

**PENGUJIAN KELAYAKAN PENANDA GENETIK MIKROSATELIT DAN RAPD
UNTUK UJI KESERAGAMAN EMPAT GALUR TETUA HIBRIDA MENTIMUN
(*Cucumis sativus* L.)**

**ASSESSMENT OF MICROSATELLITE AND RAPD MARKERS AS TOOL FOR
UNIFORMITY TEST OF FOUR CUCUMBER PARENTAL LINES**

Ismatus Sa'diyah¹, Rudi Lukman², Aziz Purwantoro¹, Panjisakti Basunanda¹

ABSTRACT

*This study was carried out to assess the potential of SSR and RAPD markers for uniformity testing by comparing SSR and RAPD markers and morphological traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.) lines (1002-A, 1002-B, 1007-A and 1007-B). For this purpose, a set of 11 SSR primers and 18 RAPD primers were used to analyze four cucumber lines with 20 individuals per lines.*

Morphological marker testing done on 26 characters and shows high uniformity and only 2 characters that have 95% uniform. Tests with RAPD produce relevant loci and irrelevant loci to use in uniformity testing. Relevant RAPD loci are OPP14, OPP15, OPQ09, OPR19, OPS13, OPT01 and OPT12 and relevant SSR loci are CSJCT14, CSJCT252, SSR16301, SSR20354, SSR23148. The irrelevant loci needs to be re-examined for uniformity testing to ensure that they are expressed in the selected morphological characters. However, no significance different was found between the relevant loci of SSR and morphological data. SSR markers could be used to complement an uniformity testing in cucumber.

Key words: *Uniformity, cucumber, SSR, RAPD*

INTISARI

Penggunaan penanda mikrosatelit (SSR) dan RAPD diuji coba kemungkinannya dalam pengujian keseragaman. Keseragaman dalam pola penanda SSR dan RAPD diperbandingkan dengan keseragaman karakter morfologi pada empat galur tetua mentimun (*Cucumis sativus*) yang masing-masing diberi kode 1002-A, 1002-B, 1007-A, dan 1007-B. Dua puluh individu dari setiap galur diamati 26 karakter morfologinya. Profil penanda RAPD dilihat terhadap 18 primer acak dan sebelas pasang primer penanda mikrosatelit.

Keseragaman karakter morfologi sangat tinggi untuk keempat kelompok tetua dan hanya dua karakter yang menunjukkan keseragaman 95%. Di sisi lain, penanda-penanda mikrosatelit menunjukkan keragaman yang agak tinggi sampai sangat rendah. Dapat disimpulkan bahwa penanda mikrosatelit yang berkeragaman rendah, sehingga relevan bagi pengujian keseragaman material ini, adalah CSJCT14, CSJCT252, SSR16301, SSR20354, dan SSR23148. Pengujian menggunakan penanda RAPD menghasilkan lokus-lokus yang relevan bagi pengujian keseragaman adalah OPP14, OPP15, OPQ09, OPR19, OPS13, , dan OPT12. Sebagai simpulan umum, tidak ada perbedaan nyata yang ditemukan antara lokus SSR yang terpilih dan karakter morfologi. Penanda SSR yang telah diverifikasi dapat digunakan untuk menguji keseragaman pada mentimun. Penanda RAPD perlu dikaji ulang penggunaannya dalam pengujian keseragaman karena menunjukkan hasil yang berbeda dengan penanda morfologi.

¹Fakultas Pertanian Gadjah Mada, Yogyakarta

²PT. BISI International, Tbk, Sumberagung, Kediri

Kata kunci : Uji keseragaman, mentimun, RAPD, SSR

PENDAHULUAN

Sebelum suatu kultivar dilepas, dilakukan serangkaian pengujian terhadapnya yang dikenal secara populer sebagai Uji BUSS, sebagai singkatan dari Baru, Unik, Seragam, dan Stabil. Uji ini ekuivalen dengan DUS Test yang disyaratkan oleh Perserikatan Internasional bagi Perlindungan Varietas Tanaman Baru atau UPOV. Pengujian ini diperlukan untuk memenuhi syarat perlindungan varietas tanaman sebagai objek hukum, yaitu suatu varietas harus memenuhi kriteria sebagaimana tercantum dalam Pasal 1 ayat (vi) Konvensi UPOV tahun 1991 (UPOV 1991). Uji BUSS dilakukan terhadap karakter-karakter yang terlihat (fenotipe) dan pada umumnya ditanam dalam kondisi terkendali, meskipun disadari bahwa karakter fenotipe sangat dipengaruhi oleh lingkungan.

