

Pengembangan Marka SNAP Berbasis *Resistance Gene Analogue* Pada Tanaman Pisang (*Musa spp.*) (*Development of SNAP Marker Based On Resistance Gene Analogue Genomic Sequences in Banana (Musa spp.)*)

Sutanto, A¹⁾, Hermanto, C¹⁾, Sukma, D²⁾, dan Sudarsono²⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika, Jl. Raya Solok- Arian Km. 8, Solok 27301

²⁾Laboratorium PMB, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, IPB, Jl. Meranti, Dramaga, Bogor 16680

Email: bagusutanto@yahoo.com

Naskah diterima tanggal 24 Juli 2013 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 25 November 2013

ABSTRAK. Pengembangan kultivar pisang tahan penyakit secara konvensional menghadapi kendala utama, yaitu lamanya waktu yang diperlukan untuk seleksi dan evaluasi tanaman hasil persilangan. Oleh karena itu dilakukan pendekatan bioteknologi melalui pengembangan marka molekuler untuk mempercepat pencapaian program pemuliaan. Tujuan penelitian ialah mengembangkan marka SNAP untuk seleksi ketahanan tanaman pisang terhadap penyakit berdasarkan substitusi basa nukleotida atau *single nucleotide polymorphism* (SNP) pada fragmen *resistance gene analogue* (RGA) asal tanaman pisang (MNBS). Kegiatan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekular Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, mulai Bulan Juli sampai November 2012. Penelitian menggunakan sembilan sekuen MNBS yang terdeposit pada bank data NCBI untuk mendisain primer SNAP yang diperlukan. Dari 30 posisi SNP yang ada pada fragmen MNBS, terdapat 19 posisi SNP yang menyebabkan perubahan asam amino yang disandikan. Delapan posisi SNP di antaranya dapat digunakan untuk pengembangan marka SNAP. Dengan menggunakan perangkat lunak WebSNAPER, primer SNAP berhasil didisain dari delapan posisi SNP. Namun satu posisi SNP menghasilkan seperangkat primer yang tidak layak pakai. Dari 64 alternatif primer SNAP yang dihasilkan berhasil dipilih 14 pasang primer SNAP. Sepuluh dari 14 pasang primer terpilih, dihasilkan dari posisi SNP1, SNP2, SNP4, SNP5, dan SNP6. Sepuluh pasang primer SNAP terpilih juga telah diuji dan berhasil mengamplifikasi marka SNAP menggunakan DNA genom pisang cv. Klutuk Wulung dan Barangan. Sepuluh pasang primer SNAP tersebut berpotensi untuk digunakan sebagai marka ketahanan terhadap penyakit pada tanaman pisang secara umum.

Katakunci: Marka molekuler; SNP; SNAP; Ketahanan penyakit; *Musa spp.*

ABSTRACT. Development of resistance banana cultivars through conventional breeding methods faces main constrain that is long period for selecting and evaluating of the new hybrids. Therefore, the support of biotechnology approaches and molecular markers on banana breeding will be beneficial. The objectives of this research were to identify SNP of RGAs isolated from banana (MNBS) and to develop SNAP marker. The experiment was conducted at Laboratory of Plant Molecular Biology, Faculty of Agriculture, Bogor Agricultural University, from July to November 2012. The experiment used nine MNBS sequences obtained from GenBank for designing of the SNAP marker. Out of 30 SNP sites existed in the genomic fragment of MNBS genes, 19 sites caused amino acid substitution but only eight SNP positions can be used for SNAP marker development. Designing the SNAP primers using WebSNAPER, further identify one of the SNP site resulted no suitable primers. Out of the 64 possible SNAP primer pairs generated, 14 SNAP primer pairs were selected. The 10 SNAP primer pairs were generated from the SNP1, SNP2, SNP4, SNP5, and SNP6 sites. The 10 selected SNAP primers were also successfully used to amplify PCR product using banana cv. Klutuk Wulung and Barangan. These SNAP primers were potentially applied for banana disease resistance markers in general.

Keywords: Molecular marker; SNP; SNAP; Disease resistance; *Musa spp.*

Sebagai salah satu pusat keragaman genetik pisang, Indonesia menyimpan keragaman spesies dan kultivar pisang yang luas (Nasution 1991), serta jenis hama dan penyakit yang beragam (Molina *et al.* 2010). Beberapa penyakit berasosiasi dengan tanaman pisang, antara lain dengan layu bakteri *Ralstonia solanacearum*, layu *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC), dan *banana bunchy top virus* (BBTV). Ketiga penyakit tersebut menjadi masalah sangat serius di Indonesia dan telah ditemukan di seluruh wilayah Indonesia meskipun dengan intensitas serangan penyakit yang beragam. Layu bakteri diketahui telah merusak pertanaman pisang Kepok di wilayah Sumatera, Kalimantan, Sulawesi,

dan Jawa (Buddenhagen 2009), sedangkan penyakit layu fusarium dilaporkan telah menyebar ke seluruh pulau Jawa, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, dan Papua (Hermanto *et al.* 2011). Penyakit virus BBTV, pertama kali ditemukan di Jawa Barat dan Bali, kini sudah endemik di Jawa Tengah, Lampung, Kalimantan, Sulawesi, dan Papua (Nurhadi & Setyobudi 1998).

Secara alami tanaman dapat berinteraksi dengan patogen dan interaksi antara tanaman dan patogen secara kompatibel maupun non-kompatibel (Keller *et al.* 2000). Fenotip interaksi non-kompatibel berupa ketahanan tanaman terhadap penyakit yang umumnya dikendalikan oleh kelompok gen ketahanan (*R gene*)

dan gen respons pertahanan (*DR gene*) (Yulong et al. 2006).

Saat ini sejumlah gen yang tergolong ke dalam kelompok gen ketahanan (*R gene*) telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari berbagai tanaman, antara lain gen *RPS2* asal *Arabidopsis thaliana* (Bent et al. 1984), gen *Xa1* asal padi (Yoshimura et al. 1998), gen *Bs2* asal tomat (Tai et al. 1999), gen *M* asal rami (Anderson et al. 1997), dan gen *N* asal tembakau (Witham et al. 1994). Beberapa dari gen ketahanan tersebut telah dikloning dan dievaluasi fungsinya pada tanaman rentan untuk meningkatkan ketahanan terhadap penyakit tertentu (Agrios 2005).

Secara struktural, berbagai gen yang tergolong ke dalam kelompok *R gene* mempunyai ciri khusus, yaitu domain polipeptida NBS-LRR (*nucleic binding sites-leucine rich repeats*) dan STK (*serine threonine protein kinase*) (McDowell & Woffenden 2003, Jones 2001). Dari contoh *R gene* yang berhasil diisolasi, sebanyak 71% mempunyai domain polipeptida NBS yang berperan dalam pengenalan produk gen *Avr* asal patogen (Dilbirligi et al. 2004). Hasil proses pengenalan produk gen *Avr* oleh gen *R* dapat memicu respons pertahanan dari tanaman (Meyers et al. 2003).

