

## I. PENDAHULUAN

Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter Roxb)) merupakan komoditas ekspor tradisional spesifik Sumatera Barat. Pada tahun 1994 volume ekspor gambir tercatat sebesar 1.038.839 kg dengan nilai US \$ 2.512.280. Pada tahun 1996 volume ekspor gambir meningkat menjadi 1.660.906 kg dengan nilai US \$ 3.441.508 (Biro Pusat Statistik, 1997).

Salah satu kendala yang dihadapi dalam membudidayakan gambir adalah rendahnya produktivitas Hasilnya. Produktivitas dan kualitas hasil sangat bergantung pada bahan tanam yang dipergunakan. Hingga saat ini belum didapatkan varietas unggul pada gambir. Dari hasil studi di daerah sentra produksi gambir Sumatera Barat ditemukan tiga tipe gambir yang menunjukkan perbedaan secara morfologis. Ketiga tipe tersebut adalah tipe Udang, tipe Cubadak, dan tipe Riau (Fiani dan Denian, 1994).

Pada species tanaman budidaya, sumber genetik telah lama diketahui sebagai aset yang sangat berharga bagi program perbaikan sifat tanaman (Oldfield, 1989). Dalam kegiatan pemuliaan tanaman, perbedaan sumber genetik dapat diketahui dengan penggunaan marker (penanda). Marker merupakan karakter yang dapat diturunkan yang berasosiasi dengan genotipe tertentu dan digunakan untuk mengkarakterisasi genotipe (Asiedu, *et al.*, 1989). Pengetahuan mengenai perbedaan genetik di antara kultivar dan besarnya heterogenitas dalam kultivar sangat berguna bagi program pemuliaan tanaman, antara lain untuk memonitor perubahan keragaman yang disebabkan lamanya seleksi dan keragaman kultivar komersial yang menginginkan keragaman fenotipik yang rendah.

Selama ini sumber genetik telah banyak diidentifikasi dengan menggunakan berbagai marker, seperti marker morfologi (Halligan, *et al.*, 1991; Barker, *et al.*, 1992), marker sitologi (Asiedu, *et al.*, 1989; Melchinger, 1990), marker biokimia (isoenzim) (Tanksley dan Orton, 1983), dan yang terbaru adalah marker molekuler (Asiedu, *et al.*, 1989; Melchinger, 1990).

Sistem klasifikasi dan identifikasi yang didasarkan atas karakter morfologi kuantitatif dan/atau kualitatif, meskipun efektif seringkali sulit dalam menginterpretasikan hasilnya karena pengaruh fluktuasi lingkungan. Ciri

heritabilitas biokimia, seperti isoenzim dapat menolong mengatasi masalah tersebut, karena isoenzim hampir tidak dipengaruhi lingkungan. Beberapa keuntungan lain analisis isoenzim adalah pendeteksiannya dapat dilakukan dari berbagai jaringan tanaman, pelaksanaan analisisnya cepat, dan biayanya murah, serta telah luas digunakan untuk verifikasi kultivar (Arulsekar dan Parfitt, 1986; Greer, *et al.*, 1993; Peirce dan Brewbaker, 1973; Tanksley dan Orton, 1983).

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dasar mengenai hubungan genetik antara genotipe/kultivar gambir budidaya dan menyediakan marker isoenzim sebagai alat sidikjari genotipe. Dari informasi dasar tersebut dapat dikembangkan penelitian lebih lanjut, terutama untuk mendeteksi gen yang menyandikan sifat resistensi tanaman terhadap penyakit tertentu dan gen yang menyandi rendemen gambir. Pada akhirnya dapat digunakan untuk perakitan kultivar baru.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji macam isoenzim yang dapat digunakan sebagai penanda genetik, yang meliputi esterase, peroksidase, dan ACP.

Manfaat penelitian ini adalah mendapatkan informasi dasar mengenai hubungan genetik antara genotipe/kultivar gambir budidaya dan menyediakan marker isoenzim sebagai alat sidikjari genotipe. Dari informasi dasar tersebut dapat dikembangkan penelitian lebih lanjut, terutama untuk mendeteksi gen yang menyandikan sifat resistensi tanaman terhadap penyakit tertentu. Pada akhirnya dapat digunakan untuk perakitan kultivar baru.