Sebagai bagian dari pengujian BUSS, uji keseragaman diperlukan untuk menjamin bahwa benih suatu varietas tanaman yang dilindungi adalah *true-to-type* dan ciri-ciri yang dimiliki tidak menyimpang dari yang telah ditentukan dalam pendaftarannya. Batas “tidak menyimpang” ini ditentukan pada suatu nilai bakuan (standar) tertentu. Hal ini biasanya tidak menjadi masalah bagi sifat kualitatif (kategoris) dan pada tanaman menyerbuk sendiri; namun tidak demikian pada sifat kuantitatif dan tanaman menyerbuk silang, termasuk mentimun.

Dorongan untuk menggunakan sifat lain selain fenotipe, terutama bagi sifat kuantitatif menguat semenjak diperkenalkannya teknologi pemuliaan berbantuan penanda genetik. Dalam penggunaan penanda genetik, seleksi dan identifikasi dikaitkan sebagian atau sepenuhnya pada serangkaian karakter yang diperoleh dari profiling suatu seri potongan berkas DNA atau tingkat ekspresi gen (baik transkrip, protein, atau metabolit) yang bervariasi dan dapat digunakan untuk membedakan atau mengelompokkan sehimpunan material objek uji. Dorongan penggunaan penanda genetik menguat terutama apabila dijumpai kesulitan teknis atau biaya yang besar dalam pelaksanaan uji keseragaman secara baku melalui karakter fenotipik. Selain itu, penggunaan penanda genetik relatif terbebas dari pengaruh lingkungan sehingga dapat membantu penggolongan material genetik yang tengah diuji, terutama bagi sifat-sifat kuantitatif.

Penggunaan penanda molekuler, yang lebih spesifik dan relatif tidak terpengaruh lingkungan, berpotensi digunakan sebagai alat penunjang dalam uji

BUSS bersama-sama dengan karakter morfologi dalam persyaratan uji BUSS. Meskipun demikian, menurut Cooke *et al.* (2003), penggunaan penanda molekuler sebagai uji BUSS belum diterapkan di berbagai negara.

Penelitian dengan RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) pada tanaman mentimun telah banyak dipublikasikan, seperti dalam perbedaan genetik galur mentimun dari negara-negara di Afrika dicari dengan penanda RAPD (Mliki *et al.*, 2003). Penggunaan SSR dalam uji BUSS telah diterapkan pada tanaman cabai (Kwon *et al.*, 2005), buncis (Smýkal *et al.*, 2008), dan padi (Moeljopawiro, 2007). Penanda ini juga dipakai dalam pengajuan perlindungan varietas tanaman sebagaimana dilaporkan oleh Xie (2001); De Rick (2001); Cooke & Reeves (2003); Ibanez & Eeuwijk (2003).

Meskipun sampai sekarang penggunaan SSR dan penanda molekuler lainnya belum diterima oleh UPOV (*International Union for the Protection of New Varieties of Plants*) atau instansi berwenang berbagai negara untuk uji keseragaman, rintisan penggunaan penanda molekuler perlu dilakukan untuk mempelajari permasalahan teknis atau aspek-aspek lain yang terkait dengannya. Penelitian ini mengkaji penggunaan penanda genetik, khususnya mikrosatelit dan RAPD sebagai alat pendukung pengujian keseragaman konvensional yang memakai karakter morfologi.

BAHAN DAN METODE

Empat galur tetua mentimun (*Cucumis sativus* L.) yang digunakan untuk membentuk dua kultivar hibrida, dengan kode masing-masing 1002-A, 1002-B, 1007-A dan 1007-B digunakan sebagai bahan percobaan. Sebanyak 20 benih diambil secara acak dari satu lot untuk masing-masing galur. Tanaman dibudidayakan secara konvensional di lahan dengan jarak tanam 10 × 10 cm. Saat dua minggu setelah tanam, sebagian jaringan daun yang telah cukup umur diambil untuk keperluan ekstraksi DNA.

Pengamatan karakter morfologi dilakukan sampai tanaman memasuki tahap panen terhadap 26 karakter menurut UPOV dan Panduan Pengujian Individu (PPI) mentimun (*Cucumis sativus* L.) oleh Dinas Pertanian. Ada enam sifat kuantitatif yang diamati sebagai penciri morfologi, sisanya sifat kualitatif. DNA diekstraksi dari daun segar menurut prosedur Doyle dan Doyle (1990) (metode CTAB) dengan modifikasi. Ekstrak DNA disimpan dalam bentuk larutan

stok dalam penyangga TE. Kuantifikasi DNA dilakukan dengan prosedur kontrol Lambda. Stok yang disiapkan untuk amplifikasi diencerkan dengan menggunakan larutan TE 1x pada pH 8 sehingga konsentrasi yang didapatkan sesuai dengan konsentrasi yang akan digunakan dalam PCR (± 10 ng per μ l). Amplifikasi dalam PCR melibatkan penanda mikrosatelit menggunakan sebelas pasang primer dan penanda RAPD menggunakan 18 primer operon.