Fragmen gen ketahanan (*R gene*) yang ada dalam genom suatu tanaman dapat diamplifikasi dan diisolasi menggunakan *degenerate primer* yang didisain berdasarkan runutan DNA (*DNA sequence*) gen *R* asal tanaman lain, yang dikenal dengan istilah *resistance gene analogue* (RGA) (Yaish et al. 2004). Sun et al. (2009) berhasil mengisolasi lima fragmen RGA yang berasal dari pisang hibrida Gold Finger, sedangkan Pei et al. (2007) mengisolasi 12 RGA dari beberapa kultivar dan spesies pisang liar asal Cina. Namun pemanfaatan informasi RGA sebagai basis pengembangan marka molekuler untuk ketahanan penyakit pada pisang masih belum dilakukan.

Penggunaan marka molekuler seperti *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) (Faure et al. 1993), *random amplified polymorphic DNAs* (RAPD) (Howell et al. 1994), *simple sequence repeat* (SSR) (Crouch et al. 1998), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) (Ude et al. 2002), dan *inter simple sequence repeat* (ISSR) (Venkatachalam et al. 2008) untuk studi genetika dilakukan pada tanaman pisang. Marka RAPD dan *sequence-characterized amplified region* (SCAR) juga digunakan sebagai alat untuk melakukan seleksi tidak langsung ketahanan tanaman pisang terhadap penyakit bercak daun sigatoka (Nwauzoma et al. 2011) dan layu fusarium (Wang et al. 2012).

Single nucleotide polymorphism (SNP) adalah polimorfisme nukleotida pada satu situs nukleotida

tertentu di dalam genom tanaman. Frekuensi penemuan SNP bervariasi bergantung pada tanamannya. Pada tanaman jagung ditemukan 1 SNP per 31 pasang basa (pb) di bagian *non-coding region* dan 1 SNP per 124 pb di bagian *coding region* (Ching et al. 2002). Pada kedelai ditemukan 1,64 SNP per 1 kb *coding region* dan 4,85 SNP per 1 kb *non-coding region* (Zhu et al. 2001). Kanazin et al. (2002) melaporkan keberadaan 1 SNP setiap 189 pb pada tanaman barley. Polimorfisme satu nukleotida ditemukan sangat banyak, sehingga berpotensi sebagai marka yang tersebar di semua bagian genom tanaman. Marka molekuler berbasis SNP telah digunakan untuk studi genotip (Till et al. 2010), pembuatan peta tautan genetik beresolusi tinggi (Drenkard et al. 2000, Rabbi et al. 2012), identifikasi varietas (Sun et al. 2011), dan seleksi untuk karakter tertentu dalam proses pemuliaan tanaman (Gupta et al. 2001).

Metode identifikasi SNP yang masih sering digunakan untuk skala kecil ialah *cleaved amplified polymorphic sequence* (CAPS), *derived CAPS* (dCAPS) (Thiel et al. 2004, Nasu et al. 2002) dan *allele specific-PCR* (AS-PCR) atau *single nucleotide amplified polymorphism* (SNAP) (Drenkard et al. 2000, Liu et al. 2012). Dalam aplikasinya marka CAPS dan dCAPS mempunyai keterbatasan yaitu memerlukan enzim *nuclease*, sehingga memerlukan biaya yang relatif tinggi, sedangkan marka AS-PCR atau SNAP hanya memerlukan pasangan primer dan teknik PCR dan elektroforesis gel agarose standar (Drenkard et al. 2000). Marka SNAP telah dikembangkan untuk marka yang berhubungan dengan karakter aroma dan supernodulasi pada tanaman kedelai (Kim et al. 2005, Juwattanasomran et al. 2011), sehingga proses seleksi yang berhubungan dengan kedua karakter tersebut bisa lebih cepat dan efisien.

Keberadaan SNP juga berpotensi ditemukan pada sekuens DNA dari RGA. Namun informasi situs SNP pada RGA yang berasal dari tanaman pisang belum dievaluasi, apalagi digunakan untuk studi genetik dan seleksi ketahanan terhadap patogen meskipun berbagai marka molekuler yang lain telah digunakan (Lorenzen et al. 2011). Pengembangan marka SNAP berbasis RGA pada tanaman pisang diharapkan dapat mempermudah dan mempercepat seleksi kultivar pisang yang tahan terhadap penyakit.

Pada masa mendatang penelitian serupa masih perlu terus dilakukan untuk mengembangkan marka SNAP untuk seleksi tidak langsung sifat ketahanan tanaman pisang terhadap penyakit. Tujuan khusus penelitian ini ialah (1) mengidentifikasi situs SNP pada RGA yang berasal dari tanaman pisang, (2) mendisain pasangan primer untuk menghasilkan marka SNAP pada situs-situs SNP yang teridentifikasi, dan (3) mengevaluasi

keefektifan pasangan primer yang didapat untuk menghasilkan marka SNAP.

BAHAN DAN METODE

Tempat, Waktu, dan Bahan Penelitian

Kegiatan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekular Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, mulai Bulan Juli sampai November 2012. Pengujian keefektifan primer SNAP dilakukan menggunakan DNA genom yang diisolasi dari daun muda tanaman pisang cv. Klutuk Wulung (BB) dan Barangan (AAA). Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode CTAB sebagaimana yang digunakan oleh Das *et al.* (2009).

Identifikasi Situs SNP Berbasis Sekuen RGA

Identifikasi situs SNP dilakukan pada sekuen DNA dari sembilan potongan RGA (MNBS) asal tanaman pisang cv. Rejang, Klutuk Wulung, dan Barangan yang diisolasi pada penelitian sebelumnya. Sembilan sekuen DNA tersebut didepositkan di pangkalan data NCBI dengan kode akses KF034945-KF034953. Situs SNP diidentifikasi dengan melakukan pensejajaran sekuen DNA dari sembilan fragmen RGA pisang menggunakan

perangkat lunak GenDoc 2.7 (Nicolas *et al.* 1997). Di antara sejumlah situs SNP yang teridentifikasi, dipilih situs SNP pada *coding region* yang menyebabkan terjadinya perubahan residu asam amino.