## II. METODE PENELITIAN

### 2.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian dan Laboratorium FMIPA, Universitas Andalas, Padang. Penelitian berlangsung selama delapan bulan dari bulan Maret hingga Oktober 2007.

### 2.2. Bahan Tanaman

Bahan tanaman gambir terdiri atas tiga genotipe gambir yang berbeda derajat kekerabatannya, yaitu: genotipe Udang, genotipe Cubadak, dan genotipe Riau. Sebagai pembandingan juga ditambahkan 6 (enam) genotipe gambir koleksi Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Genotipe-genotipe tersebut dipelajari untuk melihat hubungan antara turunan dan kesamaan pola (pita) isoenzimnya. Genotipe gambir tersebut merupakan kultivar yang paling banyak dibudidayakan oleh petani di Sumatera Barat.

Sampel tanaman yang digunakan terdiri atas daun. Untuk keperluan sampel pengujian pengaruh lingkungan terhadap ciri heritabilitas isoenzim hanya digunakan sampel daun.

### 2.3. Analisis Isoenzim

Metode analisis yang digunakan merupakan modifikasi dari teknik Wendel dan Weeden (1989). Tahapan kegiatan analisis isozim terdiri atas pembuatan bufer, pembuatan gel pati, ekstraksi enzim, elektroforesis, dan pewarnaan.

#### ***Pembuatan Bufer***

Bufer gel terdiri atas asam borat 0.587 g/L, Natrium hidroksida 0.08 g/L, Tris 2.847 g/L, dan asam sitrat 0.735 g/L. Bufer elektrode terdiri atas Natrium hidroksida 1.6 g/L dan asam borat 0.587 g/L. Pembuatan bufer ekstraksi sesuai dengan rekomendasi Wendel dan Weeden (1989) yang terdiri atas 100 mM tris-HCl, 7% sukrosa, 10% polivinilpirolidon, 250 mM DIECA, 1.5% triton M-100,

200 mM dinatrium tetraborat, 0.1% merkptoetanol, dan 10 mM magnesium klorida.

### ***Pembuatan Gel Pati***

Gel dibuat dari pati kentang dengan kadar 10%. Pati kentang dan bufer gel dimasukkan ke dalam labu didih, lalu dikocok merata. Berikutnya dimasak dalam penangas air pada suhu 100°C, seraya diputar agar larutan pati masak merata. Gelembung udara yang ada dalam larutan dibuang dengan menggunakan pompa vakum. Larutan selanjutnya dituangkan ke cetakan gel yang sudah dilapisi parafin. Gel kemudian didinginkan, ditutup plastik film, dan dibiarkan selama satu malam.

### ***Ekstraksi Enzim***

Contoh tanaman sebanyak 2 g digiling dengan mortar yang dialasi nampan berisi es sebagai pendingin. Ke dalam mortar ditambahkan ekstrak 2 tetes. Untuk pemindahan sampel ke dalam cetakan gel dilakukan dengan cara menyerap ekstrak sampel dengan kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam gel.

### ***Elektroforesis***

Gel yang telah siap kemudian dibuat lubang atau sumur sebagai tempat sampel. Kertas saring yang mengandung sampel disisipkan. Cetakan gel lalu dimasukkan ke dalam sistem reservoir elektroforesis yang berisi bufer elektrode. Elektroforesis dilakukan dalam ruang pendingin. Waktu yang dibutuhkan untuk elektroforesis adalah 8 jam dengan tegangan (voltase) awal 50 volt selama dua jam, 100 volt selama dua jam, 150 volt selama dua jam, dan 200 volt selama dua jam. Arus listrik akan menyesuaikan dengan tegangan.

### ***Pewarnaan***

Setelah selesai melakukan elektroforesis, maka listrik dimatikan dan gel diangkat. Bagian ujung gel dipotong sebagai penanda agar urutan/posisi sampel tidak terbalik. Gel dibelah horizontal dengan ketebalan 1.5 sampai 3 mm atau sesuai dengan keperluan lalu dipindahkan ke nampan. Gel lalu direndam dalam

larutan pewarna dan ditutup. Setelah proses pewarnaan selesai, gel lalu dicuci dengan air dan difiksasi.

Komposisi kimia pewarna untuk tiga isoenzim yang dianalisis adalah esterase, peroksidase, dan ACP.

