

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. ISOLASI GENOM JARAK PAGAR

Genom jarak pagar diisolasi dari daun jarak pagar muda yang diambil dari daun pertama pada pucuk. Genom merupakan seluruh materi DNA pada suatu organisme. Isolasi genom dilakukan dengan metode Bosquet (1990) (*lihat Roy dkk. 1992: 174*). Hasil isolasi genom delapan sampel jarak pagar dari Padang, Kupang, Merauke, Jayapura, Kendari, Gunung Kidul, Tangerang, dan Purwakarta dapat dilihat pada gel elektroforesis agarosa 0,8% dengan pewarna SYBR safe (Gambar 8). Menurut Sambrook dan Russell (2001: A9.7), pewarna SYBR safe membuat DNA berpendar di bawah sinar UV. Pita DNA yang berpendar pada gel agarosa menunjukkan hasil positif bahwa terdapat DNA pada setiap lajur dengan ukuran 23 kb (berdasarkan marka λ HindIII). Menurut Manubens *dkk.* (1999: 258), hasil isolasi DNA genom tanaman *nectarine* dan persik diperoleh pita DNA dengan ukuran sekitar 23 kb (marka λ HindIII). Oleh karena itu, isolasi genom jarak pagar telah berhasil dilakukan dengan diperolehnya pita DNA pada ukuran 23 kb.

Isolasi genom menggunakan *buffer* ekstraksi yang mengandung CTAB. *Cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) merupakan detergen yang dapat melisiskan membran sel dan mampu mengendapkan polisakarida serta

senyawa fenolik yang terdapat pada tanaman jarak pagar. Kemampuan CTAB mengendapkan polisakarida dan senyawa fenolik dipengaruhi oleh konsentrasi garam. Jika konsentrasi garam pada *buffer* lebih dari 0,5 M maka CTAB dapat mengendapkan polisakarida dan senyawa fenolik serta membentuk kompleks dengan DNA. Konsentrasi garam yang digunakan pada isolasi genom jarak pagar ialah 1,26 M sehingga polisakarida dan senyawa fenolik pada jarak pagar dapat diendapkan (Moore & Dowhan 2002: 2.3.5--2.3.6).

Genom jarak pagar dimurnikan dengan senyawa kloroform isoamilalkohol (24:1) untuk mengekstraksi protein dan RNase yang berfungsi melisiskan RNA. Presipitasi DNA menggunakan isopropanol dan etanol absolut yang berfungsi mengendapkan DNA dan memisahkan genom dari garam-garam mineral, serta melarutkan sisa CTAB (Weising *dkk.* 1995: 52;). Pemurnian tersebut bertujuan menghilangkan senyawa-senyawa yang dapat menghambat reaksi enzimatik pada proses AFLP.

Menurut Weising *dkk.* (1995: 75), konsentrasi DNA dapat dihitung dengan membandingkan intensitas terang pita dan ketebalan pita DNA pada gel agarosa dengan pita DNA pada marka DNA yang telah diketahui konsentrasinya. Pita DNA sampel jarak pagar dibandingkan dengan pita DNA marka λ *HindIII* ukuran 23.130 pb. Perbandingan pita dilakukan dengan bantuan *software* BIO1D sehingga didapatkan persentase volume DNA sampel yaitu besar perbandingan pita marka λ *HindIII* ukuran 23.130 pb

dengan pita DNA sampel. Persentase volume DNA sampel yang diperoleh berkisar antara 40,846--122,83% (Tabel 1).

Konsentrasi hasil isolasi genom tertinggi diperoleh dari sampel Jayapura yaitu 97,62 ng/μl, sedangkan sampel Tangerang memiliki konsentrasi genom terendah yaitu 32,46 ng/μl. Perhitungan konsentrasi DNA dan persentase volume dapat dilihat pada Lampiran 1. Total DNA per gram berat daun yang didapatkan berkisar antara 3.655,51--24.405 ng/g (Tabel 2). Menurut Moore dan Dowhan (2002: 2.3.6) dan Krizman *dkk.* (2006: 430), jumlah total DNA yang diperoleh dapat diperbanyak dengan menaikkan konsentrasi NaCl pada *buffer* ekstraksi dan memodifikasi suhu serta waktu dalam tahap presipitasi DNA dengan etanol absolut.