Disain Primer untuk Marka SNAP

Pasangan primer SNAP didisain berdasarkan situs SNP terpilih menggunakan perangkat lunak WebSNAPER yang tersedia di situs <http://ausubellab.mgh.harvard.edu/>. Ketika mengakses situs tersebut, pada layar WebSNAPER dipilih menu SNAP Program. Pengguna program yang baru pertama kali mengakses harus melakukan *sign in* dan memasukkan alamat email pengguna pada tempat yang tersedia. Setelah *sign in*, muncul kotak dialog (Gambar 1) untuk memasukkan runutan nukleotida dengan situs SNP target yang dievaluasi. Situs SNP target ditandai sebagai [X/Y], dimana X ialah nukleotida untuk alel referensi dan Y ialah nukleotida untuk alel alternatif. Beberapa parameter yang perlu diisi ialah ukuran produk amplifikasi PCR, suhu TM, dan nama primer yang diinginkan. *Screen shot* perangkat lunak WebSNAPER dan sejumlah isian yang perlu diisi terkait dengan disain marker SNAP disajikan pada Gambar 1.

Setelah semua parameter terisi (Gambar 1), perangkat lunak diaktifkan dengan menekan tombol

The screenshot shows the WebSNAPER web application interface. At the top, there are links for 'About Websnaper' and 'Documentation'. Below that, a text box contains the email address 'bagusutanto_02@yahoo.com'. There are two rows of input fields for 'PCR Product Optimum Size Range' (325-375) and 'PCR Product Absolute Size Range' (300-500). The next row contains four input fields for primer parameters: 'Primer Concentration (nM)' (5), 'Primer Minimum Size' (20), 'Primer Maximum Size' (36), 'Primer Optimal TM' (67 °C), 'Primer Maximum TM' (70 °C), and 'Primer Minimum TM' (62 °C). A dropdown menu for 'Mispriming Library' is set to 'None'. The 'Sequence Name' field contains 'SNP1_MNBS'. Below this is a text area for the 'Sequence Name' with the instruction 'Please Enter Sequence. The SNP should be indicated as [G/C]:'. The sequence text is: 'GGGGGAATGGGGAAATCGACGCTCCTCAAAAACGCTCAACAACGAGCTCAAGGAGAATACCCGCGATTAC CATGTGGTGAAT(A/C)GATCGAGGTTGCCAACTCCGAGACGCTCAACGTTGGTCGATATGCAGAAGA TCATCGCCAAATCGGGGCTCTGCCGTGGAACGAGAGCGAGACGGAGAGGGAGCGATCCACATTTCTGC GCAGGGCCCTGAGGAGGAAGAAGTTTCGTTGCTCCTGCTCGACGACGCTCTGGAAAAAGTTCCAGTTGGCCG ACGTGGGAATCCCCACGCCAAGCTCCGACAACGGGTGGAAGCTGATCCTCGCCTCGCGGTGGAACCCAGG TGTGCGTCGAGATGGGCGACAAGGAGCCATGGAGATGCCCTGCTTGGGCGACAATGAATCGCTGAGGT TGTTCGGAGCAACTTGATGGCCGAGGTCAGTGCCGCCATCAACCATGACAGCGACATGAGAGAAGCG CCATGGATATCATACAGAGCTGCGGGCCCTTCCCCTTAGCCCTTA'. A red circle highlights the '(A/C)' SNP site. At the bottom, there are 'Output Options' with three checked boxes: 'Include Sequence', 'Include Conditions', and 'Output Tab Separated Values'. There are also links for 'Interpreting Results' and 'Questions or comments?'. At the very bottom are 'Submit!' and 'RESET' buttons. On the right side of the image, there are arrows pointing to various parts of the form with labels: 'Diisi alamat email', 'Diisi dengan ukuran produk yang diinginkan', 'Diisi dengan fitur primer yang diinginkan', 'Diisi dengan sekuen yang digunakan untuk identifikasi primer', 'Diisi tampilan luaran yang diinginkan', and 'Tombol eksekusi'.

Gambar 1. Tampilan perangkat lunak WebSNAPER yang digunakan untuk mendisain primer SNAP. Runutan nukleotida yang diberi lingkaran ialah posisi *single nucleotide polymorphism* (SNP) yang digunakan (*Screen shot of WebSNAPER software used to design SNAP primers. Circular sign in the nucleotide sequences indicate the target SNP site*)

Submit. Perangkat lunak WebSNAPER mengirimkan hasil analisisnya dalam bentuk pesan elektronik ke alamat email pengguna, yang selanjutnya dapat dikonversi dan dibaca menggunakan perangkat lunak pengolah kata. Proses disain primer tersebut diulang kembali untuk setiap posisi SNP pada runutan DNA yang diinginkan. Selanjutnya dari masing-masing hasil analisis untuk setiap situs SNP dipilih satu set (empat primer) yang terdiri atas sepasang primer untuk alel referensi dan sepasang primer yang lain untuk alel alternatif. Setelah diperoleh runutan primer dilanjutkan dengan pemilihan sesuai dengan jumlah situs SNP, primer disintesis menggunakan perusahaan jasa pembuatan primer.

Evaluasi Efektivitas Primer SNAP

Primer SNAP yang didapat kemudian diuji kemampuannya untuk menghasilkan produk amplifikasi menggunakan cetakan DNA genom pisang. Dalam penelitian ini, pengujian efektivitas primer SNAP dilakukan menggunakan pisang cv. Klutuk Wulung dan Barangan.

Reaksi PCR dilaksanakan dengan volume 25 µl menggunakan KAPA2G™ PCR Kit, yang komposisinya terdiri atas 5,0 µl 5 X buffer PCR (di dalamnya terkandung 1,5 mM Mg²⁺), 0,5 µl 25 mM MgCl, 0,5

