Analisis Pola Pita Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* D.C) Berdasarkan Primer OPD 03, OPD 20, OPC 07, OPM 20, OPN 09

Analysis of PCR amplification of Sumatra's Andaliman based on RAPD primers OPD 03, OPD 20, OPC 07, OPM 20, OPN 09

Ann Sinaga, Lollie Agustina P. Putri*, Mbue Kata Bangun
Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, USU, Medan 20155
**Corresponding author* : lollie_agustina@yahoo.com

ABSTRACT

The aimed of the research was to determine the genetic diversity Sumatera's andaliman based on OPD 03, OPD 20, OPC 07, OPM 20, OPN 09 primers. Five primers showed 20 band which is 78.34% polymorphic and 21.66% monomorphic. The size of DNA's bands were varied from 418bp – 2500bp. The research was carried out in the Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran University of Sumatera Utara began from April to September 2015 which used DNA stock from thirty accession of Andaliman from three regions in North Sumatera : Dairi, Karo and Simalungun. DARwin 6.01 software was used to calculate Factorial principal coordinates analysis and phylogenetic that only can process fifteen accessions because some of accessions have not software's standart. The analysis showed that 15 accessions clustered into three groups. The clustering were not based on region, plant physiology and altitude. The research showed that the thirty accession of andaliman from three regions in North Sumatera has a high genetic diversity..

Keywords : andaliman, genetic diversity, random amplified polymorphic DNA.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* D.C) di Sumatera Utara melalui analisis pola pita RAPD berdasarkan primer OPC 07, OPD 03, OPD 20, OPM 20, OPN 09. Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran USU pada April s/d September 2015 dengan menggunakan stok DNA dari 30 aksesi andaliman yang berasal dari tiga kabupaten di Sumatera Utara yaitu Kabupaten Dairi, Kabupaten Tanah Karo dan Kabupaten Simalungun. Total pola pita yang dihasilkan dari primer OPC07, OPD03, OPD20, OPM20, OPN09 adalah 20 pita yang 78.34% adalah pita polimorfik dan 21.66% pita monomorfik. Ukuran pita yang dihasilkan berkisar 418 bp – 2500 bp. Koefisien keragaman genetic dan dendogram filogenetik diperoleh menggunakan software Darwin 6.01 yang hanya dapat memproses 15 aksesi yang diuji karena sebagian aksesi tidak memenuhi persentase yang distandarkan. Analisis tersebut menunjukkan bahwa 15 aksesi andaliman tersebut terbagi dalam tiga kelompok. Pengelompokan aksesi andaliman tidak berdasarkan daerah, fisiologis tanaman dan ketinggian tempatnya. Penelitian ini menunjukkan bahwa 30 aksesi andaliman dari tiga kabupaten di Sumatera Utara memiliki keragaman genetik yang tinggi.

Kata kunci : andaliman, keragaman genetik, *random amplified polymorphic* DNA

PENDAHULUAN

Indonesia dikenal sebagai salah satu negara pusat keragaman genetika dari rempah-rempah. Rempah-rempah selain digunakan sebagai obat-obatan tradisional, juga digunakan sebagai bumbu masakan untuk memberikan citarasa dan membangkitkan

selera makan. Buah andaliman dan antarasa adalah rempah-rempah khas Sumatera Utara. Buah andaliman sering digunakan oleh suku Batak sebagai bumbu campuran rnasakan atau campuran bumbu sambal khas untuk berbagai jenis makanan, seperti ikan mas arsik, naniura dan natinombur (Mulia, 2000).

Saat ini andaliman diperhitungkan menjadi sumber senyawa aromatik dan minyak esensial. Sementara aspek budidaya tanaman ini masih sangat terbatas diketahui, termasuk aspek perbanyakan tanaman. Petani masih menggunakan bibit liar dalam perbanyakan tanaman andaliman, karena bijinya sulit berkecambah. Ini menjadi salah satu hambatan bagi kebanyakan petani untuk memperbanyaknya dan membudidayakan dengan skala usaha yang agak besar (Siregar, 2011)

Manfaat andaliman sebagai bumbu pelengkap rasa makanan telah lama digunakan oleh masyarakat Batak Toba. Ada beberapa makanan khas Batak yang menggunakan Andaliman sebagai bumbu contohnya: Naniura, naniarsik, nanitombur, napinadar dan sang-sang yang biasanya untuk menjamu tamu pada acara tradisional. Satu gigitan buah andaliman akan memberikan rasa pedas-sengit dan aroma dari minyak esensial yang dapat menaikkan produksi saliva. Selain itu beberapa tanaman dari genus Zanthoxylum telah digunakan sebagai aroma terapi buatan (Moektiwardoyo *et al*, 2014).