Berdasarkan hasil perhitungan konsentrasi genom pada Lampiran 1, konsentrasi DNA kemudian disesuaikan menjadi 14 ng/μl untuk proses AFLP selanjutnya. Penyesuaian konsentrasi DNA dilakukan dengan cara mengencerkan konsentrasi DNA hasil isolasi. Proses AFLP membutuhkan konsentrasi DNA 13,89 ng/μl (Invitrogen 2003: 14). Tujuan penyesuaian konsentrasi setiap sampel adalah agar tidak terjadi kesalahan interpretasi pita, karena pita yang dihasilkan tidak jelas. Komposisi pengenceran genom dapat dilihat pada Tabel 3 dan Lampiran 2.

B. AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP) PADA TANAMAN JARAK PAGAR

Teknik AFLP dapat mendeteksi polimorfisme pada sampel jarak pagar dengan menganalisis seluruh genom. Menurut Omoto dan Lurquin (2004: 123), polimorfisme pada AFLP dideteksi dengan adanya perbedaan ukuran fragmen DNA. Polimorfisme yang dihasilkan menunjukkan adanya perbedaan letak marka AFLP (urutan basa pengenalan enzim restriksi *EcoRI* dan *MseI* dan primer selektif) sehingga dapat diperoleh informasi perbedaan genetik pada setiap sampel. Perbedaan ukuran fragmen DNA menghasilkan suatu pola pita DNA tertentu. Teknik AFLP diawali dengan memotong genom jarak pagar dengan enzim *EcoRI* dan *MseI*. Jarak pagar termasuk organisme eukariot yang memiliki basa adenin dan timin yang lebih tinggi daripada basa guanin dan sitosin. Analisis AFLP dengan enzim *EcoRI* dan *MseI* bertujuan agar polimorfisme yang didapatkan lebih rinci karena komposisi basa adenin dan timin pada kedua enzim (*EcoRI* dan *MseI*) lebih tinggi daripada basa guanin dan sitosin (Vos *dkk.* 1995: 4409). Komposisi digesti dapat dilihat pada Lampiran 3.

Fragmen hasil digesti kemudian diligasi dengan *adapter*. *Adapter* merupakan DNA untai ganda yang memiliki panjang sekitar 20 pb. Terdapat dua jenis *adapter* yaitu *adapter* untuk ujung pemotongan *EcoRI* dengan kelebihan basa AATT pada ujung 5' dan ujung pemotongan *MseI* dengan kelebihan basa TA pada ujung 5' (Gambar 9). Proses ligasi dilakukan

dengan bantuan enzim T4 DNA ligase yaitu membentuk ikatan fosfodiester antara ujung 5' (ujung fosfat) dan ujung 3' (ujung OH) pada untai DNA (Gambar 10) (Struhl 1993: 3.14.1). Adapter berfungsi menyamakan dua ujung fragmen hasil digesti dan sebagai tempat menempelnya primer untuk proses amplifikasi selanjutnya. Hasil positif ligasi dapat dilihat pada akhir proses AFLP karena urutan basa pada *adapter* berkomplemen dengan urutan basa pada primer sehingga bila proses ligasi gagal maka proses amplifikasi tidak akan berjalan. Reaksi ligasi dapat dilihat pada Lampiran 4 (Saunders *dkk.* 2001: 4).

Fragmen hasil ligasi kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR. Amplifikasi pada AFLP dibagi menjadi dua tahap yaitu preamplifikasi dan amplifikasi selektif. Preamplifikasi dilakukan dengan primer selektif yang memiliki tambahan basa A pada primer *EcoRI* (E-A) dan basa C pada primer *MseI* (M-C) (Gambar 11). Reaksi preamplifikasi dapat dilihat pada Lampiran 5. Menurut Vos *dkk.* (1995: 4412), preamplifikasi bertujuan mengurangi kompleksitas fragmen hasil digesti, sehingga tidak terjadi kesalahan penempelan primer pada amplifikasi selektif dan mengurangi hasil pita *smear* pada elektroforesis gel poliakrilamid.

