

Deteksi Mutan Kentang Hitam Hasil Radiasi Sinar γ Menggunakan Marka ISSR dan RAPD (*Mutant Detection of Black Potatoes Treated in γ Ray Irradiation Using ISSR and RAPD markers*)

Yulita, KS, Martanti, D, Yuyu, SP, dan Herlina

Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong Science Centre, Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911

E-mail: yulita.kusumadewi@gmail.com

Naskah diterima tanggal 2 Mei 2013 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 3 Maret 2014

ABSTRAK. Umbi kentang hitam [*Plectranthus rotundifolius* (Poir.) Spreng.] merupakan salah satu sumber pangan alternatif bagi sebagian masyarakat Indonesia. Namun, rendahnya keragaman genetik kentang hitam menjadi kendala dalam perakitan varietas unggul. Pemuliaan tanaman dengan cara mutasi antara lain dengan iradiasi sinar γ diharapkan dapat meningkatkan keragaman genetik kentang hitam. Penelitian dilaksanakan pada Bulan Januari - November 2010 di Laboratorium Genetika Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi LIPI. Penelitian ini bertujuan mendeteksi mutan kentang hitam hasil radiasi sinar γ pada dosis 6, 25, dan 35 gray dengan menggunakan marka ISSR dan RAPD. Lima belas primer ISSR dan RAPD digunakan untuk mengamplifikasi genom DNA total. Di antara ke-15 primer tersebut, hanya empat primer yang menghasilkan pita-pita polimorfik untuk mendeteksi mutan hasil mutasi pada konsentrasi 25 gray yaitu (OPA 13, OPA 18, OPB 18, dan UBC 834) pada aksesori 1#10; 11.3#4; 11.3#5, dan 2.10#8 dan hanya tiga primer yang mampu mendeteksi mutan pada konsentrasi 35 gray (OPA 13, OPB 18, dan UBC 807) pada aksesori 4.10#2, 4.10#1, 4.10#4, 4.10#3, 4.10#5, dan 33d.1#3. Hal ini menunjukkan bahwa marka ISSR dan RAPD dapat digunakan untuk mendeteksi mutan pada kentang hitam.

Katakunci: Kentang hitam; *Plectranthus rotundifolius* (Poir.) Spreng.; Deteksi mutan; RAPD; ISSR; Iradiasi sinar γ

ABSTRACT. Black tuber potatoes [*Plectranthus rotundifolius* (Poir.) Spreng.] is one of the alternative food sources for people lived in some parts of Indonesia. However, low level of genetic variations found in black tuber potatoes have become obstacle in development of new variety. Plant breeding through mutation, e.g. irradiation of γ rays, can be assumed to improve genetic diversity. The experiment was conducted in January to November 2010 at Plant Genetic Laboratory, Research Center for Biological, Cibinong Bogor. The aim of this study was to observe the occurrence of black tuber potato mutant irradiated with γ rays 6, 25 and 35 gray using ISSR and RAPD markers. Fifteen primers of ISSR and RAPD were used to amplify total genomic DNA. Of the total 15 primers used, only four primers generated polymorphic bands for mutant detection of 25 Gy (OPA 13, OPA 18, OPB 18, and UBC 834) in accession 1#10; 11.3#4; 11.3#5, and 2.10#8, and only three primers for concentration of 35 Gy (OPA 13, OPB 18, and UBC 807) in accession 4.10#2, 4.10#1, 4.10#4, 4.10#3, 4.10#5, and 33d.1#3. The results showed that ISSR and RAPD were reliable markers that can detect mutant of black potatoes.

Keywords: Black potato; *Plectranthus rotundifolius* (Poir.) Spreng.; Mutant detections; RAPD; ISSR; γ ray irradiation

Plectranthus rotundifolius (Poir.) Spreng dikenal sebagai tanaman kentang hitam yang termasuk ke dalam famili Lamiaceae. Tanaman ini tumbuh di negara-negara Asia Tenggara (Sri Lanka, Malaysia, dan Indonesia) dan Afrika Tropis (Sudan, Nigeria) (Prematilake 2005). Umbi tanaman ini dimanfaatkan sebagai makanan pengganti sumber karbohidrat seperti nasi dan jagung. Namun, umbi kentang hitam kurang populer dan hanya dikenal serta dimanfaatkan oleh masyarakat dalam skala terbatas oleh penduduk di pulau Jawa, Bali, dan Madura (Heyne 1987).

Bila dibandingkan dengan umbi-umbian yang lain, seperti singkong dan ubi jalar, umbi kentang hitam mempunyai kandungan pati yang lebih rendah, sehingga dapat digunakan sebagai makanan untuk diet (Tindall HD 1993). Berdasarkan hasil penelitian Nugraheni *et al.* (2011), umbi kentang hitam mengandung senyawa antioksidan dan antiproliferasi yang tinggi yaitu asam ursolik dan asam oleanolik yang dapat digunakan sebagai obat kanker. Namun, ukuran

umbi yang kecil (diameter 2,5 cm) menjadikannya kurang diminati. Selain itu, keragaman genetik tanaman ini rendah, sehingga menyulitkan program perbaikan genetik melalui hibridisasi.

Pemuliaan kentang hitam secara konvensional mempunyai keterbatasan, karena biji sering tidak terbentuk. Oleh karena itu, diperlukan cara lain untuk meningkatkan keragaman genetik yaitu dengan cara induksi mutasi untuk menghasilkan varietas baru.