Salah satu cara untuk meningkatkan produksi pertanian adalah dengan menanam varietas unggul yang dihasilkan dari kegiatan pemuliaan tanaman. Walaupun pemuliaan konvensional (penyilangan dan seleksi) telah terbukti menghasilkan varietas unggul dan mampu meningkatkan produksi tanaman, namun pemuliaan konvensional memiliki keterbatasan, terutama dalam hal waktu yang diperlukan untuk memasukkan/introgensi gen-gen yang diinginkan. Oleh sebab itu diperlukan diperlukan teknologi baru yaitu penggunaan markah molekuler yang membantu pemulia tanaman dalam mempersingkat waktu seleksi dan menentukan apakah gen yang diinginkan benar-benar ada dalam tanaman hasil persilangan tanaman yang terseleksi (Bahagiawati, 2011).

Beberapa tahun terakhir ini, pemuliaan tanaman tampak mulai bangkit kembali perkembangannya, terutama setelah adanya pendekatan genetika molekuler dengan menggunakan piranti diagnostic asam nukleat baru. Piranti ini telah berhasil membentuk penanda molekuler yang mampu dalam mendeteksi gen dan sifat-sifat tertentu, monitoring keragaman dan evolusi pada level genetik (Nasir, 2002).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan metode untuk amplifikasi potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Teknik ini mampu memperbanyak sebuah urutan 105-106-kali lipat dari jumlah nanogram dari DNA template. Proses ini mirip dengan proses replikasi DNA secara *in vivo* yang bersifat semi konservatif. Polymerase Chain Reaction (PCR) ini dapat digunakan untuk amplifikasi urutan nukleotida, menentukan kondisi urutan nukleotida suatu DNA yang mengalami mutasi (Nurjannah, 2013).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas sumatera Utara, Medan pada bulan April 2015 sampai dengan bulan September 2015.

Bahan tanaman digunakan dalam penelitian ini adalah DNA Andaliman yang sudah di isolasi pada penelitian Sinaga, dkk (2015). Bahan yang digunakan adalah buffer ekstraksi CTAB,buffer TAE (*Tris-acetate-EDTA*) (pembuatan dapat dilihat pada lampiran 1.), buffer TE, NaOH, Na-EDTA, HCl, alkohol 70%, aquadest, agarose, kertas tissue, *Green Master Mix* (Promega, M7122), DNA MW *Marker ladder* (Thermoscientific) 1 kb, Primer oligonukleotida (Sigma Aldrich), masker.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital, hotplate, freezer, tabung eppendorf 2 ml dan 1,5 ml, mikro pipet 1-50 µl, 100-500 µl dan 200-1000 µl, sarung tangan karet, tip pipet kristal, tube PCR, kamera, pengaduk magnetik, pH meter, oven, autoclave, alat-alat gelas (beaker gelas,

erlenmeyer, dll), *UV Transluminator (UV Tec Cambridge 20 UV)*, elektroforesis (*Power PAC 3000*, *Biorad*), PCR (*Therma Cycler*), *Gel-Doc* (*UV Cambridge*), *power supply*, alat tulis.

Sebanyak 5 primer polimorfik yaitu OPD 03, OPD 20, OPC 07, OPM 20 dan OPN 09 digunakan untuk mengamplifikasi sampel. Reaksi PCR dilakukan dengan tahapan sebagai berikut: satu siklus denaturasi awal pada suhu 94º C selama 2 menit, kemudian 45 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94ºC selama 1 menit, *annealing* pada suhu 36ºC selama 1 menit, dan eksistensi pada suhu 72ºC selama 1 menit dilanjutkan dengan eksistensi akhir 10 menit dan pendinginan selama 30 menit pada suhu 4ºC (Setiyo, 2001). HAsil amplifikasi kemudian diseperasi dengan elektroforesis gel agarose 2 % dalam buffer TAE selama 60 menit pada 80 volt, kemudian divisualisasikan dengan UV transluminator.

