

Keseragaman Genetik Bibit Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Hasil Kultur Jaringan

Genetic uniformity of sungkai (*Peronema canescens* Jack) regenerated from tissue culture

MARIA IMELDA[▼], AMY ESTIATI, LAELA SARI DAN FEBRYANA ERLYANDARI

Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor 16911

ABSTRACT

Sungkai or jati sebrang (*Peronema canescens* Jack) is one of the industrial timber estate species native to Indonesia, which is commonly chosen for reforestation and as raw materials for the furniture and handicraft industry. In order to provide this planting material in large and sustainable quantities, a technique for *in vitro* propagation of sungkai through adventitious shoot proliferation is needed and has been successfully developed at the Research Centre for Biotechnology, LIPI. Since tissue culture method is prone to genetic variations, it is important to assess the genetic uniformity of sungkai planting materials derived from this *in vitro* method at an early stage. In this research, early detection of genetic uniformity was done by morphological observation of the regenerant plants and RAPD analysis using 4 primers namely OPB 5, OPB 9, OPH 11 and OPH 19. Morphological test showed differences in leaf shape, stem diameter and plant height among plantlets originating from Kalbar, Kaltim, Jambi and Cibinong. However, RAPD analysis with PCR showed that all planting materials were genetically uniform among those originating from the same or different places.

© 2007 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: sungkai (*Peronema canescens* Jack), perbanyak *in vitro*, morfologi, RAPD

PENDAHULUAN

Sungkai atau jati sebrang (*Peronema canescens* Jack) merupakan tanaman tumbuh cepat yang direkomendasikan untuk memenuhi program Hutan Tanaman Industri (HTI). Jenis ini merupakan tumbuhan asli Indonesia yang banyak dijumpai di Sumatera Barat, Jambi, Bengkulu, Sumatera Selatan, Lampung, Jawa Barat dan seluruh Kalimantan (Anonim, 1992). Kayunya menyerupai kayu jati dan mempunyai alur yang artistik, warnanya cerah bergaris-garis coklat tua, karenanya banyak digunakan untuk industri mebel dan kerajinan.

Tanaman sungkai umumnya diperbanyak secara vegetatif dengan stek batang, namun dengan cara ini penyediaan bibit menjadi terbatas karena ketersediaan bahan tanaman yang baik juga terbatas. Perbanyak melalui biji sulit dilakukan mengingat sungkai hanya berbunga 1-2 kali setahun, viabilitas bijinya sangat rendah serta menurun dengan cepat sehingga tidak dapat disimpan lama (Faizah dkk., 1995).

Teknik kultur jaringan telah terbukti unggul pada banyak tanaman berkayu, antara lain jati, mangium, sengon dll. (Bonga and von Anderkas, 1992). Penelitian yang dilakukan di Puslit Bioteknologi LIPI telah berhasil mengembangkan teknik perbanyak *in vitro* tanaman sungkai melalui proliferasi tunas adventif (Imelda dkk., 1999). Secara teoritis, dalam waktu satu tahun, dari satu mata tunas aksiler tanaman dewasa dapat dihasilkan jutaan tunas *in vitro* tanaman sungkai yang selanjutnya dapat

diregenerasikan menjadi planlet/bibit sungkai.

Keseragaman genetik merupakan hal yang sangat penting dalam perbanyak tanaman secara massal, karena perlu ada jaminan bahwa bibit yang dihasilkan tidak menyimpang dari sifat induknya. Bibit sungkai hasil perbanyak *in vitro* juga perlu diuji keseragamannya mengingat beberapa tanaman hasil kultur jaringan juga dilaporkan mengalami penyimpangan genetik (Smith & Hamil, 1993). Keberadaan variasi pada tanaman sebenarnya dapat diketahui pada tingkat kultur jaringan, akan tetapi kejadian ini tidak terlihat sampai tanaman menjadi dewasa. Variasi morfologi hanya dapat dideteksi di lapangan ketika tanaman tersebut dewasa, sehingga untuk mengetahui adanya variasi ini diperlukan waktu yang sangat lama terutama pada tanaman tahunan seperti sungkai.

