

Karakterisasi Molekuler Plasma Nutfah Tanaman Pangan

Ida H. Somantri, Tri J. Santoso, Minantyorini, A. Dinar Ambarwati, Atmitri
Sisharmini, dan Aniversari Apriana

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Penelitian ini telah dilakukan pada tahun anggaran 2002, pada komoditas padi asal Kalimantan Timur dan ubi jalar asal Irian Jaya. Karakterisasi molekuler dilakukan untuk mengetahui diversitas genetik dan kekerabatan dari komoditas yang ditangani. Penelitian ini merupakan tahap awal karakterisasi pada tingkat DNA pada plasma nutfah koleksi Balitbio. Isolasi DNA pada padi dan ubi jalar telah dilakukan sesuai target, sedangkan analisis PCR baru dilakukan pada ubi jalar. Hasil analisis PCR memperlihatkan bahwa dari tiga primer oligonukleotida acak yang digunakan, yaitu primer A01, A04, dan B01 dapat mengamplifikasi DNA dari 97 plasma nutfah ubi jalar yang berasal dari Irian Jaya dengan jumlah pita DNA bervariasi antara 1-9 pita. Amplifikasi dari ketiga primer tersebut juga menunjukkan adanya polimorfisme di antara aksesori-aksesori ubi jalar yang dianalisis.

Kata kunci: Karakterisasi molekuler, plasma nutfah, tanaman pangan

ABSTRACT

The research have been done in the year 2002, for rice germplasm from East Kalimantan and sweetpotato from Irian Jaya. Molecular characterization was done to know their genetics diversity and similarity. This research was the first activity to characterize DNA level of germplasm collection in Indonesian Agri-cultural Biotechnology and Genetics Resources Research Institute (IABGRRI). DNA isolation was done as a target, whereas PCR analysis was only done in sweetpotato. The results of PR analysis were random primer's of A01, A04, and B01 could be amplified the DNA on 97 accessions of sweetpotato germplasm with DNA band varied between 1-9.

Key words: Molecular characterization, germplasm, food crops

PENDAHULUAN

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian mempunyai mandat untuk pengelolaan plasma nutfah pertanian, terutama tanaman pangan termasuk padi dan ubi jalar. Plasma nutfah tersebut merupakan hasil pengumpulan baik secara eksplorasi atau introduksi dari luar negeri. Pada saat ini telah tersimpan sekitar 3500 aksesori padi dan 1000 aksesori ubi jalar. Untuk dapat dimanfaatkan dalam program pemuliaan plasma nutfah harus diidentifikasi sifat-sifat penting yang dimilikinya dan diharapkan terdapat keragaman genetik yang luas. Keberadaan keragaman genetik menempati peran yang sangat penting dalam program pemuliaan tanaman.

Sampai saat ini belum tersedia atau tersaji dengan baik informasi mengenai keragaman genetik dari plasma nutfah yang terkumpul, sehingga dipandang sangat perlu melakukan studi diversitas genetik untuk koleksi-koleksi yang ada. Diversitas genetik merupakan gambaran tingkat keragaman dalam suatu populasi dan banyak digunakan untuk melakukan studi kekerabatan di antara individu spesies.

Estimasi tingkat diversitas dapat dilakukan secara konvensional berdasarkan analisis karakter morfologi (John *et al.*, 1997), ataupun secara non konvensional berdasarkan pola pita isoenzim (Hunter *et al.*, 1995) atau pola pita DNA (Wang dan Tanskley, 1989; Cao dan Oard, 1997). Karakterisasi secara molekuler untuk setiap komoditas di Balitbiogen belum pernah dilakukan, untuk itu penelitian ini diharapkan sebagai langkah awal yang sangat berguna dalam mendorong dilakukannya karakterisasi secara molekuler dari plasma nutfah yang tersedia. Pada periode ini akan dilakukan terhadap ubi jalar asal Irian Jaya dan padi asal Kalimantan Timur. Selanjutnya dapat dilakukan terhadap semua koleksi dari semua komoditas.

RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) adalah salah satu teknik sidik jari DNA yang digunakan untuk mendeteksi polimorfisme sebuah genom berdasarkan PCR. Dengan metode ini, DNA genom diamplifikasi di bawah kondisi *stringency* yang rendah menggunakan sebuah primer oligonukleotida tunggal dan pendek biasanya 10 mer yang sekuennya dibuat secara acak. Kondisi *stringency* PCR yang rendah ini, memungkinkan primer untuk menempel pada banyak tempat pada genom, menghasilkan sejumlah pita fragmen DNA.

RAPD telah digunakan secara luas pada beberapa aplikasi, di antaranya untuk pemetaan genetik tanaman (Rowland dan Levi, 1994; Qu dan Hancock, 1997), analisis keterpautan (Nozaki *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1997; Nghia *et al.*, 1999), survei polimorfisme dan sidik jari (Prince *et al.*, 1995; Mulcahy *et al.*, 1993) dan identifikasi mutan suatu varietas (Deng *et al.*, 1995). Keunggulan dari teknik RAPD adalah kemampuannya yang secara cepat mendeteksi polimorfisme pada sejumlah lokus yang berbeda dengan menggunakan sejumlah nanogram DNA genom. Selain itu, teknik RAPD merupakan teknik yang paling cepat untuk mengumpulkan polimorfisme dalam DNA genom dan telah sering digunakan untuk mengkonstruksi peta genetik pada tingkat DNA.

Studi diversitas dan kekerabatan perlu dilakukan selain untuk memberi informasi kepada para pemulia tanaman juga untuk mengetahui apakah ada duplikasi atau tidak di dalam koleksi yang kita kelola.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah 97 aksesi plasma nutfah ubi jalar yang berasal dari Irian Jaya dan 124 aksesi plasma nutfah padi yang berasal dari Kalimantan Timur. Untuk analisis PCR (analisis RAPD), digunakan 5 ma-cam primer oligonukleotida acak dengan panjang 12 nukleotida (12 mer).

Metode

Isolasi DNA Ubi Jalar

DNA genom total diekstraksi dari daun ubi jalar sesuai dengan prosedur dari Tanaka dan Nakatani (2001). Sebelum ekstraksi, daun ubi jalar yang masih muda dikeringkan pada suhu 50°C selama semalam dan selanjutnya daun tersebut di-gerus sampai menjadi bubuk daun yang lembut. Sebanyak 25 mg bubuk daun di-masukkan ke dalam tabung mikro dengan ditambahkan 600 µl bufer ekstraksi CTAB (50 mM Tris HCl pH 8,0; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,7 M NaCl; 1% CTAB dan 0,1 M 2-mercaptoethanol) dan dicampur secara merata. Campuran diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dan selanjutnya ditambah dengan 1 kali volume chloro-form/isoamylalkohol (24 : 1) kemudian digoyang secara perlahan selama 5 menit dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit. Fase akuosa dipindahkan ke ta-bung mikro baru dan ditambah dengan 1/10 volume larutan 10% CTAB (10% CTAB dalam 0,7 M NaCl) dan dicampur dengan baik. Selanjutnya, campuran ditambah lagi dengan 1 kali volume chloroform/isoamylalkohol (24 : 1) kemudian digoyang secara perlahan selama 5 menit dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit. Fase akuosa dipindahkan ke tabung mikro baru dan ditambah dengan 1-1,5 x volume larutan 1% CTAB (50 mM Tris HCL pH 8,0; 5 mM EDTA pH 8,0 dan 1% CTAB). Larutan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dan kemudian disentrifus pada 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet dilarutkan pada larutan 1 M NaCl-TE serta ditambahkan 4 µl Rnase A (1 mg/ml) dan diinkubasi pada 55°C selama 30 menit. Setelah itu, larutan ditambah dengan 800 µl 100% EtOH dan dibolak-balik perlahan-lahan dan kemudian disentrifus pada 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 400 µl 70% EtOH kemudian pelet dikeringkan. Pelet DNA dilarutkan kembali dengan 100 µl TE (pH 8,0). Sebanyak 1 µl larutan DNA dianalisis dengan elektroforesis gel agarose (0,8%).

