

**FRAGMEN POLIMORFIK PENANDA RAPD UNTUK ANALISIS
GENETIK SENGON (*Falcataria moluccana*)**

Polymorphic RAPD fragments for genetic analysis of Sengon (Falcataria moluccana)

Vivi Yuskianti

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar Km. 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta 55582
Telp. (0274) 895954, 896080, Fax. (0274) 896080

ABSTRACT

*This research was conducted to support tree improvement program for sengon (*Falcataria moluccana* (Miq.) Barneby & J.W. Grimes). Polymorphic fragments were surveyed in 288 RAPD primers using 24 materials from Okinawa, Japan. Carefully selections of the polymorphic fragments were applied to overcome a problem of low reproducibility of RAPD markers. The first screening using 4 materials found that 285 out of 288 primers successfully produced fragments. The second screening using 16 materials finally obtained 48 polymorphic fragments. High discrimination ability ($DP=0.483$, in average) was obtained from all the selected fragments. The selected fragments can be used to support tree improvement program of the species for genetic diversity study and to facilitate a development of more specific markers such as Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) marker.*

Key Words : *Falcataria moluccana, sengon, polymorphic fragments, RAPD markers*

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mendukung program pemuliaan pohon sengon (*Falcataria moluccana* (Miq.) Barneby & J.W. Grimes). Fragmen polimorfik didapatkan dengan melakukan seleksi pada 288 RAPD primer menggunakan 24 sampel dari Okinawa, Jepang. Seleksi pertama menggunakan 4 sampel menunjukkan bahwa 285 primers menghasilkan fragmen dan dapat dilanjutkan ke seleksi kedua. Setelah melakukan seleksi dan pemilihan fragmen dengan kriteria yang ketat untuk menghindari masalah reproduibilitas yang rendah di penanda RAPD, 48 fragmen polimorfik akhirnya diperoleh. Fragmen yang terpilih mempunyai kemampuan identifikasi yang baik ditandai dengan tingginya nilai *Discrimination Power* (rata-rata $DP=0,483$). Hasil penelitian ini dapat diaplikasikan untuk studi keragaman genetik dan dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi penanda yang lebih spesifik seperti penanda *Sequence Characterized Polymorphic Region* (SCAR).

Kata Kunci : *Falcataria moluccana, sengon, fragmen polimorfik, penanda RAPD*

I. PENDAHULUAN

Sengon (*Falcataria moluccana* (Miq.) Barneby & J.W. Grimes) merupakan spesies pohon asli di Maluku, New Guinea, Kepulauan Bismark dan Kepulauan Solomon (Argent *et al.*, 1996). Sengon yang mempunyai kemampuan untuk tumbuh cepat (*fast growing species*) dan mempunyai berbagai kegunaan antara lain sebagai bahan baku pembuatan pulp dan kertas, furnitur dan tanaman pelindung menyebabkan spesies ini banyak ditanam petani di Indonesia terutama di Pulau Jawa.

Untuk mendukung program pemuliaan pohon sengon diperlukan adanya metode identifikasi genotipe yang akurat. Identifikasi secara tradisional menggunakan karakter morfologi dapat menyebabkan kesalahan karena dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Rajora dan Rahman (2003) mengatakan bahwa identifikasi secara tradisional sulit, membingungkan, memerlukan waktu dan bersifat subyektif. Penanda molekuler menawarkan keunggulan untuk identifikasi karena keakuratan dan keandalannya dalam melakukan analisis dan fleksibilitasnya untuk diaplikasikan pada berbagai tahap pertumbuhan tanaman.

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh fragmen DNA yang polimorfik pada sengon. Hasil penelitiannya dapat diaplikasikan untuk studi keragaman genetik dan juga dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi penanda yang lebih spesifik, misalnya penanda *Sequence Characterized Amplified Region* (SCAR) (Paran dan Micheltore, 1993). Penanda yang spesifik ini dapat memudahkan identifikasi antar genotipe dan antar klon, jika dilakukan perbanyakan secara vegetatif. Seleksi fragmen polimorfik

dilakukan menggunakan penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (William *et al.*, 1990). RAPD merupakan penanda yang banyak digunakan untuk identifikasi karena mudah, dapat digunakan pada semua spesies karena tidak membutuhkan informasi awal tentang genom tanaman yang akan dianalisis, tidak menggunakan bahan radioaktif dan terdapat banyak primer yang sudah dikembangkan (Khasa dan Dancik, 1996).