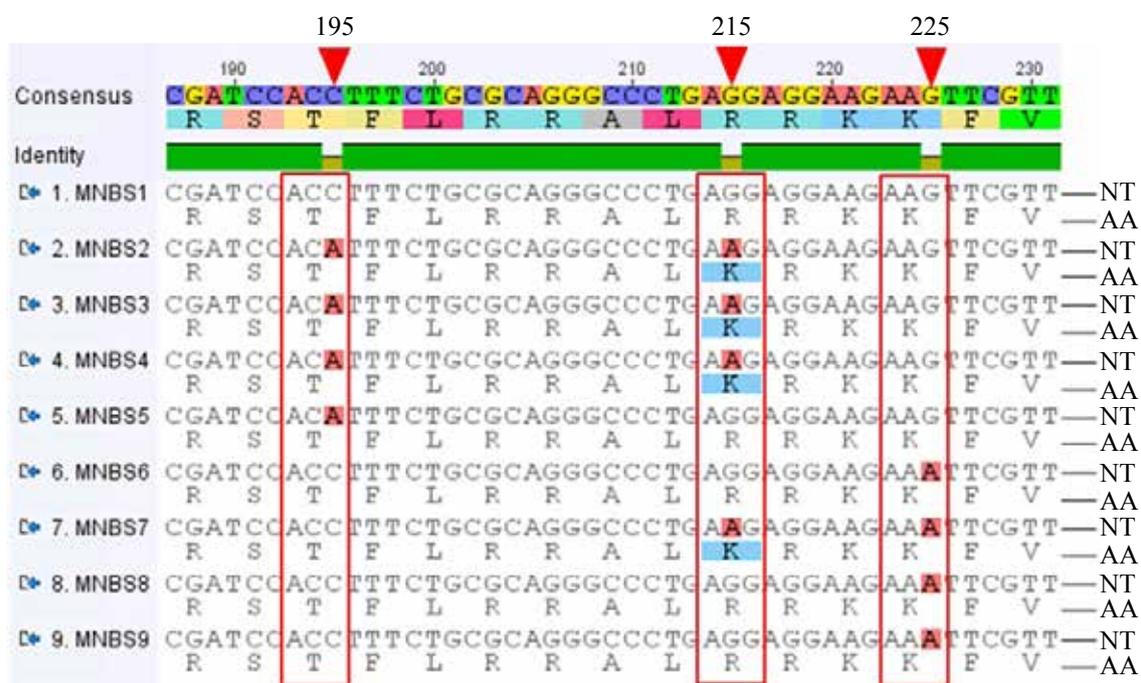
µl 10 mM dNTPs, 1,0µl 10µM masing-masing primer (primer *forward* dan *reverse*), 30 ng DNA genom, 0,1 µl Taq DNA polimerase (5 U/ µl) dan 15,4 µl ddH₂O. Denaturasi cetakan DNA pada awal reaksi pada suhu 95°C selama 3 menit, diikuti dengan 35 kali siklus 95°C selama 10 detik, 60–62°C selama 10 detik, dan 72°C selama 3 detik, dan diakhiri dengan satu siklus 72°C selama 10 menit. Produk PCR dipisahkan berdasarkan ukuran dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 1% pada mesin elektroforesis dengan tegangan 80 V selama 25 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Single nucleotide polymorphism (SNP) adalah polimorfisme yang disebabkan oleh proses substitusi satu basa pada nukleotida dalam genom tanaman (Syvänen 2001). Keberadaan SNP diketahui menyebar di seluruh bagian dari genom tanaman, sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai marka molekuler (Gupta *et al.* 2001).

Identifikasi Situs SNP Berbasis Sekuen RGA

Fragmen MNBS yang digunakan dalam penelitian ini berukuran 524 pasang basa (pb). Seluruh runutan nukleotida MNBS tersebut merupakan bagian exon



Gambar 2. Representasi situs SNP pada fragmen MNBS asal pisang (*Musa spp.*). Situs SNP 195 dan 225 tidak menyebabkan terjadinya substitusi asam amino, sedangkan situs SNP 215 merubah residu asam amino arginin (R) menjadi lisin (K). NT= runutan nukleotida DNA dan AA: runutan asam amino yang diprediksi dari runutan NT, segitiga merah= posisi SNP (*Representative of SNP sites in the MNBS fragments originated from banana. SNP site at 195 and 225 did not change the amino acid residues, while one at 215 change the arginin residue (R) into lysine (K) one. NT= nucleotide sequences and AA: amino acid sequences translated from NT, red triangles= the SNP sites in the MNBS fragment*)

dan tidak terdapat intron di dalamnya. Fragmen MNBS menyandi 174 asam amino yang merupakan bagian dari domain motif p-loop sampai dengan GLPL. Dari hasil pensejajaran runutan DNA di antara sembilan MNBS, berhasil diidentifikasi keberadaan 30 situs SNP. Pada fragmen MNBS yang dianalisis, kerapatan SNP yang ditemukan sebanyak satu SNP per 17 pb.

Tidak semua situs SNP yang ditemukan pada fragmen MNBS menyebabkan terjadinya substitusi asam amino hasil translasi dari runutan DNA-nya. Sebagai contoh, nukleotida pada posisi 195 merupakan situs SNP karena ada yang mempunyai nukleotida C dan ada yang A. Pada situs tersebut, kedua fragmen varian dengan nukleotida C atau A sama-sama menjadi residu asam amino treonine (T) (Gambar 2). Contoh yang sama juga dapat dilihat pada nukleotida di urutan 225 yang merupakan situs SNP dengan varian nukleotida [G/A], yang keduanya tetap menjadi residu asam amino lisin (K) (Gambar 2). Karena tidak menyebabkan terjadinya substitusi asam amino, maka di dalam penelitian ini SNP posisi 195 dan 225 tidak dievaluasi lebih lanjut.

Nukleotida pada urutan nomor 215 merupakan situs SNP dengan varian nukleotida [G/A]. Pada posisi tersebut, keberadaan SNP menyebabkan terjadinya substitusi residu asam amino dari arginin (R) menjadi lisin (K) (Gambar 2). Situs SNP seperti pada posisi 215 yang dipilih untuk pengembangan marka SNAP dalam tahap-tahap penelitian selanjutnya.

Dari 30 situs SNP yang berhasil diidentifikasi pada fragmen MNBS, diperoleh 19 situs SNP yang mensubstitusi asam amino. Selanjutnya, 19 situs SNP tersebut digunakan untuk mendisain pasangan primer SNAP. Meskipun tergolong menyebabkan substitusi residu asam amino, belum tentu dari setiap situs SNP yang terpilih dapat didisain pasangan primer SNAP. Kegagalan mendisain primer dari situs yang teridentifikasi antara lain disebabkan oleh kurangnya jumlah basa di sekitar situs SNP terutama untuk situs SNP ada di ujung 5' ataupun 3' runutan nukleotida fragmen DNA yang digunakan atau karena komposisi nukleotida di sekitar target SNP tidak dapat memenuhi kriteria yang ditentukan pada awal proses disain primer. Untuk mendisain primer, di sekitar situs SNP disyaratkan keberadaan sebanyak minimal 25 nukleotida. Kriteria yang sama juga menjadi syarat dalam mendisain primer dCAPS menggunakan perangkat lunak dCAPS Finder (Shahinnia & Sayed-Tabatabaei 2009). Dari alternatif 19 situs SNP pada fragmen MNBS, hanya berhasil didisain primer dari delapan posisi SNP saja (Gambar 3).

