

KERAGAMAN POPULASI *Eusideroxylon zwageri* KALIMANTAN TIMUR BERDASARKAN PENANDA RAPD

Population Diversity of Eusideroxylon zwageri in East Kalimantan Revealed by RAPD Markers

Anto Rimbawanto¹⁾, AYPBC Widyatmoko¹⁾ dan Harkingto²⁾

¹⁾ Pusat Litbang Hutan Tanaman

²⁾ Fakultas Pertanian UGM

ABSTRACT

Eusideroxylon zwageri or iron wood (local name) is a high value timber and has been under intensive utilization. The aim of this study is to investigate genetic variation of ulin population in East Kalimantan to assist genetic conservation program of the species, using RAPD markers. Leaves from five populations were used and analyzed using 19 RAPD primers which produced 48 polymorphic loci. The average genetic diversity within population was 0.3564, while between populations was 0.0415. AMOVA also revealed that 96% of the genetic diversity resided within populations while the remaining was attributed to among population differences. Cluster analyses based on population data revealed that the five populations were divided into two groups. The first group consisted of TN Kutai, Meratus, S. Wain and Semboja, while Lempake was in different group. The information obtained is useful for developing a strategy of conservation of ulin.

Key words: *Eusideroxylon zwageri*, genetic diversity, RAPD

ABSTRAK

Eusideroxylon zwageri atau ulin adalah kayu bernilai ekonomi tinggi dan telah mengalami eksploitasi yang intensif sehingga keberadaan tegakan ulin di hutan alam semakin langka. Penelitian ini bertujuan mempelajari keragaman genetik populasi ulin di Kalimantan Timur guna membantu program konservasi genetik, dengan menggunakan penanda RAPD. Sampel daun dikumpulkan dari 5 populasi dan dianalisa menggunakan 19 primer RAPD yang menghasilkan 48 lokus polimorfik. Nilai keragaman genetik rerata dalam populasi sebesar 0.3564 sedangkan keragaman antara populasi 0.0415. Analisis AMOVA menunjukkan bahwa 96% dari keragaman genetik terdapat di dalam populasi, sedang sisanya ada di antara populasi. Analisis kluster menghasilkan dua kelompok populasi yaitu TN Kutai, Meratus, S. Wain dan Semboja, sedang populasi Lempake satu kelompok tersendiri.

Kata Kunci: *Eusideroxylon zwageri*, keragaman genetik, RAPD

I. PENDAHULUAN

Ulin (*Eusideroxylon zwageri* T. et B.), yang juga dikenal dengan nama kayu besi borneo, *belian* (Kalimantan), *bulian*, ataupun *onglen* (Sumatera), merupakan salah satu jenis pohon penyusun hutan tropika basah yang tersebar di Sumatera Bagian Selatan, Kepulauan Bangka-Belitung dan hampir seluruh wilayah Kalimantan. Kayu ini mempunyai serat lurus dan termasuk kayu kelas I dalam hal kekuatan dan keawetannya (Martawijaya *et al.*, 1981). Selain itu, ulin merupakan bagian dari budaya masyarakat Dayak yang menggunakan kayu ulin untuk berbagai kebutuhan antara lain untuk tiang pancang rumah, lantai dan atap rumah, dermaga sungai, bak truk, jembatan, tiang listrik, dek kapal maupun kegiatan lainnya.

Dewasa ini, ulin semakin sulit ditemukan di hutan alam karena pemanfaatan pohon ulin dewasa secara eksploitatif sehingga mengganggu regenerasi alaminya, dan juga karena tumbuhan ini hidup soliter, mempunyai penyebaran sempit, dan permudaan alamnya terbatas.

Informasi keragaman genetik diperlukan untuk mengetahui besarnya variasi genetik yang ada. Hal ini penting karena dapat menjadi dasar kegiatan konservasi maupun pemuliaan pohon. Penanda molekuler banyak digunakan dalam pemuliaan pohon untuk pendugaan tingkat keragaman, hubungan kekerabatan, parameter persilangan, identifikasi genotipe dan seleksi dengan penanda DNA atau MAS/ Marker Assisted Selection (Cheliak and Rogers, 1990).

