



UNIVERSITAS KALSEL



Program Magister
Pendidikan Biologi Urdan

Sertifikat

Hari Cinta Puspa dan Satwa Nasional 2013



Diberikan kepada :

Dindin Hidayatul Mursyidin, M.Sc.

Atas peran dan partisipasinya sebagai

Pemakalah

Judul : Karakterisasi Molekuler Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* Blume) Pelaihari
untuk Mendukung Program Pelestarian dan Pemuliaan

**Seminar Konservasi Keanekaragaman Hayati
"Flora dan Fauna Terpelihara Manusia Sejahtera "**

Banjarmasin, 16 November 2013

Kepala BKSDA
Kalimantan Selatan

Ir. Supriyanto



Ketua Program
Pendidikan Biologi

Dr. H. Muhammad Zaini, M.Pd.

Ketua Pelaksana

Amalia Rezeki, M.Pd.

KARAKTERISASI MOLEKULER ANGGREK BULAN (*Phalaenopsis amabilis* Blume) PELAIHARI UNTUK Mendukung PROGRAM PELESTARIAN DAN PEMULIAAN

Dindin H. Mursyidin

Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler FMIPA UNLAM
Jl. A. Yani Km 36 Banjarbaru, Kalimantan Selatan 70714
E-mail : dindinhm@gmail.com

ABSTRAK

Anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* Blume) Pelaihari merupakan salah satu jenis anggrek spesies yang paling populer di dunia. Namun di habitat aslinya, yaitu Pegunungan Meratus (Gunung Birah Bajuin, Kabupaten Tanah Laut), Kalimantan Selatan keberadaannya mulai terancam. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari karakteristik anggrek tersebut menggunakan penanda molekuler RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Enam penanda molekuler RAPD, yaitu OPA-02, OPA-04, OPB-01, OPB-06, OPB-07, dan OPS-12 telah digunakan untuk mempelajari karakteristik molekuler anggrek bulan Pelaihari. Penelitian dimulai dengan ekstraksi DNA (menggunakan *kit DNAzol ES*), kemudian uji kualitatif dan kuantitatif DNA, amplifikasi DNA, dan elektroforesis. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan metode PCR, dengan pengaturan reaksi sebagai berikut: denaturasi awal 94°C selama 5 menit, denaturasi pada 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 37°C selama 30 detik, dan ekstensi pada 72°C selama 1,5 menit, serta ekstensi akhir pada 72°C selama 7 menit. Reaksi tersebut diulang sebanyak 45 siklus. Analisis data didasarkan pada terdapat atau tidaknya fragmen DNA. Profil fragmen DNA diterjemahkan kedalam data biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada fragmen DNA dan 1 untuk adanya fragmen DNA pada satu posisi yang sama dari individu-individu yang dibandingkan. Pengelompokan data matrik (*cluster analysis*) dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode UPGMA, menggunakan program NTSys versi 2.1. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa anggrek bulan Pelaihari memiliki karakteristik yang berbeda secara molekuler dengan anggrek bulan lainnya. Hal ini ditunjukkan terutama oleh penanda RAPD OPA-02 dan OPA-07. Hasil analisis cluster memisahkan anggrek bulan tersebut dengan anggrek bulan yang lain. Oleh karena itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai acuan dalam program pelestarian dan pemuliaan tanaman anggrek di Indonesia.

Katakunci : *Phalaenopsis amabilis* Blume; Karakterisasi Molekuler; RAPD; UPGMA.

PENDAHULUAN

Anggrek spesies merupakan salah satu kekayaan alam Indonesia yang tersebar di beberapa kepulauan besar, termasuk Kalimantan. Di wilayah ini terdapat sekitar 2.500-3.000 anggrek spesies dari 5.000 jenis anggrek yang ada di

seluruh Indonesia. Jumlah ini jauh lebih besar dibandingkan Thailand yang merupakan salah satu negara penghasil anggrek terbesar di dunia, yaitu hanya memiliki 1.125 jenis anggrek spesies. Di Kalimantan Selatan, beberapa jenis anggrek spesies tersebar di sepanjang Pegunungan Meratus, meliputi Kabupaten Tanah Laut, Banjar, Hulu Sungai Selatan dan Tengah, serta Tanah Bumbu (Muslimah et al., 2011). Menurut Sarwono (2002), anggrek spesies merupakan salah satu plasma nutfah yang memiliki peran penting dalam upaya pelestarian dan pemuliaan tanaman anggrek, terutama sebagai induk persilangan.

Anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* Blume) Pelaihari merupakan salah satu anggrek spesies endemik Pegunungan Meratus, Kalimantan Selatan yang paling populer di dunia. Anggrek ini paling banyak dicari dan digemari oleh para kolektor maupun penyilang anggrek dunia, karena keindahan dan eksotiknya, serta memiliki keunggulan tersendiri untuk dijadikan induk persilangan (Muslimah et al., 2011). Namun di habitat aslinya, keberadaan anggrek tersebut saat ini relatif sulit ditemukan. Menurut *List of Endangered Plant* dalam *Indonesia Plant Biodiversity*, hampir 70% lebih jenis anggrek spesies termasuk anggrek bulan Pelaihari telah termasuk kedalam spesies terancam (Muslimah et al., 2011). Oleh karena itu, upaya pelestarian dan pemuliaan tanaman anggrek bulan Pelaihari maupun anggrek spesies lainnya merupakan kegiatan yang sangat penting dan mutlak dilakukan (Karp et al., 1997).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari karakteristik anggrek bulan Pelaihari secara molekular. Penanda molekular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) akan digunakan dalam penelitian ini, dengan pertimbangan bahwa penanda tersebut memiliki kelebihan dibandingkan penanda lain, diantaranya murah, cepat dan memerlukan jumlah sampel DNA yang lebih rendah (0,5-50 ng), tidak memerlukan radioisotop, dan tidak memerlukan keahlian yang khusus untuk pelaksanaannya (Demeke & Adams, 1994). Disamping itu, penanda ini dapat digunakan untuk menganalisis sampel dengan jumlah yang relatif besar dan hasil analisis tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Darmono, 1996).

METODE

Bahan Tanaman

Sampel (daun) tanaman anggrek diperoleh dari para kolektor tanaman anggrek binaan Perhimpunan Anggrek Indonesia cabang Kalimantan Selatan di Banjarmasin dan Banjarbaru.

Analisis RAPD

Kegiatan ini dimulai dengan ekstraksi DNA terhadap sampel daun anggrek yang telah dikoleksi, menggunakan kit *DNAzol ES* (Molecular Research Center Inc., USA). Uji kualitatif DNA (menggunakan metode elektroforesis pada agarose 0,8%) dan uji kuantitatif DNA, menggunakan UV-VIS spektrofotometer (BMG Labtech, USA) kemudian dilakukan terhadap sampel DNA yang telah diperoleh (Sambrook *et al.*, 1989). Amplifikasi DNA dilakukan setelah itu dengan menggunakan 6 primer acak RAPD, yaitu OPA-02, OPA-04, OPB-01, OPB-06, OPB-07, dan OPS-12. Reaksi amplifikasi mengikuti prosedur Sambrook *et al.*, (1989) dengan menggunakan mesin Thermal Cycler PCR (Techne, TC3000G, USA) pengaturan reaksi sebagai berikut: denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit, denaturasi pada 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 36-37°C selama 30 detik dan ekstensi pada 72°C selama 1,5 menit, serta ekstensi akhir pada 72°C selama 7 menit. Reaksi dilakukan sebanyak 45 siklus dan dikerjakan pada volume total sebanyak 25 µL, terdiri atas: 12,5 µL master mix PCR (berisi air bebas ion, bufer PCR, dNTP, MgCl₂, enzim *Taq* DNA polymerase), 2,5 µL sampel DNA (*template*), dan 2,5 ng/µL primer RAPD dan 7,5 µL air bebas ion. Hasil PCR (*amplicon*) dipisahkan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5%, dengan TBE 1X sebagai buffer dan GelRed sebagai pewarna DNA. Fragmen DNA hasil amplifikasi kemudian diamati beserta DNA marker (100 bp) di atas sinar ultra violet dan didokumentasikan dengan kamera digital.