Pendeteksian terhadap mutan yang dihasilkan proses iradiasi sinar γ dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain dengan mengamati karakter morfologinya. Namun, pengamatan terhadap karakter morfologi tidak selalu dapat menunjukkan perubahan yang terjadi di dalam genom tanaman. Oleh karenanya, pendeteksian yang lebih akurat dilakukan dengan pendekatan dengan cara molekuler.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ialah marka molekuler yang relatif paling mudah dan

cepat digunakan untuk berbagai tujuan, antara lain identifikasi genotip (Jimenez *et al.* 2002, Poerba *et al.* 2007) dan kultivar (Malik *et al.* 2006, Shabaan *et al.* 2006, Jain *et al.* 2007), deteksi mutan pada *Rhododendron* (Atak *et al.* 2011), *Chrysanthemum* (Kumar *et al.* 2006) dan sorgum (Taryono *et al.* 2011) serta memperkirakan keragaman genetika jenis-jenis pohon kayu tropis (Siregar *et al.* 2008, Rath *et al.* 1998, Poerba *et al.* 2007). Keuntungan utama penerapan marka RAPD ialah menghasilkan polimorfisme yang cukup tinggi *random sampling* dalam genom total dan secara teknis cukup cepat dan mudah dilakukan, sedangkan *inter-simple sequence repeats* (ISSR) juga merupakan marka molekuler berbasis PCR, yang mengamplifikasi daerah di antara dua ulangan nukleotida pendek (mikrosatelit) (Zietkiewicz *et al.* 1994). Keuntungan utama dari marka ini ialah dapat menganalisis lokus ganda dalam reaksi tunggal. ISSR telah banyak digunakan untuk mendeteksi keragaman genetik dan kekerabatan genetik (Rucinska & Puchalski 2010, Isshiki *et al.* 2008, Liu *et al.* 2006), identifikasi genotip (Fracaro & Echeverrigaray 2006, Mattioni *et al.* 2002) serta identifikasi mutan (Campbell *et al.* 2011, Yadav *et al.* 2006).

Tujuan penelitian ini ialah memperoleh sidik DNA mutan kentang hitam hasil iradiasi sinar γ pada konsentrasi 6, 25 dan 35 gray menggunakan marka RAPD dan ISSR. Hipotesis yang diajukan ialah bahwa mutasi genetik dapat diinduksi pada beberapa aksesori kentang hitam melalui iradiasi sinar γ . Mutan kentang hitam dapat dideteksi melalui profil RAPD dan ISSR yang dihasilkan dari hasil amplifikasi PCR, dan diharapkan dapat digunakan selain sebagai identitas genotip, juga bisa dimanfaatkan lebih lanjut dalam kegiatan pemuliaan tanaman kentang hitam.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini berlangsung pada Bulan Januari – November 2010 di Laboratorium Genetika Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Iradiasi sinar γ telah dilakukan pada planlet tanaman kentang hitam dan telah dilakukan seleksi untuk dapat ditanam di kebun percobaan. Sampel yang digunakan pada studi ini meliputi 36 aksesori kentang hitam yang dikoleksi daunnya dari Kebun Plasma Nutfah Cibinong Science Center, Pusat Penelitian Biologi LIPI. Sampel meliputi tiga aksesori kontrol dan 63 aksesori yang diberi perlakuan iradiasi sinar γ , yaitu 20 sampel diberi perlakuan iradiasi sinar γ pada konsentrasi 6 gray (Gy), 28 sampel dengan konsentrasi 25 Gy, dan 13 sampel dengan konsentrasi 35 Gy (Tabel 1).

Isolasi dan Amplifikasi DNA

Isolasi total DNA genom pada kentang hitam telah dilakukan pada seluruh sampel yang dikoleksi dengan menggunakan metode CTAB (Doyle & Doyle 1990) yang telah dimodifikasi dengan penambahan RNase 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Deteksi mutan kentang hitam dilakukan pada seluruh genotip hasil iradiasi sinar γ pada konsentrasi 6, 25 dan 35 Gy. Skrining dilakukan secara acak dengan menggunakan lima primer RAPD, yaitu OPA 13, OPA18, OPB17, OPB 18, dan OPD 18 dan 10 primer ISSR yaitu UBC 807, 809, 811, 817, 820, 822, 823, 826, 834, dan 835. Seluruh primer ini ternyata menghasilkan produk amplifikasi. Volume reaksi total PCR ialah 15 μl yang terdiri atas 1x PCR *master mix* (fermentas), 2 μM primer (Promega), dan ~ 10 ng DNA *template*.

Kondisi mesin PCR untuk amplifikasi RAPD diawali dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, diikuti oleh 45 siklus yang terdiri atas: fase denaturasi (94°C selama 1 menit), fase penempelan (36°C selama 1 menit) dan fase pemanjangan (72°C selama 2 menit) (Williams *et al.* 1990). Setelah 45 siklus selesai, proses amplifikasi PCR diakhiri dengan fase pemanjangan pada suhu 72°C selama 5 menit, sedangkan kondisi optimum untuk amplifikasi PCR ISSR ialah sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, diikuti oleh 30 siklus yang terdiri atas: fase denaturasi (94°C selama 1 menit), fase penempelan (50°C selama 45 detik), dan fase pemanjangan (72°C selama 2 menit). Setelah 30 siklus selesai, proses amplifikasi PCR diakhiri dengan fase pemanjangan pada suhu 72°C selama 5 menit. Produk amplifikasi dipisahkan dengan elektroforesis menggunakan 2% gel agarosa dan bufer TAE (tris-acetic acid-EDTA) 1X pada voltase 100 volt selama 120 menit dan divisualisasi dengan *UV transilluminator gel documentation*. Sebagai standar digunakan 100 bp DNA Ladder (Fermentas) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA.

Analisis Data

Analisis hanya dilakukan pada primer yang menghasilkan pita polimorfik untuk memastikan identitas mutan yang tidak terdeteksi oleh primer monomorfik. Setiap pita RAPD dan ISSR dianggap sebagai satu lokus putatif. Hanya lokus yang menunjukkan pita yang jelas diskor 1 bila ada pita dan 0 bila tidak ada pita. Kedua data set tersebut digabung untuk diskor hingga membentuk matriks binari di program Microsoft Excel. Matriks tersebut kemudian diolah menggunakan program MVSP (*multi variate statistical package*, Kovach 2007) untuk menghitung koefisien kesamaan Jaccard. Matriks kesamaan ini kemudian digunakan untuk membuat dendrogram

Tabel 1. Daftar koleksi kentang hitam hasil radiasi sinar γ konsentrasi 6, 25, dan 35 Gy yang berasal dari Nganjuk 1. No. 1-3: kontrol (tanpa radiasi), cetak tebal: konsentrasi 6 Gy, cetak miring: konsentrasi 25 Gy, cetak garis bawah: konsentrasi 35 Gy. *List of DNA samples of black potatoes treated in γ ray of 6, 25, and 35 Gy originated from Nganjuk 1. 1-3: control (untreated), bold type: 6 Gy, Italic type: 25 Gy, Underscore type: 35 Gy)*