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan

Ada 103 tanaman sengon yang tidak diketahui asal-usulnya yang ditanam di Pulau Okinawa, Jepang dikoleksi sebagai bahan untuk seleksi. Sebanyak 24 dari 103 sengon tersebut kemudian dipilih secara acak dan digunakan sebagai materi seleksi. DNA diisolasi menggunakan metode *Cetyl Trimethylammonium Bromide* (CTAB) dari Shiraishi dan Watanabe (1995) yang dimodifikasi. Purifikasi dilakukan menggunakan GENE CLEAN III kit (Bio101. INC) sesuai dengan prosedur yang ada.

B. Metode Penelitian

Primer RAPD yang mempunyai 13-pasang sekuens basa yang berasal dari 6 seri (D02, D18, E20, I02, S11 dan Y16) dengan total sebanyak 288 primer digunakan untuk seleksi fragmen di penanda RAPD. Analisis RAPD dilakukan menggunakan 10 µl reaksi yang mengandung 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 10 mM KCl, 3mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,025 unit/µl Platinum taq DNA polymerase (Perkin-Elmer), 1,5 µM primer, dan 10 ng templat DNA. Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin 9700 Applied

Biosystem (Perkin Elmer) selama 1 menit pada suhu 94°C, kemudian 45 siklus pada suhu 94°C selama 30 detik, 30 detik pada suhu 37°C dan 90 detik pada suhu 72°C; dan selanjutnya 7 menit pada suhu 72°C. Elektroforesis hasil amplifikasi menggunakan 1,2% agarose gel pada 1xTBE *buffer* elektroforesis, kemudian hasil elektroforesis tersebut difoto di bawah sinar ultraviolet. Fragmen RAPD yang dihasilkan kemudian diskor sebagai 1 (ada fragmen) dan 0 (tidak ada fragmen).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penanda RAPD mempunyai reproduibilitas yang rendah karena dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (Skroch dan Nienhuis, 1995 dan Jones *et al.*, 1997). Upaya meningkatkan reproduibilitas dengan cara mengulang percobaan menggunakan sampel dan primer yang sama selama beberapa kali hanya menunjukkan sedikit atau tidak ada perbedaan hasil (Keil dan Griffin, 1994). Oleh karena itu, pada penelitian ini tidak dilakukan pengulangan percobaan. Untuk mengatasi masalah reproduibilitas tersebut berbagai kriteria untuk pemilihan fragmen diterapkan. Fragmen yang terpilih selain bersifat polimorfik, fragmen tersebut harus mempunyai kriteria yaitu signal yang kuat, tidak sumir, warnanya jelas, dan signalnya tidak meragukan (membingungkan) (Gambar 1).

Seleksi pertama yang menggunakan 4 sampel sengon menunjukkan bahwa sebanyak 285 dari 288 primer RAPD menghasilkan fragmen. Kegagalan menghasilkan fragmen hanya terjadi di tiga primer yaitu E20GGT,

I02CCT and I02TCA. Hasil seleksi pertama menunjukkan bahwa 107 RAPD primer mempunyai hasil yang baik dan dapat dilanjutkan untuk seleksi selanjutnya. Seleksi kedua dilakukan menggunakan 16 sampel sengon pada 107 RAPD primer yang terpilih. Hasil seleksi kedua ini menunjukkan bahwa sebanyak 59 primer menghasilkan fragmen yang tidak jelas, membingungkan dan juga bersifat kurang polimorfik. Pada seleksi ini sebanyak 48 RAPD fragmen dari 44 primer akhirnya terpilih (Tabel 1 dan Gambar 1).

Fragmen yang terpilih mempunyai ukuran yang beragam mulai dari 240-700 bp. Frekuensi sampel yang menghasilkan fragmen (skor=1) bervariasi dari 0,188-0,688 sedangkan frekuensi sampel yang tidak menghasilkan fragmen (skor=0) bervariasi dari 0,313-0,813 (Tabel 1). Kemampuan untuk identifikasi yang ditandai dengan nilai *Discrimination Power* (DP) dihitung menggunakan formula Tessier *et al.*, (1999). Sebagian besar fragmen yang terpilih mempunyai kemampuan yang tinggi untuk identifikasi ditandai dengan nilai rata-rata DP sebesar 0,483 dengan variasi DP sebesar 0,325-0,533 (Tabel 1). Hasil maksimal DP diperoleh pada sampel yang mempunyai frekuensi yang seimbang antara yang menghasilkan fragmen (skor=1) dan tidak (skor=0) (Watanabe *et al.*, 2004). Ada 7 penanda yang mempunyai angka DP yang tertinggi (DP=0,533) yaitu fragmen dari primer D02ACG, D02AGC, D02GAC, D02TAC, E20GAG, E20TGT, dan I02CGA (Tabel 1.).