Pengamatan morfologi dilakukan dengan membandingkan data observasi setiap individu contoh (sampel) dengan standar pertelaan (deskripsi) bagi setiap galur tetua (UPOV, 1991). Bagi karakter kuantitatif, terhadap data observasi dilakukan uji-t (SUMBER) untuk melihat kesesuaian antara pengamatan dengan nilai standar yang tertera pada deskripsi morfologi. Hipotesis nol adalah bahwa rerata populasi asal contoh sama dengan nilai standar. Selain uji mengenai rerata, terhadap data kuantitatif dilakukan pula uji keseragaman bahan genetik, dengan menerapkan uji untuk melihat apakah terdapat pencilan (*outlier*) dari ke-20 contoh yang ada dari Grubbs (1969):

$$G = \frac{\max_{i=1, \dots, n} |Y_i - \bar{Y}|}{s} \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan : G = Nilai uji Grubbs

Y_i =Nilai sampel

\bar{Y} = Rata-rata keseluruhan sampel

Untuk uji dua sisi, hipotesis bahwa tidak ada data pencilan akan ditolak pada tingkat signifikansi α jika

$$G > \frac{n-1}{\sqrt{n}} \sqrt{\frac{t^2_{(\frac{\alpha}{2n}; n-2)}}{n-2+t^2_{(\frac{\alpha}{2n}; n-2)}}} \dots\dots\dots (2)$$

apabila G = nilai Grubbs,

n = banyaknya sampel, dan

t α = Nilai t-Student pada tingkat nyata α .

Bagi karakter kualitatif, persentase penyimpangan karakter dihitung dan dibandingkan dengan batas penerimaan keseragaman sebagaimana yang dipakai oleh Fengge et al. (2005) yaitu Tingkat keseragaman dibagi menjadi empat kriteria yaitu sangat tinggi, tinggi, sedang, rendah dan sangat rendah

(Tabel 3.3). Kriteria ini didasarkan pada nilai rasio keseragaman (r) dan rerata r (R).

Tabel 1. Standar tingkat keseragaman menurut Fengge *et al* (2005).

Level	Standar
1 (Sangat tinggi)	(i) $R \geq 99\%$; atau (ii) $r \geq$ pada semua lokus
2 (Tinggi)	$95\% \leq R < 99\%$ dan tidak lebih dari 2 lokus SSR dengan $r \leq 85\%$
3 (Sedang)	(i) $95\% \leq R < 99\%$ dan tidak lebih dari 3 lokus SSR dengan $r \leq 85\%$; atau (ii) $90\% \leq R < 95\%$; atau (iii) $85\% \leq R < 90\%$ dan tidak lebih dari 2 lokus SSR dengan $r \leq 85\%$;
4 (Rendah)	$85\% \leq R < 90\%$ dan 3-4 lokus SSR dengan $r \leq 85\%$
5 (Sangat rendah)	(i) $R \leq 85\%$ atau (ii) tidak lebih kurang dari 5 lokus SSR dengan $r \leq 85\%$

Terhadap data penanda genetik, yang berupa data biner, dihitung persentase lokus polimorfik (PLP) untuk mengetahui tingkat polimorfisme pita yang terbentuk pada tiap nomor. Semakin rendah tingkat polimorfisme, semakin tinggi keseragaman material yang diuji. Persentase lokus polimorfik dihitung melalui

$$PLP = \frac{N(LP)}{N(LP)+N(LM)} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

dengan $N(LP)$ adalah banyaknya lokus polimorfik dan $N(LM)$ adalah banyaknya lokus monomorfik. Penghitungan PLP dihitung untuk setiap primer atau pasangan primer yang digunakan.

Nisbah individu menyimpang (NIM) adalah nisbah banyaknya individu menyimpang (memiliki polimorfisme) terhadap total individu yang diuji dari setiap galur. Nilai nisbah dilakukan terhadap data dari setiap lokus penanda RAPD maupun SSR. Rasio keseragaman (r) dihitung menurut Fengge *et al.* (2005) dengan rumus satu dikurangi NIM . Rerata nisbah keseragaman (R) untuk semua lokus SSR maupun RAPD dihitung dengan $R = \sum ri / t$ apabila ri adalah nisbah keseragaman dari suatu lokus i dan t adalah banyaknya keseluruhan lokus yang dianalisis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian dengan penanda morfologi menunjukkan bahwa populasi sampel yang digunakan dalam penelitian ini sudah seragam (100%) meskipun beberapa karakter seperti umur berbunga pada galur 1002-B serta panjang 15 buku pertama pada galur 1007-A memiliki nilai nisbah keseragaman 95% (Tabel 2). Meskipun demikian, hal ini dapat diterima berdasarkan aturan pada Panduan

Pengujian Individual Mentimun oleh Departemen Pertanian no. PVT/PPI/22/1 yang menyatakan bahwa pengujian keseragaman minimal dilakukan pada 20 sampel individu dengan peluang diterima paling sedikit 95%. Dalam kasus ukuran contoh, untuk populasi sebanyak 20 tanaman maka jumlah maksimum tanaman tipe simpang yang diperbolehkan adalah satu tanaman. Dalam penelitian ini, tanaman yang menyimpang untuk kedua karakter tersebut berjumlah satu sehingga masih disebut seragam.

