

Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) berdasarkan metode *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP)

*Genetic similarity of rubber clones (Hevea brasiliensis Muell. Arg.)
based on Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) method*

NURHAIMI-HARIS¹⁾, Hajrial ASWIDINNOOR²⁾
Nurita TORUAN-MATHIUS¹⁾ & Agus PURWANTARA¹⁾

¹⁾Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

²⁾Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

Summary

*Genetic similarity among ten rubber clones originating from the Wickham collection was studied by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers. These clones have different levels of resistance to *Corynespora cassiicola*, one of the major pathogens in rubber plantations. The information resulted from this study will be used to determine resistant and susceptible clones which will be used in expression study of the genes encoding plant resistancy to *C. cassiicola*. Genetic similarity values of clones were calculated from all AFLP markers and used to produce a dendrogram using Unweight Pair-Group Method Arithmetic (UPGMA) based on Numerical Taxonomy and Multivariate System (NTSYS) version 1.8 pc. A total of 481 fragments were detected by using ten pairs of selective AFLP primers, and 233 fragments (48,4 %) of them were polymorphic. The results clearly demonstrated that genetic back-grounds of these ten clones were 85.5% similar. At 88.0% similarity level, the clones could be divided into three clusters. Genetic similarity of IRR 100 (resistant clone) with RRIC 103, PPN 2444 and IAN 873 (susceptible clones)*

was 90.5, 89.5 and 89.0% respectively. While genetic similarity of other three resistant clones (AVROS 2037, PR 255 and BPM 1) to those susceptible clones was 88.0%. The lowest genetic similarity (85.5%) was found between RRIC 100 (resistant clone) and those three susceptible clones. By considering the distribution and the source of clones, AVROS 2037 (resistant) and PPN 2444 (susceptible) clones which have 88.0% genetic similarity were finally will be selected for the expression study of the genes.

[Key words : *Hevea brasiliensis*, AFLP markers, polymorphism, clone resistance, *Corynespora cassiicola*]

Ringkasan

Kemiripan genetik sepuluh klon karet yang berasal dari koleksi Wickham dipelajari dengan menggunakan marka *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP). Kesepuluh klon tersebut memiliki tingkat resistensi berbeda terhadap *Corynespora cassiicola*, salah satu cendawan patogen penting pada daun tanaman karet.

Informasi yang diperoleh dalam penelitian ini akan digunakan untuk menetapkan klon resisten dan klon rentan untuk digunakan dalam mempelajari ekspresi gen yang menyandikan ketahanan tanaman karet terhadap *C. cassiicola*. Nilai kemiripan genetik kesepuluh klon karet dihitung berdasarkan semua marka AFLP yang diperoleh dan selanjutnya digunakan untuk membuat dendrogram dengan menggunakan *Unweight Pair-Group Method Arithmetic* (UPGMA) berdasarkan *Numerical Taxonomy and Multivariate System* (NTSYS) version 1.8 pc. Dengan menggunakan 10 pasang primer AFLP selektif diperoleh sebanyak 481 fragmen DNA, 233 fragmen (48,4 %) di antaranya polimorfik. Dendrogram dengan nyata menunjukkan bahwa 85,5% latar belakang genetik kesepuluh klon karet tersebut adalah sama, dan pada tingkat 88,0% kesepuluh klon terpisah dalam tiga kelompok. Kemiripan genetik klon IRR 100 (resisten) dengan klon rentan RRIC 103, PPN 2444 dan IAN 873 masing-masing adalah 90,5, 89,5 dan 89,0%. Sedangkan kemiripan genetik tiga klon resisten lainnya (AVROS 2037, PR 255 dan BPM 1) dengan ketiga klon rentan yang sama adalah 88,0%. Kemiripan genetik terendah (85,5%) terdapat antara klon RRIC 100 (resisten) dengan ketiga klon rentan tersebut. Dengan mempertimbangkan distribusi penyebaran klon dan asal klon maka klon resisten AVROS 2037 dan klon rentan PPN 2444 yang memiliki kemiripan genetik 88,0% akan dipilih untuk digunakan dalam studi ekspresi gen tanaman karet.

Pendahuluan

Tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) penghasil karet alam merupakan salah satu komoditas perkebunan penting bagi Indonesia. Hal ini tercermin dari banyaknya petani, tenaga kerja, dan pengusaha yang terlibat di dalam pengusaha karet alam. Di areal sentra produksi saja tidak kurang dari 1,75 juta keluarga petani yang terlibat

langsung dalam usaha ini. Pada tahun 2002 produksi karet alam Indonesia tercatat sebanyak 1,6 juta ton, sebagian besar diekspor dengan nilai 1,1 milyar US dolar (Bank Indonesia, 2002).

Bahan tanam karet yang dibudidayakan saat ini merupakan klon asal persilangan berbagai tetua terpilih yang kemudian diperbanyak dengan cara okulasi. Masing-masing klon memiliki karakter agronomi yang berbeda seperti tingkat produksi, pertumbuhan sebelum dan setelah lateks disadap, ketebalan kulit, kandungan karet kering dan warna lateks, serta ketahanan terhadap penyakit (Simmonds, 1989). Persilangan buatan untuk mendapatkan klon dengan sifat primer dan sekunder yang baik dilakukan oleh berbagai institusi penelitian yang umumnya terdapat di negara penghasil karet alam. Oleh karena itu dijumpai banyak sekali jenis klon yang ditanam secara komersial, baik di Indonesia maupun di negara penghasil karet alam lainnya. Tetua yang digunakan untuk persilangan berasal dari dalam negeri maupun luar negeri.

Klon seri BPM dan GT 1 asal Indonesia banyak digunakan sebagai tetua dalam persilangan buatan. Sedangkan beberapa klon seperti seri RRIM dan PB (asal Malaysia) serta seri RRIC (asal Sri Lanka), yang juga banyak digunakan sebagai tetua, masuk ke Indonesia melalui program pertukaran klon Internasional yang dilakukan pada tahun 1974 (Madjid *et al.*, 1977). Di samping klon juga terdapat koleksi plasma nutfah karet di BPP Sungei Putih (Sumatera Utara) dan BPP Sembawa (Sumatera Selatan) yang dikumpulkan dari lembah Amazon melalui ekspedisi Internasional negara-negara penghasil karet alam dunia pada tahun 1981. Hubungan

kekerabatan antar masing-masing klon karet, antar individu tanaman maupun antar populasi tanaman dalam plasma nutfah karet dengan klon karet yang banyak dibudidayakan saat ini telah banyak dipelajari dengan menggunakan analisis molekuler. Marka isozim telah digunakan untuk mempelajari hubungan genetik pada 60 klon karet (Yeang *et al.*, 1998) serta hubungan genetik masing-masing kelompok atau individu dalam populasi plasma nutfah (Chevallier, 1988; Seguin *et al.*, 1995). Sedangkan hubungan genetik populasi plasma nutfah dengan klon karet telah dipelajari melalui analisis RFLP (Besse *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1995), serta marka mikrosatelit (Lekawipat *et al.*, 2003).

