

PENANDA MOLEKULAR RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)
PADA KELAPA GENJAH JOMBANG

RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) MOLEKULAR MARKER
ON JOMBANG DWARF COCONUT

Hayati, P.K.D.¹⁾, A. Hartana^{1,2)}, dan Suharsono²⁾

¹⁾Laboratorium Biologi Tumbuhan, PAU-Ilmu Hayat IPB

²⁾Jurusan Biologi, FMIPA-IPB

ABSTRACT

Information of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) is necessary to support the breeding programs and germplasm conservation efforts. RAPD is molecular marker can provide to enhance the efficiency of early selection for time consuming of coconut breeding. The objective of this research was to study the genetic diversity of Jombang Dwarf coconut populations at Pakuwon and Mapanget Coconut Research Station (BALITKA) and at Jombang. DNA was amplified via *Polymerase Chain Reaction* (PCR) using ten random decamer primers and generated 72 (92%) RAPD polymorphic markers. Genetic diversity of coconut populations in BALITKA was higher than in Jombang. Genetic diversity of Jombang Dwarf coconut among populations was 20%.

Kata kunci : molecular marker, RAPD, PCR, genetic diversity, and Jombang Dwarf coconut

PENDAHULUAN

Asia Tenggara terutama wilayah Indo-Malaya diduga kuat merupakan pusat keragaman dan asal kelapa di dunia (Thampan, 1981; Rao *et al.*, 1996). Dengan demikian Indonesia sebagai bagian dari Indo-Malaya memiliki keragaman genetik kelapa lokal yang tinggi. Kelapa Genjah Jombang merupakan salah satu kelapa lokal Indonesia yang berasal dari Jombang, Jawa Timur. Yang menarik dari kelapa Genjah Jombang adalah terdapatnya empat variasi warna kulit buah, yaitu merah, kuning, hijau, dan coklat, tetapi karakter morfologi lainnya tidak dapat digunakan untuk membedakan keempat populasi kelapa Genjah Jombang ini (Saefudin dan Wardiana, 1994). Karena potensi yang dimilikinya maka kelapa Genjah Jombang telah dikoleksi oleh Balai Penelitian Kelapa dan Palma Lain (BALITKA), namun relatif masih sedikit informasi genetik yang diketahui.

sifat morfologi-agronomi maupun melalui penggunaan penanda tertentu. *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) merupakan salah satu penanda yang digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada tingkat molekular. Dasar dari analisis RAPD adalah penggunaan mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang mampu mengamplifikasi sekuen DNA secara *in vitro* (Mullis, 1990). Teknik PCR melibatkan pengaturan temperatur

selama pengulangan siklus denaturasi DNA, penempelan primer pada sekuen DNA, dan perpanjangan primer oleh enzim DNA Polymerase menjadi suatu fragmen DNA dengan berbagai ukuran.

Sebaran lokasi basa nukleotida di dalam genom yang menjadi tempat penempelan primer menyebabkan RAPD menjadi cara yang efektif untuk memeriksa polimorfisme sekuen DNA setiap individu dan sensitif karena mampu mendeteksi perubahan satu basa nukleotida pada tempat penempelan primer. Penggunaan RAPD relatif sederhana, mudah preparasinya, memberikan hasil lebih cepat dibandingkan teknik molekular lainnya, serta menghasilkan jumlah karakter yang tidak terbatas sehingga sangat membantu untuk keperluan analisis keragaman genetik tanaman yang tidak diketahui latar belakang genomnya (Furnier dan Liu, 1993). Pada tanaman perennial, RAPD sangat membantu dalam peningkatan efisiensi pada seleksi awal (Grattapaglia *et al.*, 1992).

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keragaman genetik populasi Kelapa Genjah Jombang yang dikoleksi oleh BALITKA (KP Pakuwon dan KP Mapanget) dan yang langsung berasal dari Jombang.

METODOLOGI

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun kelapa dari empat populasi kelapa Genjah Jombang yaitu Genjah Merah Jombang (GMJ), Genjah Kuning Jombang (GKJ), Genjah Hijau Jombang (GHJ), dan Genjah Coklat Jombang (GCJ). Jumlah tanaman yang diambil untuk setiap populasi, baik dari Jombang maupun koleksi Balitka adalah 10 pohon sehingga jumlah total tanaman yang digunakan adalah 80 pohon. Daun kelapa yang diambil dari Jombang terdiri dari keempat populasi kelapa Genjah Jombang. Daun kelapa yang diambil dari koleksi BALITKA KP Mapanget adalah populasi kelapa GHJ yang ditanam tahun 1978, sedangkan dari KP Pakuwon adalah populasi kelapa GKJ yang ditanam tahun 1978 dan GMJ dan GCJ yang ditanam bersamaan tahun 1994.

