



ISSN 0126-1754

Volume 8, Nomor 5, Agustus 2007

Terakreditasi

SK Kepala LIPI

Nomor 14/Akred-LIPI/P2MBI/9/2006

# Berita Biologi

Jurnal Ilmiah Nasional



Diterbitkan Oleh  
Pusat Penelitian Biologi - LIPI

**B**erita Biologi merupakan Jurnal Ilmiah Nasional yang dikelola oleh Pusat Penelitian Biologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), untuk menerbitkan hasil karya-penelitian dan karya pengembangan, tinjauan kembali (review) dan ulasan topik khusus dalam bidang biologi. Disediakan pula ruang untuk menguraikan seluk beluk peralatan laboratorium yang spesifik dan dipakai secara umum, standard dan secara internasional. Juga uraian tentang metode-metode berstandar baku dalam bidang biologi, baik laboratorium, lapangan maupun pengolahan koleksi biodiversitas. Kesempatan menulis terbuka untuk umum meliputi para peneliti lembaga riset, pengajar perguruan tinggi (dosen) maupun pekaryasiswa sarjana semua strata. Makalah harus dipersiapkan dengan berpedoman pada ketentuan-ketentuan penulisan yang tercantum dalam setiap nomor.

Diterbitkan 3 kali dalam setahun bulan April, Agustus dan Desember. Satu volume terdiri dari 6 nomor.

### **Surat Keputusan Ketua LIPI**

Nomor: 1326/E/2000, Tanggal 9 Juni 2000

### **Dewan Pengurus**

#### **Pemimpin Redaksi**

B Paul Naiola

#### **Anggota Redaksi**

Andria Agusta, Achmad Dinoto, Tukirin Partomihardjo, Hari Sutrisno

#### **Desain dan Komputerisasi**

Muhamad Ruslan

#### **Distribusi**

Budiarjo

#### **Sekretaris Redaksi/Korespondensi/Kearsipan**

(berlangganan dan surat-menyurat)

Enok

Ruswenti

Pusat Penelitian Biologi – LIPI  
Jl. Ir. H. Juanda 18, PO Box 208, Bogor, Indonesia  
Telepon (0251) 321038, 321041, 324616  
Faksimili (0251) 325854; 336538  
Email: [herbogor@indo.net.id](mailto:herbogor@indo.net.id)

Keterangan foto cover depan: *Biodiversitas Nepenthes (kantong semar), salah satu kekayaan hayati hutan hujan tropik Indonesia, sesuai makalah di halaman 335* (Foto: koleksi LIPI-M Mansur).



**LIPI**

# **Berita Biologi**

**Jurnal Ilmiah Nasional**

**ISSN 0126-1754**

Volume 8, Nomor 5, Agustus 2007

Terakreditasi A

SK Kepala LIPI

Nomor 14/Akred-LIPI/P2MBI/9/2006

**Diterbitkan oleh  
Pusat Penelitian Biologi - LIPI**

## KATA PENGANTAR

Hasil penelitian di bidang biologi oleh para peneliti kembali dikemas dalam Jurnal Berita Biologi Nomor 5 (Volume 8) ini. Studi keragaman genetik pada varietas lokal kacang hijau dimaksudkan untuk mendapatkan landasan pemuliaan sebagai langkah lanjut pengembangan salah satu komoditi penting Indonesia. Hasil studi menunjukkan adanya keragaman genetik yang cukup luas dari semua karakter kuantitatif yang diamati. Dalam bidang mikrobiologi dilaporkan hasil studi tentang pengayaan fosfat secara hayati melalui pemahaman lanjut komunitas mikroba pengakumulasi glikogen. Selain itu, dalam mikrobiologi pangan, dilaporkan hasil studi fermentasi kecap dengan menggunakan substrat dari beberapa jenis kacang-kacangan dengan ragi mutan, dilakukan untuk melihat kemungkinan penggunaan beberapa jenis kacang-kacangan sebagai bahan dasar untuk pembuatan kecap dengan menggunakan ragi yang berkualitas sebagai stater. Mikrobiologi lingkungan melaporkan hasil studinya tentang akumulasi amonia di perairan yang dipandang sangat berbahaya, diantisipasi dengan studi proses nitrifikasi oleh kultur mikroba untuk upaya pengendaliannya.

Keberadaan dan fungsi kumbang tinja Scarabaeidae (*scarabaeids dungbeetles*) dipandang komponen sangat penting dalam ekosistem hutan tropis; merupakan jenis kunci (*keystone species*), berfungsi sebagai perombak materi organik yang berupa tinja satwa liar (terutama mamalia), burung dan reptil (siklus hara). Juga sebagai penyebar pupuk alam, membantu aerasi tanah, pengontrol parasit dan penyerbuk bunga Araceae. Hasil studi keanekaragamannya di Hutan Taman Nasional Gunung Gede-Pangrango, dilaporkan peneliti zoologi.

Di bidang botani, selain studi genetika kacang hijau tersebut di atas, tentang tumbuhan obat dilaporkan hasil studi secara in vitro pertumbuhan dan perkembangan *Typhonium* (keladi tikus). Pengaruh media dasar terhadap perkembangan embrio somatik kultur meristem jahe juga dijadikan topik riset, dan dilaporkan bahwa pengaruh media dasar yang signifikan terhadap proliferasi kalus embriogenik, dan pendewasaan embrio somatik pada kultur meristem jahe. Demikian pula keanekaragaman genetik jenis tumbuhan obat tradisional, bahan bangunan dan furnitur pulai (*Alstonia scholaris* (L.) R.Br.) dipelajari pula, di mana hasil dendrogram memisahkan 2 klaster yang mengindikasikan adanya pemisahan individu ke dalam kelompok berbeda. Sementara itu, studi keanekaragaman suku Pandanaceae di kawasan Taman Nasional Lore Lindu (Poso, Sulawesi Tengah) juga dilaporkan sebagai rekor khusus, menemukan 6 jenis di kawasan itu. Buah merah (*Pandanus conoideus* Lamarck) dijadikan sebagai kasus dalam kajian etnotaksonomi di kalangan masyarakat tradisional Pegunungan Arfak, Papua, dan menemukan bahwa sistem tata nama buah merah sepadan dengan sistem tata nama ilmiah tumbuhan, sehingga kearifan lokal ini dapat merupakan alternatif dalam pemecahan masalah dalam taksonomi formal (taksonomi tumbuhan). Keanekaragaman *Nepenthes* (kantong semar) di Kalimantan Tengah diungkapkan sebagai salah satu kekayaan biodiversitas Indonesia, dan pesona keragaman tumbuhan karnivora ini kami angkat sebagai maskot cover nomor ini.

Selamat membaca!

Salam iptek,

Redaksi

### Ketentuan-ketentuan untuk Penulisan dalam Berita Biologi

1. Karangan ilmiah asli, *hasil penelitian* dan belum pernah diterbitkan atau tidak sedang dikirim ke media lain.
2. Bahasa Indonesia. Bahasa Inggris dan asing lainnya, dipertimbangkan.
3. Masalah yang diliput, diharapkan aspek “baru” dalam bidang-bidang
  - Biologi dasar (*pure biology*), meliputi turunan-turunannya (mikrobiologi, fisiologi, ekologi, genetika, morfologi, sistematik dan sebagainya).
  - Ilmu serumpun dengan biologi: pertanian, kehutanan, peternakan, perikanan air tawar dan biologi kelautan, agrobiologi, limnologi, agro bioklimatologi, kesehatan, kimia, lingkungan, agroforestri. *Aspek/pendekatan biologi* harus tampak jelas.
4. Deskripsi masalah: harus jelas adanya tantangan ilmiah (*scientific challenge*).
5. Metode pendekatan masalah: standar, sesuai bidang masing-masing.
6. Hasil: hasil temuan harus jelas dan terarah.
7. Kerangka karangan: standar.  
*Abstrak* dalam bahasa Inggris, maksimum 200 kata, spasi tunggal, ditulis miring, isi singkat, padat yang pada dasarnya menjelaskan masalah dan hasil temuan. *Hasil dipisahkan dari Pembahasan*.
8. Pola penyiapan makalah: spasi ganda (kecuali abstrak), pada kertas berukuran A4 (70 gram), maksimum 15 halaman termasuk gambar/foto; pencantuman Lampiran seperlunya.  
Gambar dan foto: harus bermutu tinggi, gambar pada kertas kalkir (bila manual) dengan tinta cina, berukuran kartu pos; foto berwarna, sebutkan programnya bila dibuat dengan komputer.
9. Kirimkan 2 (dua) eksemplar makalah ke Redaksi (alamat pada cover depan-dalam) yang ditulis dengan program Microsoft Word 2000 ke atas. Satu eksemplar tanpa nama dan alamat penulis (-penulisnya). Sertakan juga copy file dalam CD (bukan disket), untuk kebutuhan Referee secara elektronik. Jika memungkinkan, kirim juga filenya melalui alamat elektronik (E-mail) Berita Biologi: [herbogor@indo.net.id](mailto:herbogor@indo.net.id).
10. Cara penulisan sumber pustaka: tuliskan nama jurnal, buku, prosiding atau sumber lainnya selengkap mungkin; sedapat-dapatnya tidak disingkat. Nama inisial pengarang tidak perlu diberi tanda titik pemisah.
  - a. Jurnal  
**Premachandra GS, Saneko H, Fujita K and Ogata S. 1992.** Leaf Water Relations, Osmotic Adjustment, Cell Membrane Stability, Epicuticular Wax Load and Growth as Affected by Increasing Water Deficits in Sorghum. *Journal of Experimental Botany* **43**, 1559-1576.
  - b. Buku  
**Kramer PJ. 1983.** *Plant Water Relationship*, 76. Academic, New York.
  - c. Prosiding atau hasil Simposium/Seminar/Lokakarya dan sebagainya  
**Hamzah MS dan Yusuf SA. 1995.** Pengamatan beberapa aspek biologi Sotong Buluh (*Sepioteuthis lessoniana*) di sekitar perairan Pantai Wokam bagian barat, Kepulauan Aru, Maluku Tenggara. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XI*, Ujung Pandang 20-21 Juli 1993, 769-777. M Hasan, A Mattimu, JG Nelwan dan M Litaay (Penyunting). Perhimpunan Biologi Indonesia.
  - d. Makalah sebagai bagian dari buku  
**Leegood RC and Walker DA. 1993.** Chloroplast and Protoplast. Dalam: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. DO Hall, JMO Scurlock, HR Bohlar Nordenkampf, RC Leegood and SP Long (Eds), 268-282. Chapman and Hall. London.
11. Kirimkan makalah serta copy file dalam CD (lihat butir 9) ke Redaksi. Sertakan alamat Penulis yang jelas, juga meliputi nomor telepon (termasuk HP) yang mudah dan cepat dihubungi dan alamat elektroniknya.

