

KONFIRMASI GEN YANG MENCIRIKAN EKSPRESI ANTOSIANIN PADA BUNCIS (*Phaseolus vulgaris* L.)

GENE CONFIRMATION THAT CHARACTERIZE ANTHOCYANIN EXPRESSION IN COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

Freta Kirana Ballardona^{*)}, Darmawan Saptadi dan Andy Soegianto

Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang 65145, Indonesia

^{*)}E-mail: fretaballadona@gmail.com

ABSTRAK

Peningkatan permintaan buncis dari luar negeri membuat beberapa varietas lokal tersisih karena varietas introduksi yang berasal dari luar negeri tersebut memiliki kandungan gizi lebih banyak dari varietas lokal. Salah satu cara meningkatkan kualitas buncis lokal adalah persilangan antara varietas lokal dan varietas introduksi. Namun identifikasi secara fenotipik memiliki beberapa kelemahan. Maka dari itu, perlu dilakukan identifikasi molekuler pada tetua dan hasil persilangan buncis tersebut. Tujuan: mengonfirmasi keberadaan gen antosianin pada beberapa aksesori buncis berdasarkan penanda gen antosianin melalui pendekatan tetua dengan keturunan berikutnya. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 isolat DNA buncis persilangan lokal dan introduksi dan 3 primer SSR (MdMYB9, MdMYB12 dan MdMYB17). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Mei 2015 di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Berdasarkan hasil amplifikasi terlihat bahwa ketiga primer tersebut bersifat polimorfis. Hal ini membuktikan bahwa primer spesifik antosianin tersebut dikonfirmasi pada buncis. Berdasarkan panjang pita DNA yang ditinjau pada *Purple Queen* dan *Gogo Kuning (tertua,)* sama dengan keturunannya GK x PQ, PQ x GK, PQ x GI, GI x PQ dan GK x CS.

Kata kunci: SSR, Polimorfisme, Gen, Antosianin.

ABSTRACT

The increase in demand for introduction variety of common bean has made some local varieties becoming unfavorable. Therefore, one of the ways to improve the quality of local varieties is by creating a new variety such as crossing between local varieties and introduction varieties. However, phenotypic identification has some weaknesses. Therefore, it is necessary to identify the molecular to the parental and its line of common bean crossing. The purpose: to confirm some primers of anthocyanin polymorphism, which can be used as marker gene anthocyanin through parental approach. Materials used: the 12 isolates DNA introduction varieties bean plants crossbreeding with local varieties Surakarta, three specific microsatellite primer anthocyanins (MdMYB9, MdMYB12 and MdMYB17). This research was held in the Laboratory of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Brawijaya University in February-May 2015. Based on the amplification result, it shows that the three primers are polymorphic. This proves that the specific primers anthocyanin can be confirmed on the common beans. Based on the size of DNA band under review is whether the size at Purple Queen and Gogo Kuning (parental) equal to the line GK x PQ, PQ x GK, PQ x GI, GI x CS, PQ and GK.

Keywords : SSR, Polymorphism, Gene, Anthocyanin.

PENDAHULUAN

Menurut data statistik produksi tanaman sayuran buncis di Indonesia pada tahun 2012-2013 berkisar 322.145-327.378 ton dan rata-rata hasil sayuran buncis pada tahun 2013 meningkat 5,23 ton (BPS, 2014). Akan tetapi, peningkatan permintaan buncis dari luar negeri membuat beberapa varietas lokal tersisih karena varietas introduksi yang mana berasal dari luar negeri tersebut memiliki kandungan gizi yang lebih banyak seperti kandungan antosianin (Rubyogo *et al.*, 2007). Maka dari itu, salah satu cara untuk meningkatkan kualitas varietas lokal tersebut adalah dengan menciptakan suatu varietas baru yang mengandung antosianin, untuk melengkapi varietas lokal yang telah ada.

Persilangan antara varietas lokal dan varietas introduksi (Purple Queen) yang dilakukan oleh Oktarisna *et al.* (2013). Pada identifikasi awal secara fenotipik persilangan tersebut memiliki hasil perbandingan nisbah 3:1 yang menunjukkan adanya gen tunggal dominan yang mengendalikan karakter warna polong pada hasil persilangan tanaman buncis. Namun identifikasi secara fenotipik memiliki beberapa kelemahan yaitu terdapat beberapa gen yang belum terekspresi, seperti: beberapa hasil persilangan tersebut tidak memiliki warna ungu seperti yang diharapkan. Maka dari itu, perlu dilakukan identifikasi molekuler pada tetua dan hasil persilangan buncis tersebut. Salah satu metode penanda molekuler adalah dengan menggunakan metode SSR (Simple Sequence Repeat).