Untuk menentukan keragaman genetic, produk PCR – RAPD diskoring berdasarkan muncul tidaknya pita DNA. Pita yang muncul pada gel diasumsikan sebagai alel RAPD. Keragaman alel RAPD ditentukan dari perbedaan migrasi alel pada gel dari masing-masing individu sampel. Berdasarkan ada atau tidaknya pita, profil pita diterjemahkan kedalam data biner. Ukuran fragmen basa produk PCR ditentukan dengan menggunakan *software* UVITEC *Cambridge Reader*. Ukuran pita DNA (*base pair*) berpacuan pada *ladder* yang digunakan yaitu 1kb DNA *ladder*. Software ini akan mengukur pita yang muncul berdasarkan ukuran *ladder* dimana data ukuran nya telah diinput terlebih dahulu. Pengukuran pola pita yang terbentuk ini dengan pendar cahaya DNA yang terbentuk saat proses elektroforesis dengan sinar UV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemurnian DNA yang diperoleh pada penelitian ini berkisar 1.143 – 2.113. Dari 30 sampel DNA yang diisolasi hanya 4 sampel yang nilai kemurnian nya berkisar 1.8 – 2.0 yaitu aksesi nomor 12, 16, 18, dan 28. Hal ini menunjukkan bahwa sampel DNA tersebut telah murni.

Sampel dengan nilai kemurnian dibawah 1.8 sebanyak 4 sampel yaitu aksesi D6, D7, S5 dan S6. Hal ini menunjukkan bahwa stok DNA masih banyak mengandung kontaminan protein. Sampel dengan kemurnian diatas 2.0 sebanyak 22 sampel yaitu aksesi D1, D2, D3, D4, D5, D8, D9, D10, D11, D13, D14, D15, D17, K1, K2, K3, S1, S2, S3, S4, S8 dan S9. Hal ini menunjukkan bahwa sampel masih belum murni dan mengandung kontaminan RNA. Sulandri dan Zein (2003) menyatakan bahwa kemurnian DNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi protein dalam larutan. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio A260 dengan A280 berkisar 1.8 – 2.0. Jika nilai rasio lebih kecil dari 1.8 maka masih ada kontaminasi protein atau fenol di dalam larutan.

Konsentrasi DNA yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah berkisar 97.1 ng/µl – 3760 ng/µl. Konsentrasi paling rendah terdapat pada aksesi nomor D6 sedangkan konsentrasi paling tinggi terdapat pada aksesi nomor S5. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 ng/µl – 25 ng/µl dengan pengenceran yang dihitung dengan memperhatikan faktor pengenceran.

Kerusakan stok DNA dapat diakibatkan oleh kurang baiknya penyimpanan di Laboratorium. Kemungkinan pada saat penggunaan tidak menggunakan ice box sehingga suhu DNA meningkat menyebabkan penurunan konsentrasi DNA. Hal ini sesuai dengan pendapat Andras (1996) yang menyatakan bahwa temperature penyimpanan DNA yang dianjurkan adalah pada -20 C hingga -4C. DNA (tanpa tambahan) dapat mengalami kerusakan struktur jika berada pada temperature yang tinggi karena DNA terdiri dari dua jalinan yang dihubungkan dengan ikatan hidrogen, dan ikatan itu sangat rentan untuk rusak pada suhu tinggi.

Tabel 1. Hasil uji kuantitatif 30 aksesi DNA tanaman andaliman

No	Kode Aksesi	Konsentrasi DNA (ng/µl)	Kemurnian 260/280
1	D1	3041	2.018
2	D2	2201	2.078
3	D3	796	2.089
4	D4	1769	2.014
5	D5	2476	2.016
6	D6	97.1	1.143
7	D7	2398	1.310
8	D8	1073	2.075
9	D9	1367	2.077
10	D10	2046	2.113
11	D11	1335	2.052
12	D12	1524	1.975
13	D13	1417	2.079
14	D14	1211	2.079
15	D15	1415	2.075
16	D16	937	1.969
17	D17	1340	2.044
18	D18	823	1.926
19	K1	1551	2.061
20	K2	1801	2.073
21	K3	2100	2.007
22	S1	2204	2.050
23	S2	2337	2.019
24	S3	2951	2.100
25	S4	2612	2.110
26	S5	3760	1.625
27	S6	221	1.596
28	S7	1422	1.934
29	S8	2891	2.127
30	S9	3757	2.080
Rataan		1829.1	1.964

Pita polimorfik adalah pita yang tidak terdapat pada seluruh sampel. Persentase pita polimorfik yang tinggi menunjukkan tingginya variasi pada setiap aksesi andaliman yang diteliti. Azizah (2009) menyatakan bahwa jumlah pita polimorfik hasil amplifikasi berbeda-beda. Semakin banyak pita polimorfik yang dihasilkan akan semakin mudah untuk mengamati adanya variasi.