### ***Pencucian dan Fiksasi***

Selesai pewarnaan gel dicuci dengan air mengalir sampai bersih. Selanjutnya potongan gel yang berisi garis-garis (pita) dapat difiksasi dengan 50% gliserol : 50% etanol atau dengan etanol : akuades : asam asetat : gliserol (5 : 4 : 2 : 1).

### ***Dokumentasi***

Langkah yang terakhir dari kegiatan analisis isoenzim adalah pengamatan atau dokumentasi. Karena daya tahan gel tidak terlalu lama bisa disimpan, maka sehabis pencucian kalau tidak diawetkan segera digambar atau dipotret. Untuk memudahkan pengamatan atau pemotretan, maka gel dipindahkan dari bak pewarna dengan plastik transparan.

## **2.4. Analisis Data**

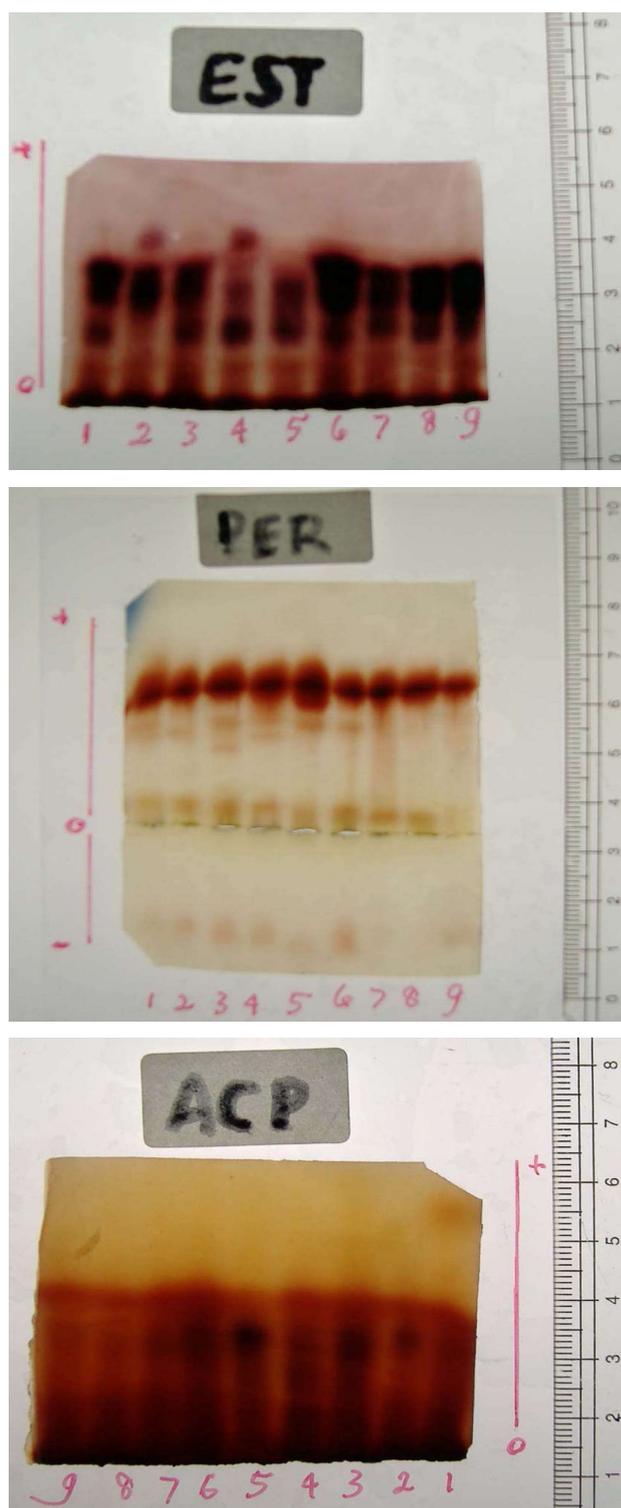
Untuk mempelajari keragaman tanaman gambir, maka perlu dilakukan penafsiran dan interpretasi pita-pita isoenzimnya. Selanjutnya dilakukan transformasi data, yaitu dengan merubah data kualitatif menjadi data biner (0,1). Satu jenis alel dengan nilai 1 pada kolom yang sesuai dan 0 untuk kolom lainnya (Cailliez et Pages, dalam Jusuf, *et al.*, 1990). Data kuantitatif hasil transformasi kemudian dilakukan analisis gerombol (*similarity*) dengan menggunakan perangkat lunak Minitab versi 14.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isoenzim adalah kumpulan berbagai molekul enzim (multi-molekuler) yang memiliki fungsi sama. Molekul-molekul isoenzim pada elektrogram akan tampak dalam bentuk pita-pita (*band*). Secara genetik telah diketahui bahwa satu gen berhubungan dengan satu rantai polipeptida. Ini berarti satu molekul isoenzim atau protein dapat dikendalikan oleh satu atau beberapa gen (Yatim, 1991).

