat mempengaruhi keanekaragaman genetik. Populasi yang lebih kecil mungkin memiliki keanekaragaman genetik yang lebih sedikit karena adanya pergeseran genetik, sedangkan populasi yang lebih besar mungkin memiliki keanekaragaman genetik yang lebih banyak karena jumlah alel dan kombinasi yang lebih banyak (Stapley *et al.*, 2017).

Migrasi dapat mempengaruhi keanekaragaman genetik karena membawa genetik baru dari satu populasi ke populasi lainnya, seperti polen dari tumbuhan yang dibawa oleh angin atau serangga (Nazareno *et al.*, 2021). Heterozigositas dapat meningkatkan keanekaragaman genetik. Karena terdapat probabilitas kedua lokus yang saling berinteraksi secara acak terjadi kiasma. Kiasma yang merupakan hasil dari pindah silang berisi kumpulan gen memiliki keadaan alel yang berbeda (Ziolkowski *et al.*, 2015). Epigenetik diketahui juga dapat memunculkan keanekaragaman genetik karena DNA metilasi atau modifikasi histon yang dapat mempengaruhi ekspresi gen (Metere dan Graves, 2020).

Polimorfisme merupakan varian yang terbentuk dua atau lebih dari rangkaian DNA tertentu, seperti polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) yang dapat terjadi di antara individu atau populasi yang berbeda. Variasi ini dapat berupa nukleotida tunggal atau satu urutan DNA yang panjang. Polimorfisme bersifat umum dan terkait dengan keanekaragaman hayati, variasi genetik, dan adaptasi. Dapat diwariskan dan dimodifikasi melalui seleksi alam (Liu 2018; Pang *et al.*, 2016). Sedangkan monomorfisme mengacu pada terbentuknya hanya satu morf dalam suatu populasi. Hanya ada satu bentuk dari rangkaian DNA tertentu dan tidak ada variasi lain (Holla *et al.*, 2014).

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) adalah teknik molekuler yang digunakan dalam genetika untuk mengidentifikasi perbedaan genetik antara individu atau spesies. Ini melibatkan amplifikasi segmen acak DNA genom menggunakan primer tunggal dari urutan nukleotida yang berubah-ubah (Amiteye, 2021). Tujuan RAPD untuk analisis keanekaragaman genetik, identifikasi spesies, dan pemetaan genetik (Slameto, 2023; Dhakshanamoorthy *et al.*, 2015). Teknik ini didasarkan pada prinsip bahwa mutasi pada DNA target pada lokasi yang melengkapi primer akan mencegah primer mengikat dan memperkuat segmen DNA tertentu. Sehingga, menghasilkan pola segmen DNA yang diperkuat pada gel yang dapat digunakan untuk analisis genetik (Niklas dan Olszewska, 2021; Sun *et al.*, 2012).

METODOLOGI

Penelitian ini menggunakan metode PCR dengan marker RAPD untuk mengamati keragaman genetiknya. Penelitian ini dilakukan dengan menyiapkan alat berupa *tube*, mikropipet, elektroforesis dan cetakan, *spindown*, *vortex*, *centrifuge*, *microwave*, dan UV transiluminator. Bahan berupa 10 sampel DNA tanaman nanas (100 ng/ μ l) dengan label spesies, yaitu A, B, C, D, E, F, G, H, I, dan J. Master *mix*, larutan ddH₂O, primer OPA (OPA-04, OPA-09, dan OPA-13) (Table 1), *buffer* TAE 1X, agarosa, *loading dye* 6X, DNA 1 kb 3 μ l, dan EtBr 5 mg/ml.

Tabel 1. Sekuen primer OPA

Primer	Sekuen
OPA 4	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA 9	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA 13	5'-CAGCACCCAC-3'

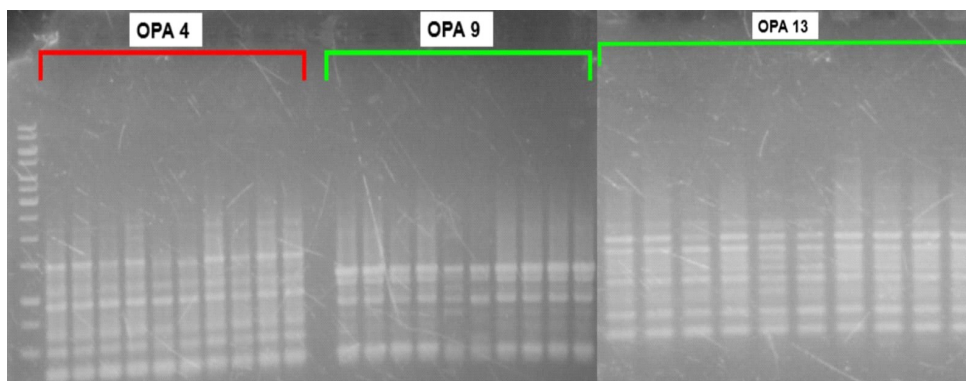
Reaksi PCR dibuat dengan campuran berisi sampel DNA tanaman nanas (100 ng/ μ l) 1 μ l, master *mix* (2) 5 μ l, primer OPA 0.5 μ l, dan ddH₂O 3.5 μ l. Sehingga, total menjadi 10 μ l. Kemudian, dilakukan *spindown-vortex-spindown* dan profil PCR sebanyak 40 siklus dengan pra-PCR 94°C selama 2 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit,