Isolasi DNA Padi

DNA total genom padi diekstraksi dari daun sesuai dengan prosedur miniprep CTAB dari Dellaporta *et al.* (1983) yang dimodifikasi. Sampel daun muda padi dipanen dan dipotong-potong menjadi potongan kecil-kecil kemudian digerus dengan nitrogen cair sampai menjadi bubuk daun yang lembut. Hasil gerusan di-masukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml dan ditambah dengan 500 µl bufer eks-traksi kemudian divorteks untuk melarutkan gerusan sampel. Campuran ditambah dengan 25 µl 20% SDS dan diinkubasi pada 65°C selama 10 menit. Setelah itu, cam-puran ditambah dengan 85 µl 5M NaCl dan eppendorf dibolak-balik sampai ter-campur merata

kemudian ditambahkan 10% CTAB sebanyak 67,5 µl. Campuran diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit dan kemudian ditambah dengan 675 µl kloroform, dicampur dengan baik dan disentrifus selama 2 menit pada 12.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke eppendorf baru dan ditambah dengan 450 µl isopropa-nol dingin kemudian disentrifus untuk mengendapkan DNA pada 8000 rpm selama 5 menit. Pelet dicuci dengan 70% EtOH dan dikeringkan kemudian dilarutkan kembali dengan 30 µl buffer TE. Sebanyak 1 µl larutan DNA dianalisis dengan elektroforesis gel agarose (0,8%). DNA yang diperoleh siap digunakan untuk analisis RAPD.

Analisis PCR (RAPD)

Pengujian PCR dilakukan dengan total volume reaksi 20 µl mengandung 20 ng DNA genomik sebagai cetakan, 2 µl 10 x PCR buffer, 1,6 µl 2,5 mM dNTPs, 1,2 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl primer (10 pmol/µl), 0,5 unit enzim *Taq DNA Polimerase* dalam larutan bufer dan 11,1 µl ddH₂O. Reaksi amplifikasi dilakukan berdasarkan metode Tanaka dan Nakatani (2001) dengan menggunakan mesin PCR MJ Research PCT-100. Program PCR terdiri dari inkubasi awal pada suhu 95°C selama 1 menit dilanjutkan dengan 40 siklus pada suhu 94°C selama 30 detik untuk denaturasi, suhu 35°C selama 1 menit untuk penempelan primer, dan suhu 72°C selama 2 menit untuk sintesis DNA. Siklus terakhir untuk pemanjangan akhir pada 72°C selama 5 menit. Sebanyak 10 µl produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis pada 1% gel agarose.

Skoring Pita DNA Hasil PCR

Profil RAPD akan diskor secara individual berdasarkan adanya pita (1) dan ti-dak adanya pita (0). Berdasarkan ada tidaknya pita ini kemudian akan disusun data biner dengan menggunakan rumus yang disajikan oleh Nei dan Li (1979), yaitu

$$F = 2 nab/(na+nb)$$

F = koefisien persamaan

nab = jumlah pita yang sama pada individu a dan b

na/nb = jumlah pita pada masing-masing individu a atau b

Dari persamaan ini akan dicari koefisien “dice” untuk menentukan jarak ke-kerabatan. Setelah itu, dapat diadakan analisis kelompok (*cluster analysis*) dan di-buat dendogramnya.