Hubungan genetik yang didasarkan pada analisis *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) pada 79 klon karet telah dilaporkan sebelumnya (Nurhaimi-Haris *et al.*, 1998). Beberapa klon tersebut akan digunakan dalam studi ekspresi gen yang terkait dengan resistensi klon terhadap *Corynespora cassiicola*, cendawan penyebab penyakit gugur daun pada tanaman karet. Dalam studi tersebut diperlukan klon yang secara genetik sangat mirip, namun tingkat resistensinya terhadap *C. cassiicola* jauh berbeda. Oleh sebab itu perlu dilakukan penajaman analisis dengan melibatkan sebanyak mungkin karakter genetik sehingga dapat mewakili sebagian besar genom tanaman karet. *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) (Vos *et al.*, 1995) merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk tujuan tersebut.

Teknik AFLP didasarkan pada amplifikasi selektif menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terhadap sekumpulan

DNA genomik yang sebelumnya dipotong dengan enzim restriksi dan diligasikan dengan adapter berupa oligonukleotida utas ganda. Primer untuk memulai amplifikasi mengandung sekuen adapter serta sekuen enzim restriksi yang sesuai dan komplemen dengan fragmen DNA. Dengan metode tersebut sejumlah besar fragmen DNA dapat diamplifikasi dan divisualisasikan pada poliakrilamid gel yang sudah didenaturasi tanpa memerlukan pengetahuan tentang sekuen nukleotida. Untuk setiap pasangan primer selektif dapat divisualisasikan sekitar 50 – 100 fragmen DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi pada sekuensing gel. Oleh karena setiap fragmen dianggap mewakili satu karakter tertentu maka sejumlah besar karakter dapat divisualisasikan untuk setiap pasangan primer.

Teknik AFLP telah banyak digunakan dalam mempelajari marka genetik untuk mendapatkan peta keterpautan atau untuk mengidentifikasi marka molekuler yang terpaut dengan fenotipik tertentu. Sebagai contoh marka molekuler yang terpaut dengan gen *Cf-9* yaitu gen yang memberikan ketahanan tanaman tomat terhadap patogen *Cladosporium fulvum* diperoleh melalui analisis AFLP (Thomas *et al.*, 1995). Pada tanaman kedelai dilakukan pemetaan markamarka molekuler dengan menggunakan tiga macam analisis, yaitu AFLP, RAPD dan RFLP (Lin *et al.*, 1996).

Peta genetik pertama untuk tanaman karet dengan melibatkan marka AFLP, RFLP, mikrosatelit dan isozim telah dibuat oleh Lespinasse *et al.* (2000). Peta tersebut didasarkan pada 106 individu progeni yang berasal dari persilangan antar spesies antara klon PB 260 *Hevea brasiliensis* dengan klon RO38 yang merupakan hasil persilangan

antara *H. brasiliensis* X *H. benthamiana*. Dari hasil yang diperoleh dikemukakan bahwa dengan marka AFLP peta genetik jenuh (*saturated map*) dapat lebih cepat dikonstruksi.

Penelitian ini bertujuan meng-analisis kemiripan genetik 10 klon karet yang memiliki tingkat resistensi berbeda terhadap infeksi patogen *C. cassiicola*. Informasi yang diperoleh akan digunakan sebagai dasar untuk memilih satu klon resisten dan satu klon rentan yang memiliki kemiripan genetik tinggi untuk digunakan dalam studi ekspresi gen pada tahap selanjutnya.

Bahan dan Metode

Bahan tanam dan isolasi DNA

Bahan yang digunakan untuk isolasi DNA adalah daun karet dari 10 klon yang terdiri dari 5 klon resisten (AVROS 2037, BPM 1, PR 255, RRIC 100, IRR 100), 2 klon moderat (GT 1, RRIM 600), dan 3 klon rentan (RRIC 103, PPN 2444, dan 3 klon rentan (RRIC 103, PPN 2444, dan IAN

klon rentan (RRIC 103, PPN 2444, dan IAN 873). Kesepuluh klon karet tersebut dikumpulkan dari Kebun Percobaan Pusat Penelitian Karet, Sungei Putih dan Kebun Percobaan Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor. Asal dan tetua setiap klon dicantumkan pada Tabel 1.

DNA diisolasi dari daun muda yang warnanya telah berubah dari cokelat menjadi hijau namun daun masih terasa lembut, dengan menggunakan metode Orozco-Castillo *et al.*, (1994). Metode tersebut menggunakan CTAB sebagai deterjen dalam bufer ekstraknya, kloroform: isoamilalkohol untuk mengeliminasi protein dan karbohidrat, isopropanol untuk mengendapkan DNA, dan RNase untuk menghilangkan RNA. Pengujian kualitas dan kuantitas DNA dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989), serta melalui pemotongan DNA dengan enzim restriksi dan perbandingan intensitas pita DNA sampel dengan DNA lain yang konsentrasinya telah terukur.

Tabel 1. Asal dan tetua sepuluh klon karet

Table 1. Source and parentage of ten rubber clones

No.	Klon Clones	Asal klon Source of clones	Silsilah Parentage
1.	AVROS 2037	Algemene Vereniging Rubberplanters Oostkust Sumatera, Indonesia	AV 256 x AV 352
2.	BPM 1	Research Institute for Estate Crops Medan, Indonesia	AV 163 x AV 308
3.	PR 255	Proefstation voor Rubber, Indonesia	Tjir 1 x PR 107
4.	RRIC 100	Rubber Research Institute of Ceylon, Sri Lanka	RRIC 52 x PB 86
5.	IRR 100	Indonesian Rubber Research Institute, Indonesia	BPM 107 x IAN 717
6.	GT 1	Godang Tapen, Indonesia	Klon primer
7.	RRIM 600	Rubber Research Institute oh Malaysia, Malaysia	Tjir 1 x PB 86
8.	RRIC 103	Rubber Research Institute of Ceylon, Sri Lanka	RRIC 52 x PB 86
9.	PPN 2444	Government Estate Enterprice, Indonesia	LCB 1320 illegitim
10.	IAN 873	Instituto Agronomico do Norte, Brazil	PB 86 x F 1717

Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis*)...