annealing 37°C selama 1 menit, *elongasi* 72°C selama 2.5 menit, pasca PCR 72°C selama 7 menit, dan *cooling* 25°C selama 10 menit.

Hasil PCR diambil sebanyak 10 µl dan dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1.5% dengan *buffer* TAE 1X. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 50 volt selama 80 menit. Kemudian, gel direndam pada EtBr selama 10-15 menit dan dibilas dengan air. Gel agarosa divisualisasi dan diamati dengan UV transiluminator. Setelah gel diamati, skoring dilakukan untuk mengetahui pita polimorfik dan monomorfik sebagai penanda adanya keragaman genetik atau tidak. Skoring dilakukan dengan matriks 0 dan 1. Nilai 0 menandakan tidak terdapat pita dan nilai 1 terdapat pita. Semua pita yang dihasilkan dihitung dan dibedakan menjadi pita polimorfik dan monomorfik. Kemudian, dianalisis indeks similaritasnya dengan koefisien kemiripan dari matriks simqual antara 10 sampel DNA tanaman nanas yang digunakan dengan program NTSYS-pc. Program dilakukan dengan menggunakan prosedur *Similarity for Quantitative Data* (SIMQUAL). Setelah itu, dendrogram dibuat untuk analisis kluster melalui hirarki terhadap polimorfisme fragmen DNA tanaman nanas yang menghasilkan gambaran kedudukan dan kekerabatan antar sampel. Dendrogram dibuat dengan menggunakan pengelompokan *Sequential Aglomerative Hieararchial and Nested Clustering* (SHAN). Koefisien similaritas dengan metode *Simple Matching* (SM) dan kluster dengan metode *Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average* (UPGMA) (Danong *et al.*, 2024).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil RAPD pada tanaman nanas berdasarkan primer OPA 4, 9, dan 13 menunjukkan terbentuk pita. Ini teramati setelah direndam dengan EtBr dan divisualisasi dengan UV transiluminator (Figure 1). Kemunculan pita dalam visualisasi elektroforesis menunjukkan keberhasilan dalam RAPD.



Gambar 1. Hasil elektroforesis RAPD primer OPA 4, 9, dan 13

Hasil skoring RAPD pada tanaman nanas menunjukkan primer OPA 4, 9, dan 13 banyak terbentuk pita polimorfik. Namun, pada OPA 9 juga terdapat pita monomorfik (Figure 2). Jumlah lokus atau pita pada OPA 4 memiliki sebanyak 34 lokus. Sedangkan OPA 9 dan 13 memiliki jumlah pita 7 dan 18. Banyak pita polimorfik yang terbentuk mengindikasikan bahwa tanaman nanas yang digunakan memiliki keanekaragaman genetik baik antar spesies maupun infraspecies. Tetapi, pita monomorfik yang muncul juga mengindikasikan bahwa terdapat spesies atau infraspecies yang sama dalam satu lokus (Table 2).

Skoring	OPA 4																																		OPA9							OPA13																								
Kelompok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59							
A	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0					
B	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0					
C	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0					
D	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0						
E	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0						
F	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0					
G	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0					
H	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0				
I	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0				
J	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0

Gambar 2. Tabel skoring RAPD tanaman nanas. Garis kuning: pita monomorfik, biru: tanaman nanas (A-J), dan hijau: primer OPA 4, 9, dan 13

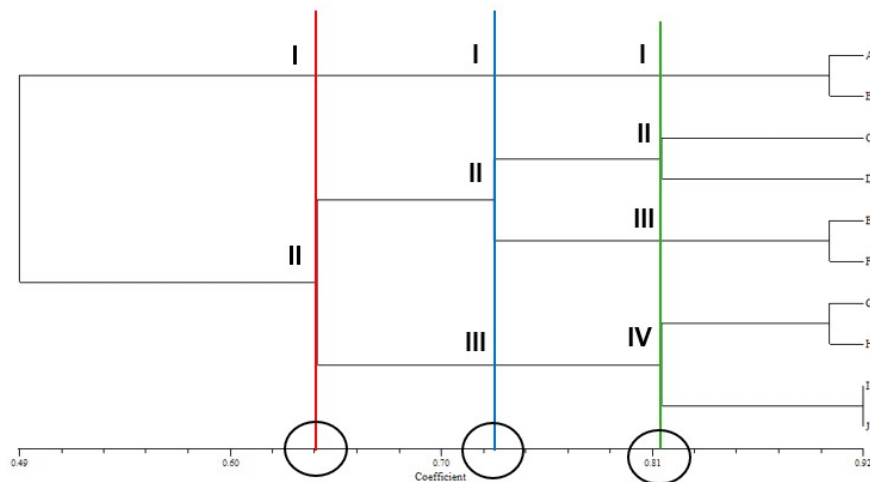
Primer	Jumlah Pita	Pita Polimorfik	Pita Monomorfik
OPA 4	34	34	0
OPA 9	7	5	2
OPA 13	18	18	0
Total	59	57	2

