

Identifikasi Keekerabatan Genetik Klon-klon Bawang Putih Indonesia Menggunakan Isozim dan RAPD

Hardiyanto, N.F. Devy, dan C. Martasari

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika Jl. Raya Tlekung No.1, Junrejo Batu 65301
Naskah diterima tanggal 6 November 2007 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 24 Maret 2008

ABSTRAK. Beberapa klon bawang putih (*Allium sativum* L.) lokal di Indonesia umumnya diberi nama oleh petani berdasarkan nama daerah atau lokasi, sehingga klon yang secara genetik sama kemungkinan dapat berbeda namanya. Dengan demikian identifikasi klon bawang putih berdasarkan marka biokimia maupun molekuler sangat dibutuhkan. Penelitian ini bertujuan memperoleh informasi mengenai keragaman dan keekerabatan genetik klon bawang putih lokal. Penelitian dilakukan di Kebun Percobaan Banaran, Batu mulai bulan Juni sampai dengan November 2005, sedangkan untuk analisis isozim dan RAPD masing-masing dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Universitas Brawijaya, Malang dan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Berdasarkan metode isozim dan RAPD, kisaran nilai keekerabatan genetik yang dihasilkan hampir sama, masing-masing 0,53-0,91 dan 0,54-0,94. Tingkat keekerabatan genetik klon bawang putih lokal cukup rendah. Metode isozim dan 2 primer RAPD, yaitu OPG 18 dan OPN 06 dapat digunakan untuk identifikasi dan penamaan ulang klon bawang putih lokal.

Katakunci: *Allium sativum*; Isozim; Keekerabatan genetik; Klon; RAPD.

ABSTRACT. Hardiyanto, N.F. Devy, and C. Martasari. 2008. Identification of Genetic Relationship among Indonesian Garlic Clones Using Isozyme and RAPD. Local garlic clones (*Allium sativum* L.) in Indonesia mostly was named by growers based on region or location, thus many genetically-identical clones may have different name. Therefore, identification of garlic clones through biochemical and molecular markers were needed. The aim of this research was to obtain the information of genetic variation and relationship of local garlic clones. This research was carried out at Banaran Experimental Garden Batu, from June to November 2005, whereas isozyme and RAPD analyses were conducted in Molecular Biology Laboratory, Brawijaya University and Indonesian Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research Institute, Bogor, respectively. The value of genetic relationship showed by isozyme and RAPD methods was almost the same, these were 0.53-0.91 and 0.54-0.94, respectively. Level of genetic relationship among local garlic clones was quite low. Isozyme and 2 primers of OPG 18 and OPN 06 were useful for identification and denomination of local garlic clones.

Keywords: *Allium sativum*; Isozyme; Genetic relationship; Clones; RAPD.

Saat ini klon-klon bawang putih lokal (*Allium sativum* L.) sangat sulit ditemukan di sentra produksi maupun di tingkat pedagang. Hal ini disebabkan karena membanjirnya bawang putih impor yang memenuhi pasar bawang putih Indonesia. Oleh karena itu, eksplorasi dan konservasi plasma nutfah menjadi hal yang sangat penting dalam upaya mendukung perbaikan kualitas klon bawang putih pada masa mendatang. Hingga saat ini, telah dikoleksi plasma nutfah bawang putih lokal hasil eksplorasi maupun introduksi dari Belanda dan Nigeria (Hardiyanto *et al.* 2003).

Klon-klon bawang putih lokal yang berkembang di lahan petani umumnya diberi nama berdasarkan asal daerah tumbuhnya, seperti Tawangmangu, NTT, Ciwidey, dan Sembalun. Lebih lanjut Volk *et al.* (2004) dan Simon *et al.* (2003) melaporkan bahwa bawang putih sangat

responsif terhadap lingkungan, sehingga suatu klon akan bervariasi bergantung lokasi tanam. Dalam kondisi ini, klon yang secara genetik sama kemungkinan dapat berbeda namanya. Hal ini akan berpengaruh terhadap keefektifan kegiatan eksplorasi dan koleksi plasma nutfah bawang putih. Untuk meningkatkan efisiensi pengelolaan plasma nutfah bawang putih, dirasakan perlu untuk mengevaluasi karakteristik koleksi plasma nutfah bawang putih yang telah dimiliki, terutama untuk mengetahui keragaman dan keekerabatan klon-klon bawang putih lokal dan sekaligus mengidentifikasi kemiripan genetik klon untuk menghindari duplikasi klon koleksi plasma nutfah. Dengan adanya informasi hubungan genetik di antara klon bawang putih, diharapkan akan memberi kemudahan bagi petani untuk memilih klon yang diinginkan untuk usahatani.

Bawang putih merupakan tanaman yang steril, sehingga perbanyakannya dilakukan secara vegetatif. Perbedaan morfologi di antara intra dan interklon bawang putih telah dievaluasi untuk melihat kekerabatan genetik melalui umbi dan daun, tanaman dewasa, dan kemampuan berbunga (Pooler dan Simon 1993, Lallemand *et al.* 1997, Zepeda 1997, Matus *et al.* 1999). Namun karakter morfologi lebih banyak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, seperti ketinggian tempat, kelembaban udara, tipe tanah, dan teknologi budidaya yang diterapkan. Klasifikasi plasma nutfah bawang putih melalui perbedaan morfologi ternyata lebih sulit, karena adanya pengaruh lingkungan terhadap ekspresi beberapa karakter (Bradley *et al.* 1996, Volk *et al.* 2003). Schotterer (2004) dan Hu dan Vick (2003) mengemukakan bahwa marka DNA untuk mempelajari keragaman genetik sudah digunakan secara rutin dan perkembangan teknik molekuler juga bergerak cepat untuk menghasilkan metode yang lebih akurat, cepat, dan murah, khususnya dalam mengidentifikasi variasi genetik.

