

## IDENTIFIKASI KULTIVAR-KULTIVAR KENTANG MELALUI ANALISIS ISOENZIM<sup>1)</sup>

(Identification Potato Cultivars with Isoenzyme Analysis)

Oleh  
Dr. Ir. Irfan Suliansyah, MS<sup>2)</sup>

### ABSTRAK

Sumber genetik dapat diidentifikasi dengan menggunakan berbagai marker (penanda), seperti marker morfologi, marker sitologi, marker biokimia (isoenzim), dan marker molekuler (DNA). 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. Penelitian ini bertujuan untuk menguji macam isoenzim yang dapat digunakan sebagai penanda genetik, yang meliputi peroksidase dan esterase.

Bahan tanaman kentang terdiri atas 15 kultivar kentang yang berbeda derajat kekerabatannya, yaitu: Prevalent, Granola, Red Pontiac, Carni 1, Carni 2, Alpha, BF 15, PAS 4062, Kennebec, *S. chaoense*, Astarte, Noorchip, PAS 3063, Atlantic, dan Atzimba. Metode analisis isoenzim yang digunakan merupakan modifikasi dari teknik Wendel dan Weeden (1989). Penafsiran dan interpretasi pita-pita isoenzim dilakukan melalui analisis gerombol (*similarity*) dengan menggunakan perangkat lunak NTSYS-pc (Exeter Software, New York).

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan: 1) peubah isoenzim peroksidase dan esterase dapat dipergunakan untuk mendeteksi kekerabatan dan pengelompokan kemiripan genetik pada kultivar kentang, 2) gen yang mengendalikan isoenzim peroksidase dan esterase masing-masing terdapat pada dua lokus, dan 3) berdasarkan analisis keragaman pita isoenzim peroksidase dan esterase pada koefisien kesamaan 0,7 kultivar kentang terdiri atas satu kelompok genotipe dan satu individu/genotipe bebas.

---

1) Makalah disampaikan pada Seminar Hasil Penelitian Dana SPP/DPP, Rutin, Doktor Muda, Berkelanjutan, dan Mandiri pada tanggal 30 Oktober 2003

2) Staf Pengajar Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang

## I. PENDAHULUAN

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 (Astedu, *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).

Dari uraian pada pendahuluan di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan dan pendekatan/konsep untuk menjawab permasalahan sebagai berikut:

- a. Perlu diketahui jaringan tanaman yang tepat sebagai bahan analisis isoenzim yang paling polimorfik. Sehingga perlu dilakukan pengujian beberapa jaringan, seperti daun, akar, dan umbi.
- b. Perlu untuk menguji bahwa ciri heritabilitas isoenzim tidak terlalu dipengaruhi lingkungan. Pendekatan dilakukan dengan penggunaan sampel analisis pada kondisi yang berbeda, yaitu satu sampel dari kondisi *in vitro* dan sampel lain dari kondisi *in vivo*.
- c. Perlu untuk menguji macam isoenzim yang dapat digunakan sebagai penanda genetik. Untuk itu perlu diuji beberapa isoenzim, seperti peroksidase, esterase, glutamat oksaloasetat transaminase, dan endopeptidase.

## II. TUJUAN PENELITIAN

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

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dasar mengenai hubungan genetik antara genotipe/kultivar kentang budidaya dan menyediakan









## 5. Ekstraksi Enzim

Contoh daun segar ditimbang antara 100 – 200 mg, lalu digunting halus ke dalam mortar yang telah diberi pasir kuarsa, dengan menambahkan bufer pengeksrak sebanyak 0,5 ml, lalu digerus sampai halus. Selanjutnya kertas saring yang ukurannya disesuaikan dengan kebutuhan dimasukkan ke dalam mortar untuk menyerap cairan sel daun yang telah hancur. Kemudian kertas saring yang telah menyerap cairan sel dari setiap contoh atau mortar tadi dibersihkan untuk disisip pada gel yang telah dilubangi.