Amplifikasi selektif dilakukan dengan primer selektif yang memiliki tambahan 3 basa pada ujung 3'. Primer selektif adalah primer yang berfungsi menyeleksi fragmen hasil digesti dengan adanya basa-basa selektif pada ujung 3'. Terdapat 4 jenis primer selektif yang digunakan yaitu pada ujung potongan *EcoRI* dan 4 jenis primer pada ujung potongan *MseI*. Kombinasi 16

pasang primer selektif dapat dilihat pada Lampiran 6. Kombinasi primer digunakan untuk melihat polimorfisme (pola pita) secara lengkap. Masing-masing primer memiliki komposisi basa-basa primer selektif. Basa-basa selektif pada primer melekat pada fragmen hasil digesti yang memiliki basa-basa berkomplemen. Perbedaan basa-basa selektif pada setiap primer mengakibatkan perbedaan amplifikasi fragmen, sehingga menghasilkan perbedaan pita berdasarkan ukuran pita yang dihasilkan dari masing-masing sampel. Perbedaan ukuran pita menggambarkan polimorfisme dari sampel jarak pagar (Saunders *dkk.* 2001: 4). Reaksi amplifikasi selektif dapat dilihat pada Lampiran 7.

Siklus amplifikasi selektif menggunakan salah satu teknik PCR yaitu *touchdown* PCR. Menurut Sambrook dan Russel (2001: 8.112), *touchdown* PCR merupakan teknik PCR untuk mengoptimasi amplifikasi DNA bila digunakan dua primer yang belum diketahui secara pasti suhu *melting*-nya primer tersebut dan tidak diketahui posisi sekuen target pada sampel. Penggunaan *touchdown* PCR pada penelitian karena belum diketahuinya suhu *melting* primer selektif yang digunakan dan posisi sekuen target yang akan diamplifikasi tersebar pada seluruh genom.

C. ELEKTROFORESIS GEL POLIAKRILAMID 6% DAN PEWARNA

SILVER

Elektroforesis gel poliakrilamida pada penelitian bertujuan memisahkan fragmen hasil amplifikasi selektif. Teknik AFLP menggunakan

elektroforesis gel poliakrilamida agar pita DNA dengan perbedaan satu basa pada setiap sampel dapat dianalisis (Saunders *dkk.* 2001: 7). Gel poliakrilamid memiliki pori-pori yang lebih kecil daripada gel agarosa sehingga dapat memisahkan pita DNA yang berukuran relatif kecil (5--500 pb) dan mampu memisahkan fragmen dengan perbedaan satu basa (Sambrook & Russell 2001: 5.4; 5.40). Fragmen pada gel poliakrilamida diwarnai dengan pewarna *silver* sehingga dihasilkan pita-pita DNA.

Berdasarkan pengamatan, hasil pewarnaan *silver* pada penelitian diperoleh pita dengan warna hitam dan cokelat dengan latar berwarna kuning kecokelatan. Hasil pewarnaan *silver* dan interpretasi pita dapat dilihat pada Gambar 12--27. Pewarna *silver* mewarnai fragmen DNA menjadi warna abu-abu atau cokelat. *Silver nitrate* yang telah mengisi gel poliakrilamid direduksi dengan penambahan *alkaline formaldehyde* dan *sodium thiosulfate* menjadi *metallic silver*. Pewarna *silver* digunakan dalam AFLP karena memiliki sensitivitas tinggi dalam mewarnai DNA yaitu dapat mewarnai dengan kuantitas DNA antara 2--5 ng (Sambrook & Russell 2001: A9.5--A9.6).