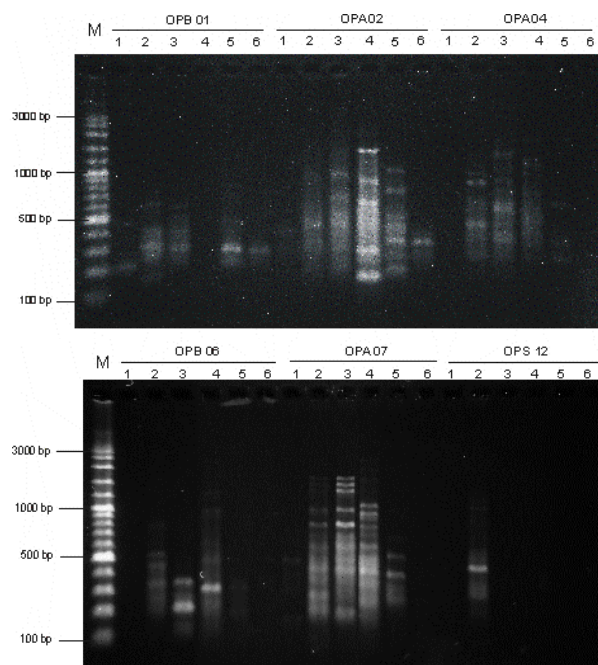
Analisis Data

Analisis data dilakukan terhadap fragmen DNA yang muncul pada laju elektroforesis tertentu. Setiap fragmen DNA yang muncul pada laju elektroforesis tersebut dianggap sebagai satu lokus, sehingga fragmen DNA yang sama dari beberapa individu tanaman diinterpretasikan sebagai satu lokus yang homolog. Lokus tersebut diubah kedalam bentuk matrik data biner dengan memberi nilai

satu (1) jika terdapat fragmen DNA dan nol (0) jika tidak terdapat fragmen DNA. Matriks data biner kemudian diturunkan menjadi matriks jarak genetik. Untuk menentukan jarak genetik pasangan genotipe yang terdapat pada individu berbeda digunakan koefisien Dice (Nei dan Li, 1979). Berdasarkan nilai kemiripan genetik tersebut kemudian dilakukan analisis pengelompokan. Pengelompokan data matriks (*cluster analysis*) dan pembuatan dendrogram dilakukan menggunakan metode UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic*) dengan aplikasi program komputer NTSys (*Numerical Taxonomy and Multivariate System*) versi 2.1 (Rohlf, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil menggunakan penanda RAPD memperlihatkan bahwa sampel tanaman anggrek (*P. amabilis*) Pelaihari, memiliki karakteristik yang berbeda dibandingkan anggrek bulan yang lain. Gambar 1 dan Tabel 1, memperlihatkan karakteristik molekuler tanaman anggrek bulan Pelaihari pada populasi *P. amabilis* ditinjau berdasarkan polimorfisme yang terjadi pada profil pita DNA tanaman anggrek tersebut.



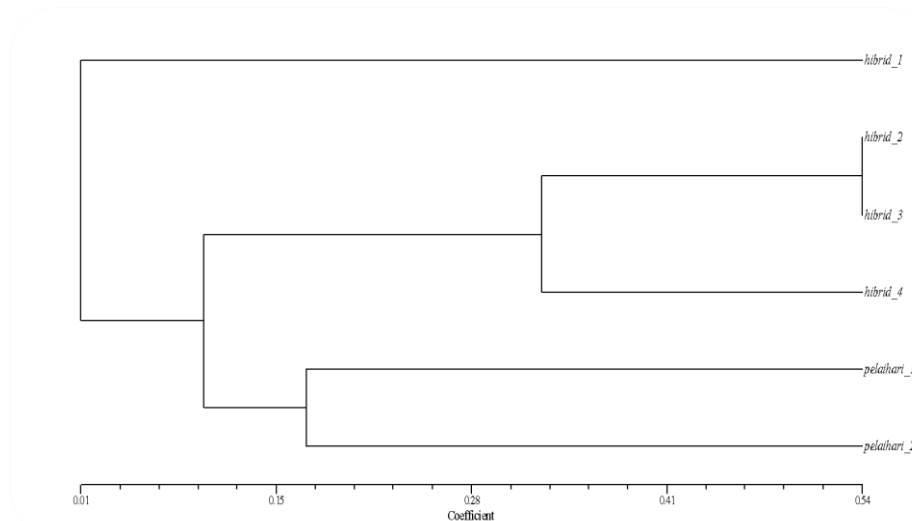
Gambar 1. Profil pita DNA tanaman anggrek hasil amplifikasi menggunakan 6 primer RAPD. (Ket. M=DNA marker, 1-4 = anggrek bulan hibrid; 5-6 = anggrek bulan Pelaihari).