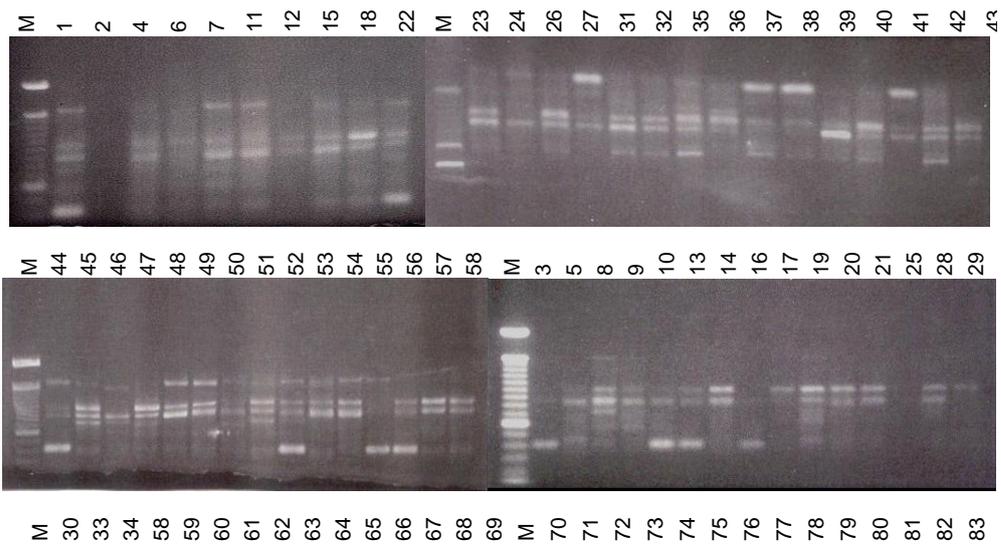
HASIL DAN PEMBAHASAN

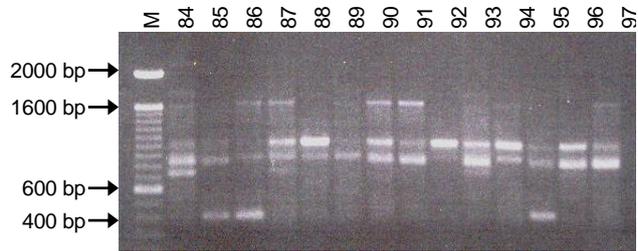
Sebelum dilakukan analisis RAPD, maka ada beberapa pertimbangan yang harus dilakukan sehingga akan diperoleh hasil analisis yang memuaskan. Dengan kata lain, optimasi beberapa parameter perlu dilakukan. Karena telah ada beberapa peneliti yang melakukan penelitian yang serupa, di antaranya adalah Tanaka dan Nakatani (2001) maka metode optimasi yang

telah digunakan oleh peneliti dapat diaplikasikan pada penelitian ini. Dari hasil optimasi tersebut ternyata parameter dan kondisi PCR yang digunakan dapat diaplikasikan pada kegiatan ini.

Polimorfisme yang terjadi dari analisis RAPD ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA pada individu yang satu sementara individu yang lain tidak terbentuk pita DNA pada posisi atau ukuran yang sama. Dengan adanya polimorfisme ini maka akan menggambarkan tingkat keragaman genetik dari plasma nutfah yang dikarakterisasi. Semakin tinggi tingkat polimorfisme maka tingkat keragaman genetik di antara individu-individu plasma nutfah juga akan semakin tinggi. Primer yang digunakan pada penelitian ini diharapkan akan memberikan hasil analisis dengan tingkat polimorfisme yang cukup tinggi.