Analisis AFLP

Analisis AFLP dilakukan menggunakan kit *AFLP® Analysis System I, AFLP Starter Primer Kit* (Gibco BRL, Cat. No. 10544-013, 10483-014) sesuai dengan prosedur yang direkomendasikan. Secara garis besar teknik AFLP terdiri atas tiga tahapan, yaitu :

Pemotongan DNA genomik dan ligasi adapter

Pemotongan DNA genomik dilakukan dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *MseI*. Ke dalam tabung mikrosentrifus 0,5 mL dicampurkan 2,5 µL bufer reaksi 5X [50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 50 mM Mg-asetat; 250 mM K-asetat]; 2,5 µL DNA (50 ng/µL); 1 µL *EcoRI/MseI* [masing-masing enzim 1,25 unit/µL dalam 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 50 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 mg/mL BSA; 50% (v/v) gliserol; 0,1% Triton X-100] dan 6,5 µL akuades. Campuran kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C, yang diikuti dengan inkubasi selama 15 menit pada suhu 70°C untuk menon-aktifkan enzim.

Untuk ligasi adapter, ke dalam setiap tabung yang berisi campuran di atas ditambahkan campuran 12 µL larutan ligasi adapter dan 0,5 µL T4 DNA ligase. Campuran kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 20°C. Hasil ligasi kemudian diencerkan 10X dengan bufer TE.

Amplifikasi fragmen hasil ligasi

Reaksi amplifikasi terhadap hasil ligasi di atas dilakukan dengan PCR dalam dua tahap yaitu preamplifikasi dan amplifikasi selektif. Pada tahap preamplifikasi digunakan primer AFLP yang mengandung satu

nukleotida selektif untuk mengamplifikasi DNA sampel. Ke dalam setiap tabung Eppendorf volume 0,5 mL dicampurkan 2,5 µL DNA hasil ligasi yang telah diencerkan, 20 µL *pre-amp primer mix*, 2,5 µL PCR bufer 10X, dan 0,2 µL *Taq* DNA polimerase (5 unit/µL). Reaksi PCR dilakukan dalam 20 siklus pada 94°C (30 dt), 56°C (60 dt), 72°C (60 dt) dan terakhir dibiarkan sampai suhu 4°C. Amplifikasi DNA dilakukan dengan alat *Thermocycler* dari *Thermoline II Amplithrone*.

Selanjutnya produk PCR diencerkan 50X untuk digunakan sebagai templat dalam amplifikasi selektif. Amplifikasi selektif dilakukan menggunakan 10 pasang primer yang masing-masing mengandung 3 nukleotida tambahan, yaitu 1) EACT-MCAT, 2) EACA-MCTG, 3) EACA-MCTT, 4) EAAC-MCAG, 5) EACT-MCTA, 6) EACA-MCAC, 7) EACC-MCAA, 8) EACC-MCTA, 9) EACA-MCTA, dan 10) EACT-MCAG. Untuk deteksi nonradioaktif setiap 18 µL primer *EcoRI* dicampur dengan 32 µL akuabides. Sebanyak 5 µL campuran tersebut kemudian dicampur dengan 45 µL primer *MseI* dan diberi label "Mix 1" (volume 50 µL adalah untuk 10 reaksi). Selanjutnya dibuat "Mix 2" dengan mencampurkan sebanyak 79 µL akuabides, 20 µL PCR bufer 10X plus Mg dan 1 µL *Taq* DNA polimerase (5 unit/µL) di dalam tabung Eppendorf 1,5 mL. Setiap reaksi amplifikasi AFLP dilakukan dengan mencampurkan 5 µL DNA hasil pre-amplifikasi yang telah diencerkan, 5 µL "Mix 1", dan 10 µL "Mix.2" di dalam tabung Eppendorf 0,5 mL. Reaksi amplifikasi menggunakan mesin *Thermocycler* (*Thermolyne II Amplithrone*) dengan kondisi yang tertera pada Tabel 2.

Visualisasi fragmen hasil amplifikasi

Setelah reaksi PCR selesai, ke dalam setiap sampel ditambahkan loading bufer-formamid 2X (98% formamid; 10 mM EDTA; 0,025% bromofenol biru; 0,025% silen sianol) dengan volume yang sama (20 µL). Untuk marker dicampurkan 1 µL 100-bp DNA Ladder, 19 µL akuades, dan 20 µL loading bufer-formamid 2X. Sampel dan marker dipanaskan pada 90°C, selama 3 menit, dan segera ditempatkan di es. Produk AFLP dipisahkan pada 6% poliakrilamid gel ukuran 12 x 14,5 cm yang sudah didenaturasi. Komposisi bahan penyusun gel untuk volume 22 mL (untuk 2 gel ukuran 12 x 14,5 cm) adalah urea 9,24 g (7 M); H₂O 10,63 mL; akrilamid/bis (19:1

3,30 mL (6%); bufer TBE (10x) 1,10 mL (0,5 x); APS (10%) 147,4 µL (0,067%) dan TEMED 14,74 µL.

Campuran larutan dituang ke lempeng kaca yang telah dipasang *spacer* dan diletakkan secara vertikal, dibiarkan selama satu jam. Sebelum elektroforesis dijalankan, sekitar 200 mL TBE 0,5X ditambahkan pada wadah bawah peralatan elektroforesis. Lempeng kaca berisi gel dimasukkan ke wadah elektroforesis kemudian ditambahkan TBE 0,5X pada bagian atas. Pre-elektroforesis dilakukan selama 20 menit (15 watt) agar supaya suhu permukaan gel mencapai sekitar 50°C. Permukaan gel dibersihkan dari kristal urea dengan bufer TBE menggunakan pipet 1 mL, kemudian sisir dipasang pada gel. Sebanyak 10 µL sampel dimasukkan ke sela-sela sisir

Tabel 2. Program PCR untuk reaksi amplifikasi selektif pada analisis AFLP (Gibco BRL- Life Technologies).