Tabel 1. 48 fragmen polimorfik yang terpilih menggunakan penanda RAPD

Primer	Sekuens (5'to 3')	Ukuran fragmen (kb)	Ada fragmen (1)	Tidak ada fragmen (0)	Frek. (1)	Frek. (0)	DP*
D02AAC	GGACCCAACCAAC	380	6	10	0,375	0,625	0,500
D02AAG	GGACCCAACCAAG	560	4	12	0,250	0,750	0,400
D02ACG	GGACCCAACCACG	700	9	7	0,563	0,438	0,525
D02ACG	GGACCCAACCACG	380	8	8	0,500	0,500	0,533
D02AGC	GGACCCAACCAGC	280	8	8	0,500	0,500	0,533
D02GAA	GGACCCAACCGAA	320	7	9	0,438	0,563	0,525
D02GAC	GGACCCAACCGAC	280	8	8	0,500	0,500	0,533
D02GAT	GGACCCAACCGAT	650	7	9	0,438	0,563	0,525
D02GCA	GGACCCAACCGCA	380	9	7	0,563	0,438	0,525
D02GTA	GGACCCAACCGTA	240	3	13	0,188	0,813	0,325
D02GTG	GGACCCAACCGTG	250	7	9	0,438	0,563	0,525
D02TAC	GGACCCAACCTAC	500	8	8	0,500	0,500	0,533
D02TCA	GGACCCAACCTCA	680	9	7	0,563	0,438	0,525
D18AAC	GAGAGCCAACAAC	320	5	11	0,313	0,688	0,458
D18AGA	GAGAGCCAACAGA	240	5	11	0,313	0,688	0,458
D18ATC	GAGAGCCAACATC	700	10	6	0,625	0,375	0,500
D18CCT	GAGAGCCAACCCT	450	11	5	0,688	0,313	0,458
D18GAA	GAGAGCCAACGAA	700	11	5	0,688	0,313	0,458
D18GAA	GAGAGCCAACGAA	580	9	7	0,563	0,438	0,525
D18GAG	GAGAGCCAACGAG	320	9	7	0,563	0,438	0,525
E20ACG	AACGGTGACCACG	520	5	11	0,313	0,688	0,458
E20ACT	AACGGTGACCACT	620	4	12	0,250	0,750	0,400
E20TGC	AACGGTGACCTGC	320	4	12	0,250	0,750	0,400
E20GAG	AACGGTGACCGAG	680	8	8	0,500	0,500	0,533
E20TAG	AACGGTGACCTAG	340	5	11	0,313	0,688	0,458
E20TGT	AACGGTGACCTGT	580	8	8	0,500	0,500	0,533
I02ACT	GGAGGAGAGGACT	400	10	6	0,625	0,375	0,500
I02CCA	GGAGGAGAGGCCA	300	4	12	0,250	0,750	0,400
I02CGA	GGAGGAGAGGCCA	380	8	8	0,500	0,500	0,533
I02GAA	GGAGGAGAGGGAA	680	7	9	0,438	0,563	0,525
I02GAG	GGAGGAGAGGGAG	340	9	7	0,563	0,438	0,525
I02GAT	GGAGGAGAGGGAT	650	9	7	0,563	0,438	0,525
I02GGT	GGAGGAGAGGGGT	680	4	12	0,250	0,750	0,400
I02GTA	GGAGGAGAGGGTA	280	10	6	0,625	0,375	0,500
I02TCG	GGAGGAGAGGGTCG	600	9	7	0,563	0,438	0,525
I02TGT	GGAGGAGAGGGTGT	400	5	11	0,313	0,688	0,458
S11ACT	AGTCGGGTGGACT	510	7	9	0,438	0,563	0,525
S11CGA	AGTCGGGTGGCGA	480	10	6	0,625	0,375	0,500
S11CGA	AGTCGGGTGGCGA	300	5	11	0,313	0,688	0,458
S11CAG	AGTCGGGTGGCAG	450	5	11	0,313	0,688	0,458
S11GAC	AGTCGGGTGGGAC	500	9	7	0,563	0,438	0,525
Y16AGT	GGGCCAATGTAGT	500	4	12	0,250	0,750	0,400
Y16GAC	GGGCCAATGTGAC	450	9	7	0,563	0,438	0,525
Y16CAC	GGGCCAATGTCAC	400	5	11	0,313	0,688	0,458
Y16CAG	GGGCCAATGTCAG	700	11	5	0,688	0,313	0,458
Y16CAG	GGGCCAATGTCAG	500	5	11	0,313	0,688	0,458
Y16CCA	GGGCCAATGTCCA	300	4	12	0,250	0,750	0,400
Y16TGT	GGGCCAATGTTGT	400	5	11	0,313	0,688	0,458
Rata-rata			7,1	8,9	0,444	0,556	0,483