D. ANALISIS PITA AFLP JARAK PAGAR

Pita-pita DNA dari seluruh primer diterjemahkan ke dalam bentuk data binari yaitu dengan memberi angka 1 bila terdapat pita dan angka 0 bila tidak terdapat pita. Berdasarkan data binari tersebut, jumlah seluruh pita dihitung. Hasil pita yang didapatkan dari 16 pasang primer dan delapan sampel adalah 8.494 pita (Tabel 4). Ukuran pita berkisar antara 150--1.000 pb berdasarkan

pada marka *ladder* 1 kb dan marka *ladder* 50 pb. Menurut Vos *dkk.* (1995: 4410), kisaran ukuran pita dalam penelitian AFLP terhadap genom manusia, *Arabidopsis thaliana*, jagung, dan tomat adalah 45 sampai 500 pb. Kisaran ukuran pita yang dihasilkan oleh genom jarak pagar lebih besar dari 500 pb. Besarnya ukuran pita mungkin disebabkan oleh enzim yang digunakan pada amplifikasi selektif yaitu *Long DNA polymerase*. Enzim *Long DNA polymerase* mampu mengamplifikasi DNA sampai 21 kb. Hasil pita AFLP (Gambar 12--27) dengan berbagai ukuran menunjukkan bahwa proses digesti dengan enzim restriksi, ligasi *adapter*, preamplifikasi, dan amplifikasi selektif telah berhasil dilakukan.

Berdasarkan lokasi pita pada sampel jarak pagar maka pita-pita AFLP dapat dibagi menjadi dua, yaitu pita umum (pita yang terdapat pada setiap sampel) dan pita polimorfis (pita yang hanya terdapat pada satu atau beberapa sampel). Sebagai contoh, pada Gambar 12 (lajur 1, 3, 6, dan 7 hasil interpretasi pita) pada baris paling atas terdapat pita yang dimiliki oleh sampel Padang, Merauke, Tangerang, dan Gunung Kidul, tetapi pita tidak terdapat pada sampel Kupang, Jayapura, Kendari, dan Purwakarta. Baris keempat dari atas terdapat pita di setiap lajur yang merupakan pita umum (Gambar 12). Polimorfisme ditandai dengan ada dan tidak adanya pita pada suatu sampel yang disebabkan oleh perbedaan ukuran pita yang dihasilkan oleh setiap sampel (Wang *dkk.* 2003: 2855). Berdasarkan hasil pola pita-pita AFLP dapat disimpulkan bahwa terdapat polimorfisme pada delapan sampel jarak pagar. Pita polimorfis AFLP yang dihasilkan tidak dapat ditentukan

sebagai alel atau lokus tertentu karena analisis dilakukan pada seluruh genom. Pita polimorfis yang didapatkan tidak dapat dijadikan dasar perbandingan karakter fenotipe secara langsung (Mba & Tohme 2005: 190).

Primer selektif digunakan untuk menyeleksi fragmen berdasarkan komposisi basa-basa pada primer. Perbedaan komposisi basa pada primer menghasilkan perbedaan fragmen yang teramplifikasi. Perbedaan fragmen tersebut kemudian dibedakan berdasarkan ukuran. Berdasarkan hasil pola pita yang diperoleh oleh setiap primer, tidak ada pola pita yang identik antar sampel sehingga setiap primer menghasilkan pola pita yang unik untuk masing-masing sampel. Menurut Loh *dkk.* (2000: 375), setiap pasangan primer mampu menghasilkan pola pita yang spesifik untuk setiap sampel sehingga dapat digunakan sebagai identitas sampel. Perbedaan pola pita dapat menggambarkan perbedaan genetik pada setiap sampel jarak pagar.

Perbedaan pola pita dapat ditunjukkan dalam perbedaan jumlah pita yang dihasilkan. Jumlah pita yang dihasilkan oleh setiap 16 pasang primer berkisar antara 236--835 pita (Tabel 4). Jumlah pita terbanyak dihasilkan oleh pasangan primer E-AAG dan M-CTA yaitu 835 pita, sedangkan jumlah pita terendah dihasilkan oleh pasangan primer E-ACG dan M-CTG yaitu 236 pita (Tabel 4). Berdasarkan banyak jumlah pita yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa frekuensi marka E-AAG dan M-CTA pada genom jarak pagar lebih tinggi daripada marka E-ACG dan M-CTG. Menurut Restropo *dkk.* (1999: 109), komposisi basa selektif pada primer akan mempengaruhi jumlah pita DNA hasil AFLP. Primer dengan basa sitosin atau guanin yang

lebih banyak menghasilkan jumlah pita yang lebih sedikit daripada primer dengan komposisi basa adenin dan timin yang lebih banyak, karena basa sitosin dan guanin lebih selektif dalam mengamplifikasi fragmen.

