

© 2004 Saleha Hannum
Makalah Pribadi Falsafah Sains (PPS 702)
Sekolah Pasca Sarjana / S3
Institut Pertanian Bogor
Desember 2004

Posted: 19 December, 2004

Dosen:
Prof Dr Ir Rudy C Tarumingkeng, M F (Penanggung Jawab)
Prof. Dr. Ir. Zahrial Coto, M.Sc
Dr. Ir. Hardjanto, M.S

KEMIRIPAN GENETIK KELAPA GENJAH HIJAU JOMBANG dan GENJAH HIJAU NIAS BERDASARKAN PENANDA RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Oleh:

Saleha Hannum
G361040041
shol31@yahoo.com

PENDAHULUAN

Tanaman kelapa merupakan komoditas strategis yang berperan bukan hanya dalam segi ekonomi tetapi juga sosial dan budaya (Harries, 1978) bagi masyarakat Indonesia. Tanaman ini diduga berasal dari Asia Tenggara terutama wilayah Indo-Malaya (Persley, 1992), yang memiliki sistem penyerbukan alogami dan autogami sehingga dengan demikian tidak mengherankan bila Indonesia memiliki keragaman kelapa yang tinggi.

Sampai akhir Pelita V (1993) Balai Penelitian Kelapa dan Palma Lain (BALITKA) Manado telah mengkoleksi dari berbagai daerah di Indonesia sebanyak 113 populasi kelapa genjah dan dalam. Diantara kelapa genjah yang dikoleksi tersebut adalah kelapa Genjah Hijau Jombang (GHJ) yang berasal dari Jombang, Jawa Timur telah berkembang dan beradaptasi baik pada lahan pasang surut dan kelapa Genjah Hijau Nias (GHN) yang berasal dari Nias, Sumatera Utara mempunyai sifat lebih tahan terhadap penyakit *Phytophthora palmivora* yang menyebabkan busuk pucuk dan gugur buah muda. Kedua

populasi kelapa genjah ini mempunyai warna buah hijau dan telah dikoleksi oleh Kebun Instalasi Penelitian (KIP) Mapanget sejak tahun 1978 – 1980.

Evaluasi hubungan genetik dari koleksi plasma nutfah kelapa genjah ini sangat perlu dilakukan untuk memperoleh informasi genetiknya dalam menunjang program pemuliaan dan pelestarian plasma nutfah Indonesia. Analisis RAPD merupakan salah satu penanda molekuler yang digunakan untuk evaluasi hubungan genetik populasi organisme. Dasar analisis RAPD adalah penggunaan mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang mampu mengamplifikasi sekuen DNA secara *in vitro*. Penggunaan penanda RAPD relatif lebih murah, mudah, cepat memberikan hasil, tidak memerlukan pengetahuan tentang latar belakang dari genom yang dianalisis dan mudah memperoleh primer acak yang diperlukan untuk analisis genom semua jenis organisme (Tingey *et al.*, 1992). Pada tanaman tahunan RAPD sangat membantu dalam peningkatan efisiensi pada seleksi awal (Grattapaglia *et al.*, 1992).

Informasi penggunaan penanda RAPD untuk analisis hubungan genetik kelapa GHN belum pernah dilaporkan. Sedangkan kelapa GHJ telah dilaporkan oleh Hayati *et al.* (2000), tetapi bagaimana hubungan genetik GHJ dengan kelapa GHN yang sama-sama mempunyai buah warna hijau belum pernah dilaporkan. Karena itu dalam upaya untuk mendapatkan informasi genetik yang akurat dari seluruh koleksi plasma nutfah kelapa yang dimiliki untuk menunjang program pemuliaan kelapa, penggunaan penanda RAPD untuk analisis hubungan genetik kelapa perlu dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan genetik antar dan di dalam populasi kelapa Genjah Hijau Jombang (GHJ) dan Genjah Hijau Nias (GHN) berdasarkan penanda RAPD.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun muda dari populasi kelapa GHJ dan GHN yang ditanam di KIP Mapanget. Masing-masing populasi digunakan 10 tanaman sehingga jumlah seluruh tanaman yang digunakan adalah 20 pohon.