Untuk mengetahui adanya penyimpangan tersebut diperlukan pengujian dini terhadap bibit yang dihasilkan. Beberapa metode yang dapat digunakan untuk pengujian tersebut adalah dengan pengamatan morfologi planlet/bibit, dengan analisis isoenzim ataupun dengan RAPD (Lassner & Orton, 1983; Damasco et al, 1996).

Teknik Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) telah banyak digunakan untuk mengetahui variasi genetik dan phylogenetik pada beberapa species tanaman seperti hop (Pillay dan Kenny, 1996), pisang (Pillay et al., 2001) olive (Hernández et al., 2001). Teknik ini mengandalkan pada amplifikasi daerah yang tidak spesifik dari suatu genom DNA, menggunakan polymerase chain reaction (PCR) dengan primer pendek (10 mer) dari sekuense nukleotida yang acak (Williams et al., 1990). Kelebihan dari teknik RAPD adalah cepat, hanya memerlukan template DNA yang sedikit, mudah dilakukan dan tidak memerlukan penggunaan isotop radioaktif. Kelebihan tersebut membuat RAPD ini menjadi teknik yang banyak digunakan

▼ Alamat Korespondensi:

Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911
Telp.: +62-21-8754587 Fax. +62-21-8754588
Email : maria_tahardi@yahoo.com

untuk mengetahui keragaman genetik dalam suatu plasma nutfah.

Penelitian ini bertujuan untuk melengkapi paket teknologi perbanyakan *in vitro* tanaman sungkai dengan teknik pengujian keragaman genetik tanaman secara visual/morfologi maupun dengan analisis RAPD.

BAHAN DAN CARA KERJA

Proliferasi tunas in vitro

Tunas *in vitro* tanaman sungkai yang berasal dari mata tunas aksiler tanaman dewasa yang berasal dari Kalbar, Kaltim, Jambi dan Cibinong diperbanyak pada media Woody Plant (WP) yang mengandung 1 mg/l TDZ, 0.1 mg/l IAA dan 40 mg/l Adenin sulfat (Foto 1 a). Selanjutnya tunas tersebut dipisah-pisahkan kemudian ditumbuhkan pada media WP atau pada media Murashige & Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) tanpa hormon agar membentuk akar (Imelda dkk., 1999).

Aklimatisasi planlet

Aklimatisasi planlet sungkai dilakukan dengan menggunakan metode yang telah berhasil dikembangkan (Imelda dkk., 1999). Planlet yang telah berakar cukup banyak dibersihkan dari sisa agar yang melekat dengan menambahkan akuades ke dalam botol kultur. Setelah itu akarnya dikeringkan dengan menggunakan kertas tisu secara hati-hati agar tidak ada ujung akar yang patah. Selanjutnya planlet tersebut ditanam dalam pot atau polibag berisi media tanah : pasir (1:1) yang telah disterilkan dengan auoklaf pada suhu 121°C selama 1 jam. Semua pot atau polibag ditempatkan di kamar kaca dan disungkup selama 2 minggu sampai muncul daun baru.

Menguji keragaman bibit secara visual/morfologi

Bibit yang dihasilkan diamati morfologinya, dengan tujuan untuk mengetahui adanya variasi somaklonal yang mungkin muncul. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah dan bentuk daun, diameter batang, tinggi tanaman dan pola pertumbuhan bibit sungkai hasil kultur jaringan yang berasal dari Kalbar, Kaltim, Jambi dan Cibinong secara umum. Morfologi yang jelas berbeda akan dipisahkan untuk diamati lebih lanjut. Untuk mengetahui keseragamannya dilakukan pengamatan setiap bulan terhadap bibit dengan umur yang sama.

Menguji keragaman bibit dengan RAPD

Isolasi DNA genomik dan analisis RAPD

Daun muda tanaman sungkai yang panjangnya ± 10 cm dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml dibekukan dengan nitrogen cair, digerus hingga hancur, dan ditambahkan 750 μ l bufer isolasi yang mengandung bufer lisis [0,2 M tris-HCl pH 7,5; 0,05 M EDTA, 2 M NaCl, 2% (b/v) CTAB], bufer ekstraksi [0,35M sorbitol, 0,1M Tris HCl pH 7,5; 5 mM EDTA], dan 5% (b/v) sarkosil dengan perbandingan 2,5: 2,5: 1. Selanjutnya sampel tersebut diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 65 ° C sambil dikocok perlahan, lalu ditambahkan 750 μ l kloroform : isoamil alkohol (24:1) dan dikocok. Setelah itu, sampel disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm, selama 5 menit pada suhu ruang. Lapisan atas diambil dan dipindahkan ke tube 1,5 ml yang baru, ditambahkan 400 μ l isopropanol dan dikocok. Sampel disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm, selama 6 menit pada suhu ruang. Supernatannya dibuang, peletnya dicuci

dengan 500 μ l 70% etanol dan disentrifus lagi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit lalu supernatannya dibuang lagi dan peletnya dikeringanginkan. DNA dilarutkan dalam 50 μ l Tris EDTA(TE). Empat jenis primer yaitu OPB 5, OPB 9, OPH 11 dan OPH 19 digunakan sebagai primer tunggal pada reaksi PCR. Sekuense dari masing-masing primer di atas dapat dilihat pada Tabel 1. Amplifikasi PCR dilakukan dengan total reaksi 25 μ l [1x bufer PCR, 0,2 mM dNTPs, 1,0 μ M primer, 1,0 U *Taq* polymerase, 100 mg sampel DNA, dan H₂O). Kondisi PCR adalah 94 ° C (3 menit) 1 siklus; 94 ° C (1 menit), 35 ° C (1 menit), 72 ° C (2 menit) 45 siklus; dan 72 ° C (10 menit) 1 siklus. Produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis menggunakan 1,5% gel agarose dalam 0,5x bufer TBE dan diwarnai dengan ethidium bromida (EtBr). Keberadaan fragmen DNA dapat divisualisasikan dengan sinar ultra violet.

Tabel 1. Sekuense dari 4 macam primer

Primer	Sekuense
OPB 5	5' - T G C G C C C T C C - 3'
OPB 9	5' - T G G G G G A C T C - 3'
OPH 11	5' - C T T C C G C A G T - 3'
OPH 19	5' - C T G A C C A G C C - 3'

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji keragaman morfologi bibit sungkai

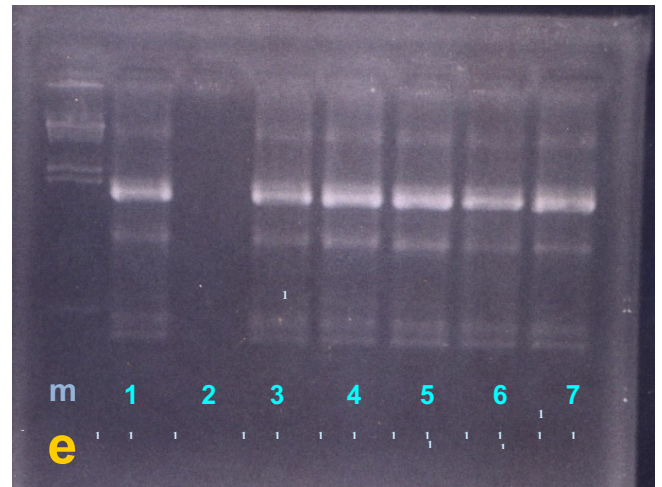
Pengamatan morfologi bibit sungkai yang dilakukan secara visual terhadap 600 planlet sungkai hasil aklimatisasi yang tetuanya berasal dari Kalbar, Kaltim, Jambi dan Cibinong menunjukkan bahwa ketika bibit masih muda (umur 4 minggu) morfologinya tidak tampak berbeda (gambar 1 b) walaupun berasal dari tempat yang berlainan. Namun, setelah bibit tumbuh lebih besar pengamatan terhadap diameter batang, jumlah bentuk daun serta tinggi tanaman menunjukkan bahwa bibit yang dihasilkan dari tanaman asal Kalbar lebih cepat tumbuh, diameter batangnya lebih besar, jumlah daun lebih banyak dan lebih cepat tinggi dibandingkan dengan yang berasal dari Kaltim dan Jambi (tabel 2). Ukuran dan bentuk anak daun bibit asal Kalbar dan Kaltim juga berbeda (gambar 1 c). Anak daun bibit asal Kalbar lebih melebar di bagian tengahnya sedangkan yang asal Kaltim lebih sempit dan ujungnya lebih runcing.