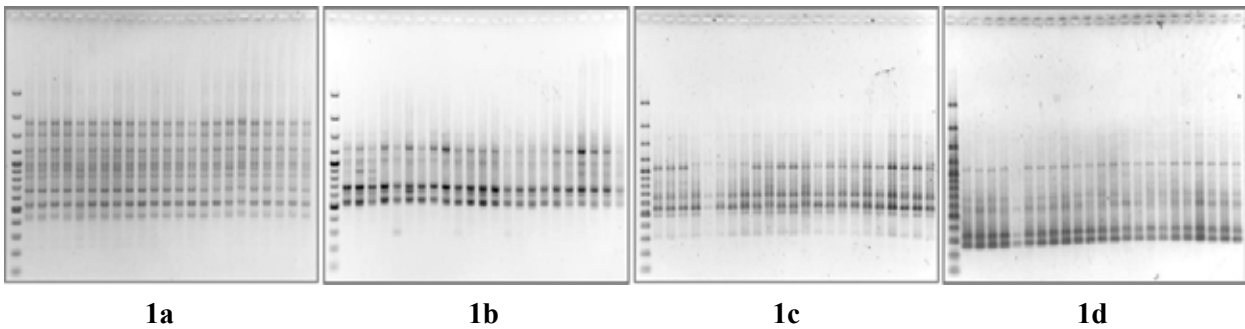
Kode aksesori (Accession code)	No. aksesori (No accession)	Kode aksesori (Accession code)	No. aksesori (No accession)
KH Ng 1 B 0 Gy F1	1.5#1	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.3#1
KH Ng 1 B 0 Gy F1	1.5#2	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.1#3
KH Ng 1 B 0 Gy F1	1.5#3	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.1#6
KH Ng 1 D 6 Gy F1	3d.15#1	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.1#2
KH Ng 1 D 6 Gy F1	3d.15#2	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.1#4
KH Ng 1 D 6 Gy F1	3d.15#3	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.1#10
KH Ng 1 D 6 Gy F1	3d.15#4	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.1#8
KH Ng 1 D 6 Gy F1	3d.15#6	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.1#7
KH Ng 1 D 6 Gy F1	33d.1#1	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.1#1
KH Ng 1 D 6 Gy F1	33d.1#2	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.1#9
KH Ng 1 D 6 Gy F1	33d.1#3	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.1#5
KH Ng 1 D 6 Gy F1	33d.1#4	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	62.2.10#4
KH Ng 1 D 6 Gy F1	33d.1#5	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	62.2.10#3
KH Ng 1 Tg 6 Gy F1	29c.3#1	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	62.2.10# 2
KH Ng 1 Tg 6 Gy F1	29c.3#2	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	2.10#4
KH Ng 1 Tg 6 Gy F1	29c.3#3	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	2.10#6
KH Ng 1 Tg 6 Gy F1	29c.3#4	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	2.10#7
KH Ng 1 Tg 6 Gy F1	29c.3#5	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	2.10#8
KH Ng 1 Tg 6 Gy F1	3.1#1	KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	2.10#9
KH Ng 1 Tg 6 Gy F1	3.1#2	KH Ng 1 Tg 35 Gy F1	4.10#5
KH Ng 1 Tg 6 Gy F1	3.1#3	KH Ng 1 Tg 35 Gy F1	4.10#4
KH Ng 1 Tg 6 Gy F1	3.1#4	KH Ng 1 Tg 35 Gy F1	4.10#3
KH Ng 1 Tg 6 Gy F1	3.1#5	KH Ng 1 Tg 35 Gy F1	4.10#2
KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.2#5	KH Ng 1 Tg 35 Gy F1	4.10#1
KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.2#4	KH Ng 1 B 35 Gy F1	4.10#4
KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.2#3	KH Ng 1 B 35 Gy F1	4.10#3
KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.3#2	KH Ng 1 B 35 Gy F1	4.10#1
KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.2#1	KH Ng 1 B 35 Gy F1	4.10#5
KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.3#5	KH Ng 1 B 35 Gy F1	4.7#4
KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.3#4	KH Ng 1 B 35 Gy F1	4.7#3
KH Ng 1 Tg 25 Gy F1	11.3#3	KH Ng 1 B 35 Gy F1	4.7#2

UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetical average*). *Principal component analysis* (PCA) juga dilakukan menggunakan program yang sama untuk mengevaluasi variasi sebaran aksesori dalam ruang dua dimensi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Marka DNA dapat berbeda satu sama lain di dalam mengamplifikasi DNA bergantung pada kelimpahan

genom, tingkat polimorfisme yang terdeteksi, spesifitas lokus, reproduibel, dan cara pengerjaan (Taryono *et al.* 2011). Induksi mutasi yang dikombinasi dengan teknik kultur *in vitro* dapat digunakan untuk meningkatkan keragaman genetik dalam kegiatan pemuliaan. Iradiasi menggunakan agen mutagenik fisik, yaitu dengan sinar gamma dapat merusak formasi DNA secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung, energi radiasi dipindahkan kepada target, dan secara tidak langsung energi diserap oleh air yang terdapat pada media dan

