

IDENTIFIKASI *Aquilaria malaccensis* DAN *A. microcarpa*
MENGGUNAKAN PENANDA RAPD
Identification of Aquilaria malaccensis and A. microcarpa Using RAPD Marker

Anto Rimbawanto dan AYPBC Widyatmoko

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

Aquilaria sp., belong to Family *Thymelaeaceae*, is one of several species whose can produce agarwood or gaharu. Quality of gaharu of this species is better than the other species. With high economic value, demand of *Aquilaria sp.* increase and also increase exploitation of the species without counterbalanced by enough planting activity. Therefore, conservation and breeding program of the species become important to carry out. Two important *Aquilaria sp.* are *A. malaccensis* and *A. microcarpa*. However, both species only can be distinguished by generative characteristics such as flower and fruit. The most appropriate and rapid method to identify species is DNA marker, especially using RAPD markers. In order to obtain DNA marker to species identification, 2 selection steps should be carried out. The first step was using 2-3 samples per species. From 180 RAPD primers, only 5 primers produced loci those can identify both species, those are D-20, A-17, G-12, R-15 and U-13. The second selection step was carried out by increasing number of samples per species (24 samples in total). From the five primers obtained from first selection, only U-13 700 basepairs that can be selected as species-specific DNA markers to identify both *Aquilaria sp.*

Key Words : *Aquilaria malaccensis*, *Aquilaria microcarpa*, *identification*, *RAPD*, *gaharu*

ABSTRAK

Aquilaria sp. merupakan salah satu jenis pohon penghasil gaharu yang berasal dari suku *Thymelaeaceae*. Dibandingkan dengan spesies pohon penghasil gaharu lainnya, kualitas gaharu yang diperoleh pada spesies ini jauh lebih baik. Tingginya nilai ekonomis meningkatkan permintaan akan produk tersebut yang mengakibatkan terjadinya eksploitasi gaharu pada spesies tersebut secara terus menerus tanpa diimbangi oleh kegiatan penanaman yang cukup. Hal tersebut mendorong untuk dilakukannya upaya konservasi dan pemuliaan untuk mencegah kepunahannya. Dua spesies *Aquilaria spp* yang paling banyak dimanfaatkan adalah *A. malaccensis* dan *A. microcarpa*. Kedua jenis ini hanya dapat dibedakan berdasarkan sifat generatifnya, yaitu bunga dan buah, sehingga hanya bisa dibedakan setelah berbunga atau berbuah. Untuk meningkatkan efisiensi dan efektifitas program konservasi dan pemuliaan kedua jenis tersebut, diperlukan metode yang lebih tepat dan cepat untuk membedakannya. Metode tersebut adalah menggunakan penanda DNA dengan metode RAPD. Dua tahap seleksi dilakukan untuk mendapatkan penanda DNA tersebut. Pada seleksi tahap pertama

dengan menggunakan 2-3 sampel per spesies, dari 180 RAPD primer hanya diperoleh 5 primer yang bisa membedakan kedua spesies yaitu primer D-20, A-17, G-12, R-15 dan U-13. Pada seleksi tahap kedua dengan menambah jumlah sampel, hanya primer U-13 *basepair* 700 saja yang dapat digunakan sebagai penanda DNA untuk membedakan kedua jenis *Aquilaria* tersebut.

Kata Kunci : *Aquilaria malaccensis*, *Aquilaria microcarpa*, identifikasi, RAPD, gaharu

I. PENDAHULUAN

Aquilaria sp merupakan tanaman asli Indonesia. Ding Hou (1960) melaporkan terdapat 6 spesies *Aquilaria* yang terdapat di Indonesia, yaitu *A. malaccensis*, *A. beccariana*, *A. microcarpa*, *A. hirta*, *A. cumingiana* dan *A. filaria*. *A. malaccensis*, *A. beccariana*, *A. microcarpa* tersebar luas di Sumatera dan Kalimantan, sedangkan *A. hirta*, *A. cumingiana* dan *A. filaria* hanya tersebar di beberapa lokasi saja. Populasi dari keenam spesies tersebut mempunyai kerapatan rendah, sehingga dengan ditambah pengaruh eksploitasi yang berlebihan, kegiatan konservasi merupakan kegiatan utama dari spesies tersebut (Chakrabarty *et al.*, 1994). Soehartono dan Newton (2000) melaporkan bahwa berdasarkan analisis NFI, mengidentifikasi kerapatan individu dalam populasi yang relatif rendah dengan rata-rata <1,2 individu/ha.

