

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* L.)

Tanaman jarak pagar memiliki klasifikasi sebagai berikut:

*Kingdom* : Plantae  
*Division* : Spermatophyta  
*Subdivision* : Angiospermae  
*Class* : Dicotyledoneae  
*Order* : Geraniales  
*Suborder* : Tricocceae  
*Family* : Euphorbiaceae  
*Genus* : *Jatropha*  
*Spesies* : *Jatropha curcas* L.

(Lawrence 1963: 217; 370; 439; 549; 566).

Tanaman jarak pagar termasuk famili Euphorbiaceae, satu famili dengan karet dan ubikayu. Nama genus *Jatropha* berasal dari bahasa Yunani *iatrós* (dokter) dan *trophé* (makanan), yang menyatakan kegunaan dalam pengobatan. Nama *curcas* adalah nama umum untuk biji obat pencahar di Malabar, India. Jumlah kromosom jarak pagar adalah  $2n= 22$  (Heller 1996: 9; 33). Tanaman jarak pagar merupakan tanaman tahunan yang tahan kekeringan. Jarak pagar mampu tumbuh cepat dan kuat di lahan

yang beriklim panas, tandus, dan berbatu. Wilayah yang cocok sebagai tempat tumbuhnya adalah di dataran rendah hingga ketinggian 300 m di atas permukaan laut. Tanaman jarak pagar dapat tumbuh hingga ketinggian 1.000 m di atas permukaan laut dengan suhu sekitar 18--28,5° C. Jarak pagar merupakan tumbuhan perdu dengan tinggi 1,5--5 m dengan ranting bulat dan tebal (Hambali *dkk.* 2006: 3--6).

Tanaman jarak pagar adalah tanaman berumah satu atau terkadang berumah dua dan memiliki bunga uniseksual, bentuk bunga mirip cawan berwarna hijau kekuningan. Penyerbukan dilakukan oleh serangga ngengat. Pembentukan buah memerlukan waktu 90 hari yaitu dari pembungaan sampai pemasakan biji. Buah jarak pagar berbentuk bulat, mempunyai tiga rongga yang panjangnya 2 cm dan tebalnya 1 cm, berwarna kuning dan berubah menjadi hitam bila sudah matang. Bagian-bagian tanaman jarak pagar dapat dilihat pada Gambar 1 (de Padua *dkk.* 1999: 322--323).

Selain biji jarak, bagian tanaman jarak pagar yang lain juga memiliki kegunaan. Bagian bungkil biji dapat dijadikan pakan ternak setelah proses detoksifikasi, kulit biji dapat diproses menjadi biogas. Selain itu, getah pada batang digunakan untuk penyembuh luka, dan daun jarak pagar dapat digunakan sebagai antiseptik (Gambar 2) (Gubitz *dkk.* 1999: 73).

Jarak pagar adalah tanaman asli Amerika Latin yang menyebar luas di berbagai daerah kering, semi kering dan sub-tropik dan tropik di seluruh dunia (Heller 1996: 35; Djogo 2006: 1). Jarak pagar diperkenalkan oleh bangsa Jepang pada tahun 1942-an sebagai bahan bakar kendaraan perang.

Tanaman jarak pagar banyak ditanam masyarakat sebagai pagar pekarangan dan cocok untuk reboisasi hutan. Indonesia memiliki berbagai jenis tanaman jarak antara lain jarak kepyar (*Ricinus communis* L.), jarak bali (*Jatropha podagrica* Hook.), jarak ulung (*Jatropha gossypifolia* L.) dan jarak pagar (*Jatropha curcas* L.). Di antara jenis tanaman jarak tersebut yang memiliki potensi sebagai penghasil minyak bakar (*biofuel*) adalah jarak pagar (*J. curcas*) (Hambali *dkk.* 2006: 9).

Tanaman jarak pagar dapat menghasilkan 4--12 ton biji/ha per tahun dengan kadar minyak 40% dalam lima tahun. Kandungan asam lemak biji jarak pagar adalah asam miristat (14:1) 0--0,1%, asam palmitat (16:0) 14,1--15,3%, asam stearat (18:0) 3,7--9,8%, asam *arachidic* (20:0) 0--0,3%, asam *behedic* (22:0) 0--0,2%, asam palmitoleat (16:1) 0--1,3%, asam oleat (18:1) 34,3--45,8%, asam linoleat (18:2) 29,0--44,2%, dan asam linolenat (18:3) 0--0,3% (Hambali *dkk.* 2006: 47).

