

Keragaman Genetik Populasi Sengon (*Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen) pada Hutan Rakyat di Jawa Berdasarkan Penanda RAPD

Genetic Diversity of Sengon Population (Paraserianthes falcataria (L)) in Java Community Forest Based on RAPD Marker

Ulfah Juniarti Siregar dan Ranny Dwita Olivia
Departemen Silvikultur Fakultas Kehutanan IPB

ABSTRACT

Sengon is a multipurpose fast growing tree species, which is commonly planted as community forest in Java. However, sengon monoculture is susceptible to pest and disease such as stem borer (Xystrocera festiva), and gall rust. One way to manage the pest is by planting resistant trees as a result of tree improvement program. High genetic diversity of base population is needed to start improvement program. The aim of this research is to measure genetic diversity of 9 sengon populations throughout Java using RAPD. Leaves were taken from 25 tree samples in each population. DNA was extracted using combination of CTAB and GenElute Kit (SIGMA) then amplified using 5 random primers. Data was analyzed by POPGENE32 and NTSYS. Parameters measured were expected heterozygocities (H_e), percentage of polymorphic loci (PPL), observed- (n_a) and effective alel (n_e), and genetic distance. Expected heterozygosity value of entire population was 0.2349 indicating that sengon population in Java has high genetic diversity. Most of genetic variation is found within population (82%) while variation among population was only 18%. Dendrogram based on genetic distance showed random distribution of sengon population in Java, because closely located populations did not necessarily have close genetic relationship with each other.

Key words: genetic distance, genetic diversity, Sengon, RAPD

PENDAHULUAN

P. falcataria (L) Nielsen yang dikenal dengan nama lokal sengon banyak ditanam pada hutan rakyat di Jawa, karena tergolong pohon yang cepat tumbuh (Santoso 1992), multiguna baik itu daun, batang, dan sistem perakaran. Akan tetapi Sengon ditanam secara monokultur sehingga tanaman ini mempunyai masalah yaitu, mudah terserang hama dan penyakit seperti hama penggerek batang *Xystrocera festiva*, damping off, dan karat puru. Untuk itu diperlukan Sengon unggul yang dihasilkan dari program pemuliaan. Untuk melaksanakan program pemuliaan, maka diperlukan keragaman genetik yang tinggi. Pengetahuan tentang keragaman genetik sangat penting sebagai dasar pengembangan tanaman sengon melalui program pemuliaan. Keragaman genetik yang dihasilkan dari analisis DNA juga berguna dalam penentuan hubungan kekerabatan antar individu atau populasi yang diteliti.

Salah satu metode analisa keragaman yang banyak digunakan adalah dengan RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). RAPD merupakan salah satu marka molekuler berbasis PCR yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi

keragaman pada tingkat interspesies maupun antarspesies (Qian *et al* 2001 dalam Pharmawati 2009). Teknik RAPD memiliki keunggulan diantaranya adalah murah dan relatif mudah dilakukan karena hanya memerlukan sejumlah kecil DNA. Penggunaan penanda RAPD memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang diseleksi dengan menggunakan satu primer bersifat acak.

Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik di dalam dan antar populasi tanaman Sengon pada beberapa hutan rakyat di Jawa.

Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah memberikan informasi dasar sebagai landasan ilmiah tentang pola keragaman genetik baik di dalam maupun antar populasi untuk kegiatan konservasi sumberdaya genetik dan pemuliaan tanaman sengon.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Tempat penelitian analisis DNA dilakukan di *Common Laboratory SEAMEO BIOTROP* dan laboratorium Silvikultur Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2011-Januari 2012.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan berupa daun yang berasal dari tegakan yang diambil secara acak di beberapa hutan rakyat di Jawa. Adapun daerah-daerah pengambilan sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Daerah-daerah tempat pengambilan sampel daun Sengon pada hutan rakyat di Jawa.