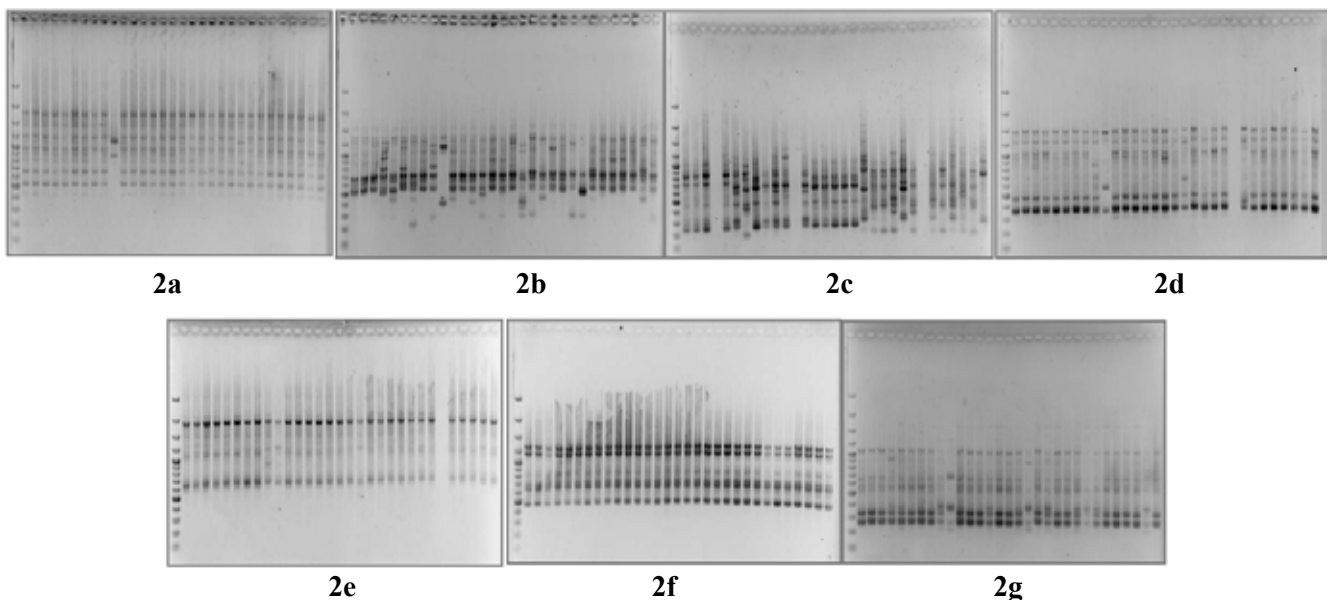


Gambar 1. Foto gel elektroforesis 23 genotip kentang hitam hasil iradiasi sinar γ pada konsentrasi 6 Gy. (a) OPA 13, (b) OPA 18, (c) UBC 826, (d) UBC 834. lajur 1: generuler 100bp plus (Fermentas), lajur 2-4: kontrol. Lajur 5-23: genotip hasil mutasi (*Electrophoresis gel documentation of 23 genotypes of black potato produced by γ -irradiation on concentration 6 Gy. (a) OPA 13, (b) OPA 18, (c) UBC 826, (d) UBC 834. Lane 1: Gene Ruler 100 bp plus (Fermentas), lane 2-4: control. Lane 5-23 genotypes produced by mutation*)

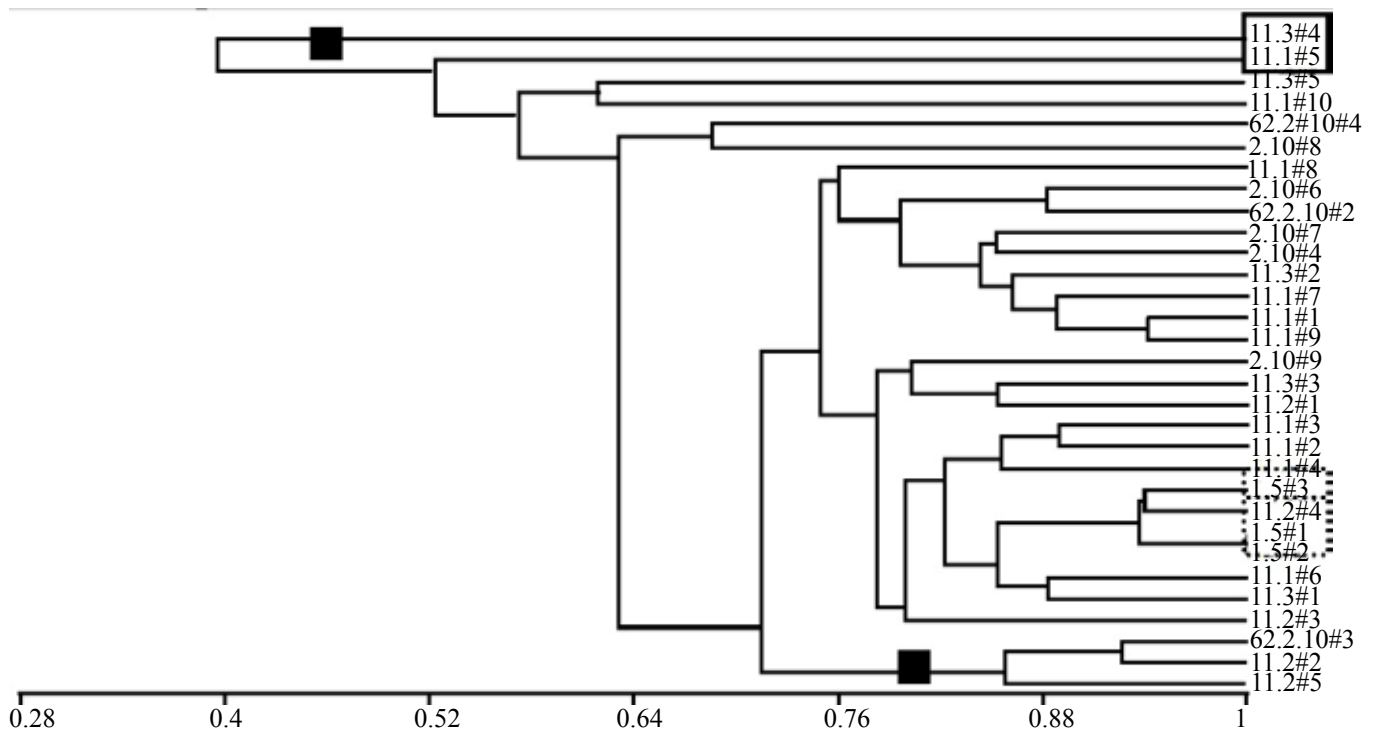
merusak susunan biomolekulnya pada saat hidrolisis air (Esnault *et al.* 2010).

Suatu genotip dikategorikan sebagai mutan apabila profil DNA-nya berbeda dari profil DNA kontrol dan profil tersebut konsisten berbeda pada beberapa primer yang digunakan. Dari sejumlah marka molekuler, ternyata tidak ada mutan yang terdeteksi pada tanaman yang mendapat perlakuan konsentrasi 6 Gy, karena semua genotip memiliki profil RAPD dan ISSR yang serupa (Gambar 1). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh rendahnya konsentrasi sinar γ yang digunakan untuk mutasi.