## 6. Elektroforesis

Cetakan yang telah disisipkan kertas saring yang telah mengandung contoh daun dimasukkan ke dalam *tray* yang telah berisi bufer elektrode. Sebelum dimasukkan selotip pada kaki cetakan dilepas dan kaki cetakan harus terendam dalam bufer elektrode lalu diletakkan dalam ruangan atau lemari es pada suhu antara 5 – 10°C.

Elektroforesis awal selama 30 menit pada 100 volt dan dielektroforesis tetap pada 150 atau 200 volt selama 3 sampai 4 jam. Kemudian untuk mengontrol jarak migrasinya di salah satu sisinya diberi penanda bromofenol biru.

## 7. Pembuatan Larutan Pewarna

Setelah elektroforesis, gel dibelah menjadi dua atau tiga (sesuai ketebalannya) pada posisi horizontal di atas alat pemotong. Sebelumnya kertas saring dikeluarkan dari lubang-lubangnya. Lembaran gel dimasukkan ke dalam nampan kemudian diberi pewarna yang masing-masing telah disiapkan sebelumnya. Selanjutnya nampan ditutup dengan *aluminium foil* atau yang lainnya dan diinkubasi pada suhu ruang sampai muncul pita-pita pada gel yang cukup jelas. Perendaman dalam larutan pewarna memerlukan waktu antara 1 sampai 2 jam atau lebih bergantung dari sistem enzimnya. Larutan pewarna yang digunakan terdiri atas:

### Pewarna Esterase (EST)

- |                               |        |
|-------------------------------|--------|
| • 100 mM sodium fosfat pH 7,0 | 100 ml |
| • 1-Naftil asetat             | 50 mg  |
| • 2-Naftil asetat             | 50 mg  |
| • Aseton                      | 5 ml   |
| • Fast blue RR salt           | 100 mg |

### Pewarna Peroksidase (PER)

- |                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| • 50 mM Natrium asetat pH 5,0      | 100 ml |
| • CaCl <sub>2</sub>                | 50 mg  |
| • H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% | 0,5 ml |
| • 3-Amino-9 etilkarbasol           | 50 mg  |
| • Aseton/N,N-dimethylformamid      | 5 ml   |

### 8. 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).

### 9. 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.

### D. Analisis Data

Untuk mempelajari keragaman tanaman kentang, 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 NTSYS-pc (Exeter Software, New York).