Provinsi	Kota/ Kabupaten	Jumlah sampel
Jawa Barat	Cianjur	25
	Sukabumi	25
	Garut	25
	Subang	25
	Kuningan	25
	Tasikmalaya	25
Jawa Tengah	Wonosobo	25
Jawa Timur	Kediri	25
	Lumajang	25
Total		225

Prosedur Kerja

Ekstraksi DNA

Dalam penelitian ini, ekstraksi DNA sengon dilakukan dengan dua metode, yaitu metode CTAB dan *Kit GenElute SIGMA*. Metode CTAB menggunakan larutan *buffer* CTAB (Tris-HCL 1M, NaCl 5M, EDTA 0,5 M dan CTAB 10%), dipilih karena lebih murah dan mudah dilakukan (Rogers and Bendich 1994). Adapun langkah awal yang dilakukan dari 2 metode ini hampir sama yaitu, sampel daun sengon ditimbang 0.25-0.5 gr digerus dengan bantuan nitrogen cair. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam mikrotube 2 ml yang telah diisi 1 ml *buffer* ekstrak CTAB dan 1% merkaptoetanol. Larutan ekstrak DNA dipurifikasi, proses purifikasi dilakukan sebanyak dua kali, hal ini bertujuan untuk memperoleh DNA yang memiliki tingkat kemurnian tinggi. Kemudian dihomogenkan perlahan sampai terbentuk benang-benang putih, setelah itu pelet DNA dilarutkan dengan *buffer* TE. Prosedur *Kit GenElute SIGMA* dilakukan sesuai dengan prosedur yang diberikan oleh produk.

Jenis Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer, berupa hasil skoring pola pita dari 9 populasi di Jawa.

Seleksi Primer

Primer adalah rantai pendek DNA yang dihasilkan secara buatan yang biasanya terdiri antara 10-25 nukleotida (Finkeldey 2005). Dalam teknik RAPD, primer yang digunakan berupa oligonukleotida yang memiliki panjang sebesar 10-mer yang dipilih secara acak minimum memiliki basa G dan C. Dari 41 primer yang diseleksi, dipilih 5 primer dalam penelitian ini yaitu OPA2 (TGCCGAGCTG), OPA3 (AGTCAGCCAC), OPB10 (CTGCTGGGAC), OPY5 (GGCTGCGAC), dan OPU5 (TTGGCGGCCT).

Tabel 2 Komponen bahan untuk reaksi PCR.

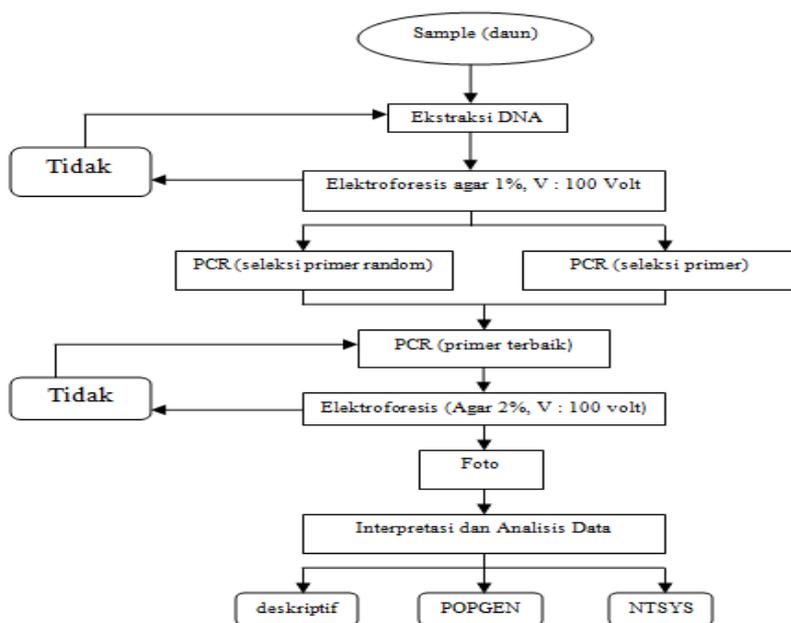
No	Nama Bahan	1 sampel reaksi
1	DNA target	2 µl
2	Primer	1,5 µl
3	PCR buffer	5 µl
4	MgCl ₂	2,5 µl
5	dNTP	0,5 µl
6	Taq polymerase	0,2 µl
7	Nucleas free water	13,3 µl
Total Volume		25 µl

PCR (Polymerase Chain Reaction)