Ada lima karakter kuantitatif yang masuk sebagai kriteria keseragaman (Tabel 3). Uji hipotesis untuk rerata sampel dibandingkan dengan nilai dalam deskripsi kultivar menunjukkan H0 ditolak untuk karakter panjang 15 buku pertama (semua galur), umur berbunga betina (semua galur), jumlah bunga betina tiap ruas (semua galur), panjang buah (semua galur) dan diameter buah (semua galur). Ini menunjukkan terjadi pengaruh lingkungan yang kuat sehingga penampilan keempat galur yang diuji menyimpang dari standar. Meskipun demikian, keseragaman tidak diukur sepenuhnya oleh rerata tetapi juga sebaran data. Oleh karena itu, digunakan uji Grubbs untuk melihat adanya data pencilan dalam sampel yang dipakai. Pencilan (*outliers*) muncul sebagai akibat data yang terlalu jauh menyimpang dari rerata, relatif terhadap data-data yang lain.

Tabel 2. Nisbah Keseragaman Karakter Kualitatif Menggunakan Penanda Morfologi

Variabel	1002-A			1002-B				1007-A			1007-B					
	Deskripsi	S	Ts	r	Deskripsi	S	Ts	R	Deskripsi	S	Ts	r	deskripsi	s	Ts	R
Tipe pertumbuhan	tak terbatas	20	0	1	tak terbatas	20	0	1	tak terbatas	20	0	1	tak terbatas	20	0	1
Ukuran helai daun	kecil (15,3 × 19,3 cm(p×l))	20	0	1	sedang (16,2×21,8 (p×l))	20	0	1	Kecil ((16,1×21,1 cm (P×L))	20	1	1	kecil (15,1 × 20,6 cm (p×l))	20	0	1
Tonjolan pada permukaan daun	Kuat	20	0	1	Sedang	20	0	1	sedang	20	0	1	sedang	20	0	1
Lekukan tepi daun	sangat kuat	20	0	1	Sedang	20	0	1	Kuat	20	0	1	lemah	20	0	1
Intensitas warna hijau daun	Sedang	20	0	1	Sedang	20	0	1	terang	20	0	1	sedang	20	0	1
Kerapatan duri	Sedang	20	0	1	Sedang	20	0	1	Jarang	20	0	1	jarang	20	0	1
Ukuran duri	Kecil	20	0	1	Kecil	20	0	1	Sangat kecil	20	0	1	sedang	20	0	1
Tipe duri	hanya rambut	20	0	1	hanya rambut	20	0	1	Hanya duri	20	0	1	hanya duri	20	0	1
keberadaan urat pada buah	Ada	20	0	1	Ada	20	0	1	Tidak ada	20	0	1	ada	20	0	1
ketonjolan urat pada buah	Sedang	20	0	1	Lemah	20	0	1	Lemah	20	0	1	Lemah	20	0	1

Keterangan : S = Seragam
Ts = Tidak Seragam
r = Nisbah Keseragaman

Lanjutan Tabel 2

Variabel	1002-A			1002-B			1007-A			1007-B		
	Deskripsi	S	T r	Deskripsi	S	T R	Deskripsi	S	T r	deskripsi	s	Ts r
warna urat dibanding warna dasar	lebih gelap	20	0 1	Lebih gelap	20	0 1	-	20	0 1	lebih gelap	20	0 1
keberadaan duri	Ada	20	0 1	Ada	20	0 1	Ada	20	0 1	Ada	20	0 1
bintik-bintik pada buah	Ada	20	0 1	Ada	20	0 1	Tidak ada	20	0 1	Ada	20	0 1
bintik-bintik yang mendominasi	besar dan tidak beraturan	20	0 1	kecil dan bulat	20	0 1	-	20	0 1	besar dan tak beraturan	20	0 1
intensitas bintik	Kuat	20	0 1	Sedang	20	0 1	-	20	0 1	Kuat	20	0 1
kepahitan pada ujung batang	tidak pahit	20	0 1	tidak pahit	20	0 1	tidak pahit	20	0 1	Pahit	20	0 1
jumlah duri	Jarang	20	0 1	Jarang	20	0 1	Jarang	20	0 1	Jarang	20	0 1
warna dasar kulit stadium dipasarkan	Hijau	20	0 1	Hijau	20	0 1	Hijau	20	0 1	Hijau	20	0 1
intensitas warna dasar kulit	Sedang	20	0 1	Sedang	20	0 1	Terang	20	0 1	Sedang	20	0 1