## IV. 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).

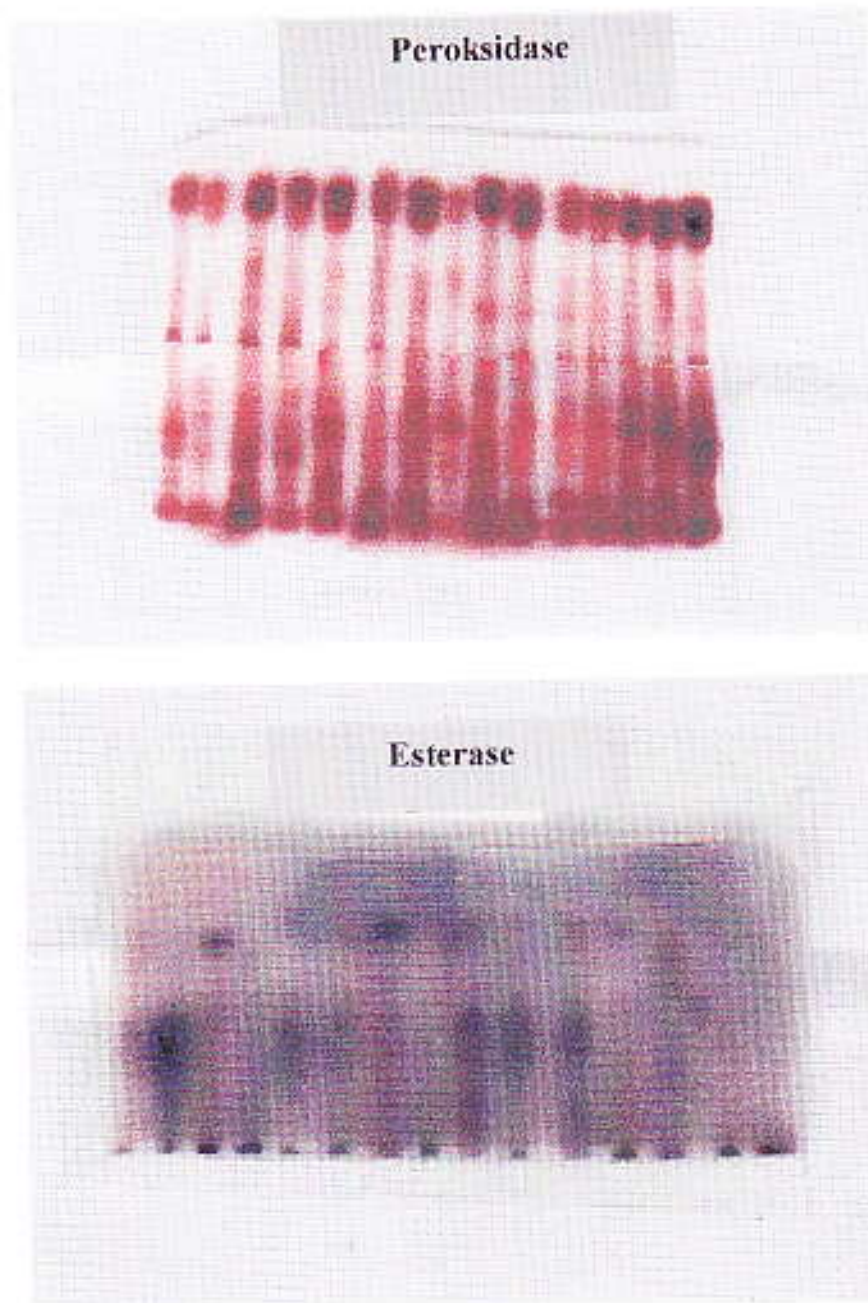
Pada elektrogram, lokus dapat ditentukan dari wilayah penyebaran pita isoenzim. Satu lokus dapat menghasilkan lebih dari satu pita. Keragaman pita-pita yang terdapat pada lokus yang sama untuk contoh yang berbeda diduga karena perbedaan adanya alel. Berdasarkan data elektrogram dapat ditafsirkan gen-gen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

Dari elektrogram isoenzim peroksidase (PER) dan esterase (EST) menunjukkan adanya dua wilayah penyebaran. Ini berarti pengendali kedua isoenzim tersebut berada pada dua lokus (Gambar 1).