Table 2. PCR programme for selective amplification reaction on AFLP analysis (Gibco BRL-Life Technologies)

File	°C	Waktu, detik <i>Time, second</i>	°C	Waktu, detik <i>Time, second</i>	°C	Waktu, detik <i>Time, second</i>	Jumlah Siklus <i>Cycle number</i>	Terkait ke <i>Link to</i>	Tipe <i>Type</i>
1	94	60	65	60	72	90	1	2	Step
2	94	60	64	60	72	90	1	3	Step
3	94	60	63	60	72	90	1	4	Step
4	94	60	62	60	72	90	1	5	Step
5	94	60	61	60	72	90	1	6	Step
6	94	60	60	60	72	90	1	7	Step
7	94	60	59	60	72	90	1	8	Step
8	94	60	58	60	72	90	1	9	Step
9	94	60	57	60	72	90	1	10	Step
10	94	60	56	60	72	90	1	11	Step
11	94	30	56	30	72	60	23		Step

Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis*)...

elektroforesis dijalankan pada *power* konstan yaitu 12 W, selama kurang lebih 40 menit (sampai silen sianol mencapai 2/3 dari panjang gel).

Lempeng kaca dikeluarkan dari peralatan elektroforesis, *spacer* dan satu sisi lempeng kaca dilepas, kemudian gel yang masih menempel pada lempeng kaca lainnya dilepas dan diletakkan pada wadah plastik yang diisi dengan larutan fiksasi (asam asetat glasial 10%) dan digoyang selama 20 menit. Larutan fiksasi dibuang dan dicuci tiga kali masing-masing selama 2 menit dengan air bebas ion sambil digoyang. Pewarnaan gel dengan cara perendaman selama 30 menit dalam larutan perak nitrat sambil digoyang (AgNO_3 6 mM, formaldehid 0,05%). Kemudian larutan perak dibuang, dibilas cepat dengan air bebas ion dan ditambahkan larutan developer dingin, suhu 4°C (Na_2CO_3 0,3 M, formaldehid 0,05%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 2 µg/mL), digoyang sampai pita muncul. Larutan developer dibuang, gel direndam dalam larutan fiksasi selama tiga menit dan dicuci, kemudian gel diawetkan dalam *cellophane membrane backing* (BioRad).

Setiap pita pada gel merepresentasikan fragmen DNA pada masing-masing individu tanaman, dan diberi nilai 1 apabila pita ada serta 0 apabila pita tidak ada. Dendrogram dibuat menggunakan metode UPGMA (*Unweighted- Pair Group Method Arithmetic*) melalui program NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate System*) versi 1.80 (Rohlf, 1993).

Hasil dan Pembahasan

DNA tanaman karet dan visualisasi produk AFLP

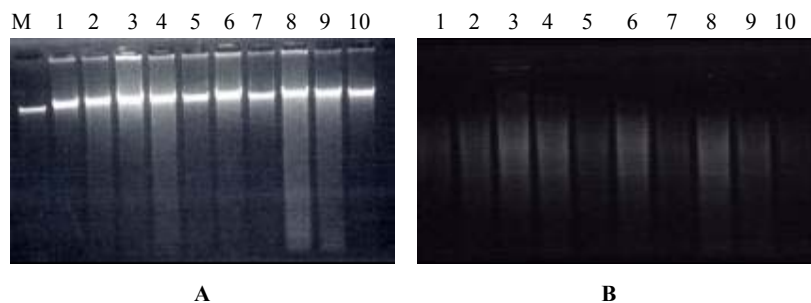
Isolasi DNA dari daun 10 klon karet menghasilkan DNA dengan kualitas dan

kuantitas yang baik (Gambar 1). Berdasarkan penampakan ketebalan pita DNA sampel pada gel agarose yakni sekitar dua kali DNA *Arabidopsis* yang konsentrasinya diketahui, yaitu 25 ng/µL, maka diperkirakan konsentrasi DNA sampel yang diperoleh sekitar 50 ng/µL (Gambar 1 A). DNA yang semula seperti pita setelah dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI* menjadi terlihat *smear* pada gel. Hal ini menunjukkan bahwa DNA dapat dipotong secara baik dengan *EcoRI* yang berarti bahwa DNA tersebut memiliki kualitas yang baik (Gambar 1 B).

Umumnya keberhasilan ekstraksi DNA ditentukan berdasarkan jumlah DNA yang diperoleh dan kemudahan penggunaan DNA, misalnya dalam proses restriksi, ligasi dan polimerasi (Rogers & Bendich, 1994). Jumlah DNA menjadi penting terutama apabila analisis yang akan dilakukan memerlukan ketepatan konsentrasi DNA dalam proses reaksinya atau DNA harus diisolasi dari sumber yang sangat terbatas. Namun kemudahan penggunaan DNA biasanya menjadi pertimbangan utama dalam berbagai analisis molekuler yang dilakukan.

Pemilihan *EcoRI* dalam pengujian kualitas DNA karet didasarkan pada pertimbangan bahwa enzim tersebut merupakan salah satu enzim yang digunakan pada proses penyiapan templat dalam analisis AFLP. Di samping itu metode serupa juga telah berhasil baik untuk konfirmasi kemurnian DNA asal daun kakao yang diketahui mengandung polisakarida dan senyawa fenolik relatif tinggi. Keberhasilan pemotongan DNA kakao dengan *EcoRI* atau *MseI* merupakan salah satu faktor yang turut menentukan keberhasilan analisis AFLP pada DNA asal daun kakao (Perry *et al.*, 1998).

Kualitas DNA karet yang baik dari hasil



Gambar 1. Visualisasi DNA dari jaringan daun 10 klon karet. (A) DNA karet hasil isolasi dan DNA *Arabidopsis*. (B) DNA karet yang telah dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI* M = DNA *Arabidopsis* (250 ng), 1-10 = DNA klon AVROS 2037, BPM 1, PR 255, RRIC 100, IRR 100, GT 1, RRIM 600, RRIC 103, PPN 2444, dan IAN 873.

