

Analisis keragaman tanaman durian sukun (*Durio zibethinus*) berdasarkan penanda RAPD

ISMI PUJI RUWAIDA¹, ENDANG YUNIASTUTI², SUPRIYADI²♥

Ruwaida IP, Yuniastuti E, Supriyadi. 2009. Variability analysis of Sukun durian plant (Durio zibethinus) based on RAPD marker.

The purpose of the study is to assess the diversity of the durian varieties of Sukun, Sunan, Kani, Monthong, and Petruk; and Sukun durian variety grown in different regions based on RAPD markers. Materials research is durian leaves of Sukun, Sunan, Kani, Monthong and Petruk from Ranukutri Garden Seeds, Karanganyar, and also Sukun durian leaf from Gempolan Karanganyar, Jepara and Salatiga. Then performed DNA analysis on samples of leaves that began the isolation of DNA, test of DNA quantity and quality, primer selection, and amplification with PCR. Visualization of PCR performed by electrophoresis using EtBr that generate DNA bands. DNA bands were then analyzed with NTSYS program to get durian diversity among varieties of durian and between Sukun durian at different planting areas. Six RAPD polymorphic primer was used, namely OPA-01, OPA-02, OPA-07, OPA-16, OPA-18, and OPA-19. Banding pattern of DNA amplification show the existence of diversity among varieties of Sukun durian, Sunan, Kani, Monthong and Petruk and show the diversity of Sukun durian grown in different areas. Dendrogram indicated that five durian varieties tend to segregate, whereas Sukun, Sunan, Monthong and Petruk in one group, which split with Kani. Dendrogram also indicated that Sukun planted in different regions resulted in two groups, Sukun from Gempolan Karanganyar and Salatiga in one group, while the second group consisted of Sukun from Ranukutri seed garden Karanganyar and Jepara.

♥ Alamat korespondensi:

- ¹ Program Studi Agronomi, Program Pascasarjana, Universitas Sebelas Maret, Surakarta 57126, Jawa Tengah, Indonesia.
- ² Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta 57126, Jawa Tengah, Indonesia.

Manuskrip diterima: 22 Januari 2009.
Revisi disetujui: 19 Maret 2009.

♥♥

Edisi bahasa Indonesia dari:
Ruwaida IP, Yuniastuti E, Supriyadi. 2009. Variability analysis of Sukun durian plant (*Durio zibethinus*) based on RAPD marker. *Bioteknologi* 6: 89-98

Key words: variation, DNA, *Durio zibethinus*, RAPD

Ruwaida IP, Yuniastuti E, Supriyadi. 2009. Analisis keragaman tanaman durian sukun (Durio zibethinus) berdasarkan penanda RAPD.

Tujuan penelitian adalah mengkaji keragaman durian varietas sukun, sunan, kani, monthong, dan petruk serta keragaman durian sukun yang ditanam pada wilayah yang berbeda berdasarkan penanda RAPD. Bahan penelitian berupa daun tanaman durian varietas sukun, sunan, kani, monthong dan petruk dari Kebun Benih Ranukutri Karanganyar; serta durian varietas sukun dari Gempolan Karanganyar, Jepara dan Salatiga. Selanjutnya dilakukan analisis DNA terhadap sampel daun yang diawali dengan isolasi DNA, uji kuantitas dan kualitas DNA, seleksi primer, dan amplifikasi dengan PCR. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan EtBr yang menghasilkan pita DNA. Pita DNA selanjutnya dianalisis dengan program NTSYS untuk mendapatkan keragaman durian antar varietas dan antar durian sukun dari wilayah yang berbeda. Primer yang digunakan adalah 6 primer polimorfik, yaitu OPA-01, OPA-02, OPA-07, OPA-16, OPA-18 dan OPA-19. Pola pita DNA hasil amplifikasi menunjukkan adanya keragaman antar varietas durian sukun, sunan, kani, monthong dan petruk serta menunjukkan keragaman durian sukun yang ditanam di wilayah yang berbeda. Dendrogram pengelompokan menunjukkan lima varietas durian cenderung memisah, yaitu sukun, sunan, monthong dan petruk merupakan satu kelompok yang memisah dengan durian Kani. Dendrogram pengelompokan durian sukun yang ditanam pada wilayah berbeda menghasilkan dua kelompok, yaitu kelompok durian sukun dari Gempolan Karanganyar dan Salatiga serta kelompok lainnya dari Kebun Benih Ranukutri Karanganyar dan Jepara.

Kata kunci: analisis keragaman, DNA, *Durio zibethinus*, RAPD

PENDAHULUAN

Durian (*Durio zibenthinus* Murr.) merupakan buah-buahan tropis yang berasal dari Asia Tenggara. Nama durian diambil dari ciri khas kulit buahnya yang keras dan berlekuk-lekuk

tajam sehingga menyerupai duri. Durian pertama kali ditemukan oleh Murray di hutan Malaya atau Malaysia dan oleh Wallace disebut sebagai "King of the Fruit". Penyebaran durian meluas ke berbagai negara yaitu Indonesia, Thailand, Myanmar, India dan Pakistan. Di

Indonesia durian merupakan komoditas ekspor penting karena permintaannya mengalami peningkatan dari tahun ke tahun (Nafsi 2007).

Durian lokal disukai oleh konsumen dalam negeri karena rasanya manis, sedikit pahit, beraroma sedang hingga kuat, warna kuning menarik, daging tebal dan produktivitas buah tinggi. Sementara itu, konsumen luar negeri lebih menyukai durian yang tidak beraroma, rasa manis, sedikit pahit, daging buah tebal dan warna daging kekuningan (Baswarsiati *et al.* 2007). Uji (2005) menemukan di Indonesia ada 20 jenis durian yang 18 jenis di antaranya berada di Kalimantan. Sebagian besar durian yang dibudidayakan berasal dari spesies *Durio zibethinus* (Sarwono 1995a,b; Sumarsono *et al.* 2002). Menurut Direktorat Bina Perbenihan (1996) beberapa durian lokal yang diakui keunggulannya oleh Menteri Pertanian dan disebarluaskan kepada masyarakat untuk dikembangkan yaitu durian sukun (Jawa Tengah), petruk (Jawa Tengah), sitokong (Betawi), sijapang (Betawi), simas (Bogor), sunan (Jepara), monthong (Thailand), kani (Thailand), sidodol dan sihijau (Kalimantan Selatan). Indonesia memiliki lebih dari 103 varietas durian dan masing-masing dibedakan karakter morfologi (Nafsi 2007), yaitu bentuk daun dan buah, rasa dan aroma buah, dan bentuk biji.

