

ANALISIS KERAGAMAN GENETIK ENAM BELAS AKSESI BLEWAH (*Cucumis melo* L.) DENGAN METODE RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)

{Study on the Genetic Variability of 16 Accessions of Blewah (*Cucumis melo* L.) By
Mean Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)}

Sobir, Dwi Guntoro dan Ima Septimayani

Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, IPB

ABSTRACT

Sixteen accession of endogenous blewah (*Cucumis melo* L.) from East Java are subjected to genetics variability analysis on their fruit morphological characters and RAPD assays. Based on five morphological characters including fruit weight, fruit length, flesh thickness, diameter of fruit, and total soluble solid, it is found that the evaluated accessions are separated into two clusters at 3.01 of genetics distance. The first cluster consists of all accessions from Jombang, Lamongan, four accessions from Pasuruan. The second cluster consists of three accessions from Mojokerto, two accessions from Tuban and two accessions from Pasuruan. Accessions from the same origin tend clustered into the same group. Screening of 55 decamer RAPD primers resulted eleven primers are able to amplify the DNA blewah genome, and five out of them are chosen for RAPD analysis. They are OPD9, OPI2, OPII7, OPN10, and OPN18. RAPD analysis reveals that the accessions are separated into three main clusters at genetics distance of 3.00. The first cluster consists of one accession of No.22 from Mojokerto, the second cluster one accession of No.36 from Lamongan, and the third cluster consists of other fourteen accessions.

Key words : Blewah (*Cucumis melo* L.), RAPD analysis, genetics distance

PENDAHULUAN

Melon merupakan tanaman yang dikenal memiliki nilai ekonomi tinggi, akan tetapi pengembangan melon di Indonesia menghadapi kendala keterbatasan penyediaan benih karena sebagian besar benih melon masih impor. Benih yang diimpor umumnya benih hibrida hasil persilangan terkendali sehingga harganya mahal, sementara itu penggunaan benih hasil panen tidak dianjurkan karena dapat menurunkan hasil mengingat benih yang dipakai sudah mengalami segregasi. Oleh karena itu perlu program pemuliaan melon berbasis sumber genetik Indonesia, mengingat Indonesia memiliki keragaman yang tinggi untuk melon yang dikenal sebagai blewah, untuk memenuhi kebutuhan benih melon yang lebih sesuai dengan agroklimat Indonesia.

Secara botani tanaman melon (*Cucumis melo* L.) termasuk kedalam genus *Cucumis*, famili *Cucurbitaceae*. Africa diduga sebagai pusat keragaman species *Cucumis* yang memiliki jumlah kromosom sebanyak 12 dalam keadaan haploid [1]. Selanjutnya melon menyebar ke Mesir dan Iran pada milenia kedua dan ketiga sebelum masehi [2]. Melon liar dapat ditemukan di Afrika, Asia hingga Australia [1], hal ini menunjukkan bahwa melon sudah menyebar luas dan proses domestikasi melon terjadi secara terpisah di Afrika dan Asia [3].

Sebagai bagian dari wilayah distribusi sekunder melon [3], Indonesia memiliki melon endogenous yang disebut blewah. Blewah biasa dibudidayakan di daerah kering Jawa Timur dan Jawa Tengah, ditanam terutama di lahan sawah setelah musim panen

padi gadu. Sebagai tanaman yang sudah lama beradaptasi dengan agroklimat Indonesia, blewah merupakan potensi genetik tinggi bagi pemuliaan melon di Indonesia, akan tetapi keragaman blewah tersebut belum dikarakterisasi, sehingga belum bias dimanfaatkan secara maksimal.

Keragaman genetik dari bahan pemuliaan sangat penting terutama dalam tahap pembentukan populasi dasar [4]. Keragaman genetik yang tinggi memberikan peluang besar untuk mendapatkan kombinasi genetik sesuai dengan tipe ideal yang diharapkan. Informasi keragaman genetik dapat diperoleh dengan melakukan karakterisasi. Karakterisasi suatu sumberdaya genetic, dapat dilakukan dengan tiga pendekatan, yaitu 1) karakterisasi berdasarkan penanda visual (morfologi); 2) karakterisasi berdasarkan penanda enzimatik (isozyme); dan 3) karakterisasi berdasarkan penanda DNA [5].