Pada elektrogram, lokus dapat ditentukan dari wilayah penyebaran pita isoenzim. Satu lokus dapat menghasilkan lebih dari satu pita. Keragaman pita-pita yang terdapat pada lokus yang sama untuk contoh yang berbeda diduga karena perbedaan adanya alel. Berdasarkan data elektrogram dapat ditafsirkan gen-gen pengendalinya. Dengan demikian, akan dapat diketahui keragaman genetiknya (Jusuf, *et al.*, 1990).

Dari elektrogram isoenzim esterase, peroksidase, dan ACP menunjukkan adanya dua wilayah penyebaran. Ini berarti pengendali kedua isoenzim tersebut berada pada dua lokus (Gambar 1). Hasil penafsiran elektrogram isoenzim esterase menunjukkan bahwa gen pengendalinya terdapat pada lokus 1 dan lokus 2. Berdasarkan keragaman pita yang dibedakan oleh ada tidaknya pita dan kecepatan migrasinya, maka pada lokus 1 dapat dideteksi mengandung tiga alel dan lokus 2 juga mengandung tiga alel (Gambar 2.A.). Demikian pula dengan gen pengendali isoenzim peroksidase terdapat pada lokus 1 dan lokus 2. Berdasarkan perbedaan mobilitas, intensitas warna, dan ukuran pita, maka dapat ditafsirkan jumlah alel yang terdapat pada setiap lokus. Lokus 1 mengandung 5 alel dan lokus 2 mengandung 3 alel (Gambar 2.B.). Sedangkan gen pengendali isoenzim ACP juga terdapat pada lokus 1 dan lokus 2. Berdasarkan keragaman pita yang dibedakan oleh ada tidaknya pita dan kecepatan migrasinya, maka pada lokus 1 dapat dideteksi mengandung empat alel dan lokus 2 juga mengandung dua alel (Gambar 2.C.).



Gambar 1. Elektrogram esterase (a: atas), peroksidase (b: tengah), dan ACP (c: bawah) ): 1-6 = Genotipe gambir, 7 = Cubadak, 8 = Riau, 9 = Udang

<b>A</b>	Esterase					
	+	-	-	-	-	Lokus 2
	Alel:	1	2	3		
		-	-			Lokus 1
			-	-		
-	Alel:	1	2	3		
<b>B</b>	Peroksidase					
	+	-	-	-	-	Lokus 2
	Alel:	1	2	3		
		-			-	Lokus 1
			-		-	
		-		-	-	
		-	-	-	-	
-	Alel:	1	2	3	4	5
<b>C</b>	ACP					
	+	-	-	-	-	Lokus 2
	Alel:	1	2			
		-		-		Lokus 1
			-	-	-	
		-	-	-		
-	Alel:	1	2	3	4	