Berita Biologi menyampaikan terima kasih kepada  
para penilai (referee) Nomor ini

***DM Puspitaningtyas*** – Pusat Konservasi Tumbuhan, Kebun Raya Bogor -LIPI

***HD Ariesyadi*** – Fakultas Teknik dan Lingkungan-Institut Teknologi Bandung

***H Simbolon*** – Pusat Penelitian Biologi-LIPI

***H Yulistiyono*** – Pusat Penelitian Biologi-LIPI

***IN Sujaya*** – Universitas Udayana

***Irawati*** – Pusat Konservasi Tumbuhan, Kebun Raya Bogor –LIPI

***JR Witono*** – Pusat Konservasi Tumbuhan, Kebun Raya Bogor –LIPI

***M Amir*** – Pusat Penelitian Biologi-LIPI

***R Ubaidillah*** – Pusat Penelitian Biologi-LIPI

***Rugayah*** – Pusat Penelitian Biologi-LIPI

***YS Poerba*** – Pusat Penelitian Biologi-LIPI

## DAFTAR ISI

|  |     |
|--|-----|
| <b>GENETIC VARIABILITY AND HERITABILITY ESTIMATE OF QUANTITATIVE CHARACTERS IN LOCAL MUNGBEAN (<i>Vigna radiate</i> (L.) Wilczek) VARIETIES</b><br><b>Keragaman Genetik dan Dugaan Heritabilitas Karakter Kuantitatif pada Varietas Lokal Kacang Hijau (<i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek)</b><br><i>Lukman Hakim</i> .....  | 311 |
| <b>KOMUNITAS MIKROBA PENGAKUMULASI GLIKOGEN</b><br><b>[The Community of Glycogen Accumulating Microbe]</b><br><i>Dyah Supriyati, Rita Dwi Rahayu dan Hartati Imamuddin</i> .....   | 319 |
| <b>KERAGAMAN DAN DISTRIBUSI VERTIKAL KUMBANG TINJA SCARABAEIDS (Coleoptera: Scarabaeidae) DI HUTAN TROPIS BASAH PEGUNUNGAN TAMAN NASIONAL GEDE-PANGRANGO, JAWA BARAT</b><br><b>[Diversity and Vertical Distributions of Scarabaeids Dungbeetles (Coleoptera: Scarabaeidae) in the Tropical Mountainous Rainforest of Gede-Pangrango National Park, West Java]</b><br><i>Sih Kahono</i> ..... | 325 |
| <b>KEANEKARAGAMAN JENIS <i>Nepenthes</i> (KANTONG SEMAR) DATARAN RENDAH DI KALIMANTAN TENGAH</b><br><b>[Diversity of Lowland <i>Nepenthes</i> (Kantong Semar) in Central Kalimantan]</b><br><i>Muhammad Mansur</i> .....   | 335 |
| <b>PENGARUH MEDIA DASAR MS DAN N<sub>6</sub> TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO SOMATIK PADA KULTUR MERISTEM JAHE (<i>Zingiber officinale</i> Rosc.)</b><br><b>[The Effect of MS and N<sub>6</sub> Basal Media to Somatic Embryo Development in Meristematic Culture of Ginger (<i>Zingiber officinale</i> Rosc.)]</b><br><i>Oti Rostiana dan Sitti Fatimah Syahid</i> .....                       | 343 |
| <b>STUDI KERAGAMAN GENETIK <i>Alstonia scholaris</i> (L.) R.Br. BERDASARKAN MARKA RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA</b><br><b>[Study on Genetic Diversity of <i>Alstonia scholaris</i> (L.) R.Br. Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers]</b><br><i>Yuyu Suryasari Poerba</i> .....  | 353 |
| <b>FERMENTASI KECAP DARI BEBERAPA JENIS KACANG-KACANGAN DENGAN MENGGUNAKAN RAGI BARU <i>Aspergillus</i> sp. K-1 DAN <i>Aspergillus</i> sp. K-1A</b><br><b>[Fermentation of kecap (soy sauce) from different kind of beans by Using Improved Inoculum <i>Aspergillus</i> sp. K-1 and <i>Aspergillus</i> sp. K-1a]</b><br><i>Elidar Naiola dan Yati Sudaryati Soeka</i> .....                  | 365 |
| <b>REKAMAN BARU PANDANACEAE, DI PEGUNUNGAN SEKITAR DESA SEDOA, TAMAN NASIONAL LORE LINDU, SULAWESI TENGAH</b><br><b>[New Records on Pandanaceae from Mountainous Area, Sedoa Village, Lore Lindu National Park, Central Celebes]</b><br><i>Ary Prihardhyanto Keim dan Himmah Rustiami</i> .....  | 375 |
| <b>KAJIAN ETNOTAKSONOMI <i>Pandanus conoideus</i> Lamarck UNTUK MENJEMBATANI PENGETAHUAN LOKAL DAN ILMIAH</b><br><b>[The Ethnotaxonomical study of Red Pandan (<i>Pandanus conoideus</i> Lamarck) to Link the Local Wisdom and Scientific Knowledge]</b><br><i>Eko Baroto Waluyo, Ary Prihardhyanto Keim dan Maria Justina S</i> .....   | 391 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>PROSES NITRIFIKASI OLEH KULTUR MIKROBA PENITRIFIKASI N-Sw DAN ZEOLIT</b><br><b>[Nitrification by Mix Culture of Nitrifying Bacteria N-Sw and Zeolite]</b><br><i>Dwi Agustiyani, Hartati Imamuddin, Edi Gunawan dan Latifah K Darusman</i> ..... | 405 |
| <b>PERTUMBUHAN DAN PERKEMBANGAN TUNAS <i>Typhonium</i> SECARA IN VITRO</b><br><b>[Shoots Growth and Development of <i>Typhonium</i> by In Vitro Technique]</b><br><i>Djadja Siti Hazar Hoesen</i> .....  | 413 |

**STUDI KERAGAMAN GENETIK PULAI [*Alstonia scholaris* (L.) R.Br.]  
BERDASARKAN MARKA RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA  
[Study on Genetic Diversity of *Alstonia scholaris* (L.) R.Br. Using  
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers]**

**Yuyu Suryasari Poerba**  
Pusat Penelitian Biologi-LIPI  
Jl. Juanda 18 Bogor 16122

**ABSTRACT**

*Alstonia scholaris* (L.) R.Br. is a popular timber and medicinal tree species in Indonesia. The species is valued for its quality light wood timber and for its medicinal properties. Information on its existing genetic potential is currently lacking. The present study was carried out to optimize PCR and to screen primers among accessions collected from different part of region in Indonesia using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in order to suggest appropriate primer and PCR conditions used in *A. scholaris*. Results showed that 26 primers generated 575 scorable bands of which 524 (92 %) were polymorphic. Fourteen highly polymorphic primers (100% polymorphic) are recorded from 48 primer used, i.e. OPA-2, OPA-03, OPA-05, OPA-06, OPA-10, OPA-12, OPA-15, OPA-18, OPA-19, OPC-03, OPC-10, OPC-12, OPC-17, and OPN-14. Based on the RAPD markers, a dendrogram was constructed using the UPGMA method. The range of genetic distance was from 0.18-0.45. The molecular data grouped the genotypes into three main clusters.

**Kata Kunci:** *Alstonia scholaris*, pulai, keragaman genetik, random amplified polymorphic DNA (RAPD), primers.

**PENDAHULUAN**

*Alstonia scholaris* (L.) R.Br. merupakan salah satu species yang termasuk Apocynaceae yang dikenal dengan nama pulai atau kayu susu. *A. scholaris* merupakan salah satu dari enam kayu ekspor penting di Indonesia. Tumbuhan ini semula masuk tumbuhan langka Indonesia dengan kategori VuA1c (Mogea *et al.*, 2001), namun sekarang sudah dikeluarkan dari daftar tersebut (Wiriadinata *et al.*, *in press*). Tumbuhan ini memiliki jumlah kromosom  $x = 11$ , dan  $2n = 22, 44$ . Karena kayunya tidak cukup kuat, kayu ini digunakan untuk kotak, peti mati, papan gambar, bingkai lukisan, korek api, papan tulis, komponen perabot rumah tangga, perahu dan kerajinan tangan seperti mainan, wayang golek, dan topeng, juga digunakan kayu tengah dalam pembuatan kayu lapis. Pulpa dari kayu ini memiliki kualitas yang baik untuk membuat kertas. Getahnya mengandung alkaloid dapat disadap dari pepagannya. Getah ini digunakan dalam obat tradisional (obat mata dan obat telinga, obat diare dan disentri) dan sebagai permen karet. Akar dan pepagannya pahit. Pepagannya (mengandung alkaloid) digunakan obat malaria, obat cacing, tonik, pemulih kesehatan, anti diare, demam, daunnya digunakan obat penyakit kulit. Ekstrak akar, daun dan getah *Alstonia scholaris* digunakan sebagai obat demam (Teo, 2000).

*A. scholaris* banyak terdapat di daerah beriklim muson dan tahan terhadap bermacam-macam tanah dan habitat, termasuk vegetasi sekunder. Tumbuhan ini terdapat pada ketinggian 500 hingga 1000 m. Regenerasi *A. scholaris* secara alami jarang ditemukan. Sebagai pohon tumbuh cepat, *A. scholaris* mempunyai prospek yang baik untuk penghasil kayu. Bukan saja erosi genetik dan kerusakan habitat oleh berbagai kegiatan merupakan ancaman terhadap keberadaan tumbuhan ini, tetapi juga 'fitness' populasi tumbuhan yang ada. Pemeliharaan keragaman genetik dipandang perlu untuk keberadaan/survival suatu spesies dalam jangka panjang karena keragaman genetik menyediakan potensi berevolusinya tumbuhan tersebut. Lebih jauh lagi, menurunnya keragaman genetik dengan kehilangan alel-alel tertentu menurunkan kemampuan populasi tumbuhan untuk meresponi perubahan lingkungan biotik (misalnya patogen) dan abiotik (Pither *et al.*, 2003). Hal-hal tersebut menjadikan assessment keragaman genetik suatu species menjadi penting. Hingga saat ini informasi genetik *A. scholaris* belum banyak diketahui, sehingga tidak banyak terungkap dalam publikasi ilmiah.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi PCR yang optimal dan primer RAPD yang

polimorfik untuk *A. scholaris*. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum PCR untuk amplifikasi DNA genom pulai yang dikoleksi dari beberapa daerah di Indonesia. Percobaan yang dilakukan meliputi pengamatan pengaruh perbedaan kondisi PCR, pemilihan serta penentuan kuantitas primer.

Marka RAPD digunakan karena selain relatif mudah dan 'cost effective', marka ini sudah banyak digunakan pada jenis-jenis pohon kayu tropis lainnya (Pitcher *et al.*, 2003; Rath *et al.*, 1998, Runo *et al.*, 2004) dan untuk tujuan identifikasi genotip lainnya (Carvalho *et al.*, 2004; Martin and Bermejo, 2000; Poerba, 2003).

#### BAHENDAN METODA

Bahan yang digunakan adalah 11 aksesi *A. scholaris* yang berasal dari berbagai lokasi di Indonesia (Tabel 1). Material DNA ke-11 aksesi *A. scholaris* ini berupa daun-daun yang dikeringkan dengan silica gel hasil koleksi dari tempat asal koleksi sesuai dengan pedoman pengumpulan material DNA (Widjaya dan Poerba, 2004).

#### Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA 11 aksesi *Alstonia scholaris* hasil koleksi dilakukan berdasarkan metoda CTAB (Delaporta *et al.*, 1983) yang dimodifikasi. Sebanyak 0,5 gram daun yang dikeringkan dengan silica gel digerus dengan menggunakan mortar dan pestle porselen. Setelah halus serbuk daun dimasukkan

kedalam tabung 2.0 ml dan ditambah dengan 700µL bufer ekstraksi yang telah dipanaskan 65°C yang mengandung 2% CTAB, 2% PVP (polynynylpyrrolidone), 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 7,5, dan 1.4M HCl. Kemudian 0,2% (10µL) mercaptoetanol kedalam setiap tabung dan kemudian dikocok dengan menggunakan vortex sampai larutan tercampur. Selanjutnya diinkubasi dalam waterbath pada suhu 65°C selama 60 menit. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 28°C. Supernatant kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam tabung yang baru dan ditambah dengan 700µL larutan kloroform:isoamil alkohol (24:1), dan dikocok. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 28°C. Langkah ini diulang sekali kali, supernatant selanjutnya ditambah 700µL larutan kloroform:isoamil alkohol (24:1) dan 20µL larutan 5 M natrium asetat dan dikocok kuat. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 28°C. Selanjutnya supernatant diambil 700µL dan ditambah ¾ volume isopropanol yang dingin, dan dikocok perlahan. Kemudian tabung berisi larutan DNA disimpan di suhu -20°C selama 30 menit. Selanjutnya tabung dikocok perlahan dengan membolak-balikkan tabung sehingga terlihat benang-benang DNA dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit pada suhu 28°C. Selanjutnya supernatant dibuang dan pelet DNA dicuci dengan 70% etanol dan dikeringkan dalam vacum selama 30 menit. Pada tahap ini DNA dapat disimpan dalam suhu -20°C atau

**Tabel 1.** Sebelas aksesi *Alstonia scholaris* yang digunakan dalam analisa RAPD

| No.    | Nomor koleksi | Lokasi                                 |
|--------|---------------|--|
| 1 (A)  | 50401         | KR Bogor (asal Kalimantan Timur)       |
| 2 (B)  | 50402         | KR Bogor (asal TN Ujung Kulon)         |
| 3 (C)  | 50403         | KR Bogor (asal TN Ujung Kulon)         |
| 4 (D)  | 50404         | KR Bogor (asal Muara Enim)             |
| 5 (E)  | 28128         | Dieng                                  |
| 6 (F)  | 35400         | TN Bali Barat                          |
| 7 (G)  | 35441         | KR Eka Karya Bali                      |
| 8 (H)  | 18            | TN Bukit Dua Belas, Jambi              |
| 9 (I)  | 35327         | KR Purwodadi                           |
| 10 (J) | 2205          | KR Bogor (asal Sumatera Utara)         |
| 11 (K) | 2225          | Hutan Lindung Loko Melolo, Sumba Barat |

dilartukan dengan dengan 100µL bufer TE. Purifikasi DNA dilakukan dengan menambahkan 1 µL RNase A (100 mg/ml).

Kualitas DNA dapat dilihat dengan elektroforesis pada gel agarosa (2%) menggunakan pewarna ethidium bromida dan dengan penanda Lambda DNA/*EcoR*I+Hind III.

### Optimasi PCR dan skrining primer

Amplifikasi DNA dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) menggunakan 'arbitrary primer' yang disusun oleh 10 oligo nucleotide (10-oligomer). Optimasi PCR dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal. Beberapa variabel seperti konsentrasi primer (5, 10, 25 nmol) dan konsentrasi DNA template (10 ng, 25 ng), yang digunakan untuk PCR diteliti dan dicoba untuk mendapatkan produk PCR yang optimal. Amplifikasi DNA dilakukan berdasarkan metode William *et al.* (1990) yang dimodifikasi. Untuk skrining primer, selanjutnya kondisi PCR dilakukan berdasarkan hasil optimasi PCR yang terbaik. Primer yang digunakan sebanyak 26 'arbitrary' primer dari Operon Kit A, C, N, dan U pada tanaman *A. scholaris*. (Tabel 2). Reaksi PCR dengan menggunakan Thermocycler (Perkin Elmer 480) selama 45 siklus.

Hasil amplifikasi difraksinasi secara elektroforesis dengan menggunakan Mupid Mini Cell pada gel agarosa 2.0% dalam bufer TAE (Tris-EDTA) selama 50 menit pada 50 V. Kemudian direndam dalam larutan ethidium bromida dengan konsentrasi akhir 0.15 µl/ml selama 10 menit. Hasil pemisahan fragmen DNA dideteksi dengan menggunakan UV transluminator, kemudian difoto dengan menggunakan kamera polaroid. Sebagai standar digunakan 100 bp DNA ladder (Promega) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA. Pita hasil amplifikasi kemudian dicatat dan diskor. Pola pita hasil amplifikasi DNA diamati untuk menentukan jumlah pita polimorfik yang dihasilkan. Primer-primer yang menghasilkan pita polimorfik terbesar dinyatakan sebagai primer yang terpilih sebagai pita polimorfik yang cocok digunakan untuk analisa RAPD apa tanaman *A. scholaris*.

Setiap pita RAPD dianggap sebagai satu lokus putatif. Hanya lokus yang menunjukkan pita yang jelas yang digunakan untuk skoring: ada (1) dan kosong

(0). Matriks binari fenotip RAPD ini kemudian disusun untuk digunakan pada analisis kluster dengan menggunakan UPGMA program NTSYS-pc versi 1.80 (Rohlf, 1993). Nilai kesamaan genetika diambil dari Simple Matching Coefficient (Dunn dan Everitt, 1982; Rohlf, 1993), sedangkan nilai ketidaksamaan genetika merupakan pengurangan nilai matrix of similarity oleh 1 (Dunn dan Everitt, 1982).

## HASIL

### Ekstraksi dan Isolasi DNA

Hasil ekstraksi DNA menunjukkan dengan metoda ini DNA yang dihasilkan bervariasi dari 50-250 ng/µL, sehingga amplifikasi DNA dapat dilanjutkan.

### Optimasi PCR dan Skrining primer

Hasil PCR yang baik dan menghasilkan fragmen DNA yang terlihat jelas dan dapat dinilai (diberi skor) pada *A. scholaris* ternyata dengan menggunakan pada masing-masing tabung PCR berisi 0,2 nM dNTPs; 1,5µl bufer reaksi; 2mM MgCl<sub>2</sub>; 10 ng DNA sample; 5 nmol primer tunggal; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega), dengan kondisi PCR seperti berikut. Pemanasan pertama pada suhu 94°C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45 siklus yang terdiri atas *denaturation* 1 menit pada suhu 94°C, *annealing* 1 menit pada suhu 36°C, dan 2 menit *extention* pada suhu 72°C. Setelah 45 siklus selesai, kemudian diikuti 4 menit pada suhu 72°C dan pendinginan pada suhu 4°C selama 30 menit. Hasil pengujian ini selanjutnya digunakan untuk analisa RAPD pada *A. scholaris*.

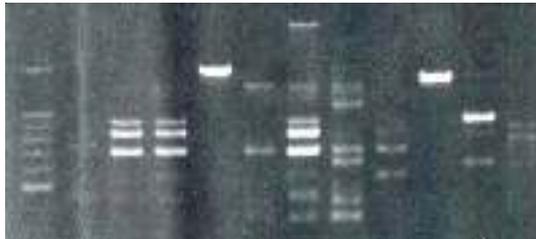
### Profil pita RAPD

Sebanyak 46 jenis primer Kit A, C, N, dan U dari Operon Technology Ltd, dengan urutan basa nitrogen yang berbeda dan mengandung G+C 60% telah diaplikasikan pada reaksi PCR, sedangkan sebagai cetakan DNA (DNA template) adalah 11 akses *A. scholaris* hasil koleksi dari berbagai lokasi.

Pengamatan terhadap pola pita DNA setelah gel elektroforesis menunjukkan bahwa setiap jenis primer menghasilkan pita DNA yang berbeda. Hasil amplifikasi DNA dengan PCR menunjukkan 11 akses *A. scholaris* menghasilkan produk PCR yang dapat dibaca dan diskor, sehingga hasilnya dapat dianalisa (Foto 1).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa diperoleh 575 fragmen DNA yang berukuran dari 100bp hingga 3.0kb, dengan 524 (92%) merupakan pita polimorfik. Rata-rata setiap primer menghasilkan 12 pita

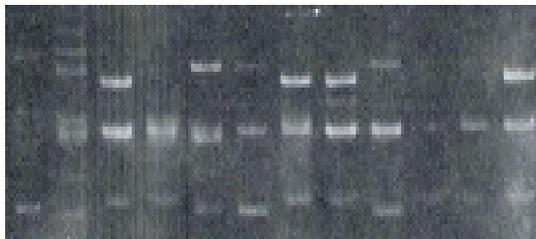
yang dapat dideteksi dan diskor. Jumlah maksimum pita polimorfik yaitu 18 terdapat pada primer OPA-12, sedangkan jumlah pita polimorfik yang terendah (5) terdapat pada primer OPA-16 dan OPA-20 (Tabel 2, foto