Karakterisasi berdasarkan penanda DNA memiliki beberapa keuntungan yaitu tidak dipengaruhi oleh lingkungan, dapat dideteksi pada setiap tahap pertumbuhan dan dari semua bagian jaringan tanaman [5]. Penanda DNA yang potensial untuk digunakan dalam karakterisasi sumberdaya genetik adalah penanda DNA yang berbasis PCR (Polymorphic Chain Reaction), seperti analisis RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) atau VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) [6]. Analisis RAPD memiliki beberapa keunggulan dibandingkan penanda DNA yang lain seperti RFLP, yaitu lebih sederhana, hanya memerlukan sedikit DNA dan tidak perlu terlalu murni, cocok digunakan untuk sampel banyak, cukup menggunakan satu macam primer

acak, dan pengerjaannya relatif cepat [7]. Analisis keragaman genetik berdasarkan penanda RAPD telah dilakukan oleh beberapa peneliti [8,9].

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman.

Bahan genetik yang dianalisis merupakan 16 aksesori blewah yang dikumpulkan dari empat kabupaten di Jawa Timur (Tabel. 1).

Analisis Morfologi

Aksesori-aksesori yang diuji ditanam di kebun percobaan IPB Tajur yang terletak pada ketinggian tempat 200 m di atas permukaan laut pada bulan Maret sampai Mei 2001. Bahan tanaman yang diuji ditanam dengan menggunakan rancangan kelompok lengkap teracak sebanyak tiga ulangan. Masing-masing ulangan terdiri atas tujuh belas aksesori dan masing-masing aksesori terdiri atas dua belas tanaman.

Pengamatan morfologi meliputi berat buah, panjang buah, tebal buah, keliling buah, dan padatan total terlarut.

Analisis RAPD

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode CTAB dengan beberapa modifikasi [10]. Daun muda blewah dengan bobot 0,2 – 0,3 gram ditumbuk sampai halus dalam *microtube* yang sudah berisi buffer ekstrak yang selanjutnya ditambahkan kloroform : IAA = 24 : 1 sebanyak 560 µl setelah diinkubasi pada suhu 65°C minimal 15 menit. Sebanyak 600 µl supernatan dicampur dengan isopropanol dingin dengan volume sama dan dispin selama 15 menit sampai pelet DNA mengendap, kemudian sisa cairan sebelumnya dicuci dengan ethanol 70% sebanyak 200 µl. DNA dikeringkan pada suhu kamar minimal empat jam. Uji kuantitas DNA dilakukan dengan elektroforesis DNA menggunakan gel agarosa konsentrasi 1,5% dan dialirkan dalam te-

ngangan 100 Volt selama 45 menit. Pewarnaan DNA menggunakan larutan Ethidium Bromida 0,5% mg/l, selanjutnya kuantitas DNA dapat dilihat pada UV *transilluminator*.

Amplifikasi total DNA genom dilakukan dengan menggunakan primer tunggal 10 basa pada mesin PCR ASTEC Thermal Cycler PC 707, yang diprogram sebanyak 45 siklus yang terdiri atas 95°C selama 1 menit, 35°C selama 1 menit, dan 72°C selama 2 menit. Diikuti satu siklus 7 menit pada 72°C. Reaksi PCR dilakukan tersebut menggunakan volume sebanyak 25 µl terdiri atas 16,5 µl air bebas ion 2.5 µl buffer PCR; 10 pM primer acak; 2 mM dNTP; 3 mM MgCl₂; 1 µl DNA dan 1 unit enzim DNA *Taq polymerase*.

Analisis Data

Penghitungan parameter genetik semua peubah morfologi yang diamati dilakukan berdasarkan metode Singh dan Chaudary [11]. Profil data pita RAPD diterjemahkan berdasarkan ada (1) dan tidaknya pita (0). Kemiripan antar aksesori dalam analisis RAPD dihitung berdasarkan pendekatan Nei and Lie [12]. Analisis gerombol dilakukan dengan Unweighted Pair Group Method and Arithmetic Average (UPGMA) dengan menggunakan program komputer NTSYS-pc, version 1,80 (Exeter software, New York).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Keragaman Morfologi

Hasil analisis sidik ragam dari hasil karakterisasi penanda morfologi, menunjukkan bahwa semua peubah yang diamati berbeda nyata, yaitu pada peubah bobot buah, panjang buah, keliling buah, dan diameter buah. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa aksesori-aksesori yang digunakan dalam penelitian ini beragam.

