

KERAGAMAN GENETIK EMPAT POPULASI *Intsia bijuga*
BERDASARKAN PENANDA RAPD DAN IMPLIKASINYA BAGI
PROGRAM KONSERVASI GENETIK

*Genetic Diversity of Four Populations of Intsia bijuga Revealed by RAPD Markers and Its
Implications for The Genetic Conservation Programme*

Anto Rimbawanto dan AYPBC Widyatmoko
Pusat Litbang Rutan Tanaman

ABSTRACT

Intsia bijuga (local name merbau) is a high value timber and has been under intensive utilization. The aim of this study is to investigate genetic variation of four populations to provide information for arranging genetic conservation strategy of the species. Leaves of wildling from four populations were collected and analyzed using 15 RAPD primers which produced 77 polymorphic loci. The average polymorphic locus for each primer was 5.1. The average genetic diversity within population was 0.296, while between populations was 0.141. Cluster analyses based on population data revealed that the four populations were divided into two groups. The first group consisted of Carita and Manokwari, while Ternate and Nabire formed another group. Clustering of Manokwari and Nabire into different group support the separation of Papua into 6 geogenetic regions.

Key words: Genetic diversity, Intsia bijuga, RAPD

ABSTRAK

Intsia bijuga atau merbau merupakan jenis kayu bemilai ekonomi tinggi dan telah mengalami eksploitasi yang intensif. Penelitian ini bertujuan mempelajari keragaman genetik populasi merbau guna membantu penyusunan strategi konservasi genetik, dengan menggunakan penanda RAPD. Sampel daun dikumpulkan dari 4 populasi dan dianalisa menggunakan 15 primer RAPD yang menghasilkan 77 lokus polimorfik. Rata-rata lokus polimorfik per primer adalah 5.1. Nilai keragaman genetik rerata dalam populasi sebesar 0,296 sedangkan keragaman antara populasi 0.141. Analisis klaster membagi keempat populasi menjadi dua kelompok populasi yaitu Carita dan Manokwari pada kelompok pertama, sedangkan kelompok kedua terdiri dari populasi Ternate dan Nabire. Pembagian kelompok antara Manokwari dan Nabire lebih memperjelas pembagian Papua menjadi 6 wilayah geogenetik.

Kata Kunci: *Intsia bijuga*, keragaman genetik, RAPD

I. PENDAHULUAN

Keragaman genetik diperlukan untuk mengetahui besarnya variasi genetik yang ada. Besarnya keragaman genetik mencerminkan sumber genetik yang diperlukan untuk adaptasi ekologi dalam jangka pendek dan evolusi dalam jangka panjang (Lande and Shannon, 1996). Suatu jenis tanaman seharusnya mempunyai dasar keragaman genetik yang cukup untuk dapat beradaptasi dengan perubahan lingkungan.

Penanda molekuler adalah alat yang sangat efektif untuk analisis keragaman genetik tanaman. Salah satu penanda yang banyak digunakan adalah *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). RAPD adalah penanda berbasis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan menggunakan 10-mer primer random.

I. bijuga (merbau) merupakan salah satu jenis tanaman yang sudah sangat dikenal dalam perdagangan kayu di Indonesia maupun dunia. Di Indonesia jenis ini secara alami tersebar cukup luas mulai dari Sumatera sampai Papua. Akibat penebangan yang mengabaikan azas kelestarian saat ini populasinya hanya tersisa di Papua dan sebagian Maluku, dan itupun terus menurun kondisinya dari waktu ke waktu. Menurut hasil monitoring UNEP-WCMC status konservasi merbau khususnya *I. bijuga* sudah termasuk kategori Vulnerable A 1 cd (VUA1cd). Di sisi lain upaya konservasi sebagai langkah penyelamatan merbau dari kelangkaan bahkan kepunahan baik secara *in situ* maupun *ex situ* sampai saat ini belum dilaksanakan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik populasi *I. bijuga* dalam rangka menyediakan informasi genetik guna penyusunan strategi konservasi jenis ini.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan Penelitian

Bahan penelitian berupa sampel daun dari cabutan di bawah pohon induk merbau yang berasal dari empat populasi, yaitu Kebun Percobaan Carita (Banten), Temate (Maluku), Manokwari dan Nabire. Dari masing-masing pohon induk hanya diwakili oleh satu cabutan, di mana jarak antar pohon induk minimal 100 meter untuk populasi alam. Masing-masing populasi diwakili oleh 24 sampel.