Tabel 2. Pertumbuhan rata-rata bibit sungkai hasil kultur jaringan dari berbagai tempat asal, 12 bulan setelah aklimatisasi

Tempat asal	Pertumbuhan rata-rata bibit sungkai		
	Diameter batang (cm)	Jumlah daun (helai)	Tinggi tanaman (cm)
Kalbar	2,26	19,28	130,00
Kaltim	1,51	17,71	110,85
Jambi	1,56	16,14	86,00
Cibinong	1,22	13,50	102,28

Uji keragaman bibit dengan RAPD

Penentuan hubungan genetik antar tanaman melalui penampakan morfologi memiliki keterbatasan, karena pengamatan secara visual/ morfologi, tidak merefleksikan hubungan genetik akibat pengaruh lingkungan, epistasis dan kontrol genetik yang belum diketahui yang dapat mempengaruhi munculnya variasi morfologi (Smith dan Smith, 1989). Di lain pihak, dengan menggunakan analisis RAPD, keragaman genetik yang dihasilkan tidak dipengaruhi oleh lingkungan ataupun tahap perkembangan tanaman.



Gambar 1. (a) Proliferasi tunas *in vitro* sungkai, (b) Bibit sungkai hasil aklimatisasi umur 4 minggu, (c) Morfologi daun sungkai asal Kalbar (1), Kaltim (2) dan Cibinong (3), (d) Bibit sungkai umur 3 bulan, (e) Hasil RAPD menggunakan primer OPH 19 pada bibit sungkai asal Kalbar (1, 2) Kaltim (3, 4), Jambi (5, 6), Cibinong (7) dan DNA ladder marker (m)

Hasil uji keragaman dengan teknik RAPD menunjukkan bahwa dari 4 RAPD primer yang digunakan, yaitu OPB 5, OPB 9, OPH 11 dan OPH 19 ternyata hanya OPB 9 yang tidak mampu mengamplifikasi fragmen DNA. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian selanjutnya yaitu untuk pengujian dini adanya keragaman genetik pada bibit sungkai hasil perbanyakannya *in vitro*, digunakan primer OPB 5, OPH 11 dan OPH 19.

Analisis RAPD pada 7 sampel tanaman sungkai dengan menggunakan primer OPH 19 menunjukkan bahwa hanya satu sampel (Foto 1 e-2) yang tidak teramplifikasi. Sampel lain yang berasal dari Kalbar (Foto 1 e-1), Kaltim (Foto 1 e-3, 1 e-4), Jambi (Foto 1 e-5) dan Cibinong (Foto 1 e-6, 1 e-7) memiliki pola pita yang sama. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ke enam sampel di atas, baik yang berasal dari satu tempat asal seperti Kaltim (Foto 1 e-3, 1 e-4) maupun yang berbeda asalnya yaitu Kalbar, Jambi dan Cibinong, ternyata memiliki sifat genetika yang seragam. Hasil tersebut tidak sesuai dengan pengamatan secara morfologi yang menunjukkan adanya perbedaan antar sungkai yang berasal dari tempat yang berbeda (Foto 1 d).