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. Kelebihan RAPD dibandingkan dengan penanda molekuler lainnya adalah relatif mudah dengan menggunakan peralatan yang cukup sederhana dan murah. RAPD banyak digunakan untuk analisis keragaman genetik tanaman di Indonesia, seperti *Paraserianthes falcataria* (Suharyanto *et al.*, 2002), *Araucaria cunninghamii* (Widyatmoko *et al.*, 2005) dan *Shorea leprosula* (Rimbawanto dan Suharyanto, 2005).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik lima populasi alam ulin di Kalimantan Timur, dalam rangka menyusun rekomendasi tentang strategi konservasi jenis ini.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan Penelitian

Bahan penelitian berupa sampel daun ulin yang berasal dari lima populasi daerah penyebaran ulin di Kalimantan Timur, yaitu Taman Nasional Kutai (TN Kutai), Hutan Lindung Gunung Meratus (Meratus), Hutan Lindung Sungai Wain (S. Wain), Hutan Penelitian Wanariset Samboja (Samboja), dan Kebun Raya Samarinda Lempake (Lempake). Masing-masing populasi terdiri dari 16 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 50 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/µl untuk reaksi PCR.

Reaksi PCR dilakukan dengan total volume 10 μ l volume yang mengandung 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 Biosystem), 10 ng/10 μ l 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 *extention* (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 penelitian ini adalah 19 primer yang menghasilkan 48 loci polimorfik. Tabel 1 memperlihatkan nama primer yang digunakan, susunan basanya dan jumlah lokus polimorfik yang dihasilkan.

2. Analisis Data

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

Untuk mengetahui lebih jauh distribusi keragaman genetik, dilakukan Analisis AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) (Excoffier *et al.*, 1992; Huff *et al.*, 1993) dengan menggunakan program komputer GenAlEx 5.1 (Peakal and Smouse, 2001). Analisis AMOVA bertujuan untuk mengetahui pola penyebaran keragaman genetik antar populasi dan dalam populasi/antar individu.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Keragaman Genetik

Analisis RAPD menggunakan 19 primer terhadap tegakan ulin yang berasal dari populasi TN Kutai, Meratus, S. Wain, Samboja dan Lempake di Kalimantan Timur menghasilkan 48 loci polimorfik. Panjang lokus polimorfik berkisar antara 230 bp - 880 bp. Jumlah lokus yang dihasilkan oleh masing-masing primer berkisar antara satu sampai lima dengan rata-rata 2,5 loci per primer (Tabel 1).

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

No	Primer	Sekuens (5 - 3)	Jumlah pita polimorfik
1	OPA-02	TGCCGAGCTG	3
2	OPA-18	AGGTGACCGT	1
3	OPA-20	GTTGCGATCC	2
4	OPG-02	GGCACTGAGG	4
5	OPG-03	GAGCCCTCCA	1
6	OPG-07	GAACCTGCGG	1
7	OPG-08	TCACGTCCAC	2
8	OPG-11	TGCCCGTCGT	5
9	OPG-12	CAGCTCACGA	2
10	OPG-19	GTCAGGGCAA	2
11	OPJ-04	CCGAACACGG	2
12	OPJ-18	TGGTCGCAGA	2
13	OPK-10	GTGCAACGTG	4
14	OPK-15	CTCCTGCCAA	4
15	OPK-16	GAGCGTCGAA	2
16	OPS-11	AGTCGGGTGG	3
17	OPS-18	CTGGCGAACT	1
18	OPZ-03	CAGCACCGCA	4
19	OPZ-12	TCAACGGGAC	3
Total			48

Hasil pengamatan terhadap jumlah dan persentase lokus polimorfik masing-masing populasi menunjukkan jumlah lokus polimorfik paling banyak adalah populasi Meratus dan Samboja (48 lokus atau 100%), sedangkan populasi yang mempunyai jumlah lokus polimorfik paling sedikit adalah populasi TN Kutai dan S. Wain (46 lokus atau 95,8%).

Nilai keragaman genetik berdasarkan analisis keragaman genetik Nei (1972; 1973) menunjukkan bahwa populasi TN Kutai dan S. Wain mempunyai keragaman lebih tinggi dari populasi lainnya, masing-masing 0,3659 dan 0,3629 sedang yang terendah adalah populasi Meratus (Tabel 2).

Besarnya nilai rata-rata jarak genetik antar populasi adalah 0,0415. Dengan kata lain, sekitar 96% dari keragaman genetik berada di dalam populasi. Hasil ini didukung oleh hasil AMOVA (Peakall and Smouse, 2001) Tabel 3 yang menunjukkan bahwa distribusi keragaman genetik dalam-populasi sebesar 96%, sedangkan sisanya (4%) adalah jarak genetik antar populasi.