Isolasi DNA total tanaman dilakukan dengan cara menggerus daun kelapa yang masih muda dengan nitrogen cair menurut metode Suharsono (1998, komunikasi pribadi). Hasil DNA masing-masing sampel diuji kuantitas dan kualitasnya berdasarkan Sambrook *et al.* (1989). DNA hasil isolasi diamplifikasi dengan menggunakan 10 primer acak 10-mer (Tabel 1). Komposisi reaksi PCR (Perkin Elmer) dan program mesin PCR (Gene Amp PCR System 2400 Perkin-Elmer) dilakukan menurut Lengkong *et al.*, (1998). Hasil amplifikasi kemudian dielektroforesis pada 1.0% gel agarose dengan voltase 70 V selama 3 jam dan dilakukan pemotretan dengan film Polaroid 667.

Berdasarkan ada atau tidaknya pita RAPD, profil pita diterjemahkan ke dalam data biner untuk menyusun matriks data biner yang diturunkan menjadi matriks persamaan

genetik (Nei dan Li, 1979). Analisis pengelompokan dan pembuatan dendrogram dilakukan menggunakan metode UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Arithmetic*) melalui program NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate System*) versi 1.80.

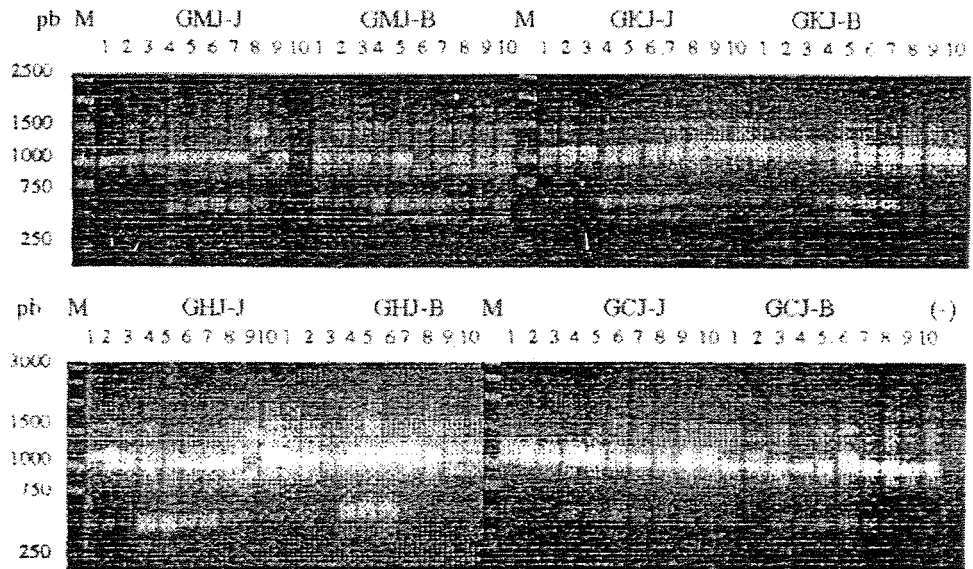
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan terhadap profil pita RAPD yang dihasilkan dari 10 primer ditampilkan pada Tabel 1. Semua primer yang digunakan mampu mengamplifikasi DNA keempat populasi kelapa Genjah Jombang dan menghasilkan menghasilkan pita polimorfik sebesar 92%. Jumlah pita berkisar antara empat (OPA-03) sampai sebelas (OPB-11) berukuran antara 200-2400 pasang basa (pb). Primer OPB-11 menghasilkan pita polimorfik tertinggi (Gambar 1).