Beberapa penelitian durian yang sudah dilakukan, di antaranya penelitian identifikasi dan keragaman genetik pohon induk durian di Jawa Tengah berdasarkan penanda morfologi dan isozim (Sriyono 2006) yang menunjukkan bahwa terdapat keragaman berdasarkan karakter morfologi. Keragaman durian akan terus meningkat karena sifat tanaman durian yang menyerbuk silang (Ashari 1995). Penelitian lain yaitu identifikasi morfologi durian sukun (Yuniastuti 2008). Penggunaan karakter morfologi mudah dilakukan dan cepat, namun terdapat kendala yaitu adanya faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi karakter fenotip, perbedaan umur tanaman dan jaringan tanaman (Nandariyah 2007).

Alternatif untuk mengkaji keragaman durian adalah dengan menggunakan penanda molekuler (protein, isozim, dan DNA). Keragaman genetika durian dapat dianalisis menggunakan beberapa penanda, di antaranya penanda RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphisms*), SSR atau mikrosatelit yang telah dilakukan oleh Nafsi (2007). Dibandingkan beberapa penanda

molekuler tersebut, keunggulan RAPD antara lain mudah dilakukan, cepat dan hanya memerlukan sedikit DNA sebagai cetakan, serta tanpa memerlukan informasi awal genom target (Martasari dan Sugiyatno 2007). Rowland dan Levi (1994) dalam Maftuchah dan Zainudin (2007) menyatakan bahwa penanda RAPD sesuai untuk spesies tanaman berkayu, sehingga dapat digunakan untuk analisis keragaman DNA tanaman durian sukun.

Tujuan penelitian ini adalah: (i) Mengkaji keragaman beberapa varietas durian yaitu sukun, sunan, kani, monthong dan petruk berdasarkan penanda RAPD. (ii) Mengkaji keragaman varietas durian sukun yang ditanam pada wilayah yang berbeda berdasarkan penanda RAPD.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta pada November 2008 sampai Januari 2009.

Bahan tanaman

Bahan penelitian keragaman antar varietas durian adalah daun durian sukun, petruk, sunan, kani dan monthong yang ada di kebun benih Ranukutri, Kabupaten Karanganyar. Bahan penelitian keragaman antar populasi durian sukun pada wilayah penanaman berbeda adalah daun durian sukun yang berasal dari (i) Desa Gempolan, Kerjo, Karanganyar, (ii) kebun benih Ranukutri, Pendem, Karanganyar, (iii) Desa Tahunan, Jepara, dan (iv) Desa Brongkol, Banyubiru, Salatiga.

Pelaksanaan penelitian

Pelaksanaan penelitian terdiri dari beberapa kegiatan, yaitu pengambilan sampel, isolasi DNA yang meliputi ekstraksi DNA dan purifikasi (pemurnian) DNA, uji kualitas dan kuantitas DNA, seleksi primer, serta reaksi amplifikasi dan elektroforesis.

Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan berasal dari daun tanaman durian sukun, sunan, kani, monthong, dan petruk yang sudah tua. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan mengambil daun yang masih bagus tekstur dan warnanya.

Ekstraksi DNA

DNA durian diekstraksi dari bagian daun yang tua dengan menggunakan metode CTAB (*Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*). Sebelum dilakukan ekstraksi, terlebih dahulu disiapkan buffer ekstraksi, yang kebutuhannya tergantung dari jumlah sampel yang akan diekstraksi. Sampel yang akan diekstraksi di timbang (50-100 g), dipotong kecil-kecil, dimasukkan dalam microtube 2 mL dengan 2 buah gotri dan 1,5 mL buffer ekstraksi didalamnya. Sampel dihaluskan dengan alat (*mini bead beater*) selama 10 menit dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 65°C. Selanjutnya, sampel tersebut dipisahkan dari larutan bawah (diambil 1000 µL, dimasukkan dalam microtube baru ukuran 2 mL), dan ditambahkan 800 µL kloroform isoamyl, yang berfungsi memisahkan kontaminan seperti protein dengan DNA. Selanjutnya dirotasikan selama 20 menit, disentrifuse 15000 rpm, kemudian diambil 700 µL dan ditambahkan 700 µL kloroform, dirotasikan selama 20 menit dan disentrifuse 15000 rpm. Larutan diambil 600 µL, dipindahkan dalam microtube 1.5 mL yang sudah berisi NaOAc sebanyak 20 µL, kemudian ditambahkan 650 µL isopropanol sebagai pengikat DNA, sentrifuse selama 10 menit pada 15000 rpm, dan dikeringkan dengan aspirator, sehingga diperoleh pellet DNA. Selanjutnya pellet DNA dicuci dengan 1 mL EtOH (etanol) 70% dan 100%. Terakhir, pellet DNA dikeringkan dengan aspirator, dilarutkan dalam 200 µL H₂O dan penyimpanan dilakukan pada suhu -4°C.

Pemurnian DNA (purifikasi)

Ekstraksi DNA belum menghasilkan DNA yang murni (*crude DNA*), oleh karena itu perlu dilakukan pemurnian DNA (purifikasi) yang bertujuan memisahkan DNA dari kontaminan lain seperti RNA. Metode yang digunakan adalah Gene Clean Kit III, dengan langkah mencampur 50 µL larutan DNA dengan 150 µL NAI, kemudian disentrifuse sebentar pada 10000 rpm, dan ditambahkan 5 µL silica sebagai pengikat DNA. Larutan DNA disentrifuse kemudian dibuang supernatannya dan pellet dicuci dengan 375 µL new wash sebanyak 3 kali. Pencucian DNA disertai dengan sentrifuse 3 kali masing-masing 13000 rpm, 14000 rpm, dan 15000 rpm. Langkah selanjutnya, pellet DNA dikeringkan dengan desikator selama 10 menit, kemudian dilarutkan dengan 65 µL H₂O.