Figure 1. Visualization of DNA from Hevea leaf tissue of 10 clones. (A) DNAs of rubber and DNA *Arabidopsis*. (B) Rubber DNA digested with *EcoRI*. M = DNA of *Arabidopsis* (250 ng), 1-10 = DNA of AVROS 2037, BPM 1, PR 255, RRIC 100, IRR 100, GT 1, RRIM 600, RRIC 103, PPN 2444, and IAN 873 clones.

penelitian ini ditunjukkan oleh profil AFLP dari masing-masing kombinasi primer selektif (Gambar 2). Menurut Vos *et al.*, (1995), pelaksanaan metode AFLP menghendaki DNA dengan kualitas dan kuantitas yang baik. Hal ini disebabkan sebelum proses amplifikasi terdapat beberapa tahapan yang cukup kritis seperti pemotongan DNA genomik dengan dua macam enzim restriksi serta pemasangan adapter pada ujung-ujung fragmen yang telah terpotong yang dilaksanakan melalui proses ligasi. DNA dengan kualitas tinggi diperlukan untuk mencegah terjadinya pemotongan DNA genomik secara tidak lengkap sehingga dapat menyebabkan kesalahan dalam identifikasi fragmen polimorfis.

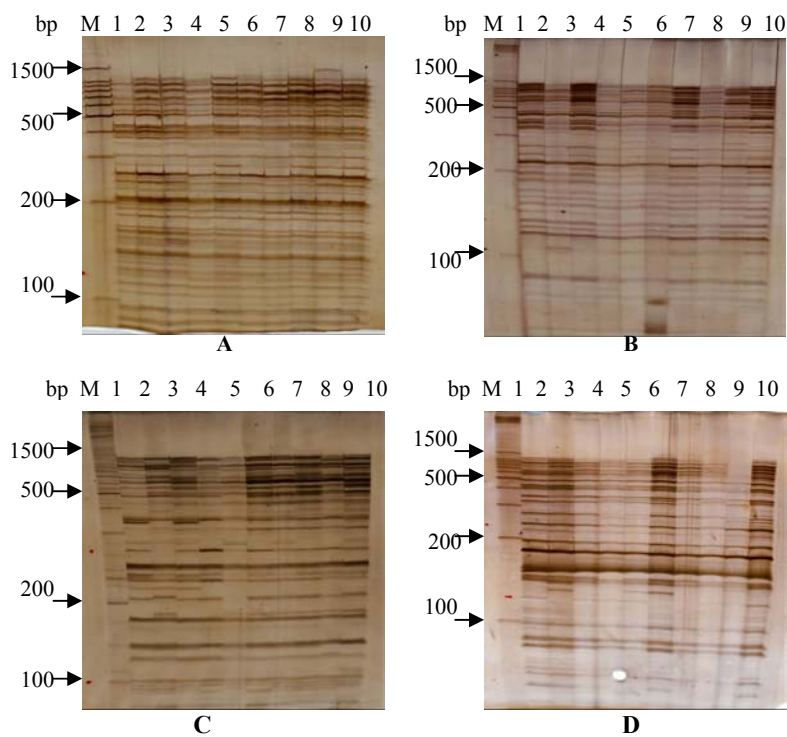
Konsentrasi DNA berdampak pada kualitas fragmen hasil amplifikasi. Konsentrasi DNA terlalu rendah dapat menghasilkan fragmen sebagai pita yang sangat tipis pada gel atau bahkan pita tidak terlihat secara visual, sebaliknya konsentrasi

DNA terlalu tinggi akan menyebabkan fragmen terlihat tebal sehingga sulit dibedakan antara satu pita dengan pita lainnya. Sistem kit *AFLP[®] Analysis System I* menghendaki konsentrasi DNA antara 100 – 500 ng per reaksi. Dalam penelitian ini konsentrasi DNA sebanyak 250 ng dapat menghasilkan produk AFLP yang baik (Gambar 2). Analisis AFLP tanaman karet memerlukan beberapa modifikasi dibandingkan dengan prosedur aslinya yaitu dalam proses visualisasi produk AFLP dan ukuran

Kemiripan genetik klon karet (Hevea brasiliensis)...

gel yang digunakan. Menurut Vos *et al.*, (1995), untuk visualisasi produk AFLP salah satu primer yang digunakan dalam reaksi amplifikasi dilabel secara radioaktif menggunakan isotop P (^{32}P atau ^{33}P). Selanjutnya fragmen-fragmen hasil amplifikasi dipisahkan pada sekuensing gel

menggunakan poliakrilamid gel yang sudah didenaturasi dan kemudian divisualisasikan pada film autoradiograf. Hal ini seringkali menyulitkan karena tidak semua laboratorium biologi molekuler memiliki fasilitas untuk penggunaan radioisotop.



Gambar 2. Produk AFLP dari DNA daun 10 klon karet pada 6 % gel akrilamid yang didenaturasi dengan ukuran gel 12 x 14,5 cm. (A) primer EAAC-MCAG, (B) primer EACA-MCTA, (C) primer EACC-MCTA, (D) primer EACT-MCAG. (Lajur M = 100 bp DNA Ladder. 1-10 = DNA sampel klon AVROS 2037, BPM 1, PR 255, RRIC 100, IRR 100, GT 1, RRIM 600, RRIC 103, PPN 2444, dan IAN 873).

Figure 2. AFLP products of DNA from 10 Hevea clones on 6% denaturing polyacrylamide gel, in 12 x 14.5 cm gel size. (A) EAAC-MCAG primer, (B) EACA-MCTA primer, (C) EACC-MCTA primer, (D) EACT-MCAG primer. (Lanes M = 100 bp DNA Ladder. 1-10 = DNA samples of AVROS 2037, BPM 1, PR 255, RRIC 100, IRR 100, GT 1, RRIM 600, RRIC 103, PPN 2444, and IAN 873 clones).

Sebagai alternatif salah satu metode non-radioaktif dengan menggunakan poliakrilamid gel yang diwarnai dengan perak nitrat telah dikembangkan oleh Chalhoub *et al.*, (1997). Melalui perbandingan profil produk AFLP tanaman *Pisum sativum* yang divisualisasikan secara autoradiografi dengan yang langsung divisualisasikan pada gel poliakrilamid melalui pewarnaan perak nitrat telah dibuktikan bahwa sensitivitas dan resolusi yang diperoleh melalui kedua prosedur tersebut sama. Hasil serupa juga diperoleh pada produk AFLP tanaman wortel (Briard *et al.*, 2000). Berdasarkan hasil yang telah dilaporkan pada tanaman lain maka visualisasi fragmen-fragmen AFLP asal daun karet dilakukan dengan menggunakan poliakrilamid gel yang diwarnai dengan perak nitrat dan telah memberikan hasil yang baik (Gambar 2).