Jumlah seluruh baris pita-pita AFLP dari 16 pasang primer adalah 1.468 baris. Dari seluruh baris tersebut terdapat 532 baris yang mengandung pita umum (*common band*). Jumlah baris yang mengandung pita polimorfis adalah 936. Persentase baris dengan pita polimorfis dihitung dan diperoleh kisaran persentase antara 40,68--89,06%. Rata-rata persentase baris polimorfis seluruh pasangan primer adalah 63,76% (Tabel 5). Persentase polimorfisme diperoleh berdasarkan perbandingan jumlah baris yang mengandung pita polimorfis dengan jumlah baris yang mengandung seluruh pita, kemudian dikalikan 100%.

Urutan basa pada primer selektif juga memiliki peranan dalam menggambarkan polimorfisme. Pasangan primer E-ACA dan M-CAC menghasilkan persentase polimorfisme 40,68%, tetapi perubahan satu basa pada primer M-CAC menjadi M-CAG menghasilkan persentase polimorfisme yang lebih tinggi (74,6%). Berdasarkan hasil tersebut maka dapat disimpulkan bahwa komposisi dan urutan basa-basa selektif berpengaruh terhadap hasil persentase polimorfisme dalam melihat variasi genetik sampel jarak pagar.

Berdasarkan penelitian Chen *dkk.* (2004: 160--164), diperoleh persentase polimorfisme sebesar 70% dari 30 kultivar *Aglaonema* dengan 6 pasang primer. Hasil penelitian Chen *dkk.* menunjukkan bahwa ke-6

pasang primer yang digunakan dapat menggambarkan perbedaan genetik dengan persentase polimorfisme 70%. Berdasarkan hasil tersebut, Chen *dkk.* berhasil membedakan secara identik masing-masing kultivar *Aglaonema*. Berdasarkan hasil rata-rata persentase polimorfisme jarak pagar (63,76%), maka dapat disimpulkan bahwa jarak pagar dari setiap sampel dapat dibedakan secara genetik.

Penelitian dengan menggunakan marka AFLP untuk mendeteksi polimorfisme pada beberapa spesies tanaman telah dilakukan. Aggarwal *dkk.* (2002) (*lihat* Chen *dkk.* 2004: 160) mengidentifikasi 501 marka AFLP dari *Oryza sativa* L. dengan persentase polimorfisme 65%. Singh *dkk.* (1999) (*lihat* Chen *dkk.* 2004: 160) menghasilkan 422 pita dari *Azadiracht indica* A. Juss dengan persentase polimorfisme 70%. Tomkins *dkk.* (2001) (*lihat* Chen *dkk.* 2004: 160) menghasilkan persentase polimorfisme 79% pada *Hemerocallis* spp. Menurut Vergara dan Bughrara (2003: 2165), tingginya tingkat polimorfisme menunjukkan tingginya keragaman genetik. Oleh karena itu, hasil persentase polimorfisme delapan sampel jarak pagar yang diperoleh memiliki keragaman genetik yang tinggi. Keragaman genetik tersebut dapat digambarkan dengan tingginya persentase polimorfisme.

Pita-pita polimorfis yang dihasilkan juga menunjukkan pita-pita spesifik yang hanya terdapat pada sampel tertentu dengan primer tertentu, dan tidak terdapat pada sampel lain dengan primer yang lain. Sebagai contoh pada Gambar 12 lajur 1 (*lihat* hasil interpretasi pita) terdapat 9 pita berwarna merah yang menunjukkan pita spesifik. Jumlah pita spesifik yang dihasilkan adalah

120 pita dari seluruh primer dan sampel (Tabel 5). Pita spesifik terbanyak dihasilkan oleh primer E-ACA dan M-CAG yaitu 17 pita dengan 5 pita pada sampel Padang dan 12 pita pada sampel Merauke. Primer E-AAG dan M-CTG tidak menghasilkan pita spesifik, karena pada setiap sampel jarak pagar tidak terdapat urutan basa primer E-ACA dan M-CAG secara spesifik.

Berdasarkan penelitian Loh *dkk.* (2000: 373--375) terhadap kultivar *Caladium bicolor* dengan marka AFLP diperoleh pita spesifik sebanyak 173 pita. Marka spesifik AFLP dapat digunakan untuk mempermudah identifikasi dan mendapatkan paten. Jumlah pita spesifik yang dihasilkan pada penelitian AFLP terhadap jarak pagar adalah 120 pita dan masing-masing sampel memiliki pita-pita spesifik. Ukuran pita-pita spesifik dapat dilihat pada Tabel 7. Jumlah pita spesifik terbanyak ditemukan pada sampel Padang yaitu 54 pita dari seluruh pasangan primer dan jumlah pita terendah ditemukan pada sampel Jayapura yaitu 1 pita dari pasangan primer E-AAG dan M-CTA. Berdasarkan hasil pita spesifik tersebut maka dapat disimpulkan bahwa dengan teknik AFLP dapat menggambarkan keunikan sampel jarak pagar secara genetik.

Sebagai contoh, sampel Padang dapat diidentifikasi bila terdapat pita berukuran ± 474 pb dengan amplifikasi oleh primer E-ACA dan M-CTG (Gambar 12). Sampel Kupang dan Gunung Kidul dapat diidentifikasi bila terdapat pita berukuran ± 772 pb dan ± 216 pb dengan amplifikasi oleh primer E-ACG dan M-CAC (Gambar 13). Sampel Merauke dan Purwakarta dapat diidentifikasi bila terdapat pita berukuran ± 318 pb dan ± 280 pb dengan

amplifikasi oleh primer E-ACG dan M-CAG (Gambar 14). Sampel Jayapura dapat diidentifikasi bila terdapat pita berukuran ± 757 pb dan diamplifikasi oleh primer E-AAG dan M-CTA (Gambar 15). Sampel Kendari dapat diidentifikasi bila terdapat pita berukuran ± 675 pb dan diamplifikasi oleh primer E-ACG dan M-CTA (Gambar 16). Sampel Tangerang dapat diidentifikasi bila terdapat pita berukuran ± 650 pb dan diamplifikasi oleh primer E-ACA dan M-CAC (Gambar 17).

Besar ukuran pita ditentukan dengan bantuan *software* BIO1D. Prinsip perhitungan ukuran pita adalah membandingkan marka DNA 1 kb *ladder* dan 50 bp *ladder* dengan posisi pita spesifik. Analisis pita AFLP tidak dapat dilanjutkan sampai pembacaan urutan basa-basa DNA pada pita spesifik karena belum diketahuinya urutan basa primer selektif.

Keunikan genetik jarak pagar kemungkinan disebabkan oleh mutasi DNA dan rekombinasi. Mutasi DNA dan rekombinasi secara seksual merupakan faktor utama terjadinya variasi genetik (Indrawan *dkk.* 2007: 24--25). Teknik AFLP tidak menganalisis gen-gen tertentu, tetapi hanya menganalisis seluruh genom jarak pagar melalui pola pita yang terbentuk sehingga keunikan genetik yang diperoleh tidak dapat langsung diterjemahkan ke dalam karakter fenotipe. Menurut Griffiths *dkk.* (2000: 754), karakter fenotipe dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Oleh karena itu, data variasi genetik jarak pagar yang telah dilakukan dengan marka AFLP perlu dibandingkan dengan analisis faktor lingkungan sehingga dapat digunakan untuk menganalisis karakter fenotipe jarak pagar.

E. ANALISIS DENDOGRAM HASIL PITA-PITA AFLP DENGAN METODE *NEIGHBOR JOINING*

Pita-pita DNA dari seluruh primer diterjemahkan ke dalam bentuk data binari yaitu dengan memberi angka 1 bila terdapat pita dan angka 0 bila tidak terdapat pita. Data binari kemudian diolah dengan bantuan *software* PAUP*, sehingga didapatkan dendogram seperti pada Gambar 28. Dendogram merupakan topologi pohon filogenetik yang menggambarkan percabangan dan pengelompokan (*clustering*) sampel dengan OTU yang berderet rata secara vertikal pada satu sisi pohon. Berdasarkan dendogram, maka dapat diketahui pola percabangan dan pengelompokan sampel berdasarkan marka molekular AFLP. *Software* PAUP* menganalisis data binari menjadi dendogram dengan menggunakan perhitungan *distance matrix neighbor joining*. Algoritma *neighbor joining* akan mengelompokkan dua sampel yang memiliki kemiripan pola pita, kemudian dibandingkan dengan sampel yang memiliki kemiripan dengan kelompok pertama sampai delapan sampel dikelompokkan menjadi satu dendogram.

Hasil dendogram menunjukkan bahwa dari delapan sampel jarak pagar, terdapat dua *cluster* besar yaitu *cluster* A yang terdiri atas sampel Padang dan Merauke dan *cluster* B yang terdiri atas sampel Kupang, Jayapura, Kendari, Tangerang, Gunung Kidul, dan Purwakarta. *Cluster* B dibagi menjadi dua *cluster* yaitu *cluster* B1 yang terdiri atas sampel Kupang, Jayapura, dan Kendari dan *cluster* B2 yang terdiri atas sampel Tangerang,

Gunung Kidul, dan Purwakarta. *Cluster* B1 terdapat sampel Kupang yang berdiri sendiri dan tidak termasuk dalam kelompok Jayapura dan Kendari. *Cluster* B2 juga terdapat sampel Purwakarta yang berdiri sendiri dan tidak termasuk dalam kelompok Gunung Kidul dan Tangerang. Analisis dendogram menggunakan *outgroup* dari tanaman karet klon PB 260 sebagai pembanding. Karet digunakan sebagai *outgroup* karena termasuk dalam famili Euphorbiaceae, satu famili dengan jarak pagar.

Setiap cabang pada dendogram dilakukan analisis kepercayaan cabang dengan metode *bootstrap*. *Bootstrap* menganalisis setiap cabang dengan cara mensubstitusi data binari dan dibuat pohon baru (Hall 2004: 50). Analisis tersebut dilakukan sampai 1.000 kali. Menurut Felsenstein (1985: 783), nilai *bootstrap* $\geq 95\%$ pada suatu cabang menunjukkan tingkat kepercayaan suatu cabang. Berdasarkan pernyataan tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa antara *cluster* A dan *cluster* B serta *outgroup* karet klon PB 260 berbeda dengan nilai *bootstrap* 100%. Percabangan *cluster* B1 dan B2 memiliki nilai *bootstrap* 87%. *Cluster* B1 terdiri atas sampel Kupang dan kelompok Jayapura dan Kendari dengan nilai *bootstrap* 86%. Kelompok sampel Jayapura dan Kendari memiliki kemiripan genetik yang lebih tinggi dibandingkan sampel Kupang. *Cluster* B2 terdiri atas sampel Purwakarta dan kelompok Tangerang dan Gunung Kidul dengan nilai *bootstrap* 99%. Kelompok sampel Tangerang dan Gunung Kidul memiliki kemiripan genetik yang lebih tinggi dibandingkan sampel Purwakarta. Nilai *bootstrap* dapat dilihat pada Gambar 28.

Pengelompokan sampel jarak pagar berdasarkan marka AFLP menunjukkan perbedaan dan kemiripan genetik antar sampel. Perbedaan dan kemiripan genetik tersebut dihasilkan berdasarkan pola pita DNA (Mueller & Wolfenbarger 1999: 389). Sampel yang tergolong dalam satu *cluster* atau satu kelompok memiliki pola pita yang mirip seperti sampel Padang dan Merauke.