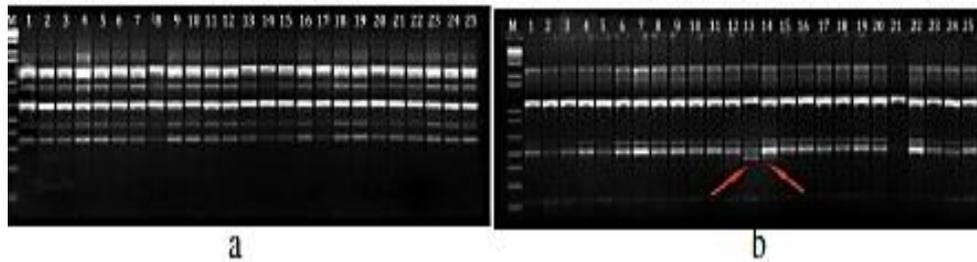
Keterangan : S = Seragam Ts = Tidak Seragam
r = Nisbah Keseragaman

Tabel 3. Nisbah Keseragaman Karakter Kuantitatif Menggunakan Penanda Morfologi

Variabel	1002-A			1002-B			1007-A			1007-B		
	Deskripsi	S	T R	Deskripsi	S	T R	Deskripsi	S	T r	deskripsi	s	T R
Panjang 15 buku pertama*	pendek (95,4 cm)	20	0 1	pendek (94,5 cm)	20	0 1	Pendek (84,3 cm)	9	1 1 1	panjang (121,7 cm)	9	1 1 1
Jumlah bunga betina tiap buku*	satu sampai tiga	20	0 1	satu sampai tiga	20	0 1	satu sampai tiga	20	0 1	satu sampai tiga	20	0 1
Umur bunga*	genjah (33,6 hari)	20	0 1	lambat (37 hari)	37	1 1 1	genjah (27 hari)	27	2 0 1	genjah (33 hari)	33	2 0 1
Panjang buah*	sangat pendek (21,7 cm)	20	0 1	sedang (20,5 cm)	20	0 1	Sedang (15 cm)	15	2 0 1	panjang (25,2 cm)	25	2 0 1
Diameter buah*	kecil (17,4 × 2,6 cm (p×l))	20	0 1	kecil (5,1 cm)	5,1	2 0 1	sedang (4,1 cm)	4,1	2 0 1	besar (5,8 cm)	5,8	2 0 1

Keterangan : S = Seragam Ts = Tidak Seragam
r = Nisbah Keseragaman * = Nilai berdasarkan hasil uji Grubbs.

Dalam pengujian keseragaman secara RAPD, alel-alel yang ada pada suatu lokus ditunjukkan dengan pita-pita DNA. Skor dibuat berdasarkan ada atau tidaknya pita yang muncul pada gel agarosa (Gambar 1.a dan 1.b)



Gambar 1. (a) Hasil Amplifikasi RAPD dengan Primer yang menunjukkan tingkat keseragaman 100%. (b) Hasil Amplifikasi RAPD dengan dua individu menyimpang

Gambar 1.a.. menunjukkan populasi yang memiliki tingkat keseragaman 100% dengan primer RAPD. Dari 25 sampel yang digunakan dalam pengujian, tidak ditemukan pita yang menyimpang. Gambar 1.b. menunjukkan ada dua individu yang menyimpang yaitu individu pada nomor 13 dan 14. Kedua individu tersebut memiliki pita DNA yang berbeda pada ukuran antara 300 – 400 pasang basa yang tidak dimiliki oleh individu lain seperti yang ditunjukkan oleh tanda panah.

Analisis persentase lokus polimorfik digunakan untuk mengetahui adanya polimorfisme pada primer-primer yang digunakan. Dalam pengujian keseragaman, adanya lokus polimorfis dalam suatu primer menunjukkan bahwa primer tersebut menunjukkan ketidakseragaman dalam satu galur (Tabel 4). Dari analisis diketahui bahwa polimorfisme primer tertinggi ada pada primer OPQ01 pada galur 1002-A. Persentase lokus polimorfik hanya digunakan untuk mengetahui secara awal adanya lokus yang menyimpang dari primer tersebut. Namun demikian, menurut Fengge *et al.* (2005), nilai keseragaman ditentukan oleh jumlah individu yang menyimpang dan bukan lokus polimorfik.

Lokus yang dihasilkan pada RAPD memiliki jumlah yang relatif lebih banyak dan tersebar secara acak. Dalam satu primer RAPD terdapat lokus yang memiliki pita-pita yang menyimpang maupun lokus-lokus yang memiliki pita-pita yang seluruhnya seragam. Individu menyimpang dihitung berdasarkan ada tidaknya lokus yang menyimpang dalam individu tersebut. Berdasarkan ada tidaknya individu yang menyimpang dalam populasi dihitung rasio keseragaman dengan penanda RAPD untuk masing-masing galur (Tabel 5).