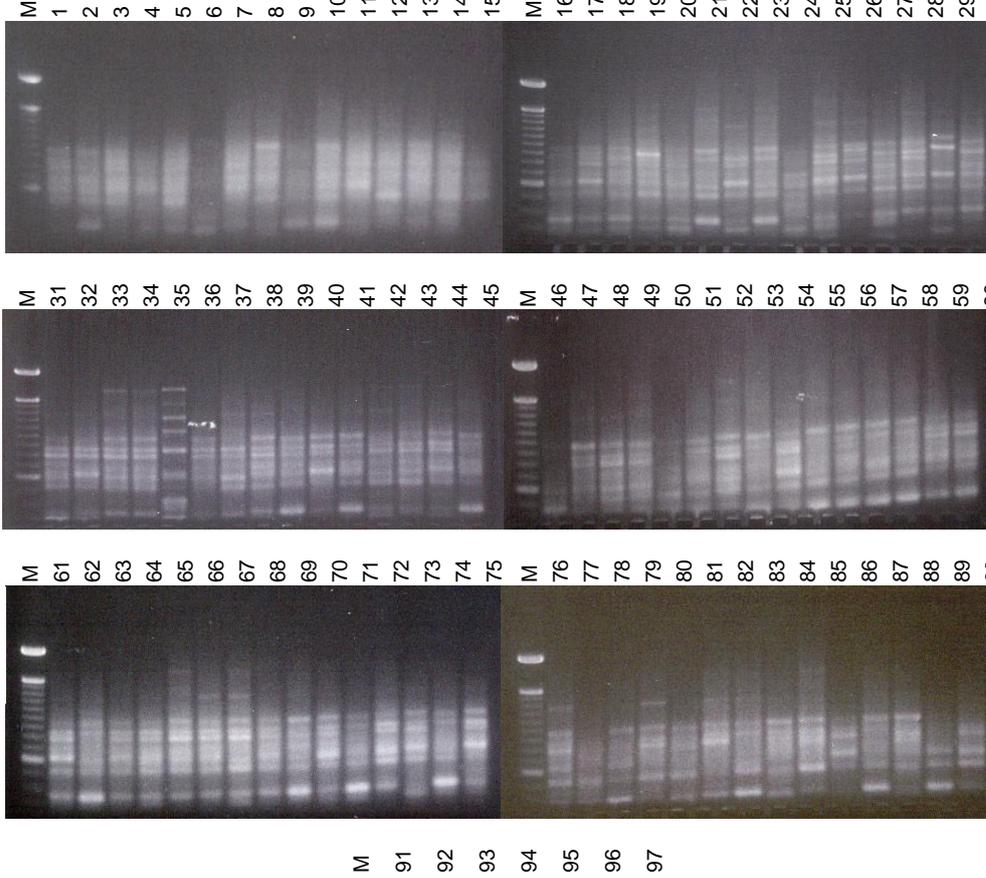
Tiga buah primer oligonukleotida acak, yaitu primer A01, A04, dan B01 telah digunakan untuk mengamplifikasi 97 aksesori plasma nutfah ubi jalar. Hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan 3 primer oligonukleotida acak dapat dilihat pada Gambar 1, 2, dan 3. Dari ketiga gambar tersebut dapat dilihat bahwa secara umum, primer yang digunakan dapat mengamplifikasi DNA dari aksesori yang dianalisis. Dari tingkat polimorfisme juga dapat dilihat bahwa primer tersebut menunjukkan tingkat polimorfisme yang relatif cukup tinggi. Pita DNA hasil PCR yang dihasilkan untuk masing-masing primer jumlah dan ukurannya sangat bervariasi. Bila dilihat dari ukurannya, maka pita DNA yang dihasilkan dari ketiga primer tersebut berukuran tidak lebih dari 2000 bp.





