

Teknik Pembuatan Marka Molekular Berbasis Sekuensing dalam Pemuliaan Tanaman

Indah Anita-Sari¹⁾, Sobir²⁾, dan Agung Wahyu Susilo¹⁾

¹⁾Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB. Sudirman 90 Jember 68118

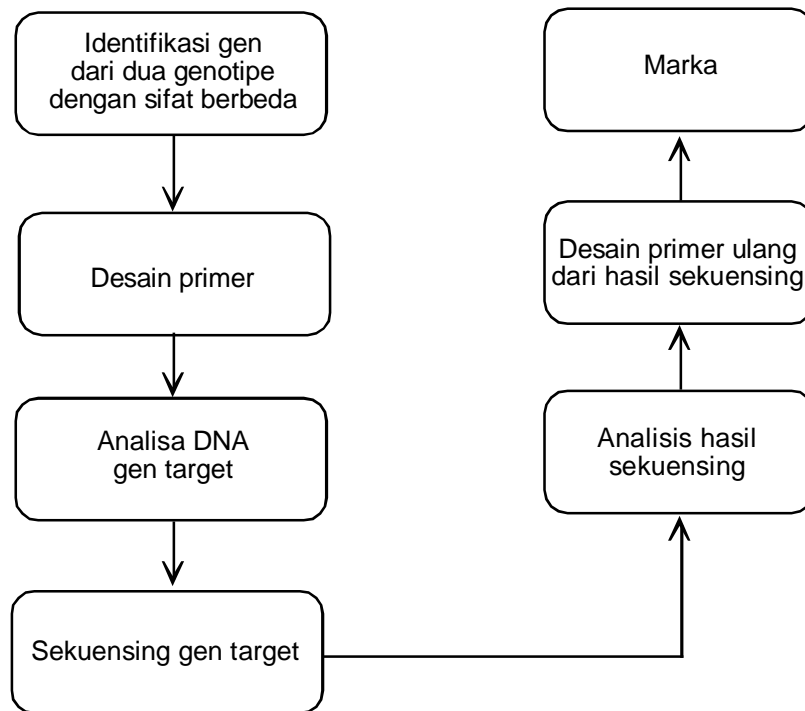
²⁾Institut Pertanian Bogor, Jl. Raya Dramaga, Bogor, Jawa Barat 16680

Perakitan bahan tanam unggul membutuhkan tahapan dan proses pemuliaan yang cukup panjang. Upaya mempercepat tahapan seleksi dalam mendukung kegiatan pemuliaan diperlukan strategi-strategi sebagai alat yang digunakan untuk melakukan seleksi lebih dini. Perkembangan ilmu bioteknologi dan molekular membuka peluang untuk dapat membuat marka seleksi sebagai penanda karakter dan sifat suatu tanaman. Marka molekular bukan alat untuk mempercepat proses pemuliaan tetapi sebagai alat bantu untuk mempercepat siklus seleksi dalam program pemuliaan tanaman sebab seleksi dapat dilakukan lebih awal tanpa harus menunggu fase generatif.

Bioteknologi tanaman dapat didefinisikan sebagai ilmu dan teknologi yang memanfaatkan fenomena biologis untuk menyalin dan memproduksi berbagai jenis zat yang bermanfaat. Ilmu ini banyak digunakan dalam upaya mendukung program pemuliaan tanaman. Identifikasi gen-gen terkait dengan karakter tertentu yang diinginkan, pembuatan marka molekular sebagai alat seleksi dini pada tanaman dan bahkan pengembangan rekayasa genetika untuk mendapatkan tanaman dengan karakter yang diinginkan saat ini banyak dilakukan. Marka molekular sendiri dapat didefinisikan sebagai penunjuk keberadaan rangkaian nukleotida atau lebih umum dikenal dengan DNA. Marka dapat menyandikan suatu sifat atau memberikan informasi tentang keberadaan posisi atau sekuen konservasi di dalam genom fungsional atau non fungsional. Terdapat beberapa macam marka

molekular antara lain marka berdasar pada fragmen restriksi (*Restriction Fragment Length Polymorphisms-RFLP*), mikrosatelit (*Simple Sequence Repeats-SSRs*), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) berbasiskan *fingerprinting* dan yang lebih spesifik pada penyandi terkait ekspresi (*Expressed Sequence Tags-ESTs*) dan SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*).

