ISBN 978-602-1570-08-1

Analisis Komparatif Efektifitas Marka Molekuler AFLP dan RAPD dalam Analisis DNA Total Beberapa Klon Tanaman Karet.

Lalu Zulkifli
Program Studi Pendidikan Biologi, PMIPA FKIP Universitas Mataram

Abstrak

Ketersediaan informasi keragaman genetik tanaman karet penting untuk mendukung program pemuliaan dan konservasi plasma nutfah. Efektifitas penggunaan teknik marker molekuler dalam analisis DNA total tanaman karet perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efektifitas antara sistem marker AFLP dan RAPD dalam analisis DNA total beberapa klon karet. Marker indeks merupakan salah satu parameter yang sangat penting dalam menentukan tingkat efektifitas suatu sistem marker molekuler. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa marker indeks AFLP (2,38) lebih tinggi daripada marker indeks RAPD (0,35). Oleh karena itu dapat direkomendasikan bahwa dalam analisis DNA plasma nutfah karet dimasa yang akan datang sebaiknya menggunakan sistem marker molekuler PCR-AFLP.

Kata Kunci : ***AFLP, keragaman genetik, marker index, PCR, polymorphic information content, RAPD***

A. Pendahuluan

Pada umumnya marker molekuler telah terbukti sangat penting dalam meningkatkan kualitas tanaman dan studi evolusi dalam banyak spesies tanaman (Hopkins *et al.*, 1999). Marker DNA telah terbukti lebih baik dari marker morfologi dan isoenzim karena marker DNA mengukur secara langsung variasi DNA genom yang ada. Berkaitan dengan hal tersebut, penerapan marker DNA berbasis PCR yang memiliki polimorfisme yang tinggi dalam analisis keragaman genetik tanaman perlu dilakukan karena dapat berguna dalam mendukung berbagai kegiatan terkait dengan pemuliaan, inventarisasi informasi molekuler, identifikasi dan karakterisasi plasma nutfah serta untuk kepentingan konservasi plasma nutfah baik hewan maupun tumbuhan. Dalam ini ini penggunaan marker molekuler yang diterapkan dalam analisis tertentu harus diusahakan untuk menerapkan marker molekuler yang daya ungkap polimorfismenya tinggi, konsisten dan genome coveragenya tinggi. Saat ini penggunaan marker molekuler masih tergolong mahal untuk diterapkan di Indonesia karena banyak bahan-bahan yang masih harus dimport, oleh karena itu penerapan sistem marker tetentu pada suatu spesies atau komuditas tertentu sebaiknya terlebih dahulu dilakukan analisis efektifitas.

Dua sistem marker molekuler berbasis PCR yang banyak diterapkan saat ini adalah RAPD (*Ramdom Amplified Polymorphic DNA*) dan AFLP (Amplified Fragment Lenght (Polymorphism). Teknik berbasis PCR secara umum lebih mudah dan cepat dibandingkan dengan teknik RFLP (Restriction Fragment Lenght Lenght Polymorphism). Teknik RAPD telah diterapkan secara luas dalam analisis keragaman genetik. Teknik AFLP yang merupakan kombinasi antara teknik RFLP dengan teknik PCR, telah banyak diterapkan dalam analisis keragaman genetik beberapa komoditas perkebunan misalnya kakao (Perry *et al.*, 1998), kapas (Pillay & Myers, 1999), padi (Blight et. Al., 1999).

Dipindai dengan CamScanner

ISBN 978-602-1570-08-1

Polimorfisme DNA yang diungkapkan oleh AFLP merupakan variasi ukuran berdasarkan situs restriksi oleh enzim tertentu.

Dalam memilih teknik marker molekuler yang baik untuk diterapkan dalam analisis suatu tumbuhan atau komoditas baik yang bertujuan hanya untuk kepentingan ilmiah maupun untuk tujuan komersil, beberapa parameter terkait dengan marker molekuler perlu diketahui untuk tumbuhan tertentu. Salah satu parameter penting adalah polymorphyc information content (PIC) dan Markers Index dari suatu sistem marker.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan tingkat efektifitas dari kedua sistem marker molekuler tersebut dalam analisis genom beberapa klon tanaman karet.

B. BAHAN DAN METODE

Ekstraksi DNA Genom

DNA diekstraksi menurut metode Orozco-Castillo *et al.* (1994). Penentuan kuantitas dan kualitas DNA total hasil ekstraksi ditentukan menurut Sambrook *et al.*, (1989). Di samping itu kualitas DNA sampel hasil ektraksi juga diverifikasi dengan digesti *Eco*RI dan dielektroforesis pada 0.8 % gel agarosa yang telah mengandung Etidium Bromida.