Keterangan: **Discrimination Power (DP)* dihitung menggunakan formula Tessier *et al.*, (1999).

Analisis RAPD dapat dilakukan dalam waktu yang singkat dan hanya membutuhkan sedikit materi tanaman dibandingkan dengan metode lain seperti metode biokimia dan penanda

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Khasa dan Dancik, 1996). Penanda RAPD dapat digunakan untuk berbagai tujuan seperti pemetaan genetik, aplikasi di bidang

pemuliaan dan sidik jari DNA (William *et al.*, 1990). Studi taksonomi dan identifikasi kultivar (Cipriani *et al.*, 1996), pengujian klon (Castilione *et al.*, 1993), identifikasi hibrid (Muro-Abad *et al.*, 2001 dan Ferreyra *et al.*, 2004) dan menganalisis kesuksesan hasil reproduksi jantan (Goto *et al.*, 2002) juga telah dilakukan menggunakan penanda RAPD. Penanda RAPD memiliki keunggulan dalam segi biaya dan cukup handal untuk melakukan analisis (McGregor *et al.*, 2000) sehingga penanda RAPD tetap akan digunakan di laboratorium terutama yang berskala kecil (Kjolner *et al.*, 2004). Fragmen polimorfik RAPD yang dihasilkan pada penelitian ini dapat digunakan untuk menunjang

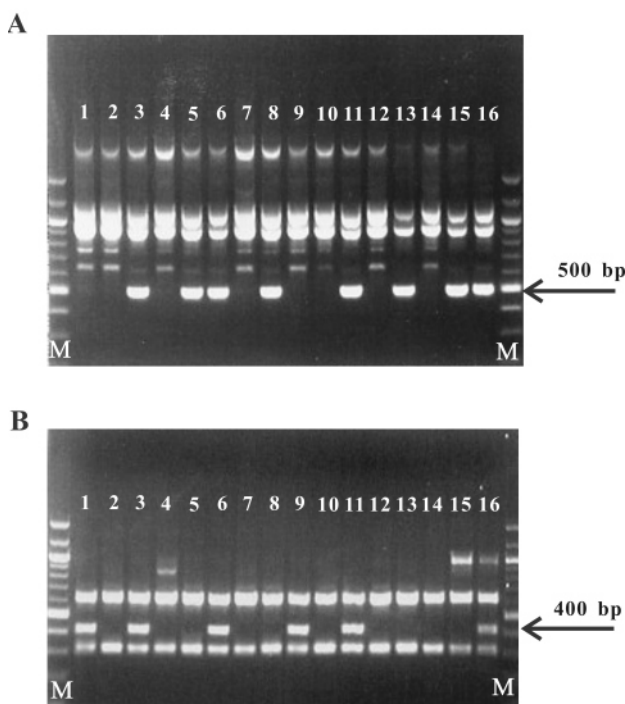
program pemuliaan pohon sengon. Informasi yang tersedia dapat diterapkan untuk studi keragaman genetik seperti halnya penelitian sejenis yang dilakukan pada jati (*Tectona grandis*) (Watanabe *et al.*, 2004). Kegunaan lain dari hasil penelitian ini adalah bahwa fragmen-fragmen yang dihasilkan dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi penanda yang lebih spesifik seperti penanda SCAR sehingga identifikasi yang dilakukan dapat lebih mudah, sederhana dan tidak banyak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan.