Tabel 1. Jenis primer dan susunan basa (Operon Alameda Tech.), serta jumlah pita DNA kelapa Genjah Jombang hasil amplifikasi

No	Primer	Susunan basa (5' - 3')	Jumlah pita polimorfis					Jumlah pita total
			GMJ	GKJ	GHJ	G CJ	Total	
1	OPA-01	CAGGCCCTTC	3	3	4	2	5	5
2	OPA-03	AGTCAGCCAC	1	0	0	1	1	4
3	OPA-04	AATCGGGCTG	7	7	8	6	8	8
4	OPA-07	GAAACGGGTG	4	3	3	3	4	5
5	OPA-17	GACCGCTTGT	7	10	8	7	10	10
6	OPB-01	GTTTCGCTCC	4	2	6	3	7	9
7	OPB-04	G GACTGGAGT	7	8	10	7	10	10
8	OPB-05	TGCGCCCTTC	7	6	5	5	7	7
9	OPB-10	CTGCTGGGAC	7	5	5	8	9	9
10	OPB11	G TAGACCCGT	10	5	10	7	11	11
T o t a l			57	49	59	48	72	78
Persentase			73	63	76	62	92	-
Rata-rata jumlah pita per primer			6	5	6	5	7	8

Berdasarkan profil pita DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 10 primer, ditentukan matrik kesamaan genetik untuk menentukan hubungan kesamaan genetik antar individu pohon kelapa dalam populasi yang sama. Keragaman genetik antar populasi kelapa GMJ, GKJ, GHJ, dan GCJ dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Profil pita DNA kelapa Genjah Jombang hasil amplifikasi dengan OPB-11

Tabel 2. Keragaman genetik antar populasi kelapa GMJ, GKJ, GHJ, dan GCI

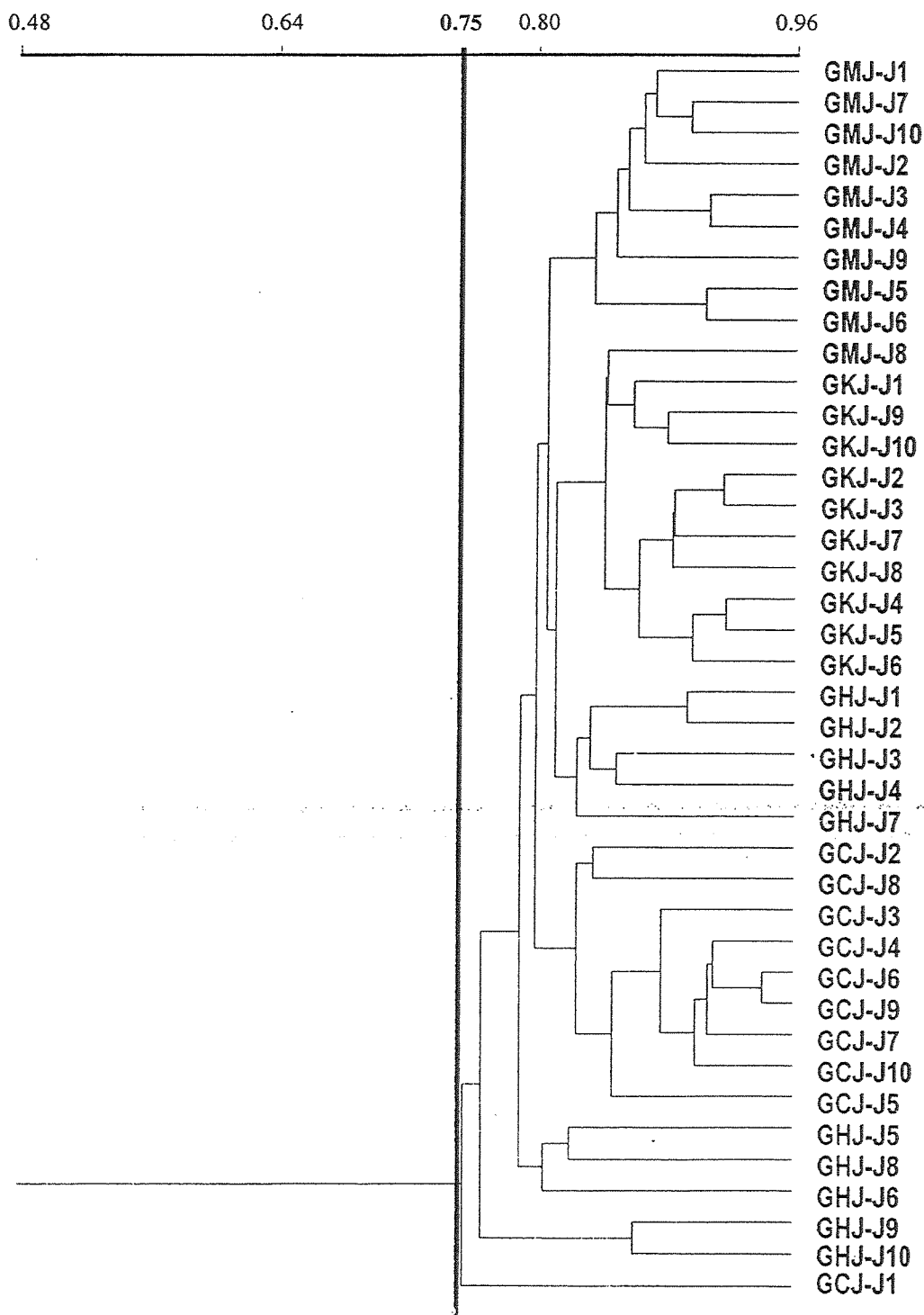
Populasi Kelapa	Keragaman genetik (%)		
	Tertinggi	Terendah	Rata-rata
Jombang	32 (GMJ-J10 – GHJ-J9)	5 (GCI-J6 – GCI-J9)	18
BALITKA	36 (GHJ-B3 – GCI-B7)	7 (GHJ-B9 – GHJ-B10)	20
Jombang-BALITKA	39 (GHJ-B7 – GCI-J1)	5 (GKJ-B1 – GKJ-B2)	20

Nilai keragaman genetik terendah di dalam populasi kelapa Genjah Jombang selalu dihasilkan dari populasi kelapa dengan lokasi geografis yang sama. Sedangkan keragaman genetik tertinggi selalu dihasilkan dari populasi kelapa Genjah Jombang yang berbeda seperti GMJ dengan GHJ yang berasal dari Jombang (32%) dan GHJ dengan GCI yang dikoleksi oleh BALITKA (36%).

Hasil analisis pengelompokan ditampilkan dalam bentuk dendrogram kesamaan genetik (Gambar 2-3). Jika dibandingkan keragaman genetik antar populasi kelapa genjah di Jombang dengan yang dikoleksi oleh BALITKA, maka keragaman genetik antar populasi kelapa GMJ, GKJ, GHJ, dan GCI koleksi BALITKA lebih tinggi (20%). Pada 75% tingkat kesamaan seluruh populasi kelapa genjah koleksi BALITKA mengumpul dalam satu kelompok, kecuali GHJ-B3 dan GHJ-B8. Semua pohon kelapa genjah Jombang yang dikoleksi oleh BALITKA baru mengelompok pada tingkat kesamaan genetik sekitar 73%.

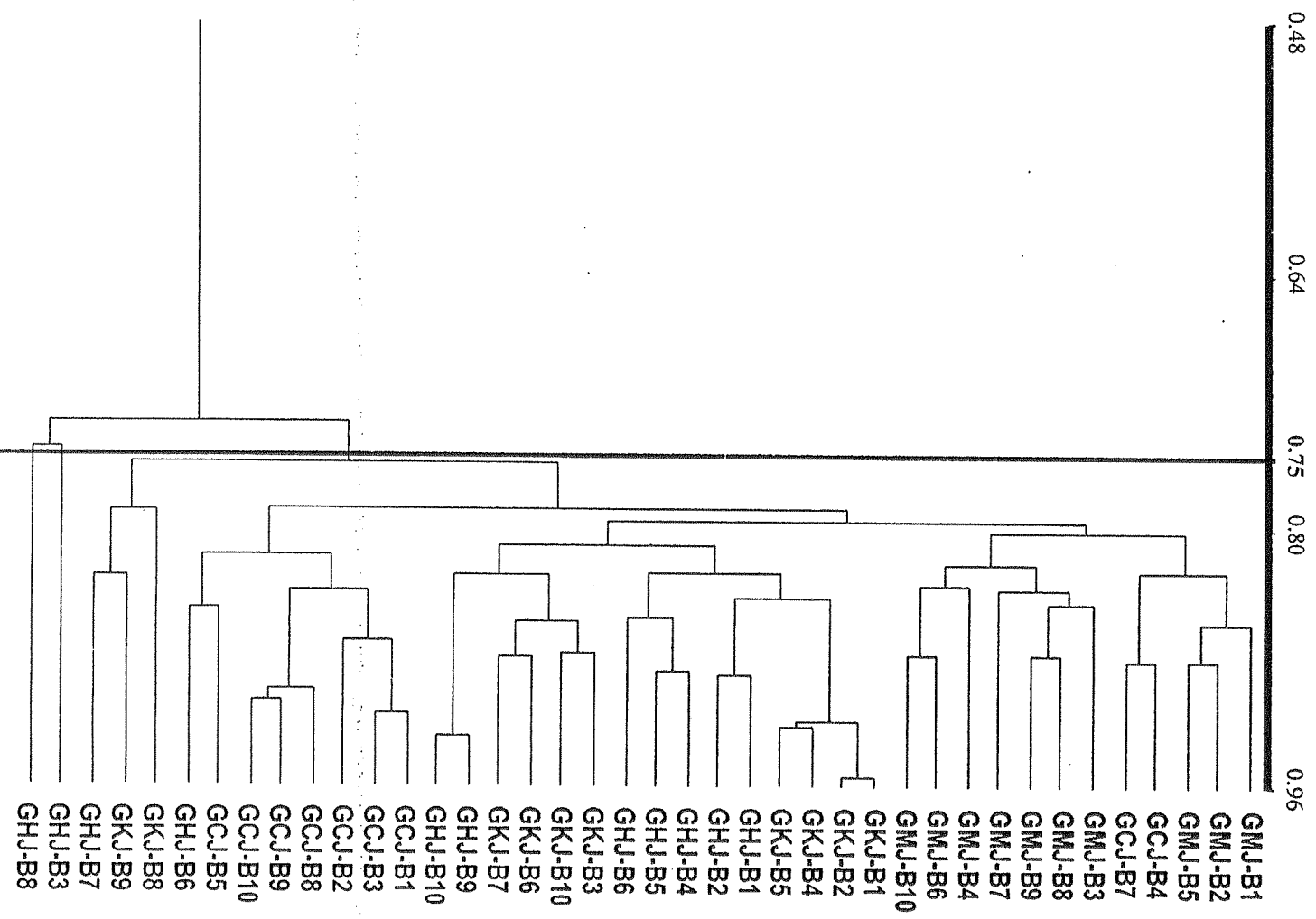
Besarnya keragaman genetik kelapa Genjah Jombang yang dikoleksi oleh BALITKA berasal dari keragaman yang ditimbulkan sebagai hasil penyerbukan terbuka. Pohon-pohon

kelapa GKJ-B8, GKJ-B9, GHJ-B3, GHJ-B7, dan GHJ-B8 yang memisah dari populasi dan kelompok lainnya, berkaitan dengan asal bibit populasi kelapa GKJ dan GHJ di BALITKA. Berbeda dengan populasi kelapa GMJ dan GCJ yang langsung dari Jombang, populasi kelapa GKJ dan GHJ berasal dari perkebunan swasta Beji, Batang, Jawa Tengah.

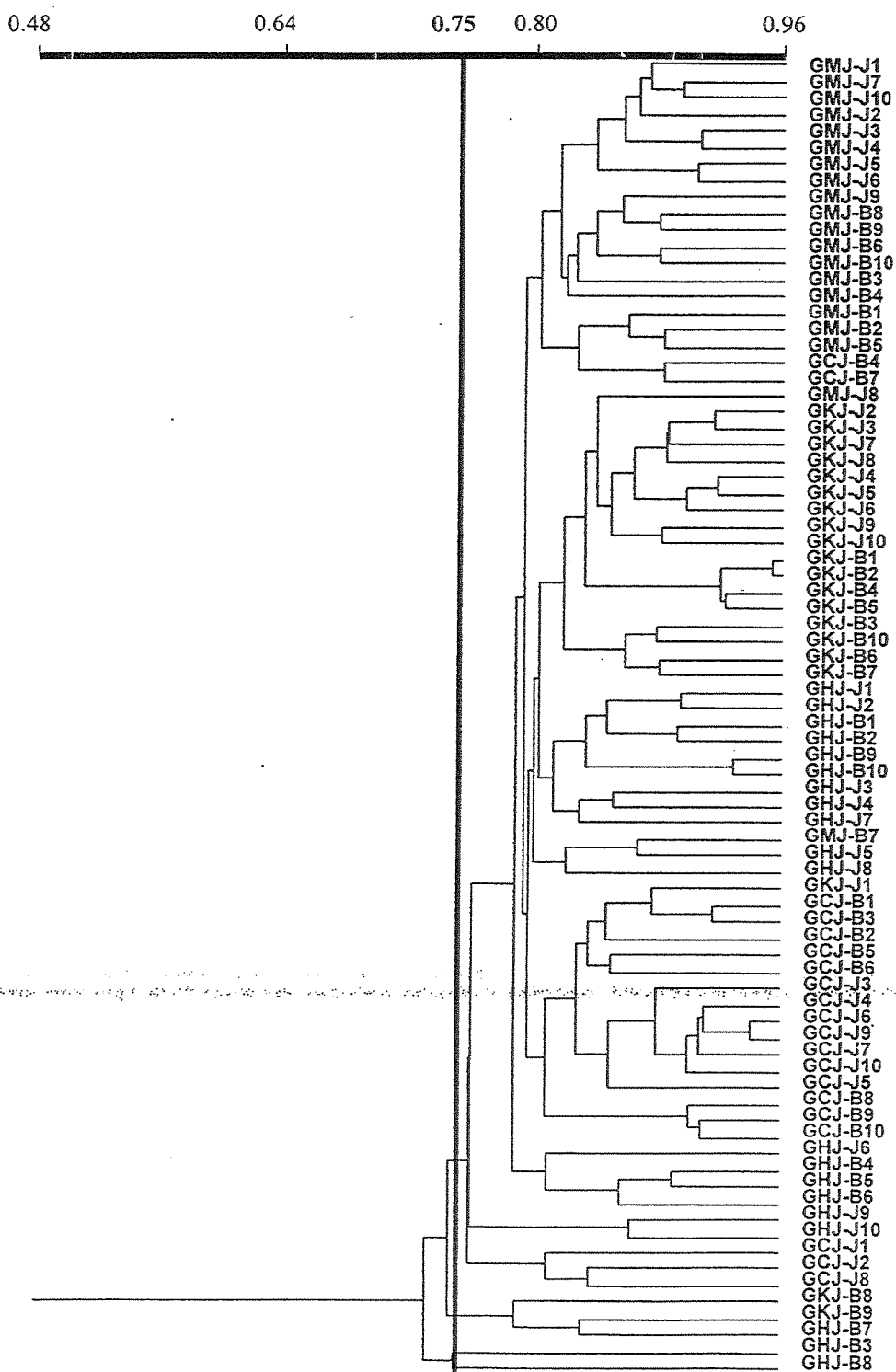


Gambar 2. Dendrogram kesamaan genetik antar populasi GMJ, GKJ, GHJ dan GCJ yang

berasal dari Jombang



Gambar 3. Dendrogram kesamaan genetik antar populasi GMJ, GKJ, GHJ dan GCJ yang dikoleksi oleh BALITKA



Gambar 4. Dendrogram kesamaan genetik antar populasi GMJ, GkJ, GHJ dan GCJ, baik yang berasal dari Jombang maupun yang dikoleksi oleh BALITKA

Populasi kelapa yang berasal dari Jombang memperlihatkan keragaman genetik yang lebih rendah (18%) dibandingkan dengan yang dikoleksi oleh BALITKA. Pada 80% tingkat kesamaan genetik, terbentuk lima kelompok. Kelompok besar pertama meliputi populasi GMJ, GKJ, dan GHJ, kelompok kedua populasi GCJ, kelompok ketiga meliputi pohon-pohon GHJ-J5, GHJ-J6, dan GHJ-J8, kelompok keempat terdiri dari GHJ-J9 dan GHJ-J10, serta kelompok kelima merupakan pohon GCJ-J1. Fenomena GCJ-J1 yang paling akhir mengumpul ke dalam kelompoknya disebabkan karena GCJ-J1 berasal dari desa yang terpisah paling jauh dari lokasi pengambilan sampel lainnya di Jombang. Pada 75% tingkat kesamaan genetik, semua populasi kelapa Genjah Jombang yang berasal dari Jombang mengelompok menjadi satu.