Isolasi DNA dilakukan dengan menggerus daun kelapa dengan pasir kuarsa menurut metode Rohde *et. al* (1995) yang telah dimodifikasi. DNA yang dihasilkan dari setiap sample diuji kuantitas, kualitas dan kemurniannya berdasarkan Sambrook *et. al.* (1989). DNA hasil isolasi diamplifikasi menggunakan 9 primer acak 10-mer yang

diseleksi dari 35 primer operon Kit A, B, dan C (Operon Alameda Technologies, Alameda, California). Hasil amplifikasi dielektroforesis bersama DNA standar 1kb DNA Ladder (Promega) pada gel agarose dengan konsentrasi 0.8%, voltase 70 volt selama 2.5 jam di dalam larutan penyangga TAE 1X (0.04 M Tris-acetat, 0.001 M EDTA). Setelah pewarnaan dengan 0.5µg/ml etidium bromida, lalu diamati di bawah sinar UV, dan dilakukan pemotretan dengan film Polaroid 667 atau dengan alat dokumentasi gel.

Berdasarkan ada atau tidak adanya pita, profil pita DNA diterjemahkan ke dalam data biner. Pengelompokan data matrik (*cluster analysis*) dan pembuatan fenogram dilakukan menggunakan metode UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Arithmetic*) dengan koefisien Dice melalui program NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate System*) versi 1.80 (Rohlf, 1993). Analisis komponen utama melalui program MINITAB versi 13.3.

HASIL DAN DISKUSI

Profil Pita RAPD

Berdasarkan jumlah pita yang diamplifikasi dari 35 primer acak yang diseleksi, diperoleh 9 primer yang menghasilkan pola pita lebih dari 2 dan polimorfis. Kesembilan primer ini selanjutnya yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA dari 10 pohon untuk setiap populasi kelapa GHJ dan GHN. Sedangkan 26 primer lainnya adalah 6 primer yang menghasilkan 1 pita, 11 primer yang menghasilkan pita monomorfik dan 9 primer yang tidak menghasilkan pita. Adanya primer yang tidak menghasilkan pita mengindikasikan bahwa primer-primer tersebut tidak mempunyai homologi dengan DNA cetakan, karena terbentuknya fragmen pita DNA tergantung pada sekuen primer dan genotipe dari DNA cetakan (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991).

Pengamatan terhadap profil pita DNA yang dihasilkan dari 9 primer terhadap kedua populasi kelapa Genjah yang berwarna buah hijau ditampilkan pada Tabel 1. Kesembilan primer ini dapat memisahkan keempat populasi ke dalam kelompoknya masing-masing. Pita yang didapatkan berukuran 250 – 2500 pb (pasang basa). Jumlah pita berkisar antara 7 (OPA- 20) dan 15 (OPA-10, OPA-18, DAN OPC-11). Jumlah pita yang diamplifikasi oleh setiap primer serupa dengan hasil Asburner *et al.*,(1997), dan Lengkong *et al.* (1998) yaitu berkisar antara 3 – 15 pita per primer.

Tabel 1. Jenis Primer, susunan basa, dan jumlah pita DNA hasil amplifikasi

Primer	Susunan Basa (5' – 3')	Jumlah Pita			Jumlah Pita Polimorfik		
		GHJ	GHN	Total	GHJ	GHN	Total
OPA-04	AATCGGGCTG	10	8	11	4	1	7
OPA-08	GTGACGTAGG	8	7	9	3	4	8
OPA-10	GTGATCGCAG	13	12	14	11	7	12
OPA-13	CAGCACCCAC	12	8	12	6	3	9
OPA-18	AGGTGACCGT	12	14	15	7	9	11
OPA-20	GTTGCGATCC	7	6	7	2	1	3
OPB-08	GTCCACACGG	9	6	9	6	2	7
OPC-05	GATGACCGCC	9	10	12	2	6	9
OPC-11	AAAGCTGCGG	14	15	15	10	10	13
Total		94	86	104	51	43	79
Persentase polimorfisme (%)					54	44	76

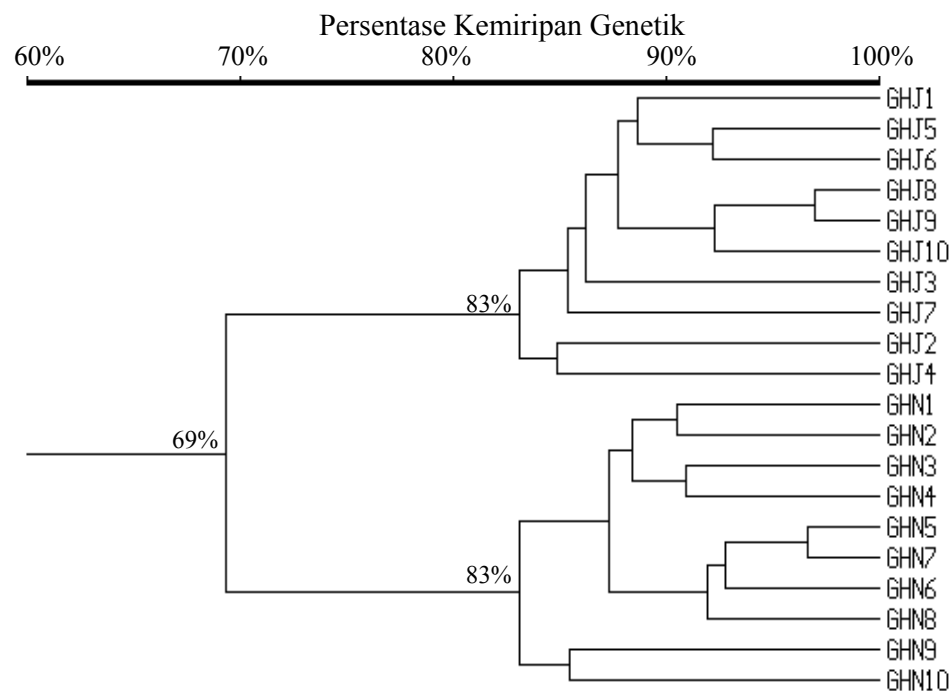
Jumlah pita DNA yang dihasilkan oleh setiap primer tergantung pada sebaran situs yang homolog dengan sekuen primer pada genom. Adapun jumlah total pita yang dihasilkan dari 9 primer yang digunakan adalah 104 pita dan 76% diantaranya adalah polimorfis. Hayati (1999) yang meneliti keragaman genetik kelapa Genjah Jombang menghasilkan 92% pita polimorfis. Jumlah pita polimorfis yang dihasilkan tergantung pada jenis primer dan DNA yang digunakan.

Primer OPA-20 yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA kelapa GHJ dan GHN, menghasilkan pita polimorfis yang rendah (3 pita), sama dengan yang dihasilkan pada kelapa Dalam Mapanget 32 (DMT-32) (Masniawati, 2000). Sementara polimorfisme yang tinggi diperoleh dari primer OPA-10 dan OPC-11. Perbedaan jumlah dan polimorfisme pita DNA yang dihasilkan dari setiap primer menggambarkan kekompleksan genom tanaman yang diamati (Grattapaglia *et.al*, 1992). Karena pita DNA merupakan hasil berpasangannya nukleotida primer dengan nukleotida genom tanaman, maka semakin banyak primer akan semakin terwakili bagian-bagian genom, sehingga semakin tergambar keadaan genom tanaman yang sesungguhnya. Sebaran situs penempelan primer pada DNA genom, jumlah fragmen yang diamplifikasi, serta kemurnian dan konsentrasi DNA genom dalam reaksi mempengaruhi intensitas pita DNA hasil amplifikasi (Grattapaglia *et al.*, 1992).

Kemiripan Genetik Kelapa Genjah Hijau Jombang (GHJ) dan Genjah Hijau Nias (GHN)

Kemiripan genetik dalam setiap populasi tanaman kelapa dalam penelitian ini dapat ditentukan berdasarkan hubungan kemiripan genetik antar individu tanaman kelapa dalam populasi yang sama, dan antar populasi yang berbeda dengan cara membandingkan pita RAPD dari setiap individu tanaman.

Berdasarkan profil pita RAPD populasi kelapa GHJ dan GHN, dibuat matriks kemiripan genetik antar individu pohon kelapa dalam populasi yang sama dan antar individu kedua populasi. Analisis pengelompokan yang diturunkan dari matriks kemiripan genetik pada populasi kelapa GHJ dan GHN memperlihatkan bahwa masing-masing individu populasi kelapa mengelompok pada populasinya (Gambar 1). Individu kelapa populasi GHJ dan GHN yang keduanya mempunyai buah berwarna hijau mengelompok pada populasi masing-masing pada kemiripan genetik 83%. Kedua populasi ini mempunyai kemiripan genetik 69%.



Gambar 1. Fenogram kemiripan genetik berdasarkan penanda RAPD antar populasi kelapa GHJ dan GHN

Fenomena ini menunjukkan bahwa pengelompokan individu-individu pohon kelapa berdasarkan kemiripan genetik tidak bisa hanya dari kesamaan warna buahnya. Pohon kelapa dari kedua populasi kelapa Genjah (GHJ dan GHN) yang mempunyai warna

buah yang sama mengelompok sesuai dengan lokasi asal koleksi, dan tidak mengelompok secara acak. Warna buah hanyalah salah satu dari sekian banyak karakter genetik yang dimiliki oleh kelapa Genjah, sedangkan karakter-karakter pita DNA hasil amplifikasi dengan 9 primer acak ini belum tentu terpaut dengan karakter warna buah yang mudah dibedakan secara visual. Hasil ini menguatkan pentingnya penanda DNA dalam melihat hubungan genetik tanaman yang secara morfologi sulit dibedakan.

Berdasarkan analisis komponen utama (*principal component analysis*) yang diturunkan dari matriks peragam (*covariance matrix*) terhadap karakter pita DNA hasil RAPD dengan 9 primer acak pada populasi kelapa GHJ dan GHN yang keduanya mempunyai buah warna hijau, diperoleh tiga komponen utama pertama yang memiliki akar ciri (*eigenvalue*) lebih dari satu. Komponen utama (KU) I dapat menerangkan keragaman pita RAPD dengan 9 primer acak sebesar 45%, sedangkan KU II dan KU III masing-masing sebesar 9% dan 7% (Tabel 2). Sehingga ketiga KU tersebut menjelaskan keragaman sebesar 61 %, yang artinya 61% keragaman dari karakter pita RAPD tersebut pada 20 individu kelapa populasi GHJ dan GHN dapat diterangkan oleh 3 komponen utama tersebut.

Tabel 2. Nilai komponen dengan nilai mutlak lebih dari 0.19 dari nilai komponen utama I, II, dan III pita-pita RAPD dengan 9 primer acak pada DNA kelapa GHJ dan GHN, dan persentase kehadirannya.

No	Primer	Pita ke-*	Nilai Komponen Utama (% keragaman)			Persentase Kehadiran (%)	
			I (45%)	II (9%)	III(7%)	GHN	GHJ
1	OPA-08	1	0.194	-0.021	0.054	0	100
2		3	0.009	-0.334	0.026	70	60
3		5	-0.194	0.021	-0.054	100	0
4		6	-0.194	0.021	-0.054	100	0
5		9	0.068	-0.073	0.266	60	100
6	OPA-10	2	0.135	0.170	-0.202	20	80
7		3	0.120	0.240	-0.204	20	70
8		11	0.137	-0.227	-0.013	0	70
9	OPA-13	2	-0.194	0.021	-0.054	100	0
10		4	-0.049	-0.205	0.103	80	60
11		9	0.052	0.019	0.207	70	100
12		10	-0.194	0.021	-0.054	100	0
13	OPA-18	12	0.087	-0.219	-0.194	30	70
14	OPC-05	8	-0.194	0.021	-0.054	100	0
15		10	-0.194	0.021	-0.054	100	0
16		11	-0.194	0.021	-0.054	100	0
17		13	-0.045	0.295	0.252	50	30
18	OPC-11	4	0.019	-0.121	-0.244	50	50
19		14	-0.112	-0.087	-0.235	90	30
20		15	0.092	0.068	0.239	50	100

Keterangan : * Pita ke- : Urutan pita hasil amplifikasi dari setiap primer dari pita yang berukuran besar ke kecil (pita ke-1 mempunyai ukuran lebih besar dari pita ke-2 dalam setiap primer yang sama)

Analisis komponen utama dari matriks peragam data biner pita RAPD populasi kelapa Genjah hijau ini berhasil mengidentifikasi 20 pita yang mempunyai nilai mutlak KU lebih dari 0.19 pada komponen I, II dan III (Tabel 2). Pada KU I, banyaknya pita penciri hasil amplifikasi primer OPA-08 , primer OPA-13, dan primer OPC-05 yang nilai mutlak KUnya lebih dari 0.19 berturut-turut 3, 2, dan 3 pita. Pita penciri pada KU I adalah pita ke 1, 5, dan 6 dari OPA-08, pita ke 2 dan 10 dari OPA-13, dan pita ke 8, 10, dan 11 dari OPC-05. Pada KU II dicirikan oleh 6 pita, yaitu pita ke 3 dari OPA-08, pita ke 3 dan ke 11 primer OPA-10, pita ke 4 OPA-13, pita ke 12 primer OPA-18, dan pita ke 13 dari primer OPC-05. Sedangkan komponen utama III dicirikan oleh 9 pita, yaitu pita ke 9 dari primer OPA-08, pita ke 2 dan 3 primer OPA-10, pita ke 9 primer OPA-13, pita ke 12 primer OPA-18, pita ke 13 primer OPC-05, dan pita ke 4, 14 dan 15 primer OPC-11.

Pita pertama dari primer OPA-08 (2500 pb) dapat digunakan untuk membedakan kelapa GHN dari kelapa populasi GHJ, karena pita tersebut hanya dimiliki oleh kelapa GHN. Sementara pita ke 5 (1375 pb) dan ke 6 (1250 pb) primer OPA-08, pita ke 2 (2000 pb) dan 10 (650 pb) OPA-13, dan pita ke 8 (900 pb), 10 (750 pb), dan 11 (550 pb) dari primer OPC-05 dapat digunakan sebagai pembeda kelapa GHJ karena pita-pita tersebut ada pada kelapa GHJ, tetapi tidak ada pada kelapa GHN.

KESIMPULAN

Analisis RAPD dengan 9 primer acak pada pohon kelapa populasi Genjah Hijau Jombang (GHJ) dan Genjah Hijau Nias (GHN) dapat dipakai untuk mengelompokkan individu pohon kelapa pada populasinya. Kemiripan genetik pohon kelapa di dalam populasi GHJ dan GHN relatif sama. Kedua populasi kelapa Genjah yang mempunyai warna buah hijau ini mengelompok pada kemiripan genetik 69%.

Analisis komponen utama, berhasil melacak pita yang berperan dalam mengelompokkan kedua populasi kelapa Genjah Hijau ini. Pita RAPD ke 5 dan 6 dari OPA-08, pita ke 2 dan 10 dari OPA-13 dan pita ke 6, 10, dan 11 dari OPC-05 hanya terdapat pada GHJ, sehingga dapat digunakan sebagai penanda populasi kelapa GHJ dari GHN. Pita pertama OPA-08 dapat digunakan sebagai penanda populasi kelapa GHN dari GHJ.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashburner, G.R., W.K. Thompson, and G.M. Halloran. 1997. RAPD Analysis of South Pacific Coconut Palm Population. *Crop Science* 39 : 992 – 997.
- Grattapaglia, D., J. Chaparro, P. Wilcox, S. McCord, D. Werner, H. Amerson, S. McKeand, F. Bridgwater, R. Whetten, D. O'Malley and R. Sederoff. 1992. Mapping in woody plants with RAPD markers: Application to breeding in forestry and horticulture, hlm. 37-40. Di dalam : *Application of RAPD Technology to Plant Breeding*. Joint Plant Breeding Symposia Series CSSA/ASHS/AGA. Minneapolis, 1 November 1992.
- Harries, H.C., 1978. The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. *Both. Review*, 44: 265 – 317.
- Hayati, P.K.D. 1999. Keragaman genetik kelapa Genjah Jombang berdasarkan penanda RAPD. Tesis. Bogor. Program Pascasarjana IPB.
- Hayati, P.K.D., A. Hartana, Suharsono dan H. Aswidinnoor. 2000. Keanekaragaman genetika kelapa Genjah Jombang berdasarkan *Random Amplified Polymorphic DNA*. *Hayati* Vol. 7 (2): 35 – 40.
- Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermont, R. Weide, T. Liharska, dan P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato using RAPD. *Theor. Appl. Genet.* 83: 108 – 114.
- Lengkong, E.F., A. Hartana, dan Suharsono. 1998. Keragaman genetika beberapa kultivar kelapa berdasarkan penanda RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), hlm. 1 – 12. Di dalam: *Prosiding Seminar Sehari Hasil-Hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat*. Bogor. 3 September 1998.
- Masniawati, A. 2000. Keragaman genetik kelapa Dalam Mapanget-32 (DMT-32) hasil penyerbukan terbuka dan penyerbukan sendiri berdasarkan penanda molekular *Random Amplified polymorphic DNA* (RAPD). Thesis. Program Pascasarjana IPB. Bogor.
- Persley, G.J. 1992. *Replanting the tree of life: Toward an international agenda for coconut palm research*. Redwood Press Ltd. Melksham.
- Rohde, W., A. Kullaya, J. Rodriguez, and E. Ritter. 1995. Genome analysis of *Cocos nucifera* L. by PCR Amplification of spacer sequences separating a subset of copia-like EcoRI repetitive elements. *J. Genetics and Breeding* 49: 170 – 186.
- Rohlf, F. 1993. *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, version 1.80. Exeter, Publishing, Ltd., New york.

Sambrook, J.E., F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. CSH-New York.

Tingey, S.V., J.A. Rafalski, and J.G.K. Williams. 1992. Genetic analysis with RAPD markers, hlm. 3-8. Di dalam: *Application of RAPD Technology to Plant Breeding*. Joint Plant Breeding Symposia Series CSSA/ASHS/AGA. Minneapolis, 1 November 1992.