Pita polimorfik terbentuk dari perbedaan ukuran pita yang terbentuk pada setiap sampel yang diteliti. Pola pita yang terbentuk oleh setiap sampel unik dan berbeda-beda. Hal ini menunjukkan adanya variasi genetik dari sampel andaliman yang diteliti. Agustian (2008) menyatakan perbedaan pola pita dapat ditunjukkan dalam perbedaan jumlah pita yang dihasilkan. Perbedaan pola pita dapat menggambarkan perbedaan genetik sampel.

Tabel 2. Persentase pita polimorfis pada lima primer

No	Nama Primer	Total Pola Pita	Jumlah Pita Polimorfik	Jumlah Pita Monomorfik	Persentase Pita Polimorfik (%)
1	OPD 03	3	2	1	66.7
2	OPD 20	5	5	0	100
3	OPC 07	4	3	1	75
4	OPM 20	4	2	2	50
5	OPN 09	4	4	0	100
Total		20	16	4	391.7
Rataan		4	3.2	0.8	78.34

Jumlah pita polimorfik tertinggi terdapat pada primer OPD 20 yaitu 5 pita polimorfik sedangkan jumlah pita polimorfik terendah terdapat pada primer OPD 03 dan OPM 20 yaitu 2 pita polimorfik. Persentase pita polimorfik yang mencapai 100% terdapat pada primer OPD 20 dan OPN 09 sedangkan OPD 03 dan OPC 07 masing-masing memiliki persentase polimorfik sebesar 66.67% dan 75%.

Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa ada 18 sampel yang tidak terampifikasi pada penelitian ini. Primer dengan jumlah sampel tidak teramplikasi paling banyak adalah OPC 07 sebanyak 10 sampel yaitu D6, D10, D12, D14, D18, K3, S6, S7, S8, S9. Sementara pada primer OPD 20 seluruh sampel teramplifikasi. Sampel 6 tidak teramplifikasi pada 3 primer yaitu primer OPC 07, OPM 20 dan OPN 09.

Menurut William, *et al* (1990) fragmen yang tidak muncul disebabkan tidak terjadinya amplifikasi, dapat terjadi karena primer yang digunakan tidak sesuai dengan DNA cetakan. Beberapa bukti percobaan menunjukkan bahwa perbedaan satu pasang basa saja sudah cukup menyebabkan ketidaksesuaian cetakan primer yang kemudian mencegah amplifikasi.

Tabel 3. Urutan basa lima primer dan aksesi yang tidak teramplifikasi

Nama Primer	Urutan Basa (5'-3')	Aksesi Yang Tidak teramplifikasi	Jumlah
OPD 03	GTCGCCGTCA	D1	1
OPD 20	ACCCGGTCAC		0
OPM 20	AGGTCTTGGG	D7, D13	2
OPC 07	GTCCCGACGA	D6, D10, D12, D14, D18, K3, S6, S7, S8, S9	10
OPN 09	TGCCGGCTTG	D1, D6, D13, K1, K2	5
		Jumlah	18

Beberapa dari pita DNA tersebut tidak terbentuk secara sempurna. Pada saat didokumentasikan dengan menggunakan Gel-doc terlihat pita-pita DNA yang blur (tidak jelas). Hal ini disebabkan pita DNA yang tidak terbentuk secara sempurna. Menurut Azizah (2009) Hasil amplifikasi yang kurang baik dapat disebabkan oleh ketidaksesuaian primer, efisiensi, dan optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik atau sesuai dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Optimasi PCR juga diperlukan untuk menghasilkan karakter yang diinginkan. Optimasi ini menyangkut suhu denaturasi dan a*nnealing* DNA dalam mesin PCR. Suhu denaturasi yang rendah dapat menyebabkan belum terbukanya DNA utas ganda sehingga tidak dimungkinkan terjadinya penempelan primer. Proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi karena primer tidak menempel atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi homologinya. Hal ini menyebabkan

No	Nama Primer	Ukuran Pita (bp)
1	OPD 03	1704; 1857; 2277
2	OPD 20	418; 615; 799; 1217;2223
3	OPC 07	586; 900; 2098; 2500
4	OPM 20	500; 648; 863; 1082
5	OPN 09	491; 875; 1044; 1786

Ukuran pita pada setiap primer berbeda-beda berkisar 418 bp – 2500 bp. Ukuran pita tertinggi terdapat pada primer OPC 07 sebesar 2500 bp sedangkan ukuran pita terendah terdapat pada primer OPD 20 sebesar 418 bp.

