

Analisis Pengelompokan dan Hubungan Kekerbatan Spesies Anggrek *Phalaenopsis* Berdasarkan Kunci Determinasi Fenotipik dan Marka Molekuler RAPD

Dwiatmini, K.¹⁾, N. A. Mattjik²⁾, H. Aswidinnoor²⁾, dan N.L. Toruan-Matius³⁾

1) Balai Penelitian Tanaman Hias Jl. Raya Ciherang- Pacet, Cianjur 43253

2) Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

3) Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan Bogor

Hubungan kekerabatan antara 19 anggrek *phalaenopsis* dianalisis menggunakan *random amplified polymorphic DNA* pada tingkat molekuler dan secara fenotipik menggunakan kunci determinasi dari Sweet. Dendrogram kekerabatan anggrek *phalaenopsis* tersebut diperoleh dari 300 pola pita DNA dan 27 karakter fenotipik. Hubungan kekerabatan secara genetik dianalisis menggunakan koefisien kemiripan Dice dan jarak genetik secara fenotipik menggunakan koefisien Dist. Korelasi antara keduanya dianalisis menggunakan statistik Mantel dengan prosedur MXCOMP pada program NTSYS. Hasil penelitian menunjukkan hubungan kekerabatan berdasarkan koefisien kemiripan Dice adalah 0,24-0,66 (jarak genetik antara 0,34-0,76), sedangkan jarak taksonomi berdasarkan koefisien Dist adalah 1,42-0,08. Nilai korelasi antara matriks kemiripan dan matriks jarak adalah kecil yaitu -0,38, dengan nilai koefisien determinasi $R^2 = 0,15$. Nilai koefisien determinasi yang kecil menunjukkan bahwa hanya 15% data morfologi dapat digunakan untuk mengestimasi kemiripan genetiknya. Hasil analisis komponen utama menunjukkan terdapat 231 pita yang berperan dalam pengelompokan secara terpisah 19 spesies anggrek *phalaenopsis*, namun tidak dapat mengidentifikasi pita spesifik untuk karakter atau genotip tertentu.

Kata kunci : Kunci determinasi; Kekerbatan genetic; *Phalaenopsis*; Penanda molekuler RAPD; Analisis pengelompokan.

ABSTRACT. Dwiatmini, K., N.A. Mattjik, H. Aswidinnoor, and N.L. Toruan-Matius. 2003. **Cluster phenotypic and genetic relationship analysis of phalaenopsis orchids based on determination key and RAPD's molecular marker.** Genetic relationships among 19 genotypes of *phalaenopsis* orchid were investigated using random amplified polymorphic DNA technique at the DNA level and using the determination key introduced by Sweet at the phenotypical level. Orchid dendrogram was obtained from banding patterns of DNA and from 27 phenotypic traits scored, using Dice similarity and average taxonomic distances respectively. Correlation between a pair of proximity matrices was tested with the Mantel statistic generated by the MXCOMP procedure in NTSYS-pc software. The results showed that constant similarity coefficient and relative order were obtained with 16 primers (300 DNA bands). Genetic relationships among 19 species of *phalaenopsis* orchids based on Dice similarity coefficient varied from 0.24 – 0.66 (genetic distance 0.34 – 0.76). Cluster analysis based on the determination key indicated that the genetic distance (Dist coefficient) varied from 1.42 – 0.08. Grouping of *phalaenopsis* species using RAPD technique was different from the one using phenotypic characters as used by Sweet with correlation value -0.38 and coefficient determination value 0.15. A small correlation coefficient indicated that the relationship between variables is weak, meaning that average taxonomic distance could not be used to estimate the genetic similarity. The principal component analysis showed the relative position of 19 genotypes of *phalaenopsis* in two and three dimensions (principal component). The same procedure also identified the most important DNA bands (231 bands) having very important roles in the grouping, but failed to identify any specific band for any particular character or genotype.

Keywords : Determination key; Genetic relationship; *Phalaenopsis*; RAPD's molecular marker; Cluster analysis.

Bunga anggrek bulan (salah satu jenis dari marga *phalaenopsis*) adalah puspa pesona bangsa Indonesia. Di Indonesia terdapat sekitar 26 spesies *phalaenopsis* yang endemik dari 70 spesies yang telah dilaporkan.

Tanaman anggrek merupakan jenis tanaman yang mempunyai keragaman fenotipik yang sangat besar. Anggrek juga tanaman yang dapat disilangkan secara intergenerik, sehingga konsep spesies secara biologi pada anggrek menjadi rancu. Hal ini menyebabkan sering terjadinya pergeseran pengelompokan dan perubahan nama

pada suatu jenis anggrek. Sebagai contoh *Phalaenopsis serpentilingua* (masuk genus *phalaenopsis*) namanya diganti menjadi *Paraphalaenopsis serpentilingua*, termasuk genus *paraphalaenopsis* (Hawkes 1970). Pemindehan dalam genus tersebut didasarkan bentuk daunnya yang berbeda (Hawkes 1970) dan secara genetik *phalaenopsis* tidak kompatibel dengan *paraphalaenopsis* (Yam 1994).

Karakterisasi yang didasarkan pada penanda morfologi biasanya dipengaruhi lingkungan

makro dan mikro, serta umur tanaman. Karakterisasi morfologi perlu didukung oleh karakterisasi menggunakan penanda molekuler. Penanda molekuler dapat memberi gambaran hubungan kekerabatan yang lebih akurat, karena analisis deoxyribo nucleid acid (DNA) sebagai material genetik tidak dipengaruhi kondisi lingkungan. Oleh sebab itu perlu dilakukan penataan pengelompokan spesies-spesies phalaenopsis dengan menggunakan teknik molekuler untuk menghindari kelemahan sistem klasifikasi yang didasarkan karakter morfologi tanaman. Salah satu teknik molekuler yang telah banyak digunakan adalah *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) (Chen *et al.* 1998, Obara-Okeyo & Kako 1998, Fu *et al.* 1997, Kardin *et al.* 1999, Kartikaningrum 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk mengelompokkan spesies-spesies phalaenopsis berdasarkan penanda morfologi, mengetahui hubungan kekerabatan berdasarkan analisis pola pita DNA dan mengetahui keselarasan antarkeduanya. Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah nilai korelasi antara penanda morfologi berdasarkan kunci determinasi dan penanda molekuler berdasarkan RAPD adalah kecil. Hal tersebut diduga disebabkan keragaman pengaruh lingkungan (fenotipik) lebih besar dari genotipiknya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi, Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan (UPBP), Bogor dari September 2001-April 2002. Sedangkan pengumpulan data fenotipik dilakukan berdasarkan data sekunder yang tertera dalam kunci determinasi Sweet (1980).

