

## Seleksi Primer RAPD dan Studi Kekerbatan *Capsicum sp.* Koleksi dari Sumatera Barat

### *RAPD Primers Selection and Genetic Relationship Study of Capsicum sp Collected from West Sumatera*

Jamsari, Darusalam, R. Syahlana, M., Syaputra, R., Darnetty, dan Putri, N.E.  
*Jurusan BDP Fakultas Pertanian Ulland  
Kampus Unand-Limau Manis 25163 Padang  
ajamsari@yahoo.com*

#### ABSTRACT

Primers selection is an important step for RAPD analysis. For that reason 22 RAPD primers were selected to amplify 8-pooled genomic DNA through Bulk Segregant Analysis (BSA). All the tested primers could produce at least one or more PCR fragments. Three of them namely OPW-01, OPE-14 and OPE-18 could produce three or more clear fragments indicating their power for DNA fingerprinting. Cluster analysis using NTSYS software package had successfully classified 95 *Capsicum sp.* genotypes into three main classes. The first class contained exclusively with MS collection. The second and the third class covered two and three independent sub classes, which could be clearly separated between RL and RS collections. However some genotypes from MS collection still existed in the second and the third main class, indicating their character similarity with genotypes originated from different location.

*Keyword: RAPD, cluster analysis, Capsicum sp, CTAB, bulked segregant analysis*

#### PENDAHULUAN

Sumatera Barat merupakan salah satu propinsi dengan produksi cabai (*Capsicum annum L.*) yang besar secara nasional. Cabai merupakan salah satu komoditi prioritas Propinsi Sumatera Barat dalam pengembangan kebijakan penelitian dan pengembangan pertanian lima tahun mendatang (2005-2009). Namun demikian stabilitas produksi tanaman tersebut masih diadapkan pada kendala serangan jamur *Colletotrichum sp.* yang merupakan patogen utama penyebab penyakit antraknosa pada pertanaman cabai.

Dalam rangka studi untuk memahami secara lebih mendalam interaksi antara inang-patogen maka perlu dilakukan identifikasi secara detail tentang potensi genetik masing-masing komponen (inang dan patogen) sehingga jenis mekanisme interaksi yang terjadi antara kedua komponen tersebut dapat ditelusuri dengan lebih

baik. Kegiatan studi interaksi inang (tanaman cabai) dan patogen (jamur *Colletotrichum sp*) merupakan bagian dari upaya jangka panjang dalam rangka pengembangan genotipe-genotipe resisten terhadap serangan patogen *Colletotrichum sp.* Untuk itu telah dilakukan kegiatan pengkoleksian genotipe-genotipe cabai dari beberapa sentra produksi cabai di Sumatera Barat.

Untuk mendapatkan informasi identitas penting genotipe-genotipe koleksi, maka perlu dilakukan karakterisasi baik secara morfologi maupun secara molekuler. RAPD sebagai salah satu sistem *fingerprinting* DNA sejak diperkenalkan oleh Botstein *et al* (1980) telah menjadi suatu sistem penanda yang populer dan telah diaplikasikan untuk berbagai kepentingan seperti analisis autentifikasi, analisis kekerabatan, bahkan juga untuk penyusunan peta genetik. Salah satu sebab cepatnya popularitas tersebut adalah aplikasinya yang relatif mudah dan murah. Dalam

kaitan tersebut, langkah awal yang harus dilakukan adalah pemilihan primer-primer yang dapat menghasilkan polimorfisme pada spesies target.

Studi ini ditujukan untuk menyeleksi primer RAPD yang dapat digunakan dalam *fillger printing* kekerabatan antara genotipe *Capsicum sp* hasil koleksi dan sekaligus menggunakannya untuk mendeskripsikan kekerabatan mereka. Untuk tujuan tersebut maka selain dilakukan karakterisasi secara morfologi juga digunakan karakterisasi molekuler dengan sistem "*RAPD-based DNA-fingerprinting*" yang berbasis kepada informasi struktur dasar material genetik (DNA) organisme. Informasi yang diperoleh diharapkan dapat digunakan untuk mendokumentasikan identitas masing-masing genotipe koleksi sehingga dapat digunakan baik untuk kepentingan studi perakitan varietas maupun studi interaksi inang-patogen (*plant-microbe interaction*).

## METODE PENELITIAN

Material genotipe-genotipe cabai sebanyak 95 aksesori didapatkan dari sentra-sentra produksi cabai di Sumatera Barat dan dikoleksi

secara *purposive sampling*. Koleksi diperoleh dari lokasi-lokasi yang mewakili i) daerah dataran tinggi yakni Kab. Solak, Kab. Agarn, Kab. Tanah Datar (MS); ii) dataran rendah: Kota Padang, Pasaman Barat, dan Padang Pariaman (RS). Selain itu koleksi juga dilengkapi dengan material yang berasal dari dataran tinggi Lembang (RL). Kegiatan koleksi dilakukan pada tahun 2006.

Sebanyak 13 karakter morfologis digunakan sebagai penciri masing-masing genotipe koleksi (Tabell). Karakterisasi secara morfologis dilakukan dengan menggunakan standar skoring yang disarankan oleh IBPGR (*International Board for Plant Genetic Resources*) (1983) dan AVRDC (*Asean Vegetable Research Development Center*) (2002).

Isolasi DNA untuk analisis molekuler dilakukan dengan menggunakan protokol isolasi berbasis CTAB yang dikembangkan oleh Saghai-Marouf *et al.* (1984) dengan melakukan beberapa modifikasi. Isolasi dilakukan dalam skala miniprep *tminipreparationi* terhadap 50 genotipe terpilih (Tabel 2) dan dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang.