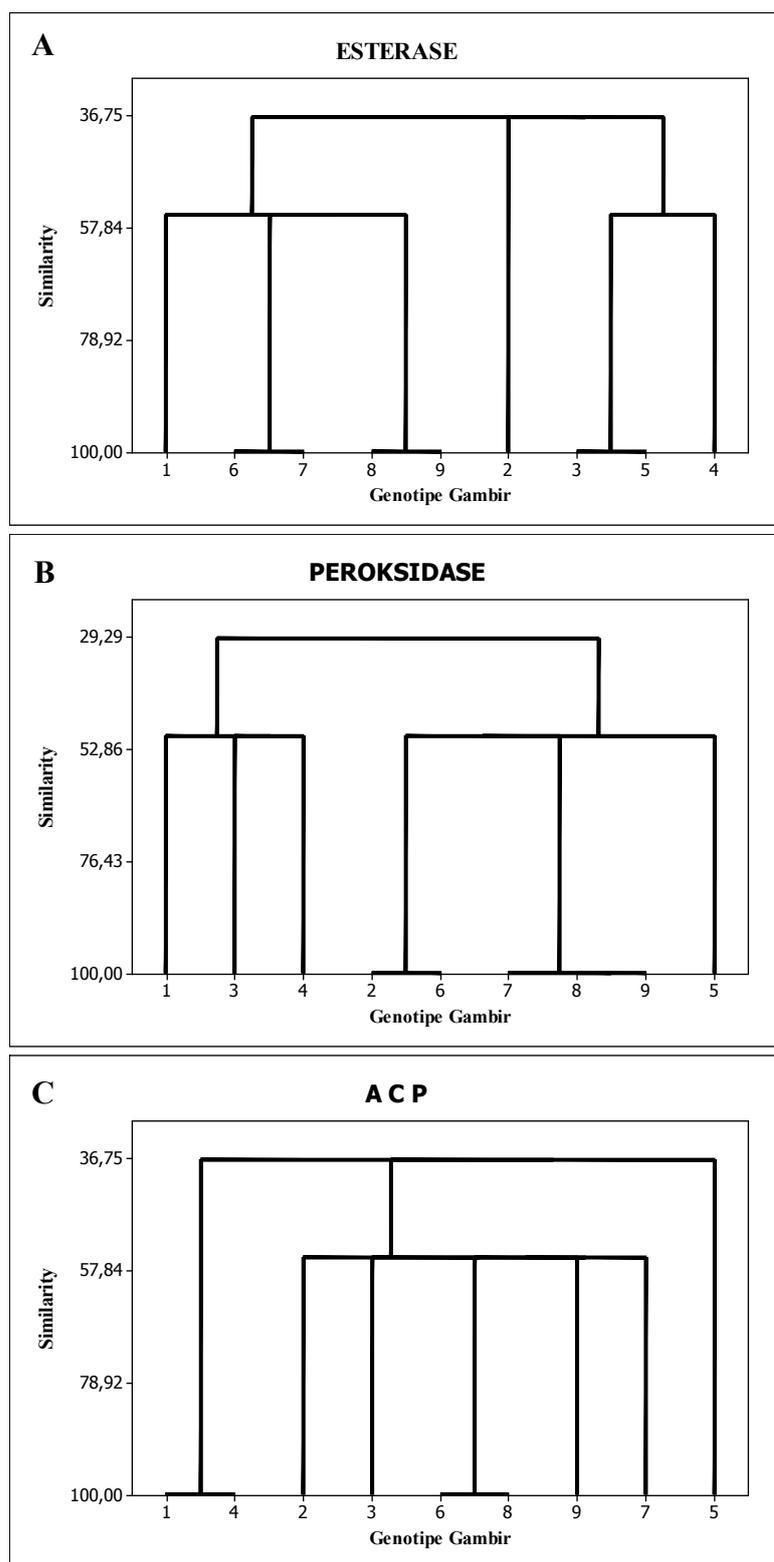
Gambar 2. Keragaman pita isoenzim pada setiap lokus: a. Esterase, b. peroksidase, dan c. ACP

Berdasarkan analisis gerombol (*similarity*) dapat dibuat dendrogram yang menggambarkan hubungan kekerabatan antara genotipe/kultivar. Kedekatan hubungan (jarak genetik) dapat ditentukan dengan besar kecilnya koefisien kesamaan (*similarity coefficient*). Dendrogram berdasarkan pita yang dihasilkan dari isoenzim esterase, peroksidase, dan ACP disajikan pada Gambar 3.

Pada Gambar 3.A., dendrogram berdasarkan pita-pita pada isoenzim esterase, terlihat bahwa dengan tingkat similaritas 36,75% terdapat tiga kelompok besar genotipe gambir, yaitu kelompok 1 yang terdiri atas genotipe 1, 6, 7, 8 dan 9. Kelompok 2 terdiri atas satu genotipe, yaitu genotipe 2. Kelompok 3 terdiri atas genotipe 3, 4, dan 5. Berdasarkan isoenzim esterase juga nampak bahwa terdapat kesamaan antara genotipe 6 dan 7, 8 dan 9, serta 3 dan 5.