Pembuatan marka spesifik berbasis sekuensing saat ini menjadi sebuah *trend* untuk mendukung percepatan seleksi pada tanaman. Informasi susunan basa nukleotida gen-gen tertentu yang akan dijadikan target diperlukan untuk mencari perbedaan susunan basa antargenotipe atau antar spesies sehingga akan dapat disusun primer spesifik untuk mendeteksi sifat-sifat tertentu. Berikut tahapan pembuatan marka molekular berbasis sekuensing untuk sifat tertentu pada tanaman:



Alur pembuatan primer spesifik sebagai marka molekular pada tanaman

Identifikasi Gen

Gen target merupakan gen yang akan dijadikan obyek dalam pembuatan marka. Gen target sangat tergantung pada sifat yang diinginkan misalnya ketahanan penyakit, citarasa, atau sifat yang lainnya. Penelusuran gen target menjadi kunci keberhasilan pembuatan marka molekular. Identifikasi gen dapat dilakukan melalui studi pustaka berkaitan dengan sifat fisiologis maupun sifat-sifat lain yang berhubungan dengan karakter yang diinginkan. Gen target yang sudah ditentukan kemudian dapat ditelusuri susunan basa nukleotida-nya di *genebank* atau *genepool*. Salah satu rujukan *genebank* dan *genepool* yang dapat digunakan adalah NCBI. *Genebank* akan menyediakan informasi berkaitan dengan gen sehingga kita dapat mengeksplorasi banyak informasi yang berhubungan dengan gen tersebut. Selain itu melalui NCBI kita dapat melakukan beberapa analisis data dan juga desain primer secara cepat.

Desain Primer

Primer adalah urutan basa nukleotida spesifik yang dapat digunakan untuk amplifikasi

DNA. Primer merupakan suatu polimer asam nukleat pendek (oligonukleotida) yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA *template* dengan panjang 15-32 bp. Untuk standar amplifikasi sepasang primer akan memiliki kisaran pasangan basa sekitar 20 basa panjangnya pada tiap primernya. Pemilihan primer yang tidak sesuai dapat menyebabkan tidak terjadinya reaksi polimerasi antara gen target dengan primer. Terdapat dua jenis primer dalam suatu reaksi PCR (*polimerase chain reaction*) yaitu *primer reverse* dan *forward* yang bekerja pada dua untai berbeda (*sense* dan *antisense*) dalam satu DNA.

Desain primer dapat dilakukan menggunakan beberapa *software online* atau dapat dilakukan secara manual. Secara *online* desain primer dapat dilakukan menggunakan program *primer design tool* yang ada di NCBI. Langkah-langkah pembuatan primer dengan program pada NCBI sebagai berikut:

1. Membuka web *ncbi.nlm.nih.gov*
2. Telusuri gen target
3. Setelah mendapatkan gen target, klik *Fasta* untuk mendapatkan urutan basa nukleotida gen yang diinginkan

4. Klik *pick primer*
5. Akan muncul beberapa pilihan primer yang dapat digunakan

Primer yang dipilih adalah primer yang dapat mewakili sepanjang mungkin dari gen target yang sudah ditentukan. Sebagai contoh untuk gen di atas dapat menggunakan alternatif primer primer 4 dan primer 9 dengan primer 1, 2, 3, 5, 6, 8. Pemilihan primer kemudian dilakukan berdasarkan rasio kandungan G:C. Primer yang dipilih adalah primer memiliki G:C ratio mendekati 50%:50%.