M = Marker 100 bp ladder

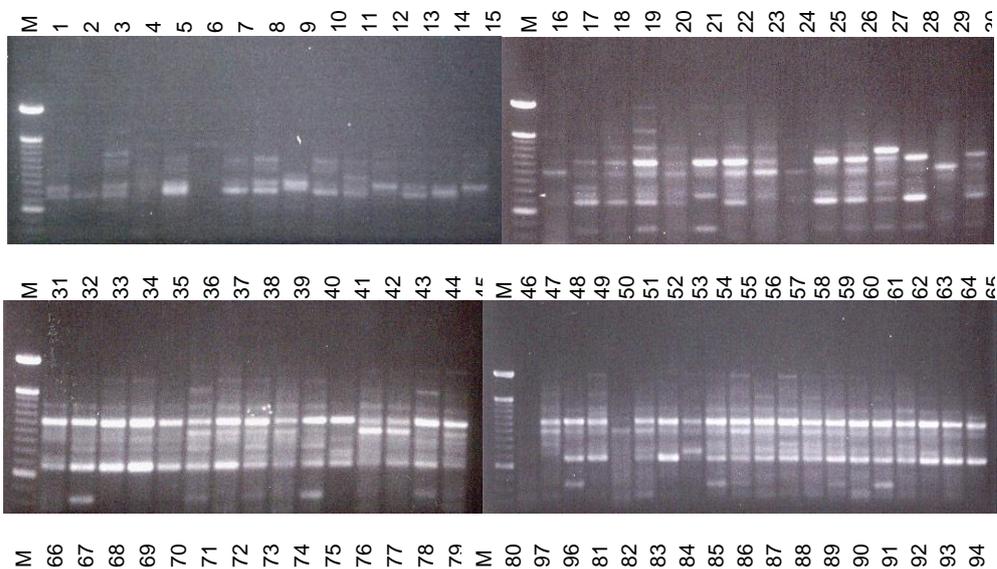
Gambar 1. Hasil analisis RAPD dari 97 aksesi plasma nutfah ubi jalar menggunakan primer A01

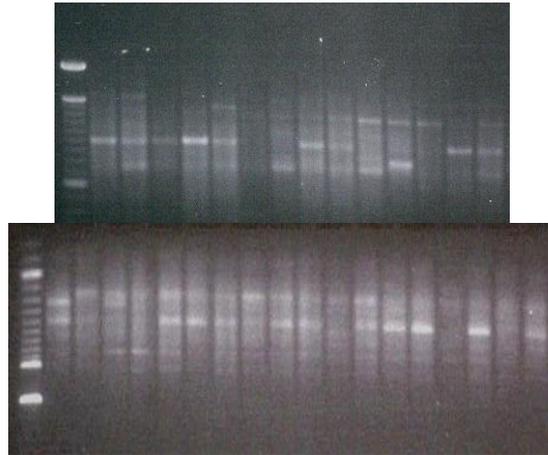




M = Marker 100 bp ladder

Gambar 2. Hasil analisis RAPD dari 97 aksesii plasma nutfah ubi jalar menggunakan primer A04





M = Marker 100 bp ladder

Gambar 3. Hasil analisis RAPD dari 97 aksesii plasma nutfah ubi jalar menggunakan primer B01

Untuk primer A01, dari 97 aksesii yang dianalisis, terdapat 5 aksesii yang tidak menghasilkan pita DNA, yaitu aksesii No. 2, 25, 58, 59, dan 65. Jumlah pita DNA yang dihasilkan dari primer ini berkisar antara 1-4 pita DNA. Polimorfisme di antara aksesii-aksesii, di antaranya terjadi pada pita DNA yang berukuran 1600 bp dan 400 bp.

Pada primer A04, semua aksesii yang diamplifikasi menghasilkan pita DNA. Jumlah pita DNA yang dihasilkan bervariasi dari 2-9 pita. Bila dilihat dari Gambar 2, tingkat polimorfisme dari primer ini lebih rendah bila dibandingkan dengan 2 primer lainnya.

Pada primer B01, terdapat 2 aksesii yang tidak menghasilkan pita DNA, yaitu aksesii No 46 dan 71. Jumlah pita DNA yang dihasilkan bervariasi antara 1-9 pita. Polimorfisme terjadi di antaranya pada pita DNA yang berukuran 400 bp. Perbandingan di antara 3 primer yang digunakan untuk menghasilkan pita DNA dapat dilihat pada Tabel 1.

Untuk mengetahui tingkat diversitas atau keragaman genetik ubi jalar dan tingkat hubungan kekerabatan genetik diantara plasma nutfah ubi jalar asal Irian Jaya, pada kegiatan ini belum dilakukan karena masih 2 primer acak lagi yang belum dikerjakan untuk analisis RAPD. Sementara, untuk plasma nutfah padi yang berasal Kalimantan Timur, analisis molekuler dengan PCR belum dilakukan. Namun demikian, DNA dari plasma nutfah padi tersebut telah selesai diekstraksi dan siap untuk dilakukan analisis RAPD.