Lokus-lokus RAPD yang diujikan memiliki nilai rasio keseragaman berbeda untuk masing-masing galur. Rerata rasio keseragaman pada galur 1002-A adalah 0,95; galur 1002-B memiliki rerata rasio 0,96; galur 1007-A

memiliki rerata rasio 0,98 sedangkan galur 1007-B memiliki rerata rasio 0,97. Nilai rasio keseragaman terendah ada pada galur 1002-A pada primer OPQ07 yaitu $r = 0,72$.

Tabel 4. Rasio keseragaman (r) pada galur-galur *Cucumis sativus* L. Dengan penanda RAPD. Primer yang dicetak miring dan diberi tanda (*) menghasilkan lokus yang seragam menurut kriteria PPI.

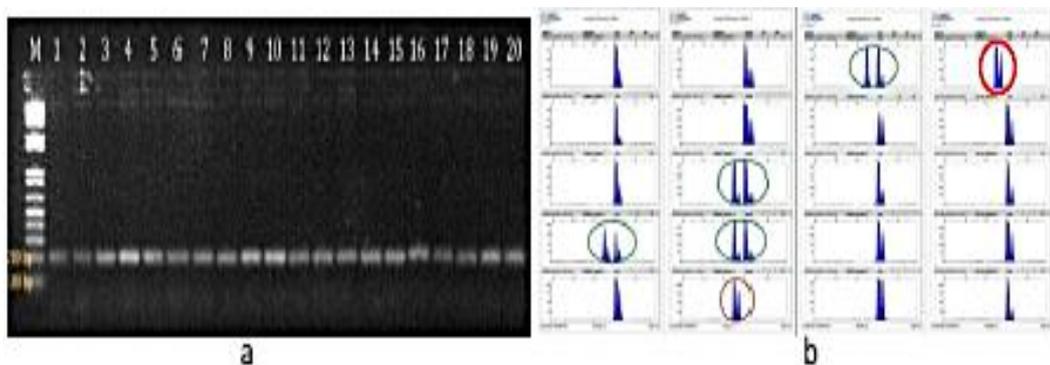
Primer	Rasio Keseragaman (r)			
	1002-A	1002-B	1007-A	1007-B
<i>OPP 14*</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>OPP 15*</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>OPQ 01</i>	0.92	1.00	1.00	1.00
<i>OPQ 03</i>	0.92	1.00	0.88	0.80
<i>OPQ 04</i>	1.00	0.76	1.00	1.00
<i>OPQ 07</i>	0.72	0.92	0.84	1.00
<i>OPQ 08</i>	1.00	0.96	1.00	0.88
<i>OPQ 09*</i>	1.00	0.96	1.00	1.00
<i>OPQ 13</i>	0.92	1.00	1.00	0.88
<i>OPQ 15</i>	0.92	0.76	0.92	0.92
<i>OPR 15</i>	0.88	1.00	1.00	1.00
<i>OPR 19*</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>OPS 12</i>	0.96	1.00	1.00	0.92
<i>OPS 13*</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>OPT 01*</i>	1.00	0.96	1.00	1.00
<i>OPT 08</i>	1.00	0.88	1.00	1.00
<i>OPT 12*</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>OPT 13</i>	0.84	1.00	0.96	1.00
Rerata r (R)	0.95	0.95	0.98	0.97
Level	2.00	2.00	2.00	2.00

Beberapa lokus menunjukkan keseragaman yang tinggi pada masing-masing galur. Primer *OPP 14*, *OPP 15*, *OPR 19* dan *OPT 12* menghasilkan lokus-lokus yang memiliki keseragaman tinggi untuk semua galur. Primer-primer yang lain memiliki nilai rasio keseragaman yang tidak konsisten pada setiap galur, meskipun nilainya masih cukup tinggi.

Apabila mengikuti kriteria PPI untuk mentimun, yang menyatakan bahwa keseragaman melebihi 95% ($r = 0,96$) masih dapat diterima, lokus-lokus yang dapat digunakan dalam pengujian keseragaman dengan penanda RAPD adalah *OPP14*, *OPP15*, *OPQ09*, *OPR19*, *OPS13*, *OPT01*, dan *OPT12*.

Elektroforesis gel pada SSR dilakukan pada dua platform yaitu gel agarosa dan sekuenser otomatis, yang dimaksudkan untuk membandingkan kedua platform ini.

Hasil menunjukkan bahwa kedua platform ini memiliki sedikit perbedaan pada hasil. Gel agarosa menghasilkan pita-pita DNA yang diukur dengan DNA ladder (Gambar 2.a) sedangkan sekuenser otomatis menghasilkan grafik yang diperoleh dari perangkat lunak *Genemapper 4.1* dengan ukuran basa dan intensitas yang telah diketahui secara otomatis (Gambar 2.b). Bahkan alat ini dapat digunakan untuk mengetahui urutan nukleotida yang dimiliki oleh DNA tersebut.