Pada konsentrasi 25 Gy hanya empat primer yang menghasilkan profil RAPD yang polimorfik (Gambar 2), dan hanya satu genotip yang profilnya secara konsisten berbeda, yaitu aksesori 11.3#4 yang terdeteksi dengan primer OPA 13, OPA 18, dan OPB 18 (gambar 2a, b, dan d), sedangkan deteksi mutan menggunakan ISSR (Gambar 2f dan g), hanya UBC 834 yang menghasilkan pita polimorfik. Mutan yang terdeteksi dengan menggunakan primer ini ialah aksesori 11.1#10; 11.3#4; 11.3#5 dan 2.10#8. Keempat mutan tersebut memiliki profil DNA yang mirip satu sama lain, yaitu adanya pita spesifik ukuran 350 dan 700 bp (Gambar 2g) yang tidak dijumpai pada aksesori lainnya.



Gambar 2. Foto gel elektroforesis 31 genotip kentang hitam hasil iradiasi sinar γ pada konsentrasi 25 gray. (a) OPA 13, (b) OPA 18, (c) OPB 17, (d) OPB 18, (e) OPD 18, (f) UBC 811, dan (g) UBC 834, lajur 1: generuler 100bp plus (fermentas), lajur 2-4: Kontrol. Lajur 5-31: genotip hasil mutasi. (*Electrophoresis gel documentation of 31 genotypes of black potato produced by γ -irradiation on concentration 25 Gy. (a) OPA 13, (b) OPA 18, (c) OPB-17, (d) OPB-18, (e) OPD-18, (f) UBC 811, and (g) UBC 834. Lane 1: GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas), lane 2-4: control. Lane 5-31 genotypes produced by mutation*)



Gambar 3. Dendrogram kesamaan genetik antara 31 aksesori kentang hitam berdasarkan koefisien kesamaan Jaccard dan algoritma UPGMA. Nomor aksesori dalam kotak solid ialah genotip mutan, nomor aksesori dalam kotak titik-titik ialah kontrol. Kotak hitam ialah pengelompokan yang ada di diagram PCA (*The dendrogram of genetic similarity among 31 accession of black potatoes based on coefficient of Jaccard similarity and UPGMA algorithm. The accession numbers in the solid box are genotype of mutants, the accession numbers in the dot box are control. The black box is clustering in PCA diagram*)

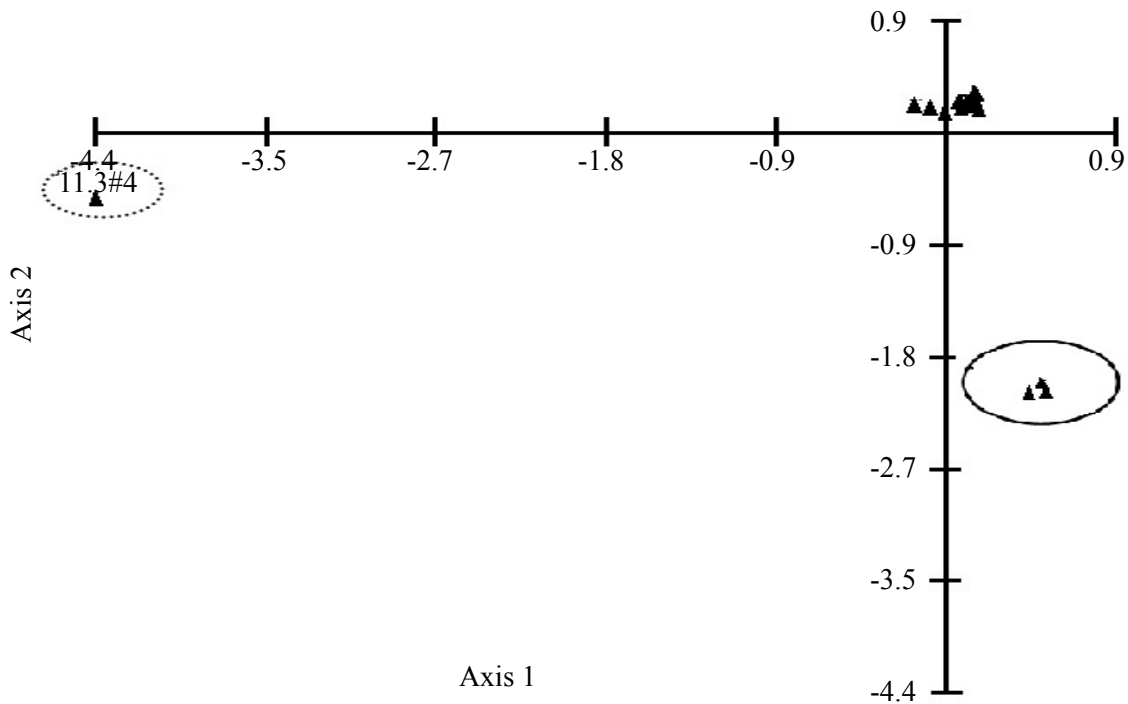
Penampakan morfologi yang terbaik dijumpai pada hasil mutasi menggunakan iradiasi sinar γ konsentrasi 25 Gy, walaupun pada jenis lain misalnya *Chinese narcissus* (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*), dosis iradiasi optimal untuk induksi mutasi ialah 10 Gy (Lu *et al.* 2007). Hasil iradiasi menggunakan konsentrasi 25 Gy diperoleh empat aksesori yang memiliki genotip berbeda, yaitu 11.1#10; 11.3#4; 11.3#5, dan 2.10#8, tetapi dari hasil analisis pengelompokan hanya 11.3#4 yang memiliki kesamaan genetik <50% (Gambar 2). Ketiga aksesori lainnya walaupun terletak di luar kelompok utama masih memiliki kesamaan genetik lebih dari 50%.

Analisis pengelompokan (Gambar 3) dan PCA (Gambar 4) mengkonfirmasi profil RAPD dan ISSR bahwa 11.3#4 ialah mutan, karena terletak jauh dari kelompok aksesori lainnya, dengan indeks kesamaan hanya 30%, sedangkan pada konsentrasi 35 Gy, rentang kesamaan genetik semakin sempit yaitu antara 40-100%, dan hanya aksesori 4.10#1 yang paling berbeda. Seleksi terhadap mutan yang memiliki jarak genetik yang jauh terhadap kontrol juga dilakukan pada tebu toleran terhadap salinitas (Yadav *et al.* 2006).