Analisis DNA

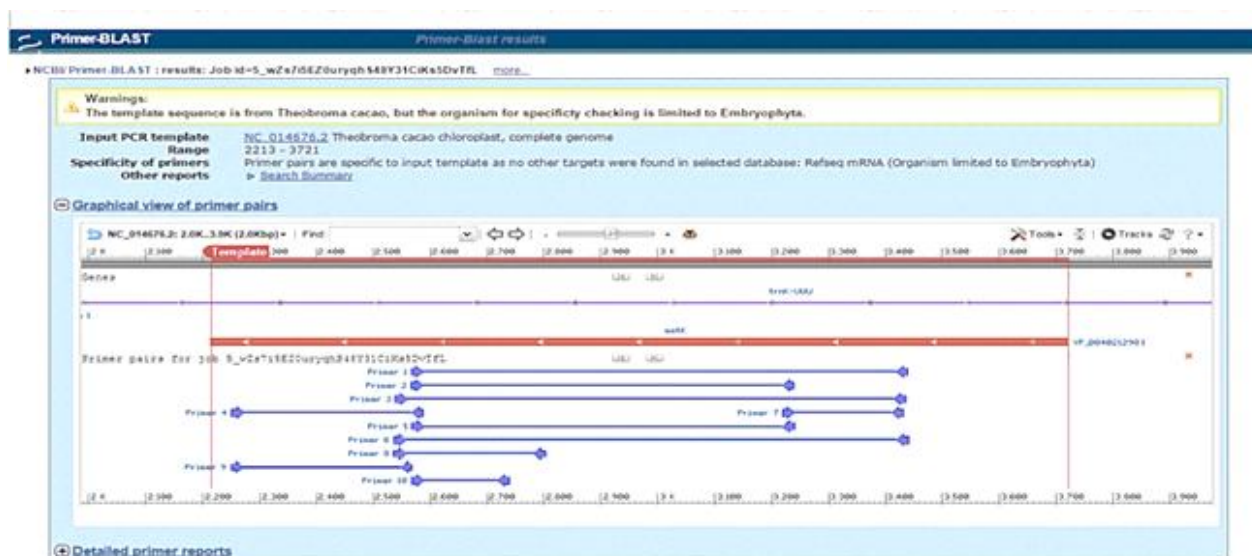
Analisis DNA dimulai dengan melakukan isolasi DNA dari jaringan tanaman. Pengecekan kualitas dan kuantitas DNA dapat dilakukan melalui beberapa metode yaitu elektroforesis, spektrofotometri dan menggunakan NanoDrop. DNA yang memiliki kualitas baik dapat dilanjutkan untuk proses PCR yaitu reaksi rantai polimerasi dengan komposisi terdiri dari DNA, buffer, dNTP, Taq Polymerase, primer. Hasil PCR atau *amplicon* kemudian diproses secara elektroforesis menggunakan gel agarose untuk mengecek pita dari gen target yang diinginkan. Jika pita yang muncul sudah menunjukkan pita yang spesifik dan tebal maka hasil amplicon dapat dilanjutkan untuk proses sekuensing dengan mengecek terlebih dahulu konsentrasi dan volume yang ditentukan untuk sekuensing.

Analisis Hasil Sekuensing, Desain Primer dan Pembuatan Marka Molekular

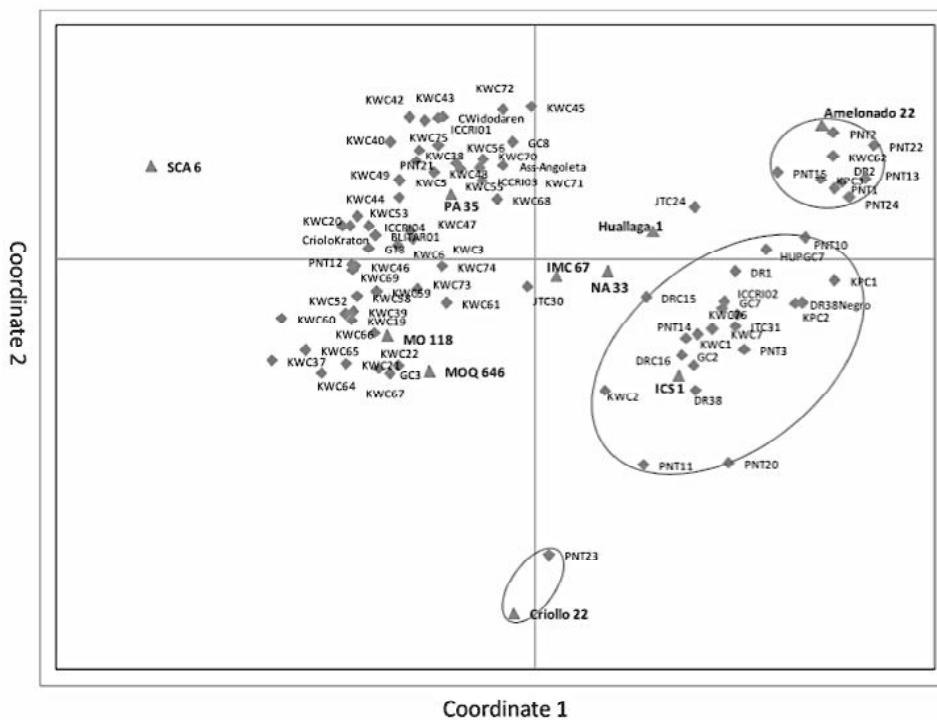
Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan cara mensejajarkan hasil sekuensing dari gen yang diinginkan dari dua individu yang memiliki sifat yang berbeda. Analisis pensejajaran dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa program *online* dan *offline* antara lain *Genius*, *Mega*, *Blast*, *ClustalW*, *ClustalX*, dll. Penelusuran perbedaan basa nukleotida dari dua sekuen dari dua genotipe dengan sifat berbeda kemudian dijadikan sebagai dasar untuk pembuatan primer untuk pembuatan marka molekular untuk analisis selanjutnya. Marka molekular yang sudah didapatkan kemudian dapat digunakan untuk mendeteksi genotipe-genotipe hasil persilangan, seleksi maupun eksplorasi pada tahap awal yang selanjutnya evaluasi dapat dilakukan secara konvensional.