Uji kualitas dan kuantitas DNA

Kuantitas DNA diukur menggunakan alat *Gene Quant*, yaitu sejumlah 7 µL DNA contoh diambil dan dilakukan pengukuran konsentrasi, rasio, dan absorbansi (230 nm, 260 nm, 280 nm dan 320 nm), selanjutnya DNA tersebut dilarutkan dengan H₂O sesuai kebutuhan. Prinsip kerja *Gene Quant* adalah menghitung rasio dan konsentrasi DNA dengan memanfaatkan *optical density* (OD) DNA pada penyerapan/absorbansi beberapa macam gelombang cahaya (230 nm, 260 nm, 280 nm dan 320 nm). Sambrook *et al.* (1989), juga menyatakan bahwa kuantitas DNA ditentukan dengan alat spektrofotometer UV pada panjang gelombang 260-280 nm. Kemurniaan DNA ditetapkan berdasarkan nilai rasio A_{260}/A_{280} sekitar 1,8-2,0. Panjang gelombang 260 nm merupakan panjang gelombang yang dapat diserap maksimal oleh DNA, sedangkan panjang gelombang 280 nm merupakan panjang gelombang yang diserap maksimal oleh RNA.

Seleksi primer

Seleksi primer dari *Operon Technology* (Almaeda, USA) dilakukan untuk mendapatkan primer yang dapat menghasilkan produk amplifikasi dan mempunyai tingkat polimorfisme yang tinggi. Beberapa primer yang akan diseleksi, yaitu: OPA-01, OPA-02, OPA-07, OPA-16, OPA-18, OPA-19, OPG-05, OPG-06, OPG-07, dan OPG-08, OPH-05, OPH-06, OPH-07, OPH-08, OPR-05, OPR-06, OPR-07 dan OPR-08. Seleksi primer menggunakan 4 sampel DNA (DNA durian varietas sukun dari Gempolan karanganyar, sukun dari kebun benih Ranukutri, sunan dan kani).

Reaksi amplifikasi dan elektroforesis

Persiapan PCR untuk amplifikasi dilakukan dalam bak berisi es. Bahan yang digunakan meliputi 4 µL DNA contoh (konsentrasi 2.5 ng/µL), 4.2 µL primer oligonukleotida, dan master mix yang terdiri dari H₂O, 10xStoffel Buffer, dNTP, MgCl₂, dan enzim *Taq Polymerase* dimasukkan dalam microtube ukuran 0.5 mL, divortex dan disentrifuse, kemudian dimasukkan dalam alat PCR *Applied Biosystem GeneAmp PCR System 9700*. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 45 siklus yang terdiri dari 3 tahap, yaitu (i) denaturasi selama 30 detik pada suhu 94°C, (ii) annealing selama 30 detik pada suhu 37 °C, dan (iii) ekstension selama 1,5 menit pada suhu 72 °C. Reaksi amplifikasi ini membutuhkan waktu selama ± 3 ½ jam.

Langkah selanjutnya setelah reaksi amplifikasi selesai yaitu mencampurkan hasil amplifikasi tersebut dengan 2 µL gel loading kemudian dielektroforesis dengan agarose 1% (76 g H₂O, 1 g agarose (Promega), dan 4 mL 20xTBE) pada voltase konstan 120 volt selama 2 jam. Gel kemudian direndam dalam larutan etidium bromide selama 30 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan pada *BioRad* kemudian dilakukan pemotretan. Menurut Sambrook *et al.* (1989) bahwa elektroforesis dengan gel agarose adalah salah satu cara yang digunakan untuk memisahkan, memurnikan, dan mengidentifikasi DNA. Proses elektroforesis ini terjadi karena molekul DNA terpisah melalui pori-pori gel akibat adanya pengaruh medan listrik yang diberikan.

Menurut Williams *et al.* (1990) yang menggunakan alat Thermolyne Amplitron®-1 versi 2.11, reaksi PCR dilakukan sebanyak 45 siklus yang terdiri atas satu menit pada suhu 94°C (*denaturasi*), satu menit suhu 55°C (*annealing*), dan dua menit suhu 72°C (*ekstension*). Selanjutnya setelah reaksi PCR berakhir, produk amplifikasi dielektroforesis dengan agarose 1.2% dan divisualisasikan di atas UV transiluminator kemudian dilakukan pemotretan dengan film poraloid 667.

Analisis data

Analisis data didasarkan pada ada atau tidaknya pita DNA. Profil pita DNA diterjemahkan ke dalam data biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada pita dan 1 untuk adanya pita DNA pada satu posisi sama dari varietas durian yang dibandingkan. Analisis gerombol (*cluster analysis*) dilakukan menggunakan program NTSYSpc versi 2.02i dengan metode UPGMA fungsi SIMQUAL (Rohlf (2000). Matriks kemiripan genetik dihitung berdasarkan koefisien Dice.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi primer

Seleksi primer dilakukan untuk mencari primer yang dapat mengamplifikasi DNA durian, dapat menghasilkan pita DNA yang tegas dan dalam jumlah banyak. Kriteria primer yang digunakan untuk analisis keragaman DNA ini adalah primer yang dapat menghasilkan pita polimorfik, dengan keadaan pita jelas, reproduksibilitasnya baik, dan pita DNA yang dihasilkan relatif stabil, serta mudah dibaca. Menurut Williams *et al.* (1990) primer yang

digunakan untuk RAPD sebaiknya mengandung 40% basa G+C (umumnya mengandung 50-80% G+C). Sebanyak 20 primer dari *operon* diseleksi dan diperoleh 6 primer (OPA-01, OPA-02, OPA-07, OPA-16, OPA-18, dan OPA-19) yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 1.).

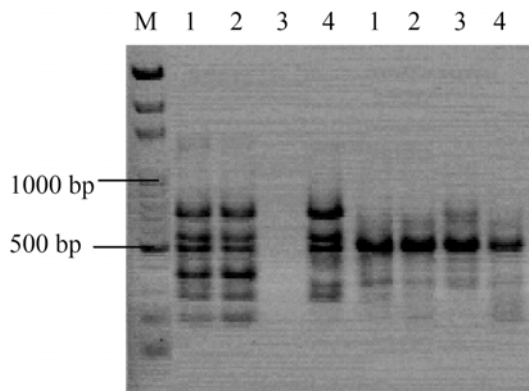
Primer RAPD bersifat random dengan ukuran panjang basanya 10 nukleotida. Jumlah produk amplifikasi PCR berhubungan langsung dengan jumlah dan orientasi sekuen yang komplementer terhadap primer di dalam genom tanaman (Azrai 2005). Amplifikasi merupakan hasil berpasangannya nukleotida primer dengan nukleotida penyusun DNA (Hartati 2006). Pemilihan primer pada analisis RAPD berpengaruh terhadap polimorfisme pita yang dihasilkan, karena setiap primer memiliki situs penempelan tersendiri. Akibatnya pita DNA polimorfik yang dihasilkan setiap primer menjadi berbeda, baik dalam ukuran banyaknya pasang basa maupun jumlah pita DNA. Polimorfisme merupakan gambaran amplifikasi yang diperoleh dari perbedaan fragmen DNA yang diobservasi dan diskor sebagai ada atau tidaknya perbedaan sekuen, sehingga menunjukkan adanya variasi (McGregor *et al.* 2000; Mansyah *et al.* 2003). Sesuai dengan pernyataan Hartati (2007) bahwa polimorfisme merupakan suatu bentuk variasi genetik yang terjadi dalam rantai DNA.

Tabel 1. Jenis dan susunan basa dari 20 primer yang diseleksi

Primer	Urutan basa nukleotida (5'-3')	Kandungan G+C (%)
OPA-01*	CAGGCCCTTC	70%
OPA-02*	TGCCGAGCTG	70%
OPA-04	AATCGGGCTG	60%
OPA-07*	GAAACGGGTG	60%
OPA-16*	AGCCAGCGAA	60%
OPA-17	GACCGCTTGT	60%
OPA-18*	AGGTGACCGT	60%
OPA-19*	CAAACGTCGG	60%
OPG-05	CTGAGACGGA	60%
OPG-06	GTGCCTAACC	60%
OPG-07	GAACCTGCGG	70%
OPG-08	TCACGTCCAC	60%
OPH-05	AGTCGTCCCC	70%
OPH-06	ACGCATCGCA	60%
OPH-07	CTGCATCGTG	60%
OPH-08	GAAACACCCC	60%
OPR-05	GACCTAGTGG	60%
OPR-06	GTCTACGGCA	60%
OPR-07	ACTGGCCTGA	60%
OPR-08	CCCGTTGCCT	70%

Keterangan: *: Primer yang terpilih

Amplifikasi menggunakan 6 primer (Tabel 2.) menghasilkan jumlah pita antara 11 (OPA-19) sampai dengan 18 (OPA-01). Menurut Hartati (2006) perbedaan jumlah pita yang dihasilkan setiap primer disebabkan perbedaan urutan basa nukleotida primer atau interaksi antara primer dan DNA cetakan. Perbedaan ini menggambarkan genom tanaman yang kompleks, sehingga semakin beragam genom akan menghasilkan pita yang semakin kompleks.



Gambar 1. Amplifikasi pada Seleksi OPA-16 dan OPA-17 menggunakan sampel DNA durian sukun (1), sunan (2), monthong (3) dan petruk (4).

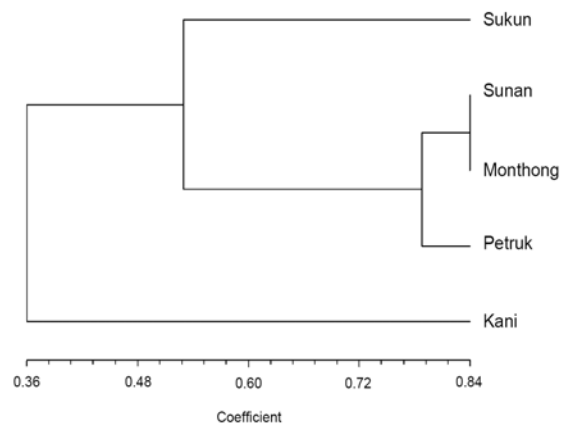
Pita DNA polimorfik paling banyak dihasilkan OPA-01 (16 pita), sedangkan paling sedikit dihasilkan OPA-19 (10 pita). Pita polimorfik merupakan pita yang dimiliki pada beberapa individu sampel, sedangkan pita monomorfik adalah pita yang dimiliki oleh semua individu sampel. Jumlah pita DNA polimorfik yang dihasilkan menentukan keragaman suatu populasi, karena pita DNA polimorfik menggambarkan keadaan genom tanaman (Hartati 2006).

Tabel 2. Tingkat polimorfisme enam primer yang digunakan berdasarkan pola pita yang dihasilkan

Primer	Urutan basa nukleotida (5'-3')	Jumlah pita polimorfik	Jumlah pita monomorfik	Persentase polimorfisme
OPA-01	CAGGCCCTTC	16	2	88,89%
OPA-02	TGCCGAGCTG	11	4	73,33%
OPA-07	GAAACGGGTG	12	4	75%
OPA-16	AGCCAGCGAA	14	2	85,5%
OPA-18	AGGTGACCGT	11	3	78,5%
OPA-19	CAAACGTCGG	10	1	90,1%

Keragaman RAPD antar varietas durian

Amplifikasi lima varietas durian dengan menggunakan enam primer yaitu OPA-01, OPA-02, OPA-07, OPA-16, OPA-18 dan OPA-19 menunjukkan terdapat keragaman DNA antar varietas durian sukun, sunan, kani, monthong dan petruk.. Cahyarini *et al.* (2004) menyatakan bahwa perbedaan varietas dapat dilihat dari jumlah pita, ketebalan pita maupun mobilitasnya. Analisis pengelompokan lima varietas durian berdasarkan pola pita menghasilkan pemisahan yaitu durian sukun, sunan, monthong, dan petruk dalam satu kelompok memisah dengan durian kani (Gambar 2).

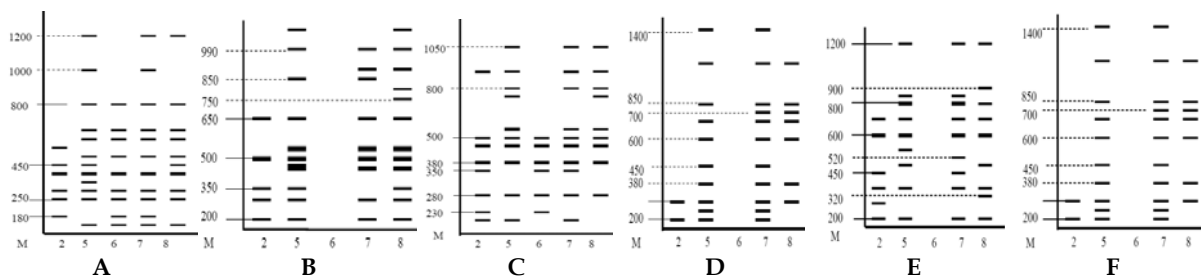


Gambar 2. Dendrogram pengelompokan lima varietas durian berdasarkan pola pita dengan OPA-01, OPA-02, OPA-07, OPA-16, OPA-18 dan OPA-19.

Durian varietas sunan dan monthong mengelompok pada koefisien kemiripan 0,84 atau mempunyai kemiripan 84%, kemudian mengelompok dengan durian petruk pada koefisien kemiripan 0,83 dan mengelompok dengan durian sukun dan durian kani masing-masing pada koefisien kemiripan 0,52 dan 0,36. Hasil pengelompokan tersebut apabila dihubungkan dengan ciri morfologi diperoleh kenyataan bahwa durian kani mempunyai kedudukan daun berbeda dengan varietas lainnya, yaitu bergantung.

OPA-01

Amplifikasi dengan OPA-01 menghasilkan total 47 pita, dengan jumlah pita antara 6-12 pita. Durian sunan menghasilkan pita DNA paling banyak (12 pita), sedangkan pita DNA paling sedikit dihasilkan oleh durian sukun (6 pita) (Gambar 3A). Hasil amplifikasi menunjukkan



Gambar 3. Pola pita DNA lima varietas durian dengan primer: A. OPA-01 B. OPA-02, C. OPA-07, D. OPA-16, E. OPA-18, F. OPA-19. Keterangan: M : marker, 2. Durian sukun, 5. Durian sunan, 6. Durian kani, 7. Durian monthong, 8. Durian petruk.

adanya keragaman pola pita DNA lima varietas durian yaitu durian sukun, sunan, kani, monthong dan petruk. Ada beberapa pita yang membedakan kelima varietas tersebut, yaitu pita pada ukuran 180 bp yang dimiliki oleh durian sukun, kani dan monthong. Pita ini dapat diasumsikan sebagai penanda yang membedakan bentuk buah pada durian varietas sukun, kani dan monthong yang berbentuk bulat panjang dengan durian varietas sunan dan petruk yang mempunyai bentuk buah bulat telur terbalik. Marka DNA seperti RFLP, RAPD, SSR dan AFLP banyak digunakan sebagai penciri genotipe tanaman. Marka tersebut mampu membedakan genotipe di antara individu dengan tingkat akurasi tinggi, baik pada tingkat inter dan antar spesies maupun kerabat jauhnya (Powell *et al.* 1996).

OPA-02

Berdasarkan interpretasi pola pita dengan OPA-02 tampak bahwa durian kani tidak mampu menghasilkan produk amplifikasi (Gambar 3B). Hal ini dimungkinkan karena urutan basa nukleotida yang menyusun primer tersebut tidak komplemen dengan pasangan basa yang menyusun DNA sampel durian. Seperti pernyataan Sanjaya *et al.* (2002) bahwa panjang pendeknya primer yang digunakan juga mempengaruhi hasil amplifikasi. Selain itu, menurut Prana dan Hartati (2003) jumlah atau konsentrasi primer serta perbedaan kondisi PCR berpengaruh terhadap hasil amplifikasi DNA. Interpretasi pola pita tersebut menunjukkan bahwa pita DNA yang dihasilkan pada durian sunan dan monthong sebanyak 3 pita yang berbeda, yaitu pada ukuran 1100 bp dan 350 bp yang dimiliki oleh durian sunan, dan pada ukuran 900 bp yang dimiliki oleh durian monthong. Apabila dibandingkan dengan durian petruk, terdapat 4 pita DNA yang membedakan

antara durian sunan dan petruk, yaitu pada ukuran 750, 800, 900 dan 1100 bp yang hanya dimiliki oleh durian petruk.

OPA-07

Hasil amplifikasi dengan OPA-07 menunjukkan adanya keragaman antar varietas durian sukun, sunan, kani, monthong dan petruk (Gambar 3C). Berdasarkan hasil amplifikasi dan interpretasi pola pita pada gambar dibawah ini, diperoleh jumlah total pita DNA yang dihasilkan sebanyak 44 pita, dengan pita paling banyak dihasilkan pada durian sunan dan monthong, yaitu 10 pita DNA. Pita DNA yang dihasilkan oleh durian sunan dan petruk berbeda pada satu pita, yaitu pada ukuran 200 bp. Karsinah *et al.* (2002) menyatakan bahwa pita-pita spesifik yang dihasilkan dapat memberikan harapan sebagai identifikasi varietas. Didapatnya pita spesifik sebagai penanda suatu varietas atau sebagai pembeda dengan varietas lainnya sangat penting, karena identifikasi varietas pada umumnya didasarkan pada karakter morfologi yang memerlukan observasi intensif dari tanaman dewasa.

OPA-16

Amplifikasi dengan OPA-16 menghasilkan 35 pita DNA (Gambar 3D). Pita DNA paling banyak dihasilkan pada sampel durian monthong, yaitu sebanyak 11 pita DNA. Pita pada ukuran 1400 bp, 380 bp dan 300 bp merupakan pita pembeda antar varietas durian sukun, sunan, kani, monthong dan petruk. Pita pada ukuran 600 bp membedakan durian varietas monthong dengan durian varietas lain. Durian sunan dan petruk dibedakan oleh 4 pita DNA, yaitu pita pada ukuran 200, 900 dan 1000 bp yang dimiliki oleh durian sunan, dan pita pada ukuran 600 bp yang dimiliki oleh durian petruk.

OPA-18

Amplifikasi dengan OPA-18 menghasilkan jumlah total pita DNA sebanyak 33 pita DNA (Gambar 3E). Durian varietas sunan dan monthong dibedakan oleh tiga pita DNA, yaitu pita ukuran 550 bp dan 500 bp yang dimiliki durian sunan, dan pita 520 bp yang dimiliki durian monthong. Pita pada ukuran 800 bp mempunyai ketebalan yang berbeda antara yang dihasilkan pada durian sunan dan monthong dengan durian petruk. Ketebalan pita DNA yang berbeda ini menurut Sanjaya (2002) disebabkan rendahnya suhu *annealing* yaitu di bawah 50-60°C, yang dapat menyebabkan produk yang dihasilkan mempunyai spesifitas rendah.