Aquilaria malaccensis dan *A. microcarpa* merupakan 2 jenis *Aquilaria* yang dapat memproduksi gaharu dengan kualitas tinggi (Sumarna, 2002). Saat ini, akibat dari kegiatan penanaman yang belum berhasil dengan baik, produk gaharu masih mengandalkan dari hutan alam. Oleh karena itu, populasi alam dari kedua spesies tersebut dari tahun ke tahun semakin berkurang. *Aquilaria malaccensis* menjadi salah

satu spesies dalam daftar CITES yang harus dikonservasi. Program konservasi dan pemuliaan dari kedua spesies menjadi penting untuk mengamankan populasi alam dan untuk memperluas hutan tanaman. Secara umum, kedua spesies ini amat sukar untuk dibedakan. Kedua spesies tersebut hanya dapat dibedakan pada saat fase generatifnya saja (bunga dan buah). Hal ini dikarenakan kedua spesies memiliki hubungan kekeluargaan yang sangat dekat.

Di dalam menyusun strategi konservasi maupun pemuliaan dari kedua jenis tersebut, maka sangatlah penting untuk membedakan keduanya pada level awal dari pertumbuhan. Satu-satunya teknik yang bisa membedakan spesies pada tingkat awal adalah penanda DNA. Apabila kedua spesies telah bisa dibedakan menggunakan penanda DNA, maka keduanya dapat dibedakan dalam tingkat semai.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) merupakan teknik PCR yang sederhana dan cepat untuk identifikasi spesies dengan beberapa keuntungan seperti jumlah genom DNA yang dibutuhkan, hanya menggunakan 1 primer 10-bp dan 1 program PCR. RAPD telah digunakan sebagai penanda untuk identifikasi spesies pada *Lolium* (Delozier *et al.*, 1999), *Populus* (Sanchez *et al.*, 1998), *Spruce* (Khasa dan

Dancik, 1996), Larch (Scheepers *et al.*, 2000), Quercus (Samuel, 1999), Picea (Nkongolo, 1999), dan Acacia (Widyatmoko dan Shiraishi, 2001 dan 2003). Delozier *et al.* (1999) mengatakan bahwa penanda spesies-spesifik harus mempunyai 2 persyaratan yaitu muncul pada semua individu dari 1 spesies dan tidak muncul pada semua individu dari spesies yang lain.

Tujuan dari kegiatan penelitian ini adalah untuk menemukan penanda spesies-spesifik RAPD pada *Aquilaria malaccensis* dan *A. microcarpa* untuk membedakan keduanya dalam rangka mendukung program konservasi sumber daya genetik dan pemuliaan dari kedua spesies.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan

Materi genetik yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun yang dikoleksi dari 8 individu *Aquilaria malaccensis* (Berau, Kalimantan Timur) dan 16 individu *A. microcarpa* (Samboja dan Samarinda, Kalimantan Timur).

B. Metode

Total DNA diperoleh melalui ekstraksi menggunakan *mini beadbeater* dengan metode CTAB (Murray dan Thompson, 1980) yang telah dimodifikasi oleh Shiraishi dan Watanabe (1995). Sedangkan purifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan GeneClean III Kit (Q-biogene). DNA hasil purifikasi dihitung menggunakan GeneQuant (Pharmacia), yang selanjutnya akan digunakan untuk reaksi PCR dengan konsentrasi 2,5 ng DNA/ μ l.