Hasil analisis RAPD, melalui pengamatan terhadap pola pita fragmen DNA yang teramplifikasi menunjukkan adanya keseragaman genetik antar bibit yang berasal dari satu daerah maupun yang berlainan tempat asalnya. Tingkat yang rendah dari keragaman genetik sangat kontras dengan keragaman morfologi yang diamati pada tanaman sungkai ini. Keadaan tersebut dapat terjadi karena: 1) primer RAPD tidak menempel (*anneal*) pada area dari genom yang sangat berpengaruh terhadap variasi morfologi, 2) variasi morfologi adalah hasil dari interaksi genotip x lingkungan dan 3) ketidak mampuan untuk menghasilkan keragaman genetik dapat disebabkan karena jumlah primer RAPD yang digunakan sangat terbatas (4 primer). Sebagai contoh adalah pada tanaman hop untuk mengetahui keragaman atau keseragaman genetik digunakan 60 primer (Pillay dan Kenny, 1996), pada tanaman pisang digunakan 80 primer (Pillay et al., 2001), pada tanaman padi digunakan 140 primer (Jeon et al., 1999) dan pada tanaman bawang digunakan 271 primer

(Rafalski et al., 1991). Untuk lebih meyakinkan, hasil tersebut perlu dikonfirmasi lagi dengan menggunakan jumlah primer yang lebih banyak untuk memastikan adanya keragaman atau keceragaman genetik populasi tanaman sungkai ini.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah ditemukannya perbedaan morfologi dan pertumbuhan (diameter batang, jumlah daun dan tinggi tanaman) antar bibit yang berasal dari Kalbar, Kaltim, Jambi dan Cibinong. Hasil analisis RAPD dengan PCR menggunakan primer OPH 19 menunjukkan adanya keceragaman genetik bibit yang berasal dari satu daerah maupun yang berlainan tempat asalnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1992. *Vademikum Hasil-hasil Penelitian Hutan Tanaman Industri*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Departemen Kehutanan, Jakarta 18 hal.
- Bonga, J.M. and P. von Anderkas. 1992. *In vitro Culture of Trees*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 236 pp.
- Damasco, O.P.; G.L.Graham, R.J.Henry, S.W.Adkins, M.K.Smith and I.D.Godwin. 1996. RAPD detection of dwarf off-types in micropropagated cavendish (*Musa spp.AAA*) bananas. *Plant Cell Report* 16 : 118-123.
- Faizah, E., Nurhasybi and S.Sadjad. 1995. The development of methods for early selection of superior ecotype. *Proc. Int. Workshop on Biotech.and Dev.of Species for Industrial Timber Estates*. R & D Centre for Biotechnology, LIPI, Bogor, p. 211-218
- Hernández P, R. de la Rosa, L. Rallo, A. Martin and G. Dorado. 2001. First evidence of a retrotransposon-like element in olive (*Olea europaea*): implications in plant variety identification by SCAR-marker development. *Theor Appl Genet* 102: 1082-1087
- Imelda, M., T.Setyowati dan Juleha. 1999. Production of planting material of sungkai (*Peronema canescens* Jack) through adventitious shoot proliferation. (in Indonesian). *J. Agric. Biotech.* 3 (2) : 53-57
- Jeon Y.H, S.N. Ahn, H.C. Choi, T.R. Hahn and H.P. Moon. 1999. Identification of a RAPD marker linked to a brown planthopper resistance gene in rice. *Euphytica* 107: 23-28
- Lassner, M.W. and T.J.Orton. 1983. Detection of somatic variation. *In : Tanskey, S.D.(Ed). Isoenzymes in plant genetics and breeding* : p. 207-215.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15 : 473-497.
- Pillay M and S.T. Kenny. 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*: level of geneyic variability and segregation in F1 progeny. *Theor Appl Genet* 92: 334-339 .
- Pillay M, E. Ogundiwin, D.C. Nwakanma, G. Ude and A. Tenkouano. 2001. Analysis of genetic diversity and relationships in East African banana germplasm. *Theor Appl Genet* 102: 965-970.
- Rafalski, J.A., Tingey S.V., Williams J.G.K. 1991. RAPD markers-a new technology for genetic mapping and plant breeding. *Agric Biotech News Info* 3 : 645-648.
- Smith J.S.C and O.S. Smith. 1989. The description and assessment of distances between inbred lines of maize. II. The utility of morphological, biochemical and genetic descriptors and a scheme for testing of distinctiveness between inbred lines. *Maydica* 34: 151-161.
- Smith, M.K. and S.D.Hamil. 1993. Early detection of dwarf off types on micropropagated cavendish bananas. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 33 e
- Williams J.G.K, A.R Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.