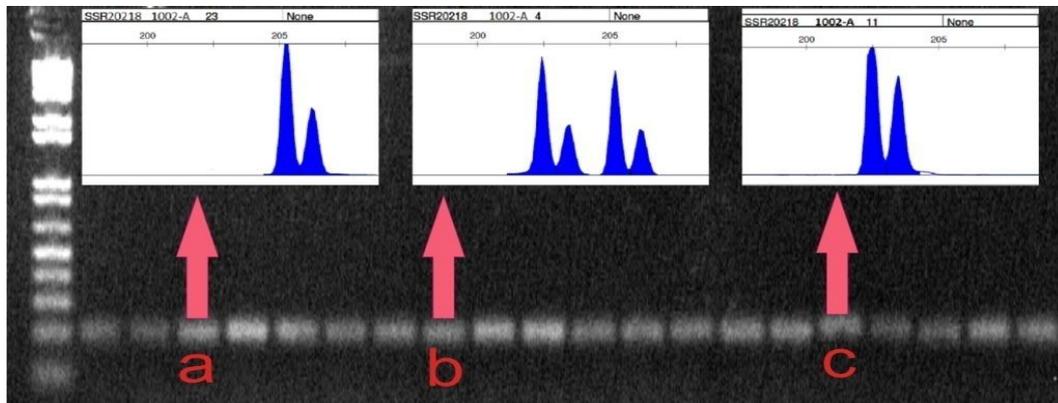


Gambar 2. Elektroforesis SSR dengan gel agarosa pada galur 1002-A dengan primer SSR20218.

Besarnya tingkat keakuratan pada gel agarosa dan sekuenser otomatis juga berbeda. Gel agarosa memiliki keakuratan sampai ukuran 100 *base pairs* (pasang basa/pb). Pada Gambar 2.a, DNA yang diuji dengan menggunakan gel agarosa menunjukkan tingkat keseragaman yang tinggi yaitu 100%. Semua pita DNA yang dihasilkan memiliki pola yang sama dan terletak pada lokus yang sama pula yaitu 200 bp. Namun demikian, pada pengujian menggunakan sekuenser otomatis, hasil yang terlihat sedikit berbeda (Gambar 2.b).

Gambar 2.b menunjukkan elektroforesis dengan menggunakan sekuenser otomatis dengan sampel yang sama. Pola-pola alel yang terbentuk berbeda pada beberapa individu. Pengujian keseragaman galur 1002-A pada lokus SSR20218 ini memiliki tiga tipe alel yang berbeda. Individu normal pada lokus ini memiliki satu alel dengan ukuran 205-206 pasang basa. Individu menyimpang pertama (lingkaran hijau) memiliki dua alel dengan ukuran 202-204 pasang basa serta 205-206 pasang basa. Individu menyimpang kedua (lingkaran merah) hanya memiliki alel pada ukuran 202-204 pasang basa. Pola alel menyimpang yang pertama (lingkaran hijau) memiliki proporsi yang lebih tinggi daripada yang

kedua. Perbedaan pola alel dan ukuran yang hanya 2 basa ini tidak terlihat ketika pengujian menggunakan gel agarosa (Gambar 3).



Gambar 3. Perbedaan elektroforesis gel dan *Genetic Analyzer*. Pita a menunjukkan pola normal, sedangkan pita b dan c adalah pola menyimpang.

Rasio keseragaman dengan penanda SSR dihitung berdasarkan keseragaman yang ditunjukkan oleh dua platform (Tabel 5)

Tabel 5. Rasio keseragaman (r) pada galur *Cucumis sativus* L. dengan penanda SSR. Primer yang dicetak miring dan diberi tanda (*) menghasilkan lokus yang seragam menurut kriteria PPI.

Primer	Rasio Keseragaman (r)							
	1002-A		1002-B		1007-A		1007-B	
	Agarosa	GA	Agarosa	GA	Agarosa	GA	Agarosa	GA
<i>CSJCT 14</i> *	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00	0.95
<i>CSJCT 252</i> *	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00	0.95
SSR 01099	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00	0.95	1.00	0.85
SSR 03514	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.90	1.00	0.80
SSR 06632	1.00	0.85	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.95
SSR 07284	1.00	1.00	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00
SSR 16301*	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
SSR 20218	1.00	0.70	1.00	1.00	1.00	0.65	1.00	1.00
SSR 20354*	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00
SSR 21544	1.00	1.00	1.00	0.80	1.00	1.00	1.00	1.00
SSR 23148*	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	1.00	0.95
Rerata r (R)	1.00	0.96	1.00	0.96	1.00	0.95	1.00	0.95

Primer-primer SSR memiliki nilai rasio keseragaman berbeda pada masing-masing galur. Primer yang konsisten menunjukkan nilai keseragaman yang tinggi adalah primer SSR16301 yang memiliki nilai keseragaman 100% untuk semua galur baik pada pengujian dengan media agarosa maupun sekuenser otomatis. Primer-primer yang lain menunjukkan nilai yang berbeda-beda untuk masing-masing galur. Lokus-lokus SSR yang relevan digunakan

dalam pengujian keseragaman adalah CSJCT14, CSJCT252, SSR16301, SSR20354, SSR23148.