SSR memiliki beberapa kelebihan, yaitu: SSR memiliki susunan yang kodominan, dapat digunakan untuk multiallel dan dapat dilakukan dalam penelitian di laboratorium melalui primer sequence yang telah dipublikasikan (Hale, 2003). Dalam hal ini, primer produksi antosianin spesifik untuk buncis belum ditemukan, sehingga perlu adanya penelitian dan pengembangan penanda DNA gen antosianin pada buncis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Februari 2013 hingga Mei 2015 di laboratorium bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

Ekstraksi DNA

Bahan yang digunakan dalam ekstraksi DNA adalah 10 isolat DNA tanaman buncis persilangan varietas introduksi dengan varietas lokal Surakarta, yaitu: 1. Gogo Kuning (Ungu), 2. Cherokee Sun (Kuning), 3. Purple Queen (Ungu), 4. Gilik Ijo (Hijau), 5. Mantili (Hijau), 6. GK x PQ (Ungu), 7. PQ x GK, (Ungu), 8. PQ x GI (Ungu), 9. GI x PQ (Ungu), 10. GK x CS (Ungu), tris, HCl, ethanol 70 %, EDTA, H₂O, NaCl, dan kloroform.

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengacu pada protokol ekstraksi CTAB Doyle dan Doyle (1990).

Pelaksanaan PCR

Bahan yang digunakan dalam proses PCR adalah Taq polimerase, dd H₂O, 3 primer dan DNA template dari masing-masing galur. 3 primer mikrosatelit spesifik antosianin (MdMYB9, MdMYB12 dan MdMYB17). Alat yang digunakan adalah mesin PCR, tube PCR, tip dan micropipet. Pelaksanaan PCR dimulai dengan pre-denaturasi 2 menit dan suhu 94°C dengan 35 siklus. Lalu dilanjutkan dengan denaturasi dengan suhu 94°C selama 30 detik. Annealing dengan suhu 49°C selama 30 detik dan elongasi dengan suhu 72°C selama 1 menit. *Final extension* dengan suhu 72°C selama 1 menit.

Elektroforesis

Bahan yang digunakan dalam elektroforesis adalah DNA marker, sampel DNA hasil amplifikasi, gel agarosa 1% (0,4 gram), larutan *buffer* TAE 1x yang telah diencerkan, *loading dye*, dan larutan *Etidium Bromid* (EtBr) sebagai pewarna.

Alat yang digunakan dalam elektroforesis adalah timbangan, spatula, gelas ukur, labu erlenmeyer, sarung tangan, oven, seperangkat mikropipet beserta tipnya, kertas parafilm, cetakan agarose,

sisir agarose, baki elektroforesis, *gel doc*, dan kamera digital.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA

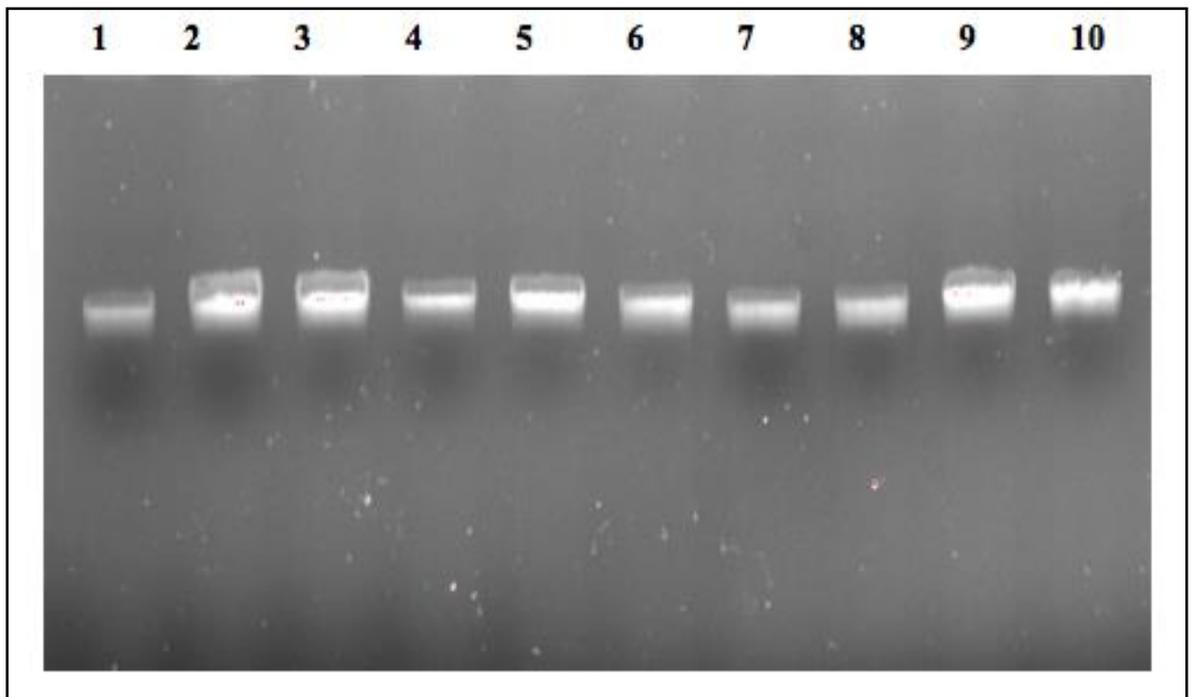
Di dalam penelitian ini, teknik isolasi DNA menggunakan teknik CTAB berdasarkan penelitian Doyle dan Doyle (1990) dan pengecekan kualitas DNA menggunakan gel elektroforesis 1%. Hasil elektroforesis dari seluruh genom tersebut terlihat bahwa DNA yang diperoleh merupakan DNA yang utuh (Gambar 1). DNA yang utuh ditandai dengan tidak adanya smear DNA yang dielektroforesis. Hal ini menjadi penting karena pada proses PCR, DNA yang masih utuh akan lebih memberikan hasil yang relatif lebih akurat.

Pita genom DNA yang bersih mengindikasikan tingkat kemurnian DNA

yang baik (DNA tidak tergradasi dan terkontaminasi).

Kontaminasi oleh fenol dan bahan organik lainnya seperti polisakarida dan metabolit sekunder seperti tanin, pigmen, alkaloid dan flavonoid dapat dilihat dengan munculnya latar belakang yang smear disepanjang jalur pergerakan pita genom DNA. Jika ditemukan adanya kontaminasi RNA maka ditandai dengan adanya pita yang kabur pada posisi berat molekul yang rendah (Tenriulo *et al.*, 2001).

Hal diatas dapat dihindari dengan penggunaan PVP dan mercaptoethanol akan mereduksi senyawa-senyawa fenolik yang keberadaannya dapat merusak kualitas DNA. Selain itu penggerusan secara langsung sampel segar tanpa penyimpanan selama semalam (Syafaruddin dan Santoso, 2011



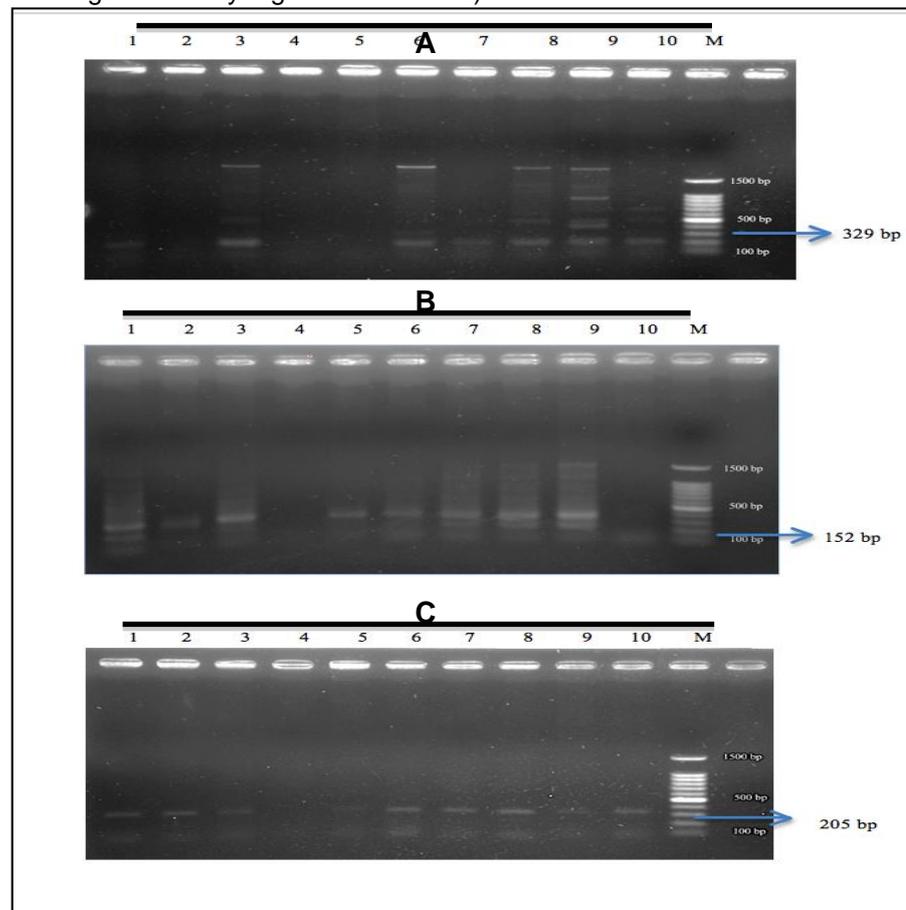
Gambar 1 Hasil Pengecekan Kualitas DNA Buncis dengan gel elektroforesis 1%, (1) Gogo Kuning (GK), (2) Cherokee Sun (CS), (3) Purple Queen (PQ), (4) Gilik Ijo (GI), (5) Mantili (M), (6) GK x PQ, (7) PQ x GK, (8) PQ x GI, (9) GI x PQ, (10) GK x CS, aksesori *P. vulgaris* L.

Amplifikasi Gen MdMYB9, MdMYB12, MdMYB17

Pada tahap selanjutnya, setelah memiliki hasil isolasi DNA yang baik, pemilihan marka (penanda) yang digunakan juga penting. Tingkat keberhasilan amplifikasi dari teknologi marka (penanda) tergantung dari tersedianya dalam jumlah yang besar tingkat polimorfisme yang tinggi, di dalam pautan (linkage) yang mendekati antara lokus kandidat marka dengan gen yang diinginkan dan juga kemudahan dalam penggunaan marka tersebut (Yu *et al.*, 2000). Primer yang digunakan dalam mendeteksi kandungan antosianin pada buncis di dalam penelitian ini adalah beberapa kandidat gen MYB yang telah

ditemukan motif pengulangan penanda SSR pada apel.

Primer yang digunakan dalam mendeteksi kandungan antosianin pada buncis di dalam penelitian ini adalah beberapa kandidat gen MYB yang telah ditemukan motif pengulangan penanda SSR pada apel. MYB merupakan protein yang mengatur flavonoid pathway biosintesis khususnya antosianin di berbagai macam tanaman (Faramzi *et al.*, 2014) dan komponen kunci dalam mengaktifasi gen-gen sintesa antosianin seperti gen produksi antosianin, aktivator atau inhibitor antosianin (PAP1/MYB75, MYB9, MYB12 dan MYB17) (Tako *et al.*, 2006). (Gambar 2)



Gambar 2 Representasi hasil amplifikasi PCR menggunakan gel elektroforesis 1% menggunakan primer (A) MdMYB9, (B) MdMYB12 dan (C) MdMYB17 pada tanaman buncis: (1) Gogo Kuning (GK), (2) Cherokee Sun (CS), (3) Purple Queen (PQ), (4) Gilik Ijo (GI), (5) Mantili (M), (6) GK x PQ, (7) PQ x GK, (8) PQ x GI, (9) GI x PQ, (10) GK x CS, aksesi *P. vulgaris* L.

Berdasarkan hasil amplifikasi terlihat bahwa dari ketiga primer tersebut bersifat polimorfis dan ada beberapa yang memiliki lebih dari satu alel. Hal ini membuktikan bahwa primer spesifik SSR antosianin tersebut dapat dikonfirmasi pada buncis. Namun, tidak hanya melihat dari kesesuaian marka yang digunakan melainkan juga kesesuaian dengan kemunculan alel pada aksesori buncis tersebut. Primer yang diinginkan merupakan primer yang hanya terkonfirmasi pada aksesori buncis Gogo Kuning, Purple Queen, GK x PQ, PQ x GK, PQ x GI, GI x PQ dan GK x CS karena berwarna ungu yang mencirikan adanya kandungan antosianin. Sedangkan kesesuaian primer pada hasil amplifikasi tersaji dalam (Tabel 1), dibawah ini:

Di dalam Tabel 1 terlihat bahwa primer yang dapat digunakan sebagai penanda gen antosianin adalah primer yang telah dikonfirmasi melalui polimorfisme pita DNA pada seluruh aksesori buncis dan kecenderungan monomorfisme pada tetua buncis Purple queen dan keturunannya serta kesesuaian panjang pita DNA tersebut. Jika dibandingkan dengan ketiga

primer tersebut, primer yang sesuai dengan kriteria adalah primer MdMYB9 yang mana primer tersebut merupakan primer gen produksi antosianin (Chagne *et al.*, 2007). Jika ditinjau melalui keberadaan alel, gen MdMYB9 menunjukkan bahwa hanya buncis yang berpolong ungu yang dapat menunjukkan pita DNA. Hal ini berarti hanya pada buncis yang berpolong ungu ditemukan gen produksi antosianin. Sedangkan primer yang lain, buncis yang tidak berpolong ungu ada beberapa yang dapat menunjukkan pita DNA. Pada primer MYB12, pada buncis Gilik Ijo muncul satu alel karena gen MYB12 yaitu aktivator antosianin (Chagne *et al.*, 2007) terkonfirmasi pada buncis berwarna hijau, sehingga berpotensi adanya MdMYB12 yaitu aktivator antosianin selain dari pada buncis yang memiliki polong berwarna ungu. Pada primer MdMYB17 juga muncul satu alel pada buncis Cherokee Sun yaitu memiliki warna kuning sehingga gen MYB17 yaitu sebagai gen inhibitor antosianin (Chagne *et al.*, 2007) berpotensi muncul pada buncis selain dari pada warna ungu.

Tabel 1 Amplifikasi pada Masing-Masing Primer

Nama Aksesori	Warna Polong	MYB9		MYB12		MYB17	
		Alel	Panjang (bp)	Alel	Panjang (bp)	Alel	Panjang (bp)
Gogo Kuning (GK)	Ungu	+	150	+	250	+	300
Cherokee Sun (CS)	Kuning	-	-	-	-	+	300
Purple Queen (PQ)	Ungu	++	200 dan >1500	+	300	+	350
Gilik Ijo (GI)	Hijau	-	-	+	300	-	-
Mantili (M)	Hijau	-	-	-	-	-	-
GK x PQ	Ungu	++	200 dan >1500	+	300	+	350
PQ x GK	Ungu	+	200	+	300	+	350
PQ x GI	Ungu	++	200 dan >1500	+	300	+	350
GI x PQ	Ungu	++++	200, 400, 900 dan >1500	++	300 dan 250	+	350
GK x CS	Ungu	++	200 dan >1500	-	-	+	350

Keterangan: + = keberadaan dan jumlah alel.
- = null allele (tidak ada alel).

Freta Kirana Balladona, et al: *Konfirmasi Gen yang Mencirikan Ekspektasi Antosianin.....*

Kemudian, ditinjau dari panjang pita DNA menunjukkan bahwa tidak ada alel yang menunjukkan panjang yang sesuai informasi yang tertera pada (Chagne *et al.*, 2007). Hal ini dikarenakan informasi primer pada penelitian tersebut berasal dari aksesori apel. Sedangkan ditinjau dari kekerabatan antara apel dan buncis sangat jauh. Sehingga, tidak dapat dikonfirmasi dengan tepat panjang alel gen antosianin tersebut. Penggunaan SSR antar spesies tidak menutup kemungkinan karena telah dibuktikan melalui penelitian Saptadi *et al.* (2011), namun pada tingkat keberhasilan pada penggunaan primer tersebut lebih tinggi jika jarak kekerabatan tanaman tersebut semakin dekat. Sehingga dalam penelitian ini, berdasarkan panjang pita DNA yang ditinjau adalah panjang pada Purple Queen dan Gogo Kuning (tetua) sama dengan keturunannya GK x PQ, PQ x GK, PQ x GI, GI x PQ dan GK x CS. Panjang pita DNA yang paling sesuai dan mendekati antara tetua dan keturunannya adalah pada primer MYB9. Ada beberapa asumsi penyebab ketidaksesuaian panjang primer dan jumlah alel dengan informasi yang tersedia yaitu perbedaan aksesori yang dipakai dan tersedia maupun tidak tersedia gen produksi, aktivator dan inhibitor pada tanaman buncis tersebut.

Menurut penelitian Reddy (1996) mengenai genetika dan analisis molekuler jalur pigmen antosianin menyatakan bahwa interaksi gen nonallelik mengarah ke modifikasi dari rasio fenotip F₂. Sistem pigmen antosianin gen terdiri dari terutama tiga gen dasar: C (chromogen), A (aktivator), dan P (distributor). Gen yang telah dikenal dapat dikelompokkan ke dalam gen struktural sementara dan gen pengatur (regulator). Di antara gen struktural: gen C, A, Rc, dan Rd dapat mengkodekan enzim dari jalur sedangkan gen pengatur: P dan Pl, dengan alel yang beragam, menentukan regulasi temporal dan spasial pigmentasi. Selain itu, dominan inhibitor nonallelik pada lokus telah ditemukan. Pola pigmentasi antosianin dalam tanaman padi dengan demikian ditentukan terutama oleh status alel gen individu dan interaksi yang kompleks di antara mereka. Pada penampilan fenotip gen struktural dan

regulator dapat ditemukan beragam alel yang mengaktivasi gen tersebut dan ada juga kemunculan null allele atau tidak ada alel.

KESIMPULAN

Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa dijumpai gen yang mencirikan ekspresi gen antosianin pada seluruh aksesori tanama buncis dari ketiga primer yang diujikan dan berdasarkan jumlah dan panjang alel pada beberapa tetua buncis yaitu Purple Queen dan Gogo Kuning hampir sama dengan galur-galur keturunannya.

DAFTAR PUSTAKA

- BPS. 2014.** Produksi sayuran Indonesia, 1997-2013.
http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php?kat=3&tabel=1&daftar=1&id_subyek=55¬ab=70. Diakses pada tanggal 1 November 2014.
- Chagné, D., C. M. Carlisle, C. Blond, R. K. Volz, C. J. Whitworth, N. C. Oraguzie, R. N. Crowhurst, A. C. Allan, R. V. Espley, R. P. Hellens and S. E. Gardiner. 2007.** Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple. *BMC Genomic* 1(8): 212-223.
- Doyle, J.J. dan J.L. Doyle. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* (12): 13-15.
- Hale, A. L. 2003.** Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating russet norkotah strains using AFLP and microsatellite marker analysis. Desertation. Texas A&M University. USA
- Oktarisna, F. A., A. Soegianto, A. N. Sugiharto. 2013.** Pola pewarisan sifat warna polong pada hasil persilangan tanaman buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) varietas introduksi dengan varietas lokal mantili. *Jurnal Produksi Tanaman*. 2(1): 81-89.
- Reddy, A. R. 1996.** Genetic and molecular analysis of the anthocyanin

Freta Kirana Balladona, et al: *Konfirmasi Gen yang Mencirikan Ekspektasi Antosianin.....*

- pigmentation pathway in rice. *Proceeding of International Third Rice Genetics Symposium*.p.341-352.
- Rubyogo, J.C., L. Sperling dan T. Assefa. 2007.** Pendekatan baru guna memfasilitasi akses petani pada benih buncis. Artikel. Ethiopian Institute Agriculture Addis Ababa. Penerjemah Salam. Ethiopia.
- Saptadi, D., R.R.S. Hartati. A. Setiawan, B. Heliyanto dan Sudarsono. 2011.** Pengembangan marka simple sequence repeat untuk *Jatropha* spp. *Jurnal Littri* 17(4): 140 – 149.
- Syafaruddin dan T. J. Santoso. 2011.** Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Littri* 17 (1): 11-17.
- Takos, A. M., F. W. Jeffé, S. R. Jacob, J. Bogs, S. P. Robinson dan A. R. Walker. 2006.** Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Journal of Plant Physiology* (142): 1216-1232.
- Tenriulo, A., E. Suryati, A. Parenrengi dan Rosmiat. 2001.** Ekstraksi DNA rumput laut kappaphycus alvarezii dengan metode fenol kloroform. *Marina Chimica Acta* 2(2): 6-10.
- Yu, K., S. J. Park, V. Poysa dan P. Gepts. 2000.** Integration Simple Sequence Repeat (SSR) markers into molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Heredity* 91 (6): 429-434.