Saat ini klasifikasi genetik dalam genus *Allium* termasuk bawang putih telah dilakukan melalui teknik biokimia, seperti isozim (Cholakova 2000, Pooler dan Simon 1993, Peffley dan Hou 2000) dan marka DNA seperti RAPD, AFLP, SSR, dan mikrosatelit (Maass dan Klass 1995, Al Zahim *et al.* 1997, Ipek *et al.* 2006). Pola pita polimorfik isozim pada bawang putih telah dihasilkan menggunakan enzim alkohol dehidrogenase (Siquera *et al.* 1988) dan esterase (Pooler dan Simon 1993), sedangkan Ipek *et al.* (2003) melaporkan bahwa enzim SKDH, MDH, IDH, dan AAT tidak menunjukkan variasi isozim pada beberapa klon bawang putih yang diuji. Lebih lanjut dikemukakan oleh Trujillo *et al.* (1995) bahwa marka DNA dapat memberikan estimasi hubungan keragaman genetik yang lebih akurat daripada metode evaluasi secara morfologi maupun isozim. Keuntungan dari analisis RAPD di antaranya adalah mampu mendeteksi perbedaan genom nukleir yang disebabkan keunikan rangkaian nukleotida primer yang berkesesuaian dengan nukleotida pada genom tanaman (Samal *et al.* 2003). Selanjutnya, RAPD juga merupakan metode yang murah dibandingkan metode lain, seperti AFLP, SSR, dan mikrosatelit, serta hanya membutuhkan potongan kecil DNA (Williams *et al.* 1990). Rout *et al.* (2003) menyebutkan

bahwa marka molekuler RAPD menghasilkan sejumlah polimorfisme yang menunjukkan adanya keragaman genetik yang sangat berguna untuk mendeteksi kekerabatan genetik pada sejumlah komoditas. Hasil penelitian Al-Zahim *et al.* (1997) menunjukkan bahwa 26 primer dari 35 primer yang digunakan untuk mengklasifikasikan bawang putih membentuk pola pita polimorfik. Selanjutnya di antara 292 pita yang dihasilkan, 63 atau sekitar 21% adalah polimorfik dengan rerata 2,42 pita polimorfik per primer.

Penelitian bertujuan memperoleh informasi tentang keragaman dan kekerabatan genetik beberapa klon bawang putih lokal dengan menggunakan isozim dan marka RAPD. Penggunaan metode RAPD diduga akan membentuk pola pita yang polimorfik dan tingkat pengelompokan berdasarkan kekerabatan genetik lebih banyak dibandingkan dengan metode isozim.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Kebun Percobaan Banaran, Batu, sedangkan untuk analisis isozim dan RAPD masing-masing dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler, Universitas Brawijaya dan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor mulai bulan Juni sampai dengan November 2005.

Bahan tanaman yang digunakan untuk analisis isozim adalah 8 klon bawang putih lokal, yaitu Lumbu Hijau, Lumbu Kuning, Krisik, Tawangmangu, Sanggah, NTT, Saigon, dan Tiongkok serta 1 klon impor, yaitu Honan, sedangkan untuk analisis RAPD, bahan yang digunakan sama dengan untuk analisis isozim, di tambah dengan 2 klon lokal Teki dan Ciwideo serta tanpa klon Honan. Klon-klon yang digunakan merupakan hasil eksplorasi dari beberapa daerah sentra produksi tanaman bawang putih di Indonesia dan diperoleh dari koleksi plasma nutfah bawang putih di Kebun Percobaan Banaran, Batu.

Siung bawang putih yang sudah siap tanam, direndam ke dalam larutan zat perangsang tumbuh (ZPT) dan fungisida untuk mempercepat pertumbuhan dan menghindari jamur. Konsentrasi

larutan yang digunakan adalah 5 g ZPT dan 5 g fungisida dalam 1 l air. Media tanam terdiri atas campuran pupuk kandang dan tanah dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam polibag berukuran 5 kg dan dibiarkan selama 1 minggu. Sebelum tanam, pada bagian tengah media dibuat lubang sedalam ± 15 cm untuk pemberian pupuk dasar, yaitu NPK dan TSP dengan perbandingan 1:1 sebanyak 15 g. Siung bawang putih ditanam dengan cara ditancapkan tepat di atas lubang yang sudah ditutup tersebut. Pemeliharaan meliputi pemupukan, pengendalian hama dan penyakit, pengairan, dan penyiangan. Pemupukan dilakukan pada umur 2, 4, dan 6 minggu setelah tanam (MST) dengan NPK sebanyak 15 g. Penyemprotan dilakukan 2 kali/minggu dengan insektisida dan fungisida, sedangkan pengairan dilakukan secara periodik. (Hardiyanto *et al.* 2003).

Sampel daun yang telah terbuka sempurna diambil saat tanaman berumur 1 bulan. Ekstraksi dilakukan dengan cara memotong daun kurang lebih 1-2 cm atau kira-kira seberat 0,1 g. Potongan daun tersebut langsung digerus menggunakan mortal yang sudah didinginkan dan diletakkan ke dalam wadah berisi es. Untuk memudahkan proses penggerusan, ditambahkan pasir silika. Setelah daun hancur, ditambahkan buffer ekstraksi yang sudah didinginkan sebanyak 500 μ l dan kembali digerus sampai daun benar-benar halus. Selanjutnya sampel dimasukkan dalam ependorf yang sudah diberi label dan disentrifuse pada 10.000 rpm/menit selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh diambil sebanyak 100 μ l dan diberi 5 μ l **glycerol/dye**. Sebelum dilakukan elektroforesis, sampel dikocok dengan stirer dan disimpan pada suhu -20°C. Selanjutnya, elektroforesis dilakukan dengan metode Pooler dan Simon (1993). Pada analisis isozim, digunakan enzim esterase (EST) dan aspartat amino transferase (AAT). Untuk enzim EST, gel hasil elektroforesis diletakkan pada oven bersuhu 35-40°C selama 15-20 menit atau sampai pita tampak, baru dicuci dengan akuades, sedangkan untuk enzim AAT, proses pewarnaan dilakukan dalam keadaan gelap, selama 15-20 menit.