Pemanfaatan Marka Molekular dalam Pemuliaan Tanaman Kakao

Pemanfaatan marka molekular dalam program pemuliaan tanaman sudah banyak dilakukan baik dalam seleksi sifat ketahanan terhadap hama dan penyakit, identifikasi karakter citarasa pada beberapa komoditas tanaman, seleksi genotipe tahan terhadap cekaman abiotik, dan juga untuk analisis kekerabatan/silsilah maupun evolusi



Visualisasi hasil desain primer menggunakan program *primer-blast*



(Sumber: Susilo *et al.*, 2011)

Analisis keragaman genetik kakao mulia asal Indonesia menggunakan marka SSR

tanaman. Analisis keragaman genetik plasma nutfah kakao mulia asal Indonesia yang dilakukan berbasis mikrosatelit menunjukkan bahwa sebagian besar kakao di Indonesia adalah jenis Trinitario. Beberapa aksesori dari Indonesia menunjukkan kerabat dekat dengan Criollo 22.

Beberapa marka molekular telah digunakan untuk gen-gen ketahanan terhadap penyakit. Pengembangan marka seleksi untuk ketahanan penyakit yang sudah dilakukan antara lain *marker assisted selection* (MAS) untuk ketahanan terhadap *witches broom* (*Moniliophthora perniciosa*), *frosty pod* (*M. royeri*) dan busuk buah (*Phytophthora* spp.), Identifikasi perbedaan antara kakao mulia dan kakao lindak juga dapat dilakukan dengan menggunakan marka seleksi berbasis mikrosatelit. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa kakao mulia dan kakao lindak dapat dibedakan secara jelas, tetapi keduanya tidak membentuk kelompok yang berbeda.

Penutup

Pembuatan marka molekular menjadi sebuah strategi dalam percepatan proses seleksi

pada tanaman, khususnya tanaman kakao. Pemahaman teknik pembuatan marka molekular menjadi penentu keberhasilan dalam menciptakan marka spesifik dari karakter tanaman.

Sumber Pustaka

- ¹Dwinita, W.U.; E.M. Septiningsih; S. yuriyah & I. Hanarida (2010). Marka molekular untuk ketahanan hawar daun bakteri. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 29, 152-156.
- ²Schnell, R.J.; D.N. Kuhn; J.S. Brown; C.T. Olano; W. Phillips-Mora; F.M. Amores & J.C. Motamayor (2007). Cocoa disease: important threats to chocolate production worldwide development of a marker assisted selection program for cocoa. *Phytopathology*, 97, 1664-1669.
- ³Smulders, M.J.; M.D. Esselink; F. Amores; G. Ramos; D.A. Sukha; D.R. Butler; B. Vosman & E.N. van Loo (2012). *Identification of cocoa (Theobroma cocoa L.) varieties with different quality attributes and parentage analysis of their beans*. Plant Research International, Wageningen. 13 p.
- ⁴Susilo, A.W.; D. Zhang, L.A. Motial; S. Mischke & L.W. Meinhardt (2011). Assessing genetic diversity in Java Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao* L.) germplasm by using Simple Sequence Repeat (SSR) marker. *Trop. Agr. Develop*, 55, 84-92.

0