B. Metode Penelitian

1. Ekstraksi DNA dan Prosedur RAPD

Untuk memperoleh total DNA dari setiap sampel, daun dari masing-masing individu diekstraksi dengan metode CTAB (Murray and Thompson, 1980) yang telah dimodifikasi (Shiraishi and Watanabe, 1995). Daun seberat 40 mg - 60 mg dihancurkan dalam larutan ekstraksi dengan menggunakan mesin penghancur MiniBead Beater-8 (BioSpec) selama 5 menit dan diinkubasi selama 1 jam dalam suhu 65°C. Hasil ekstraksi dimurnikan (dipurifikasi) menggunakan GeneClean III Kit (Q-biogene). Konsentrasi DNA dikuantifikasi menggunakan GeneQuant (Pharmacia), selanjutnya dilarutkan menjadi 2,5 ng/ μ l untuk reaksi PCR.

Reaksi PCR dilakukan dengan total volume 10 μ l volume yang mengandung 1x Buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.3), 10 mM KCl, 3.0 mM MgCl₂), 200 μ M tiap dNTP, 0.25 μ M primer, 0.5 units/10 μ l AmpliTaq DNA polymerase, Stoffel Fragment (Applied Biosystems), 10 ng larutan DNA. Proses PCR diawali dengan denaturasi selama 60 detik pada suhu 94°C, diikuti dengan 45 siklus yang masing-masing terdiri dari denaturasi selama 30 detik pada suhu 94°C, *annealing* (penempelan primer) selama 30 detik pada suhu 37°C, dan *extension* (pemanjangan) selama 90 detik pada suhu 72°C. Proses PCR

diakhiri dengan pemanjangan selama 7 menit pada suhu 72°C. Keseluruhan proses tersebut menggunakan thermocycler GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada 1.0% gel agarose, 20 X TBE Buffer dan 0.5% Ethidium Bromide selama ± 2 jam pada 120 V. Hasil elektroforesis difoto menggunakan *Fotodyne Image Analyzer*. Jumlah primer RAPD yang digunakan dalam studi ini adalah 15 primer. Nama primer yang digunakan beserta susunan basanya disajikan pada Tabel 1.

2. Analisis Data

Jarak genetik dihitung berdasarkan pengukuran Nei's (Nei, 1978) dengan mempergunakan bantuan program komputer POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). Dendrogram menggunakan metode UPGMA dibuat menggunakan data jarak genetik tersebut untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar individu dan antar populasi.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Keragaman Genetik

Analisis RAPD menggunakan 15 primer terhadap keempat populasi menghasilkan 77 loci polimorfik. Panjang lokus polimorfik berkisar antara 300 bp - 1100 bp. Jumlah lokus yang dihasilkan oleh masing-masing primer berkisar antara dua sampai delapan dengan rata-rata 5,1 loci per primer yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Daftar primer yang digunakan beserta susunan basanya dan jumlah pita polimorfik yang dihasilkan.