Reaksi PCR dilakukan dengan total volume 10 μ l per sampel yang mengandung 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 10 mM KCl, 3,0 mM $MgCl_2$, 200 μ M tiap dNTPs, 0,25 μ M primer, 0,5 unit/10 μ l AmpliTaq DNA polymerase (*Stoffel Fragment, Applied Biosystems*), dan 10 ng larutan DNA. Kondisi dari proses amplifikasi PCR adalah denaturasi awal selama 60 detik pada suhu 94°C, diikuti dengan 45 siklus yang masing-masing terdiri dari denaturasi selama 30 detik pada suhu 94°C, penempelan primer (*annealing*) selama 30 detik pada suhu 37°C, dan pemanjangan (*extension*) selama 90 detik pada suhu 72°C. Proses PCR diakhiri dengan pemanjangan selama 7 menit pada suhu 72°C. Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada 1,2% gel agarose dengan ethidium bromide dan akhirnya dideteksi menggunakan 302-nm UV transilluminator (BIO-RAD Gel DocTM EQ).

Dua (2) tahap seleksi dilakukan untuk memperoleh penanda spesies-spesifik dari *A. malaccensis* dan *A. microcarpa*. Tahap pertama adalah seleksi (*screening*) primer RAPD yang memproduksi penanda spesies-spesifik menggunakan 2 - 3 sampel dari masing-masing spesies yang telah diidentifikasi menggunakan karakter buah dan/atau bunganya. Tahap kedua adalah menyeleksi primer yang telah diseleksi pada tahap pertama dengan menambah jumlah sampel dari kedua spesies. Pada tahap ini untuk *A. malaccensis* digunakan 8 sampel, sedangkan *A. microcarpa* 16 sampel, dimana penentuan sampel tersebut berdasarkan informasi dari masyarakat sekitar pohon/sampel tersebut.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

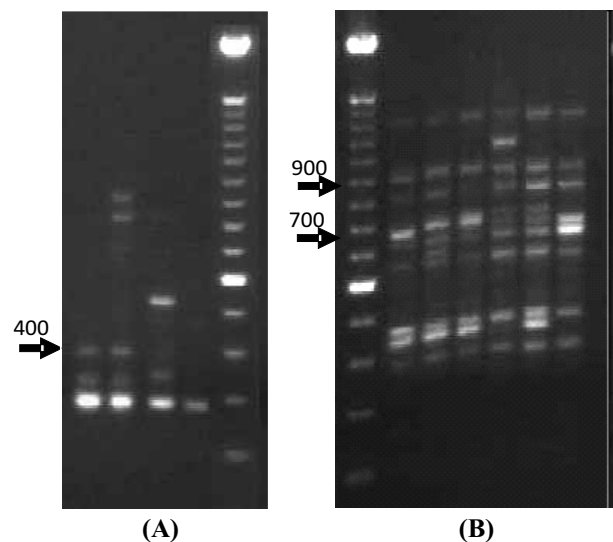
A. Seleksi Primer Tahap I

Kegiatan awal dari identifikasi penanda DNA adalah seleksi primer RAPD. Kriteria primer yang dapat digunakan untuk analisis RAPD adalah primer yang dapat menghasilkan pita-pita polimorfik, pita-pita yang dihasilkan jelas, reproduksibilitas baik, hasil amplifikasi pita DNA relatif stabil, dan mudah dibaca. Sekuens primer yang digunakan untuk PCR-RAPD sebaiknya juga mengandung 40% basa G+C (umumnya mengandung 50-80% G+C) dan tidak memiliki sekuens yang polindromik (Williams *et al.*, 1993).

Seleksi primer untuk memperoleh penanda spesies-spesifik dilakukan dengan melihat ada atau tidaknya pita spesifik yang muncul pada kedua jenis spesies *Aquilaria* sp tersebut.