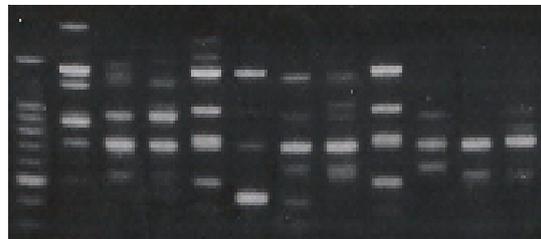
OPA-18



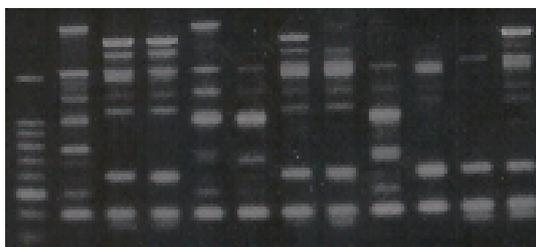
OPC-01



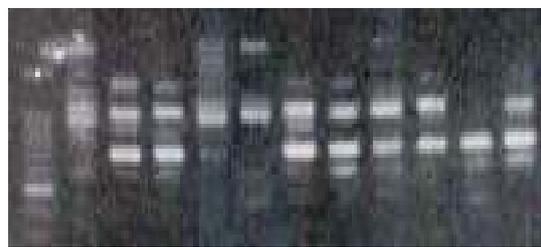
OPC-02



OPC-08



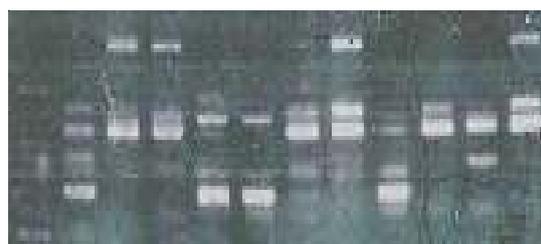
OPC-09



OPC-10



OPC-11



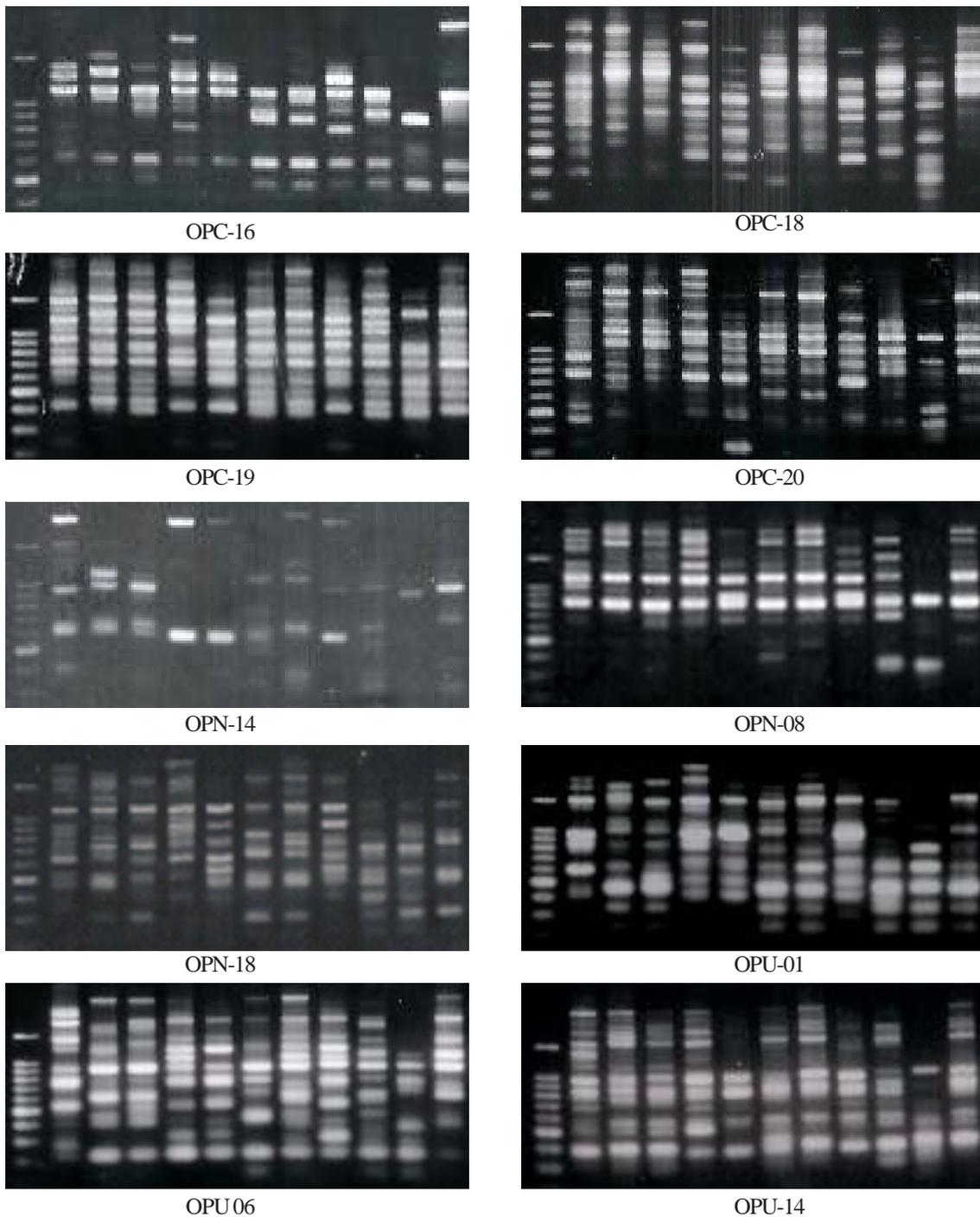
OPC-12



OPC-14



OPC-15



**Foto 1.** Hasil amplifikasi DNA 11 aksesi *Alstonia scholaris* dengan berbagai primer

1). Beberapa pita utama umum dijumpai pada ke 11 aksesi *A. scholaris*, seperti 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, dan 1500 bp.

Pita unik terdapat pada 2 aksesi (No 1 dan No

2). Pada aksesi No 1 (50401: koleksi KRB asal Kalimantan Timur) terdapat fragmen DNA unik pada OPA 05<sub>900, 1700</sub>, OPA 06<sub>1400</sub>, OPA 07<sub>1100</sub>, OPA 10<sub>1400</sub>, OPA 12<sub>1600</sub>, OPA 14<sub>1500</sub>, OPC 02<sub>1700, 1800</sub>, OPC 03<sub>1100</sub>, OPC 04<sub>500</sub>, OPC 07<sub>1700</sub>

**Tabel 2.** Primer yang digunakan dan jumlah pita DNA hasil amplifikasi pada 11 aksesi *Alstonia scholaris*

| Kode primer | Urutan basa | Aksesi*) |    |    |   |   |   |    |   |    |    |    | Jml total Pita | Jml pita Polimorfik |
|-------------|-------------|----------|----|----|---|---|---|----|---|----|----|----|----------------|---------------------|
|             |             | 1        | 2  | 3  | 4 | 5 | 6 | 7  | 8 | 9  | 10 | 11 |                |                     |
| OPA-01      | CAGGCCCTTC  | 6        | 5  | 6  | 4 | 4 | 4 | 8  | 4 | 5  | 8  | 6  | 12             | 9 (75%)             |
| OPA-02      | TGCCGAGCTG  | 3        | 4  | 3  | 3 | 1 | 4 | 3  | 2 | 4  | 4  | 4  | 9              | 9 (100%)            |
| OPA-03      | AGTCAGCCAC  | 8        | 3  | 6  | 8 | 5 | 6 | 4  | 7 | 3  | 1  | 3  | 11             | 11 (100%)           |
| OPA-04      | AATCGGGCTG  | 7        | 8  | 8  | 6 | 6 | 4 | 8  | 4 | 11 | 5  | 7  | 14             | 13 (92.86%)         |
| OPA-05      | AGGGGTCTTG  | 8        | 5  | 8  | 6 | 2 | 2 | 7  | 5 | 5  | 1  | 2  | 17             | 17 (100%)           |
| OPA-06      | GGTCCCTGAC  | 6        | 4  | 4  | 5 | 2 | 6 | 3  | 5 | 2  | 2  | 4  | 16             | 16 (100%)           |
| OPA-07      | GAAACGGGTG  | 4        | 6  | 5  | 5 | 2 | 4 | 7  | 4 | 4  | 4  | 3  | 14             | 13 (92.86%)         |
| OPA-08      | GTGACGTAGG  | 4        | 2  | 6  | 5 | 2 | 4 | 4  | 4 | 1  | 5  | 5  | 14             | 13 (92.86%)         |
| OPA-09      | GGGTAACGCC  | 4        | 5  | 6  | 3 | 1 | 1 | 5  | 4 | 3  | 1  | 3  | 9              | 8 (88.89%)          |
| OPA-10      | GTGATCGCAG  | 2        | 3  | 4  | 2 | 1 | 1 | 3  | 1 | 3  | 1  | 1  | 7              | 7 (100%)            |
| OPA-11      | CAATCGCCGT  | 1        | 4  | 5  | 3 | 2 | 4 | 4  | 4 | 1  | 2  | 1  | 10             | 9 (90%)             |
| OPA-12      | TCGGCGATAG  | 6        | 6  | 4  | 5 | 7 | 5 | 4  | 5 | 1  | 4  | 8  | 18             | 18 (100%)           |
| OPA-13      | CAGCACCCAC  | 10       | 12 | 8  | 9 | 6 | 8 | 10 | 7 | 6  | 7  | 9  | 16             | 13 (81.25%)         |
| OPA-14      | TCTGTGCTGG  | 2        | 2  | 3  | 1 | 1 | 3 | 1  | 2 | 4  | 4  | 1  | 10             | 10 (100%)           |
| OPA-15      | TTCCGAACCC  | 2        | 2  | 3  | 2 | 1 | 6 | 4  | 2 | 3  | 1  | 3  | 8              | 8 (100%)            |
| OPA-16      | AGCCAGCGAA  | 2        | 4  | 3  | 4 | 1 | 4 | 4  | 2 | 2  | 2  | 1  | 6              | 5 (83.33%)          |
| OPA-17      | GACCGCTTGT  | 1        | 1  | 1  | 1 | 1 | 4 | 1  | 1 | 1  | 1  | 4  | 11             | 10 (90.91%)         |
| OPA-18      | AGGTGACCGT  | 3        | 4  | 5  | 2 | 2 | 5 | 9  | 8 | 4  | 3  | 3  | 15             | 15 (100%)           |
| OPA-19      | CAAACGTCGG  | 1        | 3  | 3  | 3 | 1 | 3 | 2  | 1 | 4  | 2  | 1  | 10             | 10 (100%)           |
| OPA-20      | GTTGCGATCC  | 2        | 4  | 4  | 2 | 3 | 3 | 2  | 4 | 4  | 3  | 3  | 6              | 5 (83.33%)          |
| OPC-01      | TTTCAGCCAG  | 6        | 12 | 10 | 9 | 6 | 6 | 11 | 8 | 3  | 5  | 8  | 12             | 9 (75%)             |
| OPC-02      | GTGAGGCGTC  | 6        | 3  | 2  | 4 | 3 | 4 | 4  | 3 | 2  | 2  | 3  | 9              | 9 (77.78%)          |
| OPC-03      | CCGCATCTAC  | 6        | 7  | 6  | 5 | 4 | 5 | 6  | 4 | 5  | 1  | 3  | 16             | 16 (100%)           |
| OPC-04      | CCGCATCTAC  | 6        | 8  | 7  | 6 | 5 | 8 | 8  | 5 | 8  | 2  | 7  | 12             | 11 (91.67%)         |
| OPC-05      | GATGACCGCC  | 9        | 7  | 8  | 6 | 2 | 7 | 6  | 6 | 13 | 5  | 7  | 17             | 16 (94.12%)         |
| OPC-06      | GAACGGACTC  | 6        | 6  | 6  | 6 | 5 | 6 | 6  | 6 | 12 | 6  | 6  | 15             | 14 (93.33%)         |
| OPC-07      | GTCCCGACGA  | 6        | 8  | 8  | 6 | 4 | 5 | 5  | 6 | 4  | 2  | 6  | 14             | 13 (92.86%)         |
| OPC-08      | TGGACCGTCC  | 6        | 5  | 6  | 7 | 5 | 5 | 5  | 5 | 3  | 2  | 2  | 11             | 10 (90.91%)         |
| OPC-09      | CTCACCGGTG  | 8        | 7  | 7  | 7 | 6 | 8 | 8  | 7 | 5  | 4  | 8  | 13             | 12 (92.31)          |
| OPC-10      | TGTCTGGGTG  | 8        | 5  | 5  | 5 | 2 | 6 | 5  | 4 | 4  | 3  | 4  | 11             | 11 (100%)           |
| OPC-11      | AAAGCTGCGG  | 6        | 3  | 6  | 6 | 6 | 5 | 5  | 7 | 4  | 2  | 4  | 11             | 10 (90.91%)         |
| OPC-12      | TGTCATCCCC  | 6        | 3  | 3  | 5 | 4 | 5 | 6  | 4 | 3  | 5  | 3  | 9              | 9 (100%)            |

Tabel 2. (Lanjutan)

|        |             |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |             |
|--------|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-------------|
| OPC-14 | TGCGTGCTTG  | 4  | 7  | 7  | 3  | 2  | 4  | 7  | 2  | 3  | 3  | 4  | 9   | 9 (88.89%)  |
| OPC-15 | GACGGATCAG  | 6  | 6  | 5  | 7  | 3  | 5  | 6  | 4  | 4  | 4  | 3  | 10  | 8 (80%)     |
| OPC-16 | CACACTCCAG  | 4  | 6  | 6  | 8  | 4  | 4  | 4  | 8  | 5  | 2  | 5  | 12  | 11 (91.67%) |
| OPC-17 | TTCCCCCCAG  | 12 | 8  | 11 | 13 | 8  | 11 | 11 | 6  | 5  | 4  | 11 | 17  | 17 (100%)   |
| OPC-18 | TGAGTGGGTG  | 8  | 8  | 7  | 9  | 7  | 9  | 9  | 6  | 9  | 9  | 8  | 12  | 9 (66.67%)  |
| OPC-19 | GTTGCCAGCC  | 13 | 15 | 14 | 13 | 10 | 12 | 13 | 10 | 12 | 10 | 12 | 15  | 7 (46.67%)  |
| OPC-20 | ACTTCGCCAC  | 13 | 12 | 9  | 12 | 9  | 11 | 11 | 9  | 9  | 6  | 9  | 15  | 11 (63.64%) |
| OPN-08 | ACCTCAGCTC  | 8  | 9  | 9  | 9  | 7  | 11 | 9  | 8  | 8  | 4  | 8  | 15  | 13 (86.67%) |
| OPN-14 | TCGTGCCGGT  | 6  | 3  | 5  | 3  | 2  | 3  | 5  | 3  | 3  | 1  | 5  | 8   | 8 (100%)    |
| OPN-18 | GGTGAGGTCA  | 9  | 11 | 10 | 11 | 7  | 6  | 9  | 8  | 7  | 6  | 6  | 15  | 11 (73.33%) |
| OPN-19 | GTCCGTA CTG | 13 | 11 | 11 | 11 | 5  | 7  | 8  | 7  | 9  | 2  | 6  | 15  | 14 (93.33%) |
| OPU-01 | ACGGACGTCA  | 12 | 13 | 14 | 14 | 9  | 12 | 11 | 10 | 12 | 7  | 12 | 15  | 9 (75%)     |
| OPU-06 | ACCTTTGCGG  | 12 | 9  | 10 | 11 | 10 | 9  | 12 | 9  | 12 | 6  | 10 | 15  | 12 (80%)    |
| OPU-14 | TGGGTCCCTC  | 14 | 13 | 12 | 11 | 6  | 10 | 11 | 9  | 9  | 4  | 10 | 15  | 12 (80%)    |
|        | Jumlah      |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 575 | 524         |

OPC 08<sub>1900</sub>, OPC14<sub>1600</sub>, OPU 06<sub>2300</sub>. Sedangkan pada aksesi No. 2 (50402: KR Bogor asal Ujung Kulon) fragmen unik terdapat pada OPA 05<sub>800</sub>, OPA 07<sub>1800</sub>, OPA 11<sub>1400</sub>, OPA 16<sub>1500</sub> (Tabel 3). Hasil penelitian menunjukkan 37 primer dapat membedakan aksesi yang diuji dengan menunjukkan marka RAPD spesifik yang hanya dapat dideteksi pada setiap aksesi (Tabel 3).

Data RAPD digunakan untuk membuat 'pair-wise comparison' aksesi berdasarkan produk amplifikasi DNA. Ketidaksamaan genetik untuk kesebelas aksesi *A. scholaris* berkisar dari 0.18-0.44. Ketidaksamaan genetik terendah terdapat antara aksesi nomor 2 dan aksesi no 3, sedangkan ketidaksamaan genetik tertinggi terdapat antara aksesi nomor 1 dan No 10 (Tabel 4).

Analisis cluster ke 11 aksesi *A. scholaris* menunjukkan pemisahan aksesi kedalam kelompok-kelompok. Semua aksesi tersebar pada koefisien 0.63-0.82. Hasil dendrogram mengelompokkan ke-11 aksesi menjadi dua cluster yaitu cluster pertama yang terdiri atas 2 kelompok yaitu kelompok 1 yang terdiri atas aksesi 1 (A) (asal Kaltim) dan aksesi 4 (D) (Muara Enim) serta kelompok 2 yang terdiri atas aksesi 5 (E) (Jambi) dan 8 (H) (Dieng). Cluster kedua terdiri atas dua kelompok dan dua outgroup. Kelompok 1 terdiri atas genotype 2 (B) (TN Ujung Kulon), 3 (C) (TN Ujung Kulon), dan genotype 7 (G) (KR Bali). Kelompok 2 terdiri atas genotype 6 (F) (TN Bali Barat) dan genotype 11 (K) (Sumba Timur). Sedangkan kedua outgroup masing-masing adalah genotype 9 (I) (KR Purwodadi) dan genotype 10 (J) (Sumatera Utara), (Gambar 1).

Hubungan kekerabatan pada cluster pertama menunjukkan bahwa kesamaan genetik tertinggi terdapat antara aksesi E (Jambi) dan H (Dieng). Sedangkan pada cluster kedua kesamaan genetik tertinggi terdapat antara aksesi B (TN Ujung Kulon) dan C (TN Ujung Kulon).

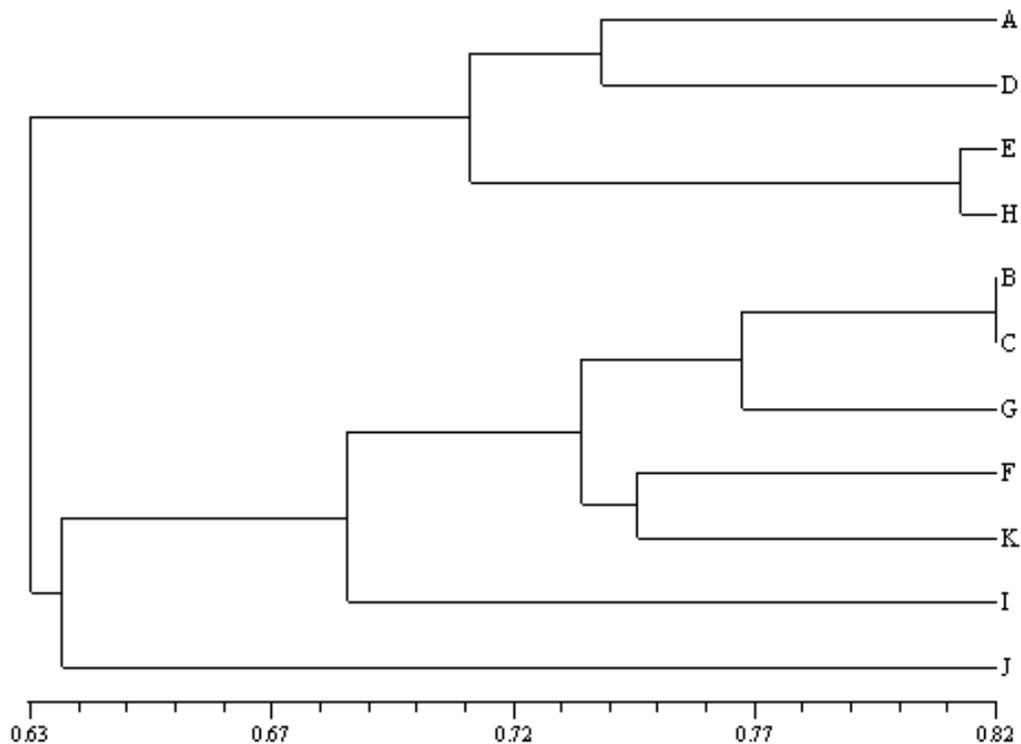
## PEMBAHASAN

### Ekstraksi dan Isolasi DNA

Proses isolasi DNA dari jaringan daun memerlukan penghancuran dinding sel. Setelah dinding sel hancur, langkah selanjutnya adalah penghancuran membran sel untuk melepaskan DNA