Primer OPD 03 menunjukkan pola pita yang berjumlah 3 pita dengan ukuran pita yang berukuran 1704bp, 1857bp dan 2277bp. Persentase pita polimorfik sebesar 66.67 %. Persentase monomorfis sebesar 33.37 %. Primer OPD 20 menunjukkan pola pita yang berjumlah 4 pita dengan ukuran pita 418bp, 615bp, 799bp, 1217bp, 2223 bp. Persentase pita polimorfik sebesar 100 %. Persentase monomorfis sebesar 0 %. Primer OPC 07 mennjukkan pola pita yang berjumlah empat pita dan ukuran pita 586 bp, 900 bp, 2098 bp, 2500 bp. Persentase ppolimorfik sebesar 75% dan persentase monomorfis sebesar 25%. Primer OPM 20 menunjukkan pola pita yang berjumlah 4 pita dengan ukuran pita 500bp, 648bp, 863bp, 1082bp. Persentase pita polimorfis sebesar 100 %. Primer OPN 09 menunjukkan pola pita yang berjumlah 4 pita dengan ukuran pita 491bp, 875bp, 1044bp, 1786bp. Persentase pita polimorfis sebesar 100 %.

Ada beberapa faktor yang sangat mempengaruhi keberhasilan proses elektroforesis dalam analisis ini. Menurut Ardhana (2011) Faktor-faktor tersebut diantara nya adalah ukuran molekul DNA, konsentrasi gel agarosa, konformasi DNA, voltase, keberadaan pewarna DNA, komposisi buffer elektroforesis.

Dalam penelitian ini penulis menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 2%. Dengan perbandingan agarose sebesar 2,6 gr dengan 130 ml tris TAE 10 x untuk chamber elektroforesis berukuran besar. Konsentrasi gel agarose sangat mempengaruhi laju migrasi DNA pada proses elektroforesis. Menurut Fatciyah (2011) konsentrasi Agarosa yang digunakan akan menentukan besarnya pori-pori gel yang akan memisahkan-misahkan DNA. Semakin rendah konsentrasi agarose maka matriks gel akan semakin kecil dan fragmen DNA dapat dipisah semakin jauh berdasarkan ukurannya.

Sama hal nya dengan konsentrasi agarose, voltase pada saat elektroforesis juga berpengaruh pada laju migrasi DNA. Pada penelitian ini penulis mencoba dua voltase dalam pelaksanaan nya yaitu 80 volt selama 60 menit dan 100 volt selama 65 menit. Dari kedua voltase tersebut lebih banyak sampel yang teramplifikasi dengan 100 volt selama 65 menit dibandingkan dengan 80 volt selama 60 menit. Menurut Fatciyah (2011) penambahan voltase yang dialirkan ke larutan buffer berarti arus yang diberikan juga semakin besar, sehingga kecepatan migrasi DNA bertambah. Namun bila terlalu besar akan menimbulkan panas yang jika terlalu besar dapat menyebabkan panas berlebih yang menyebabkan gel meleleh.

Keberadaan pewarna DNA sangat menentukan tampak atau tidaknya pita DNA saat didokumentasikan dengan geldoc. Pada penelitian ini penulis menggunakan *Etidhium Bromide* (EtBr) sebagai pewarna. Hal ini sesuai dengan pendapat Wicaksono (2009) yang menyatakan bahwa etidium bromide merupakan sebuah molekul yang dapat mengikat kuat pada DNA. Digunakan untuk memvisualisasi potongan-potongan DNA yang telah dipisahkan pada gel elektroforesis. Etidium mengikat dengan cara menyisip diantara ikatan basa pada untai ganda DNA.