Table 1. List of Blewah accession along with their origin, which subjected to the genetics analysis.

No.	Code	Origin	Regency
1	PKBT06	Pedon	Tuban
2	PKBT09	Pedon	Tuban
3	PKBT17	Topeng	Lamongan
4	PKBT18	Topeng	Lamongan
5	PKBT21	Pilanggud	Mojokerto
6	PKBT22	Pilanggud	Mojokerto
7	PKBT24	Pilanggud	Mojokerto
8	PKBT26	Bangil	Pasuruan
9	PKBT27	Sungikulon	Pasuruan
10	PKBT28	Sungikulon	Pasuruan
11	PKBT29	Sungikulon	Pasuruan
12	PKBT30	Sungikulon	Pasuruan
13	PKBT31	Sungikulon	Pasuruan
14	PKBT32	Perak	Jombang
15	PKBT34	Perak	Jombang
16	PKBT36	Perak	Jombang

Berdasarkan karakter morfologi, keragaman genetik dapat dideteksi dari jarak genetik 0,63 – 3,66 (Gambar 1). Pada jarak genetik 3,0; keenambelas aksesi yang diuji dapat dikelompokkan kedalam dua kelompok besar. Kelompok pertama terdiri atas tujuh aksesi, dua aksesi berasal dari Tuban (No. 6; No. 9), tiga aksesi dari Mojokerto (No. 21; No. 22; No. 24) dua aksesi dari Pasuruan (No. 27; No. 29). Kelompok kedua terdiri atas 9 aksesi, dua aksesi dari Lamongan (No. 17; No. 18), empat aksesi dari Pasuruan (No. 26; No. 28; No. 30; No. 31) dan tiga aksesi dari Jombang (No. 32; No. 34; No. 36). Hasil tersebut di atas menunjukkan kecenderungan bahwa aksesi dari suatu daerah berada pada satu kelompok.

Analisis RAPD

Sebanyak 55 primer acak RAPD diuji terhadap aksesi yang memiliki buah paling kecil dan aksesi buah paling besar dan diperoleh sebelas macam primer yang dapat mengamplifikasi DNA genom blewah, yaitu OPD 3; OPD 9; OPD 10; OPN 8; OPN 10; OPN 14; OPN 18; OPI 2; OPI 3; OPI 17; dan OPI 18. Primer-primer yang menghasilkan pita lebih dari satu sebanyak lima primer dan dipilih untuk analisis selanjutnya. Primer-primer tersebut adalah OPD 9; OPI 2; OPI 17; OPN 10; dan OPN 18 dan kelima primer tersebut mengamplifikasi 48 pita DNA, atau rata-rata setiap primer dapat menghasilkan sembilan pita DNA dengan jumlah pita polimorfik 46 pita. Pita-pita DNA yang dihasilkan berukuran dari 4260 sampai 420 pasang basa (Gambar 2).

Hasil analisis terhadap data RAPD dengan menggunakan lima primer acak menunjukkan bahwa ak-

sesi yang diuji meliki jarak genetik pada kisaran 2,00 sampai 3,74 (Gambar 3). Pada jarak genetik 3,000, aksesi yang diuji dibedakan kedalam tiga kelompok besar. Kelompok besar pertama adalah aksesi No. 22; kelompok besar kedua adalah aksesi No. 36; sedangkan empat belas aksesi lainnya merupakan anggota kelompok besar ketiga. Selanjutnya pada jarak genetik 2,79; kelompok besar ketiga dapat dibedakan kedalam empat sub-kelompok, yang terdiri atas sub-kelompok pertama dengan satu anggota aksesi No. 28; sub-kelompok kedua dengan anggota enam aksesi (No.18; No.26; No.27; No.30; No.31; dan No.32), sub-kelompok ketiga dengan anggota satu aksesi yaitu aksesi No.29 dan sub-kelompok keempat dengan anggota enam aksesi (No.6; No.9; No.17; No.21; No.24; dan No. 34).