**Tabel 3.** Marka Random amplified polymorphic DNA yang spesifik pada setiap aksesori *Alstonia scholaris*

| No.    | Aksesori | Marka RAPD  |
|--------|----------|---|
| 1 (A)  | 50401    | OPA 05 <sub>1700</sub> , OPA 05 <sub>900</sub> , OPA 06 <sub>1400</sub> , OPA 07 <sub>1100</sub> , OPA 10 <sub>1400</sub> , OPA 12 <sub>1600</sub> , OPA 14 <sub>1500</sub> , OPC 02 <sub>1800</sub> , OPC 02 <sub>1700</sub> , OPC 03 <sub>1100</sub> , OPC 04 <sub>500</sub> , OPC 07 <sub>1700</sub> , OPC 08 <sub>1900</sub> , OPC14 <sub>1600</sub> , OPU 06 <sub>2300</sub>   |
| 2 (B)  | 50402    | OPA 05 <sub>7800</sub> , OPA 07 <sub>1800</sub> , OPA 11 <sub>1400</sub> , OPA 16 <sub>1500</sub>   |
| 3 (C)  | 50403    | OPA 01 <sub>1400</sub> , OPA 05 <sub>700</sub> , OPA 05 <sub>350</sub> , OPA 07 <sub>1700</sub> , OPA 08 <sub>1800</sub> , OPA 10 <sub>1300</sub> , OPA 14 <sub>1100</sub> , OPC 10 <sub>8800</sub>   |
| 4 (D)  | 50404    | OPA 02 <sub>1600</sub> , OPA 08 <sub>1700</sub> , OPA 08 <sub>1100</sub> , OPA 11 <sub>1800</sub> , OPA 18 <sub>1550</sub> , OPA 19 <sub>1900</sub> , OPA 19 <sub>1500</sub> , OPC 02 <sub>2200</sub> , OPC 03 <sub>2600</sub> , OPC 07 <sub>2000</sub> , OPC 08 <sub>1700</sub> , OPC 08 <sub>1500</sub> , OPC 14 <sub>2000</sub> , OPC 15 <sub>2000</sub> , OPC 15 <sub>1100</sub> , OPC 16 <sub>1700</sub> , OPN 08 <sub>2000</sub> , OPN 19 <sub>2200</sub> , OPN 19 <sub>1900</sub> , OPN 19 <sub>1600</sub> |
| 5 (E)  | 28128    | OPA 19 <sub>1300</sub> , OPN 18 <sub>600</sub>  |
| 6 (F)  | 35400    | OPA 06 <sub>900</sub> , OPA 08 <sub>1500</sub> , OPA 17 <sub>1300</sub> , OPN 17 <sub>1200</sub>  |
| 7 (G)  | 35441    | OPA 11 <sub>700</sub> , OPA 18 <sub>2000</sub> , OPC 02 <sub>1200</sub> , OPC 18 <sub>1900</sub>  |
| 8 (H)  | 18       | OPA 06 <sub>400</sub> , OPA 08 <sub>1600</sub> , OPA 09 <sub>1200</sub> , OPA 12 <sub>200</sub> , OPA 18 <sub>1600</sub> , OPA 18 <sub>1200</sub>   |
| 9 (I)  | 35327    | OPA 10 <sub>1100</sub> , OPA 14 <sub>400</sub> , OPC 03 <sub>800</sub> , OPC 03 <sub>500</sub> , OPA 03 <sub>300</sub> , OPC 04 <sub>2100</sub> , OPC 04 <sub>600</sub> , OPC 05 <sub>400</sub> , OPC 05 <sub>300</sub> , OPC 05 <sub>200</sub> , OPC 06 <sub>2500</sub> , OPC 06 <sub>200</sub> , OPC 07 <sub>300</sub>  |
| 10 (J) | 2205     | OPA 01 <sub>300</sub> , OPA 01 <sub>200</sub> , OPA 06 <sub>900</sub> , OPA 08 <sub>1650</sub> , OPA 14 <sub>600</sub> , OPA 14 <sub>500</sub> , OPA 20 <sub>400</sub> , OPC 18 <sub>300</sub> , OPN 08 <sub>600</sub>  |
| 11(K)  | 2225     | OPA 17 <sub>2000</sub> , OPA 17 <sub>800</sub> , OPA 17 <sub>700</sub> , OPC 16 <sub>1800</sub>   |



**Gambar 3.** Dendrogram aksesori *Alstonia scholaris* berdasarkan marka RAPD

**Tabel 4.** Matrik ketidaksamaan genetik sebelas aksesori *Alstonia scholaris* L.

|   | A    | B    | C    | D    | E    | F    | G    | H    | I    | J    | K |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| A | 0    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| B | 0.36 | 0    |      |      |      |      |      |      |      |      |   |
| C | 0.39 | 0.18 | 0    |      |      |      |      |      |      |      |   |
| D | 0.26 | 0.36 | 0.38 | 0    |      |      |      |      |      |      |   |
| E | 0.3  | 0.38 | 0.39 | 0.26 | 0    |      |      |      |      |      |   |
| F | 0.4  | 0.28 | 0.29 | 0.39 | 0.35 | 0    |      |      |      |      |   |
| G | 0.37 | 0.24 | 0.23 | 0.38 | 0.37 | 0.25 | 0    |      |      |      |   |
| H | 0.31 | 0.37 | 0.37 | 0.27 | 0.19 | 0.36 | 0.36 | 0    |      |      |   |
| I | 0.43 | 0.35 | 0.34 | 0.43 | 0.33 | 0.26 | 0.32 | 0.35 | 0    |      |   |
| J | 0.45 | 0.43 | 0.4  | 0.43 | 0.29 | 0.36 | 0.39 | 0.35 | 0.32 | 0    |   |
| K | 0.39 | 0.27 | 0.25 | 0.34 | 0.31 | 0.25 | 0.24 | 0.34 | 0.29 | 0.31 | 0 |

kedalam buffer ekstraksi. Pada umumnya ada dua bahan kimia (*detergent*) yang digunakan dalam bufer ekstraksi, yaitu CTAB dan SDS. Pada penelitian ini digunakan CTAB. Selain itu digunakan PVP (polyvinylpyrrolidone) untuk menghilangkan polifenol, dan EDTA untuk melindungi DNA dari nuklease endogen, dan  $\beta$ -mercaptoethanol untuk mencegah oksidasi senyawa fenolik yang mengganggu ekstraksi DNA. Hasil penelitian ini menunjukkan dengan protokol yang dimodifikasi dari Delaporta *et al.* (1983), kesebelas aksesori *A. scholaris* menghasilkan kuantitas DNA yang cukup baik yaitu antara 50-250 ng/ $\mu$ L.

#### Optimasi PCR dan Skrining primer

Analisa RAPD memiliki keuntungan dalam segi teknis yaitu relatif sederhana, kuantitas DNA yang dibutuhkan hanya sedikit (dibutuhkan 5-25 ng DNA dalam setiap reaksi PCR). Kelemahan teknik RAPD adalah tingkat reproduksitasnya yang rendah. Walaupun demikian dapat diatasi dengan konsistensi kondisi PCR. Kualitas pita DNA yang tajam juga penting untuk memudahkan interpretasi dan keakuratan data. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kualitas pita DNA produk amplifikasi PCR dalam analisis RAPD selain primer adalah, konsentrasi DNA, konsentrasi enzim polimerase, primer dan suhu siklus PCR terutama suhu annealing. Perbedaan kualitas hasil amplifikasi selain dilihat berdasarkan jumlah pita yang dapat diidentifikasi, juga dapat dilihat berdasarkan resolusi fragmen DNA yang diamplifikasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan hasil amplifikasi DNA *A. scholaris* yang terbaik diperoleh dengan menggunakan pada masing-masing tabung PCR berisi 0.2 nM dNTPs; 1.5 $\mu$ l bufer reaksi; 2mM MgCl<sub>2</sub>; 10 ng DNA sample; 5 f $\mu$ mol primer tunggal; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega), dengan kondisi PCR seperti berikut. Pemanasan pertama pada suhu 94°C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45 siklus yang terdiri atas *denaturation* 1 menit pada suhu 94°C, *annealing* 1 menit pada suhu 36°C, dan 2 menit *extention* pada suhu 72°C. Setelah 45 siklus selesai, kemudian diikuti 4 menit pada suhu 72°C dan pendinginan pada suhu 4°C selama 30 menit. Konsentrasi DNA *template* yang digunakan relatif sedikit dibandingkan dengan tumbuhan lain (pada cendana diperlukan 25 ng). Penggunaan kondisi PCR ini memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan kondisi PCR lainnya dalam jumlah pita DNA hasil amplifikasi yaitu menampilkan jumlah pita hasil amplifikasi yang lebih banyak.