Tabel 1. Karakter dan skoring yang digunakan untuk karakterisasi morfologis genotipe hasil koleksi. Skoring didasarkan atas kriteria IBPGR dan AVRDC

| No  | Karakter                      | Nilai Skoring  |
|-----|-------------------------------|--|
| 1.  | Tipe tumbuh                   | Menyeber (3), kompak (5), tegak (7)  |
| 2.  | Bulu pada daun                | Tak berbulu (0), Berbulu jarang (3), Berbulu cukup banyak (5), berbulu lebat (7)                             |
| 3.  | Tinggi tanaman                | <50 (3), 50-100 (5), >100 (7)  |
| 4.  | Jumlah Bunga per buku         | 1 (1), 2 (2), 3 (3), >3 (7)  |
| 5.  | Posisi tangkai bunga.         | Merunduk (3), Sedang (5), Tegak (7)  |
| 6.  | Sudut. bunga & tangkai bunga. | 0° (3), 45° (5), 90° (7), >90° (9)   |
| 7.  | Warna buah muda               | Hijau (1), Kuning (2), Oranye (3), Merah (4), Ungu (5), Coklat (6), Hitam (7)                                |
| 8.  | Warna buah matang             | Hijau (1), Kuning (2), Oranye (3), Merah oranye (4), Merah Ungu (5), Coklat Hitam (6), Coklat (7), Hitam (8) |
| 9.  | Bentuk buah                   | Membujur (1), Lonjong (2), Bulat (3), Kerucut (4), Tudek beraturan (5), Kotek lonceng (6)                    |
| 10. | Puncak buah                   | Puncak Meruncing (1), Tidak berpuncak (3), Puncak rata (5), Puncak agak berteluk (7), Puncak Berlekuk (9)    |
| 11. | Bentuk ujung buah             | Runcing (3), Tumpul (5), Berlekuk (7), Bergelombang (9)  |
| 12. | Permukaan Kulit Buah          | Mengkilap (3), Tudek (5), Kusam (7)  |
| 13. | Bentuk Daun                   | Lebar (3), Sedang (5), Sempit runcing (1)  |

Tabel 2. Daftar genotipe tanaman cabai koleksi yang digunakan untuk analisis RAPD

| Nc | Kode Genotipe | Spesies              | No. | Kode Genotipe | Spesies              | No. | Kode Genotipe | Spesies         |
|----|---------------|----------------------|-----|---------------|----------------------|-----|---------------|-----------------|
| 01 | MS-01         | <i>Capsicum spp.</i> | 18  | MS-18         | <i>C. annum</i>      | 34  | RL-06         | <i>C. annum</i> |
| 02 | MS-02         | <i>C. annum</i>      | 19  | MS-19         | <i>C. ehinense</i>   | 35  | RL-07         | <i>C. wnum</i>  |
| 03 | MS-03         | <i>C. frutescens</i> | 20  | MS-20         | <i>C. chimnse</i>    | 36  | RL-08         | <i>C. annum</i> |
| 04 | MS-04         | <i>C. annum</i>      | 21  | MS-21         | <i>C. baccaium</i>   | 37  | RL-11         | <i>C. annum</i> |
| 05 | MS-05         | <i>C. frutescens</i> | 22  | MS-22         | <i>C. frutescens</i> | 38  | RL-12         | <i>C. annum</i> |
| 06 | MS-06         | <i>C. frutescers</i> | 23  | MS-23         | <i>C. annum</i>      | 39  | RL-13         | <i>C. anmon</i> |
| 07 | MS-07         | <i>C. frutescens</i> | 24  | MS-24         | <i>C. annum</i>      | 40  | RL-15         | <i>C. anmon</i> |
| 08 | MS-08         | <i>C. annum</i>      | 25  | MS-25         | <i>C. fruiescens</i> | 41  | RL-16         | <i>C. annum</i> |
| 09 | MS-09         | <i>C. frutescens</i> | 26  | MS-26         | <i>C. frutescens</i> | 42  | RL-18         | <i>C. annum</i> |
| 10 | MS-10         | <i>C. jrutescens</i> | 27  | MS-27         | <i>C. ftutescens</i> | 43  | RL-20         | <i>C. annum</i> |
| 11 | MS-11         | <i>C. frutescens</i> | 28  | MS-28         | <i>C. annum</i>      | 44  | RL-23         | <i>C. annum</i> |
| 12 | MS-12         | <i>C. annum</i>      | 29  | MS-29         | <i>C. annum</i>      | 45  | EL-24         | <i>C. annum</i> |
| 13 | MS-13         | <i>C. annum</i>      | 30  | MS-30         | <i>C. annum</i>      | 46  | RL-27         | <i>C. anmon</i> |
| 14 | MS-14         | <i>C. annum</i>      | 31  | MS-31         | <i>Capsicum spp</i>  | 47  | RL-28         | <i>C. annum</i> |
| 15 | MS-15         | <i>C. frutescens</i> | 32  | MS-32         | <i>C. chinense</i>   | 48  | RL-29         | <i>C. annum</i> |
| 16 | MS-16         | <i>C. annum</i>      | 33  | RL-02         | <i>C. annum</i>      | 49  | RL-30         | <i>C. annum</i> |
| 17 | MS-17         | <i>C. annum</i>      | 34  | RL-06         | <i>C. annum</i>      | 50  | RL-32         | <i>C. annum</i> |