Pembahasan

Berdasarkan analisis morfologi aksesi-aksesi yang berasal dari daerah yang sama cenderung mengelompok menjadi satu kelompok karena aksesi-aksesi yang berasal dari daerah yang sama cenderung homogen dalam keragaan di lapangan, dengan beberapa pengecualian. Sebagai contoh adalah aksesi No.27 dan No.29 yang keragaannya lebih mirip dengan kelompok besar pertama daripada dengan aksesi-aksesi lainnya yang berasal dari daerah yang sama dan berada pada kelompok besar pertama. Hal ini menunjukkan bahwa keragaman dalam aksesi dari satu daerah cenderung lebih rendah dibandingkan keragaman aksesi antar daerah, yang diduga karena lingkungan sebagai tekanan seleksi lebih mirip dalam satu daerah dibandingkan antar daerah.

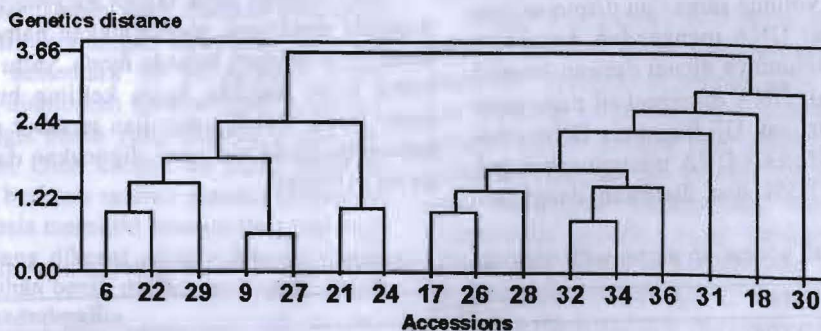


Figure 1. Cluster analysis result of sixteen blewah accessions, constructed base on their fruit characters.

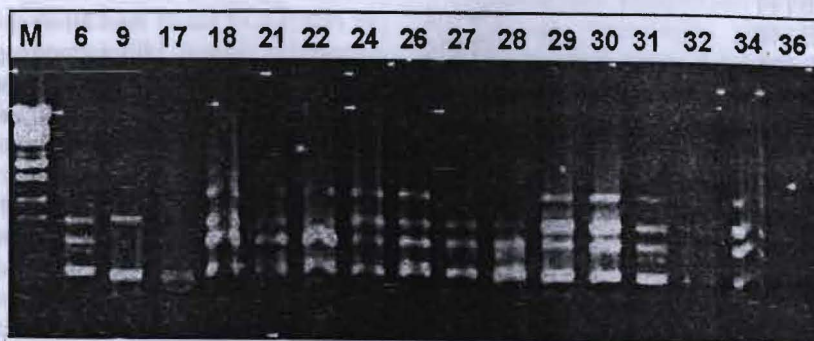


Figure 2. RAPD profile of sixteen blewah (*C. melo* L) accessions amplified by random primer OPN-10. Number of 6 to 36 above each lane indicated accession code, and M is DNA size markers (ϕ X174/*Hae*III digest).

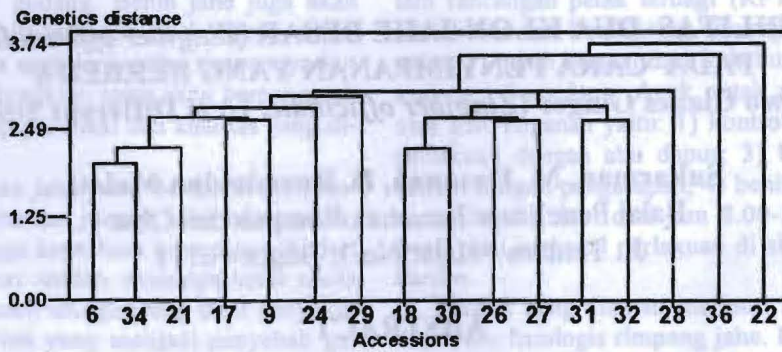


Figure 3. Dendrogram constructed using UPGMA and based on RAPD assay using five random primers of OPD9, OPI2, OPI17, OPN10 and OPN18.