No.	Primer	Sekuens (5' - 3')	Jumlah pita polimorfik
1	OPD-01	ACCGCGAAGG	2
2	OPD-03	GTCGCCATCA	7
3	OPD-20	ACCCGGTCAC	7
4	OPH-06	ACGCATCGCA	3
5	OPO-20	ACACACGCTG	4
6	OPQ-06	GAGCGCCTTG	5
7	OPQ-07	CCCCGATGGT	6
8	OPQ-15	GGGTAACGTG	6
9	OPU-11	AGACCCAGAG	8
10	OPV-14	AGATGGGGCC	4
11	OPW-11	CTGATGCGTG	7
12	OPY-06	AAGGCTCACC	6
13	OPY-07	AGAGCCGTCA	4
14	OPY-11	AGACGATGGG	4
15	OPY-14	AGTCGCCCTT	4
Total			77

Nilai keragaman genetik berdasarkan analisis keragaman genetik Nei (1972; 1973) menunjukkan bahwa populasi Carita mempunyai keragaman tertinggi yaitu 0,317 disusul oleh populasi Manokwari (0,315). Populasi Temate mempunyai keragaman genetik yang terkecil (0,257). Rata-rata keragaman genetik di dalam populasi adalah 0,296 yang disajikan pada Tabel 2.

Besarnya nilai rata-rata jarak genetik antar populasi adalah 0,141. Dengan kata lain, sekitar 86% dari keragaman genetik berada di dalam populasi. Hubungan terdekat diperlihatkan antara populasi

Ternate dan Nabire, disusul oleh jarak genetik antara Carita dan Manokwari, sedangkan jarak genetik yang terjauh adalah antara populasi Carita dan Ternate.

Tabel 2. Nilai keragaman genetik dalam populasi (diagonal) dan antar populasi (bawah diagonal) Merbau berdasarkan *Nei's Gene Diversity* (1973) dan *Nei's Original Measures of Genetic Distance* (1972)

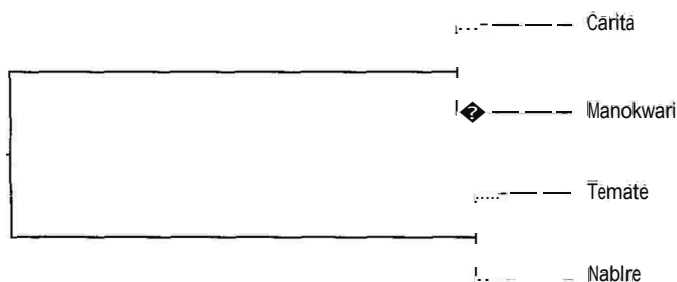
Populasi	Carita	Manokwari	Ternate	Nabire
Carita	0,317			
Manokwari	0,039	0,315		
Ternate	0,216	0,212	0,257	
Nabire	0,176	0,168	0,032	0,294

Rata-rata keragaman genetik dari empat populasi adalah 0,296. Angka ini lebih besar dari pada rata-rata keragaman genetik baik untuk kelompok jenis tropis maupun jenis konifer, yaitu 0,211 dan 0,207 (Hamrick, 1989). Keragaman genetik *I. bijuga* ini sedikit lebih besar daripada *I. palembanica* yang dilaporkan oleh Lee *et al.* (2002) yaitu sebesar 0,242. Besarnya keragaman genetik ini, seperti yang dilaporkan untuk *I. palembanica* (Lee *et al.*, 2002), disebabkan oleh sejarah terbentuknya jenis ini dan proses ekologiannya, umur yang panjang, sebaran yang luas dan sistem perkawinan campur. Walaupun kegiatan eksploitasi sudah banyak dilakukan pada jenis ini, tetapi keragaman genetik dari keempat populasi ini masih dapat dikatakan cukup tinggi. Hal ini disebabkan karena pada keempat populasi ini penebangan belum banyak dilakukan. Kebun Percobaan Carita misalnya merupakan kebun koleksi.

Rata-rata jarak genetik antar populasi dari keempat populasi adalah 0,141 jauh lebih besar daripada *I. palembanica* 0,04 (Lee *et al.*, 2002) dan *Shorea leprosula* 0,04 (Rimbawanto dan Suharyanto, 2005), tetapi lebih kecil daripada ulin 0,182 (Purnamila Sulistyowati *et al.*, 2005) dan *Araucaria cunninghamii* 0,194 (Widyatmoko *et al.*, 2005). Besarnya nilai jarak genetik antar populasi disebabkan karena biji jenis ini cukup berat sehingga hanya jatuh dan tumbuh di sekitar pohon induknya. Di sisi lain, diduga berpindahnya biji yang disebabkan oleh air atau binatang tidak terjadi. Dugaan lainnya adalah luasan populasi *I. bijuga* cukup besar, sehingga perpindahan serbuk sari maupun biji sebagian besar hanya terjadi di dalam area populasi tersebut.