Secara ringkas isolasi dilakukan sebagai berikut. Sebanyak 1 g sampel digerus sampai halus. Hasil gerusan ditambahkan 1 mL Buffer ekstraksi yang terdiri dari campuran 2% CTAB yang telah diberi 1%  $\beta$ -mercaptoethanol-hangat. Campuran divortex agar merata, lalu diinkubasi dan dicampur dengan Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) sebanyak 500  $\mu$ l. sampai merata dengan cara inversi. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 menit. Supernatant ditransfer ke dalam tabung eppendorf steril lainnya dan dipresipitasi dengan isopropanol. Pellet dicuci menggunakan buffer pencuci I (10 mM  $\beta$ -acetate, 76% (Ethanol) dan selanjutnya buffer pencuci II (200 mM Ammonium Acetate, 76% Ethanol). Pellet dikeringkan, kemudian diencerkan kembali menggunakan buffer TE. Larutan DNA dianalisis dengan elektroforesis menggunakan agarose 0,75% untuk mengetahui konsentrasi DNA yang diperoleh. Visualisasi dilakukan dengan menggunakan UV trans illuminator (Biometra-Jerman) yang diintegrasikan dengan sistem kamera iCybertech-Jerman) serta dihubungkan dengan sistem PC. Data dokumentasi disimpan dalam data digital dengan format jpeg.

Analisis PCR diawali dengan seleksi primer RAPD yang akan dipergunakan untuk

melihat keragaman genetik. Untuk mempercepat seleksi primer maka dilakukan strategi *bulk-segregant analysis* (BSA). Dalam hal ini DNA dari 5 buah genotipe tanaman cabai dicampurkan dengan konsentrasi sebanding. Sebanyak 22 primer telah dicobakan untuk melihat peluang ditemukannya polimorfisme antara genotipe-genotipe yang diuji pada setiap primer yang dicobakan. Daftar ke 22 primer yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3. PCR dilaksanakan dengan menggunakan kit *Ready to Go PCR Kit* (RTG-PCR Kit) (LG-USA) sesuai dengan petunjuk produsen. Prosedur yang sama juga diterapkan pada analisis terhadap individu genotipe-genotipe yang diuji. Volume reaksi yang digunakan berjumlah 15  $\mu$ l, yang terdiri dari 3  $\mu$ l DNA template (25 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), 3  $\mu$ l primer (20 pmol/ $\mu$ l) dan 9  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Proses PCR dilaksanakan dengan menggunakan mesin PCR-TC312 (Techne-UK) dengan program yang terdiri dari 2 loop. Loop pertama dengan 1 siklus terdiri dari denaturasi (94°C) selama 60 detik, annealing (42°C) 5 menit dan ekstensi (72 °C) selama 2 menit. Loop kedua dengan 40 siklus terdiri dari Denaturasi (94°C) selama 30 detik, annealing (42 °C) selama 30 detik dan ekstensi (72 °C) selama 1 menit. Ekstensi tambahan dilakukan selama 6 menit. Produk PCR selanjutnya dielektroforesis

menggunakan agarose berkonsentrasi 1,5% yang dirunning menggunakan Buffer 0,1 TAE setelah sebelumnya ditambahkan 1,5 ul, loading buffer 10xBPB (*Bromophenol Blue*).

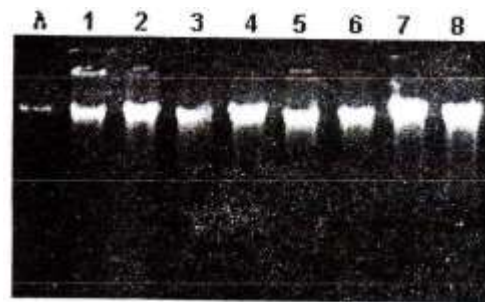
Data karakter morfologi berupa skor sesuai dengan klasifikasi yang disarankan oleh IBPGR dan AVRDC digunakan sebagai data *envy* untuk matriks data program perangkat lunak NTSYS (Rohlf, 1989). Hal yang sama juga dilakukan dengan data analisis molekuler, dimana setiap fragmen dengan ukuran tertentu merupakan perwakilan dari satu karakter penotif marker. Ukuran dan posisi fragmen distandarisasi menggunakan marker 1 kb ladder (Amersham-USA). Fragmen yang hadir pada posisi tertentu diberi skor "1", sedangkan untuk fragmen yang tidak ada diberi skor "0". Untuk genotipe yang tidak diikuti dalam analisis RAPD datanya dianggap *missing* dan diberi kode "2". Koefisien kekerabatan dihitung menggunakan metode UPGMA (*Unweighted pair group method arithmetic average*) sebagai *setting default* dari program NTSYS. Hasil pengolahan program NTSYS disajikan dalam bentuk diagram pohon, berupa dendrogram yang mencerminkan tingkat kekerabatan antara masing-masing genotipe.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi DNA