OPA-19

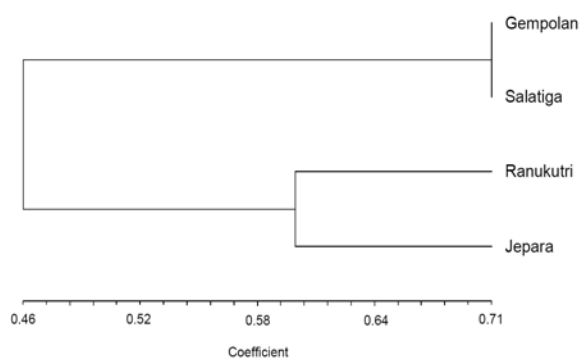
Hasil amplifikasi dengan OPA-19 menunjukkan bahwa durian sunan dan monthong mempunyai pola pita yang hampir sama, hanya dibedakan oleh pita DNA pada ukuran 700 bp saja (Gambar 3F). Pengelompokan ini menunjukkan bahwa keragaman morfologi belum tentu menunjukkan keragaman genetik yang berbeda (Cahyarini *et al.* 2004).

Keragaman varietas durian Sukun pada wilayah penanaman berbeda

Hasil amplifikasi durian sukun dari wilayah penanaman berbeda dengan menggunakan enam primer menunjukkan adanya keragaman DNA yang dapat dilihat pada pola pita yang dihasilkan (Gambar 4). Berdasarkan pola pita DNA tersebut selanjutnya dilakukan analisis kluster dan diperoleh dendrogram pengelompokan durian varietas sukun. Analisis tersebut membagi empat sampel durian sukun menjadi dua kelompok, yaitu kelompok I terdiri dari durian sukun dari Gempolan, Karanganyar dan durian sukun dari Salatiga. Hal ini menunjukkan bahwa durian dari Salatiga yang disebut durian sukun oleh petani durian di Desa Brongkol, Salatiga diduga memang durian varietas sukun seperti yang ada di Kebun Benih Ranukutri, Karanganyar.

Durian sukun dari Gempolan Karanganyar mempunyai tingkat kemiripan 71% dengan durian sukun dari Salatiga, sedangkan durian sukun dari kebun benih Ranukutri, Karanganyar mengelompok dengan durian sukun dari Jepara pada koefisien kemiripan 0,60 atau mempunyai tingkat kemiripan 60%. Pengelompokan durian sukun yang ditanam pada wilayah berbeda menunjukkan bahwa durian sukun dari Gempolan Karanganyar dengan durian sukun

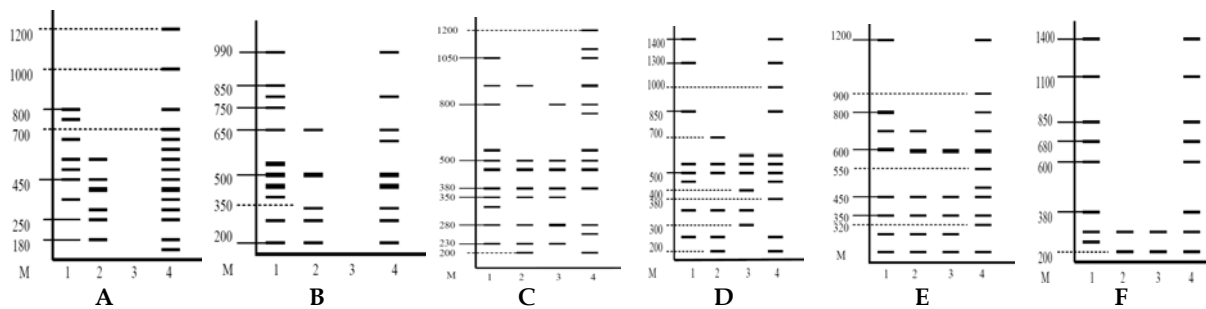
dari Salatiga mempunyai susunan genetik yang sama. Kelompok II terdiri dari durian sukun dari Kebun Benih Ranukutri, Karanganyar dan durian sukun dari Jepara. Hal ini mungkin disebabkan bibit durian sukun dari Jepara berasal dari durian sukun yang ada di Kebun Benih Ranukutri, Karanganyar yang berasal dari tetua yang sama, sehingga tidak terjadi perubahan genetik. Sebaliknya, durian sukun dari Gempolan, Karanganyar mempunyai tingkat kemiripan yang lebih jauh dengan durian sukun Kebun Benih Ranukutri, Karanganyar dan durian sukun Jepara dibandingkan dengan tingkat kemiripan dengan durian sukun dari Salatiga. Hal ini mungkin disebabkan tanaman tersebut berasal dari tetua yang berbeda. Sesuai dengan pernyataan Cahyarini *et al.* (2004) bahwa kemiripan dikatakan jauh apabila kurang dari 0,6 atau 60%. Dengan demikian pengelompokan tersebut membuktikan bahwa bibit durian sukun dari Jepara yang berasal dari kebun benih Ranukutri, Karanganyar berasal dari tetua yang sama.



Gambar 4. Dendrogram pengelompokan durian sukun dari Gempolan, Karanganyar, kebun benih Ranukutri, Jepara dan Salatiga berdasarkan pola pita dengan OPA-01, OPA-02, OPA-07, OPA-16, OPA-18 dan OPA-19.

OPA-01

Amplifikasi dengan OPA-01 menghasilkan jumlah total pita DNA sebanyak 28 pita DNA, dengan sampel durian sukun dari Salatiga menghasilkan pita DNA paling banyak. Gambar interpretasi keragaman pola pita DNA menunjukkan adanya keragaman pola pita pada durian sukun yang ditanam pada daerah yang berbeda, yaitu pita pada ukuran 750 bp hanya dimiliki durian sukun dari Gempolan Karanganyar dan pita pada ukuran 150 bp dan 700 bp dimiliki oleh durian sukun dari Salatiga (Gambar 5^a). Pita DNA ini yang membedakan keempat durian sukun tersebut.