Hasil indeks similaritas keanekaragaman tanaman nanas dapat dikelompokkan kekerabatannya, yaitu sangat dekat, dekat, tidak dekat, dan sangat tidak dekat. Pengelompokan kekerabatan ditunjukkan dengan nilai indeks similaritas (IS). Hubungan kekerabatan yang sangat dekat ditunjukkan dengan nilai ≥ 0.75 . Hubungan kekerabatan dekat dengan nilai 0.51-0.74. Hubungan kekerabatan tidak dekat dengan nilai 0.26-0.50. Hubungan kekerabatan sangat tidak dekat dengan nilai ≤ 0.25 (Hasanudin dan Fitriana, 2014).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	1.0									
B	0.89	1.0								
C	0.54	0.61	1.0							
D	0.46	0.49	0.81	1.0						
E	0.44	0.44	0.66	0.81	1.0					
F	0.47	0.47	0.66	0.78	0.90	1.0				
G	0.47	0.47	0.59	0.64	0.69	0.73	1.0			
H	0.47	0.47	0.59	0.64	0.66	0.69	0.90	1.0		
I	0.46	0.46	0.54	0.59	0.61	0.64	0.78	0.88	1.0	
J	0.54	0.54	0.59	0.64	0.66	0.69	0.76	0.83	0.91	1.0

Keterangan: Tanaman nanas (A-J)

Indeks similaritas tanaman nanas pada spesies A memiliki hubungan kekerabatan sangat dekat dengan spesies B, dekat dengan spesies C, tidak dekat dengan spesies D, E, F, G, H, I, dan dekat dengan spesies J. Spesies B memiliki hubungan kekerabatan dekat dengan spesies C, tidak dekat dengan spesies D, E, F, G, H, I, dan berkerabat dekat dengan spesies J. Spesies C memiliki hubungan kekerabatan sangat dekat hanya dengan spesies D. Sedangkan dengan kelompok lainnya banyak memiliki hubungan yang dekat. Spesies D memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat dengan spesies E dan F. Tetapi, dekat dengan spesies G, H, I, dan J. Spesies E memiliki hubungan yang sangat dekat hanya dengan spesies F. Kekerabatan dengan spesies G, H, I, dan J banyak memiliki hubungan yang dekat. Spesies G memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat dengan spesies H, I, dan J. Hubungan kekerabatan yang sangat dekat juga terjadi pada spesies H dengan I dan J. Spesies I juga sangat dekat hubungan kekerabatannya dengan spesies J (Table 3).



Gambar 3. Dendrogram pada klaster tanaman nanas. Kelompok 1-10 (A-J)

Hasil dendrogram pada klaster dari data similaritas keanekaragaman tanaman nanas menunjukkan garis merah sebagai klaster 1 dan 2, garis biru sebagai klaster 1, 2, dan 3, garis hijau sebagai klaster 1, 2, 3, dan 4 (Figure 3). Spesies A dengan B memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat dalam klaster 1 dengan nilai koefisien 0.91. Dendrogram pada garis merah menunjukkan bahwa klaster 1 (A dan B) memiliki hubungan kekerabatan dengan klaster 2 (C, D, E, F, G, H, I, dan J). Hubungan kekerabatan klaster 1 dan 2 memiliki nilai koefisien similaritas sekitar 0.64. Nilai itu mengindikasikan terdapat hubungan kekerabatan yang dekat.

Dendrogram pada garis biru menunjukkan bahwa klaster 2 (C, D, E, dan F) memiliki hubungan *sister clade* dengan klaster 3 (G, H, I, dan J). Hubungan *sister clade* ini dapat mengindikasikan bahwa kemungkinan klaster 2 dan 3 merupakan kerabat dekat dalam antar kelompok. Klaster 2 (C, D, E, dan F) dan 3 (G, H, I, dan J) memiliki hubungan kekerabatan dengan klaster 1 (A dan B) dengan nilai koefisien similaritas sekitar 0.72. Nilai itu mengindikasikan hubungan kekerabatan yang dekat antara *sister clade* klaster 2 dan 3 dengan klaster 1. Dendrogram pada garis hijau menunjukkan hubungan kekerabatan yang sangat dekat dengan nilai koefisien 0.81. Dendrogram pada garis hijau juga menunjukkan ada hubungan *sister clade* antara klaster 2 (C dan D) dan 3 (E dan F) dalam kelompok yang sama. Sedangkan klaster 4 tidak membentuk *sister clade* dengan klaster 2 dan 3. Tetapi, dalam klaster 4 berupa spesies G dan H memiliki hubungan *sister clade* dengan spesies I dan J. Hubungan kekerabatan yang sangat dekat dalam klaster yang sama adalah G dan H dengan nilai koefisien 0.92. Ini mengindikasikan bahwa G dan H merupakan spesies yang sama. Klaster 1 (A dan B) dengan klaster 2, 3, dan 4 memiliki hubungan kekerabatan yang tidak dekat dalam antar klaster.

Polimorfisme dapat terjadi ketika dua atau lebih gen berbeda terdapat dalam populasi yang sama dari spesies yang sama. Variasi ini dapat disebabkan oleh faktor genetik, lingkungan, dan perkembangan. Polimorfisme dipertahankan dalam suatu populasi karena tidak ada satu bentuk pun yang memiliki kelebihan atau kekurangan secara keseluruhan dibandingkan bentuk lainnya dalam hal seleksi alam. Hal ini dapat disebabkan oleh faktor-faktor, seperti seleksi yang bergantung pada frekuensi, polimorfisme heterozigot, dan migrasi populasi. Polimorfisme dapat diwariskan dan dapat dimodifikasi melalui seleksi baik secara buatan maupun alami. Hal ini tidak berhubungan langsung dengan spesiasi, namun dapat menjadi bagian dari proses adaptasi terhadap lingkungan yang berbeda dalam suatu spesies (Sheftel *et al.*, 2018; Chung *et al.*, 2023; Brisson, 2018).

Polimorfisme juga dapat terjadi karena faktor heterosis dan frekuensi seleksi. Heterosis terbentuk dari heterozigot di lokus. Heterozigot memiliki diversitas gen yang lebih baik daripada homozigot karena keturunannya berupa rekombinan (Farinati *et al.*, 2023). Frekuensi seleksi bergantung pada fenotipe yang terbentuk dalam populasi seiring waktu dan perubahan gen atau rekombinan terhadap wilayah yang ditempati (Sakamoto dan Innan, 2020). Selain faktor heterosis dan frekuensi seleksi, terdapat juga polimorfisme nukleotida tunggal (SNPs), mutasi insersi dan delesi, modifikasi epigenetik, variasi laju mutasi, seleksi alam, dan penyimpangan genetik (Makova dan Hardison, 2015; Wang *et al.*, 2019). Selain polimorfisme, monomorfisme juga dapat terjadi karena faktor *founder effect*, *inbreeding*, reproduksi klonal, dan rekayasa genetik (Lan *et al.*, 2019; Jamieson, 2011; Loewe dan Hill, 2010).

Founder effect merupakan populasi kecil yang muncul sebagai populasi baru pada wilayah baru yang ditempati. Populasi ini hanya membawa fraksi diversitas genetik yang asli dari populasi asal. Seiring waktu jika mengalami pergeseran genetik akan mengurangi variasinya dan menghasilkan populasi secara genetik homogen (Jamieson,

2011). *Inbreeding* terjadi ketika ikatan perkawinan kedua tetua sangat dekat hubungannya dan meningkatkan homozigositas. Homozigositas dapat menurunkan diversitas genetik dalam populasi. Inbreeding yang berkelanjutan dapat mengarah ke penurunan diversitas genetik menjadi monomorfisme. Sehingga, populasi menjadi tinggi homozigotnya pada alel (Pekkala *et al.*, 2014). Reproduksi klonal menghasilkan monomorfisme genetik karena keturunan yang dihasilkan secara genetik identik dari tetuanya dan tidak ada variasi atau rekombinan (Barrett, 2015). Rekayasa genetika juga dapat menghasilkan monomorfisme karena dapat direkayasa melalui teknik modifikasi genetik untuk menghasilkan populasi dengan ciri genetik tertentu. Hal ini berguna dalam penelitian, bioteknologi, dan pertanian untuk menghasilkan fenotipe yang seragam atau diinginkan (Aziz *et al.*, 2022).

Primer OPA dalam RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) mengacu pada sekumpulan primer yang digunakan dalam teknik RAPD untuk memperkuat DNA. Dalam penelitian disebutkan, total digunakan 400 primer, dengan masing-masing primer berasal dari salah satu dari 20 seri primer (tidak termasuk seri OPT). Primer OPA dipilih berdasarkan kemampuannya menghasilkan pita polimorfik pada urutan genom target, yang sangat penting untuk keberhasilan teknik RAPD. Jumlah dan jarak antara situs primer dalam urutan genom target memainkan peran penting dalam menentukan efisiensi primer (Premkrishnan dan Arunachalam, 2012). Primer OPA digunakan untuk memperkuat DNA dari berbagai sampel, seperti Pisang Raja, lada Katokkon, dan organisme lainnya, untuk mempelajari keanekaragaman genetik dan hubungan antar sampel (Probojati *et al.*, 2019; Larekeng *et al.*, 2019).

Primer OPA memiliki beberapa keunggulan diantaranya, yaitu mudah digunakan, lebih murah, tinggi polimorfisme, fleksibel, dapat amplifikasi pada sekuen tidak diketahui, dapat konversi ke penanda SCAR, tinggi indeks penanda, tinggi PIC, tinggi EMR, dan tinggi hasil resolusi (Probojati *et al.*, 2019; Premkrishnan dan Arunachalam, 2012). Mudah digunakan karena tidak memerlukan sekuen target tertentu dan cocok untuk amplifikasi DNA dari berbagai spesies. Lebih murah karena marka RAPD relatif lebih murah daripada marka genetik lainnya. Tinggi polimorfisme karena dapat menghasilkan pita polimorfik dalam urutan genom target untuk mempelajari keanekaragaman genetik. Fleksibel karena tidak spesifik untuk agen reaksi. Penanda OPA dapat digunakan untuk amplifikasi urutan sekuen target yang tidak ketahu. Konversi ke penanda SCAR menjadi penanda wilayah teramplifikasi bercirikan SCAR atau berurutan. Primer OPA juga memiliki indeks penanda (MI) yang tinggi sebesar 41,02 dan PIC sebesar 0,5 yang menunjukkan efektivitas primer dalam menganalisis variasi genetik. Primer OPA memiliki EMR (effective multiplex ratio) sebesar 121 pada OPA 2 dan 17 untuk menentukan rasio efektif jumlah pita yang dihasilkan dengan jumlah pita polimorfik. Tinggi hasil resolusi pada primer OPA 1 dengan nilai 15,60 untuk dapat memperkirakan efektivitas primer dalam menghasilkan pita polimorfik juga (Probojati *et al.*, 2019; Premkrishnan dan Arunachalam, 2012).

Primer OPA juga memiliki kekurangan berupa kurang spesifitas, reproduktibilitas sensitif terhadap perubahan reaksi, estimasi genom, dan pengelompokan yang terbatas pada beberapa infraspecies menunjukkan kesamaan (Verma *et al.*, 2017). Selain primer OPA-04, OPA-09, dan OPA-13 juga ada primer lain yang dapat digunakan untuk RAPD berupa OPA-6, OPA-9, OPA-13, CRA-22, dan CRA-23 untuk studi *Jatropha* cucas (Winget dan Wommack, 2008). OPA 02, OPB 12, OPD 20, OPH 01, dan OPH 03 untuk studi pisang (Wiguna dan Pharmawati, 2021). A07, K10, AE10, Q07, B10, dan RAD1 untuk studi cabai (Niklas dan Olszewska, 2021).

Faktor keberhasilan RAPD dapat diperoleh jika kondisi PCR optimal. Karena keberhasilan analisis RAPD bergantung pada optimalisasi kondisi PCR, seperti suhu annealing, konsentrasi DNA, dan konsentrasi Taq DNA polimerase. Pemilihan primer yang sesuai dapat mempengaruhi amplifikasi fragmen dan tingkat pengamatan polimorfisme (Arunachalam 2012; Hull *et al.*, 2020). Diversitas genetik yang terdeteksi dari target populasi. Kualitas hasil dari elektroforesis yang digunakan dapat memisah dan memvisualisasi fragmen yang teramplifikasi. Efisiensi PCR juga dapat mempengaruhi keberhasilan analisis RAPD karena kualitas DNA template, tidak ada inhibitor, terdeteksi polimorfik (Rout dan Peter, 2022; Kaya dan Yilmaz-Gökdoğan, 2015). Selain faktor keberhasilan, juga terdapat faktor kegagalan karena reaksi PCR yang tidak optimal, kesalahan dalam pemilihan primer, kualitas sampel DNA yang terdegradasi, dan hasil polimorfik yang rendah (Zhou *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2015).

Metode RAPD dalam analisis hubungan kekerabatan untuk indeks similaritas digunakan program SIMQUAL. Karena program ini karena menghitung berbagai koefisien asosiasi untuk data kualitatif. Dapat untuk menganalisis hubungan antar objek atau individu berdasarkan karakteristik kualitatifnya. Koefisien ini, seperti koefisien pencocokan sederhana, Jaccard, dan phi. Biasanya digunakan dalam studi filogenetik dan evolusi untuk mengukur persamaan atau ketidaksetaraan antar organisme berdasarkan karakteristik genetik atau morfologinya. Program SIMQUAL menyediakan cara untuk mengukur dan memahami hubungan kekerabatan antar organisme dan untuk menyimpulkan hubungan evolusi (Rohlf, 2005, Hartati *et al.*, 2022). Analisis hubungan kekerabatan pada koefisien similaritas dengan SM untuk data kualitatif. SM berasosiasi dengan SIMQUAL untuk mengukur persamaan atau

ketidaksamaan antar organisme berdasarkan karakteristik kualitatifnya (Rohlf, 2005; Cvrček *et al.*, 2018). Selain program SIMQUAL untuk similaritas, pengklasteran juga dilakukan untuk mengelompokkan individu berdasarkan persamaan atau ketidaksamaan genetiknya. Pengklasteran dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai algoritma pengelompokan, seperti UPGMA atau metode pengelompokan hierarki yang membantu mengidentifikasi pola hubungan genetik antar individu atau populasi. Pengelompokan sangat berguna dalam mengidentifikasi kluster atau subpopulasi genetik dalam populasi yang lebih besar. Sehingga, dapat memudahkan untuk memahami hubungan evolusi, melacak penyakit genetik, atau mengelola sumber daya genetik (Wang *et al.*, 2023; Wahyudi *et al.*, 2021).

Metode pengklasteran yang digunakan dalam kegiatan praktikum berupa UPGMA dan dendrogram dengan metode SHAN. Metode UPGMA diketahui merupakan algoritma pengelompokan hierarki yang digunakan dalam studi filogenetik dan evolusi untuk membangun pohon evolusi atau dendrogram dari sekumpulan organisme berdasarkan karakteristik genetik atau morfologinya. Metode ini sangat berguna dalam menyimpulkan hubungan evolusi antar organisme dan merekonstruksi sejarah filogenetik (Borem dan Fritsche-Neto, 2014). Metode SHAN merupakan teknik pengklasteran yang digunakan untuk membuat dendrogram dari data kualitatif. Metode SHAN berguna dalam studi filogenetik dan evolusi untuk membangun pohon evolusi atau dendrogram dari sekumpulan organisme berdasarkan karakteristik genetik (Acharya *et al.*, 2014).

KESIMPULAN

Identifikasi keanekaragaman tanaman nanas dapat diamati melalui RAPD. Karena dapat mengindikasikan keanekaragaman genetik antar spesies. Keberhasilan RAPD dapat diamati melalui visualisasi elektroforesis dan terbentuk pita baik polimorfik maupun monomorfik. Kedua pita yang terbentuk dapat memudahkan identifikasi hubungan kekerabatan antar spesies atau infraspesies tanaman nanas.

REFERENSI

- Abdul Aziz M, Brini F. (2022). Rouached H, Masmoudi K. Genetically engineered crops for sustainably enhanced food production systems. *Front Plant Sci.* 13: 1027828. doi: 10.3389/fpls.2022.1027828.
- Acharyaa L, Arup KM, Pratap CP, Das P. (2014). Molecular characterization of five medicinally important species of *Typhonium* (Araceae) through Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Zeitschrift fur Naturforschung C.* 60 (7-8): 600-604. doi: 10.1515/znc-2005-7-815.
- Amiteye S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon.* 7 (10) :e08093. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08093.
- Arunachalam V. (2012). *Genomics of cultivated palms*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Barrett SC. (2015). Influences of clonality on plant sexual reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112 (29): 8859-8866. doi: 10.1073/pnas.1501712112.
- Barton NH. (2010). Mutation and the evolution of recombination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1544):1281-1294. doi: 10.1098/rstb.2009.0320.
- Borem A, Fritsche-Neto R. 2014. *Biotechnology and plant breedin applications and approaches for developing improved cultivars*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Brisson D. (2018). Negative frequency-dependent selection is frequently confounding. *Front Ecol Evol.* 6:10. doi: 10.3389/fevo.2018.00010.
- Chung MY, Merilä J, Li J, Mao K, López-Pujol J, Tsumura Y, Chung MG. (2023). Neutral and adaptive genetic diversity in plants: An overview. *Front Ecol Evol.* 11:1116814. doi: 10.3389/fevo.2023.1116814.
- Cvrček J, Petr V, Dupej J, Vostrý L, Brůžek J. (2018). Kinship and morphological similarity in the skeletal remains of individuals with known genealogical data (Bohemia, 19th to 20th centuries): A new methodological approach. *American Journal of Biological Anthropology.* 167(3):541-556. doi: 10.1002/ajpa.23683.
- Danong MT, Ruma MTL, Refli, Nono KM, Boro TL, Nina A. (2024). Hubungan kekerabatan fenetik varian ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) berdasarkan karakteristik morfologi di kecamatan mollo utara kabupaten timor tengah selatan. *Floribunda.* 7(4):166-181.
- Dhakshanamoorthy D, Selvaraj R, Chidambaram A. (2015). Utility of RAPD marker for genetic diversity analysis in gamma rays and ethyl methane sulphonate (EMS)-treated *Jatropha curcas* plants. *Comptes Rendus Biologies.* 338(2):75-82. doi: 10.1016/j.crv.2014.12.002.
- Ellegren H, Galtier N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics.* 17(7):422-433. doi: 0.1038/nrg.2016.58.
- Farinati S, Scariolo F, Palumbo F, Vannozzi A, Barcaccia G, Lucchin M. (2023). Heterosis in horticultural crop breeding: combining old theoretical bases with modern genomic views. *Front Hortic.* 2:1250875. doi: 10.3389/fhort.2023.1250875.

- Filho WL, Anabela MA, Luciana B, Amanda LA, Tony W. (2020). *Life on land*. Berlin, Germany: Springer Nature.
- Gillman LN, Wright SD. (2013). Patterns of evolutionary speed: in search of a causal mechanism. *Diversity*. 5(4):811-823. doi: 10.3390/d5040811.
- Hartati S, Samanhudi, Cahyono O. (2022). Morphological characterization of five species of dendrobium native to indonesia for parent selection. *BIODIVERSITAS*. 23(5):2648-2654. doi: 10.13057/biodiv/d230548.
- Hasanuddin, Fitriana. (2014). Hubungan kekerabatan fenetik 12 spesies anggota famili Asteraceae. *Jurnal Edubio Tropika*. 2(2):187-250.
- Holla KMS, Khan JA, Sowjanya MS, Shashidhar HE. (2014). Monomorphic molecular markers are as informative as polymorphic molecular markers. *Indian J Genet*. 74(4):596-601. doi: 10.5958/0975-6906.2014.00896.7.
- Hull R, Graham H, George TT. (2020). *Genetically modified plants assessing safety and managing risk*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Jamieson IG. (2011). Founder effects, inbreeding, and loss of genetic diversity in four avian rePENDAHULUAN programs. *Conserv Biol*. 25(1):115-123. doi: 10.1111/j.1523-1739.2010.01574.x.
- Kaya E, Yilmaz-Gökdoğan E. (2015). Molecular characterization of some turkish olive cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Natural and Applied Science*. 19(1):103-106. doi: 10.19113/sdufbed.22444.
- Lan H, Zhou T, Wan Q-H, Fang S-G. (2019). Genetic diversity and differentiation at structurally varying mhc haplotypes and microsatellites in bottlenecked populations of endangered Crested Ibis. *Cells*. 8(4):377. doi: 10.3390/cells8040377.
- Larekeng SH, Dermawan R, Iswoyo H, Mustari K. (2019). RAPD primer screening for amplification on Katokkon pepper from Toraja, South Sulawesi, Indonesia. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci*. 270:012023. doi: 10.1088/1755-1315/270/1/012023.
- Larson S, Ramsey C, Tinnemore D, Amemiya C. (2014). Novel microsatellite loci variation and population genetics within leafy seadragons, *Phycodurus eques*. *Diversity*. 6(1):33-42. doi: 10.3390/d6010033.
- Lenormand T, Duthiel J. (2005). Recombination difference between sexes: a role for haploid selection. *PLoS Biol*. 3(3):e63. doi: 10.1371/journal.pbio.0030063.
- Liu Y. (2018). *Genetic diversity and disease susceptibility*. London, United Kingdom: IntechOpen.
- Loewe L, Hill WG. (2010). The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 365(1544):1153-1167. doi: 10.1098/rstb.2009.0317.
- Makova KD, Hardison RC. (2015). The effects of chromatin organization on variation in mutation rates in the genome. *Nat Rev Genet*. 16(4):213-223. doi: 10.1038/nrg3890.
- Metere A, Graves CE. (2020). Factors influencing epigenetic mechanisms: is there a role for bariatric surgery? *High Throughput*. 9(1):6. doi: 10.3390/ht9010006.
- Nazareno AG, Knowles LL, Dick CW, Lohmann LG. (2021). By animal, water, or wind: can dispersal mode predict genetic connectivity in riverine plant species? *Front Plant Sci*. 12:626405. doi: 10.3389/fpls.2021.626405.
- Niklas A, Olszewska D. (2021). Application of the RAPD technique to identify genetic diversity in cultivated forms of *Capsicum annuum* L. *BioTechnologia (Poznań)*. 102(2):209-223. doi: 10.5114/bta.2021.106523.
- Pang E, Wu X, Lin K. (2016). Different evolutionary patterns of SNPs between domains and unassigned regions in human protein-coding sequences. *Mol Genet Genomics*. 291(3):1127-1136. doi: 10.1007/s00438-016-1170-7.
- Pekkala N, Knott KE, Kotiaho JS, Nissinen K, Puurtinen M. (2014). The effect of inbreeding rate on fitness, inbreeding depression and heterosis over a range of inbreeding coefficients. *Evol Appl*. 7(9):1107-1119. doi: 10.1111/eva.12145.
- Peterson GW, Dong Y, Horbach C, Fu Y-B. (2014). Genotyping-by-sequencing for plant genetic diversity analysis: a lab guide for SNP genotyping. *Diversity*. 6(4):665-680. doi: 10.3390/d6040665.
- Premkrishnan BV, Arunachalam V. (2012). In Silico RAPD priming sites in expressed sequences and iSCAR markers for oil palm. *Comp Funct Genomics*. 2012:913709. doi: 10.1155/2012/913709.
- Probojati RT, Wahyudi D, Hapsari L. (2019). Clustering analysis and genome inference of pisang raja local cultivars (*Musa* spp.) from java island by random amplified polymorphic dna (RAPD) marker. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*. 4(2):42-53. doi: 10.22146/jtbb.44047.
- Rohlf FJ. (2005). *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. New York: Applied Biostatistics Inc.
- Rout GR, Peter KV. (2022). *Omics in horticultural crops*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Sakamoto T, Innan H. (2020). Establishment process of a magic trait allele subject to both divergent selection and assortative mating. *Theor Popul Biol*. 135:9-18. doi: 10.1016/j.tpb.2020.07.001.

- Sheftel H, Szekely P, Mayo A, Sella G, Alon U. (2018). Evolutionary trade-offs and the structure of polymorphisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 373(1747):20170105. doi: 10.1098/rstb.2017.0105.
- Slameto. (2023). Genetic diversity and molecular analysis using RAPD markers of banana cultivars in the five regions of East Java, Indonesia. *Biodiversitas.* 24(9):5035-5043. doi: 10.13057/biodiv/d240947.
- Stapley J, Feulner PGD, Johnston SE, Santure AW, Smadja CM. (2017). Variation in recombination frequency and distribution across eukaryotes: patterns and processes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 372(1736):20160455. doi: 10.1098/rstb.2016.0455.
- Sun X, Mu Q, Jiang D, Wang C, Wang XC, Fang JG. (2012). A new strategy employed for identification of sweet orange cultivars with RAPD markers. *Genet Mol Res.* 11(3):2071-2080. doi: 10.4238/2012.August.6.11.
- Verma KS, Ul Haq S, Kachhwaha S, Kothari SL. (2017). RAPD and ISSR marker assessment of genetic diversity in *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad: a unique source of germplasm highly adapted to drought and high-temperature stress. *3 Biotech.* 7(5):288. doi: 10.1007/s13205-017-0918-z.
- Wahyudi MS, Faizah M, Zuhria SA. (2021). Morphological characteristics and kinship relationships of salak pace, salak hitam, and salak kuning in bedahlawak jombang. *Agaricus.* 1(2):51-61.
- Wang J, Li X, Do Kim K, Scanlon MJ, Jackson SA, Springer NM, Yu J. (2019). Genome-wide nucleotide patterns and potential mechanisms of genome divergence following domestication in maize and soybean. *Genome Biol.* 20(1):74. doi: 10.1186/s13059-019-1683-6.
- Wang Z, Zhou F, Tang X, Yang Y, Zhou T, Liu H. (2023). Morphology and SSR markers-based genetic diversity analysis of sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars released in china. *Agriculture.* 13(10):1885. doi: 10.3390/agriculture13101885.
- Wiguna IKC, Pharmawati M. (2021). RAPD primers selection for genetic variation analysis of banana plant (*Musa* spp.). *Jurnal Biologi Universitas Andalas.* 9(2):47-53. doi: 10.25077/jbioua.9.2.47-53.2021.
- Winget DM, Wommack KE. 2008. Randomly amplified polymorphic DNA PCR as a tool for assessment of marine viral richness. *Appl Environ Microbiol.* 74(9):2612-8. doi: 10.1128/AEM.02829-07.
- Yang G, Ding J, Wu LR, Duan YD, Li AY, Shan JY, Wu YX. (2015). A new strategy for complete identification of sea buckthorn cultivars by using random amplified polymorphic DNA markers. *Genet Mol Res.* 14(1):1836-1845. doi: 10.4238/2015.March.13.12.
- 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):1048. doi: 10.3390/molecules23051048.
- Ziolkowski PA, Berchowitz LE, Lambing C, Yelina NE, Zhao X, Kelly KA, Choi K, Ziolkowska L, June V, Sanchez-Moran E, Franklin C, Copenhaver GP, Henderson IR. (2015). Juxtaposition of heterozygous and homozygous regions causes reciprocal crossover remodelling via interference during *Arabidopsis* meiosis. *Elife.* 4:e03708. doi: 10.7554/eLife.03708.