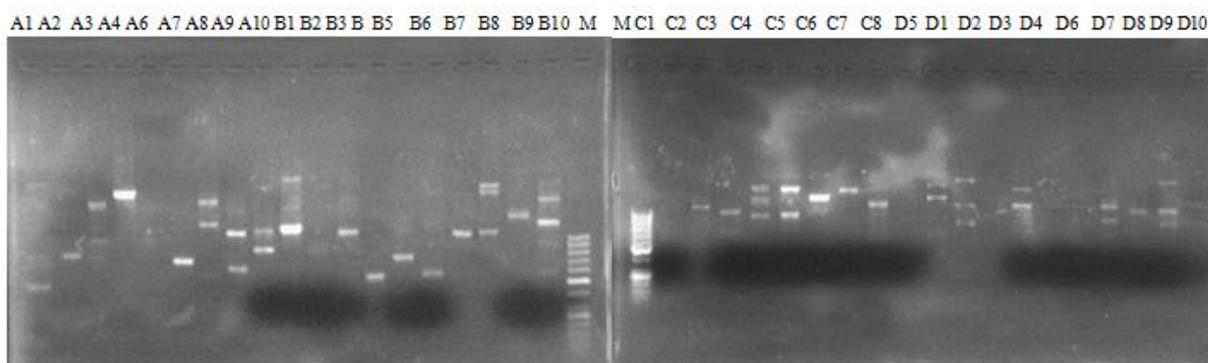
Proses amplifikasi DNA pada proses PCR membutuhkan bahan campuran yang terdiri dari beberapa komponen. Komponen-komponen bahan reaksi PCR ini dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil amplifikasi DNA pada proses PCR ini ditentukan oleh primer yang digunakan. Adapun tahap PCR yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel 3.

Skoring Fragmen RAPD

Hasil PCR dianalisis dengan melakukan skoring. Profil pita DNA hasil analisis RAPD diskoring dengan ada atau tidaknya hasil amplifikasi. Jika terdapat pita maka genotip dinilai 1 dan jika tidak terdapat pita genotip dinilai 0. Hasil skoring ini berguna untuk memperoleh nilai keragaman genetik yang diolah dengan menggunakan program POPGEN32. Analisis pengelompokan berdasarkan metode UPGMA dengan software NTSYS Versi 2.0.



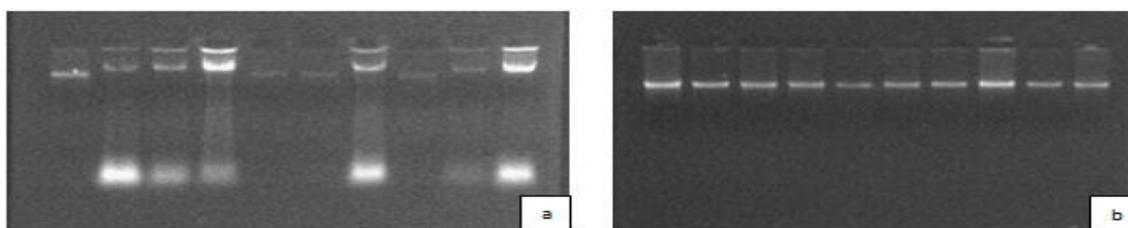
Gambar 1 Bagan tahapan penelitian.



Gambar 2 Foto hasil seleksi primer pada DNA Sengon.

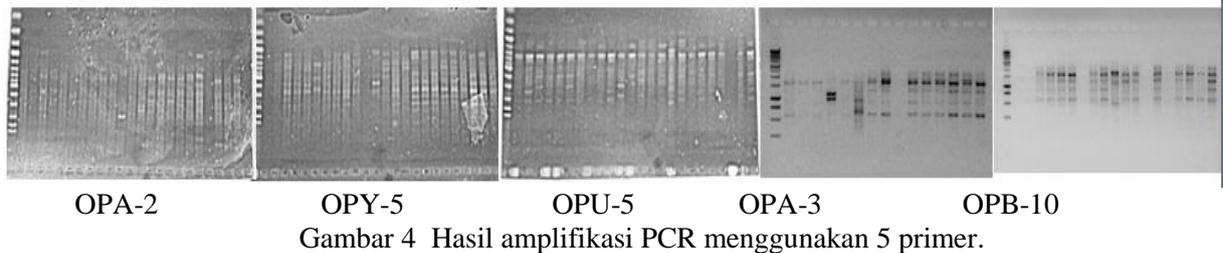
Tabel 3 Tahapan proses PCR

<u>Tahapan</u>	<u>Suhu</u>	<u>Waktu</u>	<u>Jumlah Siklus</u>
<u>Pre-denaturation</u>	95°C	2 menit	1
<u>Denaturation</u>	95 °C	1 menit	35
<u>Annealing</u>	37 °C	2 menit	35
<u>Extension</u>	72 °C	2 menit	35
<u>Final Extension</u>	72 °C	5 menit	1



Gambar 3 Contoh hasil ekstraksi DNA Sengon. Ket: (a) DNA Sengon yang diekstraksi dengan Buffer CTAB dan dilakukan pengenceran, (b) DNA Sengon yang diekstraksi dengan Kit GenElute.

HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 4 Hasil amplifikasi PCR menggunakan 5 primer.

Tabel 4 Hasil pengukuran diversitas 9 populasi Sengon di Jawa.

No	Populasi	Jumlah Sample	Na	Ne	He	PLP
1	Cianjur	25	1.9815	1.4462	0.2757	98.15 %
2	Garut	25	2.0000	1.2555	0.1602	100 %
3	Sukabumi	25	2.0000	1.4693	0.2761	100 %
4	Tasikmalaya	25	2.0000	1.2675	0.1830	100 %
5	Subang	25	2.0000	1.2808	0.1941	100 %
6	Kuningan	25	2.0000	1.2128	0.1485	100 %
7	Wonosobo	25	2.0000	1.1675	0.1328	100 %
8	Kediri	25	2.0000	1.4892	0.2946	100 %
9	Lumajang	25	2.0000	1.2458	0.1785	100 %
	Rata-rata		2.0000	1.3280	0.2349	100 %

Keterangan:

- Na : Jumlah alel yang diamati
- Ne : Jumlah alel yang efektif
- He : Keragaman genetik
- PLP : Presentasi Lokus Polimorfik

Hasil dari uji kualitas DNA menentukan langkah selanjutnya untuk tahapan PCR. Dalam penelitian ini dilakukan 2 metode ekstraksi DNA yaitu dengan buffer CTAB dan ekstraksi dengan menggunakan *Kit GenElute SIGMA*. Dapat dilihat hasil ekstraksi DNA pada Gambar 3. Pada gambar terlihat bahwa DNA yang dihasilkan oleh metode *Kit GenElute SIGMA* lebih murni dibandingkan dengan CTAB yang masih mengandung kontaminan.

Salah satu keuntungan analisis keragaman menggunakan teknik molekuler yang memanfaatkan teknologi PCR adalah kuantitas DNA yang dibutuhkan hanya sedikit. Selain itu, untuk RAPD tingkat kemurnian DNA yang dibutuhkan tidak perlu terlalu tinggi dengan kata lain teknik ini toleran terhadap tingkat kemurnian. Akan tetapi dibutuhkan senyawa-senyawa kontaminan yang dapat mengganggu reaksi PCR seperti polisakarida dan metabolit sekunder (Prana *et al* 2003).

Dari hasil amplifikasi PCR 5 primer (OPA-2, OPB-10, OPU-5, OPA-3, OPY-5) berkisar antara 1-10 pita. Analisis DNA Sengon dengan penanda RAPD dilakukan melalui skoring dari semua individu yang

berasal dari 9 populasi, dengan jumlah 225 individu (Gambar 4).

Variasi Genetik Dalam Populasi

Menurut Finkeldey (2005), Parameter yang digunakan untuk menandakan keragaman genetik dalam populasi yaitu Presentase Lokus Polimorfik (PLP), jumlah alel yang diamati (na), jumlah alel efektif (ne) dan variasi genetik (He). Hasil analisis menunjukkan rata-rata jumlah alel yang diamati pada populasi sengon di Pulau Jawa adalah 2.0000 dan rata-rata jumlah alel efektif adalah 1.3280. Adapun nilai rata-rata keragaman genetik (He) pada total populasi Sengon di Pulau Jawa sebesar 0.2349 dan persen lokus polimorfis (PLP) pada populasi sengon dalam penelitian mencapai 100% (Tabel 4).

Dari Tabel 4 dapat dilihat nilai He dari masing-masing populasi Sengon cukup beragam berkisar antara 0.1328-0.2946 dengan nilai rata-rata He populasi Sengon di Jawa sebesar 0.2349. Menurut Weising (2005), *dominant marker* seperti RAPD hanya dapat memproduksi dua alel pada masing-masing lokus. Maka dari itu nilai He maksimum adalah 0.5. Dari hasil analisis DNA dalam penelitian ini, dapat dikatakan bahwa

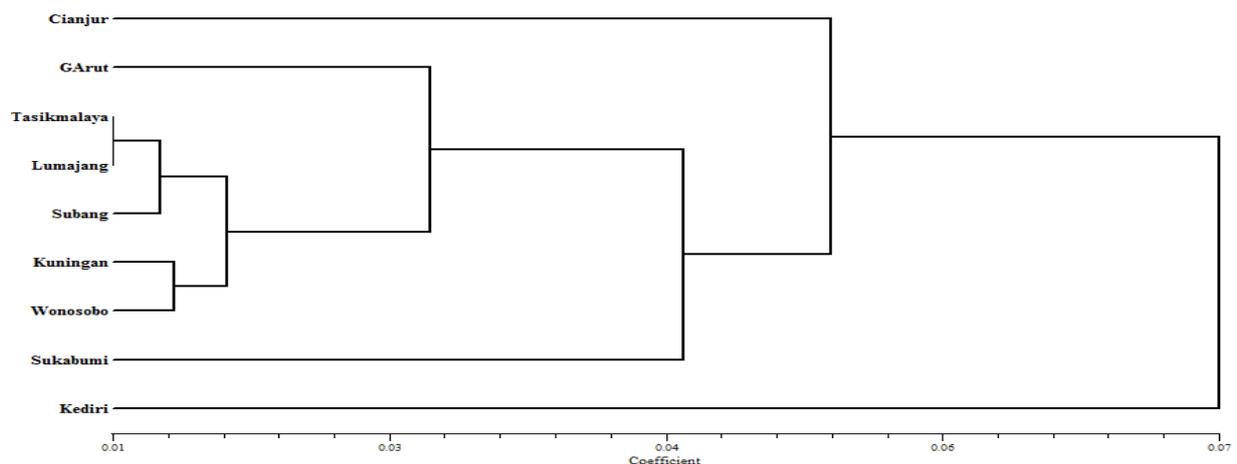
keragaman genetik populasi Sengon di Jawa tergolong tinggi. Hasil ini hampir mendekati dari hasil penelitian keragaman genetik Sengon yang dilakukan dengan penanda RAPD oleh Agustina (2009) sebesar 0.2813 dan Widyastuti (2007) sebesar 0.1852. Hasil

ini tidak berbeda jauh dengan penelitian keragaman genetik dengan penanda isoenzim oleh Gunawan (2005) sebesar 0.235, hasil penelitian Basyuni (1998) sebesar 0.226, dan Wulan (2003) sebesar 0,172).

Jarak Genetik Antar Populasi

Tabel 5 Rata-rata jarak genetik antar populasi Sengon.

pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	****								
2	0.0809	****							
3	0.0461	0.0633	****						
4	0.0433	0.0222	0.0397	****					
5	0.0604	0.0302	0.0320	0.0165	****				
6	0.0463	0.0314	0.0432	0.0164	0.0277	****			
7	0.0451	0.0363	0.0459	0.0196	0.0194	0.0157	****		
8	0.0769	0.0814	0.0703	0.0712	0.0762	0.0759	0.0686	****	
9	0.0457	0.0304	0.0416	0.0123	0.0134	0.0157	0.0135	0.0736	****



Gambar 5 Dendrogram jarak genetik populasi Sengon di Pulau Jawa.

Pada Tabel 5 didapat bahwa jarak genetik Sengon menunjukkan kisaran antara 0.0123-0.0814. Dari hasil penelitian ini populasi Garut dan Kediri memiliki jarak genetik terjauh yaitu 0.0857. Jarak genetik yang besar ini menandakan bahwa hubungan kekerabatan kedua populasi ini cukup jauh. Sedangkan populasi sengon Tasikmalaya dari Jawa Barat menunjukkan jarak genetik terdekat dengan populasi sengon Lumajang dari Jawa Timur dengan jarak genetik sebesar 0.0123.

Hasil analisis pengelompokan dengan jarak genetik menunjukkan famili yang berasal dari populasi yang sama tidak selalu berada dalam kelompok yang sama (Widyastuti

2007). Jarak genetik digunakan dalam mendeteksi hubungan kekerabatan antar populasi dan antar jenis.