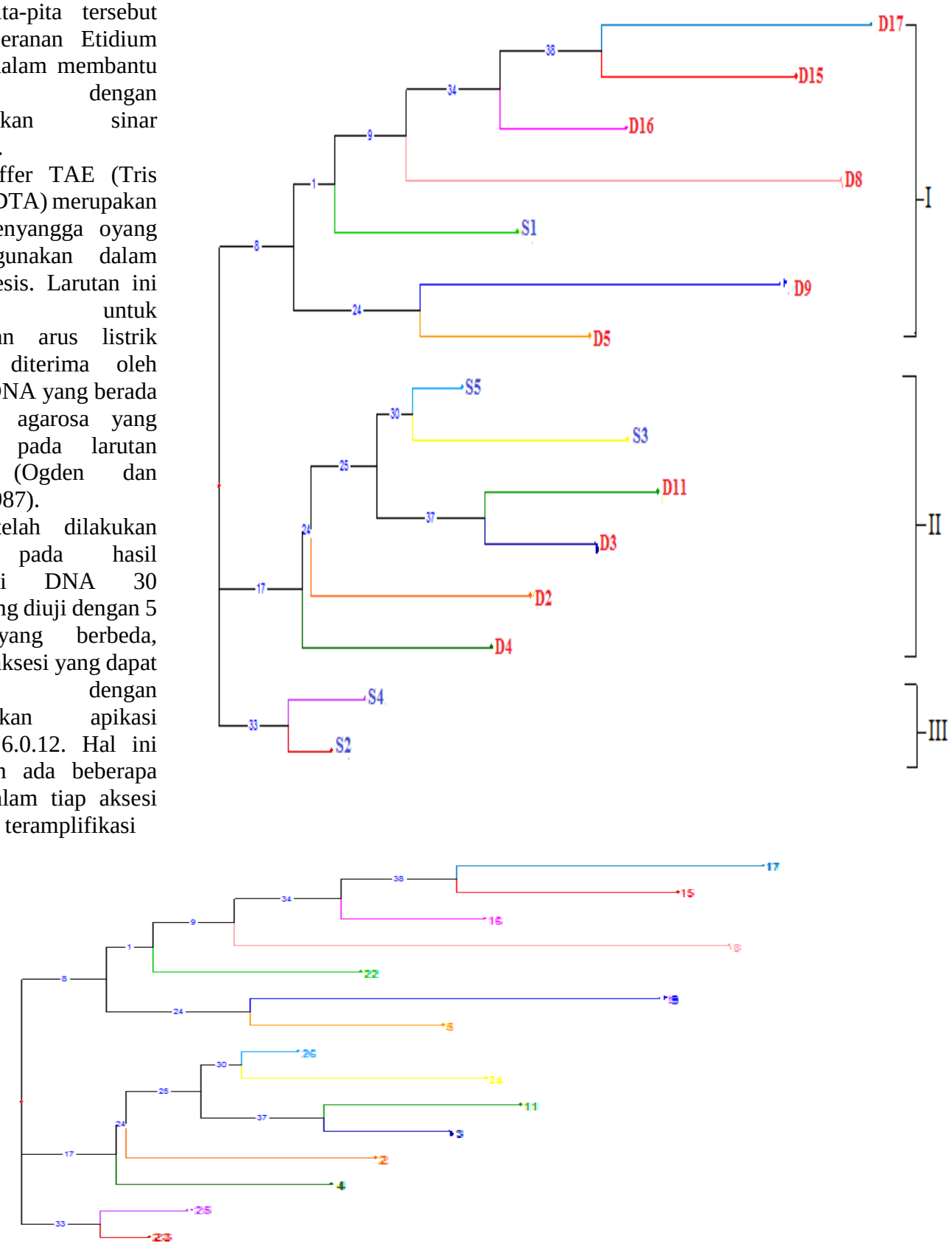
Jika gel disinari dengan ultraviolet dari bawah maka akan tampak citra berupa pita-pita pada gel. Yang dapat diamati dan dihitung panjang basepair nya dan discoring sehingga bisa ditentukan kekerabatan antar sampel yang teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut. Suhu penempelan (*annealing*) ini ditentukan berdasarkan primer.

Tabel 4. Ukuran pita dari kelma primer

diamati. Menurut Yuwono (2006) pita-pita tersebut muncul peranan Etidium bromide dalam membantu visualisasi dengan memendarkan sinar ultraviolet.

Buffer TAE (Tris Acetate EDTA) merupakan larutan penyangga oyang biasa digunakan dalam elektroforesis. Larutan ini berfungsi untuk meneruskan arus listrik sehingga diterima oleh fragmen DNA yang berada pada gel agarosa yang terendam pada larutan tersebut (Ogden dan Adams, 1987).

Setelah dilakukan scoring pada hasil amplifikasi DNA 30 sampel yang diuji dengan 5 primer yang berbeda, hanya 15 aksesi yang dapat diproses dengan menggunakan apikasi DARwin 6.0.12. Hal ini disebabkan ada beberapa sampel dalam tiap aksesi yang tidak teramplifikasi



Gambar1. Pohon filogenetik 15 aksesi tanaman andaliman yang berasal dari Sumatera Utara yang dianalisis berdasarkan *matrix dissimilarity simple matching.*

Penelitian ini menunjukkan bahwa kelimabelas aksesi terbagi dalam 3 kelompok besar. Gambar 1 menunjukkan bahwa kelompok 1 terdiri dari 7 aksesi yaitu aksesi D5, D8, D9, D15, D16, D17, S1. Kelompok 2 terdiri dari 6 aksesi dengan nomor aksesi D2, D3, D4, D11, S3, S5. Sedangkan pada kelompok yang ketiga ada 3 aksesi yaitu aksesi S2 dan S4.