Minyak biji jarak pagar diekstraksi dengan alat penekan biji yang akan mengeluarkan minyak dari biji jarak. Minyak yang didapatkan kemudian diproses lebih lanjut untuk menghasilkan biodiesel. Proses pembuatan biodiesel dari minyak nabati disebut transesterifikasi. Transesterifikasi merupakan perubahan bentuk dari satu jenis ester (trigliserida) menjadi bentuk ester yang lain (gliserol). Satu molekul minyak nabati terdiri atas tiga ester yang terikat pada molekul gliserol. Sekitar 20% molekul minyak nabati adalah gliserol (Haryati *dkk.* 1993: 67).

Reaksi transesterifikasi mereaksikan satu mol trigliserida dengan tiga mol alkohol untuk membentuk satu mol gliserol dan tiga mol alkil ester asam lemak berikutnya. Reaksi transesterifikasi adalah reaksi kesetimbangan, sehingga dibutuhkan alkohol dalam jumlah berlebih untuk mendorong reaksi agar menghasilkan metil ester (biodiesel). Katalis yang digunakan dalam reaksi adalah KOH dan NaOH (Gambar 3) (Hambali *dkk.* 2006: 58; 61).

Sampel jarak pagar dari daerah Padang, Merauke, Kupang, dan Jayapura memiliki rendemen minyak antara 30--35%. Sampel dari daerah Kendari memiliki rendemen minyak tertinggi yaitu 35--40%. Sampel dari daerah Purwakarta, Gunung Kidul, dan Tangerang memiliki rendemen minyak antara 19--20% [Komunikasi pribadi: Tadjuddin 2007].

## **B. AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP)**

Teknik AFLP merupakan suatu teknik untuk membuat *fingerprint* DNA genom. Menurut Mueller dan Wolfenbarger (1999: 389), AFLP dapat mendeteksi variasi dan keragaman genetik pada makhluk hidup pada tingkat antar individu, spesies, dan populasi berdasarkan kesamaan atau perbedaan pola pita. Prinsip dasar teknik AFLP adalah mengamplifikasi secara selektif fragmen hasil digesti dengan dua enzim restriksi (Gambar 4). Polimorfisme dapat dideteksi dari perbedaan letak situs pemotongan dua enzim restriksi (*EcoRI* dan *MseI*) dan komposisi basa pada primer selektif (Invitrogen 2003: 2).

Menurut Vos *dkk.* (1995: 4409), organisme eukariot memiliki komposisi basa adenin dan timin yang lebih tinggi daripada basa guanin dan sitosin, sehingga untuk menganalisis genom eukariot digunakan enzim restriksi yang memiliki basa pengenalan dengan komposisi basa A dan T yang lebih banyak agar polimorfisme yang dihasilkan lebih rinci. Digesti AFLP menggunakan enzim dengan basa pengenalan jarang (*rare cutter*) dan basa pengenalan yang sering (*frequent cutter*). Enzim *rare cutter* adalah enzim *EcoRI* dengan 6 basa pengenalan (G↓AATTC), sedangkan enzim *frequent cutter* adalah enzim *MseI* dengan 4 basa pengenalan (T↓TAA). Tujuan penggunaan *frequent cutter* adalah memotong genom dengan ukuran lebih kecil sehingga mudah diamplifikasi dan berada pada kisaran ukuran yang optimal untuk dijalankan pada elektroforesis gel poliakrilamid. Kemudian, enzim *rare cutter* bertujuan membatasi jumlah fragmen yang akan diamplifikasi karena pemotongan oleh enzim *rare cutter* lebih sedikit daripada *frequent cutter* dan ukuran fragmen lebih besar.

Hasil pemotongan tersebut kemudian diligasi dengan *adapter* yang sesuai hasil pemotongan. *Adapter* adalah untai ganda DNA yang memiliki panjang sekitar 20 pasang basa dan dapat berikatan dengan ujung fragmen hasil digesti karena memiliki basa-basa yang berkomplemen. Susunan basa pada *adapter* berkomplemen dengan susunan basa pada primer selektif. Reaksi pertama adalah preamplifikasi dengan prinsip PCR. Reaksi tersebut menggunakan primer selektif dengan tambahan satu basa pada ujung 3', sehingga fragmen yang diamplifikasi hanya fragmen yang memiliki pasangan

basa tersebut. Reaksi kedua adalah amplifikasi selektif dengan prinsip PCR dan menggunakan primer selektif dengan tambahan tiga basa pada ujung 3' sehingga fragmen yang diamplifikasi hanya fragmen yang memiliki pasangan basa-basa tersebut (Invitrogen 2003: 2).