B. Hubungan Kekkerabatan Antar Populasi

Berdasarkan jarak genetik Nei (1972) disusun dendrogram menggunakan metode UPGMA untuk mengklarifikasi hubungan antar populasi. Hasil dendrogram yang disajikan pada Gambar 1 menunjukkan hubungan kekerabatan antara empat populasi yang dianalisis. Keempat populasi terbagi menjadi 2 kelompok, yaitu Carita dan Manokwari pada kelompok pertama, sedangkan kelompok kedua terdiri dari Ternate dan Nabire.



Gambar 1. Dendrogram hubungan kekerabatan antara 4 populasi Merbau berdasarkan jarak genetik Nei's (1972)

Sepintas pengelompokan yang terjadi seperti tidak berhubungan dengan posisi geografisnya, karena populasi Ternate yang jauh lebih dekat dengan populasi Nabire dibandingkan dengan populasi Manokwari, meskipun secara geografis lebih dekat ke Manokwari, tetapi apabila dilihat dari 2 kelompok yang terbentuk serta jarak genetik antar populasi dalam satu kelompok, pengelompokan yang terjadi terkait dengan pembagian Papua menjadi 6 wilayah berdasarkan pertimbangan geogenetik (Widyatmoko *et al.*, 2005), di mana Manokwari dan Nabire berada pada wilayah yang berbeda.

Populasi Carita mempunyai hubungan kekerabatan yang sangat dekat dengan populasi Manokwari karena kemungkinan materi untuk membangun Kebun Percobaan Carita berasal dari Manokwari, tetapi karena ada seleksi individu dalam pengambilan materi genetik maka keragaman genetik Carita sedikit lebih besar dibandingkan dengan Manokwari. Kedekatan hubungan yang sama juga diperlihatkan antara populasi Ternate dan Nabire. Hal ini diduga karena materi genetik di Ternate dahulu dibawa dari Nabire.

Pemahaman tentang keragaman genetik dan hubungan kekerabatan sangat diperlukan baik untuk kegiatan konservasi genetik maupun pemuliaan pohon. Untuk konservasi *ex-situ*, informasi ini sangat diperlukan untuk menentukan jumlah populasi maupun individu di dalam populasi yang perlu dikoleksi, sehingga dapat tetap mempertahankan dasar keragaman genetik yang dimiliki, sedangkan untuk konservasi *in-situ*, informasi ini diperlukan untuk menentukan jumlah lokasi yang harus ditentukan beserta luasan serta jumlah individu di dalamnya.

Dari kegiatan penelitian ini diperoleh keragaman genetik *I. bijuga* sebesar 0,296. Angka ini lebih besar daripada rata-rata keragaman genetik jenis tropis dan konifer. Hal ini menunjukkan bahwa keragaman genetik yang ada di alam masih cukup besar, khususnya untuk mendukung kegiatan pemuliaan. Untuk kegiatan eksplorasi, baik untuk kegiatan pemuliaan maupun konservasi *ex-situ*, berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, untuk satu wilayah perlu dikoleksi jumlah individu yang cukup banyak dalam satu populasi dengan jumlah populasi yang sedikit. Dengan adanya kecenderungan pengelompokan wilayah yang jelas, khususnya di wilayah Papua, maka dari masing-masing wilayah sebaran *I. bijuga* di Papua perlu dilakukan koleksi materi seperti di atas. Mengingat jumlah populasi yang digunakan pada penelitian ini masih sedikit (khususnya dari Papua), maka untuk melengkapi informasi keragaman genetik populasi *I. bijuga* perlu digunakan materi dari populasi yang lain pada sebaran alamnya.