Pola pita yang dihasilkan diterjemahkan menjadi data biner, yaitu nilai 1 bila ada pita dan nilai 0 bila tidak ada pita pada satu posisi yang sama

antaraksesi dari tiap enzim yang diuji. Selanjutnya dihitung nilai mobilitas relatif dari tiap-tiap pita yang merupakan nilai perbandingan antara jarak pita dengan jarak batas akhir pergerakan pita (Rf). Analisis kekeberatan antarvarietas dilakukan dengan membentuk pengelompokan yang digambarkan dalam dendogram dengan cara memasukkan matriks pada program Clad 97 (Pooler dan Simon 1993).

Pelaksanaan analisis RAPD diawali dengan ekstraksi DNA dari daun dewasa (2 g) menggunakan metode Deng (1995) yang dimodifikasi. Uji kualitas dan kuantitas DNA dilakukan pada gel elektroforesis agarose 0,8% berdasarkan metode Sambrook dan Maniatis (1989). Sepuluh primer digunakan untuk amplifikasi DNA, yaitu OPA 03, OPA 13, OPB 10, OPE 08, OPE 14, OPG 16, OPG 18, OPJ 04, OPN 06, dan OPN 15. Pemilihan primer ini berdasarkan ketersediaan primer di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya dan Genetik Pertanian dan sering digunakan untuk uji identifikasi varietas dari beberapa komoditas termasuk bawang putih. Mesin PCR dijalankan dengan 1 siklus denaturasi suhu 95°C selama 5 menit, diikuti dengan 44 siklus denaturasi suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* suhu 45°C selama 1 menit dan ekstensi suhu 72°C selama 2 menit. Siklus PCR diakhiri dengan 1 siklus ekstensi akhir suhu 72°C selama 7 menit. Pemisahan fragmen RAPD hasil amplifikasi dilakukan dengan metode elektroforesis pada gel agarose 1,4% di dalam larutan 0,5X TBE selama 4 jam pada kekuatan arus 80 volt. Deteksi pita DNA dilakukan dengan merendam gel agarose di dalam larutan etidium bromida (10 mg/l) selama 5 menit dan difiksasi dalam mesin chemi doc.

Pita-pita DNA yang terbentuk dari hasil amplifikasi PCR diterjemahkan ke dalam data biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada pita DNA dan 1 untuk adanya pita DNA pada satu posisi yang sama dari beberapa individu yang dibandingkan. Dendogram dibangun berdasarkan analisis data biner program NTSYS. Pengelompokan atau klusterisasi data matriks yang dihasilkan disusun menurut UPGMA dengan menggunakan metode SHAN pada program NTSYS-PC versi 1,7 (Rohlf 1992).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis isozim menunjukkan bahwa variasi isozim tidak ditemukan pada enzim AAT, karena hanya membentuk 1 pola pita (Gambar 1). Hasil ini sesuai dengan penelitian Ipek *et al.* (2003). Pola pita tersebut tersusun atas 3 buah pita yang selanjutnya akan disebut dengan nama AAT₁, AAT₂, dan AAT₃. Pita pada enzim AAT tersebar pada bagian atas dan bagian bawah gel. Terdapat perbedaan tebal dan tipisnya pita yang terbentuk, AAT₁ tampak tipis, sedangkan AAT₂ dan AAT₃ tampak tebal. Pita yang tebal menunjukkan adanya aktivitas enzim yang tinggi.

Nilai mobilitas relatif (Rf) untuk masing-masing pita, yaitu 0,3 untuk AAT₁, 0,73 untuk AAT₂, dan 0,78 untuk AAT₃ yang ditampilkan dalam bentuk zimogram (Gambar 1). AAT₁ termasuk dalam kategori mobilitas lambat, sedangkan AAT₂ dan AAT₃ termasuk dalam kategori mobilitas cepat. Nilai Rf merupakan nilai perbandingan antara jarak pita dengan jarak batas akhir *running*. Besar kecilnya Rf menunjukkan besar kecilnya berat molekul. Semakin kecil berat molekul akan semakin cepat mobilisasi pita.

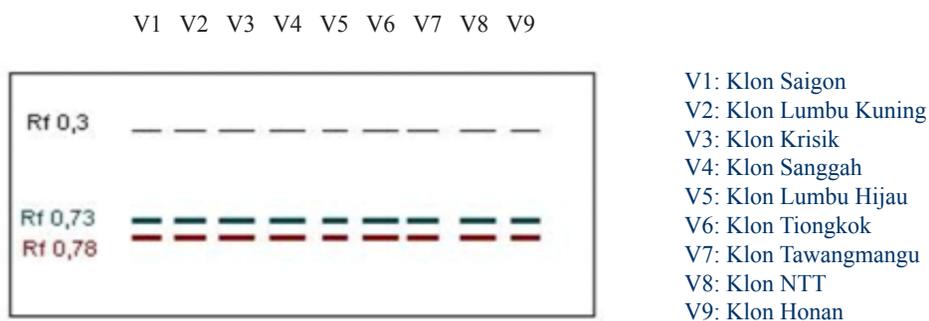
Berbeda dengan AAT, isozim esterase membentuk pola pita polimorfik sebanyak 9 tipe dengan jumlah pita yang bervariasi pada masing-masing tipe. Jumlah total pita yang tampak adalah 11 buah yang kemudian diberi nama EST₁, EST₂, sampai EST₁₁. Pita-pita tersebut tersebar pada bagian tengah dan bawah gel dengan nilai Rf berkisar antara 0,36-1. Jumlah pita terbanyak ditunjukkan oleh klon Tawangmangu (9 pita),

Krisik, dan NTT masing-masing 8 pita, sedangkan klon Saigon menunjukkan jumlah pita yang paling sedikit dibandingkan klon bawang putih lainnya, yaitu hanya 5 pita (Gambar 2).