PCR-RAPD

Dalam proses PCR-RAPD digunakan 10 primer dekamer dengan total volume rekasi PCR adalah 25 µl yang mengandung DNA templat, primer 10-mer tertentu, dNTPs, *Taq* polimerase (Promega) dan 1X bufer *Taq* DNA polimerase (Promega). Profil reaksi PCR adalah sbb : denaturasi (94°C, 3 menit), annealing (37°C, 1 menit), ekstensi (72°C, 2 menit), diikuti dengan 45 siklus berikutnya dengan profil siklus sebagai berikut : denaturasi (94°C, 1 menit), annealing (40°C, 1 menit), ekstensi (72°C, 2 menit), kemudian reaksi diakhiri dengan ekstensi pada 72°C selama 5 menit. Produk PCR dielektroforesis pada 1,4% gel agarosa dengan 1X bufer TAE (40 mM Tris-asetat, 1mM EDTA pH 8). Gel kemudian difoto pada UV transiluminator. Hasil foto selanjutnya digunakan untuk bahan analisis.

PCR-AFLP

Beberapa tahap yang dilakukan dalam teknik AFLP adalah : (i) Digesti DNA total hasil ekstraksi; (ii) Ligasi adaptor *Eco*RI dan adaptor *Mse*I; (iii) Reaksi Preamplifikasi; Dalam reaksi pre-amplifikasi primer AFLP terdiri dari tiga bagian yaitu sekuen inti (CORE), sekuen enzim spesifik (ENZ) dan 1 nukleotida tambahan yang berbeda pada masing-masing ujung 3' primer (+ 1EXT); (iv) Reaksi Amplifikasi Selektif menggunakan mesin PCR Thermolyne Amplitron®-1, dengan profil program PCR disesuaikan dengan protokol dari GibcoBRL-Life Technologies; (v) Selanjutnya dilakukan elektroforesis pada gel poliakrilamida (dengan marka pGEM DNA); (vi) Pewarnaan dengan Perak Nitrat; (vii) Gel selanjutnya dilapisi dengan *cellophane membrane backing* (BIORAD). Gel yang telah dilapisi ini selanjutnya digunakan untuk bahan analisis pola sidik jari band yang dihasilkan.

Dipindai dengan CamScanner

ISBN 978-602-1570-08-1

Menentukan Marker Index

Pola sidik jari yang diperoleh dengan kedua teknik tersebut selanjutnya dianalisis untuk mendapatkan nilai *polymorphic information content* (PIC) menurut formula sebagai berikut :

$Hav = \Sigma hi/N$

N= jumlah total lokus.

$hi = 1 - \Sigma pi^2$

hi = probabilitas bahwa dua individu yang diambil secara random dari populasi akan memiliki alel yang berbeda pada suatu lokus tertentu.

pi = frekuensi dari alel ke-i di dalam populasi untuk suatu lokus tertentu.

Sedangkan *Marker Index* sistem marker dihitung menurut formula sebagai berikut :

MI = E Hav.

dimana $E = n\beta$

Sedangkan $\beta = n_p / (n_p + n_{np})$; dimana p dan np berturut-turut adalah fraksi polimorfik dan non-polimorfik dari marker.

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi DNA

Hasil penetapan kualitas DNA total hasil ekstraksi menunjukkan bahwa DNA contoh tersebut tergolong murni (Tabel 1). Di samping itu kualitas DNA juga dikonfirmasi dengan melakukan restriksi dengan *Eco*RI dan dielektroforesis pada gel agarosa 1% (Gambar 1). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi tersebut terpotong dengan baik yang ditunjukkan dengan *smear* disepanjang lajur D (digesti). DNA tersebut juga tergolong murni dari kontaminasi RNA, sebagaimana terlihat bahwa tidak terdapat signal ke arah bagian bawah gel pada setiap lajur T (DNA total). Pada semua lajur T juga menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi relatif utuh (tidak banyak mengalami fragmentasi), karena tidak ada *smear* di bagian bawah lajur. Jadi konfirmasi kualitas DNA dengan elektroforesis ini mendukung hasil yang diperoleh berdasarkan spektrofotometer.

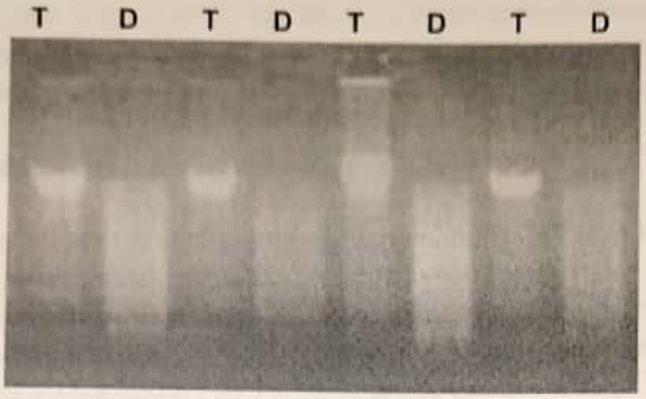
Tabel 1. Nilai rasio A_{260nm}/A_{280nm}) hasil ekstraksi DNA sampel

No. Sampel Klon	Absorban		#$A(\lambda_{260\ nm})/A(\lambda_{280\ nm})$
	$\lambda_{260\ nm}$	$\lambda_{280\ nm}$	
1	0,066	0,033	1,985
2	0,094	0,052	1,801
3	0,069	0,036	1,958
4	0,071	0,038	1,824
5	0,081	0,043	1,876
6	0,075	0,041	1,791
7	0,109	0,062	1,782
8	0,072	0,039	1,876

#DNA tergolong murni (suspensi) pada rasio $A_{260}/A_{280\ nm}$) : 1,8-2,0 (Sambrook et al., 1989).

Dipindai dengan CamScanner

ISBN 978-602-1570-08-1



Gambar 1. Contoh hasil elektroforesis DNA sampel (1% gel agarose yang telah mengandung Etidium Bromida) sampel untuk uji kualitas DNA sampel hasil ekstraksi dengan digesti enzim restriksi *Eco*RI. T (DNA total); D (digesti dengan enzim restriksi *Eco*RI).

Uji terhadap hasil ekstraksi menunjukkan bahwa hasil ekstraksi DNA sampel dapat diperoleh dengan yang baik ditinjau dari segi kualitas dan kuantitas DNA. Dengan demikian itu hasil ekstraksi tersebut dapat dipergunakan untuk reaksi selanjutnya misalnya digesti dengan enzim restriksi untuk kepentingan ligasi adaptor dalam reaksi AFLP. Disamping itu kualitas DNA yang baik sangat penting dalam keberhasilan reaksi PCR baik untuk RAPD maupun AFLP.

Analisis Band dan Marker Index

Analisis RAPD menggunakan 10 primer menghasilkan 55 pita. yang berkisar dari 250 bp - 2250 bp. Jumlah pita paling sedikit yang dihasilkan adalah dua pita yang merupakan hasil amplifikasi primer OPC19, sedangkan yang paling banyak adalah 9 pita yang merupakan hasil amplifikasi dengan primer OPN15. Sebanyak 19 merupakan pita polimorfik sedangkan jumlah pita polimorfik berkisar 1-5 pita.

Analisis dengan AFLP menggunakan 10 Pasangan primer Amplifikasi Selektif (PPAS) menghasilkan 293 pita yang berkisar dari 40 bp- 500 bp, dimana sebanyak 109 merupakan pita polimorfik. Jumlah band yang paling sedikit adalah 24 band yang merupakan hasil amplifikasi dengan PPAS-N dan PPAS-T (E-ACC/M-CTA dan E- ACT /M-CAC, secara berturut turut), dan yang paling banyak (39 pita) yang merupakan hasil amplifikasi dengan PPAS-E (E-ACA/M-CTT). Jumlah pita polimorfik berkisar 9-12 band.

Marker Indeks

Berdasarkan analisis beberapa parameter terhadap pola pita yang dihasilkan oleh masing-masing sistem marker, terlihat bahwa sistem marker AFLP lebih efektif daripada RAPD yang dicerminkan dari nilai marker indeks-nya yaitu 2,38 sedangkan marker indeks RAPD adalah 0,35. Dibandingkan dengan hasil penelitian lain perbandingan

Dipindai dengan CamScanner

ISBN 978-602-1570-08-1

yang diperoleh dalam penelitian ini masih rendah, sebagai contoh misalnya Powell *et al*,. (1996) melaporkan bahwa MI AFLP adalah 6,14 sedangkan RAPD hanya 0,48. Sebagai perbandingan MI untuk RFLP dan SSR berturut-turut adalah 0,1 dan 0,6. Bohn *et al.* (1999) melaporkan bahwa MI AFLP adalah 3,41 sedangkan MI RFLP dan SSR berturut-turut adalah 0,18 dan 0,24. Pada penelitian ini nilai PIC dari kedua sistem marker tersebut relatif sama yaitu 0,22 untuk AFLP dan 0,19 untuk RAPD, tetapi karena multipleks rasio efektif AFLP (10,38) jauh lebih tinggi dari nilai MRE RAPD (1,87) menyebabkan MI AFLP menjadi lebih tinggi dari pada RAPD.