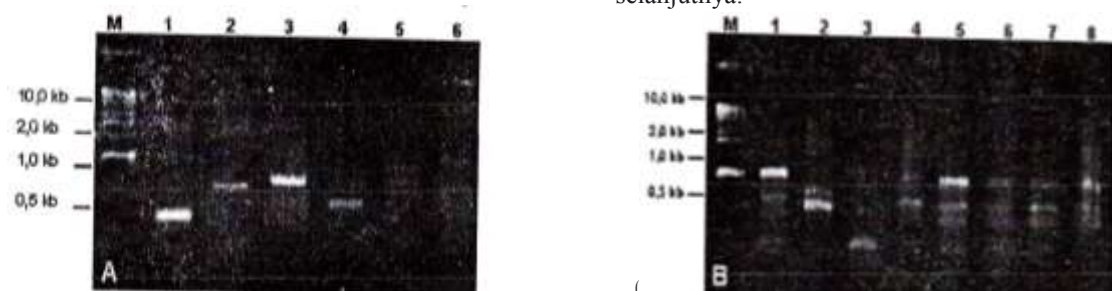
Gambar 1 memperlihatkan hasil isolasi DNA yang dilakukan dengan prosedur Saghai-Marouf *et al.* (1984). Rata-rata konsentrasi DNA total yang dihasilkan dari 1 g daun segar sebanyak

7,5 ug dengan kualitas baik. Jumlah ini dianggap sangat mencukupi sebagai material untuk kegiatan analisis kekerabatan berbasis PCR yang akan dilakukan selanjutnya. Bahkan DNA sebanyak 7,5 ug juga masih mencukupi untuk analisis DNA berbasis hibridisasi seperti RFLP yang membutuhkan jumlah material rata-rata di atas 1 ug (Botstein *et al.*, 1980; Jiang, *et al.*, 1997; Jamsari, 2003)



Gambar 1. DNA tanaman cabai yang diisolasi dengan menggunakan prosedur CTAB yang dimodifikasi

Gambar 1, juga menunjukkan bahwa kualitas DNA yang diperoleh cukup baik yang ditandai dengan sedikitnya fragmen-fragmen *smear* yang hadir di bawah fragmen utama. Fragmen-fragmen *smear* tersebut merupakan kumpulan potongan-potongan DNA pendek yang terbentuk pada saat proses isolasi. Meskipun pada setiap sampel ditemukan adanya indikasi tanda-tanda DNA *smear*, tetapi proporsi DNA dari fragmen utama masih sangat besar, dengan demikian DNA tersebut tergolong masih baik untuk digunakan pada kegiatan analisis selanjutnya.



Gambar 2. Hasil elektroforesid produk PCR 6 macam primer RAPD dengan menggunakan pool DNA cabai (panel A) dan penampakan produk PCR dari 8 genotipe cabai koleksi yang diamplifikasi dengan primer OPE-14 (panel B). Panel A; M= 1 kb ladder, 1=OPC-02, 2 = OPE-08, 3=OPA-09, 4=OPC-08, 5=OPE-18, 6=OPE-14. Panel B; M = 1 kb-ladder, 1 = MS-OI, 2 = MS-13, 3 = MS-25, 4 = RL-27, 5 = RL-28, 6 = RL-29, 7 = RL-30, 8 = RL-32.

Tabel 3. Ringkasan primer yang digunakan untuk seleksi serta karakteristik produk peR yang diperoleh. Jumlah fragmen teramati adalah fragmen yang hanya dapat diskoring

| No  | Nama Primer r | Sekuens<br>5'----3' | Jumlah fragmen<br>teramati | Keterangan             |
|-----|---------------|---------------------|----------------------------|------------------------|
| 1   | OPC-02        | GTGAGGCGTC          | 2                          | Satu jelas, satu halus |
| 2   | OPE-OS        | TCA CCA CGGT        | 1                          | Jelas                  |
| 3   | OPA-09        | GGGTAACGC C         | 3                          | Satu jelas, dua halus  |
| 4   | OPC-08        | TGGACC GGTG         | 1                          | Jelas                  |
| 5   | OPE-18        | GGA CTG CAGA        | 5                          | Tige je las, dua halus |
| 6.  | OPE-14        | TGC GGC TGA G       | 4                          | Empat jelas            |
| 7   | OPW-OI        | GGT GAGGTCA         | 5                          | Tiga je les, dua helus |
| 8   | OPW-02        | CAT CGC CGC A       | 2                          | Keduanyajelas          |
| 9   | OPN-06        | GAGACGCACA          | 2                          | Keduanyajelas          |
| 10. | OPN-14        | TCGTGC GGGT         | 1                          | lelas                  |
| 11. | OPY-IO        | TCG CAT CCCT        | 4                          | Satu jelas, tiga halus |
| 12. | OPY-08        | AGGCAGAGCA          | 5                          | Due je las, tiga halus |
| 13  | OPY-13        | CAC AGCGACA         | 2                          | Satu jelas, satu halus |
| 14. | OPY-16        | GGGCCAATGT          | 2                          | Satu jelas, satu halus |
| 15. | OPW-04        | CAGAAGCGGA          | 4                          | Satu jelas, tiga halus |
| 16. | OPW-14        | GGT CGATCT G        | 1                          | Satujelas              |
| 17  | OPW-03        | GTC CGGAGTG         | 2                          | Dua jelas              |
| 18. | OPN-18        | CTCAGT GTC C        | 1                          | Agak smear             |
| 19. | OPW-19        | CAAAGC GCT C        | 2                          | Satu jelas, satu halus |
| 20. | OPN-15        | CAGCGA CTGT         | 3                          | Satu jelas, dua halus  |
| 21. | OPA-02        | TGC CGA GCT G       | 1                          | Satu jelas             |
| 22. | OPA-13        | CAGCACCCAC          | 3                          | Satu jelas, dua helus  |