IV. KESIMPULAN

1. Rata-rata keragaman genetik di dalam populasi dari 4 populasi *Intsia bijuga* yang digunakan adalah $0,296 \pm 0,028$.
2. Rata-rata jarak genetik antar populasi adalah sebesar $0,141 \pm 0,084$ yang berarti bahwa 86% keragaman genetik berada di dalam populasi, sedangkan sisanya 14% berada di antara populasi. Analisis kluster dengan metode UPGMA, membagi empat populasi ke dalam dua kelompok. Kelompok pertama terdiri dari Kebun Percobaan Carita dan Manokwari, sedangkan kelompok yang ke dua terdiri dari Ternate dan Nabire.
4. Untuk tetap menjaga besarnya keragaman genetik dan agar dapat mencakup distribusinya, kegiatan eksplorasi perlu dilakukan di seluruh wilayah sebaran alam *I. bijuga*, khususnya untuk wilayah Papua.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada teknisi Wahyunisari dan Y. Triyanta yang telah membantu pengambilan sampel di lapangan dan pekerjaan laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Hamrick, J. L. 1989. Isozyme and the analysis of genetic structure in plant population. *In Isozyme in Plant Biology*. Soltis, D. E. and P. S. Soltis (ed.). Dioscorides Press, Oregon, pp 87-105.
- Lande, R. C. and Shannon, S. 1996. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution* 50:434-437.
- Lee, S-L., Kevin, K.-S., and Saw, L-G 2002. Population genetic of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of virgin jungle reserves in Peninsular Malaysia. *Am. J. Bot.* 89:447-459.
- Murray, M.G and Thompson, W.F. 1980. Rapid of molecular weight plant DNA. *Nuc. Acids. Res.* 8. (19): 4321-4325.
- NeiM. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Purnamila, S., Widyatmoko, A.Y.P.B.C. dan Rimbawanto, A. 2005. Keragaman genetik empat populasi *Eusideroxylon zwageri* asal Kalimantan berdasarkan penanda RAPD. Prosiding Seminar Nasional Peningkatan Produktivitas Hutan-Peran Konservasi Sumber Daya Genetik, Pemuliaan dan Silviculture dalam Mendukung Rehabilitasi Hutan, E. B. Hardiyanto (ed.). Fakultas Kehutanan UGM dan ITTO. pp. 383-395.
- Rimbawanto, A. dan Suharyanto. 2005. Keragaman genetik populasi *Shorea leprosula* Miq. dan implifikasinya untuk program konservasi genetik. Prosiding Seminar Nasional Peningkatan Produktivitas Hutan-Peran Konservasi Sumber Daya Genetik, Pemuliaan dan Silviculture dalam Mendukung Rehabilitasi Hutan, E. B. Hardiyanto (ed.). Fakultas Kehutanan UGM dan ITTO. Yogyakarta. pp. 373-382.
- Shiraishi, S and Watanabe, A. 1995. Identification of hloroplast genome between *Pinus densiflora* SIEB et ZUCC and *P. thunbergii* PARL. based on the polymorphisms in *rbcL* gene. *J. Jpn. For. Soc.* 77:429-436.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research* 18:7213-7218.
- Widyatmoko, AYPBC., Rimbawanto, A. dan Suharyanto. 2005. Keragaman genetik *Araucaria cunninghamii* menggunakan penanda RAPD. Prosiding Seminar Nasional Peningkatan Produktivitas Hutan-Peran Konservasi Sumber Daya Genetik, Pemuliaan dan Silviculture dalam Mendukung Rehabilitasi Hutan, E. B. Hardiyanto (ed.). Fakultas Kehutanan UGM dan ITTO. Yogyakarta pp. 397-408.
- Williams, J. G. K., Kubelic, A.R., Livak, J. K., Ravalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic marker. *Nuc. Acid. Res.* (18): 6531-6539p.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H. and Mao, J.X. 1999. *POPGENE 1.32* The User Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton.