

PENGEMBANGAN MARKA MOLEKULAR UNTUK KARAKTERISASI VARIETAS ANGGREK TANAH UNGGUL (*SPATHOGLOTTIS*) HASIL POLIPLIODISASI DENGAN KOLKISIN

Agus Setiawan^{1)*}, Anahtadiya Nurfa Shochicha¹⁾, Abrory Agus Cahya Pramana¹⁾, Restiyanti¹⁾, Budi Setiadi Daryono¹⁾

¹⁾Program Studi Biologi, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada
*e-mail: agus.setiawan@mail.ugm.ac.id

Abstract

Characterization of *Spathoglottis* has not been observed yet especially in determination of genetic relationship and identification of colchicine-induced polyploid orchid. The aim of this research was to study about characterization of *fingerprinting* molecular mark in DNA *Barcode profiling* of Polyploid Anggrek Tanah (*Spathoglottis* sp.) and fenetic relationship of polyploid orchid with superior hybrid soil orchid (*Spathoglottis* sp.). The method of this research is collecting the orchid, germinating orchid seed, colchicine-induced PLB orchid, making simply buffer DNA isolation, genome DNA isolation, quantitative test of genome DNA, qualitative test of genome DNA, liquidity DNA genom, liquidity RAPD primer, PCR *Random Amplified Polimorphism DNA* (RAPD) of Orchid DNA, electrophoresis of PCR-RAPD, polymorphism RAPD , Dendogram RAPD analysis, dan creating Orchid DNA barcode. Based on the result known that RAPD molecular method could be used in detection of polyploid *Spathoglottis* sp. with OPAW11 primer. Electroforegram could be made as DNA *bar-coding* for *Spathoglottis* sp. that also could be used to to trace the origin orchids from Indonesia.

Keywords: *Spathoglottis*, RAPD, *bar-code* DNA, colchicine

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan megabiodiversitas anggrek karena dari 30.000 spesies anggrek alam di dunia, sebanyak 5.000 diantaranya berada di Indonesia (Irawati, 2002). Salah satunya adalah Anggrek Tanah (*Spathoglottis*) yang memiliki siklus pembungaan tiap bulan dan mudah perawatannya. Dalam produksi varietas anggrek unggul baru melalui teknik mutasi genetik yang menghasilkan peningkatan karakter fisik dan fenotip tertentu, seperti perubahan performa tumbuhan, warna bunga, peningkatan ukuran dan daya adaptasi. Teknik mutasi tanaman anggrek dapat menggunakan bahan kimia berupa kolkisin yang berfungsi sebagai antimikrotul (Zainudin, 2010).

Menurut Sulistianingsih *et al.* (2004) pemberian kolkisin pada tanaman anggrek dapat memicu poliploidisasi yang diikuti oleh peningkatan ukuran sel dan

jaringan tanaman termasuk bentuk dan warna. Poliploidisasi anggrek menunjukkan peningkatan karakter yang lebih diing tipe diploid (2n). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diketahui bahwa konsentrasi kolkisin dalam usaha poliploidisasi pada genus anggrek berbeda-beda. Perlakuan *Protocorm-like bodies* (PLB) anggrek *Phalaenopsis* pada kultur cair dengan penambahan 50 (ml/g) kolkisin dapat menginduksi poliploid sebesar 50% (Griesbach, 1981). Sedangkan dalam Sarathum *et al.* (2010) menyatakan bahwa konsentrasi kolkisin yang paling efektif pada anggrek *Dendrobium devonianum* (0,03%), *Vanda poepoe* 'Diana' (0,5-1,5%), *Dendrobium devonianuma* (0,03%), *Dendrobium offinale* (0,01%), *Phalaenopsis* sp. (0,005%), *Dendrobium scabrilingue* (0,075%). Setiawan (2012) menyatakan bahwa perendaman *Protocorm* dalam medium *New Phalaenopsis* cair dengan penambahan kolkisin 0,075% dengan lama perlakuan 7 hari dapat menginduksi

poliploidisasi anggrek *Spathoglottis plicata* secara optimal. Setiawan (2012) menemukan konsentrasi kolkisin optimal dalam poliploid anggrek *Spathoglottis plicata* Blume 1825 adalah 0,075% dengan lama perlakuan 7 hari.

Pengembangan marka molekular untuk karakterisasi varietas anggrek tanah unggul dapat dilakukan dengan perlakuan senyawa kolkisin. Proses karakterisasi genetik anggrek tanah unggul dapat dilakukan dengan metode DNA *fingerprinting*, yaitu: *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD) yang menghasilkan profil fenetik DNA anggrek. Profil DNA anggrek dapat digunakan dalam proses pemuliaan dan pencarian varietas unggul. Penelitian ini menggunakan DNA dari *Protocorm like-bode* (PLB) Anggrek Tanah unggul (*Spatholgotitis* sp.) hasil perlakuan kolkisin secara *in-vitro*, sehingga DNA terbebas dari senyawa kontaminan. Teknik RAPD membutuhkan tingkat kemurnian DNA yang tidak terlalu tinggi namun harus dihindarkan dari senyawa kontaminan seperti polisakarida dan metabolit sekunder. Khosravi *et al.* (2009) telah melakukan analisis RAPD terhadap beberapa varietas anggrek *Dendrobium Serdang beauty* yang telah diinduksi dengan menggunakan kolkisin dan menemukan primer yang sesuai, yaitu: OPU-7 (5'-CCTGCTCATC-3'), OPU-10 (5'-ACCTCGGCAC-3'), OPAW-11 (5'-CTGCCACGAC-3') dan OPU-14 (5'-TGGGTCCCTC-3').

Inovasi karakterisasi molekular berupa pembuatan profil *bar-code* DNA anggrek hasil poliploidisasi dapat meningkatkan nilai jual dari anggrek tersebut. Penelitian ini dapat menjadi dasar pengembangan varietas anggrek *Spathoglottis* dalam skala besar di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakterisasi marka molekular *fingerprinting* dalam pembuatan profil *bar-code* DNA pada varietas Anggrek Tanah unggul (*Spatholgotitis* sp.) hasil poliploidisasi dan mengetahui hubungan kekerabatan fenetik anggrek hasil poliploidisasi dengan varietas Anggrek Tanah unggul (*Spatholgotitis* sp.) hibrid.

2. METODE

1. Koleksi Buah Anggrek

Buah varietas anggrek *Spathoglottis* dikoleksi dari kebun Fakultas Biologi UGM meliputi buah *Spathoglottis plicata*, *S. plicata* var. pink, *S. kimballiana*, dan *Spathoglottis* hibrid, yaitu: *Spathoglottis* Sutra Ungu, *Spathoglottis* Bintang Segunung, *Spathoglottis* Kuning Layung, *Spathoglottis* Bintang IOCRI, dan *Spathoglottis* Kartika

2. Kultur Biji Anggrek pada Medium *New Phalaenopsis* (NP)

Buah anggrek dikultur secara *in-vitro* menggunakan medium *New Phalaenopsis* (NP) pada masing-masing cawan petri dan tiap buah ditabur pada 10 jenis petri untuk menghindari terjadinya kemungkinan kontaminasi medium kultur. Setelah 3 minggu, *Protocorm* sudah muncul dan dilakukan subkultur pada petri dengan jumlah 4 untuk perlakuan kolkisin.

3. Perlakuan Mutasi dengan Kolkisin

Penambahan kolkisin pada medium *New Phalaenopsis* (NP) anggrek yang telah mencapai fase *Protocorm-like bodies* (PLB) masing-masing 0.075% (gr/100 ml) selama 1 minggu kemudian dipindahkan kedalam medium tanpa kolkisin. Setelah 3 minggu, maka PLB siap untuk diekstraksi.

4. Isolasi DNA Genom Tanaman Anggrek

Isolasi DNA anggrek *Spathoglottis* dilakukan dengan mengambil 0,1 gram daun segar tanaman kemudian dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 mL lalu digerus menggunakan *pestle* kecil yang sebelumnya telah dicelupkan pada larutan nitrogen cair. Setelah sampel daun digerus, kemudian ditambahkan 600 μ L buffer isolasi DNA. *Tube* lalu diinkubasi pada *waterbath* suhu 68°C selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 500 μ L kloroform dingin, lalu *tube* *dishake* selama 1 jam dengan kecepatan 110 rpm. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. *Aqueous layer* selanjutnya dipindahkan ke dalam *tube* 1.5 mL baru lalu ditambahkan

isopropanol dengan peringan 1:1 dengan larutan *aqueous layer*. Tube diinverse sebanyak 6 kali lalu didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya tube disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibung kemudian pellet DNA dicuci dengan menggunakan ethanol 70% lalu di sentrifugasi kembali 10.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang, lalu pellet DNA dikeringanginkan pada *vacuum*. Setelah pellet DNA kering, kemudian ditambahkan larutan TE (0,1-10 M) sebanyak 50 µL. Sampel DNA kemudian di simpan pada suhu -20 °C.

5. Analisis *Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) anggrek *Spathoglottis**

PCR dilakukan menggunakan kit PCR *Go Taq Green*®. Pertama dilakukan pembuatan premix PCR sesuai dengan jumlah sampel yang akan di PCR namun jumlahnya dilebihkan 1 untuk meminimalisir habisnya premix. Komposisi premix untuk satu reaksi yaitu 12,5 µL kit PCR, 10 µL ddH₂O dan 2 µL primer. Kemudian ditambahkan sampel DNA genom yang akan di PCR. Konsentrasi DNA genom yang digunakan yaitu 50-75 ng/ µL. Sampel kemudian di *running* menggunakan alat PCR BOECO dengan suhu predenaturasi 95°C (5 menit), dan kemudian dilanjutkan dengan siklus yang diulang sebanyak 45 kali yaitu denaturasi 95 °C, *annealing* 38 °C, dan elongasi 72 °C. Siklus selanjutnya diakhiri dengan post-elongasi 72 °C (10 menit) lalu *holding* 4 °C selama 5 menit. Amplikon disimpan pada suhu 4 °C.

6. Deteksi Polimorpisme Profil *fingerprinting DNA Anggrek Spathoglottis*

Hasil PCR RAPD kemudian di lakukan analisis polimorfisme pita hasil elektroforesis. Data berupa pita-pita DNA diubah menjadi matriks 0-1, yaitu pita DNA yang muncul diubah menjadi matriks 0-1, yaitu yang muncul diberi nomor 1 sedangkan yang tidak muncul diberi nilai 0. Matriks dibuat dengan menggunakan program *Microsoft Excel* (.xls). Nama spesies diletakkan pada pada kolom pertama

lalu data diisi secara horizontal. Hasil skoring kemudian dimasukkan pada data kolom selanjutnya.

7. Analisis Data dan Pembuatan *bar-coding DNA Anggrek*

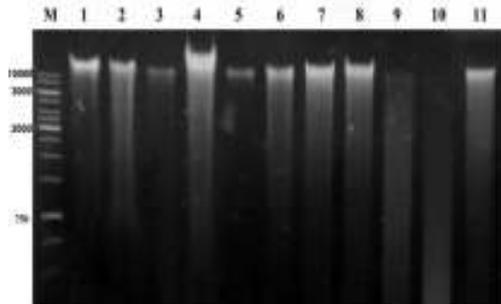
Pengamatan DNA hasil elektroforesis dapat diamati dengan menggunakan UV transluminator. DNA kemudian di beri skor berdasarkan jarak tempuhnya (bp) dan diberi skor yaitu 0 apabila tidak ada yang muncul dan 1 untuk kenampakan yang ada. Data biner dan yang didapat dianalisis dengan menggunakan MVSP versi 2.0. Modul SIMQUAL digunakan dalam menggeneralisirkan matriks similaritas Koefisien Jaccard (Jaccard, 1908). Ukuran similaritas dikonversi ke dalam jarak genetik menggunakan rumus $S_{ij} = a / (a + b + c) * 100\%$. Matriks jarak yang diperoleh digunakan analisis pengelompokkan. Hasil pengelompokan kemudian digunakan dalam menyusun dendogram dengan metode *unweighted pair-group method with arithmetic mean* (UPGMA).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA genom anggrek *Spathoglottis* dapat dilakukan dengan menggunakan buffer isolasi DNA sederhana menggunakan deterjen komersial. Penggunaan deterjen berfungsi sebagai pelarut lipid, melarutkan dan menstabilkan protein dan senyawa lain yang mengandung permukaan hidrofobik yang signifikan, pendenaturasi protein serta agen emulsi (Rickwood and Patel, 1995).

Uji kuantitatif DNA genom menggunakan metode elektroforesis untuk mengetahui ukuran panjang pasangan basa dan berat molekul dari DNA anggrek *Spathoglottis*. Berdasarkan elektroforesisi DNA anggrek diperoleh hasil elektroforegram seperti Gambar 1. Menurut Li dan Yang (1996) pita DNA pada elektroforegram yang baik adalah apabila pita DNA terlihat jelas dan mempunyai keseragaman ukuran panjang pasangan basa tanpa adanya *smear*. Kuantitas DNA anggrek ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV pada panjang

gelombang 260 nm dan 280 nm (Murray and Thompson, 1980).

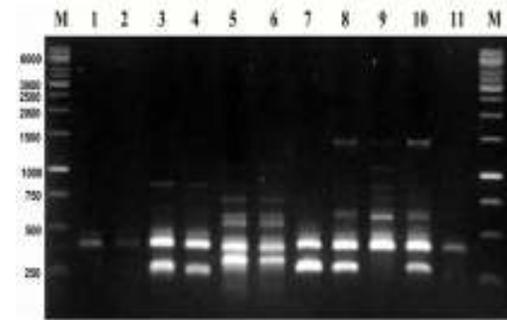


Gambar 1. Uji kuantitatif DNA genom anggrek *Spathoglottis*. M=marker, 1= *S. plicata*, 2=*S. plicata* poliploid, 3=*S. plicata* var. pink, 4=*S. plicata* var, pink poliploid, 5=*S. kimballiana*, 6=*S. kimballiana* poliploid, 7= *S. Sutra Ungu*, 8=*S. Bintang Segunung*, 9=*S. Kuning layung*, 10=*S. Bintang IOCRI*, dan 11=*S. Kartika*.

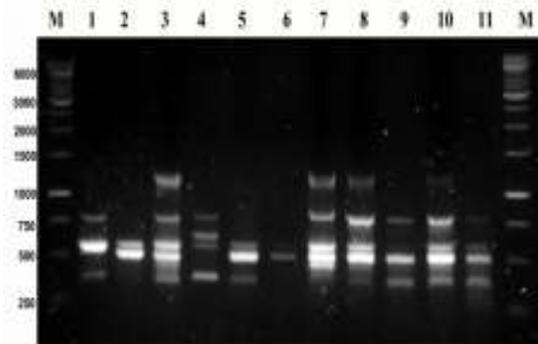
Metode *Random Amplified Polimorphic DNA* (RAPD) merupakan metode yang paling populer dalam penentuan marka molekular suatu karakter genetik makhluk hidup. Hal ini dikarenakan penanda RAPD merupakan penanda yang cukup efisien untuk identifikasi polimorfisme secara cepat dan akurat (Williams *et al.*, 1990). PCR-RAPD anggrek *Spathoglottis* menggunakan 4 primer random berdasarkan penelitian Khasravi *et al.*, (2009).

Amplikon PCR-RAPD dari 4 jenis primer dianalisis menggunakan elektroforesis sehingga diperoleh elektroforegram seperti pada Gambar 2-5. Analisis polimorfisme DNA anggrek *Spathoglottis* menggunakan *software* MVSP dengan cara menentukan polimorfisme pita-pita DNA yang teramplifikasi. *Scoring* DNA digunakan sebagai dasar dalam pembuatan dendogram dengan

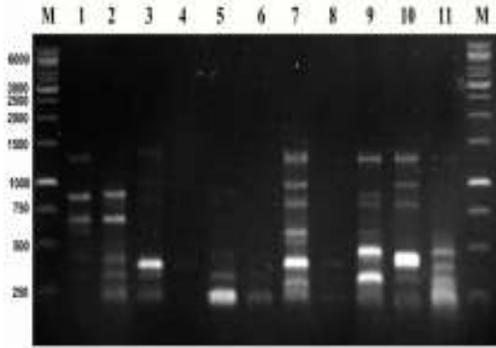
menggunakan analisis *Jaccard's coefficient*.



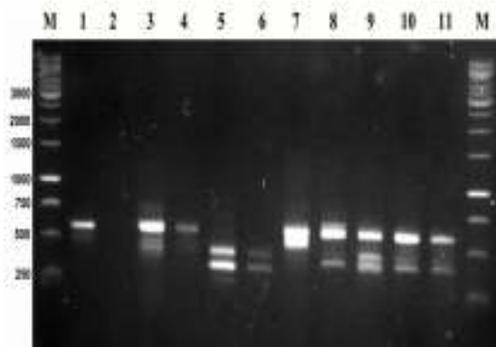
Gambar 2. Hasil elektroforesis 11 spesies anggrek *Spathoglottis* menggunakan primer OPU 7. M=marker, 1= *S. plicata*, 2=*S. plicata* poliploid, 3=*S. plicata* var. pink, 4=*S. plicata* var, pink poliploid, 5=*S. kimballiana*, 6=*S. kimballiana* poliploid, 7= *S. Sutra Ungu*, 8=*S. Bintang Segunung*, 9=*S. Kuning layung*, 10=*S. Bintang IOCRI*, dan 11=*S. Kartika*.



Gambar 3. Hasil elektroforesis 11 spesies anggrek *Spathoglottis* menggunakan primer OPU 10. M=marker, 1= *S. plicata*, 2=*S. plicata* poliploid, 3=*S. plicata* var. pink, 4=*S. plicata* var, pink poliploid, 5=*S. kimballiana*, 6=*S. kimballiana* poliploid, 7= *S. Sutra Ungu*, 8=*S. Bintang Segunung*, 9=*S. Kuning layung*, 10=*S. Bintang IOCRI*, dan 11=*S. Kartika*.



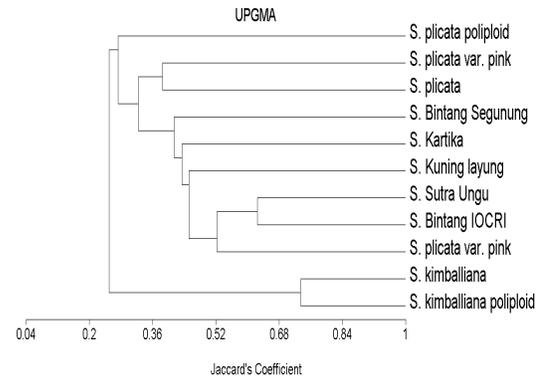
Gambar 4. Hasil elektroforesis 11 spesies anggrek *Spathoglottis* menggunakan primer OPAW 11. M=marker, 1=*S. plicata*, 2=*S. plicata* poliploid, 3=*S. plicata* var. pink, 4=*S. plicata* var, pink poliploid, 5=*S. kimballiana*, 6=*S. kimballiana* poliploid, 7=*S. Sutra Ungu*, 8=*S. Bintang Segunung*, 9=*S. Kuning layung*, 10=*S. Bintang IOCRI*, dan 11=*S. Kartika*.



Gambar 5. Hasil elektroforesis 11 spesies anggrek *Spathoglottis* menggunakan primer OPU 14. M=marker, 1=*S. plicata*, 2=*S. plicata* poliploid, 3=*S. plicata* var. pink, 4=*S. plicata* var, pink poliploid, 5=*S. kimballiana*, 6=*S. kimballiana* poliploid, 7=*S. Sutra Ungu*, 8=*S. Bintang Segunung*, 9=*S. Kuning layung*, 10=*S. Bintang IOCRI*, dan 11=*S. Kartika*.

Berdasarkan analisis *clustering* karakter pita-pita DNA elektroforegram RAPD dihasilkan dendogram (Gambar 6) dengan *range* koefisien similaritas 0.24-0.72. Karakterisasi didasarkan pada polimorfisme pita-pita DNA yang teramplifikasi dengan menggunakan 4 primer acak. Hasil analisis dendogram Anggrek Tanah (*S. plicata* var. Tarakan