Amplifikasi selektif menggunakan teknik *touchdown* PCR. Prinsip dasar teknik *touchdown* PCR adalah menaikkan suhu annealing  $\pm 3^{\circ}$  C dari suhu melting primer pada awal siklus. Suhu annealing kemudian diturunkan  $1^{\circ}$  C setiap siklus, kemudian siklus PCR berjalan tanpa penurunan suhu *annealing* jika sudah mencapai suhu normal untuk primer yang digunakan. Fungsi *touchdown* PCR adalah mengoptimasi jumlah DNA amplifikasi ketika suhu *melting* primer, kombinasi 2 primer, dan sekuen target yang akan diamplifikasi tidak diketahui secara pasti (Sambrook & Russell 2001: 8.112).

Menurut Loh *dkk.* (1999: 155), AFLP dapat digunakan untuk mendeteksi perbedaan genetik pada enam kultivar *Caladium bicolor* Aiton. Kultivar *C. bicolor*. sulit dibedakan antar kultivar bila dibandingkan secara morfologi, sehingga digunakan 17 pasang primer AFLP untuk membedakan kultivar *C. bicolor* secara genetik. Hasil *fingerprinting* dengan AFLP menunjukkan bahwa spesies yang berkerabat dekat dan antar kultivar dapat dibedakan secara genetik. Hasil tersebut dapat digunakan mengkarakterisasi dan mengidentifikasi kultivar baru serta memprogram penyilangan antar kultivar.

Menurut Mba dan Tohme (2005: 187--190), teknik AFLP tidak memerlukan informasi mengenai susunan basa pada genom sampel. Marka

AFLP terdiri atas susunan basa-basa situs pengenalan enzim, primer selektif yang tersebar luas pada seluruh bagian genom. Hasil pita polimorfis yang didapatkan relatif banyak dan bila diulang cenderung menghasilkan hasil yang sama. Kelemahan dari teknik AFLP adalah pita yang didapatkan tidak dapat diinterpretasikan dalam alel atau lokus tertentu.

### C. VARIASI GENETIK

Variasi genetik menggambarkan keragaman fenotipe di alam. Variasi genetik di alam dapat terjadi karena adanya mutasi atau rekombinasi. Variasi genetik dapat diketahui dengan melihat perbedaan urutan basa-basa DNA (Raven & Johnson 2001: 205 & 423). Perbedaan urutan basa-basa tersebut mengakibatkan adanya polimorfisme pada DNA. Polimorfisme adalah banyaknya fragmen DNA yang berbeda berdasarkan ukuran. Perbedaan ukuran fragmen disebabkan oleh adanya marka-marka DNA yang tersebar pada seluruh genom. Marka tersebut berupa urutan basa tertentu yang dikenali oleh enzim restriksi dan urutan basa-basa nukleotida pada primer tertentu (Harlt & Jones 1998: 631; Omoto & Lurquin 2004: 123).

Marka DNA berdasarkan basa pengenalan enzim restriksi akan menghasilkan banyak fragmen DNA. Fragmen-fragmen tersebut dipisahkan berdasarkan ukuran dengan elektroforesis gel dan akan menghasilkan pita-pita DNA. Pita-pita DNA tersebut kemudian dibandingkan dengan pita DNA sampel lain untuk membuat DNA *fingerprint*. DNA *fingerprint* dapat

digunakan sebagai identitas suatu organisme karena adanya pita-pita spesifik yang dihasilkan karena keunikan suatu organisme (Harlt & Jones 1998: 639).

#### D. TEKNIK MOLEKULAR

##### 1. Isolasi DNA genom

Isolasi DNA adalah mengekstraksi DNA dari dalam sel dan memurnikan DNA dari zat-zat pengotor. Isolasi DNA tanaman dilakukan dengan senyawa *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) yang merupakan detergen kation untuk melisis sel. Senyawa CTAB mampu membentuk kompleks dengan DNA dan larut dalam air pada konsentrasi garam NaCl lebih dari 0,5 M. Senyawa CTAB digunakan untuk mengisolasi DNA genom jarak pagar karena dapat mengekstraksi DNA, kemudian DNA dimurnikan dari zat yang terdapat dalam tanaman seperti polisakarida dan senyawa fenolik (Moore & Dowhan 2002: 2.3.5--2.3.6).