Berdasarkan gambar 1, terlihat bahwa semua pita DNA menunjukkan polimorfisme yang tinggi. Bahkan 2 penanda RAPD yaitu, OPA-02 dan OPB-07 mampu menghasilkan pita DNA spesifik, yang dapat membedakan antara anggrek bulan Pelaihari dengan anggrek bulan lainnya (hibrid). Ukuran pita DNA spesifik yang terdeteksi pada penelitian ini, yaitu OPA-02 pada ukuran basa 200 bp, 350 bp dan 440 bp (OPA-02₂₀₀, OPA-02₃₅₀ dan OPA-02₄₄₀), serta OPB-07 dengan ukuran basa 250 bp, 380 bp, 510 bp (OPB-07₂₅₀, OPB-07₃₈₀ dan OPB-07₅₁₀). Adapun Tabel 1, memperlihatkan bahwa semua primer RAPD ternyata mampu menghasilkan profil pita DNA yang polimorfik.

Tabel 1. Polimorfisme diantara sampel DNA tanaman anggrek bulan.

Jenis Primer	Jumlah pita	Pita polimorfik	Pita monomorfik	Polimorfisme (%)
OPB 01	16	16	0	100,00
OPA 02	22	22	0	100,00
OPA 04	7	7	0	100,00
OPB 06	11	11	0	100,00
OPB 07	36	36	0	100,00
OPS 12	4	4	0	100,00

Berdasarkan analisis pengelompokan (*clustering*), terlihat bahwa populasi anggrek bulan (*P. amabilis*) Pelaihari memisah dengan anggrek bulan lainnya (Gambar 2).



Gambar 2. Kekerabatan genetik diantara populasi tanaman anggrek bulan (*P. amabilis*) menggunakan penanda RAPD.

Berdasarkan gambar 2, terlihat bahwa secara umum populasi anggrek bulan memisah menjadi 3 kelompok utama. Kelompok pertama anggrek bulan

hibrid 1 memisah tersendiri dari varietas lainnya pada koefisien 0,01%. Anggrek bulan hibrid 2, 3 dan 4 mengelompok tersendiri menjadi kelompok kedua pada koefisien similaritas 1,38%. Sementara itu, anggrek bulan Pelaihari memisah menjadi kelompok ketiga dengan koefisien similaritas 1,67%. Oleh karena itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai acuan dalam program pelestarian dan pemuliaan tanaman anggrek di Indonesia.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa anggrek bulan (*P. amabilis*) Pelaihari memiliki karakteristik molekuler yang khas dibandingkan anggrek bulan lainnya. Adapun penanda RAPD (terutama OPA-02 dan OPA-07) dapat membedakan karakteristik molekuler diantara populasi anggrek bulan tersebut. Disamping itu, hasil analisis kluster memperlihatkan bahwa populasi anggrek bulan Pelaihari membentuk kelompok tersendiri dan terpisah dari populasi anggrek bulan lainnya. Oleh karena itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai acuan dalam program pelestarian dan pemuliaan tanaman anggrek di Indonesia. Namun demikian, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mempelajari karakteristik molekuler anggrek bulan tersebut menggunakan penanda molekuler yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Darmono TW. 1996. Analysis of plant genetic variation with molecular technique. *Hayati*, 3(1): 7-11.
- Demeke T, Adams RP. 1994. The Use of PCR-RAPD Analysis in Taxonomy and Evolution. P. 179-191. in H.G. Griffin and A.M. Griffin (ed.). *PCR Technology Current Innovations*. London: CRC Press Inc.
- Karp A, Kresovich S, Bhat KV, Ayad WG, Hodgkin T. 1997. Molecular tool in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. *IPGRI Technology Bulletin*. No. 2.
- Muslimah A, Rachmawaty D, Hoesain FF, Ninsyh R, Yulianto. 2011. *Pesona Anggrek Meratus*. Penerbit Dewan Pimpinan Daerah Perhimpunan Anggrek Indonesia Kalimantan Selatan. 146 hal.
- Nei M, Li WM. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proceedings of The National Academy of Sciences*. 76:5269-5273.
- Rohlf FJ. 2000. *NTSys-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Version 2.1. Department of Ecology and Evolution. New York State University.

- Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis TA. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarwono B. 2002. *Mengenal dan Membuat Anggrek Hibrida*. AgroMedia Pustaka. Jakarta.