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

Populasi	TN Kutai	Meratus	S. Wain	Samboja	Lempake
TN Kutai	0,3659				
Meratus	0,0416	0,3464			
S. Wain	0,0414	0,0378	0,3629		
Samboja	0,0296	0,0328	0,0249	0,3492	
Lempake	0,0489	0,0488	0,0620	0,0475	0,3576

Tabel 3. Analisis keragaman molekuler (AMOVA) terhadap lima populasi ulin di Kalimantan Timur berdasarkan keragaman penanda RAPD.

Sumber	df	SS	MS	Var.	%	Stat	Value	Prob
Antar Pop.	4	63,125	15,781	0,401	4%			
Dalam Pop.	75	702,063	9,361	9,361	96%	PhiPT	0,0411	0,010

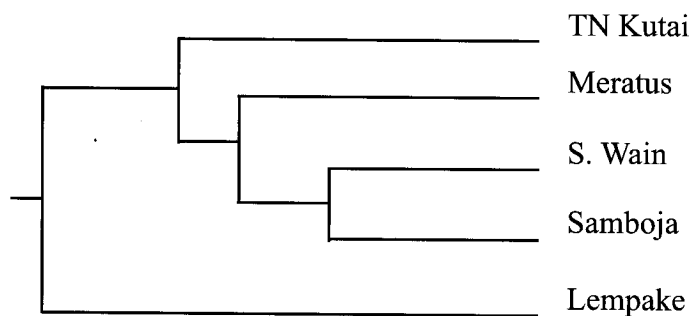
Hasil penelitian ini menunjukkan kecenderungan yang berlawanan antara keragaman genetik berdasarkan jumlah lokus polimorfik dan hasil perhitungan dengan POPGENE 1.32. Jumlah lokus polimorfik paling banyak adalah populasi Meratus dan Samboja (48 lokus atau 100%), sedangkan menurut perhitungan jarak genetik populasi TN Kutai dan S. Wain mempunyai keragaman lebih tinggi dari populasi Meratus dan Semboja. Jumlah lokus polimorfik antar populasi tidak berbeda. Sehingga hasil di atas kemungkinan disebabkan adanya lokus spesifik yang hanya dimiliki satu atau dua populasi saja.

Rata-rata keragaman genetik ke lima populasi adalah 0,3564 dimana besarnya keragaman genetik ini masih berkisar di antara keragaman genetik populasi Kalimantan (Purnamila *et al.*, 2005) dan masih sedikit lebih rendah daripada populasi Sepaku (Kalimantan Timur). Hal ini menunjukkan bahwa keragaman genetik populasi ulin di Kalimantan masih cukup tinggi.

Kecenderungan pola distribusi keragaman seperti ini sesuai dengan beberapa hasil penelitian pada populasi yang berkawin silang (*outcrossing*) seperti *Shorea leprosula* (Rimbawanto dan Suharyanto, 2005). Pola distribusi keragaman dapat disebabkan oleh sistem perkawinan (*mating system*), sejarah populasi dan spesiasi, sebaran populasi, letak geografis dan *gene flow*; dan spesies yang berkawin silang, berdaur hidup panjang, sebarannya yang luas dan berkesinambungan dengan populasi yang besar cenderung memiliki keragaman genetik lebih besar di dalam populasi (Hamrick and Godt, 1989).

B. Hubungan Kekkerabatan Antar Populasi

Menggunakan informasi jarak genetik antar individu dan populasi, disusun dendrogram menggunakan metode UPGMA untuk mengklarifikasi hubungan antar populasi. Hasil dendrogram (Gambar 1) berdasarkan jarak genetik Nei (1972) tersebut menunjukkan hubungan kekerabatan antara lima populasi di Kalimantan Timur tersebut terbagi dalam dua kelompok besar. Kelompok pertama terdiri dari satu populasi yaitu populasi Lempake, sedangkan kelompok kedua terdiri dari empat populasi lainnya.