Gambar 5. Interpretasi pola pita DNA durian sukun dari Gempolan, Karanganyar (1), kebun benih Ranukutri, Karanganyar (2) Jepara (3), dan dari Salatiga (4) dengan primer: A. OPA-01 B. OPA-02, C. OPA-07, D. OPA-16, E. OPA-18, F. OPA-19.

Pita pada pasang basa 400 juga lebih tebal daripada pita-pita DNA lainnya. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya kompetisi tempat penempelan primer pada DNA cetakan yang menyebabkan salah satu fragmen diamplifikasi dalam jumlah banyak dan fragmen lain diamplifikasi dalam jumlah sedikit, sehingga hanya beberapa saja yang dideteksi sebagai pita setelah amplifikasi (Grattapaglia *et al.* 1992). Sampel nomor 3 yaitu durian sukun yang berasal dari Jepara tidak mampu menghasilkan amplifikasi pita DNA. Hal ini dimungkinkan karena urutan basa nukleotida yang menyusun primer tersebut tidak komplementer dengan pasangan basa yang menyusun DNA sampel durian sukun dari Salatiga.

OPA-02

Berdasarkan interpretasi pola pita DNA, diperoleh bahwa terdapat keragaman pada durian sukun yang ditanam di daerah yang berbeda. Sampel no 1 (durian sukun dari Gempolan Karanganyar) mempunyai pita pada ukuran 400 bp yang membedakan dengan durian sukun yang lain. Pada sampel no 4 (durian sukun dari Salatiga) yang mempunyai pita pada ukuran 600 bp (Gambar 5B).

OPA-07

Hasil amplifikasi dengan OPA-07 menghasilkan total pita sebanyak 39 pita. Pita pada ukuran 1200 bp, 1100 bp 750 bp merupakan pita yang hanya dihasilkan oleh durian sukun dari Salatiga (Gambar 5C). Pita pada ukuran 300 bp juga merupakan pita yang membedakan durian sukun dari Gempolan, Karanganyar dengan durian sukun yang lain. Durian sukun dari Salatiga mampu menghasilkan pita DNA dengan jumlah paling banyak, yaitu 13 pita.

OPA-16

Amplifikasi menghasilkan jumlah total pita DNA sebanyak 31 pita DNA (Gambar 5D). Sampel durian sukun dari Salatiga merupakan sampel yang menghasilkan pita DNA paling banyak, sedangkan durian sukun dari Jepara menghasilkan pita DNA paling sedikit. Pita pada ukuran 1000 bp dan 380 bp merupakan pita DNA yang membedakan durian sukun dari Salatiga dengan durian sukun lainnya. Pita pada ukuran 700 bp juga merupakan pita yang membedakan durian sukun dari Ranukutri, Karanganyar dengan durian sukun lainnya. Sementara itu pita pada ukuran 400 bp merupakan pita DNA yang membedakan durian sukun dari Salatiga dengan durian sukun yang lain. Berdasarkan Gambar 22 di bawah, pita DNA yang dihasilkan oleh durian sukun dari Gempolan Karanganyar hampir sama dengan pita DNA yang dihasilkan oleh durian sukun dari Salatiga.

Pada amplifikasi dengan OPA-16 ini semua sampel mampu menghasilkan produk amplifikasi. Grattapaglia *et al.* (1992) menyatakan bahwa amplifikasi DNA terjadi jika primer menempel pada dua situs komplementer yang jaraknya berdekatan dan orientasinya saling terbalik. Jarak antar situs amplifikasi ini menghasilkan fragmen DNA dengan berbagai ukuran pasang basa. Umumnya jumlah pasang basa yang masih dapat diamplifikasi pada DNA genom tanaman berkisar 200 bp sampai 2000 bp bahkan kadang-kadang mencapai 5000 bp. Pita DNA yang terletak pada pasang basa (bp) yang sama menunjukkan bahwa pita DNA tersebut mempunyai migrasi yang sama dan diasumsikan sebagai lokus yang homolog.

OPA-18

Hasil amplifikasi dengan OPA-18 diperoleh 30 pita DNA. Pita DNA pada ukuran 550 bp, 500 bp dan 320 bp hanya dimiliki oleh sampel durian sukun dari Salatiga (Gambar 5E). Pita ini merupakan pita pembeda yang dapat diasumsikan sebagai penanda dengan durian sukun yang lain. Hasil amplifikasi menunjukkan adanya pita dengan ketebalan yang berbeda, yaitu pita pada ukuran 600 bp.

OPA-19

Reaksi amplifikasi dengan OPA-19 menghasilkan pita DNA berukuran antara 200-1400 bp dengan jumlah total pita DNA yang dihasilkan sebanyak 20 pita (Gambar 5F). Pita DNA yang dihasilkan oleh durian sukun dari kebun benih Ranukutri, Karanganyar dengan durian sukun dari Jepara sama persis, yaitu sebanyak 2 pita. Pita yang dihasilkan oleh durian sukun dari Gempolan, Karanganyar dengan durian sukun dari Salatiga hanya dibedakan oleh pita pada ukuran 200 bp, yang tidak dimiliki oleh durian sukun dari Gempolan, Karanganyar dan pita pada ukuran 250 bp yang hanya dimiliki oleh durian sukun dari Gempolan, Karanganyar. Pita ini dapat digunakan sebagai penanda durian sukun Gempolan, Karanganyar.

Weeden *et al.* (1992) menyebutkan bahwa intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer sangat dipengaruhi oleh (i) kemurnian dan konsentrasi DNA cetakan. DNA cetakan yang mengandung senyawa fenolik dan konsentrasi DNA cetakan yang terlalu kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup dan tidak jelas; (ii) sebaran situs penempelan primer pada DNA cetakan (Grattapaglia *et al.* 1992; Weeden *et al.* 1992), (iii) adanya kompetisi tempat penempelan primer pada DNA cetakan yang menyebabkan satu fragmen diamplifikasi dalam jumlah banyak dan fragmen lainnya sedikit. Proses amplifikasi mungkin saja diinisiasi pada beberapa tempat, namun hanya beberapa set yang dapat dideteksi sebagai pita sesudah diamplifikasi (Grattapaglia *et al.* 1992).