Pada umumnya gel yang digunakan untuk visualisasi produk AFLP adalah sikuensing gel dengan ukuran relatif besar yaitu sekitar 30 x 40 cm, tergantung merek peralatannya. Ukuran gel yang demikian menyulitkan di dalam proses pewarnaan dengan perak nitrat. Pengurangan ukuran gel untuk visualisasi produk AFLP secara non-radioaktif telah dilaporkan oleh Lin *et al.*, (1997) yang membandingkan profil AFLP pada gel ukuran 30 x 39 cm dengan profil AFLP pada gel ukuran 15 x 17 cm. Melalui perbandingan tersebut dibuktikan bahwa resolusi dan profil DNA pada kedua ukuran gel tersebut sama. Oleh karena itu dalam penelitian ini digunakan gel ukuran kecil, yaitu 12,0 x 14,5 cm. Dengan ukuran gel yang demikian fragmen DNA yang teramplifikasi untuk setiap pasangan primer berkisar antara 34 – 65 fragmen. Jumlah fragmen total yang diperoleh dari 10 pasang

kombinasi primer tersebut adalah 481 fragmen. Sebanyak 233 fragmen (48,4 %) merupakan fragmen polimorfis sedangkan ukuran fragmen teramplifikasi berkisar antara kurang dari 100 – 1500 pasang basa.

Setiap fragmen DNA yang diperoleh dalam reaksi amplifikasi dianggap mewakili satu karakter tertentu dari tanamannya. Tingginya jumlah fragmen teramplifikasi yang diperoleh dalam analisis AFLP merupakan salah satu keunggulan teknik tersebut dibandingkan dengan teknik lainnya seperti misalnya teknik RAPD (Williams *et al.*, 1990). Amplifikasi fragmen DNA asal daun tanaman karet dengan teknik RAPD hanya menghasilkan antara 5 – 11 fragmen per primer (Nurhaim-Haris *et al.*, 1998). Demikian juga analisis RAPD beberapa tanaman perkebunan lainnya seperti pada DNA kopi menghasilkan 1 – 7 fragmen dan DNA kakao menghasilkan 2 – 8 fragmen per primer (Toruan-Mathius & Hutabarat, 1996; Toruan-Mathius *et al.*, 1997). Sedangkan pada analisis RAPD tanaman kelapa diperoleh antara 4 – 10 fragmen DNA per primer (Matondang *et al.*, 2001) atau rata-rata 11 fragmen per primer (Roslim *et al.*, 2003). Dengan demikian secara keseluruhan metode AFLP dapat mencakup lebih banyak karakter per kombinasi pasangan primer yang digunakan. Namun teknik AFLP sedikit lebih rumit dibandingkan dengan teknik RAPD karena merupakan kombinasi antara teknik sidik jari yang didasarkan pada hibridisasi dengan sidik jari yang didasarkan pada PCR.

Dari sepuluh pasang kombinasi primer, primer EACT-MCAT menghasilkan fragmen paling banyak yaitu 65 fragmen dan sebaliknya primer EACA-MCTG meng-

Kemiripan genetik klon karet (Hevea brasiliensis)...

hasilkan fragmen paling sedikit yaitu 34 fragmen. Namun fragmen polimorfis terbanyak diperoleh melalui amplifikasi dengan primer EACT-MCAG (Tabel 3).

Kemiripan genetik sepuluh klon karet

Berdasarkan 481 fragmen hasil amplifikasi dibuat dendrogram kemiripan genetik pada sepuluh klon karet yang digunakan (Gambar 3). Kemiripan genetik antar klon relatif tinggi yaitu mencapai 85,5%. Pada kemiripan genetik 88,0% masing-masing individu terpisah membentuk tiga kelompok, yaitu kelompok 1 terdiri atas 3 klon (AVROS 2037, PR 255, BPM 1), kelompok 2 terdiri atas 6 klon (IRR 100, GT 1, RRIM 600, RRIC 103, PPN 2444, IAN 873), dan kelompok tiga hanya 1 klon, yaitu RRIC 100. Tingginya kemiripan

genetik tersebut dapat dipahami karena tanaman karet yang dibudidayakan saat ini, baik di Indonesia maupun di negara penghasil karet alam lainnya merupakan turunan dari 22 biji yang diintroduksi oleh Wickham pada tahun 1877 ke Ceylon (Sri Lanka), Malaysia dan Indonesia (Baulkwill, 1989). Dengan demikian untuk menghasilkan klon-klon unggul baru melalui persilangan buatan pada umumnya Pusat Penelitian Karet, baik yang ada di Indonesia maupun di negara lain, menggunakan tetua yang berasal dari sejumlah biji tersebut.

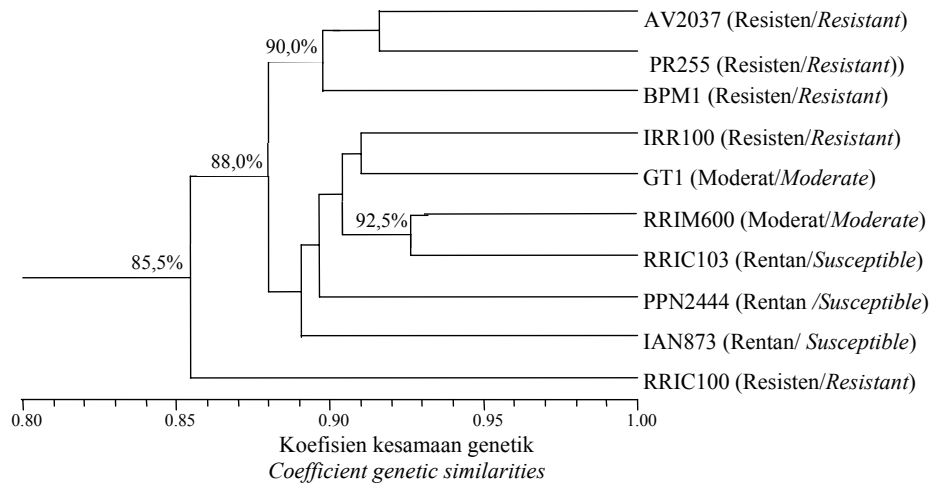
Analisis yang dilakukan sebelumnya melalui teknik RAPD menginformasikan bahwa kemiripan genetik antar 79 klon karet adalah sekitar 70% (Nurhaimi-Haris *et al.*, 1998). Dengan menggunakan marka isozim diinformasikan bahwa rata-rata kemiripan genetik 60 klon yang dibudidayakan adalah

Tabel 3. Jumlah fragmen DNA teramplifikasi dengan 10 pasang primer AFLP pada 10 klon karet.

Table 3. The number of amplified DNA fragments using 10 pairs of AFLP primers on 10 rubber clones.

No.	Pasangan primer <i>Primer pairs</i>	Jumlah fragmen DNA teramplifikasi <i>Number of DNA amplification</i>		
		P	M	Jumlah <i>Number</i>
1.	EACT-MCAT	30	35	65
2.	EACA-MCTG	12	22	34
3.	EACA-MCTT	24	29	53
4.	EAAC-MCAG	10	37	47
5.	EACT-MCTA	21	23	44
6.	EACA-MCAC	23	18	41
7.	EACC-MCAA	27	19	46
8.	EACC- MCTA	28	16	44
9.	EACA-MCTA	21	30	51
10.	EACT-MCAG	37	19	56
			Jumlah	481

Keterangan (Note) : P = Polimorfis (*Polymorphic*) M = Monomorfis (*Monomorphic*).



Gambar 3. Dendrogram kemiripan genetik 10 klon karet berdasarkan analisis AFLP menggunakan 10 pasang primer selektif.

Figure 3. Dendrogram of genetic similarity of 10 rubber clones based on AFLP analysis by using 10 pairs of selective primers.

75% (Yeang *et al.*, 1998). Perbedaan tingkat kemiripan genetik yang diperoleh diduga berhubungan erat dengan jumlah karakter yang diamati.

Pada analisis RAPD tersebut hanya digunakan sebanyak 85 karakter sedangkan pada analisis isozim digunakan 23 karakter, jauh lebih sedikit dibandingkan dengan 481 karakter yang digunakan untuk membuat dendrogram kemiripan genetik yang dilakukan dalam penelitian ini. Dari sepuluh klon karet yang diuji, kemiripan genetik tertinggi mencapai 92,5% terdapat pada klon RRIM 600 dan RRIC 103. Berdasarkan silsilah klon diketahui bahwa kedua klon tersebut memiliki garis keturunan yang dekat karena tetua jantannya sama yaitu klon PB 86 (Tabel 1). Hasil agak menyimpang ditemukan pada klon RRIC 100 dan RRIC 103

yang berasal dari garis keturunan yang sama karena berasal dari tetua betina dan tetua jantan sama (Tabel 1), namun berdasarkan hasil AFLP hanya memiliki kemiripan genetik 85,5%. Dari penelitian sebelumnya menggunakan analisis RAPD, klon RRIC 100 dan RRIC 103 mengelompok pada kemiripan genetik 75% dan kedua klon tersebut mengelompok dengan klon RRIM 600 pada kemiripan genetik 74% (Nurhaimi-Haris *et al.*, 1998). Adanya hasil yang demikian memerlukan penelitian yang lebih mendalam dengan melibatkan se-banyak mungkin karakter genetik sehingga dapat lebih menggambarkan keadaan sesungguhnya.

Tampaknya pengaruh tetua jantan terhadap tingkat kemiripan genetik turunannya lebih besar dibandingkan dengan

Kemiripan genetik klon karet (Hevea brasiliensis)...

pengaruh tetua betina. Hal tersebut terlihat pada klon RRIM 600 yang mempunyai tetua jantan sama dengan klon RRIC 103 yaitu PB 86 ternyata 92,5% latar belakang genetiknya mirip sedangkan klon RRIM 600 dengan PR 255 yang memiliki tetua betina sama yaitu Tjir 1 hanya memiliki kemiripan genetik 88,0%. Tiga klon asal Indonesia yaitu AVROS 2037, PR 255 dan BPM 1 yang diketahui memiliki tingkat resistensi tinggi terhadap *C. cassiicola* ternyata juga memiliki kemiripan genetik yang tinggi yaitu 90,0%. Demikian juga halnya dua klon yang sangat rentan yaitu PPN 2444 dan RRIC 103 memiliki kemiripan genetik 90,0%. Berdasarkan garis keturunannya diketahui bahwa tidak ada tetua yang sama antar masing-masing kelompok tersebut.

Apabila diamati antar kelompok tingkat resistensi terhadap *C. cassiicola* diketahui bahwa klon resisten IRR 100 memiliki kemiripan genetik tertinggi 90,5% dengan klon rentan RRIC 103, sedangkan dengan klon rentan lainnya yaitu PPN 2444 dan IAN 873 masing-masing mencapai 89,5% dan 89,0%. Kemiripan genetik 3 klon resisten lainnya yakni AVROS 2037, PR 255 dan BPM 1 terhadap 3 klon rentan tersebut sama, yaitu 88,0%. Sedangkan klon resisten RRIC 100 memiliki kemiripan genetik 85,0% dengan 3 klon rentan RRIC 103, PPN 2444 dan IAN 873.

Di antara 5 klon resisten, klon IRR 100 memiliki kemiripan genetik tertinggi dengan 3 klon rentan yang digunakan. Namun karena klon IRR 100 merupakan klon yang relatif baru dibandingkan dengan 4 klon resisten lainnya, dan pengujian resistensinya terhadap *C. cassiicola* relatif masih terbatas di beberapa lokasi saja sehingga klon ter-

sebut tidak dipilih untuk digunakan dalam studi ekspresi gen.

Klon resisten dan klon rentan yang akan digunakan dalam penelitian selanjutnya adalah AVROS 2037 dan PPN 2444 dengan pertimbangan bahwa distribusi klon AVROS 2037 telah ditanam cukup luas dan merupakan klon yang dihasilkan melalui persilangan buatan yang dilakukan di Indonesia. Kedua klon tersebut memiliki kemiripan genetik mencapai 88,0% dengan marka AFLP. Sedangkan berdasarkan marka RAPD kedua klon yang sama hanya memiliki kemiripan genetik 75% (Nurhaimi-Haris *et al.*, 1998). Hasil tersebut cukup menjelaskan bahwa penajaman analisis dapat dilakukan dengan melibatkan karakter genetik yang lebih banyak.

Kesimpulan

Kemiripan genetik 10 klon karet yang diuji dengan menggunakan marka AFLP mencapai 85,0%. Klon resisten AVROS 2037, PR 255 dan BPM 1 terdapat dalam satu kelompok, dimana 88,0% latar belakang genetiknya mirip dengan klon rentan RRIC 103, PPN 2444 dan IAN 873.

Klon resisten IRR 100 terdapat pada kelompok lainnya dengan kemiripan genetik berturut-turut 90,5, 89,5 dan 85,0% terhadap klon rentan RRIC 103, PPN 2444 dan IAN 873. Sedangkan klon resisten RRIC 100 memiliki kemiripan genetik 85,0% dengan ketiga klon rentan yang sama.

Untuk studi ekspresi gen tanaman karet yang terkait dengan resistensi klon terhadap *C. cassiicola* akan digunakan klon resisten AVROS 2037 dan klon rentan PPN 2444 yang memiliki kemiripan genetik 88,0%.

Daftar Pustaka

- Bank Indonesia (2002). *Laporan ekonomi dan moneter Indonesia tahun 2002*. Jakarta, Bank Indonesia.
- Baulkwill, W.J. (1989). The History of natural rubber production. In Webster CC, Baulkwill WJ (ed). *Rubber*. New York, Longman Scientific & Technical. p. 1–56.
- Besse, P., M. Seguin, P. Lebrun, M.H. Chevallier, D. Nicolas & C. Lanaud (1994). Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.*, **88**, 199-207.
- Briard, M., V. Le Clerc, D. Grzebelus, D. Senalik & P.W. Simon (2000). Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP analysis using silver stain or radioisotopes. *Plant. Mol. Biol. Rep.*, **18**, 235-241.
- Chalhoub, B.A., S. Thibault, V. Laucou, C. Rameau, H. Hofte & R. Cousin (1997). Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *Bio Techniques*, **22**, 216-220.
- Chevallier, M.H. (1988). Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germplasm using isozymes markers. *J. Nat. Rubb. Res.*, **3(1)**, 42-53.
- Lekawipat, N., K. Teerawatanasu, M. Rodier-Goud, M. Seguin, A. Vanavichit, T. Toojinda & S. Tragoonrung (2003). Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones of *Hevea brasiliensis* Muell.Arg. by using microsatellite markers. *J. Rubb. Res.*, **6(1)**, 36-47.
- Luo H., B.V. Coppenolle, M. Seguin & M. Boutry (1995). Mitochondrial DNA polymorphism and phylogenetic relationships in *Hevea brasiliensis*. *Mol. Breed.*, **1**, 51-63.
- Lespinasse D, M. Rodier-Goud, L. Grivet, A. Leconte, H. Legnate & M. Seguin (2000). A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea spp.*) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.*, **100**, 127-138.
- Lin J-J, J. Kuo, J. Ma, J.A. Saunders, H.S. Beard & M.H. MacDonald (1996). Identification of molecular markers in soybean-comparing RFLP, RAPD, and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **14**, 156-169.
- Lin J-J, J. Ma, M. Ambrose & J. Kuo (1997). Chemiluminescent detection of AFLP fingerprints. *Focus*, **19**, 36-38.
- Madjid A, M. Saleh & S. Suwitoutomo (1977). Report on the 1974 Exchange Clones. In *Workshop on International Collaboration in Hevea Breeding and The Collection and Establishment of Material from Neotropics*, Kuala Lumpur, 12-16 April, 1977.
- Matondang, I., Suharsono, A. Hartana (2001). Analisis keanekaragaman genetik kelapa dalam asal Maluku menggunakan teknik Random Amplified Polymorphic DNA. *Hayati*, **8**, 31 – 34.

Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis*)...

- Nurhaimi-Haris, S. Woelan & A. Darussamin (1998). RAPD analysis of genetic variability in plant rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) clones. *Menara Perkebunan*, **66**(1), 9 – 19.
- Orozco-Castillo, K. J. Chalmera, R. Waugh & W. Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD marker. *Theor. Appl. Genet.*, **87**, 934-038.
- Perry, M.D., M.R. Davey, J. B. Power, K.C. Lowe, H.F.J. Bligh, P.S. Roach & C. Jones (1998). DNA isolation and AFLP genetics fingerprinting of *Theobroma cacao* (L.). *Plant Mol. Biol. Rep.*, **16**, 49 – 59.
- Rogers, S.O. & A.J. Bendich (1994). Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In S.B. Gelvin & R. A. Schilperoort (Eds.). *Plant Molecular Biology Manual*. Second Edition. Section D1.
- Rohlf, J.R. (1993). *NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80*. New York, Exeter Software.
- Roslim, D. I., A. Hartana & Suharsono (2003). Kemiripan genetika tiga populasi kelapa tipe dalam berdasarkan tiga metode analisis data penanda RAPD. *Hayati*, **10**, 12 – 18.
- Sambrook, J, E.F. Fritsch & T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning*. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seguin, M., P. Besse, P. Lebrun & M.H. Chevallier (1995). *Hevea* germplasm characterization using isozymes and RFLP markers. In Baradat WT Adams & Muller-Starck (eds.) *Population genetics and genetic conservation of forest trees*. p. 129-133.
- Simmonds, N.W. (1989). Rubber Breeding. In Webster CC, Baukwill WJ (ed). *Rubber*. New York, Longman Scientific & Technical. p. 85 – 124.
- Thomas, C.M., P. Vos, M. Zabiau, D.A. Jones, K.A. Norcott & B.P. Chadwick (1995). Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Plant J.*, **8**, 785-794.
- Toruan-Mathius, N. & T. Hutabarat (1996). Penanda RAPD dan polimorfisme genetik tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) toleran terhadap cekaman air. *Menara Perkebunan*, **64**(2), 45 –55.
- Toruan-Mathius, N., T. Hutabarat & D. Suhendi (1997). The use of RAPD to evaluate genetic variability of hybrid parent in *Theobroma cacao* L. plants. *Menara Perkebunan*, **65**(2), 53 –63.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Acids Res.*, **23**, 4407-4414.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Acid Res.*, **18**, 6531-6535.
- Yeang, H.Y., E. Sunderasan, R. Wickneswari, D. Napi & A.S.M. Zamri (1998). Genetic relatedness and identities of cultivated *Hevea* clones determined by isozymes. *J. Rubb. Res.*, **1**(1), 35-47.