Disain Primer untuk Marka SNAP

Pada Tabel 1 disajikan contoh luaran dari tahapan disain primer SNAP menggunakan perangkat lunak WebSNAPER. Contoh luaran hasil analisis situs SNP posisi #1 tersebut telah dikonversi ke dalam bentuk tabel. Dalam disain primer SNAP menggunakan WebSNAPER, dari satu situs SNP dapat diperoleh sejumlah alternatif

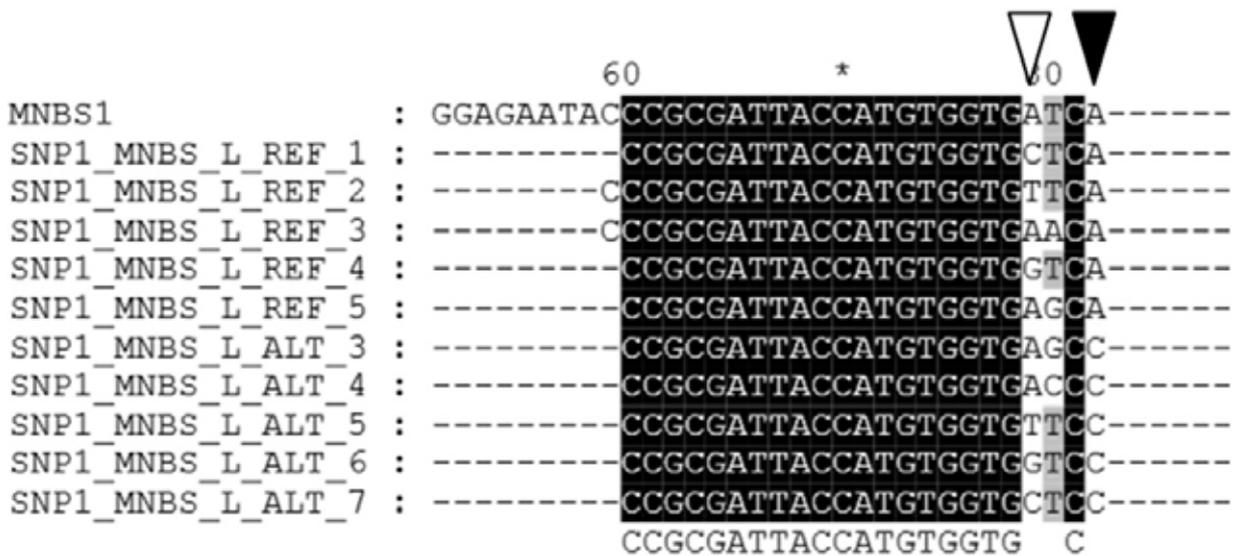
		7		12		215		301	309	319	388 389	392 394		451 452	466	472 473	500		617 618	621			
MNBS1	A	CG	G	A	A	C	C	C	G	G	A	T	G	AA	GA	A	GA	A	GA	G	C	TAG	C
MNBS2	G	TG	G	A	A	T	G	A	A	G	A	T	C	GG	CT	G	GA	T	GG	G	T	TAG	T
MNBS3	G	CA	G	A	A	T	G	A	A	G	A	T	C	GG	CA	G	GG	A	GG	G	C	TAG	C
MNBS4	C	CG	G	A	A	T	G	A	A	G	A	T	C	GG	CA	G	GA	A	AG	G	C	AGC	T
MNBS5	G	AA	A	A	A	C	G	A	G	G	A	G	C	GG	CA	G	AA	A	AG	G	C	TAG	C
MNBS6	A	AG	G	A	C	C	G	C	G	A	T	T	C	GG	CA	G	GA	A	AG	G	C	TAG	C
MNBS7	A	GA	G	A	C	C	G	C	A	A	T	T	C	GG	CA	G	GA	A	AG	A	C	TAG	C
MNBS8	T	CA	G	A	C	C	G	C	G	A	T	T	C	GG	CA	G	GA	A	AG	G	C	TAG	C
MNBS9	G	CG	G	G	C	C	G	C	G	A	T	T	C	GG	CA	G	GA	A	AG	G	C	TAG	C
EU855841	G			A				G	A	T	G	GA	GA	GA	A	AG	G					GC	
EU239821	A			A				G	A	G	C	GG	CA	GA	A	AG	G						

Gambar 3. Representasi situs SNP pada fragmen MNBS. Situs SNP dengan latar belakang kuning ialah situs SNP yang menyebabkan terjadinya substitusi asam amino, sedangkan situs SNP di dalam kotak merah ialah situs SNP terpilih untuk pembuatan primer SNAP. Nomor di atas runutan DNA mengindikasikan posisi nukleotida dalam fragmen (*Representative of SNP sites in the MNBS fragments. SNP sites with yellow background were SNP position causing amino acid substitutions while ones with red box were the selected SNP sites used for SNAP primer design. Numbers above the DNA sequence were the nucleotide position in the MNBS fragment*)

Tabel 1. Primer alternatif sebagai luaran yang didapat dari proses mendisain primer menggunakan WebSNAPER untuk situs SNP1 (Alternative primers as the output of primer design using WebSNAPER for SNP#1 site)

Identitas primer (Primer Id)	Runutan nukleotida (Nucleotide sequence)	Tm (°C)	Panjang (Length)	Ukuran produk PCR (PCR product size), bp	Catatan peringatan (Warnings)
SNP1_MNBS_L_REF_1	CCGCGATTACCATGTGGT- <u>G</u> TCA	67,759	23	325	
SNP1_MNBS_L_REF_1_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_REF_2	CCCGCGATTACCATGTG- GTG <u>T</u> TCA	68,352	24	326	
SNP1_MNBS_L_REF_2_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_REF_3	CCCGCGATTACCATGTG- GTGA <u>A</u> CA	68,352	24	326	
SNP1_MNBS_L_REF_3_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_REF_4	CCGCGATTACCATGTGGT- <u>G</u> TCA	67,565	23	325	
SNP1_MNBS_L_REF_4_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_REF_5	CCGCGATTACCATGTGGT- GAG <u>G</u> CA	67,759	23	325	
SNP1_MNBS_L_REF_5_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_ ALT_1*	CCGCGATTACCATGTGGT- GAT <u>G</u> C	67,106	23	325	High end self complementarity
SNP1_MNBS_L_ALT_1_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_ ALT_2*	CCGCGATTACCATGTGGT- GA <u>A</u> CC	66,123	23	325	High end self complementarity
SNP1_MNBS_L_ALT_2_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_ALT_3	CCCGCGATTACCATGTGGT- GAG <u>G</u> CC	68,219	23	325	
SNP1_MNBS_L_ALT_3_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_ALT_4	CCCGCGATTACCATGTGGT- GA <u>C</u> CC	68,034	23	325	
SNP1_MNBS_L_ALT_4_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_ALT_5	CCCGCGATTACCATGTGGT- GT <u>T</u> CC	66,123	23	325	
SNP1_MNBS_L_ALT_5_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_ALT_6	CCCGCGATTACCATGTGGT- <u>G</u> TCC	68,034	23	325	
SNP1_MNBS_L_ALT_6_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		
SNP1_MNBS_L_ALT_7	CCCGCGATTACCATGTGGT- G <u>C</u> TCC	68,219	23	325	
SNP1_MNBS_L_ALT_7_ REVERSE	GCAGGGCATCTC- CATGGGCTC	66,974	21		