Prinsip kerja isolasi DNA dengan metode CTAB adalah mengekstrak DNA secara mekanik yaitu pembekuan dengan nitrogen cair, kemudian digerus dengan mortar. *Buffer* ekstraksi yang mengandung CTAB, senyawa 2-merkaptotanol, dan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) ditambahkan ke dalam sampel ekstraksi DNA. Senyawa 2-merkaptotanol berfungsi sebagai agen pereduksi dan dapat memotong ikatan disulfida pada protein. Senyawa PVP berfungsi menarik senyawa fenolik pada sampel. Pemisahan DNA dari protein dilakukan dengan menambahkan larutan kloroform isoamilalkohol

(24:1), kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi. Pemurnian DNA dari RNA dilakukan dengan menggunakan enzim RNase. Larutan DNA kemudian diendapkan dengan isopropanol dan alkohol absolut. Pelet DNA dilarutkan dengan *buffer* TE yang berfungsi untuk menjaga struktur DNA (Seidman & Moore 1999: 507--508; Moore & Dowhan 2002: 2.3.4--2.3.5).

## 2. Digesti

Digesti adalah pemotongan DNA. Digesti dilakukan oleh enzim restriksi endonuklease. Pemotongan DNA tersebut berdasarkan pada situs pengenalan enzim restriksi yang terdiri atas 4--6 basa. Pemotongan DNA menghasilkan dua macam ujung pemotongan, yaitu ujung rata (*blunt end*) dan ujung tidak rata (*sticky end*). Kedua macam ujung pemotongan tersebut disebabkan perbedaan tempat pemotongan oleh enzim restriksi pada situs pengenalan (Struhl 1993: 3.1.6; 3.1.7; 3.1.14; 3.1.15; Wong 1997: 69--70).

Situs pengenalan enzim restriksi memiliki keunikan yaitu urutan basa (dari ujung 5' ke 3') sama dengan urutan basa komplemennya (dari ujung 5' ke 3') atau disebut palindrom. Enzim yang digunakan pada proses AFLP adalah enzim *EcoRI* dan *MseI*. Enzim *EcoRI* memiliki situs pengenalan GAATTC dan memotong DNA antara basa G dan AATTC. Enzim *MseI* memiliki situs pemotongan TTAA dan memotong DNA antara basa T dan TAA (Struhl 1993: 3.1.7; 3.1.14; 3.1.15).

### 3. *Polymerase chain reaction* (PCR)

*Polymerase chain reaction* merupakan suatu teknik untuk memperbanyak DNA secara *in vitro*. Teknik PCR menggunakan enzim DNA *polymerase* yang bersifat termostabil (*Taq polymerase*) karena PCR menggunakan suhu tinggi sehingga dibutuhkan enzim yang tidak mudah terdenaturasi pada suhu tinggi. Komponen-komponen dalam PCR adalah DNA *polymerase*, oligonukleotida (*primer*), dNTP, kation bivalen, *buffer*, dan DNA cetakan (Weising *dkk.* 1995: 24; Sambrook & Russel 2001: 8.4--8.6).

Primer adalah oligonukleotida yang terdiri atas 20--30 basa DNA dan basa-basa tersebut akan berkomplemen secara spesifik dengan DNA cetakan. Syarat primer yang baik adalah memiliki panjang basa oligonukleotida antara 18--24 basa, memiliki urutan basa-basa spesifik untuk melekat pada DNA cetakan, tidak terdapat basa-basa yang berkomplemen pada ujung 3' sehingga terjadi dimer, dan komposisi basa sitosin dan guanin adalah 50% dari seluruh basa. Dua primer yang dipasangkan memiliki suhu *melting* yang tidak berbeda jauh (Dieffenbach *dkk.* 1993: 31--33).

*Polymerase chain reaction* menggunakan dNTP sebagai basa-basa yang berikatan dengan DNA cetakan sebagai akibat kerja enzim *Taq polymerase*. dNTP terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Kation bivalen berfungsi sebagai kofaktor kerja enzim *Taq polymerase*. Kation bivalen yang umum digunakan adalah  $Mg^{2+}$ . *Buffer* PCR berfungsi menjaga kestabilan pH

yaitu 7,2. DNA cetakan adalah DNA yang memiliki *sequence* target untuk penempelan primer (Sambrook & Russel 2001: 8.4--8.6).