Tabel 1. Perbandingan tiga primer RAPD yang digunakan untuk mengamplifikasi 97 aksesi plasma nutfah ubi jalar

No.	Primer	Jumlah pita DNA yang dihasilkan	Jumlah aksesi yg tidak menghasilkan pita DNA	Polimorfisme
1.	A01	1-4	5	ada
2.	A04	2-9	0	ada
3.	B01	1-9	2	ada

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa dari tiga primer oligo-nukleotida acak yang digunakan, yaitu primer A01, A04, dan B01 dapat mengamplifikasi DNA dari 97 plasma nutfah ubi jalar yang berasal dari Irian Jaya dengan jumlah pita DNA bervariasi antara 1-9 pita. Amplifikasi dari ketiga primer tersebut juga menunjukkan adanya polimorfisme di antara aksesi-aksesi ubi jalar yang dianalisis. Analisis RAPD untuk aksesi-aksesi plasma nutfah padi yang berasal dari Kalimantan Timur sekarang sedang dikerjakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Cao, D. and J.H. Oard. 1997.** Pedigree and RAPD based DNA analysis of commercial US rice cultivars. *Crop Science* 37:1630-1635.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and T.B. Hicks. 1983.** A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-20.
- Deng, Z.N., A. Gentile, E. Nicolosi, F. Domina, A. Vardi, and E. Tribulato. 1995.** Identification of *in vivo* and *in vitro* lemon mutants by RAPD markers. *Journal of Horticult. Sci.* 70:117-125.
- Hunter, D.E., J.P. Murphy, and T.D. Phillips. 1995.** Isozyme variation in *Avena sterillis* L. Collected in Turkey. *Crop Sci.* 35:1477-1482.
- John, M.A., P.W. Skroch, J. Nienhuis, P. Hinrichsen, G. Bascur, and C. Munoz-Schick. 1997.** Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Sci.* 37:605-613.
- Mulcahy, D.L., M. Cresti, S. Sansavini, G.C. Douglas, H.F. Linskens, G.B. Mulcahy, R. Vignani, and M. Pancaldi. 1993.** The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Scientia Horticulturae* 24:89-96.

- Nei, M. And W.H. Li. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in of restriction endonuclease. Proc. Natl. Acad Science USA. 76:5269-5273.
- Nghia, P.T., J.P.S. Malik, M.P. Pandey, and N.K. Singh. 1999.** Genetic distance analysis of hybrid parental lines based on morphological traits and RAPD markers. Omonrice J. 7:49-59.
- Nozaki, T., A. Kumazaki, T. Koba, K. Ishikawa, and H. Ikehashi. 1997.** Linkage analysis among loci for RAPDs, isozymes and some agronomic traits in *Brassica campestris* L. Euphytica 95:115-123.
- Prince, J.P., V.K. Lackney, C. Angeles, J.R. Blauth, and M.M. Kyle. 1995.** A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. Genome 38:224-231.
- Qu, L. and J.F. Hancock. 1997.** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-based genetic linkage map of blueberry derived from an interspecific cross between diploid *Vaccinium darrowi* and tetraploid *V. Corymbosum*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122:69-73.
- Rowland, L.J. and A. Levi. 1994.** RAPD-based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species (*Vaccinium darrowi* and *V. elliotii*). Theor. Appl. Genet. 87:863-868.
- Tanaka, M. and M. Nakatani. 2001.** Protocol for RAPD analysis of sweetpotato. Apresiasi Introduksi Analisa DNA Ubi Jalar. Bogor, 6-7 Agustus 2001.
- Thompson, P.G., L.L. Hong, and K. Ukoskit. 1997.** Genetic linkage of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in sweetpotato. J. Amer. Soc. Hort. Sci.122:79-82.
- Wang, A.Y. and S.D. Tanksley. 1989.** Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L. Genome 32:1113-1118.