Keragaman genetik antar populasi kelapa yang berasal dari Jombang dan yang dikoleksi oleh BALITKA ditampilkan pada Gambar 4. Analisis pengelompokan memperlihatkan kecenderungan populasi kelapa GMJ, GKJ, dan GCJ mengumpul dalam populasinya masing-masing, kecuali GMJ-J8 yang bergabung dengan populasi GKJ, GMJ-B7 yang bersama dengan GHJ-J5 dan GHJ-J8 membentuk satu kelompok kecil, GKJ-J1 yang bergabung dengan populasi kelapa GCJ, dan GCJ-B4 dan GCJ-B7 yang bergabung dengan populasi kelapa GMJ. Selain itu pohon-pohon GCJ-J1, GCJ-J2, dan GCJ-J8, GKJ-B8, GKJ-B9 dan GHJ-B7, serta GHJ-B3 dan GHJ-B8 masing-masing mengelompok dan bergabung dengan populasi lainnya pada tingkat kesamaan sekitar 73%.

Persilangan terbuka antar populasi diperkirakan menjadi salah satu penyebab besarnya keragaman genetik antar populasi, walaupun tipe persilangan terbuka pada tipe kelapa genjah tidak sebesar pada kelapa dalam. Sebagai satu-satunya spesies dalam genus *Cocos*, tidak terdapat halangan biologis maupun genetik untuk terjadinya persilangan antara berbagai tipe atau kultivar kelapa. Selain itu, adanya empat pola penyerbukan pada kelapa, yaitu alogami sempurna, autogami langsung, autogami semi langsung, dan autogami tak langsung (Rognon, 1976) sangat berperan dalam menyebabkan besarnya keragaman genetik dalam satu populasi kelapa.

KESIMPULAN

Amplifikasi dengan menggunakan 10 primer dapat mengelompokkan populasi kelapa GMJ, GKJ, dan GCJ sesuai dengan warna kulit buah yang dimilikinya yaitu merah, kuning, dan coklat, namun masih terdapat keragaman antar pohon kelapa dalam populasi yang sama. Populasi kelapa GHJ cenderung tidak mengumpul dalam satu kelompok karena perbedaan

sumber pengambilan bibit yang memungkinkan penyerbukan terbuka dengan tipe atau kultivar kelapa lainnya. Populasi kelapa GMJ, GKJ, GHJ, dan GCJ yang dikoleksi oleh BALITKA masih memiliki kemiripan genetik yang tinggi dengan populasi kelapa Genjah Jombang yang langsung berasal dari Jombang.

DAFTAR PUSTAKA

- Furnier, G.R. and Z. Liu. 1993. Comparison of alloenzyme, RFLP, and RAPD markers for assessing genetic variation. *Am.J.Bot.*80(suppl):46-47.
- 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. p. 37-40. *In Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series. November 1, 1992. Minneapolis, Minnesota.*
- Lengkong, E.F., A. Hartana, dan Suharsono. 1998. Keragaman genetika beberapa kultivar kelapa berdasarkan penanda RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). hal. 1-12. *Dalam N. Sugiri, W.G. Piliang, M.P. Tampubolon, A. Hartana, L.I. Sudirman, K.G. Wiryawan, dan A. Gunawan (Ed). Prosiding Seminar Sehari Hasil-hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat. 3 September 1998. PAU Ilmu Hayat IPB. Bogor*
- Mullis, K.B. 1990. The unusual origin the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.* p. 56-65.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 76:5269-5273.
- Rao, V.R., K.W. Riley, J.M.M. Engels, F. Engelmann, and M. Diekmann. 1996. Towards a coconut conservation strategy. p.4-20. *In V.R. Rao and P.A. Batugal (Eds). Proceedings of The COGENT Regional Coconut Genebank Planning Workshop. February 26-28, 1998. Pekanbaru, Riau, Indonesia.*
- Rognon, F. 1976. Floral biology of coconut duration and sequence of male and female phase in various types of coconut. *Oleagineux* 31:13-17.
- Saefudin dan E. Wardiana. 1994. Penampilan dan keragaman fenotipik empat tipe kelapa Genjah Jombang. Sub Balai Penelitian Kelapa Pakuwon. Laporan Kerja BALITKA, KP Pakuwon, Sukabumi. 20 hal.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory. CSH. New York.*
- Sangare, A., F. Rognon, and M. de Nuce de Lamothe. 1978. Male and female phases in the inflorescence of the coconut. *Oleagineux.* 30(12) : 609-617.
- Thampan, P.K. 1981. *Handbook on Coconut Palm. Oxford and IBH Publ. Co. Calcutta.* 311 p.