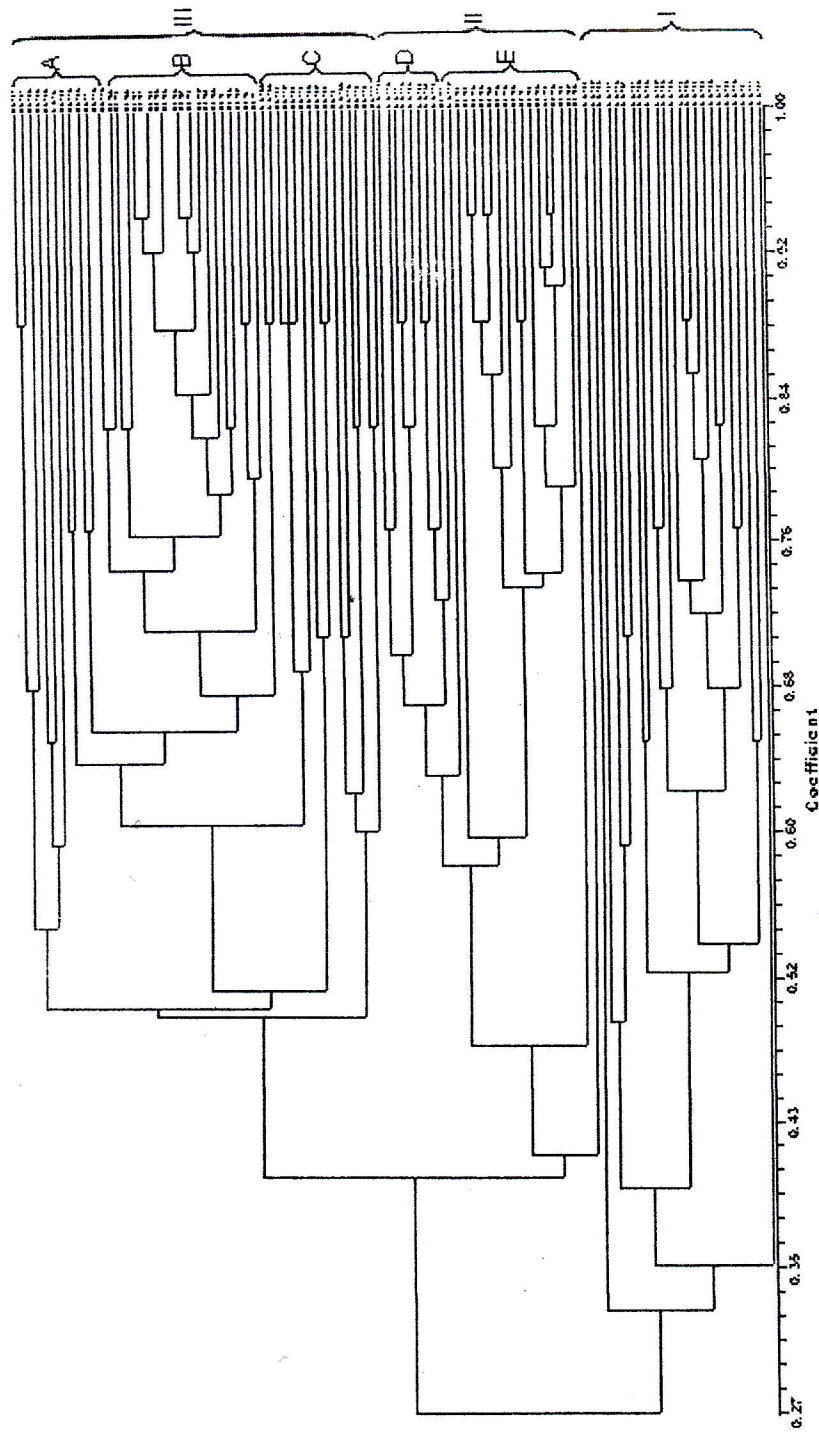
Hasil analisis restriksi memperlihatkan, bahwa keseluruhan DNA yang digunakan sebagai sarnpel dapat dipotong secara sempurna (data tidak ditunjukkan). Hasil ini mengindikasikan, bahwa DNA yang diperoleh memiliki kualitas yang baik. Dengan demikian, pada DNA yang diperoleh dari hasil isolasi ini proporsi kontarninan seperti protein, ethanol beserta turunannya, serta senyawa-senyawa lainnya tidak jtit~mukan dalam jumlah yang kritis yang dapat raenghalangi aktifitas enzim dalam proses amplifikasi nantinya. Dengan demikian secara keseluruhan metode Sanghai-Marroof, *et al* (1984) merupakan satu protokol isolasi yang sesuai dalam isolasi DNA dari tanaman cabai. Aplikasi metode Sanghai-Marroof *et al.*, (1984) untuk isolasi DNA telah terbukti memiliki apliksi yang luas, meskipun awalnya metode untuk isolasi DNA jamur, akan tetapi prinsip protokol yang dikembangkan dapat untuk tanaman asparagus (Reamon-Burtner and Jung, 2000; Jamsari, 2003), dan tanaman bitgula (*Beta vulgaris*) (El-Mezawy *et al.*.2002), bahkan metoda tersebut juga dapat

digunakan untuk mengisolasi DNA dari spesies dengan kandungan senyawa fenolik tinggi seperti *Uncaria gambir* dan jamur berfilamen seperti *Colletotrichum sp* (Jamsari, data tidak dipublikasi).