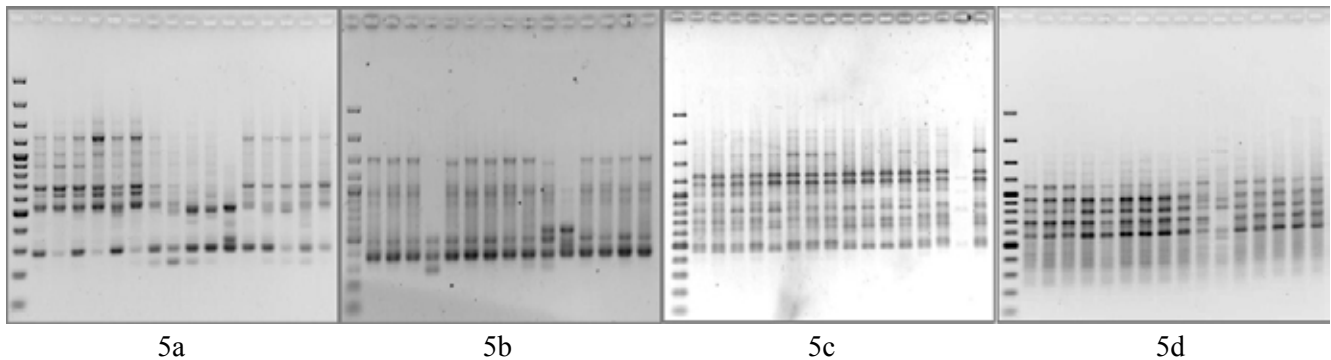
Amplifikasi DNA kentang hitam hasil mutasi sinar γ pada konsentrasi 35 Gy juga hanya menghasilkan

produk PCR dengan menggunakan empat primer RAPD, yaitu OPA 13, OPA 18, OPB 17, dan OPB 18, tetapi hanya OPA 13 dan OPB 18 yang menghasilkan pita polimorfik (Gambar 5). Terdapat empat mutan yang terdeteksi menggunakan primer OPA 13, yaitu 4.10#2, 4.10#1, 4.10#4, 4.10#3, dan tiga mutan yang terdeteksi dengan OPB 18 yaitu 4.10#5, 4.10#3, dan 4.10#1, sedangkan pada 10 primer ISSR yang digunakan untuk skrining, hampir semuanya dapat mengamplifikasi DNA genom pada 16 aksesori kentang hitam, tetapi hanya satu primer yang menghasilkan pita polimorfik, yaitu UBC 807 (Gambar 5c). Pita spesifik ini dijumpai pada aksesori 4.10#1, yaitu dengan ketiadaan pita ukuran 700 bp. Dengan demikian aksesori ini dianggap sebagai mutan.

Analisis pengelompokan (Gambar 6) dan PCA (Gambar 7) mengkonfirmasi profil RAPD dan ISSR bahwa 4.10#1 ialah mutan karena terletak jauh dari kelompok aksesori lainnya, dengan koefisien kesamaan yang hanya 40%. Seluruh mutan yang dideteksi ini memiliki profil DNA berupa penambahan atau penghilangan pita DNA. Hal ini mengindikasikan bahwa iradiasi sinar γ pada konsentrasi 25 dan 35 Gy berhasil menginduksi perubahan genetik pada aksesori 11.1#10; 11.3#4, 11.3#5, 2.10#8, dan 4.10#1.



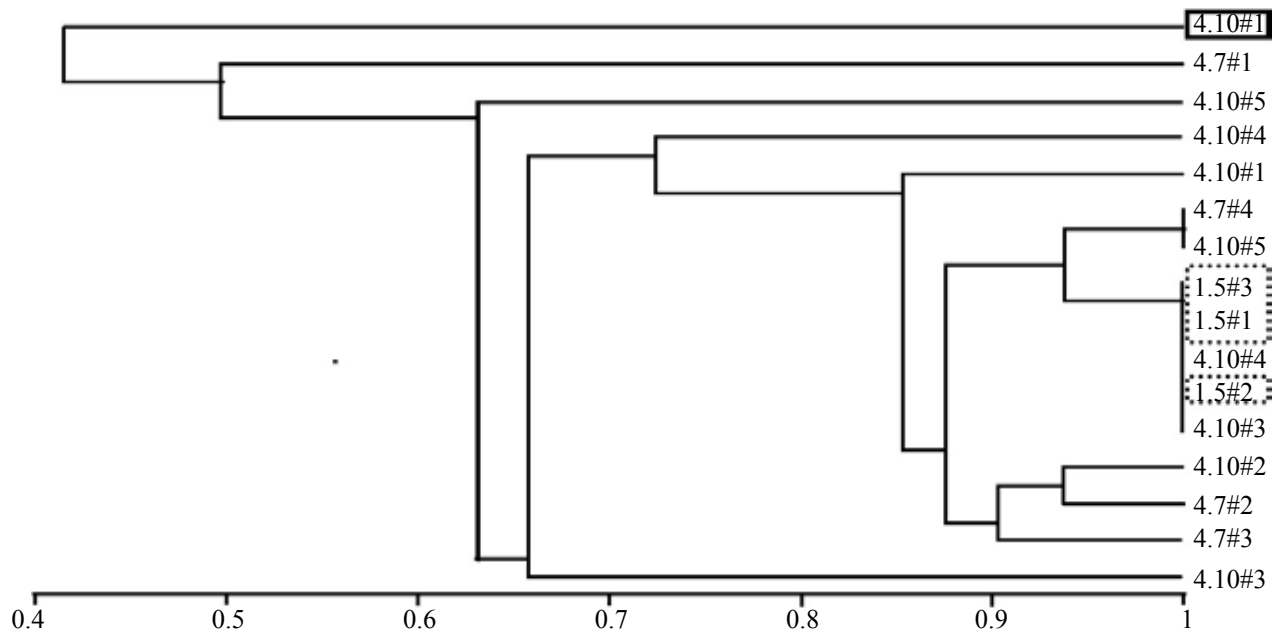
Gambar 4. Diagram PCA dua dimensi. Nomor aksesori dalam lingkaran ialah aksesori yang terdapat dalam dendrogram. Nomor aksesori dalam lingkaran titik-titik ialah genotip mutan (*Two dimensional view of PCA diagram. The accession numbers in the circle are accession in the dendrogram. The accession numbers in the dot circle are genotype of mutans*)