Tabel 2. Hasil Analisis marker indeks berdasarkan sidikjari sistem marker molekuler AFLP dan RAPD.

No	Parameter	Sistem Marker	
		AFLP	RAPD
1	Unit assay	10	10
2	Total Lokus	293	55
3	Multiplex Ratio	29,3	5,5
4	Nilai β	0,37	0,35
5	Multiplex ratio efektif	10,84	1,87
6	PIC	0,22	0,19
7	Marker Indeks	2,38	0,35

Markers indeks merupakan parameter kemampuan total keefektivan suatu marker dalam mendeteksi polimorfisme (Powell *et al.*, 1996). Berdasarkan hasil di atas dapat disimpulkan bahwa AFLP lebih efektif daripada RAPD dalam analisis keragaman genetik beberapa klon tanaman karet yang diteliti. Oleh karena itu untuk analisis keragaman genetik tanaman karet secara menyeluruh pada koleksi plasma nutfah sebaiknya menggunakan AFLP. Alasan lain yang sangat penting adalah AFLP sangat konsisten (Vos *et al.*, 1995; Mackill *et al.*, 1996), sedangkan RAPD banyak dilaporkan kurang konsisten (Kantety *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996; Halldane *et al.*, 1996), sehingga analisis keragaman genetik dengan AFLP akan dapat memberikan hasil yang lebih baik. Di samping itu *multiplex ratio* AFLP dapat diatur dengan memilih enzim restriksi (Barret dan Kidwell, 1998), dan jumlah basa selektif ujung 3' primer, hal ini berarti bahwa dalam penerapan AFLP juga terdapat tingkat fleksibilitas yang tinggi sesuai dengan yang diinginkan.

D. KESIMPULAN

1. Konfirmasi kuantitas dan kualitas DNA hasil isolasi melalui spektrofotometer dan uji melalui elektroforesis setelah digesti dengan enzim restriksi menunjukkan hasil yang baik.
2. Sistem marker molekuler AFLP lebih efektif dibandingkan dengan sistem RAPD, karena nilai marker indeks AFLP (2,38) lebih tinggi dari nilai marker indek RAPD (0,35).
3. Penelitian ini merekomendasikan bahwa untuk analisis genom plasma nutfah tumbuhan karet sebaiknya menggunakan marker molekuler sistem PCR-AFLP

Dipindai dengan CamScanner

ISBN 978-602-1570-06-1

E. DAFTAR PUSTAKA

Barret, B.A. & K.K. Kidwell. 1998. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from The Pacific Northwest. *Crop Sci.* **38** : 1262-1271

Bligh, H.F.J., N.W. Blackhall, K.J. Edwards, & A.M. McClung. 1999. Using AFLP and sequence length polymorphisms to identify cultivars of brown and white milled rice. *Crop Sci.* **39** : 1715-1721.

Bohn, M., H.F. Utz, A. E. Melchinger. 1999. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Sci.* **39** : 228-237.

Hallden, C., M. Hansen, N.O. Nelson, A. Hjerdin & T. Sall. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theor Appl Genet.* **93** : 1185-1192.

Hopkins, M.S., A.M. Casa, T. Wang, S.E. Mitchell, R.E. Dean, G.D. Kochert, and S. Kresovich. 1999. Discovery and charachterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. *Crop Sci.* **39** : 1243-1247.

Kantety, R. V., X. Zeng, J.L. Bennetzen and B.E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat amplification. *Molecular Breeding.* **1** : 365-373.

Mackill, D.J., Z.Zhang, E.D.Redona, & P.M. Colowit. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genom.* **39** : 969-977.

Perry, M.D., M. R. Davey, J.B. Power, K.C. Lowe, H.F.J. Blig. 1998. DNA isolation and AFLP genetic fingerprinting of *Theobroma cacao* (L.). *Plant Molecular Biology Reporter.* **16** : 49-59.

Pillay, M. & G.O. Myers. 1999. Genetic diversity in cotton assesed by variation in ribosomal DNA genes and AFLP markers. *Crop Sci.* **39** : 1881-1886.

Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafaski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP ang SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding.* **2** : 225-238.

Sambrook,J., E.F.Fritsch, & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory. New York.

Vos, P., R. Hoger, M. Bleeker, M. Reijan, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* **23** : 4407-4414.

Yang, W., A.C. de Oliveira, I. Godwin, K. Schertz, and J.L. Bennetzen. 1996. Comparision of DNA markers technologies in characterizing plant genome diversity : variability in Chinese sorghums. *Crop Sci.* **36** : 1669-1676.

Dipindai dengan CamScanner