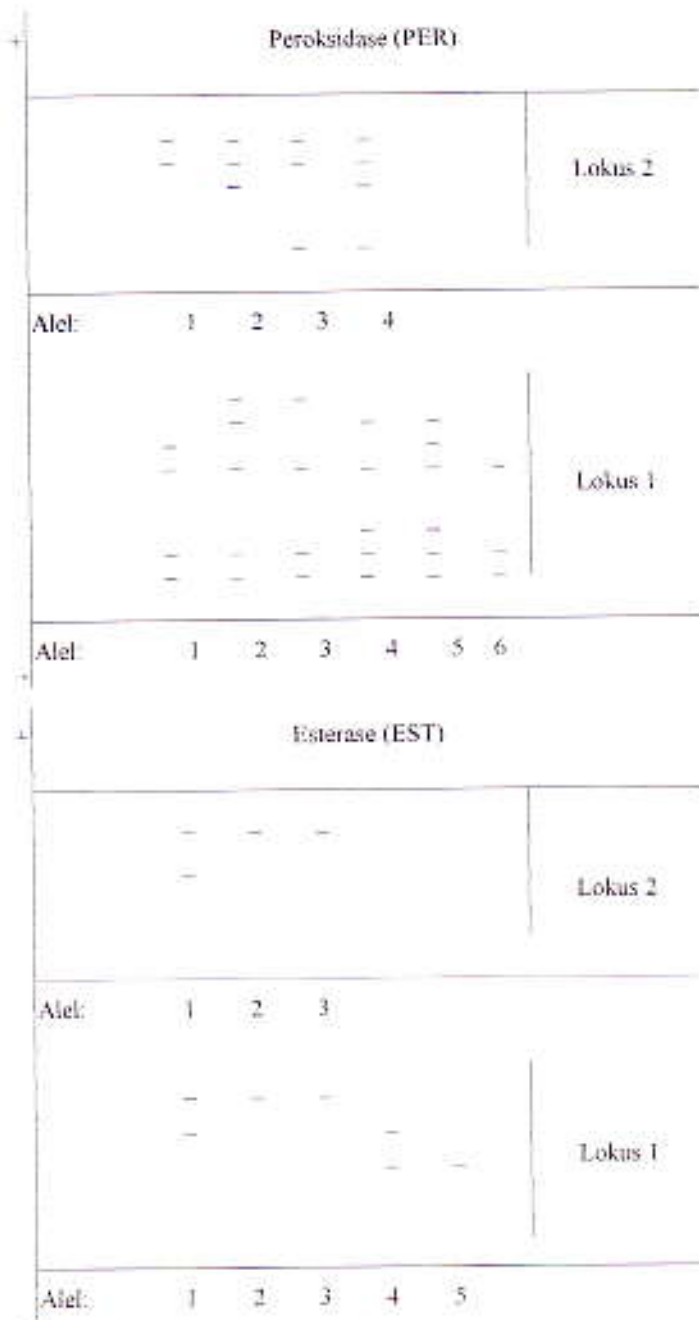
Hasil penafsiran elektrogram isoenzim peroksidase (PER) menunjukkan bahwa gen pengendalinya terdapat pada lokus 1 (PER-1) dan lokus 2 (PER-2). Berdasarkan keragaman pita yang dibedakan oleh ada tidaknya pita dan kecepatan migrasinya, maka pada lokus 1 dapat dideteksi mengandung enam alel dan lokus 2 mengandung empat alel (Gambar 2a). Sedangkan gen pengendali isoenzim esterase (EST) terdapat pada lokus 1 (EST-1) dan lokus 2 (EST-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.