Hasil pengelompokan menunjukkan bahwa setiap kelompok maupun sub kelompok dapat berasal dari berbagai tempat yang berberda-beda. Hal ini berarti bahwa lokasi tumbuh tidak mempengaruhi faktor genetis pada andaliman. Seperti hal nya pada kelompok 1 subkelompok 1 yang berasal dari 2 Kabupaten yang berbeda. Dapat dilihat pula bahwa dalam setiap subkelompok terdapat aksesi dengan lokasi tumbuh yang ketinggian nya bervariasi antara 978 – 1518m diatas permukaan laut. Hal ini berarti bahwa ketinggian tempat juga tidak mempengaruhi genetik tanaman andaliman. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya Sinaga, *et al* (2015) yang menyatakan bahwa hasil pengelompokan aksesi andaliman berdasarkan marka RAPD tersebut menghasilkan 3 kelompok tidak dipengaruhi oleh letak geografis dan ketinggian tempat dilihat dari beragamnya ketinggian tempat setiap aksesi pada suatu kelompok tersebut.

Hal tersebut juga dapat dibuktikan dari beragamnya subkelas pada aksesi-aksesi yang berasal dari lokasi yang sama. Seperti aksesi yang berasal dari Kabupaten Simalungun Kecamatan Purba Desa Kampung Baru Purba Hinalang tersebar pada 2 kelompok yang berbeda. Aksesi S3 dan S5 berada pada kelompok 1 sub kelompok 1 sedangkan aksesi S2 dan S4 berada pada sub kelommpok 3. Hal ini menunjukkan tingginya keragaman genetik andaliman yang berasal dari daerah tersebut. Perbedaan genetik andaliman pada daerah yang sama dipengaruhi berbagai faktor. Terutama faktor asal tetua. Kemungkinan terjadinya penyerbukan secara alami, dapat terjadi melalui bantuan angin ataupun dengan serangga. Selain itu, bisa juga karena terbawa oleh aliran air pada saat hujan turun ataupun aliran sungai serta dari bantuan manusia yang memindahkan bibit tanaman ke tempat lain.

Aksesi yang berasal dari desa Parbuluan Dairi (aksesi D8 dan D9), desa Tiga baru Kabupaten Dairi (aksesi D15, D16 dan D17), terdapat di masing-masing di subkelas yang sama. Hal ini menunjukkan masih dekatnya kekerabatan antara masing-masing aksesi yang berasal dari desa yang sama.

Di masing-masing kelompok besar terdapat tanaman yang berbeda-beda secara morfologisnya. Setiap kelompok terdapat tanaman berwarna daun hijau, hijau kemerahan dan merah. Contohnya pada kelompok 1 aksesi D15 dan D17 yang sangat dekat jarak kekerabatannya memiliki warna daun yang berbeda yaitu aksesi D15 berwarna hijau dan aksesi D17 berwarna merah. Setiap jenis andaliman yang berbeda warna bagian belakang daun sama menyebar pada ketiga kelompok tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan morfologi tidak menentukan bahwa perbedaan tersebut dipengaruhi oleh faktor genetik.

Pengelompokan tersebut juga menunjukkan bahwa setiap kelompok tidak berdasarkan ketinggian tempat dan letak geografis setiap aksesi. Contohnya dapaDt dilihaS1 pada aksesi D8 dan S1 yang terletak di kelompok yang sama namun ketinggian tempat tumbuh nya beragam yaitu aksesi D8 pada ketinggian 1317 mdpl dan aksesi S1 pada ketinggian 1423 mdpl. Setiap kelompok tidak dipengaruhi oleh ketinggian tempat setiap aksesi. Aksesi yang berasl dari tempat yang sama dengan ketinggian yang sama menyebar pada ketiga kelompok. Setiap aksesi pada kelompok berada pada ketinggian 978 – 1423 mdpl.

Dilihat dari jarak kekerabatan antar aksesi dari setiap kelompok jarak paling dekat adalah aksesi S2 dan S4 pada kelompok 3 yaitu sebesar 0.0326. Hal ini menunjukkan kedekatan genetik antara aksesi dalam satu kelompok tersebut. Sementara jarak terbesar adalah jarak antara aksesi D17 dan S3 yaitu sebesar 0.29326. Kedua aksesi ini terdapat pada dua kelompok yang berbeda.