#### *Bulked Segregant Analysis* (BSA) dan Seleksi Primer

Sebanyak 22 primer telah diseleksi dalam penelitian ini untuk melihat potensi polimorfisme yang dapat mereka hasilkan (Gambar 2 dan Tabel 3). Dari 22 primer RAPD yang digunakan masing-masing menghasilkan jumlah fragmen yang berbeda-beda dengan kisaran dari 1 sampai 5 [ragmen. Jumlah fragmen tersebut tergolong sedikit jika dibandingkan dengan fragmen yang dihasilkan oleh Adetula (2006) dengan kisaran antara 7 sampai 14 fragmen pada spesies yang sama (*Capsicum sp.*), sementara Rajput *et al.* 2006 mendapatkan jumlah fragmen antara 8 sampai 12 fragmen pada tanaman tomato Namun, peneliti lain yang juga menggunakan spesies *Capsicum sp.* hanya mendapatkan rata-rata 5 fragmen per primer (Rodriguez, *et al.*, 1999).

Jamsari, Darusalam, R. Syahlana, M., Syaputra, R., Darnetty, dan Putri, N.E. : Seleksi primer RAPD



Gambar 3. Dendrogram kekerabatan genotipe cabai koleksi yang berasal dari sentra produksi cabai Sumatera Barat dan Balitisa Lembang. Tingkat kekerabatan ditentukan menggunakan metode

Di samping perbedaan jumlah fragmen yang dihasilkan, kualitas fragmen yang dinilai dari taraf intensitas dan tunggal tidaknya fragmen yang dihasilkan juga bervariasi. Ada fragmen yang memiliki intensitas lebih besar dan ada pula intensitas yang kurang jelas. Jelas tidaknya fragmen yang dihasilkan menunjukkan perbedaan konsentrasi fragmen yang diperoleh. Namun demikian, beberapa fragmen yang sangat terlihat bisa saja diakibatkan oleh adanya fragmen yang berbeda, yang secara kebetulan memiliki ukuran fragmen yang sama panjang. Di samping intensitas fragmen yang berbeda, ada pula beberapa primer yang menghasilkan produk yang *smear*. Produk yang *smear* diakibatkan oleh adanya penumpukan beberapa fragmen berbeda ukuran tetapi tidak terlalu besar sehingga saling tumpang tindih secara kontinyu. Dengan demikian sulit dibedakan perbedaan ukuran masing-masing fragmen. Dalam kondisi demikian, sebaiknya primer tersebut tidak digunakan lebih lanjut untuk analisis *fingerprinting*.

Jumlah siklus PCR sebanyak 45 siklus yang digunakan pada penelitian ini tergolong banyak. Meskipun hal ini dianggap wajar oleh karena dalam sistem RAPD banyak produk dibutuhkan suatu fragmen dapat diidentifikasi dengan jelas. Disisi lain, komponen senyawa seperti DNA template dan primer yang digunakan juga harus lebih banyak dibandingkan dengan aplikasi PCR untuk keperluan standar. Sebagai perbandingan aplikasi PCR standar dapat menggunakan primer hanya 5 pmol, dengan konsentrasi total DNA 5 ng (Jamsari, 2003). Untuk kondisi PCR yang digunakan pada penelitian ini, total jumlah DNA yang digunakan mencapai 150 ng, sedangkan konsentrasi mencapai 60 pmol.

Di samping faktor di atas, kalau suhu annealing yang digunakan pada fraksi PCR di atas juga cukup tinggi yakni 42°C. Beberapa peneliti yang bekerja dengan teknik RAPD menggunakan suhu annealing pada kisaran sebesar 32°C (Karsinah *et al.*, 2002; Aras *et al.*, 2003; Rajput *et al.*, 2006), 35°C (Adetula, 2006) sampai 36°C (Di Stilio *et al.*, 1998; Zahner *et al.*, 1999) yang lebih sesuai dengan karakteristik primer yang hanya terdiri

atas 10 nukleotid. Dengan demikian, suhu annealing yang digunakan pada aplikasi PCR RAPD pada penelitian ini lebih besar 10°C dari kondisi umumnya. Namun demikian aplikasi RAPD pada beberapa organisme juga menggunakan suhu annealing di atas 40°C yakni 47-55 °C pada Topovirus (Meena *et al.*, 2005). Perbedaan ini bisa jadi disebabkan oleh perbedaan sensitifitas jenis mesin PCR yang digunakan.

Berdasarkan data hasil seleksi primer yang diperoleh seperti diringkaskan dalam Tabel 3, maka primer OPE-14 merupakan primer yang paling potensial untuk digunakan dalam kegiatan *fingerprinting* selanjutnya. Disamping jumlah fragmen yang dihasilkan cukup banyak, kualitas masing-masing fragmen juga secara nyata sangat baik, dimana keempat fragmen yang dihasilkan secara nyata dapat diamati dan dibedakan sesamanya dengan mudah sehingga diharapkan dalam skoring akan lebih mudah nantinya. Meskipun ada primer yang menghasilkan jumlah fragmen 5 buah seperti OPE-IS dan OPY -OS, akan tetapi dari masing-masingnya tiga fragmen yang dihasilkan memiliki intensitas lemah atau sulit untuk dibedakan antara satu dengan lainnya, karena posisinya yang saling berdekatan satu sama lain, sehingga dikuatirkan akan menyulitkan dalam skoring nantinya. Oleh karena itu, primer OPE-I4 dipilih digunakan selanjutnya dalam *fingerprinting* menggunakan DNA dari individu tanaman.