Gambar 1. Dendrogram hubungan kekerabatan antara 5 populasi ulin di Kalimantan Timur berdasarkan jarak genetik Nei's (1972)

Pola pengelompokan populasi dan jarak genetik memperlihatkan hubungan yang nyata dengan distribusi geografis populasi ulin. Populasi Samboja, Meratus dan S. Wain berada dalam satu kelompok karena letaknya berdekatan. Populasi S. Wain dan Samboja yang mempunyai hubungan terdekat secara geografis kedua populasi ini letaknya berdampingan. Populasi Lempake terpisah dari kelompok populasi lainnya dan mempunyai jarak genetik yang relatif tinggi terhadap populasi-populasi lainnya. Penelitian terhadap populasi *Shorea leprosula* Miq. (Rimbawanto dan Suharyanto, 2005) menunjukkan terdapat korelasi antara jarak genetik dan letak geografis.

Besarnya hasil keragaman genetik dari studi ini tidak jauh berbeda dengan hasil yang telah dilaporkan oleh Purnamila *et al.* (2005). Perbedaan yang nyata adalah jarak genetik antar populasi, di mana pada penelitian ini jarak genetik antar populasi hanya sebesar 0,0415, sedangkan Purnamila *et al.* (2005) melaporkan sebesar 0,1824. Perbedaan tersebut disebabkan karena letak populasi yang digunakan. Dengan hanya menggunakan populasi-populasi dari satu propinsi, ternyata jarak genetik antar populasi sangat jauh menurun.

Strategi konservasi genetik ulin dapat dirancang berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan Purnamila *et al.* (2005) dan penelitian ini. Masing-masing propinsi di Kalimantan dapat dianggap sebagai satu populasi besar, sehingga eksplorasi materi genetik ulin dalam rangka pembangunan kebun konservasi *ex-situ* dilakukan terhadap tiap propinsi dengan cukup diwakili oleh satu atau dua populasi saja, di mana pada masing-masing populasi diwakili oleh jumlah individu yang cukup. Demikian juga untuk konservasi *in-situ*, masing-masing propinsi cukup diwakili oleh satu populasi saja.

IV. KESIMPULAN

1. Rata-rata keragaman genetik di dalam populasi dari 5 populasi yang digunakan adalah $0,3564 \pm 0,0085$.
2. Rata-rata jarak genetik antar populasi adalah sebesar $0,0415 \pm 0,0116$. Berdasarkan analisis AMOVA, total keragaman genetik di dalam populasi sebesar 96% sedangkan sisanya terletak di antara populasi
3. Analisis kluster dengan metode UPGMA, membagi lima populasi ke dalam dua kelompok besar. Kelompok pertama terdiri dari TN. Kutai, Samboja, Meratus dan S. Wain, sedangkan kelompok yang kedua terdiri dari satu populasi Lempake. Pengelompokan ke lima populasi tersebut berhubungan dengan letak geografis populasinya.
4. Koleksi materi genetik dalam rangka pembangunan kebun konservasi *ex-situ* dilakukan dengan memperhatikan materi dari masing-masing propinsi dan jumlah individu di dalam satu populasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kegiatan penelitian ini dibiayai oleh proyek “*Sustainable Management of the Tropical Rain Forest in Kalimantan: Silviculture Development and Genetic Conservation of Eusideroxylon zwageri Teijm. & Binned*”, kerjasama antara Puslitbang Hutan Tanaman dan Tropenbos International/MOF Tropenbos Kalimantan Programme. Pekerjaan lapangan dan laboratorium dibantu oleh Wahyunisari dan Y. Triyanta.

DAFTAR PUSTAKA

- Cheliak, W.M and Rogers, D.L. 1990. Integrating biotechnology into tree improvement programs. *Canadian Journal of Forest Research* 20: 452-463.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quattro, J.M. 1992. Analyses of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plants. *In* Plants Population Genetics Breeding and Genetic Resources, Browns, A.H.D., M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir (eds.). Sinauer, Sunderland Massachusetts. Pp.43-63.
- Huff, D.R., Peakal, R. and Smouse, P.E. 1993. RAPD Variation within and among natural populations of outcrossing Buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theor. Appl. Genet.* 86:927-934.
- Martawijaya, I., Kartasujana, K., Kadir dan Prawira, S.A. 1981. Atlas Kayu Indonesia. Jilid I. Balai Penelitian Hasil Hutan, Bogor.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc. Acids. Res.* 8. (19): 4321-4325.
- Nei M. 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.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2001. GenAlEx V5: Genetic analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>
- 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 Silvikultur dalam Mendukung Rehabilitasi Hutan, E. B. Hardiyanto (ed.). Fakultas Kehutanan UGM dan International Tropical Timber Organization. Yogyakarta. 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 Silvikultur 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 chloroplast 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.