Untuk tahap pertama ini, 180 primer RAPD, yang berasal dari 9 set primer merek PROLIGO (A, D, R, G, H, M, W, N dan U), diseleksi menggunakan 2-3 sampel per spesies. Dari hasil seleksi tahap I ini terlihat bahwa kedua spesies memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat. Hal ini dibuktikan dari sulitnya memperoleh pita pada penanda DNA yang spesifik pada dua spesies tersebut. Dari 180 primer yang diseleksi, hanya terdapat lima primer yang memberikan kenampakan pita yang spesifik, yaitu primer D-20, A-17, G-12, R-15, dan U-13. Gambar 1 memperlihatkan 2 primer yang sementara menghasilkan lokus yang membedakan kedua spesies. Primer R-15 (Gambar 1A) menghasilkan 1 lokus yang membedakan kedua spesies pada 400bp. Sedangkan primer U-13 (Gambar 1B) menghasilkan 2 losi yaitu pada

700bp dan 900bp. Untuk memastikan apakah losi tersebut bisa digunakan sebagai penanda spesies-spesifik untuk *A. malaccensis* dan *A. microcarpa*, dilakukan seleksi tahap II dengan menambah jumlah individu dari masing-masing spesies.



Gambar 1. Hasil seleksi tahap I primer R-15 (A) dan U-13 (B)

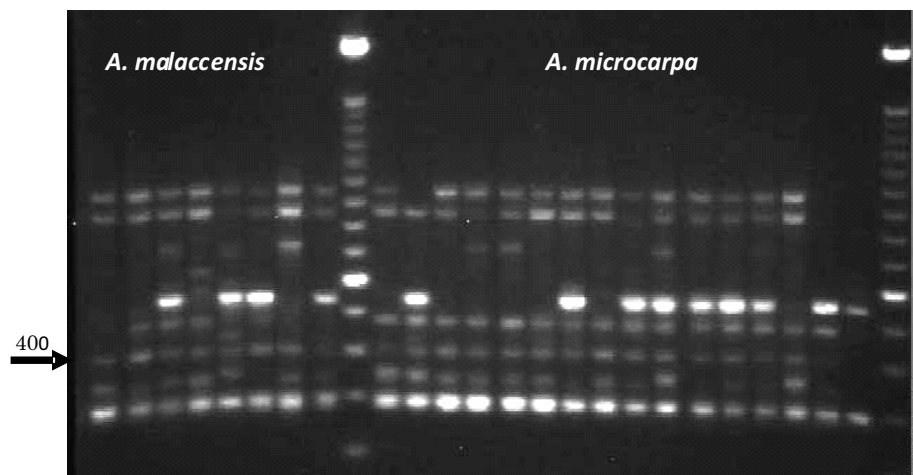
B. Seleksi Penanda Spesies-spesifik (Seleksi Tahap II)

Pada seleksi tahap I, telah terpilih 5 primer yang menghasilkan losi spesies-spesifik sementara untuk membedakan *A. malaccensis* dan *A. microcarpa*, yaitu D-20, A-17, G-12, R-15, dan U-13. Untuk membuktikan apakah losi tersebut memang dapat digunakan sebagai penanda spesies-spesifik, maka dilakukan seleksi tahap II dengan menambah jumlah sampel untuk masing-masing spesies (*A. malaccensis* 8 sampel dan *A. microcarpa* 16 sampel). Hasil amplifikasi seleksi tahap II dari kelima primer tersebut di atas menggunakan total 24 sampel adalah hanya 1 lokus yang memenuhi syarat sebagai penanda spesies-spesifik yaitu yang dihasilkan oleh primer U-13 pada *basepair* 700. (Gambar 3).

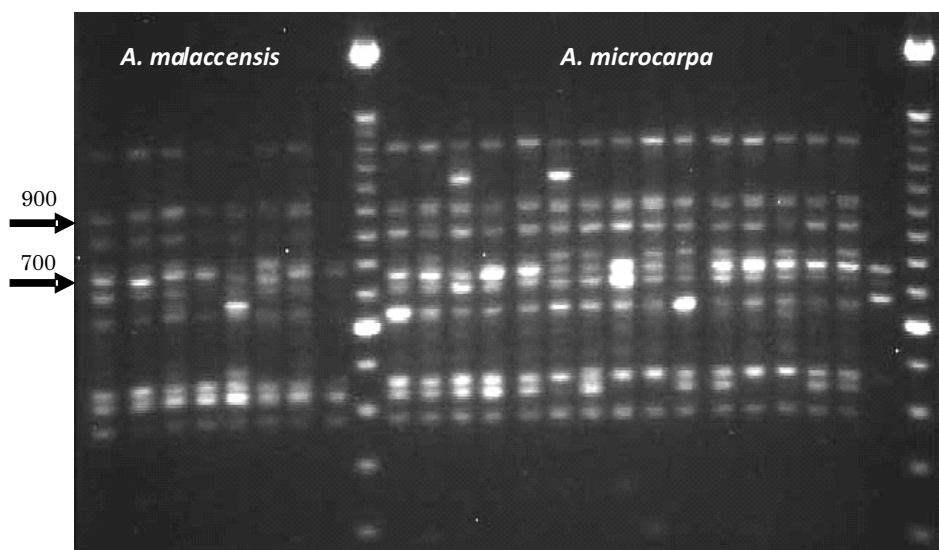
Lokus ini membedakan kedua *Aquilaria* spp dengan panjang *band* yang berbeda (sekitar 10-20 bp).