Pada Gambar 3.B., dendrogram berdasarkan pita-pita pada isoenzim peroksidase, dengan tingkat similaritas 29,29% terdapat dua kelompok besar. Kelompok 1 terdiri atas genotipe 1, 3, dan 4. Sedangkan kelompok 2 terdiri atas genotipe 2, 5, 6, 7, 8, dan 9. Berdasarkan isoenzim peroksidase juga nampak bahwa terdapat kesamaan antara genotipe 2 dan 6, serta 7, 8, dan 9.

Pada Gambar 3.C., dendrogram berdasarkan pita-pita pada isoenzim ACP, terlihat bahwa dengan tingkat similaritas 36,75% terdapat tiga kelompok besar genotipe gambir, yaitu kelompok 1 yang terdiri atas genotipe 1 dan 4. Kelompok 2 terdiri atas genotipe 2, 3, 6, 7, 8, dan 9. Kelompok 3 terdiri atas satu genotipe, yaitu genotipe 5. Berdasarkan isoenzim ACP juga nampak bahwa terdapat kesamaan antara genotipe 1 dan 4 serta 6 dan 8.



Gambar 3. Dendrogram berdasarkan pita-pita pada isoenzim esterase (a: atas), peroksidase (b: tengah), dan ACP (c: bawah): 1-6 = Genotipe gambir, 7 = Cubadak, 8 = Riau, 9 = Udang

#### **IV. KESIMPULAN DAN SARAN**

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Peubah isoenzim esterase, peroksidase, dan ACP dapat dipergunakan untuk mendeteksi kekerabatan dan pengelompokkan kemiripan genetik pada kultivar gambir.
2. Gen yang mengendalikan isoenzim esterase, peroksidase, dan ACP masing-masing terdapat pada dua lokus.
3. Berdasarkan analisis keragaman pita isoenzim esterase pada tingkat similaritas 36,75% terdapat tiga kelompok besar genotipe gambir. Berdasarkan pita-pita pada isoenzim peroksidase, dengan tingkat similaritas 29,29% terdapat dua kelompok besar. Sedangkan berdasarkan pita-pita pada isoenzim ACP, terlihat bahwa dengan tingkat similaritas 36,75% terdapat tiga kelompok besar genotipe gambir.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arulsekhar, S. and D.E. Parfitt. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almonds, grape, walnut, pistachio, and fig. *HortScience* 21:928-933.
- Asiedu, R., N ter Kuile, and A. Mujeeb-Kazi. 1989. Diagnostic markers in wheat wide crosses, p. 293-299. *In* Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-1988: 2nd Internatl Symposium on Genetics Manipulation in Crops. A. Mujeeb-Kazi and L.A. Sitch (eds.), CYMMIT, Mexico.
- Barker, T.A., T.A. Vuori, M.R. Hegedus, and D.G. Myers. 1992. The use of ray parameters for the discrimination of Australian wheat varieties. *Plant Var. Seeds* 5:35-45.
- Greer, C.E., R.E. Schutzki, A. Fernandez, and J.F. Hancock. 1993. Electrophoretic characterization of *Taxuz* cultivars. *HortTechnology* 3:430-433.
- Halligan, E.A., M.B. Forde, and I.J. Warrington. 1991. Discrimination of ryegrasses by heading date under various combination of vernalization and daylength. *Plant Var. Seed.* 4:115-123.
- Jusuf, M., N. Marina, U. Widyastuti, dan A. Girindra. 1990. Analisis keragaman beberapa mutan dan varietas kedelai II, studi elektroforesis globulin dan albumin. *Forum Pascasarjana* 13(2):1-16. Lehninger, A.L. 1990. *Dasar-dasar Biokimia, Jilid I.* Erlangga, Jakarta. Alih Bahasa oleh M. Thenawijaya.
- Melchinger, A.E. 1990. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breed.* 104:1-19.
- Oldfield, M.L. 1989. *The Value of Conserving Resources.* Sinauer, Sunderland.
- Peirce, L.C. and J.L. Brewbaker. 1973. Applications of isozyme analysis in horticultural science. *HortScience* 8:17-22.
- Tanksley, S.D. and T.J. Orton. 1983. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Parts A and B.* Elsevier, Amsterdam.
- Wendel, J.F. and N.F. Weeden. 1989. Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. In Soltis, D.E. and P.S. Soltis (Eds.). *Isozymes in Plant Biology.* Dioscorides Press, Oregon. p:5-45.