Catatan (Remarks): nukleotida yang diberi garis bawah pada primer *forward* ialah *mismatch*. Primer yang diberi tanda asterik [*] tidak dipilih untuk menghasilkan marka SNAP karena *high end self complementarity* (Underlined nucleotides in the forward primer sequences were mismatches Primers indicated by asterisk [*] were not chosen to generate SNAP marker because they were high end self complementarity)



Gambar 4. Penyejajaran runutan nukleotida dari alternatif primer untuk situs SNP#1 dengan fragmen MNBS. Tanda segitiga hitam ialah situs SNP#1 dan segitiga putih ialah posisi *mismatch* terjauh dari ujung 3' primer yang didapat (*Multiple alignment among sequences of the alternative primers generated from SNP#1 with original sequences of the MNBS fragment. The black triangle was the SNP site and the white triangle was farthest positions of nucleotide mismatch from the 3' end of the generated primers*)

Tabel 2. Primer SNAP terpilih dari tujuh situs SNP yang dapat digunakan untuk menghasilkan marka SNAP (*The selected SNAP primers from seven SNP sites that can be used to generate SNAP markers*)

SNP sites	Identitas primer (Primer ID)	Runutan nukleotida primer forward (Nucleotide sequences of forward primer)	Runutan nukleotida primer reverse (Nucleotide sequences of reverse primer)	Ukuran produk PCR (PCR product size), bp
1	<i>SNP1_MNBS_Ref</i>	CCGCGATTACCATGTGGTGCTCA	GCAGGGCATCTCCATGGGCTC	325
	<i>SNP1_MNBS_Alt</i>	CCGCGATTACCATGTGGTGCTCC	GCAGGGCATCTCCATGGGCTC	
2	<i>SNP2_MNBS_Ref</i>	GGCGAGGATCAGCTTC-CACCCTTT	GGTGATCATGATCGAGGTT-GCCAACT	250
	<i>SNP2_MNBS_Alt</i>	GGCGAGGATCAGCTTCCACCCT-TA	GGTGATCATGATCGAGGTT-GCCAACT	
3	<i>SNP3_MNBS_Ref</i>	GCGAGGCGAGGATCAGATTC	GGAATGGGGAAAACGACGCT	325
	<i>SNP3_MNBS_Alt</i>	GCGAGGCGAGGATCAGATTA	GGAATGGGGAAAACGACGCT	
4	<i>SNP4_MNBS_Ref</i>	TGGTTCGACCGCGAGGCCAG	GGAATGGGGAAAACGAC-GCTCCT	335
	<i>SNP4_MNBS_Alt</i>	TGGTTCGACCGCGAGGCCAC	GGAATGGGGAAAACGAC-GCTCCT	
5	<i>SNP5_MNBS_Ref</i>	AACCTCAGCGATTCATTGGCGC	ATGCAGAAGATCATCGC-CAATCGG	287
	<i>SNP5_MNBS_Alt</i>	ACAACCTCAGCGATTCATTG-GCGT	ATGCAGAAGATCATCGC-CAATCGG	
6	<i>SNP6_MNBS_Ref</i>	CGGAACAACCTCAGC-GATTCCTTG	GGTGATCATGATCGAGGTT-GCCAACT	342
	<i>SNP6_MNBS_Alt</i>	CCGGAACAACCTCAGC-GATTCACTC	GGTGATCATGATCGAGGTT-GCCAACT	
7	<i>SNP7_MNBS_Ref</i>	CTGTATGATATCCATGGCGGTTT	ATGCAGAAGATCATCGC-CAATC	372
	<i>SNP7_MNBS_Alt</i>	TCTGTATGATATCCATGGCGGTTT	ATGCAGAAGATCATCGC-CAATC	

pasangan primer untuk menghasilkan marka SNAP. Sebagai contoh, untuk SNP yang dievaluasi posisi #1 dihasilkan alternatif 12 pilihan pasangan primer SNAP (lima alternatif pasangan primer *reference* dan tujuh pasangan primer *alternate*) (Tabel 1). Dari 12 pilihan pasangan primer yang didapat, dua primer *alternate* tidak bisa dipilih karena berpotensi membentuk utas ganda antarpasangan primer (*high end self complementary*), yaitu pasangan primer *SNP1_MNBS_L_ALT_1* dan *SNP1_MNBS_L_ALT_2*. Dari 12 alternatif primer yang dihasilkan, hanya dipilih sepasang primer untuk alel referensi dan sepasang primer untuk alel alternatif.

Salah satu hal penting dalam pemilihan primer SNAP ialah suhu T_m . Pasangan primer harus mempunyai T_m yang tidak jauh berbeda. Pada Tabel 1 terlihat bahwa terdapat satu nukleotida yang berbeda selain pada situs SNP-nya (ujung 3') dari primer *forward* terhadap sekuen aslinya, yang disebut *mismatch*. Posisi *mismatch* bisa berjarak satu sampai empat nukleotida dari situs SNP. Untuk lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 4 yang menunjukkan penyelarannya runutan nukleotida primer *forward* dari Tabel 1 dengan fragmen aslinya (MNBS). Menurut Bru *et al.* (2008), posisi *mismatch* dari ujung 3' sangat berpengaruh terhadap keberhasilan mendapatkan produk PCR. Semakin dekat *mismatch* dengan ujung 3' semakin besar kegagalan mendapat produk PCR. Berdasarkan hal tersebut, maka primer SNAP yang dipilih ialah yang mempunyai posisi *mismatch* dengan jarak paling jauh dari ujung. Gambar 4 ialah contoh penyelarannya runutan nukleotida primer *forward* untuk SNP1 dari Tabel 1 terhadap fragmen MNBS untuk melihat jarak nukleotida *mismatch* terhadap ujung 3' (situs SNP1).