IV. KESIMPULAN

Sebanyak 48 fragmen polimorfik telah terpilih dari seleksi menggunakan 288 primer penanda RAPD. Fragmen-fragmen ini mempunyai kemampuan untuk identifikasi yang tinggi ditandai dengan angka DP yang tinggi. Aplikasi dari penelitian ini dapat diterapkan untuk studi keragaman genetik ataupun untuk membantu pengembangan metode identifikasi yang lebih spesifik seperti pengembangan penanda *Sequence Characterized Amplified Region* (SCAR).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Osamu Chigira dari *Forest Tree Breeding Center*, Okinawa, Jepang untuk pengambilan sampel sengon di Okinawa, Jepang. Ucapan terima kasih juga diberikan kepada Prof. Susumu Shiraishi dari Kyushu University, Jepang atas semua arahan, bimbingan dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis.



Gambar 1. Hasil amplifikasi pada 16 sampel sengon menggunakan primer (A) 5'-GGACCCA ACCTAC-3' dan (B) 5'-GGGCCAATGT TGT-3'. M merupakan 100 bp DNA ladder. Angka 1-16 pada tiap kolom menunjukkan sampel sengon yang digunakan. Tanda panah pada tiap gambar menunjukkan fragmen polimorfik yang terpilih dari tiap primer.

DAFTAR PUSTAKA

- Argent, G., A. Saridan, E.J.F. Campbell, G. Fairweather, J.T. Hadiah, D.J. Middleton, C. Pendry, M. Pinard, M. Warwick dan K.S. Yulita (eds) (1996). Manual of the larger and more important non dipterocarp trees of central Kalimantan Indonesia. Forest Research Institute Samarinda, Indonesia, p.685.
- Castiglione S., G. Wang, G. Damiani, C. Bandi, S. Bisoffi dan F. Sala (1993). RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. *Theor Appl Genet* **87**:54-59.
- Cipriani, G., R. Di Bella dan R. Testolin (1996). Screening RAPD primers for molecular taxonomy and cultivar fingerprinting in the genus *Actinidia*. *Euphytica* **90**:169-174.
- Ferreira, L.I., C. Bessega, J.C. Vilardi dan B.O. Saidman (2004). First report on RAPD patterns able to differentiate some Argentinean species of section *Algarobia* (*Prosopis*, Leguminosae). *Genetica* **121**:33-42.
- Goto, S., F. Miyahara dan Y. Ide (2002). Monitoring male reproductive success in a Japanese black pine clonal seed orchard with RAPD markers. *Can. J. For. Res.* **32**:983-988.
- Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. Van De Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Bulatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez dan A. Karp (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* **3**:381-390.
- Keil, M. dan A.R. Griffin (1994). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theor Appl Genet* **89**:442-450.
- Khasa, P.D. dan B.P. Dancik (1996). Rapid identification of white-Engelmann spruce species by RAPD markers. *Theor Appl Genet* **92**:46-52.
- Kjolner, S., S.M. Sastad, P. Taberlet dan C. Brochmann (2004). Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. *Molecular Ecology* **13**:81-86.
- McGregor, C.E., C.A. Lambert, M.M. Greyling, J.H. Louw dan L. Warnich (2000). A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* **113**:135-144.
- Muro-Abad, J.I., E.A. Gomes, O.N. Cancio dan E.F. De Araujo (2001). Genetic analysis of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* clones selected in commercial crops from the Brazilian Amazon by RAPD markers. *Silvae Genetica* **50**:5-6.
- Paran, I. dan R.W. Michelmore (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* **85**:985-993.

- Rajora, D.P. dan M.H. Rahman (2003). Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationship of hybrid poplar (*Populus x canadensis*) cultivars. *Theor Appl Genet* **106**:470-477.
- Shiraishi, S. dan A. Watanabe (1995). Identification of chloroplast genome between *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc and *P. thunbergii* Parl. based on polymorphisms in *rbcL* gene. *Journal of Japanese Forest Society* **77**:429-436.
- Skroch, P. dan J. Nienhuis (1995). Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor Appl Genet* **91**:1086-1091.
- Tessier, C., J. David, P. This, J.M. Boursiquot dan A. Charrier (1999). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor Appl Genet* **98**:171-177.
- Watanabe, A., A. Widyatmoko, A. Rimbawanto dan S. Shiraishi (2004). Discrimination of teak (*Tectona grandis*) plus trees using selected Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Tropical Forest Science* **16** (1):17-24.
- William, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski dan S.V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**:6531-6535.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dewan Redaksi Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan menyampaikan rasa terimakasih dan penghargaan kepada Prof. Dr. Mohammad Na'iem selaku Mitra Bestari (*Peer Reviewer*) atas telaah dan saran terhadap isi naskah yang dimuat pada Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan Vol. 5 No. 1 Tahun 2011.