Losi yang dihasilkan oleh 5 primer RAPD pada seleksi tahap I, setelah penambahan sampel, hampir semuanya tidak memenuhi syarat sebagai penanda spesies-spesifik karena pita yang semula muncul pada seleksi tahap I, tidak muncul pada seleksi tahap II untuk individu dari jenis yang sama. Atau sebaliknya, yang semula tidak muncul menjadi muncul di beberapa individu

dari jenis yang sama. Sebagai contoh pada primer R-15 (Gambar 2), pada *A. malaccensis* yang seharusnya muncul semua, tidak muncul pada sampel no. 8, sedangkan pada *A. microcarpa* yang seharusnya tidak muncul, hanya sampel no. 15 dan 16 saja yang tidak muncul sedangkan yang lain muncul. Hal yang sama juga diperlihatkan untuk primer U-13 lokus 900 bp (Gambar 3). Terdapat 2 sampel yang tidak menghasilkan pita, yaitu *A. malaccensis* no. 8 dan *A. microcarpa* no. 16.



Gambar 2. Hasil amplifikasi tahap II primer R-15



Gambar 3. Hasil amplifikasi tahap II primer U-13

Fingerprint RAPD telah berhasil digunakan untuk identifikasi spesies dari tanaman, bakteri dan binatang (Welsh *et al.*, 1991; Akopyanz *et al.*, 1992; Bidochka *et al.*, 1994; Lee dan Chang, 1994; Sale *et al.*, 1996). Penelitian tersebut memperlihatkan bahwa penanda RAPD dapat digunakan untuk identifikasi spesies pada berbagai keperluan. Selain murah dan relatif mudah untuk mendapatkan penanda informatif, reaksi PCR yang cepat dengan hanya 1 program PCR dan hanya menggunakan 10 bp primer tunggal merupakan keuntungan dari penanda RAPD. Kegiatan penelitian yang dilakukan kali ini juga membuktikan kemampuan penanda DNA, khususnya RAPD, untuk membedakan 2 spesies yang memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat.

Dengan ditemukannya penanda spesies-spesifik untuk *A. malaccensis* dan *A. microcarpa*, selanjutnya penanda tersebut dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi *sequence characterized amplified region* (SCAR) yang mempunyai sensitifitas dan reproduktibilitas tinggi. Hal ini khususnya disebabkan karena penanda yang dihasilkan dalam penelitian ini (primer U-13 *basepair* 700) membedakan kedua *Aquilaria* spp berdasarkan panjang pita. Oleh karenanya, pengembangan lokus tersebut menjadi penanda SCAR juga akan lebih memudahkan dalam interpretasi pita. Seperti halnya dengan penanda spesies-spesifik pada RAPD, penanda SCAR yang bagus untuk identifikasi spesies harus muncul pada semua individu dari salah satu spesies dan tidak muncul pada semua individu dari spesies lainnya. Mengingat baru hanya 1 lokus yang ditemukan, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan penanda

spesies-spesifik lainnya menggunakan penanda DNA lainnya seperti *simple sequence repeat* (SSR).