control ($2n=2x=44$) diketahui bahwa Indeks Similaritasnya dengan *S. plicata* var. Tarakan poliploid mengelompok pada IS 0.23. Oleh karena dapat dipastikan bahwa anggrek ini telah mengalami mutasi yang menyebabkan terjadinya perubahan struktur sekuen DNA spesifik pada tiap-tiap primer yang digunakan. Menurut Setiawan (2012) anggrek yang diperlakukan dengan kolkisin melebihi konsentrasi optimum maka dapat menyebabkan auto multiplikasi kromosom secara tidak teratur. Kondisi ini dapat menyebabkan mutasi kromosom terutama delesi salah satu kromosom. Peristiwa ini ditandai dengan pertumbuhan *plantlet* yang abnormal, misalnya anggrek menjadi kerdil dan pertumbuhan daun yang tidak simetris dikarenakan gen homeobox daun mengalami mutasi. Berbeda halnya dengan anggrek *S. kimballiana* kontrol dan poliploid yang mengelompok pada $IS \geq 0,70$. Hal ini dikarenakan konsentrasi kolkisin yang digunakan belum optimal untuk melakukan mutasi pada tanaman. Sedangkan jenis anggrek *Spathoglottis* hybrid maupun yang telah dipoliploid mengelompok ≤ 0.70 . Menurut Pamungkas (2011) apabila terdapat spesies yang mengelompok ≥ 0.70 maka dinyatakan sebagai satu jenis spesies yang sama namun spesies yang mengelompok ≤ 0.70 dinyatakan sebagai spesies yang berbeda. Oleh karenanya, anggrek *Spathoglottis plicata* var. pink poliploid dan *S. plicata* var. Tarakan poliploid dinyatakan sebagai varietas baru apabila diingkan dengan kontrolnya.



Gambar 6. Dendogram similaritas 11 spesies anggrek *Spathoglottis* berdasarkan karakter molekular dengan metode UPGMA.

Berdasarkan dendrogram similaritas (Gambar 6) diketahui bahwa terdapat perbedaan antara anggrek yang telah diberi perlakuan kolkisin dengan kontrol. Perbedaan tersebut terlihat jelas pada pengelompokan IS spesies pada taraf >70%, namun pada spesies *Spathoglottis kimbaliiana* kontrol dengan *S. kimbaliiana* poliploid menunjukkan bahwa keduanya masih tidak berbeda jauh secara fenetik.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa metode molekular RAPD dapat digunakan dalam deteksi Anggrek *Spathoglottis plicata* var. Tarakan poliploid menggunakan Primer OPAW11. Elektroforegram ampikon PCR RAPD OPAW 11 dapat digunakan sebagai *bar-coding* DNA Anggrek *Spathoglottis plicata* var. Tarakan poliploid yang dapat digunakan untuk melacak Anggrek Asli Indonesia. Hasil analisis dendrogram menunjukkan bahwa anggrek *Spathoglottis* poliploid dapat mengelempok sendiri dan secara fenetik berbeda spesies dengan anggrek kontrol.

5. REFERENSI

- Griesbach, R. J. 1981. Colchicine-induced polyploidy in phalaenopsis orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1 (1):103-107.
- Irawati. 2002. *Pelestarian jenis anggrek di Indonesia*. Prosiding Seminar Anggrek Nasional, Yogyakarta.
- Khosravi A.R, M.A. Kadir, S.B Kadzemin, F.Q. Zaman, and D.A.E. de Silva. 2009. RAPD analysis of colchisin induced variation of the *Dendrobium Serdang Beauty*. *African Journal of Biotechnology* 8 (8):1455-1465.
- Li Y.Y. and B. Yang. 1996. *Practical protocols in molecular biology*. Edited by Yongming Li and Yuqi Zhao, Science Press. New York
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res.* 8(19):4321-5.
- Pamungkas R.P.2011. *Variasi genetik dan hubungan kekerabatan fenetik tanaman durian (Durio zibethinus Murr.) di Jawa berdasarkan karakter molekular*. Tesis. Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Rickwood, D. and D. Patel. 1995. *Cell and molecular biology essential data*. John Wiley and Sons. New York.
- Sarathum, S., M. Hegele, S. Tantiviwat, and M. Nanakorn. 2010. Effect of Concentration and Duration of Colchicine Treatment on Polyploidy Induction in *Dendrobium scabrilingue* L. *Europ.J.Hort.Sci.* 75(3):123-127.
- Setiawan, A. 2012. *Peningkatan kualitas anggrek Tanah (Spathoglottis plicata Blum 1825) dengan teknik poliploid in-vitro*. Laporan Seminar. Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Sulistianingsih, R., Z.A. Suyanto, dan N. Anggia. 2004. Peningkatan Kualitas Anggrek *Dendrobium* Hibrida dengan Pemberian Kolkhisin. *Ilmu Pertanian* 11 (1):13-2.
- Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Ravalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by Arbitrary Primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18(22): 6531-6535
- Zainudin A. 2010. *Optimasi Proses PCR-RAPD Anggrek Phalaenopsis sp. yang telah Diperlakukan dengan Colchicine*. Malang: Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Malang.