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah 19 spesies anggrek phalaenopsis, yaitu *Phalaenopsis vuilacea* 'Borneo', *P. sumatrana*, *P. kunstleri*, *P. pantherina*, *P. cornu-cervi*, *P. micholitzii*, *P. gigantea*, *P. lueddemanniana* 'Pulchra', *P. amboinensis* 'Ambon', *P. parishii*, *P. celebensis*, *P. amabilis*, *P. javanica*, *P. speciosa* 'Tetraspis', *P. venosa*, *P. viridis*, *P. schillerana*, *P. manii*, dan *P. equestris*.

Analisis fenotipik

Data fenotipik dikumpulkan dengan cara membuat kategori nilai skoring (Lamadji 1998) berdasarkan karakter-karakter pembeda yang digunakan dalam kunci determinasi pada 18 spesies phalaenopsis (*P. venosa* tidak tercantum dalam kunci determinasi). Hasil skoring disajikan pada Tabel 1.

Analisis RAPD

Analisis RAPD terdiri atas beberapa tahapan kegiatan yaitu isolasi DNA genom yang dilanjutkan dengan pemurnian dan penetapan kualitas dan kuantitas DNA, seleksi primer, dan analisis polimorfisme. DNA tanaman anggrek genus phalaenopsis diisolasi dari daun muda yang segar menurut metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) yang dimodifikasi khususnya penambahan antioksidan *polivinilpolipirolidon* (PVPP) pada waktu penggerusan dan *merkapttoetanol* dalam bufer ekstraks (Toruan-Matius *et al.* 1997).

Pemurnian DNA dilakukan dengan cara penambahan isopropanol dingin dalam tabung *epENDORF* yang berisi larutan DNA. Penetapan kualitas dan kuantitas DNA dilakukan dengan cara elektroforesis menurut Sambrook *et al.* (1989).

Untuk memperoleh tingkat polimorfisme yang tinggi dilakukan seleksi primer dengan menggunakan 17 primer dekamer acak dari operon technology (Almaeda, USA) dan mengadopsi hasil penelitian pada anggrek subtribe sarcanthinae (Kartikaningrum 2002) dan anggrek vanda (Kardin *et al.* 1997). Pemilihan primer untuk percobaan selanjutnya didasarkan pada banyaknya pita dan ketajaman pita yang dihasilkan.

Amplifikasi DNA dilakukan menurut metode Williams *et al.* (1990). Reaksi amplifikasi dalam 25 µl campuran larutan terdiri atas 10 x bufer reaksi (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9,0; 0,1% Triton X-100), 0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1 unit *Tag* polimerase (*Taq GeneAmp* dari *Applied Biosystem*), H₂O, 50 ng DNA cetakan dan 0,3µl primer. Seluruh campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung *epENDORF*. Untuk mencegah penguapan, ke dalam tabung ditambahkan 25 µl minyak mineral. Selanjutnya tabung dimasukkan ke dalam blok mesin PCR

Tabel 1. Kategorial nilai berdasarkan karakter fenotipik 18 spesies dalam genus *phalaenopsis* (Categorial value based on phenotypical character on 18 species of *phalaenopsis* orchids)

Karakter pembeda (<i>Differentiate character</i>)	Diskripsi karakter (<i>Character discription</i>)	Kategorial nilai (<i>Categorial value</i>)
1. Rasio petal dan sepal	1.1. petal jauh lebih luas dari sepal	1
	1.2. petal sama/lebih sempit dari sepal	2
2. Ujung <i>column</i>	2.1. tanpa perpanjangan	1
	2.2. ada perpanjangan	2
	2.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
3. Ujung bibir tengah	3.1. bifid/ <i>bicirrhous</i> (membelah)	1
	3.2. entire/halus-rata	2
	3.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
4. Perkembangan daun	4.1. rudimenter	1
	4.2. sempurna	2
5. Pangkal bibir	5.1. terpisah dengan pangkal <i>column</i>	1
	5.2. menyambung pangkal <i>column</i>	2
	5.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
6. Kedudukan bibir tengah	6.1. lepas/ mobil	1
	6.2. tidak lepas	2
	6.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
7. Bibir	7.1. menggelembung	1
	7.2. tidak menggelembung	2
	7.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
8. Bentuk bibir tengah	8.1. jangkar	1
	8.2. berlekuk dangkal pada ujung	2
	8.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
9. Persimpangan bibir tengah dan lateral	9.1. tonjolan berbentuk perisai	1
	9.2. tanpa tonjolan berbentuk perisai	2
	9.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
10. Adanya tonjolan di antara bibir lateral	10.1. tanpa tonjolan	1
	10.2. ada tonjolan	2
	10.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
11. Bentuk bagian tengah bibir	11.1. semibulat, cekung pada bagian tengah sangat tebal	1
	11.2. <i>ovate</i> , bulat telur memanjang, selalu cembung, bagian tengah tipis	2
	11.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
12. Bentuk bunga	12.1. <i>rotuliform</i> /bulat	1
	12.2. <i>stellate</i> /bintang	2
	12.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
13. Ukuran petal	13.1. luas, elips/panjang kurang dari dua kali lebar	1
	13.2. sempit, obovat, panjang lebih dari dua kali lebar	2
	13.3. tidak seperti di atas/diketahui	0
14. Daun	14.1. permukaan atas daun dewasa satu warna tanpa motif	1
	14.2. berwarna hijau dengan motif keperakan	2
	14.3. berwarna hijau tanpa ada batasan	3
	14.4. berwarna hijau dengan <i>marmorate</i>	4
	14.5. tidak diketahui	0
15. Pedunkala dan rakis	15.1. hijau	1
	15.2. ungu	2
	15.3. tidak diketahui	0