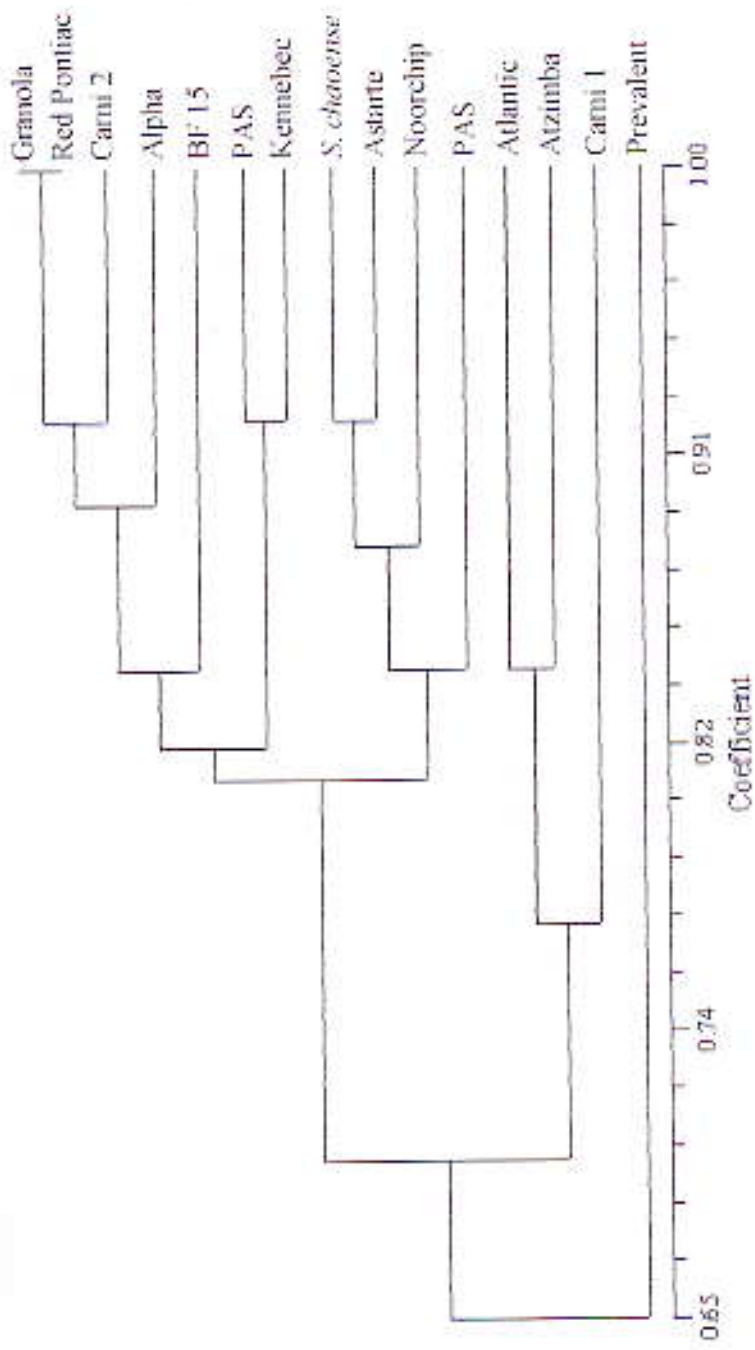


Gambar 1. Elektrogram peroksidase (a: atas) dan esterase (b: bawah)