Metode BSA cukup efektif dan efisien untuk memilih primer dalam waktu yang relatif singkat (Tabel 3). Dari 22 primer yang diuji diperoleh 3 primer yang menghasilkan fragmen sama atau lebih banyak dari 3 yang dapat diskoring, yakni OPE-I8, OPW -01, OPE-I4. Ditinjau dari jumlah unit percobaan yang dibutuhkan untuk menseleksi primer yang dapat menghasilkan fragmen polimorfisme jika tanpa BSA, maka akan dibutuhkan paling tidak  $22 \times 5 = 110$  satuan unit percobaan, sedangkan jika dengan BSA, maka hanya akan dibutuhkan 22 satuan unit percobaan saja. Dengan demikian bukan hanya biaya yang dapat direduksi akan tetapi waktu yang dibutuhkan juga akan lebih cepat.

Efektifitas metode BSA dalam kegiatan seleksi primer telah diinformasikan oleh banyak peneliti. Reamon-Buttner *et al.* (1998) menggunakan BSA untuk menyeleksi kombinasi primer AFLP dalam studi pemetaan gen pengendali kelamin pada tanaman asparagus, sementara EI-Mezawy *et al.* (2002) menggunakan teknik BSA untuk menyeleksi kombinasi primer AFLP dalam pemetaan lokus pengendali gen *B (Bolting)* pada tanaman bit gula (*Beta vulgaris*)

#### Analisis RAPD dan Penentuan Kekerbatan

Gambar 2B dengan jelas memperlihatkan kemampuan primer OPE-14 untuk menghasilkan fragmen setelah digunakan untuk mengamplifikasi 8 individu genotipe koleksi. Jumlah fragmen yang dihasilkan tetap stabil seperti saat digunakan untuk mengamplifikasi pool DNA pada aplikasi BSA. Dengan adanya indikasi stabilitas hasil yang diperoleh tersebut, maka diharapkan data yang diperoleh akan memenuhi kelayakan analisis yang digunakan nantinya. Persoalan konsistensi dan ketidakstabilan produk RAPD sudah sering dilaporkan oleh beberapa peneliti (Meunier and Grimont, 1993; Rajput *et al.*, 2006). Banyak faktor seperti rasio templet DNA dan primer, konsentrasi ion Mg dan Taq-Polymerase yang digunakan dan bahkan jenis mesin PCR yang dipakai (Yu and Paul, 1992). Bahkan Vos *et al.* (1995) dan MacPherson *et al.* (1993) menyatakan, meskipun RAPD tidak sensitif terhadap konsentrasi templet yang digunakan, tetapi apabila templet DNA yang digunakan terlalu banyak juga akan memberikan hasil yang berbeda-beda. Dalam penelitian ini, persoalan tersebut tidak ditemukan. Oleh karena itu, maka data yang diperoleh dari analisis RAPD ini dianggap valid untuk penentuan keragaman genotipe koleksi.

Hasil analisis menggunakan software analisis kluster NTSYS terhadap data karakterisasi morfologi dan molekuler dapat dilihat pada Gambar 3. Secara umum dapat diuraikan, dengan menggunakan koefisien kesamaan 0,5 dendogram yang dihasilkan membagi keseluruhan genotipe kedalam tiga kelompok besar (I, II dan III). Kelompok I seluruhnya tersusun oleh genotipe dengan inisial MS yakni genotipe yang berasal dari dataran rendah Sumatera Barat. Tidak ada satupun Kelompok dengan inisial RL dan RS

masuk dalam kelompok I. Sementara itu, kelompok II dan kelompok III masing-masing terdiri dari 2 dan tiga sub kelompok berturut-turut. Kelompok II terdiri dari sub kelompok D dan E, dimana sub kelompok D disusun oleh genotipe-genotipe dengan inisial MS, sedangkan sub kelompok E hampir seluruhnya berinisial RL. Hanya satu genotipe MS (MS-19) yang masuk kedalam sub kelompok E tersebut. Genotipe RL merupakan genotipe yang berasal dari dataran tinggi Lembang, dan merupakan koleksi genotipe hasil pemuliaan yang sedang dalam pengujian. Kelompok besar lainnya, yakni kelompok III sebagian besar tersusun oleh genotipe dengan inisial RS, lalu disusul dengan genotipe berinisial RL. Sedangkan genotipe inisial MS hanya beberapa saja yang masuk dalam kelompok III tersebut. Namun demikian, meskipun kelompok III terdiri dari campuran antara RS dan RL akan tetapi pada setiap sub kelompoknya juga masih terlihat adanya pengelompokan yang jelas antara RS pada sub kelompok A dan C dan RL pada sub kelompok B. Adanya genotipe inisial MS (MS-19, MS-34, MS-35, dan MS-36) yang masih mengelompok pada kelompok besar yang lain (II dan III) dan juga masing-masing sub kelompok mengindikasikan adanya kesamaan karakter morfologi /molekuler) genotipe-genotipe tersebut dengan genotipe sub kelompoknya. Pertanyaan yang muncul adalah, apakah keempat genotipe MS tersebut sebenarnya berasal dari dataran tinggi dan telah beradaptasi di dataran rendah? Belum dapat dijawab dengan pasti dari penelitian ini. Untuk menjawabnya perlu dilakukan analisis molekuler yang lebih mendetail.

Hasil yang diperoleh tersebut memperlihatkan kelayakan sistem penanda RAPD dalam analisis kekerabatan tanaman cabai. Disamping penelitian ini, beberapa peneliti lain juga telah melaporkan penggunaan sistem *fingerprinting* RAPD untuk analisis kekerabatan pada spesies *Capsicum sp.* seperti Adetula (2006), dan Rodriguez *et al.* (1999). Di samping untuk spesies *Capsicum sp.*, penggunaan RAPD dalam penentuan kekerabatan juga telah banyak digunakan untuk spesies lainnya seperti tanaman obat (Joshi *et al.*, 2004), *Piper belle* (Verma *et al.*, 2004), *Silene dioica* (Di Stilio *et*



al., 1998), bahkan juga bakteri *Brevibacillus* (Zahner *et al.*, 1999) dan serangga Orthoptera: Acrididae (*Rhammatocerus: schistocercoides*) (da Silva *et al.*, 2002).

## KESIMPULAN

Metode isolasi berbasis CTAB dari Sanghai-Maroo *et al.* (1984) dapat digunakan baik untuk mengisolasi DNA tanaman cabai.

Primer-primer RAPD yang dapat digunakan untuk analisis kekerabatan spesies *sp.* dari hasil penelitian ini adalah: 18, OPW-OI dan OPE-14.

Analisis kekerabatan menggunakan program NTSYSs memperlihatkan kemampuan RAPD untuk digunakan dalam menggambarkan kekerabatan genotipe-genotipe spesies *Capsicum* sp koleksi dari Sumatera Barat.

Untuk meningkatkan akurasi pengelompokan dalam penyusunan kekerabatan antara genotype maka perlu digunakan primer lebih banyak. Untuk itu apabila dibutuhkan perlu dilakukan seleksi primer RAPD lainnya.

## SANWACANA

Terimakasih yang sebesar-besarnya diucapkan kepada Dirjen Dikti yang telah membiayai penelitian ini melalui skim Hibah Kompetitif Fundamental Tahun Anggaran 2006.

## DAFTAR PUSTAKA

- Acetula O.A. 2006. Genetic diversity of *Capsicum* using Random Amplified Polymorphic DNAs. African Journal of Biotechnology 5: 120-122.
- Aras, S., A. Duran and G. Yenilmez. 2003. Isolation of DNA for RAPD Analysis From Dry Leaf Material of Some *Hesperis* L. Specimens. Plant Molecular Biology Reporter 21: 461 a-461 f.
- AVRDC 1992 Progress Report (Tainan, Taiwan: AVRDC,1993).
- Burstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davies, R. W. 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet 32: 314-331.
- Qa Silva, J.B.T, M. S. Tigano, B. P. Magalhaes. and C. M. T. Cordeiro. 2002. Polymorphism of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* populations revealed by RAPD. Pesq. Agropec. Bras., Brasilia, 37: 1669-1673.
- Di Stilio, V.S., R.Y. Kesseli and D. L. Mulcahy. 1998. A Pseudoautosomal Random Amplified Polymorphic DNA Marker for the Sex Chromosomes of *Silene dioica*. Genetics 149: 2057-2062.
- EI-Mezawy, A., F. Dreyer, G. Jacobs, and C. Jung, 2002. High-resolution mapping of the bolting gene *B* of sugar beet. Theor Appl Genet 105: 100-105.
- IBPGR, 1983. Genetic Resources of *Capsicum*. International Board for Plant Genetic Resources Secretariat, Rome, Italy
- Jamsari. 2003. Construction of high-density genetic and physical maps around the sex gene *M* of *Asparagus officinalis* L. Schriftenreihe des Institut der Pflanzenbau und Zilchtung Christian Albrechts Universitat zu Kiel. 33: 1-170.
- Jiang, C., M.E. Lewis, and K.C. Sink. 1997. Combined RAPD and RFLP molecular linkagemap of asparagus. Genome 40: 69-76.
- Joshi, K., P. Chavan, D. Warude and B. Patwardhan. 2004. Molecular markers in herbal drug technology. Current Science, 87: 159-165.
- Karsinah, Sudarsono, L. Setyobudi, dan H. Aswidinnoor. 2002. Keragaman genetik plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. Jurnal Bioteknologi Pertanian, 7: 8-16
- MacPherson, J.M., P.E. Eckstein, G.J. Scoles, and A.A. Gajadhar. 1993. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. Mol Cell Probes 7: 293-299 .
- Meena, R.L., T. Ramasubramanian, S. Venkatesan and S. Mohankumar. 2005. Molecular characterization of tospovirus

- transmitting thrips populations from India. *Am. J. Biochem. & Biotech.* 3:168-173.
- Meunier JR, and P.A. Grimont. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144:373-379.
- Rajput, S.G., K.J., Wable, K.M., Sharma, p.o., Kubde and S.A. Mulay. 2006. Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in Tomato. *African Journal of Biotechnology* 5: 108-112.
- Reamon-Buttner, S. M., Jung, C. 2000. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Them Appl Genet* 100: 432-438.
- Reamon-Biittner, S. M., J. Shcondelmaier, and C, Jung. 1998. AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. *Molecular Breeding* 4: 91-98.
- Rodriguez, J.M., T. Berke, L. Engle, and J. Nienhuis. 1999. Variation among and within Capsicum species revealed by RAPD markers. *Theor Appl Genet* ,99: 147-156.
- Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80. Exeter Software, Setauket, NY.
- Saghai-Marooif, M.A, K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 8014-8018
- Verma, A., N. Kumar and S. A. Ranade. 2004. Genetic diversity amongst landraces of a dioecious vegetatively propagated plant, betelvine (*Piper belle* L.). *J Biosci.* 29: 319-328.
- Vos P, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Homes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Yu, K., K.P. Pauls. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl. Acids Res.* 20: 2606.
- Zahner, V., L. Rabinovitch, P. Suffys, and H. Momen. 1999. Genotypic Diversity among *Brevibacillus laterosporus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5182-5185.