Proses PCR terdiri atas tiga tahap, yaitu denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi. Denaturasi pada suhu 92--95° C bertujuan untuk memisahkan DNA rantai ganda menjadi rantai tunggal. *Annealing* pada suhu rendah (45--48° C) bertujuan untuk meletakkan primer ke dalam cetakan. Polimerisasi pada suhu 72--75° C merupakan proses pemanjangan primer menggunakan untai tunggal DNA sebagai cetakannya (Mertens & Hammersmith 1995: 276).

Proses PCR untuk AFLP dibagi menjadi dua yaitu preamplifikasi dan amplifikasi selektif. Proses preamplifikasi menggunakan primer selektif dengan penambahan satu basa, sedangkan amplifikasi selektif menggunakan primer dengan penambahan tiga basa nukleotida. Siklus amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6 (Invitrogen 2003: 7).

#### 4. Elektroforesis gel poliakrilamid

Poliakrilamid adalah hasil polimerisasi senyawa akrilamid yang digunakan sebagai matriks elektroforesis. Senyawa akrilamid berpolimerisasi karena adanya inisiasi oleh *N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine* (TEMED) sebagai senyawa radikal. Reaksi polimerisasi dipercepat oleh katalisator ammonium persulfate 1,6%. Gel poliakrilamid memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan gel agarosa yaitu kemampuan memisahkan molekul DNA dengan perbedaan 1 pasang basa, mampu menampung kuantitas DNA

yang lebih besar, dan purifikasi DNA dari gel poliakrilamid lebih murni serta dapat digunakan untuk aplikasi lainnya (Sambrook & Russell 2001: 5.40).

#### 5. Pewarna *silver*

Pewarna silver umum digunakan untuk mewarnai DNA setelah proses elektroforesis dengan gel poliakrilamid. Pewarna silver memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi dalam mewarnai DNA yaitu dapat mendeteksi DNA dengan kuantitas 2--5 ng. Langkah pertama dalam pewarna silver adalah *glutaraldehyde* memfiksasi gel dan membuat DNA menjadi sensitif untuk mengikat *silver*. *Silver nitrate* mengisi gel pada kondisi asam lemah dan *alkaline formaldehyde* mereduksi ikatan ion *silver* menjadi *metallic silver*. Pita yang dihasilkan berwarna abu-abu atau coklat kekuningan. Reduksi ion *silver* juga dapat dilakukan dengan penambahan *sodium thiosulfate* pada larutan *alkaline formaldehyde*. *Thiosulfate* melepaskan ion silver dari permukaan gel dengan membentuk kompleks dengan garam *silver* (Sambrook & Russell 2001: A9.5--A9.6).

### **E. FILOGENETIK**

Filogenetik adalah ilmu yang mempelajari hubungan evolusi antar organisme, gen, atau protein dengan menggunakan kombinasi biologi molekular atau perhitungan statistik. Hubungan filogenetik umumnya digambarkan pada suatu bentuk pohon binari. Struktur pohon filogenetik

menggambarkan hubungan antara nenek moyang dan keturunannya (Polanski & Kimmel 2007: 187).

Rekonstruksi pohon filogenetik dapat dibagi menjadi dua berdasarkan data yang diolah yaitu metode matriks jarak (*distance matrix method*) dan metode status karakter (*character state*). Metode jarak mengolah matriks jarak memiliki satu set dari  $n(n-1)/2$  nilai jarak dari  $n$  OTU (*operational taxonomy unit*), sedangkan penyusunan status karakter digunakan dalam metode status karakter. *Unweighted pairgroup method using arithmetic mean* (UPGMA), metode Fitch dan Margoliash, metode Wagner, metode *neighbor joining*, dan metode evolusi minimum tergolong dalam metode matriks jarak. Metode status karakter terdiri atas *maximum parsimony*, metode kompatibilitas, dan metode *maximum likelihood* (Saitou 1995: 120--121).

Metode *neighbor joining* merupakan salah satu metode matriks jarak. Matriks jarak didapatkan dari nilai perbedaan antar spesies. Nilai perbedaan dapat diolah dari perbedaan susunan basa nukleotida atau asam amino. Nilai perbedaan terendah dapat menggabungkan dua spesies menjadi satu *cluster*. *Cluster* tersebut kemudian dihubungkan dengan spesies ketiga dengan nilai perbedaan yang rendah dan seterusnya, sehingga dihasilkan cluster yang lebih besar. Hasil akhir pengelompokkan tersebut adalah pohon filogenetik. Dendogram merupakan suatu bentuk pohon filogenetik yang memiliki OTU berderet rata secara vertikal pada satu sisi (Saitou 1995: 122).