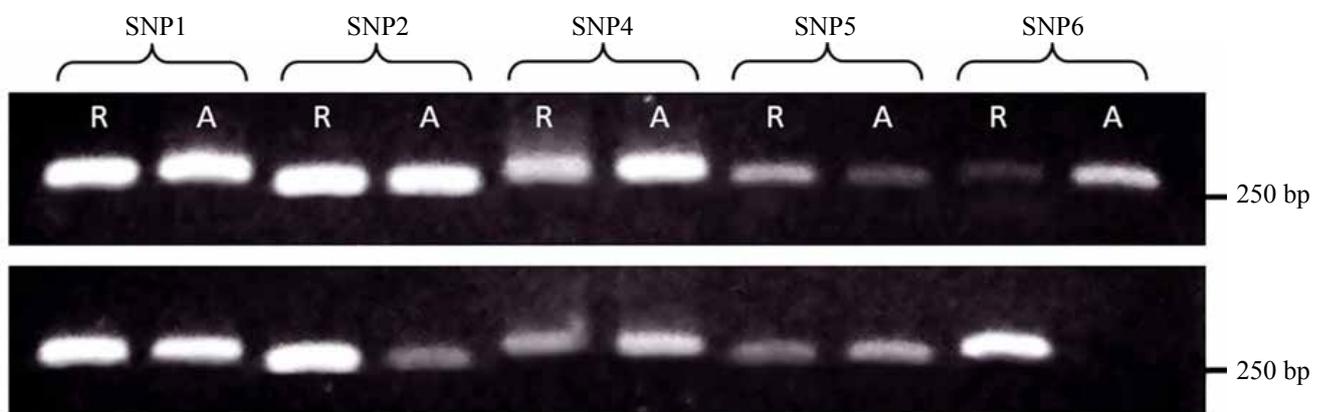
Berdasarkan hasil disain primer SNAP diketahui bahwa dari delapan situs SNP fragmen MNBS yang

dipilih, satu situs SNP (posisi #215) tidak menghasilkan primer SNAP karena primer yang didapat mempunyai peluang membentuk utas ganda dengan dirinya sendiri pada ujung-ujungnya (*high end self complementarity*). Hal ini dapat mengakibatkan terbentuknya *hairpin* atau terbentuknya *primer dimer*, sehingga berpotensi mengganggu amplifikasi fragmen target dan produk PCR yang diinginkan tidak dapat dihasilkan (Brownie *et al.* 1997). Disain primer menggunakan tujuh situs SNP menghasilkan total 64 alternatif primer SNAP. Untuk setiap situs SNP diperlukan dua pasangan primer, yang terdiri atas sepasang primer *forward* dan *reverse* untuk alel referensi dan sepasang primer *forward* dan *reverse* untuk alel alternatifnya. Dengan demikian, dari tujuh situs SNP, dihasilkan 14 pasang primer SNAP seperti yang ditampilkan pada Tabel 2.

Evaluasi Efektivitas Primer SNAP untuk Menghasilkan Marka

Kemampuan primer SNAP yang dikembangkan untuk menghasilkan marka SNAP menggunakan genom tanaman pisang perlu dievaluasi. Dari 14 pasangan primer SNAP yang dihasilkan, dalam penelitian ini hanya dievaluasi 10 pasang primer SNAP. Pada Gambar 5 disajikan hasil PCR yang dilakukan menggunakan 10 pasang primer SNAP dan genom pisang cv. Klutuk Wulung atau Barangan. Produk amplifikasi PCR difragmentasi menggunakan teknik elektroforesis gel agarose, di-staining dengan ethidium bromide (EtBr), dan divisualisasi di bawah penyinaran UV.

Berdasarkan elektroferogram (Gambar 5), pasangan primer yang diuji mampu menghasilkan produk PCR sesuai yang diharapkan, yaitu sebesar 250-372 pb. Semua pasangan primer yang diuji menghasilkan produk PCR pada pisang Klutuk Wulung dan Barangan



Gambar 5. Produk PCR hasil amplifikasi menggunakan 10 pasang primer SNAP dan genom tanaman pisang cv. Klutuk Wulung (A) atau Barangan (B) (*PCR amplified products generated using the 10 SNAP primer pairs and the genome of banana cv. Klutuk Wulung [A] or Barangan [B], R: the reference allele and A: the alternate allele, respectively*)

yang diuji. Untuk primer *SNP6_MNBS_Alt*, hasil PCR-nya negatif dan tidak ada produk PCR ketika diuji menggunakan genom pisang Barangan. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada Klutuk Wulung lima lokus SNP yang diuji mempunyai kombinasi alel heterozigot, sedangkan pada Barangan, empat lokus SNP mempunyai kombinasi alel heterozigot dan satu lokus homozigot (lokus *SNP6_MNBS*).

Pemanfaatan SNP Berbasis RGA untuk Marka Ketahanan Terhadap Penyakit

Adanya keragaman SNP yang terkait (*linkage*) dengan fenotip tertentu telah dilaporkan pada tanaman padi, kedelai, dan bawang putih (Gupta *et al.* 2001). Mutasi akibat substitusi satu basa dapat merubah susunan asam amino dari polipeptida yang disandi oleh gen dan dapat merubah fungsi dari polipeptidanya (Kowarsch *et al.* 2010).

Agar dapat dimanfaatkan sebagai marka ketahanan terhadap penyakit, marka SNAP berbasis RGA perlu dievaluasi polimorfismenya dan keterkaitannya dengan sifat resistensi. Evaluasi tersebut perlu dilakukan untuk seluruh marka SNAP berbasis RGA yang teridentifikasi. Apabila marka SNAP yang diuji mampu mengelompokkan kultivar atau spesies pisang yang berbeda-beda responsnya terhadap penyakit, maka marka SNAP tersebut berpotensi digunakan sebagai marka untuk sifat resistensi penyakit. Meskipun pengujian keterkaitan antara marka SNAP dengan sifat resistensi penyakit pada pisang belum dievaluasi dalam penelitian ini, keberhasilan mendapatkan produk amplifikasi PCR menggunakan pasangan primer SNAP yang dikembangkan dapat memberi dampak positif dari langkah awal penggunaan marka SNAP berbasis RGA pada tanaman pisang.

Dalam pengembangan marka SNAP, sebaiknya tidak hanya dilakukan berbasis pada satu macam gen (RGA) saja, tetapi harus berbasis pada sejumlah gen yang mempunyai peranan sama. Sebagai contoh, marka SNAP untuk ketahanan terhadap penyakit, dapat dikembangkan berbasis SNP pada gen *NBS-LRR*, gen β -1,3-*glucanase*, dan gen *chitinase* yang ketiganya berperan dalam respons terhadap penyakit yang menyerang tanaman pisang.

Penggunaan RGA kelompok NBS-LRR yang langsung digunakan sebagai marka telah diteliti, antara lain pada tanaman kakao (Kuhn & Narasimhan 2006), kacang tanah (Radwan *et al.* 2010), gandum (Yan *et al.* 2003), dan tebu (Jayashree *et al.* 2010). Berdasarkan publikasi tersebut, dari RGA yang dievaluasi dapat dikembangkan marka *resistance gene analogue polymorphism* (RGAP). Sejumlah marka RGAP yang dikembangkan terbukti terkait dengan QTL untuk sifat ketahanan terhadap penyakit karat dan antrakns pada

kacang hijau (Mutlu *et al.* 2006), penyakit busuk merah pada tebu (Jayashree *et al.* 2010), dan penyakit hawar pada gandum (Mazaheri *et al.* 2008).

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Pada fragmen MNBS asal pisang yang berukuran 524 pb, berhasil diidentifikasi adanya 30 situs SNP. Dari jumlah tersebut, sebanyak 19 situs SNP diidentifikasi menyebabkan substitusi residu asam amino. Dari 19 situs SNP terpilih, hanya delapan situs SNP yang dapat digunakan untuk mendisain primer SNAP. Dari delapan situs SNP terpilih, hanya dari tujuh situs SNP saja yang dapat menghasilkan primer untuk pengembangan marka SNAP untuk tanaman pisang.
2. Dari tahapan disain primer, diperoleh 14 pasang primer yang dapat diuji untuk menghasilkan marka SNAP (tujuh pasang untuk alel referensi dan tujuh pasang untuk alel alternatifnya).
3. Dari 14 pasang primer yang didapat, 10 pasang primer yang terbukti efektif untuk mengamplifikasi PCR dengan menggunakan genom pisang Klutuk Wulung dan Barangan, yaitu pasangan primer SNAP yang dikembangkan dari situs SNP1, SNP2, SNP4, SNP5, dan SNP6 pada gen MNBS.
4. Primer SNAP yang didapat berpotensi untuk dikembangkan sebagai marka untuk sifat ketahanan terhadap penyakit pisang. Namun demikian, efektivitas penggunaan marka SNAP yang dikembangkan sebagai indikator seleksi tidak langsung untuk ketahanan pisang terhadap penyakit yang menyerang pisang, masih perlu dievaluasi. Pengujian ini akan dilakukan dalam penelitian selanjutnya.

PUSTAKA

1. Brownie, J, Shawcross, S, Theaker, J, Whitcombe, D, Ferrie, R, Newton, C & Little, S 1997, 'The elimination of primer-dimer accumulation in PCR', *Nuc. Acids Res.*, vol. 25, no. 16, pp. 3235-41.
2. Bru, D, Martin-Laurent, F & Philippot, L 2008, 'Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16s rRNA gene as an example', *App. Env. Microbiol.*, vol. 74, no. 5, pp. 1660-3.
3. Buddenhagen, I 2009, 'Blood bacterial wilt of banana: history, field biology and solution', *Acta Hort. (ISHS)*, vol. 828, pp. 57-68.
4. Das, BK, Jena, RC & Samal, KC 2009, 'Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of banana/plantain (*Musa spp.*)', *Int. J. Agric. Sci.*, vol. 1, no. 2, pp. 21-5.
5. Gupta, PK, Roy, JK & Prasad, M 2001, 'Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants', *Current Sci.*, vol. 80, pp. 524-35.

6. Hermanto, C, Sutanto, A, Jumjunidang, Edison, HS, Daniells, JW, O'Neill, WT, Sinohin, VGO, Molina, AB & Taylor, P 2011. 'Incident and distribution of fusarium wilt disease of banana in Indonesia', *ISHS Acta Hort.*, vol. 897, pp. 313-22.
7. Jayashree, J, Selvi, A & Nair, NV 2010, 'Characterization of resistance gene analog polymorphisms in sugarcane cultivars with varying levels of red rot resistance', *Elec. J. Plant Breed.*, vol. 1, no. 4, pp. 1191-9.
8. Keller, B, Feuiller, C & Messmer, M 2000, 'Genetic of disease resistance: basic concept and application in resistance breeding', in Slusarenko, A, Fraser, RSS & van-Loon, LC, (eds.), *Mechanism of resistance to plant disease*, Kluwer Academic Publisher, Netherland, pp. 101-60.
9. Kowarsch, A, Fuchs, A, Frishman, D & Pagel, P 2010, 'Correlated mutations: a hallmark of phenotypic amino acid substitutions', *PLoS Comput Biol.*, vol. 6, :e1000923, no. 9, diunduh tanggal 3 Juli 2013, <doi:10.1371/journal.pcbi.1000923>.
10. Kuhn, DN & Narasimhan, G 2006, 'Identification of cacao TIR-NBS-LRR resistance gene homologues and their use as genetic markers', *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, vol. 131, no. 6, pp. 806-13.
11. Mazaheri, M, Naghavi, MR, Ghaffari, MR, Pirseyedi, SM, Ghareyazie, B, Abdemishani, S & Mardi, M 2008, 'Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with the major QTL of fusarium head blight (FHB) resistance, *qfhs.ndsu-3BS* in wheat', *Iran J. Biotech.*, vol. 6, no. 2, pp.119-23.
12. Molina, AB, Williams, RC, Hermanto, C, Suwanda, Komolog, B & Kokoa, P 2010, *Mitigating the threat of banana Fusarium wilt: understanding the agroecological distribution of pathogenic forms and developing disease management strategies*, Final report, ACIAR, Australia.
13. Mutlu, N, Miklas, PN & Coyne, DP 2006, 'Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease resistance genes and QTL in common bean', *Mol. Breed.*, vol. 17, pp. 127-35.
14. Nasution, RE 1991, A taxonomic study of the species *Musa acuminata* colla with its intraspecific taxa in Indonesia', *Memoirs of Tokyo University of Agriculture*, vol. 32, pp. 1-122.
15. Nicholas, KB, Nicholas Jr., HB & Deerfield II, DW 1997, 'GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation', *EmbNet News*, vol. 4, pp.1-4.
16. Nurhadi & Setyobudi, L 1998. 'Status on banana and citrus viral diseases in Indonesia', in: *Managing Banana and Citrus Diseases, Proceedings of a Regional Workshop on Disease Management of Banana and Citrus Through the Use of Disease-free Planting Materials*, Davao City, 14-16 October 1998.
17. Radwan, OE, Ahmed, TA & Knapp, SJ 2010, 'Phylogenetic analyses of peanut resistance gene candidates and screening of different genotypes for polymorphic markers', *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 17, pp. 43-9.
18. Shahinnia, F & Sayed-Tabatabaei, BE 2009, 'Conversion of barley SNPs into PCR-based marker using dCAPS method', *Gen. Mol. Biol.*, vol. 32, no. 3, pp. 564-7.
19. Syvänen, AC 2001, 'Accessing genetic variation: genotyping SNPs', *Nat. Rev. Gen.*, vol. 2, pp. 930-42.
20. Yan, GP, Chen, XM, Line, RF & Wellings, CR 2003, 'Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with the YR5 gene for resistance to wheat stripe rust', *Theor. Appl. Gen.*, vol. 106, no. 636-43.
21. Yulong, GAO, Wangzhen, GUO, Lei, W & Tianzhen, Z 2006, 'Isolation and characterization of resistance and defense gene analogs in cotton (*Gossypium barbadense* L.)', *Sci. China Ser. C: Life Sci.*, vol. 49, no. 6, pp. 530-42.