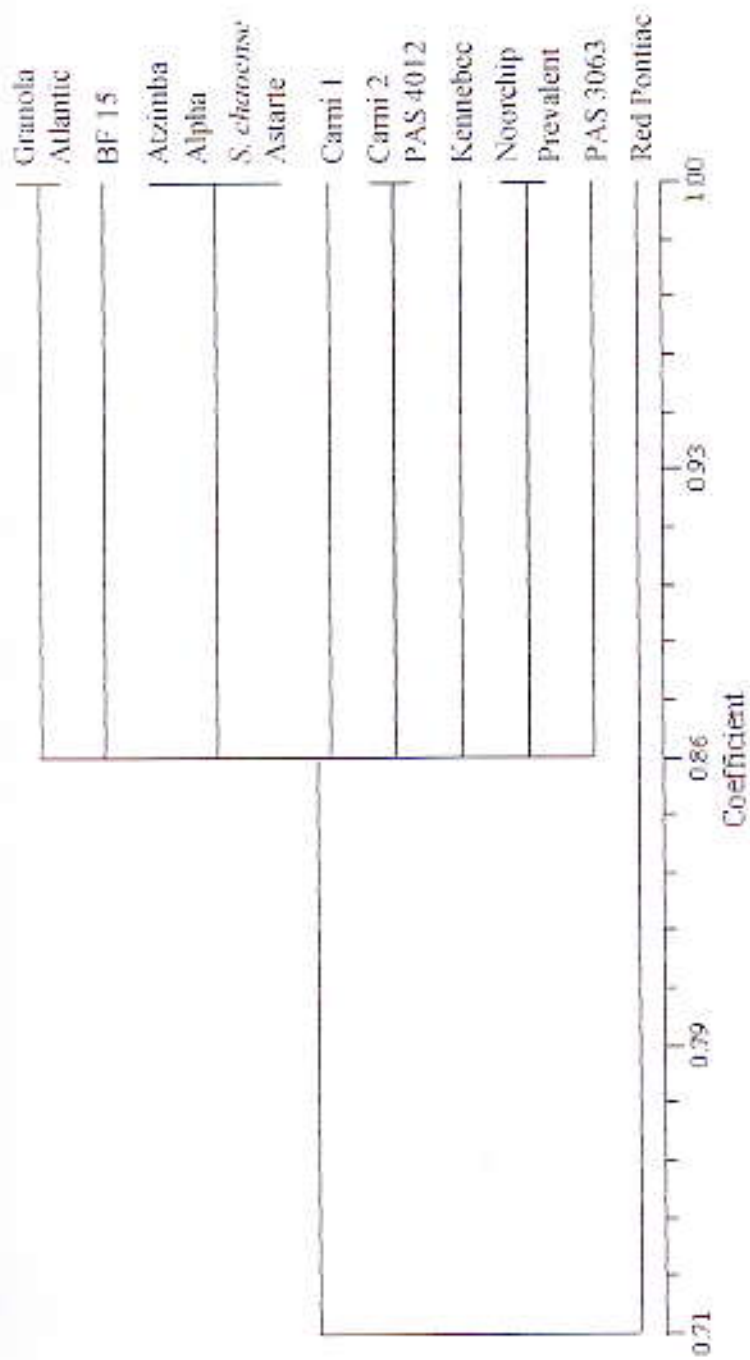


Gambar 2. Keragaman pita isoenzim pada setiap lokus: a. peroksidase dan b. esterase





Gambar 3. Dendrogram berdasarkan pita-pita pada isoenzim peroksidase (PER)



Gambar 4. Dendrogram berdasarkan pita-pita pada isoenzim esterase (EST)



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 peroksidase dan esterase disajikan pada Gambar 3 dan Gambar 4.

Pada Gambar 3 terlihat bahwa dengan koefisien kesamaan 0,65 terdapat dua kelompok besar genotipe/kultivar kentang, yaitu kelompok 1 yang terdiri atas satu genotipe (Prevalent) dan kelompok 2 yang terdiri atas 14 genotipe (Granola, Red Pontiac, Carni 2, Alpha, BF 15, PAS 4062, Kennebec, *S. chaoense*, Astarte, Noorchip, PAS 3063, Atlantic, Atzimba, dan Carni 1). Bila koefisiennya ditingkatkan menjadi 0,74, maka akan didapatkan tiga kelompok besar. Kelompok satu tetap terdiri atas satu genotipe (Prevalent), kelompok dua terdiri atas 11 genotipe ((Granola, Red Pontiac, Carni 2, Alpha, BF 15, PAS 4062, Kennebec, *S. chaoense*, Astarte, Noorchip, dan PAS 3063), dan kelompok tiga terdiri atas tiga genotipe (Atlantic, Atzimba, dan Carni 1).

Pada Gambar 4 terlihat bahwa dengan koefisien kesamaan 0,71 akan terdapat dua kelompok besar genotipe kentang, yaitu kelompok 1 terdiri atas satu genotipe (Red Pontiac) dan kelompok dua terdiri atas 14 genotipe (Granola, Atlantic, BF 15, Atzimba, Alpha, *S. chaoense*, Astarte, Carni 1, Carni 2, PAS 4062, Kennebec, Noorchip, Prevalent, dan PAS 3063). Sedangkan pada koefisien 0,9 akan terdapat lima genotipe bebas (Red Pontiac, PAS 3063, Kennebec, Carni 1, dan BF 15) serta empat kelompok genotipe. Kelompok 1 terdiri atas Granola dan Atlantic, kelompok 2 terdiri atas Atzimba, Alpha, *S. chaoense*, dan Astarte, kelompok tiga terdiri atas Carni 2 dan PAS 4062, serta kelompok 4 terdiri atas Noorchip dan Prevalent.

## VI. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Peubah isoenzim peroksidase dan esterase dapat dipergunakan untuk mendeteksi kekerabatan dan pengelompokan kemiripan genetik pada kultivar kentang.
2. Gen yang mengendalikan isoenzim peroksidase dan esterase masing-masing terdapat pada dua lokus.
3. Berdasarkan analisis keragaman pita isoenzim peroksidase dan esterase pada koefisien kesamaan 0,7 kultivar kentang terdiri atas satu kelompok genotipe dan satu individu/genotipe bebas.

Ucapan Terima Kasih

### DAFTAR PUSTAKA

- Anilsekar, 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 Internl 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 1*. Erlangga, Jakarta. Alih Bahasa oleh M. Thenawijaya.
- Meichinger, 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.
- 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.
- Yatim, W. 1991. *Genetika*. Tarsito, Bandung.