

# Kekerabatan 13 Genotip Anggrek Subtribe Sarcanthinae Berdasarkan Karakter Morfologi dan Pola Pita DNA

Kartikaningrum, S.<sup>1</sup>, N. Hermiati<sup>2</sup>, A. Baihaki<sup>2</sup>,  
M.H. Karmana<sup>2</sup>, dan N. Toruan-Mathius<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang Pacet, Cianjur 43253

<sup>2</sup> Program Studi Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Bandung

<sup>3</sup> Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor

Abnormalitas meiosis dan rendahnya fertilitas sering terjadi pada persilangan interspesifik maupun intergenerik pada beberapa tanaman anggrek subtribe sarcanthinae. Kendala tersebut mungkin berkaitan dengan jauh-dekatnya hubungan kekerabatan. Hubungan kekerabatan antara dua individu atau populasi dapat diukur berdasarkan kemiripan dari sejumlah karakter, dengan asumsi karakter-karakter berbeda menggambarkan perbedaan susunan genetiknya. Penelitian dilakukan mulai Januari-Desember 2001. Tujuan penelitian adalah mengetahui kekerabatan antar-13 genotip anggrek subtribe sarcanthinae serta korelasi antara jarak taksonomi berdasarkan karakter morfologi dan tingkat kemiripan berdasarkan pola pita DNA. Pengelompokan 13 genotip anggrek dianalisis berdasarkan 22 data morfologi dan 185 pita DNA yang diperoleh dari hasil amplifikasi 14 primer dekamer acak *random amplified polymorphic* DNA berbasis *polymerase chain reaction*. Analisis gerombol 13 genotip anggrek subtribe sarcanthinae dilakukan berdasarkan karakter morfologi menggunakan rumus rata-rata jarak taksonomi dan berdasarkan pola pita DNA menggunakan rumus Nei & Li atau koefisien Dice. Dari hasil analisis diperoleh matriks kemiripan yang digunakan untuk menentukan nilai korelasi antara hasil pengelompokan dengan data fenotipik dan data pola pita DNA. Hasil pengelompokan tanaman anggrek subtribe sarcanthinae berdasarkan karakter morfologi tidak konsisten dengan hasil yang diperoleh dari analisis pola pita DNA. Jarak genetik yang berasal dari data fenotip tidak dapat digunakan untuk menduga kemiripan genetik. Rataan jarak taksonomi 13 genotip anggrek berdasarkan karakter morfologi berkorelasi negatif ( $r = -0,586, P < 0,01$ ) dengan tingkat kemiripan berdasarkan pola pita DNA.

Kata kunci : Anggrek; Kekerabatan; Jarak genetik; Subtribe sarcanthinae; Karakter morfologi; Pola pita DNA; *Random amplified polymorphic* DNA

**ABSTRACT.** Kartikaningrum, S., N. Hermiati, A. Baihaki, M. H. Karmana, and N. Toruan-Mathius. 2003. **Genetic relationships 13 genotypes of subtribe sarcanthinae dendrobium according to morphological and DNA band characteristics.** Several interspecific and intergeneric hybrid of subtribe sarcanthinae showed meiotic abnormality and poor fertility. This condition was caused by the distant genetic relationship. Genetic relationships between individuals and populations can be measured based on similarity of traits, assuming that the different traits describe the genetic composition. This experiment was begun in January-December 2001. The objective of this study was to estimate the correlation between taxonomic distance based on phenotypic performance and genetic similarity based on DNA banding pattern among 13 different genotype of orchid member of subtribe sarcanthinae. The genetic relationship analysis among those genotypes was based on 22 morphological traits and 185 DNA bands generated from 14 random amplified polymorphic DNA primers by polymerase chain reaction procedure. Cluster analysis of the genotypes based on phenotypic performance was computed by average taxonomic distance and the DNA banding pattern was calculated by the Dice coefficient of Nei & Li. The analysis resulted in a distance and similarity matrix which was used to determine correlation value between phenotype and DNA. Subtribe sarcanthinae clusters were not consistent with DNA banding pattern. Genetic distance from phenotypic data can't be used to estimate genetic similarity distance based on phenotypic performance which was negatively correlated ( $r = -0.586, P < 0.01$ ) with that of similarity based on DNA banding pattern.

Keywords : Orchid; Genetic relationship; Genetic distance; Subtribe sarcanthinae; Morphological trait; DNA banding pattern; Random amplified polymorphic DNA

Kekerabatan secara fenotipik merupakan kekerabatan yang didasarkan pada analisis sejumlah penampilan fenotipik dari suatu organisme. Hubungan kekerabatan antara dua individu atau populasi dapat diukur berdasarkan kesamaan sejumlah karakter dengan asumsi bahwa karakter-karakter berbeda disebabkan oleh adanya perbedaan susunan genetik.

Karakter pada makhluk hidup dikendalikan oleh gen. Gen merupakan segmen DNA yang hasil aktivitasnya dapat diamati melalui perubahan karakter morfologi. Karakterisasi yang diukur berdasarkan karakter morfologi dipengaruhi oleh lingkungan.

Pengelompokan secara genotipik, dilakukan menggunakan data yang berasal dari marka

molekuler yang berkaitan langsung dengan fenotip suatu organisme (Sulyo 1997). Walton (1993) mengartikan penanda molekuler sebagai suatu karakter yang didasarkan atas sifat-sifat senyawa biokimia tertentu atau karakter berdasarkan senyawa molekuler yang dapat diukur dengan pewarisan sederhana dan mengikuti pewarisan Mendel. Penanda molekuler memegang dua peranan penting dalam program pemuliaan tanaman, yaitu sebagai penentu sidik jari dan sebagai penanda dalam seleksi terpaut dengan karakter fenotipik tertentu yang diinginkan (McCouch & Tanksley 1991).

Liu (1998) menyatakan bahwa pada tingkat molekuler gen merupakan segmen DNA yang mengode atau menyandi sintesis protein tertentu yang dapat menjadi ciri pada makhluk tertentu. Segmen DNA tersebut dapat diamati melalui pola perubahan karakter morfologi.

Menurut Sokal & Sneath (1963), pendugaan hubungan kekerabatan sering ditentukan secara subyektif. Pengukuran berdasarkan molekuler akan menghasilkan penilaian standar untuk membandingkan kekerabatan yang berbeda dengan hasil pengukuran berdasarkan karakter morfologi. Keselarasan hasil karakterisasi melalui penanda morfologi dengan molekuler dapat diketahui dengan analisis korelasi.

Salah satu penanda molekuler yang dapat dimanfaatkan dalam kegiatan pemuliaan adalah *random amplified polymorphic DNA* (RAPD). Pemanfaatan teknik RAPD dengan menggunakan 38 primer acak, mampu membedakan anggrek *Phalaenopsis* normal dan varian somaklonalnya (Chen *et al.* 1998). Obara-Okeyo & Kako (1998) dapat mengidentifikasi anggrek genus *Cymbidium* dan membedakan kultivar blue smoke green meadow dari kultivar-kultivar lain menggunakan primer OPA5-370. Fu *et al.* (1997) melaporkan bahwa anggrek *Phalaenopsis amabilis* yang secara morfologi berkerabat jauh dengan *Phalaenopsis equetris* ternyata berkerabat dekat bila dianalisis dengan teknik RAPD.

Hal tersebut merupakan salah satu indikasi yang menunjukkan bahwa penggunaan teknik RAPD cukup baik untuk studi kekerabatan anggrek, terutama bagi jenis anggrek yang belum diketahui latar belakang genomnya. Teknik RAPD tidak memerlukan pengetahuan latar

belakang genom tanaman dan tidak memerlukan informasi tentang urutan nukleotida spesifik, melainkan hanya menggunakan primer acak tunggal untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA. Namun penggunaan penanda molekuler seperti teknik RAPD untuk mempelajari kekerabatan anggrek memerlukan biaya yang tinggi, terutama bila materi yang dianalisis dalam jumlah besar. Sedang penggunaan penanda morfologi sangat dipengaruhi lingkungan. Sehingga perlu dilakukan pendugaan nilai korelasi antara jarak genetik berdasarkan karakter morfologi dengan jarak genetik berdasarkan penanda molekuler. Pendugaan nilai korelasi dikuatkan dengan pendugaan persamaan regresi antara dua variabel menggunakan data jarak taksonomi sebagai nilai penduga (X) dan data kemiripan berdasarkan RAPD sebagai peubah tidak bebas (Y) menghasilkan suatu hubungan yang dapat digunakan untuk menduga jarak genetik yang berasal dari data fenotipik. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui kekerabatan 13 genotip anggrek subtribe *sarcanthinae* berdasarkan karakter morfologi dan pola pita DNA, serta korelasi antara jarak genetik berdasarkan karakter morfologi dengan kemiripan genetik berdasarkan pola pita DNA. Hipotesis dari penelitian ini adalah teknik RAPD mampu mengelompokkan materi bahan penelitian berdasarkan jauh dekatnya jarak genetik, dan terdapat korelasi yang nyata antara jarak genetik berdasarkan karakter morfologi dengan kemiripan genetik berdasarkan pola pita DNA.

## BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan dalam percobaan ini adalah delapan genus anggrek terdiri atas 13 spesies, yaitu 1 spesies dari genus *Aerides*, 1 spesies dari genus *Ascocentrum*, 1 spesies dari genus *Renanthera*, 3 spesies dari genus *Phalaenopsis*, 1 spesies dari genus *Paraphalaenopsis*, 3 spesies dari genus *Vanda*, 1 spesies dari genus *Cleitostoma*, dan 2 spesies dari genus *Doritis*.

Pengamatan utama morfologi tanaman dilakukan pada 22 peubah seperti yang diteliti Bechtel *et al.* (1981), Cameron & Chase (1999), dan Holtum (1972) yang disajikan pada Tabel 1.

### Isolasi DNA genom

Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) yang dimodifikasi khususnya penambahan antioksidan polivinilpolipirrolidon (PVPP) pada waktu penggerusan dan merkaptoetanol yang ditambahkan dalam bufer ekstraksi (Toruan-Mathius *et al.* 1997). Pemurnian DNA dilakukan menggunakan senyawa campuran kloroform dan isoamilalkohol pada perbandingan 24:1. Konsentrasi DNA contoh ditetapkan dengan metode minigel menurut Sambrook *et al.* (1989) dibandingkan dengan standar DNA lambda.

Penetapan kuantitas (konsentrasi) dan kualitas DNA dilakukan dengan cara elektroforesis menurut Sambrook *et al.* (1989). Uji kualitas DNA dilakukan pada 4 µl DNA contoh, yang ke dalamnya ditambahkan 2,5 µl larutan bufer 10x, empat unit 0,3 µl *EcoRI* dan 18,2 µl akuades steril.

### Analisis polimorfisme dengan teknik RAPD

Analisis RAPD dilakukan menggunakan DNA dari masing-masing spesies anggrek yang telah diamati karakter morfologinya. Amplifikasi DNA anggrek dilakukan menurut metode Williams *et al.* (1990). Reaksi amplifikasi dilakukan dalam 25 µl campuran larutan yang terdiri atas 1x bufer reaksi (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9,0; 0,1% Triton X-100), 0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 unit *Taq* DNA polimerase (Promega), 50 ng DNA template, dan 0,3 µM primer yang dipipet ke dalam tabung eppendorf. Untuk mencegah penguapan, ke dalam setiap tabung ditambahkan 25 µl minyak mineral. Selanjutnya tabung dimasukkan ke dalam blok mesin thermolyne amplitron I (PCR) yang diprogram satu siklus dengan profil: *denaturation* awal pada suhu 94°C selama dua menit, *annealing* pada suhu 37°C selama satu menit, *extention* pada suhu 72°C selama satu menit, dan diikuti dengan 45 siklus berikutnya dengan profil siklus sebagai berikut: *denaturation* 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. Ke dalam tabung berisi DNA hasil amplifikasi ditambah 5 µl *loading*

*buffer* dan difraksinasi dengan elektroforesis 1,4% gel agarose yang mengandung 2,5 µl etidium bromida 1% di dalam bak elektroforesis yang berisi 1x bufer tris acetic EDTA (TAE) dengan kondisi voltase konstan 50 volt selama kurang lebih satu jam. Gel hasil elektroforesis divisualisasikan di atas transiluminator ultra violet dan didokumentasi dengan film Polaroid 665.

### Analisis data

Dari hasil pengamatan fenotip diperoleh data yang akan digunakan untuk menghitung kesamaan matriks jarak dua genotip yang dibandingkan. Untuk mengurangi pengaruh skala pengukuran dan kategori yang berbeda dari karakter-karakter yang berbeda digunakan prosedur standarisasi, dengan mentransformasi data melalui prosedur *STAND* pada program NTSYS versi 2.10, 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; Rohfl 1993). Data yang sudah ditransformasi dianalisis dengan fungsi *similarity interval* (SIMMINT) pada program NTSYS berdasar koefisien DIST/rataan jarak taksonomi:

$$d_{ij} = \left\{ \sum_{k=1}^p n^{-1} (X_{ik} - X_{jk})^2 \right\}^{1/2} \quad (1)$$

- $d_{ij}$  : jarak antara dua genotip i dan j  
 $p$  : banyaknya variabel pengamatan  
 $x_{ik}$  : nilai pengamatan genotip i pada variabel pengamatan ke k  
 $X_{jk}$  : nilai pengamatan genotip j pada variabel pengamatan ke k  
 $n$  : jumlah genotip

Analisis polimorfisme dengan teknik RAPD pada tanaman anggrek dilakukan dengan menetapkan ada (1) atau tidaknya (0) pita yang sama pada masing-masing tanaman yang dianalisis. Analisis data menggunakan fungsi SIMQUAL program NTSYS. Untuk menentukan tingkat kesamaan pasangan spesies yang terdapat pada lajur yang berbeda ditentukan berdasarkan rumus Nei dan Li (1979) atau koefisien Dice (S). yaitu:

**Tabel 1 . Pengamatan fenotip bagian-bagian tanaman anggrek dan masing-masing nilai kategorinya (*Phenotype observation of orchid and its categorized value of orchid*).**

Variabel pengamatan* ( <i>Observed variable</i> )	Kategori nilai ( <i>Value category</i> )						
	1	2	3	4	5	6	7
Penampang lintang daun ( <i>Leaf cross-section</i> )	Konduplikata	-	Plikata	-	Bilateral kompres	-	Teret
Bentuk daun ( <i>Leaf shapes</i> )	Linear	Lanceolata	Oblanseolata	Oblong	Eliptik	Ovata	Obovata
Bentuk ujung daun ( <i>Leaf apices</i> )	Akuminata	Praemorta	Tridentata	Retusa	Trunkata	Akuta	Obtusa
Susunan daun ( <i>Leaf composition</i> )	Duplikata	-	-	-	-	-	Konvoluta
Bentuk bunga ( <i>Flower shapes</i> )	Bintang	-	-	-	-	-	Bulat
Resupinasi ( <i>Resupination</i> )	Tidak ada	-	-	-	-	-	Ada
Corak bunga ( <i>Flower color</i> )	Polos	-	-	Berbintik	-	-	Bergaris
Tipe tonjolan bibir ( <i>callus</i> )	Sederhana	-	-	Lamelata	-	-	Kompleks
Bibir-tungu ( <i>Lip-column</i> )	Bergabung pada keping sisi	-	-	-	-	-	Bebas
Letak lekuk bibir ( <i>Lip lobed position</i> )	Pangkal	-	-	Tengah	-	-	Ujung
Spur	Tidak ada	-	-	-	-	-	Ada
Jumlah polinia ( <i>Number of pollinia</i> )	Dua	-	-	-	-	-	Empat
Bentuk braktea ( <i>Brachtea shapes</i> )	V	-	-	-	-	-	U
Tipe pembungaan ( <i>Inflorescence types</i> )	Tunggal	Simosa	Fasikulata	Umbelata	Spikata	Rasemosa	Panikulata
Posisi bunga ( <i>Inflorescence position</i> )	Menggantung/Horizontal	-	-	-	-	-	Tegak
Akar udara ( <i>Airy root</i> )	Tidak ada	-	-	-	-	-	Ada
Akar tanah ( <i>Root</i> )	Tidak ada	-	-	-	-	-	Ada
Cara tumbuh ( <i>Growth habit</i> )	Monopodial memanjat	-	-	-	-	-	Monopodial herba
Jumlah bunga per tangkai ( <i>Flower number</i> )	-	-	-	-	-	-	-
Panjang tangkai bunga ( <i>Length of flower stalk</i> )	-	-	-	-	-	-	-
Lebar bunga ( <i>Flower width</i> )	-	-	-	-	-	-	-
Panjang tugu ( <i>Column length</i> )	-	-	-	-	-	-	-

\* Penentuan kategori nilai berdasarkan pada deskripsi tanaman anggrek subtribe sarcanthinae dan berdasarkan gradasi dari rendah ke tinggi

Sumber : Bechtel *et al.* 1981; Cameron & Chase 1999; Setoguchi *et al.* 1996; Holtum 1964; Tatineni *et al.* 1996 yang dimodifikasi.

$$S = 2n_{ab} / n_a + n_b \quad (2)$$

- S : koefisien kemiripan  
 a dan b : dua individu yang dibandingkan  
 $n_{ab}$  : jumlah pita DNA yang sama posisinya baik pada individu a maupun b  
 $n_a$  : jumlah pita DNA pada individu a  
 $n_b$  : jumlah pita DNA pada individu b

Analisis gerombol disusun dari data matrix rata-rata jarak taksonomi yang sudah ditransformasi dan data dari pola pita DNA dengan metode UPGMA pada program NTSYS.

Tingkat kepercayaan dari dendrogram berdasar UPGMA ditentukan melalui analisis *bootstrap* menggunakan program WinBoot dengan pengulangan 2000 kali (Yap & Nelson 1996).

Untuk melihat keselarasan antara hasil karakterisasi karakter morfologi dengan pola pita DNA, matrik rata-rata jarak taksonomi dan matrik kemiripan genetik dibandingkan melalui uji korelasi *product-moment* dari Pearson fungsi MXCOMP pada program NTSYS (Smouse et al. 1986 dalam Beer et al., 1993). Korelasi antara pasangan dua matrik diuji dengan statistik Mantel (Mantel 1967 dalam Beer et al. 1993) yang dihitung sebagai:

$$Z = \sum_j \sum_k X_{jk} Y_{jk}$$

$x_{jk}$  : elemen baris matrik ke j dan kolom ke k dari  $X_{n \times n}$

$y_{jk}$  : elemen baris matrik ke j dan kolom ke k dari  $Y_{n \times n}$

$$k < j$$

Nilai Z kemudian ditransformasi melalui normalisasi statistik Mantel yang ekuivalen dengan koefisien korelasi *product-moment* Pearson untuk x dan y (Smouse et al. 1986 dalam Beer et al. 1993) dengan rumus :

$$Z = \sum_j \sum_k X^{jk} Y^{jk}$$

$x^{jk}$  : hasil transformasi  $x_{jk}$

$y^{jk}$  : hasil transformasi  $y_{jk}$

Jika x dan y berdistribusi normal, dan koefisien korelasi populasi sama dengan 0 maka nilai mengikuti distribusi Student's t (Snedecor & Cochran, 1989 dalam Beer et al. 1993).

Hipotesis :

$H_0$  : nilai  $x^{jk}$  tidak berkorelasi dengan nilai  $y^{jk}$

$H_1$  : nilai  $x^{jk}$  berkorelasi dengan nilai  $y^{jk}$

Dasar pengambilan keputusan:

Jika probabilitas  $> 0.05$ , maka  $H_0$  diterima

Jika probabilitas  $\neq 0.05$ , maka  $H_0$  ditolak

Keselarasan pengelompokan ditentukan dari kriteria *goodness of fit* berdasarkan nilai korelasi menurut Rohlf (1993) yang disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2. Kriteria *goodness of fit* berdasarkan nilai korelasi (*Goodness of fit criteria for correlation statistic*)**

Level	Kriteria <i>goodness of fit</i>
$0,9 \leq r$	Sangat baik ( <i>Excellent</i> )
$0,8 \leq r < 0,9$	Baik ( <i>Good</i> )
$0,7 \leq r < 0,8$	Lemah ( <i>Weak</i> )
$r < 0,7$	Sangat lemah ( <i>Weakness</i> )

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Jarak taksonomi antar genotipe berdasarkan karakter morfologi yang dihitung dengan rumus 1 menghasilkan nilai yang beragam dan disajikan dalam bentuk matrik jarak taksonomi (Tabel 3). Makin besar nilai jarak, kekerabatan antar genotipe makin jauh. Kedekatan hubungan antar genotipe berdasarkan 22 data morfologi disajikan dalam bentuk dendrogram (Gambar 1). Dari dendrogram tersebut terlihat bahwa pada rata-rata jarak taksonomi sebesar 1,36 diperoleh 6 kelompok yaitu kelompok A terdiri atas genus *Vanda*, *Ascocentrum* dan *Doritis*, kelompok B terdiri atas dua genotipe dari genus *Phalaenopsis* dan kelompok C terdiri atas satu genus yaitu *Paraphalaenopsis*, kelompok D terdiri atas dua genus yaitu *Aerides* dan *Renanthera*, kelompok E terdiri atas satu genus yaitu *Cleisostoma* dan kelompok F terdiri atas satu genus yaitu *Phalaenopsis amabilis*.

Analisis polimorfisme dengan teknik RAPD menggunakan 14 primer menghasilkan 185 pita dengan ukuran fragmen berkisar antara 250 bp sampai 2000 bp. Contoh pita DNA 13 genotip yang diamplifikasi menggunakan primer OPD

**Gambar 1.** Dendrogram 13 spesies anggrek hasil analisis kluster berdasarkan karakter morfologi dengan metode UPGMA. Skala di bawah adalah rata-rata jarak taksonomi/koeffisien Dist. (*Dendrogram of 13 orchid species cluster analysis based on phenotypic performance by UPGMA method. Below scale is an average taxonomic distance/Dist coefficient*)

**Gambar 2.** Profil pita RAPD hasil amplifikasi dengan primer OPD 05. (*RAPD bands profil of amplification product with OPD 05 primer*). (M) 1 Kb DNA marker (1) *Vanda tricolor*, (2) *Aerides odoratum*, (3) *Vanda limbata*, (4) *Cleisostoma subulatum*, (5) *Vanda suavis*, (6) *Doritis pulcherima*, (7) *Ascocentrum miniatum*, (9) *Phalaenopsis amabilis*, (10) *Renanthera matutina*, (12) *Phalaenopsis violacea*, (13) *Phalaenopsis amboinensis*, (14) *Doritis pulcherima* "Alba", (15) *Paraphalaenopsis serpentilingua*.

05 disajikan pada Gambar 2. Matrik kemiripan berdasarkan pita DNA dihitung menggunakan rumus 2, disajikan pada Tabel 3. Makin kecil nilai kemiripan, kekerabatan makin jauh, begitu juga sebaliknya. Hasil analisis menunjukkan bahwa 13 genotipe anggrek yang dianalisis terbagi menjadi empat kelompok pada tingkat kemiripan genetik 0.26, yaitu kelompok A terdiri atas *Vanda* dan *Ascocentrum*, kelompok B terdiri atas *Doritis* dan *Phalaenopsis* dan kelompok C terdiri atas *Aerides* dan *Cleisostoma* dan kelompok D

terdiri atas satu genus yaitu *Paraphalaenopsis* (Gambar 3).

Dengan membandingkan antara dendrogram berdasarkan karakter morfologi (Gambar 1) dan RAPD (Gambar 2) terhadap 13 genotipe yang dianalisis diperoleh hasil pengelompokan yang tidak konsisten. Genus *Vanda* dan *Ascocentrum* menjadi satu kelompok baik berdasarkan karakter morfologi dan RAPD. Namun Genus *Doritis* dan *Phalaenopsis* berdasarkan karakter morfologi tidak berada pada satu kelompok,

**Gambar 3. Dendrogram 13 spesies angrek hasil analisis kluster berdasarkan RAPD dengan metode UPGMA menggunakan 14 primer dekamer acak. Skala di bawah adalah tingkat kemiripan koefisien Dice. Angka-angka pada garpu merupakan persentase tingkat ketelitian setelah dianalisis *bootstrap* 2000 kali. (Dendrogram of 13 species cluster analysis based on RAPD with UPGMA method using 14 random decamer primer. Below scale is similarity coefficient of Dice)**

sedang berdasarkan RAPD keduanya menjadi satu kelompok. Perbedaan kelompok beberapa genotipe antara dendrogram berdasarkan karakter morfologi dan RAPD tersebut kemungkinan terjadi karena persentase daerah genom yang terwakili masih sedikit atau masing-masing penanda mengungkap daerah genom yang berbeda.

Untuk melihat keselarasan antara matrik rata-rata jarak taksonomi berdasarkan karakter morfologi dengan tingkat kemiripan genetik berdasarkan pola pita DNA, dilakukan pengujian *goodness of fit* dengan menggunakan analisis korelasi antara matrik jarak taksonomi dengan matrik tingkat kemiripan genetik. Hasil perhitungan nilai korelasi antara matrik rata-rata jarak taksonomi berdasarkan karakter morfologi dengan matrik tingkat kemiripan berdasarkan RAPD dan diuji dengan statistik Z Mantel dihasilkan korelasi nyata sebesar  $-0.586$  ( $p = 0.0000$ ).

Kemiripan genetik menurut Nei (1987) merupakan kebalikan dari jarak genetik yang secara luas menunjukkan kesamaan sifat dari dua aksesori tanaman. Ukuran jarak genetik dan kemiripan genetik dari dua aksesori merupakan kovarian dan frekuensi alel seluruh sifat yang diamati (Smith 1984). Diagram hubungan antara matrik jarak taksonomi dengan matrik tingkat kemiripan disajikan pada Gambar 4.

Kriteria *goodness of fit* (Tabel 2) untuk nilai korelasi sebesar  $-0,586$  tergolong sangat lemah.

Menurut Beer *et al.* (1993) rendahnya nilai korelasi menunjukkan bahwa hubungan antara dua peubah lemah dan tidak linier. Dengan menggunakan data jarak taksonomi sebagai nilai penduga (X) dan tingkat kemiripan berdasarkan RAPD sebagai peubah tidak bebas (Y) diperoleh persamaan regresi  $Y = 0.506 - 0.171 X$ ,  $R^2 = 0.334$ . Rendahnya nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) menunjukkan bahwa pendekatan persamaan regresi linier tersebut kurang baik. Hal ini berarti rata-rata jarak taksonomi yang berasal dari data karakter morfologi (Y) tidak dapat digunakan untuk menduga kemiripan genetik yang berasal dari data RAPD (X), mengingat hanya 33.40% nilai jarak RAPD ditentukan oleh rata-rata jarak taksonomi.

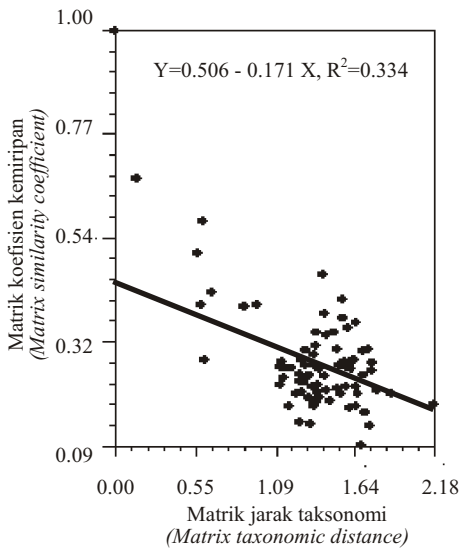
Banyak peneliti yang telah menguji keselarasan pengelompokan antara penanda morfologi dengan penanda molekuler dalam mengevaluasi aksesori plasma nutfah. Secara umum sebagian besar tidak berhasil memperoleh pengelompokan yang selaras. Sebagai contoh nilai korelasi yang rendah diperoleh antara pengelompokan berdasarkan penanda morfologi dengan penanda molekuler pada tanaman gandum yaitu 0.47,  $p < 0.01$  (Autrique *et al.*, 1996), tanaman oat (*Avena sterilis*)  $-0.35$ ,  $p \neq 0.005$  (Beer *et al.*, 1993), dan tanaman buncis (*Phaseolus vulgaris L.*) 0.386,  $p < 0.001$  (Johns *et al.* 1997).

Menurut Tatineni *et al.* (1996) nilai korelasi yang tinggi diperoleh jika penanda morfologi

**Tabel 3. Matriks jarak taksonomi antar genotip berdasarkan karakter morfologi (di bawah diagonal) dan matriks tingkat kemiripan genetik berdasarkan pola pita DNA (di atas diagonal) [Taxonomic distance matrix based on morphological characters (below diagonal) and genetic similarity matrix based on DNA banding pattern (above diagonal)]**

Genotip	1	2	3	4	5	6	7	9	10	12	13	14	15
1		0,194	0,400	0,197	0,674	0,225	0,395	0,256	0,239	0,202	0,279	0,140	0,209
2	1,324		0,267	0,338	0,186	0,175	0,211	0,205	0,239	0,270	0,279	0,163	0,090
3	0,584	1,86		0,243	0,427	0,265	0,278	0,173	0,232	0,261	0,292	0,247	0,143
4	1,386	1,488	1,428		0,212	0,253	0,267	0,182	0,176	0,295	0,259	0,212	0,273
5	0,152	1,357	0,662	1,439		0,277	0,400	0,348	0,245	0,233	0,300	0,220	0,198
6	1,118	1,609	1,081	1,720	1,087		0,262	0,465	0,280	0,309	0,340	0,511	0,187
7	0,879	1,374	0,610	1,350	0,967	1,105		0,244	0,333	0,258	0,267	0,178	0,225
9	1,609	1,885	1,590	2,183	1,581	1,385	1,687		0,204	0,379	0,413	0,304	0,137
10	1,395	1,255	1,380	1,440	1,414	1,514	1,517	1,739		0,275	0,264	0,301	0,207
12	1,224	1,609	1,194	1,693	1,248	1,327	1,387	1,413	1,641		0,583	0,369	0,214
13	1,260	1,617	1,351	1,597	1,288	1,330	1,519	1,540	1,654	0,603		0,360	0,222
14	1,286	1,678	1,221	1,758	1,298	0,559	1,145	1,478	1,625	1,507	1,610		0,222
15	1,270	1,682	1,252	1,749	1,315	1,423	1,373	1,744	1,611	1,505	1,635	1,538	

(1) *V. tricolor*, (2) *A. odoratum*, (3) *V. limbata*, (4) *C. subulatum*, (5) *V. suavis*, (6) *D. pulcherima*, (7) *A. miniatum*, (9) *P. amabilis*, (10) *R. matutina*, (12) *P. violacea*, (13) *P. amboinensis*, (14) *D. pulcherima* var. "Alba", (15) *P. serpentina*.



**Gambar 4. Diagram hubungan antara matriks jarak taksonomi berdasarkan karakter morfologi dengan matriks tingkat kemiripan genetik berdasarkan RAPD dari 13 genotip anggrek subtribe sarcanthinae (Plot of genetic distance based on average taxonomic distance based on morphological characters and similarity coefficient based on RAPDs of 13 subtribe sarcanthinae orchid genotypes)**

yang digunakan merupakan karakter yang mempunyai daya waris yang tinggi dan stabil. Selain itu genom yang terwakili oleh masing-masing penanda dalam mengungkap polimorfisme, sebagian besar menghasilkan tingkat polimorfisme yang sama besar. Namun demikian, walaupun morfologi yang diamati memiliki nilai heritabilitas yang tinggi dan stabil, apabila genom yang terungkap menghasilkan polimorfisme yang berbeda, tidak akan menghasilkan pengelompokan yang selaras.

### KESIMPULAN

1. Pengelompokan tanaman anggrek subtribe sarcanthinae berdasarkan karakter morfologi tidak konsisten dengan pola pita DNA.
2. Rata-rata jarak taksonomi berdasarkan karakter morfologi berkorelasi negatif ( $r = -0.586$ ,  $P < 0.01$ ) dengan tingkat kemiripan berdasarkan pola pita DNA.
3. Jarak genetik yang berasal dari data fenotipe tidak dapat digunakan untuk menduga kemiripan genetik.



## PUSTAKA

1. Autrique E., M. M. Nachit, P. Monneveux., S. D. Tanksley, dan M. E. Sorrells. 1996. Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphophysiological traits and Coefficient of Parentage. *Crop Sci.* 36:735-742.
2. Bechtel, H., P. Cribb, E. Launert. 1981. *The manual of cultivated orchid species*. Blanford Press. Poole Dorset U.K. 444 pp
3. Beer, S. C., J. Goffreda, T. D. Phillips, J. P. Murphy, and M. E. Sorrells. 1993. Assessment of genetic variation in *Avena sterilis* using morphological traits, isozymes, and RFLPs. *Crop Sci.* 33:1386-1393.
4. Cameron, K. M. and Chase, M. W. 1999. Phylogenetic relationships of pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): An herbaceous example of the eastern north America-Eastern Asia phylogeographic disjunction. *J. Plant Res.* 112:317-329.
5. 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.
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. Holtum, R.E. 1972. *Flora of Malaya*. Vol. I Orchid. Gov. Printing Office. Singapore. 759 pp.
8. Johns, M. A., P. W. Skroch, J. Nienhuis, P. Hisrichsen, G. Bascur and C. Munoz-Schick. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Sci.* 37:605-613
9. Liu, B. H. 1998. *Statistical genomics*. Linkage, Mapping, and QTL Analysis. CRC Press LLC. 611 pp
10. McCouch, S. R. and S. D. Tanksley. 1991. Development and Use of Restriction Fragment Length Polymorphism in Rice Breeding and Genetic. In Khush. G. S. and G. Toennissen. (Eds.). *Rice Biotechnology*. IRRI. Los Banos, Philippines. p. 109-133
11. Nei, M. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:5269-5273.
12. \_\_\_\_\_. 1987. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals : *Genetic.* 89:583-590.
13. 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.
14. Orozco-Castillo, K., J. Chamera, R. Waugh, and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD marker. *Theor. Appl. Genet.* 89:934-938.
15. Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 1.80. Exerter Software. New York.
16. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*. Second edition. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York. USA. p. 568-600
17. Smith, J. S. C. 1984. Genetic variability within US hybrid maize : Multivariate analysis of isozyme data. *Crop Sci.* 24:1041-1045.
18. Sokal, R. R. and H. P. A. Sneath. 1963. *Principles of numerical taxonomi*. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 357 pp.
19. Sulyo, Y. 1997. *Beberapa teknik sidik DNA yang dapat digunakan sebagai penanda genetik dalam pemuliaan*. Kelti Pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Hias Jakarta. Tidak dipublikasikan. 7 pp.
20. 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.
21. Toruan-Mathius, N., and T. Hutabarat. 1997. Analysis of genetic integrity of banana plantlets from in vitro culture by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Menara Perkebunan.* 65(1):17-25.
22. Walton, M. 1993. Molecular markers: Which ones to use? *Seed World.* July :22-29.
23. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingley. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research.* 8(22):6531-6535.
24. Yap, I. V. and R. J. Nelson. 1996. *Winboot*. IRRI Manila. 22 pp.