Pengelompokan pada jarak genetik 3,01 menunjukkan bahwa semua aksesori yang diuji mengelompok pada dua kelompok besar, yang diduga berkaitan dengan karakter warna daging buah. Kelompok besar pertama memiliki warna daging buah secara umum kuning cenderung oranye sedangkan kelompok besar kedua memiliki warna daging buah kuning kehijauan. Warna daging buah kehijauan dikendalikan oleh gen tunggal (monogenic) yang bersifat resesif [13] sehingga memungkinkan pemisahan warna daging buah lebih sederhana.

Informasi besarnya keragaman genetik dari aksesori yang dimiliki sangat penting terutama dalam tahap pembentukan populasi dasar maupun untuk tahap seleksi. Jarak genetik antara aksesori yang diuji berdasarkan analisis RAPD dapat dideteksi sampai jarak 3,74. Sementara itu berdasarkan lima karakter morfologi keragaman dapat dideteksi sampai jarak genetik 3,66. Jarak genetik yang dihasilkan oleh karakterisasi RAPD dan karakterisasi morfologi berbeda, hal ini diduga karena pita hasil analisis RAPD tidak berkesesuaian dengan karakter morfologi yang diamati. Sementara itu nilai yang diperoleh dari hasil karakterisasi morfologi ini masih dipengaruhi oleh efek lingkungan dan interaksi antara genetik dan lingkungan. Ketidaksesuaian penanda morfologi dengan penanda molekuler juga ditemukan pada analisis genetik tanaman durian [14] dan pisang [15].

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari Hibah Penelitian Riset Unggulan Kemitraan Kementrian (RUK), Riset dan Teknologi Republik Indonesia, tahun anggaran 2000/2001.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Pitrat, M., Hanel, P and K. Hammer. 2000. Some comments on intraspecific classification of cultivars of melon. Proc. Cucurbitaceae 2000: 29-36.
- [2] Robinson, R. W. and D. S. DeckerWalkers. 1999. Cucurbits. CAB International. New York. USA. p.225.
- [3] Kerje, T and M. Grum. 2000. The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of literature. Proc. Cucurbitaceae 2000: 37-43.
- [4] Richards. A.J. 1986. Plant breeding system. George Allen Unwin. London. UK. p. 527.
- [5] Paterson, A.H., S.D. Tanksley, and M.E. Sorrels. 1991. DNA Markers in Plant Improvement. Adv. Agron. 44:39-90.
- [6] Lee M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. Adv Agron. 55:265-344.
- [7] 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. Nucleic Acid Res. 18: 6531-6535.
- [8] Wang. Y.H., Thomas, C. E and R. A. Dean. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Theor Appl Genet. 95:791-798.
- [9] Oliver, M., Garcia-Mas, J., Cardus, M., Pueyo, N., Lopez-Sese, A.I., Arroyo, M., Gomez-Paniagua, H., Arus, P and M.C. de Vincente. 2001. Construction of a reference linkage map for melon. Genome. 44:836-845.
- [10] Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 12: 13-15.
- [11] Singh R.K. and B.D. Chaudary. 1976. Biometrical Technique in Genetics and Plant Breeding. International Bioscience Publisher. Hissar. India. p. 248.
- [12] Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical Model for Studying Genetics Variation in Terms of Restriction Endonucleases. Proc Nat Acad Sci. 74: 5269-5273.
- [13] More, T.A and V.S. Seshadri. 1998. Genetic studies. In. Nayar, N.M. and T.A. More (eds). Cucurbits. Science Publisher. New York. USA. p. 128-153.
- [14] Novayandi, A. 2004. Analisis keanekaragaman Durian lokal Serang berdasarkan penanda Morfologi, Isozim, dan Gabungan Morfologi-Isozim. Thesis Institut Pertanian Bogor. (tidak dipublikasikan).
- [15] Robiah, H.R. 2004. Analisis keanekaragaman genetik pisang asal INIBAP berdasarkan penanda Penotipic dan RAPD. Thesis Institut Pertanian Bogor. (tidak dipublikasikan).