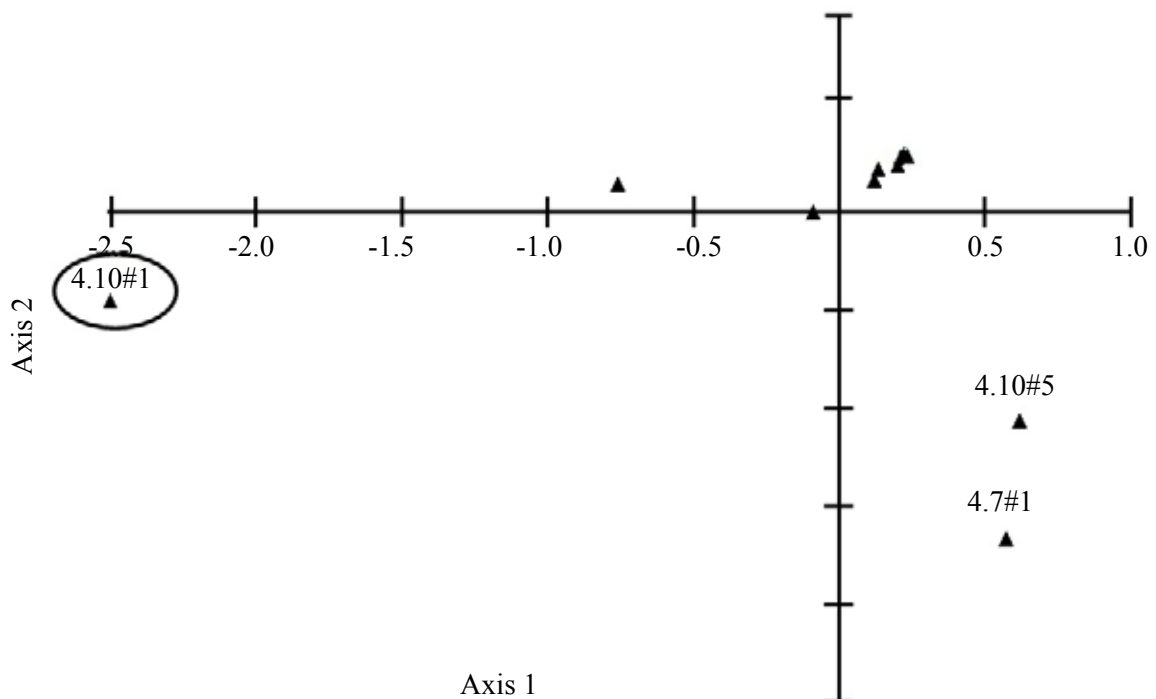
Gambar 5. Foto gel elektroforesis 17 genotip kentang hitam hasil iradiasi sinar γ pada konsentrasi 35 gray. (a) OPA 13, (b) OPB 18, (c) UBC 807, (d) UBC 811. Lajur 1: generuler 100bp plus (Fermentas), lajur 2-4: kontrol. Lajur 5-16: genotip hasil mutasi. (*Electrophoresis gel documentation of 17 genotypes of black potato produced by γ -irradiation on concentration 35 Gy. (a) OPA 13, (b) OPB 18, (c) UBC 807, (d) UBC 811. Lane 1: Gene Ruler 100 bp plus (Fermentas), lane 2-4: control. Lane 5-16 genotypes produced by mutation*)

Dari sejumlah marka molekuler yang digunakan (10 primer ISSR dan lima primer RAPD) hanya sedikit yang menghasilkan polimorfisme. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh rendahnya variasi genetik *regenerant* kentang hitam. Rendahnya polimorfisme yang dihasilkan untuk mendeteksi mutan kentang hitam dapat ditanggulangi antara lain dengan melakukan modifikasi primer, menggunakan berbagai kombinasi dua buah primer (untuk RAPD) ataupun mencari marka lain yang lebih spesifik untuk kentang hitam.

Perbedaan polimorfisme yang terdeteksi pada sejumlah aksesori kentang hitam kemungkinan juga disebabkan oleh sifat dari kedua marka yang digunakan. RAPD dan ISSR bersifat random, mengamplifikasi daerah secara random pada untai DNA genom. Namun ISSR tidak serandom RAPD, karena dibatasi oleh ulangan nukleotida pendek yang ditemukan secara random pada genom DNA. Secara umum kedua marka ini bisa digunakan secara konsisten untuk mendeteksi mutan pada sejumlah aksesori kentang hitam walaupun



Gambar 6. Dendrogram kesamaan genetik antara 16 aksesi kentang hitam berdasarkan koefisien kesamaan Jaccard dan algoritma UPGMA. Nomor aksesi dalam kotak solid adalah genotip mutan, nomor aksesi dalam kotak titik-titik adalah kontrol (*The dendrogram of genetic similarity among 16 accession of black potatoes based on coefficient of Jaccard similarity and UPGMA algorithm. The accession numbers in the solid box are genotype of mutans, the accession numbers in the dot box are control. The black box is clustering in PCA diagram*)



Gambar 7. Diagram PCA dua dimensi. Nomor aksesi dalam lingkaran ialah genotip mutan (*Two dimensional view of PCA diagram. The accession numbers in the circle are genotype of mutans*)

memiliki tingkat polimorfisme yang rendah apabila dibanding penggunaannya sebagai marka untuk mendeteksi keragaman kultivar misalnya.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Tidak ada genotip mutan kentang hitam hasil iradiasi sinar γ pada konsentrasi 6 gray yang terdeteksi dengan RAPD dan ISSR.
2. Hasil iradiasi sinar γ pada konsentrasi 25 gray terdeteksi satu genotip mutan 11.3#4 yang terdeteksi dengan primer RAPD (OPA 13, 18, dan OPB 18), dan aksesi 1#10, 11.3#4, 11.3#5, dan 2.10#8 yang terdeteksi dengan ISSR (UBC 834).
3. Pada konsentrasi 35 gray terdeteksi mutan dengan menggunakan dua primer RAPD, yaitu 4.10#2, 4.10#1, 4.10#4, 4.10#3, 4.10#1 (OPA 13), dan 4.10#5, 4.10#3, dan 4.10#1 (OPB 18), sedangkan menggunakan marka ISSR hanya terdeteksi satu mutan, yaitu aksesi 33d.1#3 (UBC 807).
5. Sedikitnya jumlah genotip mutan yang terdeteksi karena mutasi dengan iradiasi sinar γ bersifat acak dan hanya sedikit planlet mutan yang dapat bertahan hidup.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini sepenuhnya didukung oleh dana proyek DIPA tahun 2011 yang berjudul Karakterisasi molekuler kentang hitam (*Plectranthus rotundifolius* (Poir.) Spreng.). Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Terima kasih Kepala Laboratorium Kultur Jaringan yang telah memberikan material DNA kentang hitam.