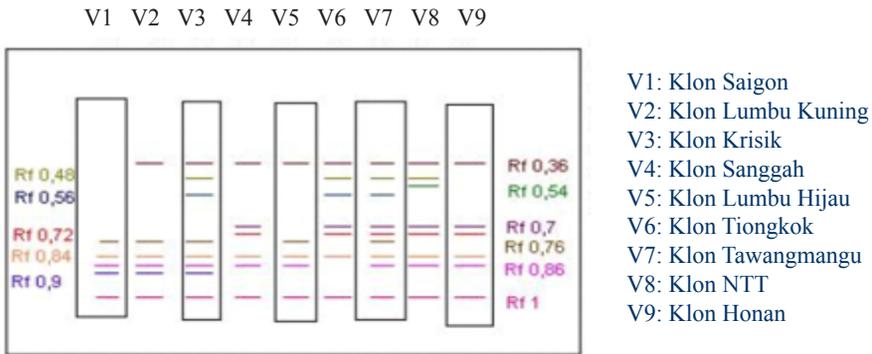
Pada Rf 0,36, hanya klon Saigon yang tidak tampak pitanya. Pada baris kedua (Rf 0,48), pita terdapat pada klon Krisik, Tiongkok, Tawangmangu, dan NTT. Pada baris ketiga (Rf 0,54), pita hanya terdapat pada klon NTT. Selanjutnya pada baris (Rf 0,56) keempat pita terdapat pada klon Krisik, Tiongkok, dan Tawangmangu. Pada baris ke-5 (Rf 0,7) dan ke-6 (Rf 0,72) pita terdapat pada klon Sanggah, Tiongkok, Tawangmangu, NTT, dan Honan. Pada baris ke-7 (Rf 0,76) pita terdapat pada klon Saigon, Lumbu Kuning, Krisik, Lumbu Hijau, dan Tawangmangu. Pada baris ke-8 (Rf 0,84) terdapat pita pada semua klon. Pada baris ke-9 (Rf 0,86) terdapat pita pada semua klon kecuali klon Tiongkok. Pada baris ke-10 (Rf 0,9) pita terdapat pada klon Saigon, Lumbu Kuning, dan Krisik. Pada baris ke-11 (Rf 1,0) terdapat pita pada semua klon.

Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian dari Ipek *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa pada bawang putih, esterase memiliki 2 pita polimorfik. Selanjutnya Pooler dan Simon (1993) menyatakan bahwa bawang putih memiliki 3 pita polimorfis pada enzim esterase. Hal ini disebabkan oleh luasnya kelompok enzim ini. Walaupun enzim esterase spesifik pada ester, tetapi enzim tersebut bereaksi pada semua jenis ester.

Tingkat kemiripan klon bawang putih berkisar antara 0,53-0,91. Berdasarkan dendogram, klon bawang putih terbagi menjadi 2 kelompok besar.



Gambar 1. Pola pita AAT pada 9 klon bawang putih (*Band pattern of AAT of 9 garlic clones*)

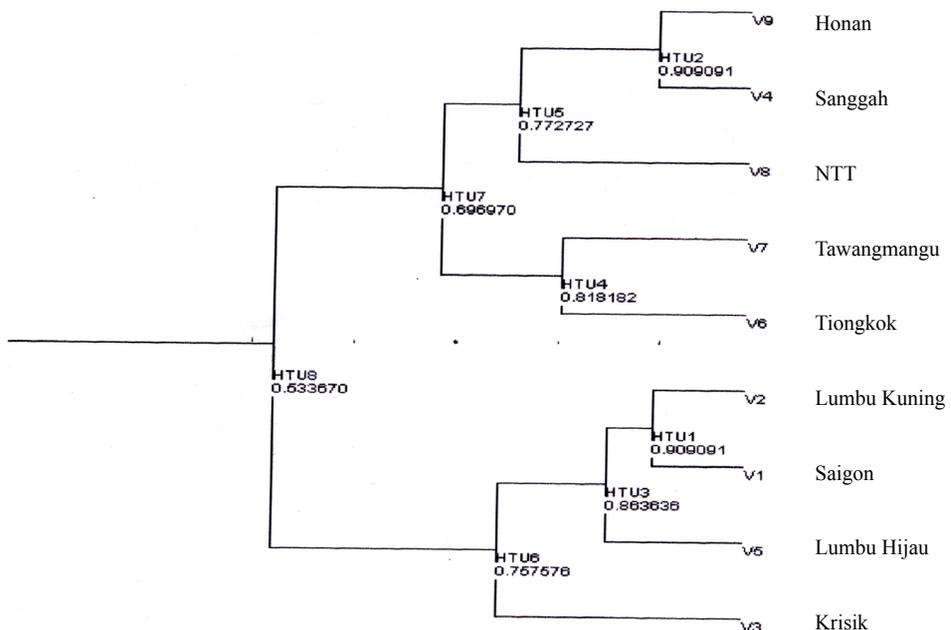


Gambar 2. Jumlah pita dan pola pita esterase pada 9 klon bawang putih (*Band number and band patterns of esterase of garlic clones*)

Kelompok pertama (kelompok A) terdiri dari klon Honan, Sanggah, NTT, Tawangmangu, dan Tiongkok dengan nilai kemiripan 0,69, sedangkan kelompok kedua (kelompok B), terdiri dari klon Lumbu Kuning, Saigon, Lumbu Hijau, dan Krisik dengan nilai kemiripan 0,76 (Gambar 3).