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

1. Seleksi tahap pertama menggunakan sampel 2-3 individu per spesies memperoleh 5 primer yang menghasilkan losi yang membedakan *A. malaccensis* dan *A. microcarpa*, yaitu D-20, A-17, G-12, R-15, dan U-13.
2. Primer U-13 yang menghasilkan lokus pada 700 bp dapat digunakan sebagai penanda spesies-spesifik yang membedakan *A. malaccensis* dan *A. microcarpa*.
3. Diperlukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan penanda spesies-spesifik lainnya menggunakan penanda DNA lainnya seperti SSR.

DAFTAR PUSTAKA

- Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S. dan Berg, D. 1992. DNA diversity among clinical isolates of *helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucl. Acid. Res.* **20**:5137-5142.
- Bidochka, M.J., McDonald, M.A., Leger, R.J. dan Roberts, D.W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr Genet.* **25**:107-113.
- Chakrabarty, K., Kumar, A. and Menon, V. 1994. Trade in Agarwood. WWF-TRAFFIC, India

- Delozier V., Peltier D. dan Jalouzot R. (1999) Development of SCARs useful for species identification in the genus *Lolium*. *Agronomie* **19**:145-153.
- Ding, H. 1960. Thymelaeaceae. In: Van Steenis, C.G.G.J. (Ed.), *Flora Malesiana*. Series I. Vol. 6. Wolters-Noordhoff, Groningen, The Netherlands, pp. 1-15.
- Khasa, P. D. dan Dancik, B. P. 1996. Rapid identification of white-Engelmann spruce species by RAPD markers. *Theoretical Applied Genetics* **92**:46-52.
- Lee, J. C-I. dan Chang, J-G. 1994. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Science International* **67**:103-107
- Nkongolo, K.K. 1999. RAPD variations among pure and hybrid populations of *Picea mariana*, *P. rubens*, and *P. glauca* (Pinaceae), and cytogenetic stability of *Picea* hybrids: Identification of species-specific RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution* **215**:229-239.
- Sale, M.M., Potts, B.M., West, A.K. dan Reid, J.B. 1996. Molecular differentiation within and between *Eucalyptus risdonii*, *E. amygdalina* and their Hybrids using RAPD Markers. *Aust. J. Bot.* **44**:559-569.
- Samuel, R. 1999. Identification of hybrids between *Quercus petraea* and *Q. robur* (Fagaceae): Results obtained with RAPD markers confirm allozyme studies based on the Got-2 locus. *Plant Systematics and Evolution* **217**:137-146.
- Sanchez, N., Grau, J.M., Manzanera, J.A. dan Bueno, M.A. 1998. RAPD Markers for the Identification of *Populus* Species. *Silvae Genetica*, **47**:67-71.
- Scheepers, D., Eloy M.C. dan Briquet, M. 2000. Identification of larch species (*Larix decidua*, *Larix kaempferi* and *Larix eurolepis*) and estimation of hybrid fraction in seed lots by RAPD fingerprints. *Theoretical Applied Genetics* **100**:71-74.
- Shiraishi, S. dan Watanabe, A. 1995. Identification of chloroplast genome between *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. and *P. thunbergii* Parl. based on the polymorphism in *rbcL* gene. *J. Jpn. For. Soc.* **77**:429-436 (in Japanese with English summary).
- Soehartono, T dan Newton, A.C. 2000. Conservation and sustainable use of tropical trees in the genus *Aquilaria* I. Status and distribution in Indonesia. *Biological Conservation* **96**:83-94
- Sumarna, Y. 2002. *Budidaya Gaharu*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Welsh, J., Peterson, C. dan McClelland, M. 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucl. Acid. Res.* **19**:303-306.
- Widyatmoko, AYPBC. dan Shiraishi, S. 2001. Identification of *Acacia auriculiformis* and *A. mangium* using RAPD markers. *Bulletin of Kyushu Branch of the Japanese Forest Society* **54**:55-56.
- Widyatmoko, AYPBC. dan Shiraishi, S. 2003. Species-specific RAPD markers for

identification of *Acacia mangium* and *A. auriculiformis* and their hybrid. *Kyushu Journal of Forest Research*, **56**:66-68.

Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalsky, J.A. dan Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* **218**:704-740.