lanjutan

Karakter pembeda (<i>Differentiate character</i>)		Diskripsi karakter (<i>Character discription</i>)		Katego- rial nilai (<i>Catego rial value</i>)
16.	Bagian tengah bibir	16.1.	<i>cruiform</i> atau linear oblong	1
		16.2.	dasarnya berbentuk semisirkuler, agak tipis, plat pinggir menyolok	2
		16.3.	dengan <i>isthmus</i> berbeda-beda	3
		16.4.	tanpa <i>isthmus</i>	4
		16.5.	berbentuk jangkar	5
		16.6.	ujungnya <i>acute</i>	6
		16.7.	ujungnya <i>apiculate</i>	7
		16.8.	datar, lunas median berdaging	8
		16.9.	lunas tipis, dobel dan bergerigi	9
		16.10.	lunas halus permukaannya	10
		16.11.	lunas tengah	11
		16.12.	bulat telur	12
		16.13.	tidak diketahui	0
17.	Bunga	17.1.	ungu terang	1
		17.2.	putih	2
		17.3.	ungu gelap	3
		17.4.	bervariasi warna, berbeda antara sepal etal	4
		17.5.	halus tidak berbulu, berkembang baik sampai ujung	5
		17.6.	tidak diketahui	0
18.	Kalus (tonjolan bibir)	18.1.	segi-4 dengan dasar terpotong atau berlekuk dangkal	1
		18.2.	segi-3, ujung runcing	2
		18.3.	tidak diketahui	0
19.	<i>Inflorescence</i>	19.1.	melengkung, rakis bergelombang	1
		19.2.	tidak diketahui	0
20.	Bentuk rakis	20.1.	pipih, bersayap	1
		20.2.	bulat, tanpa sayap	2
		20.3.	tidak <i>fractiflex</i> , sedikit bunga	3
		20.4.	tidak diketahui	0
21.	Kedudukan petal	21.1.	tegak lurus	1
		21.2.	membentuk sudut	2
		21.3.	elip <i>terbalik/resuform</i> , tak bertangkai	3
		21.4.	tidak diketahui	0
22.	Corak bibir	22.1.	sirkuler, membengkak dangkal pada tengah bibir	1
		22.2.	dengan garis-garis ungu	2
		22.3.	dengan garis-garis coklat atau <i>cinamon</i>	3
		22.4.	kasar	4
		22.5.	perhiasan lateral bervariasi	5
		22.6.	tidak diketahui	0
23.	Ujung cuping bibir	23.1.	bergerigi tidak beraturan	1
		23.2.	tidak diketahui	0
24.	Rakis	24.1.	menyatu tebal	1
		24.2.	tidak tebal	2
		24.3.	tidak diketahui	0
25.	<i>Column</i> (tugu)	25.1.	pendek, kekar, menyempit pada bagian tengah bibir lateral	1
		25.2.	berkembang baik	2
		25.3.	tidak berkembang baik	3
		25.4.	tidak diketahui	0

lanjutan

Karakter pembeda (Differentiate character)		Diskripsi karakter (Character discription)		Katego- rial nilai (Catego- rial value)
26.	Sepal dan petal	26.1.	dengan bercak coklat atau <i>cinamon</i> yang besar	1
		26.2.	dengan garis melintang merah <i>cinamon</i> menyolok	2
		26.3.	garis-garis membujur susuna dari bercak	3
		26.4.	Berberbcak-bercak	4
		26.5.	tanpa bercak	5
		26.6.	garis berwarna melintang atau bercak yang lebih besar	6
		26.7.	tanda lain	7
		26.8.	tidak diketahui	0
27.	<i>Clinandrium</i>	27.1.	seperti kipas	1
		27.2.	berbentuk topi	2
		27.3.	tidak diketahui	0

Sumber : Sweet (1980)

Karakter pembeda 1-13 adalah karakter pembeda untuk pengelompokan seksi dan nomor 14-27 karakter pembeda spesies.

(*thermolyne amplitron* I) yang diprogram satu siklus dengan profil: denaturasi awal pada suhu 94°C selama dua menit, diikuti 45 siklus berikutnya dengan profil sebagai berikut: denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, *annealing* pada suhu 36°C selama satu menit, dan *extention* 72°C selama dua menit, kemudian reaksi diakhiri dengan *extention* pada suhu 72°C selama empat menit. Produk amplifikasi dipisahkan menggunakan elektroforesis pada 1,4% agarose dengan bufer tris asetat-EDTA (TAE). Gel diwarnai dengan etidium bromida menurut Sambrook *et al.* (1989). Hasil elektroforesis divisualisasikan di atas transimulator UV dan didokumentasikan dengan film polaroid 665.

Analisis data

Data Fenotipik. Data kategorial fenotipik ditransformasi dengan prosedur standarisasi STAND pada program NTSYS 2.02 yang pada prinsipnya adalah nilai observasi setiap karakter dikurangi nilai rata-rata karakter tersebut dibagi standar deviasi (Beer *et al.* 1993, Autrique *et al.* 1996, Tatineni *et al.* 1996, Rohlf 1993). Data yang sudah ditransformasi dianalisis dengan fungsi SIMMINT berdasarkan koefisien DIST (jarak taksonomi).

Data RAPD diperoleh dalam bentuk pita-pita DNA hasil amplifikasi dengan ukuran tertentu dari masing-masing genotip anggrek. Analisis data berdasar ada (1) atau tidaknya (0) pita yang dimiliki bersama masing-masing genotip

tanaman yang dibandingkan. Untuk menentukan tingkat kemiripan genotip yang terdapat pada lajur yang berbeda ditentukan berdasarkan rumus Nei & Li (1979). Pengelompokan data matriks dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode UPGMA, fungsi SIMQUAL, koefisien DICE pada program NTSYS 2.02. Berdasarkan data RAPD dilakukan analisis komponen utama (Dillon & Goldstein 1984) untuk menentukan posisi relatif 19 spesies anggrek phalaenopsis dengan 2 dan 3 KU dan pita-pita yang berperan dalam pengelompokan tersebut.

Korelasi penanda fenotipik dan penanda RAPD

Korelasi antara penanda fenotipik dan RAPD dapat ditinjau berdasarkan matriks rata-rata jarak taksonomi dan matriks kemiripan genetik. Analisis korelasi dilakukan melalui uji korelasi dengan statistik Z Mantel yang menghasilkan *r product moment* pada fungsi MXCOMP program NTSYS 2.02.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengelompokan berdasarkan kunci determinasi

Matriks jarak taksonomi (Tabel 2) digunakan untuk membuat pengelompokan 18 spesies phalaenopsis yang dianalisis. Berdasarkan dendrogram diperoleh informasi bahwa pada

Tabel 2. Matriks perkiraan jarak genetik (koefisien DIST) 18 spesies phalaenopsis berdasarkan data fenotipik (*Matrix of genetic distance of 18 phalaenopsis specieses based on phenotypical data*).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	0.00																		
2	0.64	0.00																	
3	1.19	1.33	0.00																
4	1.21	1.39	0.72	0.00															
5	1.24	1.43	0.67	0.26	0.00														
6	1.20	1.41	0.90	0.47	0.57	0.00													
7	1.17	1.31	1.03	0.66	0.72	0.54	0.00												
8	1.22	1.29	1.12	0.74	0.71	0.71	0.43	0.00											
9	1.45	1.47	1.28	1.07	1.20	1.13	1.14	1.28	0.00										
10	1.33	1.54	1.10	0.79	0.82	0.53	0.63	0.79	1.05	0.00									
11	1.30	1.52	1.07	0.75	0.77	0.57	0.57	0.73	1.20	0.46	0.00								
12	1.30	1.52	1.08	0.79	0.79	0.59	0.60	0.75	1.24	0.48	0.09	0.00							
13	1.31	1.52	1.11	0.85	0.84	0.67	0.68	0.80	1.29	0.55	0.24	0.15	0.00						
14	1.30	1.52	1.09	0.82	0.81	0.62	0.63	0.76	1.29	0.50	0.17	0.08	0.10	0.00					
15	1.52	1.54	1.35	1.19	1.30	1.28	1.25	1.38	0.84	1.28	1.21	1.25	1.30	1.31	0.00				
16	1.55	1.57	1.43	1.33	1.41	1.39	1.37	1.47	1.15	1.34	1.21	1.19	1.13	1.20	0.91	0.00			
17	1.51	1.53	1.36	1.20	1.30	1.29	1.26	1.38	0.89	1.27	1.22	1.26	1.31	1.31	0.25	0.95	0.00		
18	1.51	1.52	1.40	1.31	1.37	1.36	1.34	1.43	1.13	1.31	1.17	1.14	1.07	1.15	1.04	0.37	1.07	0.00	

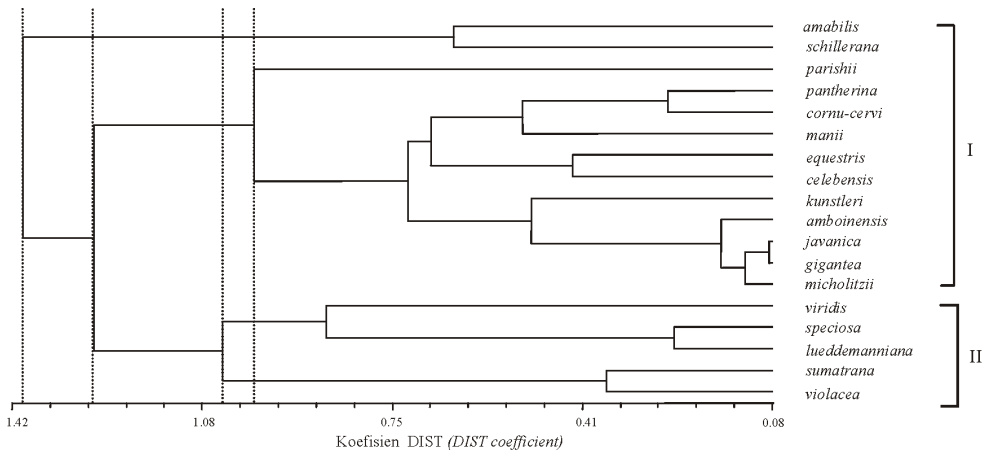
koefisien jarak 1,28 terdapat dua kelompok utama (Gambar 1). Kelompok pertama terdiri atas spesies-spesies dari seksi parishianae, polychilos, stauroglotis, dan seksi amboinensis. Sedangkan kelompok ke-2 terdiri atas spesies dari seksi zebrinae. Dua spesies dari seksi phalaenopsis yaitu *P. amabilis* dan *P. schillerana* membentuk garpu yang terpisah dari spesies lainnya. Pengelompokan berdasarkan penanda fenotipik yang dijadikan basis penyusunan kunci determinasi spesies phalaenopsis, tidak sepenuhnya selaras dengan pengelompokan berdasarkan pola pita DNA. Beberapa spesies phalaenopsis yang mempunyai ciri morfologi sama (berdasarkan kunci), terpisah pengelompokannya jika berdasarkan pita DNA. Informasi jarak taksonomi yang diperoleh menunjukkan bahwa seluruh spesies yang digunakan membentuk satu kelompok pada jarak taksonomi 1,42. Jarak genetik yang jauh juga dapat disebabkan karena spesies-spesies tersebut tidak dapat dikelompokkan hanya berdasar karakter fenotipik seperti yang tercantum pada kunci determinasi. Hal ini berarti masih banyak karakter lain yang perlu diamati, misalnya anatomi atau sitogenetiknya. Sebagai contoh *P. manii* (seksi fuscatae) secara morfologi berkerabat jauh dengan *P. lueddemanniana* (seksi zebrinae), namun pengamatan sitogenetika pada delapan hibrida interspesifik yang dilakukan oleh Arends (1970)

menunjukkan kedua spesies tersebut berkerabat dekat, jika dilihat dari homologi genomnya.

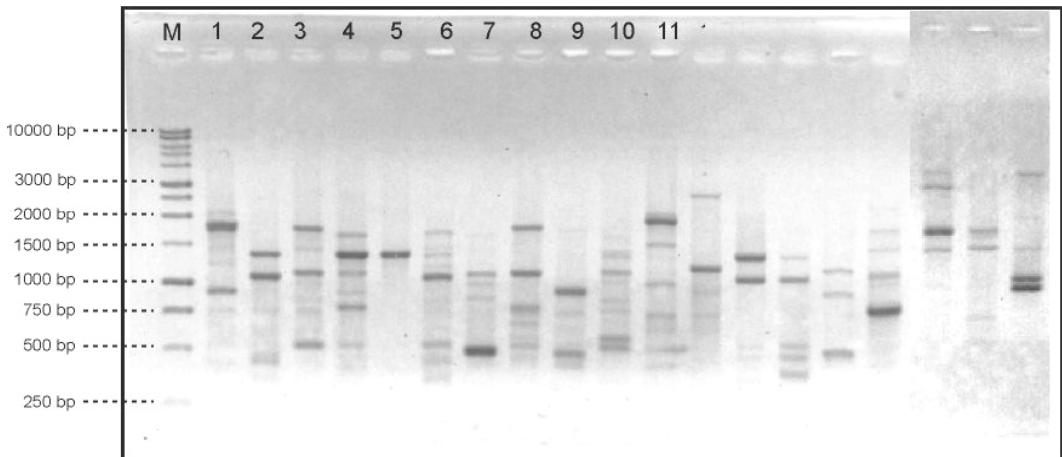
Berdasarkan informasi hasil-hasil persilangan dari *Sander's List of Orchid Hybrid* (Royal Horticultural Society 1987; 1991) diperoleh bahwa seluruh spesies phalaenopsis dapat bersilang dan menghasilkan turunan yang fertil. Kesulitan persilangan banyak disebabkan pengaruh lingkungan. Ketinggian tempat, lingkungan mikro, dan organisme penyerbuknya banyak menentukan perbedaan morfologi tanaman anggrek (Withner 1974). Sebagai contoh *P. amabilis* dan *P. schillerana* (keduanya seksi phalaenopsis), jika keduanya ditanam di dataran rendah, maka *P. schillerana* tidak akan pernah berbunga. Padahal jika kedua spesies tersebut ditanam di dataran tinggi dapat berbunga dan saling bersilang. Pengaruh lingkungan yang sangat besar inilah menyebabkan keragaman fenotipik pada tanaman anggrek sangat besar.

Analisis kekerabatan berdasarkan RAPD

Hasil amplifikasi DNA genom dari 19 genotip anggrek phalaenopsis yang diuji diperoleh 300 pita polimorfik, dengan ukuran fragmen berkisar antara 250 pb sampai 3.000 pb. Satu contoh profil pita DNA hasil amplifikasi 19 spesies anggrek phalaenopsis dengan primer OPA 11 disajikan pada Gambar 2. Primer ini menghasilkan 20 pita polimorfik. Matriks



Gambar 1. Dendrogram 18 spesies angrek dalam genus *phalaenopsis* berbasis karakter fenotipik dengan prosedur STAND dan fungsi SIMMINT diolah dengan program NTSYS versi 2.02 (*Dendrogram of 18 phalaenopsis specieses based on phenotypical characters used STAND procedure and SIMMINT function generated by NTSYS program*).



Gambar 2. Profil pita DNA 19 spesies *phalaenopsis* hasil amplifikasi menggunakan primer OPA 11 (*Banding patern of 19 phalaenopsis specieses were amplified using OPA 11 primer*); lajur (column) (M) 1 kb DNALadder, (1) *P. violacea* ‘Borneo’, (2) *P. sumatrana*, (3) *P. kunstleri*, (4) *P. panterina*, (5) *P. cornu-cervi*, (6) *P. micholitzii*, (7) *P. gigantea*, (8) *P. lueddemanniana* ‘Pulchra’, (9) *P. amboinensis* ‘Ambon’, (10) *P. parishii*, (11) *P. celebensis*, (12) *P. amabilis*, (13) *P. javanica*, (14) *P. speciosa* ‘Tetraspis’, (15) *P. venosa*, (16) *P. viridis*, (17) *P. schillerana*, (18) *P. manii*, (19) *P. equestris*.

Tabel 3. Matriks perkiraan kesamaan genetik (koefisien DICE) 19 spesies phalaenopsis berdasarkan data RAPD (Matrix of genetic distance of 18 phalaenopsis specieses based on RAPD data).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	1.00																		
2	0.64	1.00																	
3	0.35	0.31	1.00																
4	0.40	0.36	0.42	1.00															
5	0.27	0.31	0.29	0.66	1.00														
6	0.38	0.43	0.34	0.50	0.37	1.00													
7	0.26	0.23	0.40	0.39	0.31	0.30	1.00												
8	0.31	0.31	0.31	0.49	0.43	0.34	0.34	1.00											
9	0.45	0.35	0.26	0.37	0.31	0.48	0.27	0.44	1.00										
10	0.18	0.25	0.26	0.38	0.23	0.32	0.25	0.30	0.26	1.00									
11	0.19	0.21	0.29	0.27	0.21	0.30	0.32	0.21	0.28	0.33	1.00								
12	0.27	0.21	0.24	0.21	0.18	0.24	0.24	0.15	0.22	0.22	0.33	1.00							
13	0.37	0.42	0.20	0.29	0.31	0.40	0.17	0.26	0.30	0.22	0.21	0.26	1.00						
14	0.32	0.35	0.23	0.32	0.35	0.38	0.16	0.30	0.28	0.28	0.32	0.16	0.43	1.00					
15	0.35	0.31	0.21	0.31	0.28	0.31	0.19	0.23	0.29	0.23	0.26	0.15	0.39	0.46	1.00				
16	0.17	0.23	0.32	0.29	0.19	0.27	0.18	0.23	0.18	0.25	0.24	0.21	0.29	0.30	0.37	1.00			
17	0.15	0.27	0.27	0.25	0.23	0.25	0.29	0.20	0.26	0.33	0.27	0.34	0.24	0.22	0.25	0.26	1.00		
18	0.29	0.23	0.26	0.25	0.24	0.28	0.25	0.27	0.28	0.20	0.16	0.14	0.27	0.25	0.33	0.20	0.23	1.00	
19	0.24	0.21	0.28	0.27	0.17	0.25	0.25	0.28	0.29	0.32	0.33	0.26	0.19	0.27	0.31	0.35	0.42	0.26	1.00

kesamaan digunakan untuk menentukan hubungan kemiripan genetik antar genotip (Tabel 3).

Hasil analisis menunjukkan 19 genotip tersebut membentuk kelompok pada tingkat kemiripan antara 0,24 sampai 0,66 (Gambar 3). Dendrogram yang diperoleh menunjukkan nilai korelasi kofenetik sebesar 80% yang berarti baik. Seluruh spesies yang diuji terbagi menjadi dua kelompok besar pada tingkat kemiripan genetik 0,24. Kelompok I terdiri atas 16 spesies yang terbagi menjadi dua subkelompok, 15 spesies mengelompok menjadi satu, sedang *P. manii* terpisah pada kelompok lainnya pada tingkat kemiripan genetik 0,27. Beberapa spesies mengelompok sesuai seksinya yaitu *P. violacea* dan *P. sumatrana* (seksi zebrinae), *P. micholitzii* dan *P. amboinensis* (seksi amboinensis), *P. panterina* dan *P. cornucervi* (seksi polychilos).

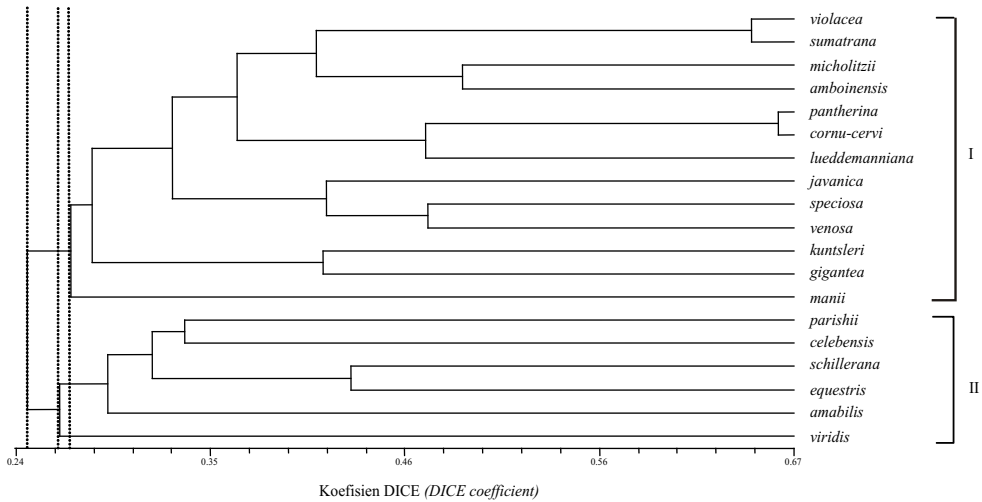
Kelompok II terdiri atas enam spesies yang terbagi menjadi dua subkelompok, *P. viridis* terpisah dalam subkelompok tersendiri. Beberapa spesies lain tidak mengelompok yang berdasarkan kunci determinasi berada dalam satu kelompok. Nilai kemiripan genetik yang rendah yaitu 0,24 (jarak genetik 0,76) menunjukkan masih besarnya sekuen DNA dalam genom anggrek tersebut yang belum dideteksi oleh 16 primer yang digunakan. Dengan kata lain DNA

yang ditempel oleh primer-primer yang digunakan baru mengungkap sebagian kecil daerah genom, dimana berbeda dengan gen-gen yang menyandikan karakter fenotipik pada kunci determinasi.

Korelasi antara penanda fenotipik dan penanda RAPD

Hasil uji korelasi antara penanda fenotipik dan RAPD dengan statistik Z Mantel dengan program MXCOMP menghasilkan korelasi r product moment nyata sebesar -0,38197, dengan $p = 0,0008$. Nilai negatif korelasi diperoleh karena dibandingkan antara tingkat kemiripan dan jarak genetik. Kemiripan genetik menurut Nei (1987) merupakan kebalikan dari jarak genetik yang secara luas menunjukkan kemiripan dua aksesori tanaman. Ukuran kemiripan genetik dan jarak genetik dari dua aksesori merupakan kovarian dan frekuensi alel seluruh sifat yang diamati (Smith 1984).

Dengan menggunakan contoh data fenotip dari matriks jarak sebagai penduga (X) dan tingkat kemiripan berdasarkan pola pita RAPD sebagai peubah bebas (Y) diperoleh persamaan $Y = 0,377 - 0,065X$, $R^2 = 0,1459$ (Gambar 4). Hal ini berarti hanya 14,59% nilai kemiripan genetik berdasarkan pola pita DNA ditentukan oleh rata-rata jarak taksonomi. Rendahnya nilai



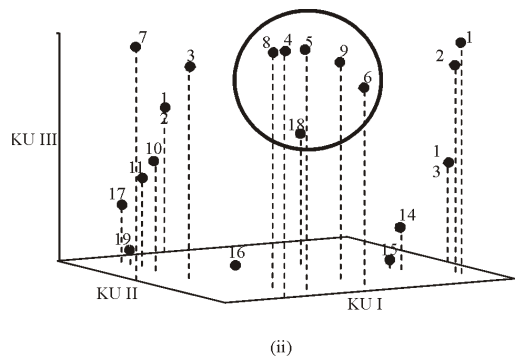
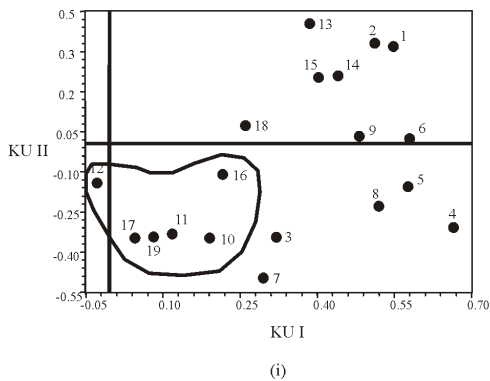
Gambar 3. Dendrogram 19 spesies phalaenopsis menggunakan 16 primer dekamer, dengan fungsi DICE dan metode UPGMA pada Program NTSYS 2.02 (*Dendrogram of 19 phalaenopsis specieses used 16 primers, DICE function and UPGMA method on NTSYS program*)

koefisien determinasi (R^2) tersebut menunjukkan pendekatan persamaan regresi linier tersebut kurang baik. Telah banyak penelitian yang menguji keselarasan pengelompokan antara penanda morfologi dan molekuler, namun sebagian besar gagal memperoleh pengelompokan yang selaras. Sebagai contoh pengelompokan berdasar penanda morfologi dan molekuler pada gandum korelasinya 0,47, $p < 0,01$ (Autrique *et al.* 1996), pada tanaman oat (*Avena sterilis*) -0,35, $p < 0,005$ (Beer *et al.* 1993). Menurut Tatineni *et al.* (1996) jika penanda morfologi yang digunakan merupakan karakter yang mempunyai daya waris tinggi dan stabil maka nilai korelasi yang diperoleh tinggi. Menurut beberapa orang penganggrek (komunikasi pribadi) karakter morfologi pada kunci determinasi sebagian besar bukan sifat yang stabil pewarisannya. Hal tersebut juga telah dilaporkan oleh Griesbach (1981), bahwa *P. garsenii* yang merupakan hibrida alam antara *P. sumatrana* dan *P. violacea* menunjukkan variasi fenotipik yang besar, dan mempunyai tiga sinonim yaitu *P. zebrina* var. *garsenii*, *P. zebrina* var. *lilacina*, dan *P. violacea* var. *schroederana*. Menurut Griesbach (1981) ekotip tetua dan terjadinya introgresi genom sangat menentukan hasil persilangan hibrida alam tersebut.

Ketidakselarasan tersebut kemungkinan dapat juga disebabkan karena banyak data hilang atau tidak ada informasi untuk karakter fenotipik tertentu pada spesies-spesies tersebut, karena tidak disebutkan dalam kunci determinasi. Penyebab lain ketidakselarasan tersebut diduga karena materi tanaman yang digunakan untuk analisis RAPD ini tidak seluruhnya merupakan spesies liar dari alam. Sedangkan Sweet menyusun kunci determinasi tersebut menggunakan materi liar dari alam. Beberapa spesies yang digunakan dalam analisis RAPD ini merupakan turunan dari hasil *selfing* bukan klonal, sehingga kemungkinan besar spesies-spesies tersebut merupakan hasil segregasi. Namun, dengan asumsi bahwa keragaman di dalam spesies lebih sempit daripada keragaman antarspesies, materi tanaman ini dapat dianggap mewakili takson seperti tercantum dalam kunci determinasi.

Analisis filogenetik menggunakan teknik RAPD ini menghasilkan korelasi yang rendah, dengan kata lain antara penanda morfologi dan penanda DNA tidak selaras. Hal ini dapat disebabkan karena teknik RAPD menganalisis secara random keseluruhan koding dan nonkoding DNA genom tanaman. Hidayat & Pancoro (2001) menyatakan bahwa dalam studi filogenetika molekuler untuk tujuan penataan

Gambar 4. Diagram hubungan antara matriks taksonomi berdasarkan fenotip dengan matriks kesamaan genetik berdasarkan RAPD dari 18 genotip anggrek *phalaenopsis* (*Relationship diagram between taxonomic matrix based on phenotypical and genetic matrix based on RAPD from 18 phalaenopsis genotypes*)



Gambar 5. Pemetaan KU I dan KU II (i) KU I, KU II dan KU III (ii) terhadap 19 genotip anggrek *phalaenopsis* (*Principal componen analysis (PCA) of 19 phalaenopsis genotypes*). (1) *P. violacea* 'Borneo', (2) *P. sumatrana*, (3) *P. kunstleri*, (4) *P. pantherina*, (5) *P. cornu-cervi*, (6) *P. micholitzii*, (7) *P. gigantea*, (8) *P. lueddemanniana* 'Pulchra', (9) *P. amboinensis* 'Ambon', (10) *P. parishii*, (11) *P. celebensis*, (12) *P. amabilis*, (13) *P. javanica*, (14) *P. speciosa* 'Tetraspis', (15) *P. venosa*, (16) *P. viridis*, (17) *P. schillerana*, (18) *P. manii*, (19) *P. equestris*.

klasifikasi sebaiknya menggunakan dasar urutan daerah *internal transcribed spacer* (ITS). Hal ini disebabkan karena adanya bagian yang variatif (*species specific*) yaitu ITS-1 dan ITS-2 (Sun 1994; Jobes & Thien 1997), dan daerah ITS dapat digunakan untuk menjawab pertanyaan-pertanyaan filogenetika yang berkaitan dengan sejumlah takson tumbuhan yang berbeda (tetapi

masih dalam satu famili atau genus) yang distribusinya sangat luas (Wen *et al.* 1998; Wen & Shi 1999).

Analisis komponen utama yang diterapkan dalam penelitian ini menghasilkan 11 komponen utama (KU) yang mempunyai *eigenvalue* (akar ciri) lebih dari satu (Dillon & Goldstein 1984, Sharma 1996) dan mempunyai persentase

keragaman kumulatif yang menerangkan keragaman total data minimum 75%. Total KU tersebut menerangkan keragaman data asal sebesar 76,83%. Besarnya keragaman yang dapat diterangkan oleh KU tersebut sesuai dengan rendahnya tingkat kemiripan antargenotip yang diamati yaitu 24% (Gambar 2). Artinya 76,83% keragaman dari karakter pita RAPD terhadap 19 genotip anggrek phalaenopsis tersebut dapat diterangkan oleh 11 KU.

Sesuai pengelompokan yang diperoleh dari dendrogram, dengan membuat pemetaan antara KU I dan KU II diperoleh tiga kelompok yang berbeda pada tiga kuadran yang berbeda. Kelompok pertama terdiri atas satu spesies yaitu *P. amabilis*, kelompok kedua terdiri atas delapan spesies phalaenopsis, dan kelompok ketiga terdiri atas 10 spesies phalaenopsis lainnya (Gambar 5 i). Kedua KU tersebut dipetakan dengan KU III (Gambar 5 ii), maka terlihat satu kelompok besar yang terdiri atas enam spesies phalaenopsis yaitu *P. pantherina*, *P. cornu-cervi*, *P. manii* (seksi polychilos), *P. amboinensis*, *P. micholitzii* (seksi amboinensis), dan *P. lueddemanniana* Pulchra (seksi zebrinae). Salah satu kemungkinan kedekatannya disebabkan karena secara fenotip spesies tersebut mempunyai fenotip bunga yang bercorak dan mempunyai warna lebih cerah.

Berdasarkan nilai KU dari 300 pita hasil amplifikasi diidentifikasi 231 pita RAPD yang berperan dalam pengelompokan terpisah 19 genotip anggrek phalaenopsis. Hal ini menunjukkan primer-primer yang digunakan dapat menghasilkan tingkat polimorfisme yang tinggi. Berdasarkan perhitungan nilai korelasi diperoleh beberapa nilai korelasi (antara pita dan KU) yang besar ($>0,80$). Namun sulit menyatakan bahwa pita tersebut merupakan pita spesifik karena dimiliki oleh beberapa genotip.

KESIMPULAN

Pengelompokan berdasarkan fenotip yang dijadikan dasar penyusunan kunci determinasi memberikan informasi jarak taksonomi antara 1,42 sampai 0,08. Hubungan kekerabatan 19 spesies anggrek phalaenopsis yang diuji berdasarkan koefisien kemiripan Dice adalah 0,24 sampai 0,66. Nilai korelasi yang diperoleh

dari dua data matriks, yaitu matriks kemiripan genetik dan matriks jarak adalah kecil $r = -0,38197$ dengan koefisien determinasi $R^2 = 0,1459$. Berdasarkan analisis komponen utama sulit menentukan pita spesifik, karena pita yang mempunyai korelasi besar $>0,80$ dimiliki oleh beberapa genotip.

SARAN

Hasil penelitian ini masih perlu didukung oleh penggunaan primer dan genotip yang lebih banyak, pengamatan materi langsung dengan data karakter-karakter yang stabil dan tinggi daya warisnya, juga penerapan teknik filogenetika molekuler lain yang lebih kompeten untuk tujuan penataan klasifikasi yang hanya berdasarkan karakter fenotipik.

PUSTAKA

1. Arends, J.C. 1970. Cytological observations on genome homology in eight interspecies hybrids of *Phalaenopsis*. *Genetica* 88-100.
2. Autrique E.M, M. Naachit, P.Monneveux, S.D. Tanksley, and M.E. Sorrells. 1996. Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphophysiological traits and Coefficient of Parentage. *Crop. Sci.* 36:735-742.
3. Beer, S.C, J.Goffreda, T.D. Phillips, J.P. Murphy, and M.E. Sorrells. 1993. Assessment of genetic variation in *Avena* sterills using morphological traits, isozymes, and RFLPs. *Crop. Sci.* 33:1386-1393.
4. Chen, W.H., T.M. Chen, Y.M. Fu, R.M. Hsieh and W.S. Chen. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* 18:7-13.
5. Dillon, W.R. and M. Goldstein. 1984. *Multivariate analysis methodes and applications*. John Willey and Sons. 581 pp.
6. Fu, Y.M, W.H. Chen, W.T. Tsai, T.S. Lin, M.S. Chyou and Y.H. Chen. 1997. Phylogenetic studies of taxonomy and evolution among wild species of *Phalaenopsis* by Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Dept. Taiwan. *Sugar Res. Inst.* 157:27-42.
7. Griesbach, R.J. 1981. *Genetic and taxonomy*. *Orch.Dig.* Nov.-Dec. p:219.
8. Hawkes, A.D. 1970. *Encyclopedia of cultivated orchid*. Faber and Faber Limited. London. 602 pp.
9. Hidayat, T dan Adi Pancoro. 2001. Studi filogenetika molekuler Anacardiaceae berdasarkan pada variasi urutan daerah *internal transcribe spacer*. *Hayati* 8(4):98-101.

10. Jobs, DV and Thien LB. 1997. A conserved motif in the 5.8S ribosomal RNA(rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant ITS sequences. *Plant Mol Biol Report* 15:326-334.
11. Kardin, M.K, Y. Suryadi, Y.A. Betty, dan S. Kartikaningrum. 1997. Aplikasi teknik molekuler (RAPD) untuk analisis keragaman genetik pada anggrek *Vanda*. Laporan Proyek Balai Penelitian Tanaman Hias. Jakarta. Tidak dipublikasikan. 6 pp.
12. Kartikaningrum, S. 2002. Analisis hubungan kekerabatan antar genus anggrek subtribe *sarcanthinae* berdasarkan fenotip dan pola pita DNA melalui teknik random amplified polymorphic DNA. Tesis Pascasarjana UNPAD. 108 pp.
13. Lamadji, S. 1998. Pemberdayaan sifat morfologi untuk analisis kekerabatan plasma nutfah tebu. *Bull P3GI*. 148:17-31.
14. Nei, M. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273.
15. _____. 1987. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetic* 89:583-590.
16. Obara-Okeyo and S. Kako. 1998. Genetic diversity and identification of Cymbidium cultivars as measured by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) marker. *Euphytica* 99:95-101.
17. Orozco-Catillo, K., J. Chamera, R. Waugh, and W. Powell. 1994. Detection of Genetic diversity and selective gene introgression in coffe using RAPD marker. *Theor. Appl. Genet.* 89:934-938.
18. Rohlf, F.J. 1993. *NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 1.80. Exerter Software. New York.
19. Royal Horticultural Society. 1987. *Sander list of orchid hybrids*. International Authority for The Regristration of Orchid Hybrids. Spottiswoode Ballantyne Printers Ltd. Great Britain. 802 pp.
20. _____. 1991. *Sander list of orchid hybrids*. International Authority for The Regristration of Orchid Hybrids. Spottiswoode Ballantyne Printers Ltd. Great Britain.
21. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniathis. 1989. *Molecular Cloning*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York. USA. p:586-600.
22. Sharma, S. 1996. *Applied multivariate techniques*. John Willey & Sons Inc. New York Chichester Brisbane Toronto Singapore 493 pp.
23. Smith, J.S.C. 1984. Genetic variability within US hybrid maize : Multivariate analysis of isozyme data. *Crop. Sci.* 24:1041-1045.
24. Sun, Y. 1994. Phylogenetic analysis of sorghum and related taxa using ITS of nuclear ribosomal DNA. *Theory. Appl. Genet.* 89:26 32.
25. Sweet, H.R. 1980. *The genus phalaenopsis. The orchid digest*. Orchid of the world Vol. 1. Day Printing Corp. Pomona, California. USA. 128 pp.
26. Tatineni, V., R.G. Cantrell, and D.D. Davis. 1996. Genetic Diversity in Elite Cotton Germplasm Determined by morphological characteristic and RAPDs. *Crop. Sci.* 36:186-192.
27. Toruan-Matius, N, T. Hutabarat dan U. Djulaicha. 1996. Ekstraksi dan pemurnian DNA kakao (*Theobroma cacao* L.) untuk analisis RAPD. *Menara Perkebunan* 64(1): 22- 33.
28. Wen, J., S. Shi, Jansen R.K., and Zimmer E.A. 1998. Phylogeny and biography of *Aralia* Sect. *Aralia* (Araliaceae). *Amer. J. Bot.* 85:866 875.
29. _____. 1999. A phylogenetic and biogeographic studi of *Hamamelis* (Hamamelidaceae), an eastern asian and eastern north american disjunct genus. *Biochem. Syst. Ecol.* 27:55-56.
30. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingley. 1990. DNA amplified polymorphic by arbitrary praimers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18(22):6531-6535.
31. Withner, C.L. 1974. *The Orchids : Scientific Studies*. John Wiley&Sons. New York. 604 p.
32. Yam, T.W. 1994. Breeding with *Paraphalaenopsis*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 63(12):1359-1365.