KESIMPULAN

Dari pengujian keseragaman dengan penanda SSR, beberapa lokus penanda menunjukkan keseragaman lebih rendah daripada penanda morfologi. Perbedaan keseragaman dimungkinkan karena lokus-lokus SSR dan RAPD yang diujikan tidak semuanya diekspresikan secara langsung dengan sifat morfologi. Dengan demikian, lokus-lokus penanda yang belum seragam ini tidak relevan digunakan dalam pengujian keseragaman. Oleh karena itu, pemilihan lokus-lokus SSR yang terkait dengan karakter-karakter yang diinginkan dan rata-rata keseragaman untuk lokus-lokus tersebut perlu diperhatikan.

Penanda molekuler seperti SSR dan RAPD dapat digunakan sebagai alat pelengkap dalam uji keseragaman, dengan pemilihan primer-primer yang tepat yaitu primer-primer yang mewakili karakter yang diinginkan serta primer-primer yang menggambarkan rata-rata keseluruhan genom yang diuji.

DAFTAR PUSTAKA

- Cooke, R.J., G.M.M. Bredemeijer, M.W. Ganal, R. Peeters, P. Isaac, S. Rendell, J. Jackson, M.S. Röder, V. Korzun, K. Wendehake, T. Areshchenkova, M. Dijcks, D. Laborie, L. Bertrand, B. Vosman. 2003. Assessment of the uniformity of wheat and tomato varieties at DNA microsatellite loci. *Euphytica* 132 : 331–341.
- Danin-Poleg, Y., N. Reis, G.Tzuri, N. Katzir. 2001. Development and characterization of microsatellite markers in Cucumis. *Theor.Appl.Genet.* 102:61–72.
- De Rick, J. 2001. Are molecular markers strengthening plant variety registration and protection? *ISHS Acta Horticulturae* 552: XX International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals-Part I. Melle, Belgium, July 2001.
- Doyle, J. J. And J. L. Doyle. 1990. A rapid total DNA preparation for fresh plant tissue. *Focus* 12 : 13-15
- Fengge, W., Zhao, J., Dai, J., Guo, J., Wang, L., Yi, H., Yang, G. 2005. Assessment of the uniformity of chinese maize varieties by a set of SSR markers. International Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA Profiling in Particular. UPOV. Geneva.
- Grubbs, Frank. 1969. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples,. *Technometrics*, 11(1):1-21.
- Ibanez, J., and F.A. Eeuwijk. 2003. Microsatellite profiles as a basis for intellectual property protection in grape. *ISHS Acta Horticulturae* 603: VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding. Kecskemet. Hungary, April 2003.

- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K. 2011. Microsatellite markers : An overview of the recent progress in plant. *Euphytica* 177 : 309–334.
- Kwon, Y.S., Lee, J.M., Yi, G.B., Yi, S.I., Kim, K.M., Soh, E.H., Bae, K.M., Park, E.K., Song, I.H., Kim, B.D., 2005. Use of SSR marker to complement tests of Distinctiveness, Uniformity and Stability (DUS) of pepper (*Capsicum annum*) varieties. *Molecules and Cells* 19: 428–435.
- Mliki, A., J.E. Staub, S. Zhangyong, A. Ghorbel. 2003. Genetic diversity in African cucumber (*Cucumis sativus* L.) provides potential for germplasm enhancement. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 461–468.
- Moeljopawiro, S. 2007. Marka mikrosatelit Marka Mikrosatelit Sebagai Alternatif Uji Buss Dalam Perlindungan Varietas Tanamam Padi. *Zuriat*. 18 (2):129-138.
- Smýkal, P., Horáček, J., Dostálová, R, Hýbl, M. 2008. Variety Discrimination in Pea (*Pisum sativum* L.) by Molecular, Biochemical and Morphological Markers. *J Appl. Genet.* 49: 155-166
- UPOV. 1991. International Convention for the Protection of New Variety of Plant. [<http://www.upov.int/en/publications/conventions/1991/act1991.htm>]. Diakses 20 Oktober 2012.
- Xie, F.M. 2001. Inbred rice lines A0044 and B0044. United States Patent 6294717. US Patent Issued on September 25, 2001.