Berdasarkan letak geografis, sampel Padang dan Merauke terletak berjauhan yaitu Padang berada di Pulau Sumatera (Indonesia bagian barat), sedangkan Merauke berada di Pulau Papua (Indonesia bagian timur), tetapi berdasarkan dendrogram kedua sampel tersebut memiliki kemiripan secara genetik. Menurut de Padua *dkk.* (1999: 320), jarak pagar berasal dari Amerika Tengah dan mulai masuk ke benua Asia melalui Filipina sebelum tahun 1750, dan mulai dikenalkan di Indonesia oleh bangsa Jepang pada tahun 1942-an, sehingga penyebaran jarak pagar kemungkinan dipengaruhi oleh manusia (Hambali *dkk.* 2006: 9). Individu jarak pagar yang digunakan tidak dapat mewakili populasi dari masing-masing daerah, oleh karena itu tidak dapat dilakukan analisis penyebaran jarak pagar dari delapan daerah tersebut. Data pita AFLP yang didapatkan tidak dapat digunakan untuk menggambarkan proses evolusi jarak pagar. Kemiripan genetik jarak pagar dari Padang dan Merauke dapat terjadi karena adanya campur tangan manusia dalam penyebaran jarak pagar, sehingga terdapat kemungkinan jarak pagar dari Merauke berasal dari Padang atau sebaliknya.

Menurut Mathius *dkk.* (2002: 46), ada keterkaitan antara karakter fenotipe dan pengelompokan secara genetik berdasarkan marka AFLP. Berdasarkan penelitian Mathius *dkk.*, marka AFLP dapat membedakan dua kelompok tanaman karet yang resistan dengan tanaman karet yang rentan terhadap patogen *Corynespora asiicola*. Perbedaan antara kedua kelompok tersebut digambarkan dalam bentuk dendogram yang mengelompokkan tanaman karet yang resistan menjadi satu *cluster* dan tanaman yang resisten dikelompokkan dalam *cluster* lain.

Berdasarkan data penelitian dilakukan perbandingan antara data rendemen minyak dan dendogram hasil pita AFLP. Rendemen minyak pada sampel Tangerang, Gunung Kidul, dan Purwakarta adalah 19--20%, sedangkan rendemen minyak sampel lain berkisar antara 30--35% (kecuali sampel Kendari 35--40%) [Komunikasi pribadi: Tajuddin 2007]. Jika dihubungkan dengan pengelompokan pada dendogram (Gambar 28), maka *cluster* B2 memiliki kemiripan karakter rendemen minyak yaitu 19--20%.

Menurut Kaushik *dkk.* (2007: 497), kandungan minyak dipengaruhi oleh faktor hereditas sebesar 99%, tetapi faktor lingkungan berperan penting dalam kandungan minyak pada jarak pagar. Faktor lingkungan yang memengaruhi rendemen minyak jarak pagar adalah curah hujan, suhu, dan kondisi tanah. Oleh karena itu, perbedaan secara genetik pada sampel jarak pagar dari Padang, Merauke, Kupang, Jayapura, dan Kendari tidak terekspresi pada karakter rendemen minyak. Kemiripan jumlah rendemen

minyak pada sampel Padang, Merauke, Kupang, Jayapura, dan Kendari kemungkinan disebabkan oleh faktor lingkungan.

Menurut Pant *dkk.* (2006: 34), faktor lingkungan memengaruhi rendemen minyak dan panen biji jarak pagar. Berdasarkan hasil penelitian Pant *dkk.* tinggi lahan dari permukaan air laut dan kondisi tanah memengaruhi rendemen minyak. Jarak pagar yang ditanam di tanah yang gersang atau lahan kritis dengan ketinggian 400--600m dari permukaan laut menghasilkan rendemen minyak tertinggi yaitu 45% sedangkan jarak pagar yang ditanam di tanah yang subur dengan ketinggian lahan 800--1.000 m hanya menghasilkan rendemen minyak sebesar 22,86%.

Heller (1996: 34) menyatakan tujuan utama melakukan perkawinan silang pada jarak pagar adalah meningkatkan panen minyak. Menurut Mian *dkk.* (2005: 2591), pengelompokan berdasarkan data AFLP dapat dijadikan dasar program penyilangan untuk mendapatkan variasi genetik yang tinggi dan diharapkan juga terekspresi pada karakter fenotipe. Oleh karena itu, hasil dendogram AFLP jarak pagar diharapkan dapat digunakan sebagai dasar untuk melakukan rekombinasi agar didapatkan karakter fenotipe untuk meningkatkan panen minyak jarak pagar.