PUSTAKA

1. Atak, C, Celik, O & Acik, L 2011, 'Genetic analysis of *Rhododendron* mutant using random amplified polymorphic DNA (RAPD)', *Pak.J.Bot.*, vol. 43, no. 2, pp. 1173-82
2. Campbell, BC, LeMare, S, Piperidis, G & Godwin, ID 2011, 'IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley', *Molecular Breeding*, vol. 27, no. 2, pp. 193-206.
3. Doyle, JJ & Doyle, JL 1990, 'Isolation of plant DNA from fresh tissue', *Focus*, vol. 12, pp. 13-5.
4. Esnault, MA, Legue, F & Chenal, C 2001, 'Ionizing radiation: Advances in plant response', *Environ.Exp.Bot.*, vol. 68, pp. 231-237.
5. Fracaro, F & Echeverrigaray, S 2006, 'Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of Southern Brazil', *Biochem Genet.*, vol. 44, no. 11/12.

6. Heyne, K 1987, *Tumbuhan berguna Indonesia*, jilid. 2, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta.
7. Isshiki, S, Iwata, N & Khan, MMR 2008, 'ISSR variation in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species', *Sci. Hort.*, vol. 117, pp. 186-90.
8. Jain, PK, Saini, L, Pathak, MH & Gupta, VK 2007, 'Analysis of genetic variation in different banana (*Musa* species) variety using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs)', *Afr. J. Biotech.*, vol. 6, no. 17, pp. 1987-9.
9. Jimenez, JF, Sanchez-Gomez, P, Guemes, J, Werner, O & Rossello, JA 2002, 'Genetic variability in a narrow endemic snapdragon (*Antirrhinum subaeticum*, Schrophulariaceae) using RAPD markers', *Heredity*, vol. 89, no. 5, pp. 387-93.
10. Kovach, WL 2007, *MVSP- A multivariate statistical package for windows*, Ver.3.1, Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.
11. Kumar, S, Prasad, KV & Coudhary, ML 2006, 'Detection of genetic variability among *Chrysanthemum* radiomutant using RAPD markers', *Current Sci.*, vol. 90, no. 8, pp. 1108-13.
12. Liu, J, Wang, L, Geng, Y, Wang, Q, Luo, L & Zhong, Y 2006, 'Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotata* (Lamiaceae), an endemic species of Qianghai-Tibet Plateau', *Genetica*, vol. 28, pp. 385-94.
13. Lu, G, Zhang, X, Zou, Y, Zou, Q, & Xiang, X 2007, 'Effect of radiation on regeneration of *Chinese narcissus* and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD', *Plant Cell, Tis. and Organ. Cult.*, vol. 88, no. 3, pp. 319-27.
14. Malik, SK, Chaudhury, R, Dhariwal, OP & Kalia, RK 2006, 'Collection and characterisation of *Citrus indica* Tanaka and *C. macroptera* Montr.: wild endangered species of north eastern India', *Gen. Res. and Crop Evol.*, vol. 53, pp. 1485-93.
15. Mattioni, C, Casasoli, M, Gonzales, M & Ipinza, R 2002, 'Comparison of ISSR and RAPD markers to characterise three Chilean *Notofagus* species', *Theor. Appl. Genet.*, vol. 104, pp. 1064-70.
16. Nugraheni, M, Santoso, U, Suparmo & Wuryastuti, H 2011, 'Potential of *Coleus tuberosus* as an antioxidant and cancer chemoprevention agent', *Int. Food. Res. J.*, vol. 18, no. 4, pp. 1471-80.
17. Poerba, YS, Wawo, A & Yulita, KS 2007, 'Keragaman fenotipe RAPD *Santalum album* L. di Pulau Timor bagian timur', *Berita Biologi*, vol. 8, no. 6, pp. 537- 46.
18. Primatilake, DP 2005, 'Inducing genetic variation of innala (*Solenostemon rotundifolius*) via invitro callus culture', *J. Natn.Sci Foundation Sri Lanka*, vol. 33, no. 2, pp. 123-31.
19. Rath, P, Rajaseger, G, Goh, CJ & Kumar, P 1998, 'Phylogenetic analysis of dipterocarps using random amplified polymorphic DNA markers', *Annals. of Bot.*, vol. 82, pp. 61-5.
20. Rucinska, A & Pulchaski, J 2010, 'Comparative molecular studies on the genetic diversity of an ex situ garden collections and its source population of the critically endangered polish endemic plant *Cochlearia polonica* E. Frochlich', *Biodivers Conserv.*
21. Shaaban, EA, Abd-El-Aal, SKH, Zaied, NS & Rizkalla, AA 2006, 'Assessment of genetic variability on some orange accessions using RAPD DNA markers', *Res J. Agric. Biol. Sci.*, vol. 2, no. 6, pp. 564-70.
22. Siregar, IZ, Yunanto, T & Pamoengkas, P 2008, 'Implikasi genetic metode pembiakan tanaman *Shorea johorensis* Foxw. pada sistem silvikultur tebang pilih tanam jalur (TPTJ)', *Biodiversitas*, vol. 9, no. 4, pp. 250-4.

23. Taryono, Cahyaningrum, P & Human, S 2011, 'The detection of mutational changes in shorgum using RAPD', *Indonesian J. Biotech.*, vol. 16, no. 1, pp. 66-70.
24. Tindall, HD 1993, *Vegetables in the Tropics*, The Macmillan Press Ltd.UK.
25. Williams, JGK, Kubelik, AR, Livak, KJ, Rafalski, JA & Tingey, SV 1990, 'DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers', *Nuc. Acids Res*, 18: 6531-35.
26. Yadav, PV, Suprasanna, P, Gopalrao, KU & Anant, BV 2006, 'Molecular profiling using RAPD technique of salt and drought tolerant regenerants of sugarcane', *Sugar Tech.*, vol. 8, no. 1, pp. 63-8.
27. Zietkiewicz, E, Rafalski, A & Labuda, D 1994, 'Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification', *Genomics*, vol. 20, pp. 176-83.