Untuk tujuan analisis keragaman, hal penting lainnya adalah pemilihan primer yang dapat menampilkan polimorfisme pita-pita DNA diantara individu yang diuji. Pada penelitian ini telah dicoba 26 jenis primer pada sebelas aksesori *A. scholaris* dan dibandingkan pola fragmen DNA yang yang diamplifikasinya. Jumlah (konsentrasi) optimum dari primer random untuk amplifikasi DNA pada beberapa tanaman bervariasi, bergantung kepada jenis primer dan jenis tanamannya. Selain itu, jumlah pita yang

dihasilkan setelah amplifikasi DNA dengan PCR sangat tergantung bagaimana primer mengenal homolognya pada cetakan DNA yang digunakan (Tingey *et al.*, 1994).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa diperoleh 575 fragmen DNA yang berukuran dari 100bp hingga 3.0kb, dengan 524 (92%) merupakan pita polimorfik. Rata-rata setiap primer menghasilkan 12 pita yang dapat dideteksi dan diskor. Jumlah maksimum pita polimorfik yaitu 18 terdapat pada primer OPA-12, sedangkan jumlah pita polimorfik yang terendah (5) terdapat pada primer OPA-16 dan OPA-20 (Tabel 2, Foto 1). Dari 26 primer yang digunakan, 14 diantaranya merupakan primer yang memiliki tingkat polimorfisme yang sangat tinggi (100% polimorfik) yaitu: OPA-2, OPA-03, OPA-05, OPA-06, OPA-10, OPA-12, OPA-15, OPA-18, OPA-19, OPC-03, OPC-10, OPC-12, OPC-17, dan OPN-14. Primer-primer inilah yang dapat digunakan dalam analisa RAPD untuk mempelajari keragaman genetik *A. scholaris*.

#### **Profil pita RAPD**

Penanda RAPD terbukti merupakan penanda/marka yang dapat digunakan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA hasil amplifikasi DNA pada 11 aksesori *A. scholaris*. Ukuran fragmen DNA ditentukan dengan membandingkan ampikon dengan penanda DNA, yang berkisar antara 200-1500 bp. Dengan primer dan kondisi PCR yang cocok, profil pita DNA terbukti konsisten menghasilkan fragmen DNA yang jelas dan teramplifikasi dengan baik, sehingga skoring dapat dilakukan untuk analisa *pair-wise comparison*. Ketidaksamaan genetik untuk kesebelas aksesori *A. scholaris* yang berkisar antara 0,18-0,44, menunjukkan adanya keragaman genetik yang relatif tinggi. Namun demikian hasil penelitian ini perlu dipertajam karena jumlah individu yang relatif kecil. Untuk menghasilkan kesimpulan yang akurat sebaiknya jumlah individu dari setiap populasi lebih besar sehingga mewakili keragaman yang ada dalam setiap populasi. Untuk tujuan analisa keragaman genetik, idealnya setiap individu dalam populasi dapat diwakili dengan jumlah 10-20 individu.

Hasil analisa *cluster* menunjukkan adanya pemisahan individu ke dalam kelompok yang berbeda menunjukkan bahwa kesebelas individu *A. scholaris*

memiliki keragaman genetik. Demikian pula hasil penelitian ini akan lebih akurat apabila jumlah individu pada setiap populasi semakin besar, sehingga keragaman genetik dapat diestimasi dalam populasi maupun antar populasi *A. scholaris*. Walaupun demikian, penelitian ini dapat bermanfaat dalam penentuan primer serta kondisi PCR yang diperlukan bagi penelitian keragaman genetik selanjutnya.

#### **KESIMPULAN**

Reaksi PCR yang menghasilkan produk amplifikasi DNA *A. scholaris* yang jelas dan konsisten dilakukan pada volume total 15 µl yang berisi 0,2 nM dNTPs; 1X bufer reaksi; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 ng DNA sample; 5 pmole primer tunggal; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega) dengan menggunakan Thermocycler selama 45 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 94°C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45 siklus yang terdiri atas *denaturation* 1 menit pada suhu 94°C, *annealing* 1 menit pada suhu 36°C, dan 2 menit *extention* pada suhu 72°C. Setelah 45 siklus selesai, kemudian diikuti 4 menit pada suhu 72°C dan pendinginan pada suhu 4°C selama 30 menit.

Dari 26 primer marka RAPD diperoleh 575 fragmen DNA dengan 524 fragmen (92%) merupakan fragmen DNA polimorfik. Dari 26 primer yang digunakan terdapat 14 primer yang menghasilkan 100% fragmen DNA polimorfik, yaitu OPA-2, OPA-03, OPA-05, OPA-06, OPA-10, OPA-12, OPA-15, OPA-18, OPA-19, OPC-03, OPC-10, OPC-12, OPC-17, and OPN-14. Berdasarkan hasil dendrogram terdapat dua cluster yaitu cluster pertama yang terdiri atas 2 kelompok yaitu kelompok 1 yang terdiri atas aksesori 1 (A) (asal Kaltim) dan aksesori 4 (D) (Muara Enim) serta kelompok 2 yang terdiri atas aksesori 5 (E) (Jambi) dan 8 (H) (Dieng). Cluster kedua terdiri atas dua kelompok dan dua outgroup. Kelompok 1 terdiri atas genotype 2 (B) (TN Ujung Kulon), 3 (C) (TN Ujung Kulon), dan genotype 7 (G) (KR Bali). Kelompok 2 terdiri atas genotype 6 (F) (TN Bali Barat) dan genotype 11 (K) (Sumba Timur). Sedangkan kedua outgroup masing-masing adalah genotype 9 (I) (KR Purwodadi) dan genotype 10 (J) (Sumatera Utara). Nilai ketidaksamaan genetik ke-11 aksesori *A. scholaris* berkisar antara 0,18 hingga 0,44.

## Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Pusat Penelitian Biologi-LIPI yang telah mendanai penelitian ini melalui Sub Kegiatan Pengembangan Bank DNA Hidupan Liar. Terimakasih disampaikan kepada Sdri. Nur Khalilatul Izzah yang telah membantu dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Carvalho VP, CF Ruas, JM Ferreira, RMP Moreira and PM Ruas. 2004.** Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* **27**, 1-16.
- Delaporta SL, J Wood and JB Hicks. 1983.** A plant DNA minipreparation. Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **4**, 19-21.
- Dunn G and BS Everitt. 1982.** *An Introduction to Mathematical Taxonomy*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Martin JP and JEH Bermejo. 2000.** Genetic variation in the endemic and endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath & Maire (Labiatae) using RAPD markers. *Heredity* **85**, 434-443.
- Mogea JP, D Gandawidjaja, H Wiriadinata, RE Nasution dan Irawati. 2001.** *Tumbuhan Langka Indonesia*. Puslitbang Biologi.
- Pither R, JS Shore and M Kellman. 2003.** Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. *Heredity* **91** (3), 307-313.
- Poerba YS. 2003.** Penampilan karakter agronomi dan analisis Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) akses mutan *Sonchus arvensis* L. *Buku Kumpulan Abstrak Seminar Nasional X Persada*, 124. Persada Cabang Bogor dan Badan Pengurus Pusat Persada. Jakarta 4 Juli 2003.
- Rath P, G Rajaseger, CJ Goh and P Kumar. 1998.** Phylogenetic analysis of Dipterocarps using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Annals of Botany* **82**, 61-65.
- Rohlf FJ. 1993.** NTSYS-pc: *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80*. Exeter Software, New York.
- Runo MS, GM Muluvi and DW Odee. 2004.** Analysis of genetic structure in *Melia volkensii* (Gurke.) populations using random amplified polymorphic DNA. *African Journal of Biotechnology* **3** (8), 421-425.
- Teo SP. 2000.** *Alstonia* R. Br. In: *Timber Trees: Major Commercial Timbers*. Plant Resources of South-East Asia. *PROSEA* **5**(1). I Soerianegara and RHMJ Lemmens (Eds). Bogor, Indonesia.
- Tingey SV, JA Rafalski and MK Hanafey. 1994.** Genetic Analysis with RAPD Markers: In: *Plant Molecular Biology*, 491-498. C Coruzzi and P Puidormenech (Eds.).
- Widjaja EA dan YS Poerba. 2004.** Pengumpulan data plasma nutfah dan genetika. Dalam: Rugayah, EA Widjaya dan Praptiwi (Ed.). *Pedoman Pengumpulan Data Keanekaragaman Flora*. Pusat Penelitian Biologi -LIPI. Pp. 113-140.
- Williams JG, AR Kubelik, KJ Livak, JA Rafalsky and SV Tingey. 1990.** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid Res.* **18**(22), 6531-6535.