

Optimasi Suhu *Annealing* pada PCR dan Kesesuaian Random Primer untuk Analisis RAPD Tanaman Karet

Nurhaimi Haris¹, Tolhas Hutabarat¹, dan
Asril Darussamin²

¹Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor

²Pusat Penelitian Karet, Sungai Putih, Medan

ABSTRAK

Suhu *annealing* merupakan salah satu faktor kritis dalam menentukan keberhasilan reaksi amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Oleh karena itu, sebelum digunakan untuk analisis DNA pada tanaman tertentu, perlu dilakukan pengujian terhadap suatu *annealing* tersebut. Di samping itu, random primer yang sesuai yang menghasilkan pola pita DNA polimorfik pada elektroforesis gel harus ditentukan sebelum digunakan untuk analisis molekuler yang didasarkan pada teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan suhu *annealing* optimum PCR dan memilih random primer yang sesuai untuk analisis RAPD tanaman karet (*Hevea brasiliensis*). DNA diisolasi dari daun muda klon PR 261, RRIC 101, GT 1, BPM 24, AVROS 2037, RRIM 600, dan LCB 1320, yang dipilih secara acak. Suhu *annealing* adalah 35, 36, 37, 38, 39, dan 45°C. Selanjutnya 20 macam random primer 10 mer yang mempunyai sekuen basa berbeda telah diuji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu *annealing* 36-39°C menghasilkan DNA terbaik, sedangkan primer OPC 05, OPC 09, OPC 13, OPC 14, OPC 16 serta OPC 20 menghasilkan pola pita DNA yang polimorfik pada beberapa klon tanaman karet. Primer-primer tersebut merupakan primer yang berpotensi untuk digunakan dalam analisis RAPD tanaman karet.

Kata kunci: Suhu *annealing*, PCR, analisis RAPD, tanaman karet.

ABSTRACT

Annealing temperature is one of the critical factor for successful of DNA amplification using PCR (*Polymerase Chain Reaction*) method. Hence, before it use for DNA analysis in certain plant, a suitable temperature of that *annealing* should be tested. Besides, the appropriate random primers that produce the polymorphic pattern of the DNA band on the electrophoresis gel should be determined before using for molecular analysis based on the RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) method. The purpose of this study is to determine the optimum PCR *annealing* temperature and to select the suitable random primer for RAPD analysis of rubber (*Hevea brasiliensis*) plant. DNA were isolated from rubber young leaves of PR 261, RRIC 101, GT 1, BPM 24, AVROS 2037, RRIM 600, and LCB 1320 clones which is selected randomly. The *annealing* temperatures were 35, 36, 37, 38, 39, and 45°C. Then 20 kinds of 10 mer random primers (operation kit C) that have different base sequences were tested. The results showed that *annealing* temperature between 36-39°C gave the best DNA band pattern, while OPC 05, OPC 09, OPC 13, OPC 14, OPC 16 and OPC 20 provided the polymorphic DNA pattern of some rubber clones. They are considered as a potential primers to be used in RAPD analysis in rubber plant.

Key words: *Annealing* temperature, PCR, RAPD analysis, rubber plant.

PENDAHULUAN

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk amplifikasi fragmen-fragmen DNA secara *in vitro*. Dalam reaksi amplifikasi tersebut antara lain digunakan enzim *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polymerase dan primer oligonukleotida (Sambrook *et al.*, 1989; Erlich *et al.*, 1991; Jerry *et al.*, 1995). Amplifikasi DNA terjadi melalui suatu seri rangkaian berulang suatu siklus, biasanya 25-45 siklus, sedangkan satu siklus terdiri atas pemisahan untai ganda (denaturasi) DNA templat menggunakan suhu sekitar 94°C, hibridisasi (*annealing*) primer oligonukleotida pada suhu sekitar 35-65°C (tergantung panjang primer) ke DNA templat yang sudah terbuka, diikuti dengan pemanjangan (*extension*) fragmen DNA-primer oleh enzim *Taq* DNA polymerase dengan bantuan dNTPs pada suhu 72°C. Pemanjangan fragmen pada siklus awal dipakai sebagai templat baru untuk siklus berikutnya, sehingga jumlah amplifikasi DNA target bertambah secara eksponensial pada setiap siklus (Erlich *et al.*, 1991; Slightom *et al.*, 1995). Hasil amplifikasi tersebut dapat diamati dengan cara memisahkan fragmen-fragmen DNA berdasarkan panjangnya melalui elektroforesis gel menggunakan agarose atau polyacrylamide, di bawah cahaya ultraviolet.

Keberhasilan reaksi amplifikasi ditentukan oleh banyak faktor, salah satunya adalah suhu *annealing*. Pemilihan suhu *annealing* merupakan faktor yang cukup kritis di dalam pelaksanaan PCR, karena pada suhu yang terlalu tinggi tidak akan terjadi amplifikasi DNA, sedangkan jika suhunya terlalu rendah hibridisasi primer oligonukleotida ke DNA templat kurang spesifik. Yu *et al.* (1993) mengemukakan bahwa suhu *annealing* ditentukan oleh panjang basa oligonukleotida serta kandungan basa C dan G pada suatu primer, yang akan menjadi dasar dalam perhitungan T_m (*melting temperature*), sehingga suhu *annealing* dapat diperkirakan. Namun untuk memperoleh hasil optimal sebaiknya dilakukan percobaan awal untuk mengetahui suhu *annealing* yang diperlukan oleh tanaman tertentu dalam suatu reaksi amplifikasi DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) merupakan salah satu metode penanda genetik yang dapat digunakan untuk berbagai keperluan penelitian pada tingkat molekuler, antara lain untuk analisis genetik keragaman suatu individu (Devos dan Gale, 1992; Russel *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1994), identifikasi tanaman hibrid (Wang *et al.*, 1994; Rokka *et al.*, 1994), dan identifikasi variasi somaklonal pada tanaman hasil kultur jaringan (Cloutier dan Landry, 1994; Paranjothy *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1994). Analisis RAPD didasarkan kepada hasil amplifikasi fragmen-fragmen DNA secara *in vitro* dengan teknik PCR. Random primer merupakan salah satu substrat yang diperlukan, dan penggunaan random primer yang kurang sesuai akan menghasilkan pola pita sama untuk suatu populasi yang diamati atau bahkan tidak menghasilkan pita sama sekali. Berarti untuk analisis genetik dengan teknik RAPD diperlukan pemilihan random primer dari sejumlah primer yang tersedia.

Percobaan ini dilakukan untuk mengetahui suhu *annealing* dan random primer yang sesuai dalam reaksi amplifikasi DNA tanaman karet sehingga dapat digunakan untuk analisis DNA pada penelitian selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Sumber DNA

Sumber DNA adalah daun muda tanaman karet, diambil dari beberapa lokasi perkebunan karet seperti Sungai Putih (Sumatera Utara), serta Ciomas dan Cikumpay (Jawa Barat). Dalam penelitian ini digunakan ekstrak DNA dari tujuh klon tanaman karet yang dipilih secara acak dari 80 klon ekstrak DNA yang dimiliki. Ketujuh klon tersebut adalah PR 261, RRIC 101, GT 1, BPM 24, AVROS 2037, RRIM 600, dan LCB 1320. Daun yang digunakan mempunyai panjang antara 3-5 cm dan masih berwarna coklat tua. Di lapang daun disimpan dalam kantong plastik dan kemudian diletakkan dalam suatu wadah berisi es.

Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi dari daun masing-masing klon sebanyak satu gram basah dan digerus dengan N_2 cair sampai halus berbentuk serbuk, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang telah diisi dengan 5 ml bufer ekstrak (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 1% 2-merkaptotanol) yang dipanaskan terlebih dahulu pada suhu $65^{\circ}C$. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu tersebut, sambil dikocok sekali-sekali, kemudian ditambah 5 ml campuran kloroform: isoamilalkohol (24:1) dan disentrifus lima menit pada kecepatan 11.000 rpm. Fase cair diambil, dimasukkan ke dalam tabung baru dan ditambah dengan 1 volume isopropanol dingin, setelah itu dikocok pelan sampai terlihat gumpalan halus di tengah larutan, dan kemudian disimpan minimal 30 menit pada suhu $4-6^{\circ}C$. Setelah itu disentrifus kembali selama lima menit pada kecepatan 11.000 rpm, cairan dibuang dan endapan dikeringkan. Pencucian terhadap endapan dilakukan dengan menggunakan alkohol 70% dingin. DNA yang diperoleh dilarutkan dalam 1 ml TE (10 mM Tris Hcl pH 8,0 dan 1 mM EDTA) dan disimpan pada suhu $-20^{\circ}C$.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA tanaman karet dilakukan menurut metode William *et al.* (1990) dengan sedikit modifikasi, sedangkan beberapa suhu *annealing* yang digunakan adalah 35, 36, 37, 38, 39, dan $45^{\circ}C$, dengan memberikan kondisi optimum terhadap substrat lainnya seperti konsentrasi ion magnesium, *Taq* DNA polymerase, dan DNA templat. Reaksi amplifikasi dilakukan menggunakan 25 μ l campuran larutan yang terdiri dari 5% glycerol, 5 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM NaCl, 10 μ M EDTA, 0,5 mM DTT,

0,1% Triton X-100, 2,5 μM MgCl_2 , 100 μM masing-masing dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5 picomol random primer, 1 unit *Taq* DNA polymerase, dan 80 ng DNA templat. Campuran dibuat di dalam tabung *ependorf* kemudian dilapisi dengan 20 μl *mineral oil*.

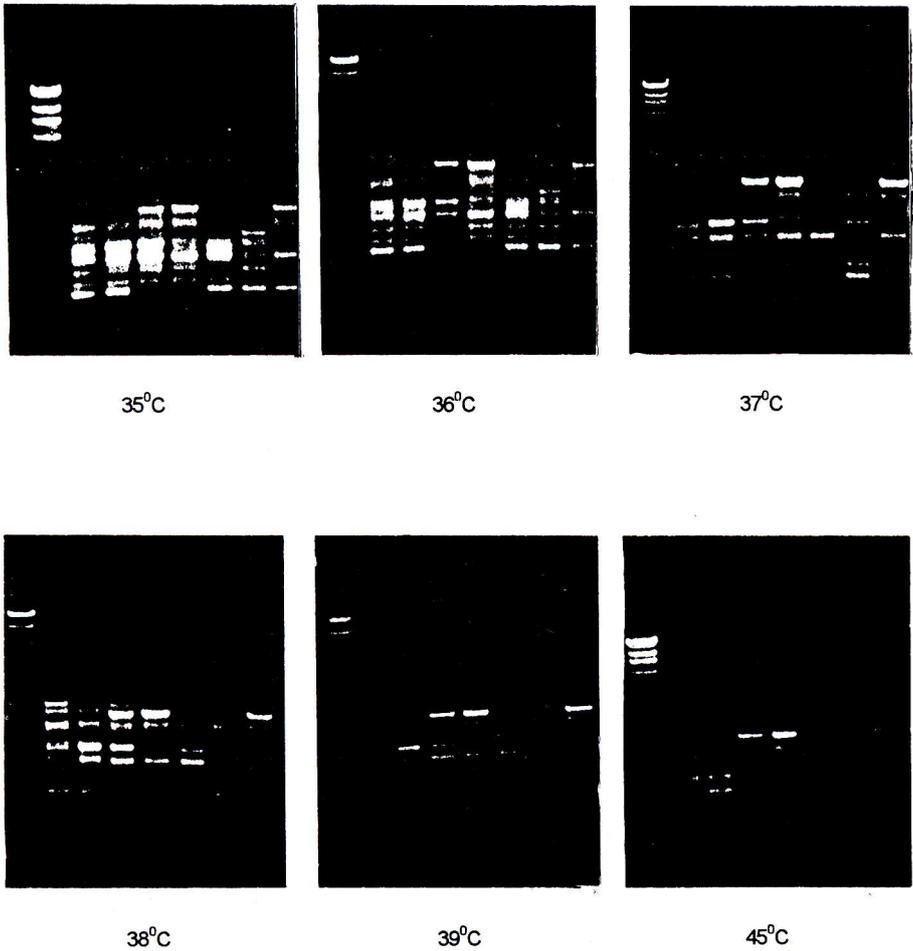
Reaksi amplifikasi DNA dilakukan dengan mesin Thermolyne AMPLITRON I yang diprogram sebanyak 45 siklus, setiap siklus terdiri dari tahap denaturasi satu menit pada 94°C, *annealing* 1 menit pada beberapa suhu seperti di atas, dan *extension* dua menit pada 72°C. Siklus terakhir diikuti dengan inkubasi selama empat menit pada suhu 72°C. Setelah reaksi amplifikasi selesai campuran tersebut ditambah dengan 5 μl *loading buffer* (sukrosa 40%, *bromophenol blue* 0,25%). Sebanyak 15 μl contoh dielektroforesis pada 1,4% agarose gel dalam satu kali bufer elektroda TAE (0,04 M Tris asetat pH 8,0, 0,001 M EDTA) selama \pm 1 jam 15 menit pada voltase 50 Volt. Ethidium bromida diberikan di dalam gel dan bufer TAE, masing-masing 0,5 ppm. Pengamatan terhadap hasil pemisahan fragmen DNA dilakukan menggunakan UV transilluminator dan pemotretan dengan kamera polaroid. Amplifikasi DNA untuk memilih random primer yang sesuai dilakukan dengan menggunakan 20 random primer dari Operon kit C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari beberapa suhu *annealing* yang dicoba, diketahui bahwa amplifikasi DNA terjadi pada semua suhu yang digunakan (Gambar 1). Berdasarkan pengamatan visual yang dilakukan terhadap pita-pita DNA hasil elektroforesis beberapa klon karet tersebut, terlihat bahwa pita dapat teramati baik pada suhu *annealing* 36, 37, 38, dan 39°C. Suhu *annealing* 35°C memberikan latar belakang yang kurang baik sehingga agak sulit untuk membedakan antara satu pita dengan pita lainnya. Hal ini akan menyulitkan di dalam pelaksanaan analisis DNA selanjutnya. Suhu *annealing* antara 36 sampai 39°C memberikan hasil amplifikasi yang lebih baik, pita-pita terlihat jelas dan setelah diulang hasilnya cukup konstan, sedangkan pada suhu tinggi, yaitu 45°C, DNA juga teramplifikasi namun pita yang diperoleh kurang kontras dan jumlah pita lebih sedikit. Menurut Saiki *et al.* (1988), amplifikasi lebih efisien jika suhu *annealing* rendah, tetapi dalam kondisi demikian jumlah kesalahan berupa *mispriming* akan meningkat. Suhu *annealing* tinggi sebetulnya dapat menghasilkan pita yang lebih spesifik, karena pada suhu tinggi tersebut hanya pasangan basa yang betul-betul sesuai akan saling menempel. Tetapi pada suhu terlalu tinggi amplifikasi sering tidak terjadi karena primer tidak menempel ke DNA templat akibat lepasnya ikatan hidrogen antara pasangan basa yang komplemen.

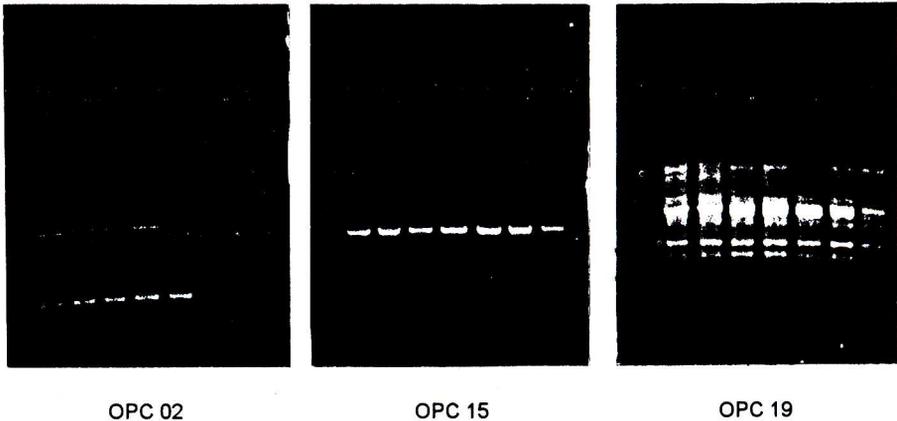
Dari keempat suhu *annealing* yang menghasilkan pola pita baik dipilih suhu 37°C. Pemilihan suhu tersebut didasarkan pada pertimbangan bahwa selain pemisahan fragmen DNA terlihat baik, juga jumlah fragmen yang diperoleh sehingga diharapkan perbedaan yang lebih rinci dapat diamati dengan lebih baik. Penampakan visual dari hasil amplifikasi DNA merupakan faktor yang penting untuk

analisis selanjutnya dengan menggunakan penanda RAPD, sebab akan sangat menentukan dalam melihat persamaan atau perbedaan antara satu klon dengan klon lainnya. Persamaan atau perbedaan penampakan pita-pita DNA antarklon tersebut dilakukan analisis untuk mengetahui polimorfisme atau hubungan kekerabatan antarindividu yang diamati.



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA beberapa klon tanaman karet pada suhu *annealing* berbeda.

Keterangan : Lajur 1. DNA marker, 2. PR 261, 3. RRIC 101, 4. GT 1, 5. BPM 24, 6. AVROS 2037, 7. RRIM 600, 8. LCB 1320



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA klon karet dengan pola pita sama menggunakan beberapa primer.

Keterangan: Lajur 1. Kontrol, 2. PR 261, 3. RRIC 101, 4. GT 1, 5. BPM 24, 6. AVROS 2037, 7. RRIC 600, 8. LCB 1320

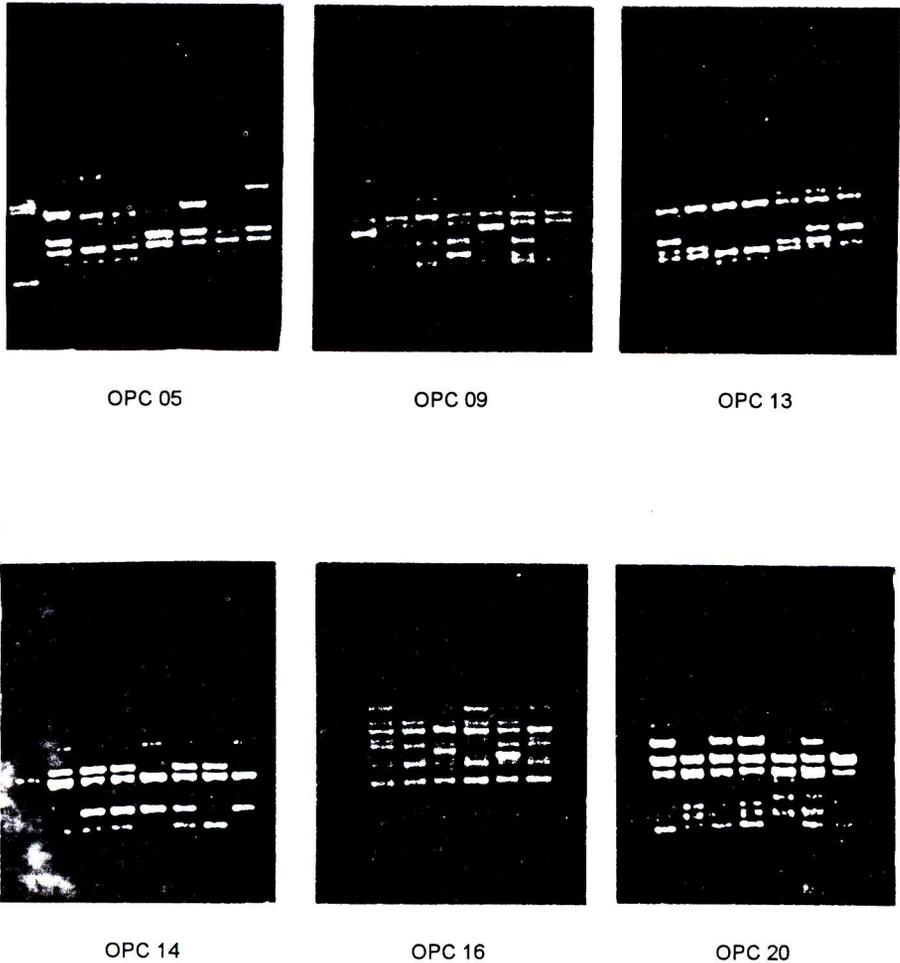
Umumnya amplifikasi DNA tanaman karet dengan 20 random primer yang digunakan menghasilkan pola pita yang relatif sama (Gambar 2). Persamaan pola pita yang diperoleh dari klon berbeda dengan menggunakan primer yang sama tersebut menunjukkan bahwa primer-primer tersebut tidak bisa digunakan untuk melacak perbedaan genetik yang terdapat antarklon karet.

Pada gel agarose yang diisi dengan contoh DNA dan menggunakan primer OPC 10 dan OPC 11 pada reaksi PCRnya, tidak terlihat adanya fragmen-fragmen DNA. Hal ini menunjukkan bahwa reaksi amplifikasi DNA tidak terjadi, yang kemungkinan dapat disebabkan oleh karena susunan basa pada primer tidak komplemen dengan susunan basa yang ada di DNA templat. Akibatnya tidak terjadi penempelan primer ke DNA templat sehingga tahapan reaksi selanjutnya berupa pemanjangan hasil *annealing* pada reaksi PCR juga tidak akan terjadi.

Adanya perbedaan pola pita pada beberapa klon tanaman karet dapat diamati dari hasil amplifikasi DNA dengan PCR menggunakan 6 primer yaitu OPC 05, OPC 09, OPC 13, OPC 14, OPC 16, dan OPC 20 (Gambar 3). Banyaknya pita yang dihasilkan dari setiap primer tersebut yang menunjukkan jumlah fragmen DNA yang diperoleh pada panjang/jumlah pasang basa berbeda, berkisar antara 5-9 pita sehingga dari 6 primer tersebut akan diperoleh sekitar 40 pita pembeda. Banyaknya fragmen DNA sebagai penanda yang digunakan di dalam analisis genetik dengan cara ini bervariasi, tergantung tujuan dari penelitian tersebut.

Beberapa literatur mengemukakan bahwa di dalam analisis genetik untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara suatu individu dengan individu lainnya diperlukan minimal 60 pita pembeda, tetapi bila memungkinkan disarankan untuk

menggunakan lebih banyak lagi pembeda sehingga dapat meningkatkan ketelitian. Jika dari setiap primer diperoleh sekitar 5-9 pita pembeda maka berarti dalam mengamati polimorfisme atau analisis hubungan genetik antara berbagai klon karet dapat digunakan sekitar 10-15 primer untuk melacak terdapatnya perbedaan genetik antara individu tanaman tersebut.



Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA tanaman karet dengan pola pita berbeda menggunakan beberapa primer.
Keterangan Lajur : 1. Kontrol, 2. PR 261, 3. RRIC 101, 4. GT 1, 5. BPM 24, 6. AVROS 2037, 7. RRIC 600, 8. LCB 1320

KESIMPULAN

Reaksi amplifikasi DNA pada tanaman karet menggunakan primer oligonukleotida 10-mer memberikan hasil yang baik pada suhu *annealing* antara 36-39°C. Di antara keempat suhu tersebut, pada reaksi PCR selanjutnya digunakan suhu 37°C yang dipilih berdasarkan kualitas dan jumlah pita yang dihasilkan.

Dari 20 random primer yang dicoba, primer yang berpotensi untuk digunakan dalam analisis genetik tanaman karet adalah OPC 05, OPC 09, OPC 13, OPC 14, OPC 16, dan OPC 20 karena hasil amplifikasinya memberikan pola pita yang berbeda. Dalam penelitian selanjutnya primer-primer terpilih tersebut akan digunakan untuk amplifikasi DNA dengan reaksi PCR terhadap seluruh DNA tanaman karet yang akan dianalisis.

DAFTAR PUSTAKA

- Cloutier, S. and B.S. Landry. 1994.** Molecular markers applied to plant tissue culture. *In vitro* Cell. Dev. Biol. (30), 32-39.
- Devos, K.M. and M.D. Gale. 1992.** The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* (84), 567-572.
- Erlich, H.A., D. Gelfand, and J.J. Sninsky. 1991.** Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* (252), 1643-1651.
- Jerry, L.S., R.F. Drong, and P.P. Chee. 1995.** Polymerase chain reaction: gene detection, inverse PCR, and genetic engineering. *In* S.B. Gelvin and R.A.Schilperoort (*Eds.*). *Plant Molecular Biology Manual*, Second Edition. F4, 1-24. Kluwer Academic Publisher.
- Paranjothy, K., R. Othman, C.C. Tan, G. Wong, and A.C. Soh. 1993.** Incidence of abnormalities in relation to *in vitro* protocols. *In* V. Rao, I.E. Henson, and N.Rajanaidu (*Eds.*). *Recent Developments in Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology*. Proc. of the 1993 ISOPB International Symposium. 77-85. Kuala Lumpur 24-25 September. Published by PORIM.
- Rokka, V.M., Y.S. Xu, J. Kankila, A. Kuusela, S. Pulli, and E. Pehu. 1994.** Identification of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens* by species specific RAPD patterns and assessment of disease resistance of the hybrids. *Euphytica* (80), 207-217.
- Russell, J.R., F. Hosein, E. Johnson, R. Waugh, and W. Powell. 1993.** Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Molecular Ecology* (2), 89-97.

- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (239), 487-491.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning. A laboratory manual, Second edition, 14.2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shah, F.H., O. Rashid, A.J. Simons, and A. Dunsdon. 1994.** The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Theor. Appl. Genet.* (89), 713-718.
- Slightom, J.L., R.F. Drong, and P.P. Chee. 1995.** Polymerase Chain Reaction: gene detection, inverse PCR, and genetic engineering. *Plant Molecular Biology Manual F4*, 1-24. Kluwer Acad. Publisher.
- Taylor, P.W.J., T.A. Fraser, H.L. Ko, and R.J. Henry. 1995.** RAPD analysis of sugarcane during tissue culture. Current issues in plant molecular and cell biology. *In* M. Terzi, R. Cella, and A. Falavigna (*Eds.*). Proc. of the VIIIth Inter. Cong., 241-246. Kluwer Acad. Publisher.
- Wang, W.J., R.C. Pai, C.C. Lai, and T.P. Lin. 1994.** Molecular evidence for the hybrid origin of *Paulownia taiwaniana* based on RAPD markers and RFLP of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet.* (89), 271-275.
- William, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* (18), 22, 6531-6535.
- Yu, K.F., A.V. Deynze, and K.P. Pauls. 1993.** Random amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *In* B.R. Glick and J.E. Thompson (*Eds.*). *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, 287-301. CRC Press.