Pada kelompok A terbagi menjadi 2 subkelompok, yaitu subkelompok 1 yang anggotanya adalah klon Tawangmangu dan Tiongkok, dan

subkelompok 2 yang anggotanya adalah klon Honan, Sanggah, dan NTT. Klon Tawangmangu dan Tiongkok memiliki nilai kemiripan 0,82, sedangkan pada subkelompok 2 masih dibagi lagi menjadi 2 kelompok kecil pada nilai kemiripan 0,77 yang memisahkan klon NTT dari 2 klon lainnya. Klon Honan dan Sanggah memiliki tingkat kemiripan yang cukup tinggi yaitu 0,91. Lebih lanjut pada kelompok B, klon Krisik bisa



Gambar 3. Tingkat kekerabatan genetik pada klon bawang putih (*Level of genetic relationship of garlic clones*)

dibedakan dari 3 klon lainnya, yaitu Lumbu Kuning, Saigon, dan Lumbu Hijau pada nilai kemiripan sebesar 0,76, sedangkan klon Lumbu Hijau bisa dibedakan dengan Lumbu Kuning dan Saigon pada nilai kemiripan 0,86.

Menurut Micales dan Bonde (1995) nilai similaritas berkisar antara 0 sampai 1,0 dan hubungan kekerabatan makin dekat bila nilai similaritas makin dekat dengan 1. Berdasarkan enzim esterase, klon Honan yang berasal dari China mempunyai hubungan kekerabatan yang cukup tinggi dengan klon Sanggah hasil eksplorasi dari NTB. Hubungan kekerabatan yang cukup tinggi juga terlihat pada klon Lumbu Kuning dengan Saigon.

Hasil analisis DNA dengan metode RAPD didapatkan bahwa total jumlah fragmen DNA hasil amplifikasi dari 10 klon bawang putih lokal menggunakan 10 primer acak adalah 39 pita DNA, 31 atau sekitar 79,5% dari jumlah fragmen DNA bersifat polimorfik sementara fragmen DNA yang monomorfik berjumlah 8 atau hanya 20,5%. Jumlah fragmen DNA yang diproduksi untuk setiap primer berkisar antara 2 hingga 7, yaitu berasal dari primer OPG 16 dan OPG 18 (Tabel 1).

Jumlah pita polimorfis terbanyak diberikan oleh primer OPG 18 dan OPN 06 yaitu sebesar

Tabel 1. Jumlah produk amplifikasi pada beberapa klon bawang putih (*Number of amplification products of several garlic clones*)

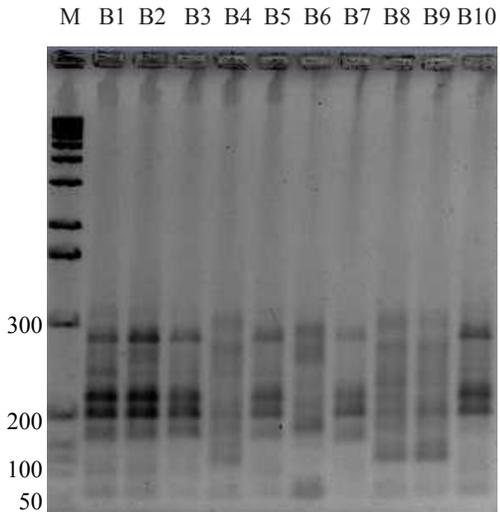
| Primer (Primers) | Jumlah produk amplifikasi (<i>Number of amplification products</i>) | | Total |
|---------------------|--|--------------------------------------|-------|
| | Monomorfik (<i>Monomorphic</i>) | Polimorfik (<i>Polymorphic</i>) | |
| OPA 03 | 0 | 3 | 3 |
| OPA 13 | 1 | 3 | 4 |
| OPB 10 | 2 | 2 | 4 |
| OPE 08 | 0 | 3 | 3 |
| OPE 14 | 1 | 3 | 4 |
| OPG 16 | 2 | 0 | 2 |
| OPG 18 | 2 | 5 | 7 |
| OPJ 04 | 0 | 4 | 4 |
| OPN 06 | 0 | 5 | 5 |
| OPN 15 | 0 | 3 | 3 |
| Total | 8 | 31 | 39 |

8,85% dari total pita yang teramplifikasi. Pita-pita DNA yang teramplifikasi terletak pada posisi antara 50 dan 300 bp. Sementara pada primer OPG 16 semua sampel yang diamati memisah dalam jarak yang sama (monomorfis). Hasil ini menunjukkan bahwa tidak semua primer dapat digunakan untuk mengidentifikasi bawang putih Indonesia. Hal ini sesuai dengan penelitian Nabulsi *et al.* (2001) yang melaporkan bahwa hanya 2 primer dari 13 primer yang dapat digunakan sebagai marka genetik pada bawang putih mutan. Profil pola pita DNA dari bawang putih Indonesia menggunakan beberapa primer RAPD dapat dilihat pada Gambar 4a, 4b, 4c, dan 4d.

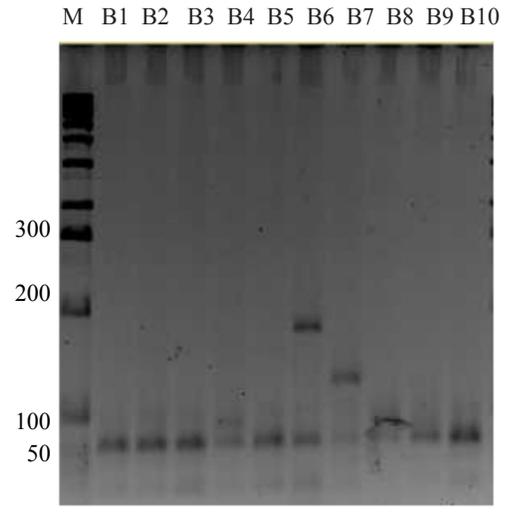
Selanjutnya berdasarkan hasil amplifikasi PCR dilakukan skoring terhadap pita DNA yang muncul dan kemudian diteruskan dengan analisis terhadap kekerabatan melalui program NTSYS sebagaimana yang ditampilkan dalam bentuk pohon kekerabatan pada Gambar 5.

Berdasarkan dendrogram gabungan, tingkat kemiripan genetik beberapa tingkat kekerabatan genetik klon bawang putih Indonesia berkisar antara 0,54-0,94. Pengelompokan dapat dibedakan atas 3 kelompok utama. Kelompok pertama mengelompok dengan tingkat kemiripan 0,73-0,94 atau jarak genetiknya sebesar 6-27%. Klon yang termasuk dalam kelompok ini adalah Saigon, Lumbu Kuning, Krisik, Lumbu Hijau, Ciwidey, dan Tawangmangu. Kelompok kedua hanya ditempati oleh 1 klon saja yaitu Tiongkok, sedangkan kelompok ketiga mengelompok dengan tingkat kemiripan 0,74-0,91 atau jarak genetiknya sebesar 9-26%. Klon yang termasuk dalam kelompok ini adalah Sanggah, NTT, dan Teki. Berdasarkan pengamatan pola pita DNA dan dendogramnya terlihat bahwa 10 klon bawang putih tersebut menunjukkan tingkat kekerabatan genetik yang cukup rendah. Meskipun demikian, masih terlihat adanya hubungan kekerabatan genetik yang cukup tinggi terutama pada subkelompok, yaitu klon Krisik, Lumbu Hijau, dan Lumbu Kuning, serta Teki dengan NTT masing-masing nilai kekerabatan sebesar 0,90 dan 0,91.

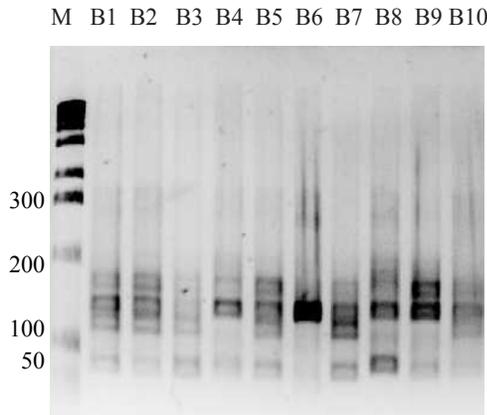
Berdasarkan metode isozim dan RAPD, kisaran nilai kekerabatan genetik hampir sama, yaitu 0,53-0,91 untuk isozim dan 0,54-0,94 untuk RAPD. Ada beberapa klon bawang putih



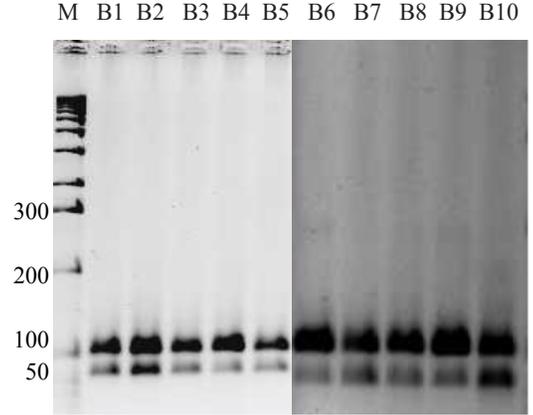
Gambar 4a. Profil pola pita DNA beberapa klon bawang putih dengan primer OPG18 (*Profile of DNA band patterns of garlic clones using primer OPG 18*)



Gambar 4c. Profil pola pita DNA beberapa klon bawang putih dengan primer OPJ 04 (*Profile of DNA band patterns of garlic clones using primer OPJ 04*)



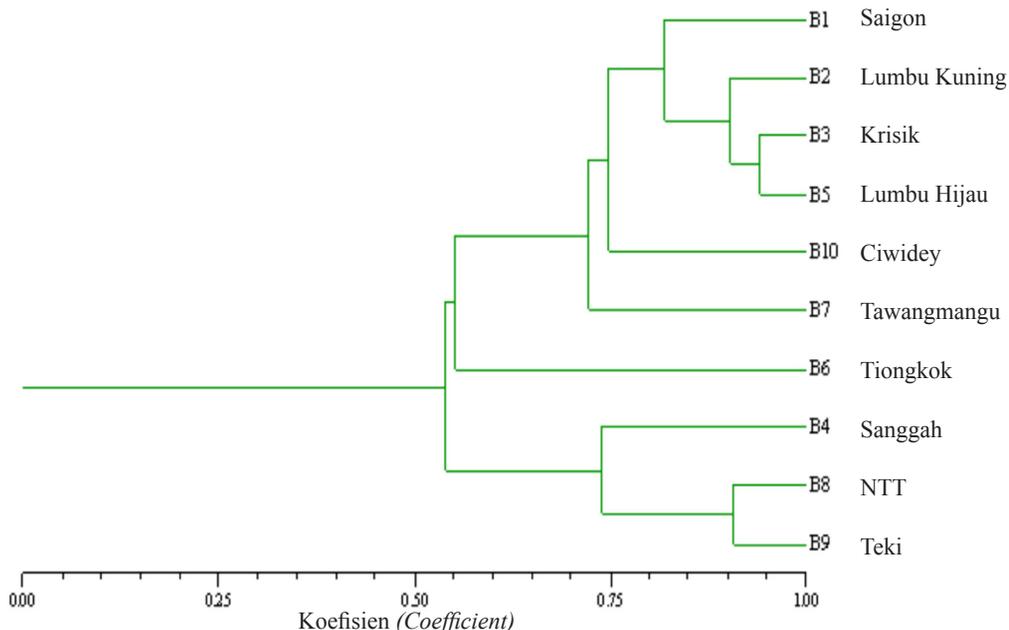
Gambar 4b. Profil pola pita DNA beberapa klon bawang putih dengan primer OPN 06 (*Profile of DNA band patterns of garlic clones using primer OPN 06*)



Gambar 4d. Profil pola pita DNA beberapa klon bawang putih dengan primer OPG 16 (*Profile of DNA band patterns of garlic clones using primer OPG 16*)

yang masuk ke dalam kelompok yang sama melalui penerapan metode isozim dan RAPD, yaitu Lumbu Kuning, Saigon, Lumbu Hijau, dan Krisik, serta NTT dan Sangah. Meskipun demikian, pengelompokan klon berdasarkan metode RAPD tampak lebih terperinci dan jelas. Hal ini dapat dilihat dari tingkat kekerabatan antara klon Tiongkok dengan Tawangmangu. Pada metode RAPD, klon Tiongkok muncul sebagai kelompok tersendiri, yaitu kelompok 2,

sedangkan klon Tawangmangu masuk ke dalam kelompok 1. Pada metode isozim, klon Tiongkok dan Tawangmangu masuk ke dalam 1 kelompok dengan nilai kekerabatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan nilai kekerabatan yang dihasilkan dengan metode RAPD masing-masing adalah 0,82 dan 0,54. Selanjutnya pada metode isozim, klon Lumbu Kuning, Lumbu Hijau, dan Krisik tidak mempunyai hubungan kekerabatan genetik (0,76), sedangkan pada metode RAPD



Gambar 5. Dendrogram beberapa klon bawang putih menggunakan 10 primer (*Dendrogram of garlic clones using 10 primers*)

ketiga klon tersebut masih mempunyai hubungan kekerabatan genetik yang cukup tinggi, yaitu berkisar antara 0,90-0,94. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada klon Lumbu Kuning dan Saigon. Pada metode isozim, 2 klon tersebut masih mempunyai hubungan kekerabatan yang cukup tinggi (0,91), sedangkan pada metode RAPD kedua klon tersebut secara genetik berbeda. Klon Tawangmangu, NTT, dan Sanggah masuk ke dalam kelompok yang sama pada metode isozim akan tetapi pada metode RAPD, Tawangmangu terpisah dengan NTT dan Sanggah.

Menurut Kartikaningrum *et al.* (2003) yang melakukan analisis genetik terhadap sejumlah genotip anggrek, hubungan kekerabatan antara 2 individu atau populasi dapat diukur berdasarkan kemiripan sejumlah karakter dengan asumsi bahwa karakter-karakter yang berbeda disebabkan oleh adanya perbedaan susunan genetik. Pengelompokan yang dilakukan berdasarkan jarak genetik masing-masing klon bawang putih erat kaitannya dengan kekerabatan genetik masing-masing. Menurut Nei dan Li (1987) kemiripan genetik merupakan kebalikan dari jarak genetik. Makin kecil nilai tingkat

kemiripan, memiliki indikasi makin jauhnya kekerabatan genetik sampel yang diuji. Informasi ini sangat berarti dalam kegiatan pemuliaan di mana semakin jauh jarak genetik yang dimiliki suatu sampel dengan sampel yang lain akan meningkatkan peluang mendapatkan keragaman genetik.

Pengelompokan plasma nutfah bawang putih berdasarkan metode isozim dan RAPD ternyata terdapat beberapa kesamaan dengan pengelompokan secara morfologi terutama pada karakter berat dan diameter umbi. Klon Krisik, Lumbu Hijau, Saigon, dan Lumbu Kuning berada dalam 1 kelompok berdasarkan karakter berat dan diameter umbi. Namun untuk karakter warna daun, Lumbu Hijau dan Lumbu Kuning berada pada kelompok yang berbeda, sedangkan pengelompokan dengan metode isozim dan RAPD masuk dalam 1 kelompok (Hardiyanto *et al.* 2005). Lebih lanjut dikemukakan oleh Panthee *et al.* (2006) bahwa analisis keragaman genetik pada bawang putih berdasarkan morfologi sangat bervariasi, bahkan dapat mencapai 86%. Pengamatan secara morfologi seperti tinggi tanaman, berat dan diameter umbi, jumlah siung per umbi, saat panen, dan hasil ternyata memberikan

variasi yang cukup tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa metode molekuler lebih sensitif dalam membedakan karakteristik klon bawang putih.

KESIMPULAN

1. Berdasarkan metode isozim dan RAPD, tingkat keekerabatan genetik klon bawang putih lokal yang digunakan cukup rendah, masing-masing berkisar antara 0,53-0,91 dan 0,54-0,94.
2. Beberapa klon bawang putih masuk ke dalam kelompok yang sama berdasarkan metode isozim maupun RAPD, yaitu Lumbu Kuning, Saigon, Lumbu Hijau, dan Krisik, serta NTT dan Sanggah.
3. Berdasarkan analisis isozim, klon Honan dan Sanggah berkerabat dekat, demikian pula Lumbu Kuning dengan Saigon. Sedangkan dengan metode RAPD, klon Krisik, Lumbu Hijau, dan Lumbu Kuning berkerabat dekat, serta NTT dengan Teki.
4. Enzim esterase dan 2 primer RAPD masing-masing OPG 18 dan OPN 06 dapat digunakan untuk identifikasi keekerabatan genetik klon bawang putih Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pelaksana penelitian ini mengucapkan banyak terima kasih kepada Ir. Sri Lestari P, MS dosen Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya dan Sdr Niken T. mahasiswi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang yang telah membantu dalam melaksanakan sebagian tahapan penelitian ini terutama dalam kegiatan analisis isozim.

PUSTAKA

1. Al-Zahim, A., H.J. Newbury, and B.V.F. Lloyd. 1997. Classification of Genetic Variation in Garlic (*Allium sativum* L.) Revealed by RAPD. *Hort. Sci.* 32(6):1102-1104.
2. Bradley, K.F., M.A. Rieger, and G.G. Collins. 1996. Classification of Australian Garlic Cultivars by DNA Fingerprinting. *Australian J. Exp. Agric.* 36:613-618.
3. Cholakova, N. 2000. Application of Esterase Isozymes for Garlic Ecotype Identification. *Biologia Plantarum* 43(3):445-446.

4. Deng, Z. N., A. Gentile, E. Domina, A. Vardi and E. Tribulato. 1995. Identification on In Vivo and In Vitro Lemon Mutans by RAPD Markers. *J. Hort. Sci.* 70(1): 117-125.
5. Hardiyanto, N.F. Devy, dan A. Supriyanto. 2003. Eksplorasi, Karakterisasi, dan Evaluasi Beberapa Varietas Bawang Putih. *Laporan Hasil Penelitian TA 2003*. Loka Penelitian Tanaman Jeruk dan Hortikultura Subtropika. 18 pp.
6. _____, S. Lestari, dan N. Trisnangsih. 2005. Keragaman Beberapa Varietas Lokal Bawang Putih Berdasarkan Morfologi dan Analisis Isozim. 15pp.
7. Hu, J. And B.A. Vick. 2003. Target Region Amplification Polymorphism: A Novel Marker Technique for Plant Genotyping. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 21:289-294.
8. Ipek, M., A. Ipek, and P.W. Simon. 2003. Comparison of AFLPs, RAPD Markers, and Isozymes for Diversity Assessment of Garlic and Detection of Putative Duplicates in Germplasm Collections. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128(2):246-252.
9. _____. 2006. Sequence Homology of Polymorphic AFLP Markers in Garlic (*Allium sativum* L.). *Genome.* 49:1246-1255.
10. Kartikaningrum, S., N. Hermiati, A. Baihaki, M.H. Karmana, dan Toruan-Mathius. 2003. Keekerabatan 13 Genotipe Anggrek Subtribe Sarcanthinae Berdasarkan Karakter Morfologi dan Pola Pita DNA. *J. Hort.* 13(1):7-15.
11. Lallemand, J., C.M. Messian, F. Briand, and T. Etoh. 1997. Delimitation of Varietal Groups in Garlic (*Allium sativum* L.) by Morphological, Physiological, and Biochemical Characters. *Acta Hort.* 433:123-132.
12. Maass, H.I and M. Klass. 1995. Intraspecific Differentiation of Garlic by Isozyme and RAPD Markers. *Theoretical Appl. Gen.* 91:89-97.
13. Matus, I., M.I. Gonzales, and A. Del Pozo. 1999. Evaluation of Phenotypic Variation in a Chilean Collection of Garlic (*Allium sativum* L.) Clones Using Multivariate Analysis. *Plant Genetic Res.* 117:31-36.
14. Micales, J.A and Bonde, M.R. 1995. Isozyme: Methods and Application. In R.P.Singh and U.S. Singh (Eds.). *Molecular Methods in Plant Pathology*: Lewis Publishers. London. Pp:115-130.
15. Nabulsi, I., B. Al-Safadi, N.M. Ali, and M.I.E. Arabi. 2001. Evaluation of Some Garlic (*Allium sativum* L.) Mutants Resistant to White Rot Disease by RAPD Analysis. *Ann. Appl. Biol.* 138:197-202.
16. Nei, M. and W. Li. 1987. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individual: *Genetic.* 89:583-590.
17. Panthee, D.R., H.N. Regmi, P.P. Subedi, S. Bhattarai, and J. Dhakal. 2006. Diversity Analysis of Garlic (*Allium sativum* L.) Germplasm Available in Nepal Based on Morphological Characters. *Gen. Res. Crop. Evol.* 53(1): 205-212.
18. Peffley, E.B., and A. Hou. 2000. Bulb-type Onion Introgressant Possessing *Allium fistulosum* L Genes Recovered from Interspecific Hybrid Backcrosses between *A. cepa* L. and *A. fistulosum* L. *Theor. Appl. Genet.* 100: 528-534.

19. Pooler, M.R and Simon, P.W. 1993. **Characterization and Classification of Isozymes and Morphological Variation in A Diverse Collection of Garlic Clones.** *Euphytica* 68:121-130.
20. Rohlf, F.J. 1992. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analyses System (version 1.7). State University of New York, NY. 330 p.
21. Rout G.R., D. Bhattacharya, R.M. Nanda., S. Nayak, and P. Das. 2003. Evaluation of Genetic Relationship in *Dalbergia* Species Using RAPD markers. *Biodiv.Conserv.* 12:197-206.
22. Sambrook, J., and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning (A laboratory manual)* Vol. 2. Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p.
23. Samal,S., G.R. Rout, and P.C. Lenka. 2003. **Analysis of Genetic Relationship between Populations of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) by Using Morphological Characterisation and RAPD Markers.** *Plant Soil Environ.* 49(4):176-182.
24. Simon, P.W., R.M. Honan, M.M. Jenderek, and R.E. Voss. 2003. Environmental and Genetic Effects on Garlic Growth, Flowering, and Bulb Characters. *Hort. Sci.* 38:783-790.
25. Siqueira, W.J., H.P.M. Filho, R.S. Lisboa, and J.B. Fornasier. 1988. **Morphological and Electrophoretic Characterization of Garlic Clones.** *Bragantia* 44(1):357-374.
26. Schotterer, C. 2004. The Evolution of Molecular Markers -just a Matter of Fashion ? *Nature Rev.Gen.* 5:63-69.
27. Trujillo, I., L. Rallo, and P. Arus. 1995. Identifying Olive Cultivars by Isozyme Analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120:318-324.
28. Volk, G.M., A.D. Henk, and C.M. Richards. 2003. Diversity of Garlic Accessions within the National Plant Germplasm System. *Hort. Sci.* 38:736-741.
29. _____ . 2004. Genetic Diversity among US Garlic Clones as Detected using AFLP Methods. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129(4):559-569.
30. Williams, J.G.K., A. Kubelik., K.J. Livak., J.A. Rafiski., and S.V. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
31. Zepeda, A.H. 1997. Number of Cloves per Bulb; Selection Criteria for Garlic Improvement. *Acta Hort.* 433:265-270.