Limabelas aksesi lainnya yaitu aksesi D1, D6, D7, D10, D12, D13, D14, D18, K1, K2, K3, S6, S7, S8, S9 tidak dapat diproses pada aplikasi DARwin karena ada sampel yang tidak teramplifikasi dari aksesi tersebut pada beberapa primer.

Keragaman genetik yang tinggi merupakan salah satu faktor penting untuk merakit varietas unggul baru (Hutami dkk, 2005) menyatakan bahwa dalam pemuliaan tanaman pendugaan hubungan genetik sangat berguna untuk mengelola plasma nutfah, identifikasi kultivar, membantu seleksi tetua persilangan serta mengurangi jumlah individu yang dibutuhkan untuk mengambil sampel dengan kisaran keragaman yang luas.

SIMPULAN

Persentase polimorfik 30 aksesi andaliman pada 5 primer sebesar 78.34 % dengan ukuran basa fragmen DNA dari 30 aksesi yang diamati adalah 418 – 2500 bp. Secara genetik aksesi andaliman yang diteliti memiliki keragaman yang tinggi. Nilai faktorial analisis (PCoA) yaitu 53.98% menunjukkan keragaman molekuler yang tinggi. Limabelas aksesi dari lokasi yang berbeda-beda terbagi dalam 3 kelompok (cluster) secara genetik.

DAFTAR PUSTAKA

Agustian, A. 2008. Karakterisasi variasi genetik Jatropha curcas L. dengan menggunakan marka molekular Amplified Fragment Length Polymophism (AFLP). Departemen Biologi. FMIPA UI. Jakarta.

Andras G. 1996. Effect of temperature on separation efficiency in capillary gel electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol 15 no 5

Azizah, A. 2009. Perbandingan Pola Pita Amplifikasi Dna Daun, Bunga Kelapa Sawit Normal dan Abnormal. Institut Pertanian Bogor . Bogor.

Bahagiawati. 2011. Peran Markah Molekuler Dalam Pemuliaan Tanaman. Badan Litbang Pertanian. Edisi 16-22 Maret 2011 No.3397 Tahun XLI

Fatchiyah, 2011. Pelatihan analisis fingerprinting DNA tanaman dengan metode RAPD. [Modul]. Laboratorium sentral ilmu hayati Universitas Brawijaya, Malang.

Hutami, S., I. Mariska dan Y. Suprati. 2005. Peningkatan keragaman genetik tanaman melalui keragaman somaklonal. *Agrobiogen* 2 (2): 81-89.

Moektiwardoyo, M. , Muchtaridi, M dan Eli, H. 2014. Chemical Composition And Locomotor Activity Of *Andaliman* Fruits (*Zanthoxylum Acanthopodium* Dc.) Essential Oil On Mice. *Int J Pharm Pharm Sci* 6(2): 547-550.

Mulia,L.2000. Kajian Aktivitas Antimikroba Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*) dan Antarasa (*Litsea cubeba*). Skkripsi . Institut Pertanian Bogor .Bogor, hlm 7-21.

Nasir, M. 2002. Bioteknologi molekuler: Teknik rekayasa genetika tanaman. Penerbit PT. Citra Aditya Bakti, Bandung. hlm 111-133.

Nurjannah, S. 2013. Teknik Analisis Biomolekuler PCR. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang.

Ogden, R. C., and Adams, D. A. 1987. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymo*. 152. 61-87

Setiyo, I, E. 2001. Pemetaan dan Keragaman genetic RAPD pada kelapa sawitPancur (RISPA). Tesis. PPS IPB. Bogor. (Tidak Dipublikasikan)

Sinaga, A.O.Y., Lollie, A.P.P., Luthfi, A.M.S. 2015. Analisis keragaman genetik andaliman Sumatera Utara menggunakan marka RAPD. *J.Agroekoteknologi. 3(1) : 350-358.*

Siregar. 2011. Studi Pemecahan Dormansi Benih Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium). Lembaga Penelitian Universitas HKBP Nommensen. Medan.

Sulandri S & MSA Zein. 2003.Panduan Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi LIPI. Bogor

Wicaksono BD, Yohana AH, Enos T, Irawan W, Dina Y, Aldrin N,Ferry S. 2009. *Antiproliferative effect of the methanol extract of Piper crocatum ruiz &pav leaves on human breast (T47D)cells In- vitro*. Trop J Pharm Res 8:345-352.

William. JG. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetik markers. *Nucleic Acids Res* 18(22):6531-5.

Yuwono, T., 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Penerbit Andi.Yogyakarta