Dari Gambar 5 diatas menunjukkan Tasikmalaya dan Lumajang memiliki jarak genetik paling dekat. Dari dendrogram terdapat 2 kelompok besar dalam populasi ini, untuk kelompok pertama terdiri atas Tasikmalaya, Lumajang, Subang, Kuningan, dan Wonosobo, Garut, Sukabumi, Cianjur, dan kelompok kedua adalah Kediri. Kediri memiliki hubungan jarak genetik yang jauh dengan 8 populasi lainnya. Dendrogram diatas menunjukkan bahwa semua populasi mengelompok secara acak, karena pola

penyebarannya tidak dipengaruhi oleh sebaran geografis. Hal ini terbaca dari dendogram bahwa populasi yang terdapat pada satu daerah yang sama (Jawa Barat) ternyata memiliki jarak yang dekat dengan provinsi lain. Jika ditinjau dari letak geografis, masing-masing provinsi memiliki jarak yang jauh.

Berdasarkan hasil *Analysis of Molecular Variance* (AMOVA) pada Tabel 6, keragaman

genetik yang tersimpan didalam populasi adalah sebesar 82% sedangkan keragaman genetik antar populasi adalah 18%. Dari hasil yang didapat menunjukkan bahwa sebagian besar variasi genetik tersimpan di dalam populasi dibandingkan keragaman genetik antar populasi.

Tabel 6 Hasil Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	Est. Var.	%
Antar Populasi	8	410.276	51.284	1.737	18
Dalam Populasi	216	1695.120	7.848	7.848	82
Total	224	2105.396		9.585	100

Adanya keragaman genetik yang tinggi pada populasi sengon bertujuan dalam pelaksanaan program pemuliaan pohon untuk menghasilkan keturunan yang baik. Menurut Namkoong *et al* (1996) dalam Finkeldey (2005) salah satu indikator genetik dalam pelaksanaan manajemen hutan lestari adalah besarnya keragaman genetik.

Variasi genetik yang tinggi berpengaruh terhadap kemampuan suatu jenis untuk beradaptasi. Variasi genetik yang tinggi akan menghasilkan sifat resisten atau tahan terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim, sehingga serangan hama dan penyakit dapat dihindari.

Keragaman genetik merupakan kunci dalam program pemuliaan pohon, hal ini dikarenakan adanya maksimalisasi perolehan genetik akan sifat tertentu. Program pemuliaan pohon berguna untuk memelihara dan meningkatkan variabilitas genetik di dalam suatu populasi. Studi keragaman genetik memiliki manfaat penting untuk pemuliaan pohon yaitu dalam membantu seleksi buatan, membantu menyiapkan uji provenan dan pengendali persilangan dan aktivitas silvikultur. Seleksi merupakan proses pemuliaan pohon dan dasar untuk perbaikan dalam mendapatkan kultivar unggul yang baru, keragaman genetik yang tinggi merupakan suatu syarat efektifnya program seleksi.

Dalam penelitian ini keragaman genetik populasi sengon sebesar 0.2349 sehingga dari hasil yang didapat tersebut menunjukkan bahwa keragaman populasi sengon yang cukup tinggi mendukung dalam kegiatan pemuliaan.

Selain itu keragaman genetik yang tinggi ini juga menguntungkan dalam pelaksanaan konservasi tanaman hutan untuk pelestarian keragaman genetik.