KESIMPULAN

Amplifikasi menggunakan OPA-01, OPA-02, OPA-07, OPA-16, OPA-18, dan OPA-19 menghasilkan pola pita yang menunjukkan keragaman antar varietas durian sukun, sunan, kani, monthong dan petruk, serta keragaman

pada durian sukun yang ditanam pada wilayah berbeda. Dendrogram pengelompokan dengan metode UPGMA pada lima varietas durian cenderung memisah, yaitu durian sukun, sunan, monthong dan petruk merupakan satu kelompok yang memisah dengan durian kani. Dendrogram pengelompokan dengan metode UPGMA pada durian sukun yang ditanam pada wilayah berbeda menghasilkan dua kelompok, yaitu kelompok I terdiri dari durian sukun dari Gempolan, Karanganyar dan durian sukun dari Salatiga. Kelompok II terdiri dari durian sukun dari Kebun Benih Ranukutri, Karanganyar dan durian sukun dari Jepara.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashari S. 1995. Hortikultura: aspek budidaya. UI Press. Jakarta.
- Asins MJ, Herrero R, Navarro L. 1995. Factors affecting citrus tree isozyme-gene expression. *Theor Appl Genet* 90: 892-898.
- Azrai M. 2005. Pemanfaatan marka molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. *J AgroBiogen* 1 (1): 26-37.
- Baswarsiaty, Yuniarti, Suhardi, Harwanto, Rahmawati D, Soegiyarto M. 2007. Karakterisasi beberapa sifat plasma nutfah durian di Kabupaten Kediri. BPTP Propinsi Jawa Timur. Surabaya.
- Cahyarini RD, Yunus A, Purwanto E. 2004. Identifikasi keragaman genetik beberapa varietas lokal kedelai di Jawa berdasarkan analisis isozim. *Agrosains* 6 (2): 79-83.
- Direktorat Bina Perbenihan. 1996. Deskripsi varietas buah-buahan dan sayuran. Direktorat Bina Perbenihan. Direktorat. Jenderal Tanaman Pangan dan Hortikultura. Jakarta.
- Grattapaglia D, Chaparro J, Wilcox P, McCord S, Werner D, Amerson H, McKeand S, Bridgwater F, Whetten R, O'Malley D & Sederoff R. 1992. Mapping in woody plants with RAPD markers: application to breeding in forestry and horticulture. Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series CSSA/ASHS/AGA. Minneapolis. 1 November 1992.
- Hartati D. 2006. Keragaman genetik sengon (*Albizia falcataria* L. Fosberg) melalui DNA marker. Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan Tanaman (P3HT). Yogyakarta.
- Hartati D. 2007. Pendugaan keragaman genetik dalam dan antar provenan pulai (*Alstonia scholaris* (L.) R. Br.) menggunakan penanda RAPD. Tesis S1. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Karsinah, Sudarsono, Setyobudi L, Aswidinnoor H. 2002. Keragaman genetik plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. *J Bioteknologi* 7 (1): 8-16.
- MacGregor TG. 2000. Genetic linkage mapping of the *Avr1a* avirulence gene in the soybean pathogen *Phytophthora sojae*. Dissertation. University of Western Ontario. Ontario, Canada.
- Maftuchah, Zainudin A. 2007. Variasi genetik kultivar mangga dengan menggunakan penanda molekuler Random Amplified Polymorphic DNA. Prosiding Seminar Nasional Hortikultura. UNS Surakarta, 17 November 2007.

- Mansyah E, Baihaki A, Setiamihardja R, Darsa JS, Sobir. 2003. Analisis variabilitas genetik manggis (*Garcinia mangostana* L.) di Jawa dan Sumatera Barat menggunakan teknik RAPD. *Zuriat* 14 (1): 35-44.
- Martasari C, Sugiyatno A. 2007. Karakterisasi morfologi dan analisa keragaman genetik plasma nutfah apel (*Malus* sp.). Prosiding Seminar Nasional Hortikultura. Surakarta 17 November 2007.
- Nafsi NI. 2007. Analisis keanekaragaman varietas durian (*Durio zibethinus* Murr.) dengan marka mikrosatelit. Tesis. Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, ITB. Bandung.
- Nandariyah. 2007. Identifikasi keragaman genetik kultivar salak Jawa berdasarkan analisis RAPD. *Agrosains* 9 (2): 70-76.
- Powell W, Margonte M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers of germplasm analysis. *Mol Breed* 2: 225-238.
- Prana TK, Hartati NS. 2003. Identifikasi sidik jari DNA talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan teknik RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), skrining primer dan optimalisasi kondisi PCR. *J Natur Indonesia* 5 (2): 107-112.
- Rohlf FJ. 2000. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80. Exeter Software. New York.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. New York
- Sanjaya L, GA Wattimena, Guharja E, Yusuf M, Aswidinoor H, Stam P. 2002. Keragaman ketahanan aksesori *Capsicum* terhadap antraknose (*Colletotricum capsici*) berdasarkan penanda RAPD. *J Bioteknologi* 7 (2): 37-42.
- Sarwono B. 1995a. Durian-durian hutan. *Trubus*. Desember 1995. No. 313. Th. 24.: 14
- Sarwono B. 1995b. Ragam varietas durian budidaya. *Trubus*. Desember 1995. No. 313. Th. 24: 15.
- Sriyono. 2006. Identifikasi dan keragaman genetik pohon induk durian (*Durio zibethinus* Murr.) lokal di Jawa Tengah berdasarkan penanda morfologi dan pola pita isoenzim. Tesis. Program Studi Agronomi, Program Pascasarjana. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Sumarsono L, Syaefudin, Dimiyati A, Abdurrahman. 2002. Teknik okulasi bibit durian pada stadia entres dan model mata tempel yang berbeda. *Buletin Teknik Pertanian* 7 (1): 10-13.
- Uji T. 2005. Keragaman jenis dan sumber plasma nutfah durio (*Durio* spp.) di Indonesia. *Buletin Plasma Nutfah* 11 (1): 28-33.
- Weeden NF, Timmerman GM, Hemmat M, Kneen BE, Lodhi MA. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series CSSA/ASHS/AGA. Minneapolis. 1 November 1992.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531-6535.
- Yuniastuti E. 2008. Karakterisasi fenotipik dan genotipik serta perbanyakan in vitro tanaman durian sukun (*Durio zibethinus* Murr.) di Karanganyar. LPPM UNS. Surakarta.