Oleh karena itu dalam upaya pemuliaan pohon, dalam membangun kebun benih untuk memperbaiki dan menghasilkan pohon yang baik dan resisten terhadap hama dan penyakit harus dilakukan sistem penanaman dengan melihat hubungan kekerabatan. Apabila anakan berasal dari populasi yang berdekatan maka penanamannya dilakukan sangat berjauhan. Berdasarkan dendogram Gambar 5 anakan dari populasi Tasikmalaya harus ditanam dengan jarak yang jauh dengan populasi Lumajang, sedangkan populasi Tasikmalaya harus ditanam berdekatan dengan populasi Kediri. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan variasi genetik dalam populasi tersebut. Sehingga akan menghasilkan kualitas bibit yang berkualitas dan unggul secara genetik. Dilihat dari pola penyebarannya sengon di Jawa menyebar secara acak, karena populasi yang terdapat pada satu daerah yang sama (Jawa Barat) ternyata memiliki jarak yang dekat dengan provinsi lain. Jika ditinjau dari letak geografis, masing-masing provinsi memiliki jarak yang jauh. Oleh karena itu kemungkinan penyebaran Sengon di Jawa dilakukan secara serentak sehingga menghasilkan jarak genetik yang dekat di Jawa.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa nilai keragaman genetik (H_e) sengon di Jawa tergolong tinggi dengan nilai rata-rata $H_e = 0.2349$. Nilai H_e terendah terdapat pada populasi sengon yang berasal dari Wonosobo ($H_e = 0.1328$) dan nilai H_e tertinggi terdapat pada populasi Kediri ($H_e = 0.2946$). Berdasarkan jarak genetik terlihat bahwa populasi sengon Tasikmalaya dan populasi sengon Lumajang memiliki jarak genetik terdekat (0.0123), sedangkan jarak genetik terjauh yaitu antara Garut dan Kediri (0.0814). Adapun pola penyebaran sengon di Jawa terjadi secara acak, karena populasi yang terdapat pada satu daerah yang sama (Jawa Barat) ternyata memiliki jarak yang dekat dengan provinsi lain. Sebagian besar variasi genetik tersimpan di dalam populasi yaitu sebesar 82%, sedangkan perbedaan antar populasi hanya sebesar 18%.

Saran

Adapun saran dalam penelitian ini adalah untuk pelaksanaan kegiatan konservasi tanaman, dilihat dari keragaman genetik yang tinggi, populasi sengon yang berasal dari Sukabumi dan Kediri cukup mewakili. Sedangkan populasi yang memiliki keragaman yang rendah cukup diwakili oleh populasi Sengon Wonosobo. Keragaman genetik Sengon yang tinggi memungkinkan untuk dilakukan kegiatan pemuliaan pohon.

DAFTAR PUSTAKA

- Atmosuseno, B. S. 1999. *Budidaya, Kegunaan, dan Prospek Sengon*. Penebar Swadaya. Bogor.
- Crowder IV. 1986. *Genetika Tumbuhan*. Yogyakarta : UGM-Press.
- Dwiyanti FG. 2009. Keragaman Sengon Solomon (*Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen) pada uji keturunan di hutan percobaan Cirangsad [skripsi]. Bogor. Departemen Silviculture. Institut Pertanian Bogor.
- Finkeldey R. 2005. *Pengantar Genetika Hutan Tropis*. Djahmuri E, Siregar IZ, Siregar UJ, Kertadikara AW, penerjemah. Bogor: Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor.
- Terjemahan dari: *An Introduction to Tropical Forest Genetics*.
- Husnaeni A. 2008. Variasi genetik Jati pada hutan tanaman di Jawa berdasarkan penanda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [skripsi]. Bogor: Fakultas Silviculture . Institut Pertanian Bogor.
- Linhart YB. 2002. Variation in woody plants: molecular biology, evolutionary processes and conservation biology. Di dalam: *Forestry sciences, Molecular biology of woody plant*. Jain SM, Minocha SC (editor). Kluwer Academic Publisher. Netherland.
- Pharmawati M. 2009. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevilla spp* (Proteaceaceae). *Jurnal Biologi XIII* (1): 12-16
- Prana TK, Hartati NS. 2003. Identifikasi sidik jari DNA Talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan teknik RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) : Skrining Primer dan Optimalisasi Kondisi PCR. *Jurnal Natur Indonesia* 5(2): 107-112.
- Santoso, H. B. 1992. *Budidaya Sengon*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Anggota IKAPI.
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G. 2005. *DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods and Applications*. Boca Raton: CRC Press.
- Widyastuti DE. 2007. Keragaman genetik dengan penanda RAPD, fenotipa pertumbuhan dan pendugaan heritabilitas pada sengon (*Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen) [tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut pertanian Bogor.
- Wulan R. 2003. Struktur dan Keragaman Genetik Populasi Sengon (*Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen) pada Hutan Rakyat di Jawa. [Tesis]. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Yunanto T. 2006. Implifikasi Genetik Sistem Silviculture TPTJ pada jenis *Shorea johorensis* di HPH PT. Sari Bumi Kusuma berdasarkan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) [skripsi]. Bogor: Departement Manajemen Hutan, Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor.