

KAJIAN KERAGAMAN GENETIK ANDALAS (*MORUS MACROURA*) UNTUK KONSERVASI GENETIK FLORA ASLI SUMATERA BARAT

*The assesment of genetic diversity of andalas (Morus macroura) for genetic conservation of
native flora of West Sumatra*

Istiana Prihatini¹, AYPBC. Widyatmoko¹, Maryatul Qiptiyah¹, Dodi Frianto² dan Eka Novriyanti²

^{1,2}Kontributor Utama, ¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar Km 15 Purwobinangun Pakem Sleman Yogyakarta Indonesia
email penulis korespondensi: istiana.prihatini@biotifor.or.id

²Balai Penelitian Teknologi Serat Tanaman Hutan
Jl. Raya Bangkinang – Kuok km. 9 Po. Box 4/BKN Bangkinang Riau Indonesia

Tanggal diterima : 12 Oktober 2021, Tanggal direvisi : 14 Oktober 2021, Disetujui terbit : 02 Desember 2021

ABSTRACT

Conservation management strategies for native Sumatran species such as andalas (Morus macroura) are currently being developed through genetic diversity studies. These informations will be used to enhance ongoing conservation and regeneration programs and to control the exploitation of these high-value plant species. This initial study aimed to develop a method for extracting DNA from andalas cambium, to select polymorphic RAPD primers and to study genetic diversity using selected RAPD primers. DNA was successfully extracted using the CTAB method from all 32 cambium samples collected from Jambi and West Sumatra. Eighteen RAPD primers were screened and six polymorphic primers were selected (OPO-6, OPY-6, OPY-15, OPW-1, OPW-3 and OPW-4). RAPD analysis using the six selected primers resulted in 52 polymorphic loci and the value of genetic diversity within the population (Hs) of 0.308 and the value of genetic diversity among populations (DST) of 0.091. The highest genetic diversity was observed in Batipuah, Tanah Datar (0.351) while the lowest was observed in Halaban, Lima Puluh Kota (0.205). A test with AMOVA shows that the genetic diversity between individuals is greater than the diversity between populations. The dendrogram based on the genetic distance between populations shows that the andalas population in West Sumatra is separated into two groups and both are separated from the Jambi population. The results of this study can be used as a basis for further research on several other andalas populations as well as the basic information for conservation strategies of andalas.

Keywords: cambium DNA, DNA extraction, genetic distance, population genetic, RAPD

ABSTRAK

Strategi pengelolaan konservasi spesies asli Sumatera seperti andalas (*Morus macroura*) saat ini sedang dikembangkan melalui studi keragaman genetik. Informasi keragaman genetik ini akan digunakan untuk meningkatkan program konservasi dan regenerasi yang sedang berlangsung dan untuk mengendalikan penebangan spesies tanaman bernilai tinggi ini. Penelitian awal ini bertujuan untuk mengembangkan metode ekstraksi DNA dari kambium andalas, menyeleksi primer RAPD yang polimorfik, dan mempelajari keragaman genetik menggunakan primer RAPD terpilih. DNA berhasil diekstraksi menggunakan metode CTAB dari 32 sampel kambium yang dikumpulkan dari Jambi dan Sumatera Barat. Delapan belas primer RAPD disaring dan enam primer polimorfik dipilih (OPO-6, OPY-6, OPY-15, OPW-1, OPW-3, dan OPW-4). Analisis RAPD menggunakan enam primer terpilih menghasilkan 52 lokus polimorfik dan nilai keragaman genetik dalam populasi (Hs) sebesar 0,308, dan nilai keragaman genetik antar populasi (DST) sebesar 0,091. Keragaman genetik tertinggi terdapat di Batipuah, Tanah Datar (0,351) dan terendah di Halaban, Lima Puluh Kota (0,205). Pengujian dengan AMOVA menunjukkan bahwa keragaman genetik antar individu lebih besar daripada keragaman antar populasi. Dendrogram yang disusun berdasarkan jarak genetik antar populasi menunjukkan bahwa populasi andalas di Sumatera Barat dipisahkan menjadi dua kelompok dan keduanya terpisah dari populasi Jambi. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut pada beberapa populasi andalas lainnya serta sebagai informasi dasar untuk strategi konservasi andalas.

Kata kunci: DNA kambium, ekstraksi DNA, jarak genetik, genetika populasi, RAPD

I. PENDAHULUAN

Andalas (*Morus macroura*) merupakan flora identitas propinsi Sumatra Barat (Dahlan, 1994). Kayu dari pohon jenis ini banyak digunakan sebagai bahan baku pembuatan rumah tradisional yang umumnya dipakai pada tiang utama, dinding maupun lantai serta dipakai pada pembuatan mebel (Pohan, 2008). Populasi alami andalas dapat ditemukan di beberapa daerah di Asia Tenggara (Roskov et al., 2014), namun jumlahnya mengalami penurunan disebabkan oleh beberapa hal, antara lain karena tingginya eksploitasi di hutan-hutan alam serta rendahnya tingkat reproduksi alami jenis ini (Pohan, 2008).

Tingkat reproduksi alami yang rendah disebabkan karena sifat bunganya berumah dua (*dioceous*), yaitu setiap individu hanya memiliki satu jenis bunga betina atau bunga jantan saja (Anwar & Ismanto, 2012; Dahlan, 1993). Penyebab lain rendahnya tingkat reproduksi alami adalah musim pembungaan yang tidak serempak sehingga menurunkan tingkat penyerbukan bunga dan penurunan produksi biji (Mahdane, 2013). Kedua fenomena tersebut akan menurunkan jumlah individu dalam populasi dan lebih lanjut akan menyebabkan terjadinya *inbreeding*. Tingkat *inbreeding* yang tinggi akan berakibat pada penurunan keragaman genetik (Nurtjahjaningsih et al., 2020). Adanya beberapa permasalahan tersebut menyebabkan upaya konservasi jenis andalas menjadi penting untuk dilakukan untuk mencegah kepunahan jenis andalas di populasi alamnya (Syamsuardi, 2015).

Salah satu upaya konservasi yang dapat dilakukan adalah dengan melakukan eksplorasi dan pengumpulan materi genetik berupa anakan dan biji dari beberapa populasi alam dan ditanam secara *ex-situ* (Priambudi, 2015). Eksplorasi materi genetik diperlukan untuk mengetahui karakter genetik setiap pohon pada populasi alamnya untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan (Widyatmoko & Yudohartono, 2015). Informasi keragaman

genetik populasi merupakan hal penting yang perlu diketahui dalam membangun kebun konservasi.

Penggunaan penanda RAPD juga telah banyak digunakan untuk mempelajari keragaman genetik dari species lain pada genus yang sama (Pohan, 2008), jenis (Chikkaswamy & Prasad, 2012), maupun genus lain dan mampu memberikan informasi keragaman genetik yang diperlukan (Nurtjahjaningsih, 2017). Penggunaan penanda RAPD untuk melihat keragaman genetik populasi jenis andalas yang telah dilakukan sebelumnya menggunakan jumlah sampel dan populasi yang terbatas dengan materi genetik berupa daun (Pohan, 2008; Syamsuardi, 2015). Penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan metode ekstraksi DNA menggunakan material berupa kambium dari pohon andalas, memilih penanda RAPD yang polimorfik serta mengetahui nilai awal keragaman genetik jenis andalas untuk menunjang kegiatan konservasi genetik jenis andalas di Pulau Sumatra.

II. METODE PENELITIAN

A. Bahan penelitian

Sampel materi genetik yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian kambium dari tegakan andalas yang dikoleksi dari beberapa lokasi di Jambi dan Sumatera Barat (Tabel 1, Gambar 1). Sampel kambium diambil dari batang pohon yang masih hidup (Gambar 2) dan dimasukkan dalam amplop kertas dan dikeringkan menggunakan *silica gel*.



Gambar 1. Peta lokasi pengambilan sampel materi genetik jenis Andalas (*Morus macroura*)

Sampel dalam kondisi telah kering dikirimkan ke Laboratorium Genetika Molekuler Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta untuk kegiatan pengujian DNA.



Gambar 2. Pohon andalus yang ditemukan di daerah Sungayang Tanah Datar yang digunakan sebagai salah satu sumber materi genetik pada kegiatan pengujian keragaman genetik andalus

B. Metode penelitian

1. Ekstraksi, purifikasi DNA dan pengenceran DNA

Ekstraksi DNA dari kambium andalus dilakukan dengan menggunakan buffer CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) (Murray & Thompson, 1980) berdasarkan metode yang telah dimodifikasi (Shiraishi & Watanabe, 1995). Adapun buffer ekstraksi CTAB terdiri dari 1 M tris pH 9.0; 5 M NaCl ; 0.5 M EDTA (etilendiamin tetraasetat), 10% CTAB; β – Mercaptoethanol, kloroform: isoamil alkohol (24: 1), sodium asetat (NaOAc), isopropanol, etanol 70% dan 100%, dan psd (purified sterile distilled) H₂O.

Sampel serat kayu kering yang mengandung kambium sebanyak kurang lebih 50 mg dimasukkan ke dalam mikrotube steril ukuran 2 ml yang telah diisi dengan 2 buah *stainless bead* ukuran 5mm (Qiagen) dan ditambahkan larutan buffer ekstraksi CTAB sebanyak 1,5 ml. Sampel dihaluskan menggunakan mesin mini beadbeater-8 (Biospec) selama kurang lebih 5-10 menit hingga sampel menjadi halus dan homogen. Larutan yang sudah homogen diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65°C, kemudian sebanyak 1 ml larutan yang ada di bagian atas (supernatant) diambil dan dipindahkan ke dalam mikrotube steril ukuran 2 ml.

Tabel 1. Populasi alami andalus yang digunakan sebagai sumber materi genetik untuk penelitian keragaman genetik andalus

Populasi	Kabupaten	Provinsi	Jumlah sampel	Koordinat		Status lahan
				Bujur (BT)	Lintang (LS)	
Gunung Kerinci	Kerinci	Jambi	5	101°5'37.5"	1°44'17.3"	hutan
Tanjung Bonai	Tanah Datar	Sumatera Barat	5	100°42'39.8"	0°21'48.2"	ladang masyarakat
Sungayang	Tanah Datar	Sumatera Barat	11	100°26'47.1"	0°26'19.9"	ladang masyarakat
Batipuah	Tanah Datar	Sumatera Barat	8	100°39'22.4"	0°22'20.9"	ladang masyarakat
Halaban	Lima Puluh Kota	Sumatera Barat	3	100°43'42.1"	0°20'53.5"	ladang masyarakat

Larutan *chloroform* sebanyak 800 μ l kemudian ditambahkan dan dicampur

menggunakan mesin *Rotator* RT-50 (Taitec) selama 20 menit. Larutan yang telah homogen

kemudian dipisahkan menggunakan mesin *Centrifuge* 5417R (Eppendorf) pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Larutan pada bagian atas sebanyak 700 µl diambil dan dipindahkan ke mikrotube steril ukuran 1,5 ml, ditambah dengan *chloroform* sebanyak 700µl dan dicampurkan menggunakan *rotator* selama 20 menit, serta dipisahkan menggunakan mesin sentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit.

Larutan pada bagian atas diambil sebanyak 600 µl dan dipindahkan ke dalam mikrotube steril ukuran 1,5 ml, kemudian ditambahkan NaOAc sebanyak 20 µl dan *isopropanol* sebanyak 650 µl untuk mengikat DNA. Larutan dicampur dengan cara digoyang perlahan dan didiamkan selama 15 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Pada tahapan ini akan diperoleh pelet DNA pada bagian dasar dari mikrotube. Supernatan dibuang dengan menggunakan aspirator. Untuk pemurnian DNA, ditambahkan etanol 70% dingin sebanyak 1 ml dan disentrifugasi 14.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang kembali menggunakan aspirator. Pemurnian DNA diulangi lagi dengan menggunakan etanol 100% dingin. Pada tahapan akhir pembuangan etanol, pelet DNA dikeringkan dengan sistem *vacum* selama 10 menit. Pelet DNA yang sudah dimurnikan kemudian dilarutkan dalam psd H₂O sebanyak 200 µl dan disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan pada tahapan lebih lanjut.

Purifikasi DNA dilakukan menggunakan metode presipitasi ulang seperti pada proses terakhir dari ekstraksi DNA, yaitu dengan mengambil larutan DNA sebanyak 50 µl dan menambahkan NaOAc sebanyak 5 µl dan *isopropanol* sebanyak 50 µl untuk mendapatkan DNA yang murni. Larutan dicampur dan didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit dan supernatan dibuang menggunakan aspirator. Untuk mencuci DNA dari kotoran, ditambahkan etanol 70% yang telah didinginkan sebanyak 1 ml dan kembali

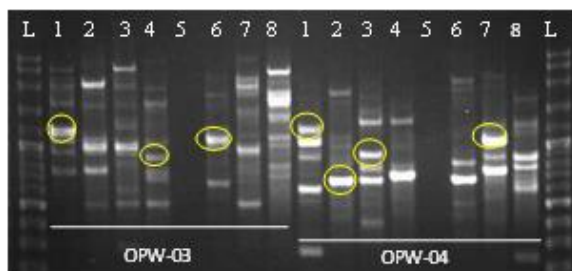
dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit, serta pembuangan supernatan menggunakan aspirator. Pencucian DNA diulangi sekali lagi dengan menambahkan etanol 100% (dingin). Setelah itu pelet dikeringkan dengan desikator selama 10 menit dan dilarutkan kembali pada psd H₂O sebanyak 50 µl dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam. Sampel DNA hasil purifikasi kemudian disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan.

Kuantifikasi dan kualifikasi DNA untuk mengetahui konsentrasi dan kualitas DNA yang telah diekstraksi dilakukan menggunakan mesin NanoVue (GE Healthcare). Nilai yang terbaca oleh mesin adalah konsentrasi DNA, rasio DNA yang secara otomatis dihitung oleh mesin berdasarkan nilai absorbansi setiap sampel pada panjang sinar 230 nm, 260 nm, 280 nm, dan 320 nm. Kualitas DNA diukur berdasar nilai absorbansinya pada panjang gelombang 260/280 nm. DNA diasumsikan memiliki kualitas yang baik jika mempunyai ratio antara 1,8 sampai 2,0. Konsentrasi DNA diukur dalam satuan ng/ml. Sampel DNA yang berkualitas baik kemudian diencerkan hingga mendapat konsentrasi sebesar 2,5 ng/µl untuk digunakan sebagai *template* dalam proses amplifikasi DNA.

2. Seleksi primer RAPD, amplifikasi DNA dan elektroforesis fragmen DNA

Pemilihan atau seleksi primer RAPD dilakukan sebelum melakukan amplifikasi PCR untuk mempelajari keragaman genetik andalas. Amplifikasi PCR untuk pemilihan primer dilakukan menggunakan delapan sampel yang dipilih secara acak mewakili beberapa populasi yang berbeda.

Jumlah primer RAPD yang digunakan pada tahap seleksi ini sebanyak 18 primer (data tidak disajikan). Pemilihan primer didasarkan pada kemampuannya dalam menghasilkan variasi (*polymorphism*) pola fragmen DNA (Gambar 3). Seleksi primer dalam penelitian ini dilakukan terhadap 18 primer RAPD dan menghasilkan enam primer polimorfik yang terpilih (Tabel 2).



Gambar 3. Pita DNA polimorfik (ditandai dengan lingkaran kuning), yang dihasilkan oleh proses amplifikasi DNA pada delapan pohon Andalas, menggunakan primer RAPD OPW-3 dan OPW-4

Amplifikasi DNA dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mempelajari keragaman genetik andalas dilakukan menggunakan enam primer polimorfik yang terpilih. Proses amplifikasi DNA dilakukan pada mesin PCR System 9600 (Applied Biosystems) dengan volume reaksi sebanyak 10 μ l. Adapun komposisi reagen PCR yang digunakan adalah 5x KAPATaq Extra PCR Buffer (KAPA); 0,3 mM dNTP; 1,75 mM MgCl₂; 1,25 U/50 μ l KAPATaq Extra Hot-start DNA Polymerase (KAPA); 10 pmol primer RAPD (sesuai Tabel 2) dan template DNA (2,5 ng/ μ l). Kondisi reaksi PCR terdiri dari: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 60 detik. Proses selanjutnya adalah 45 siklus PCR dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 37°C selama 30 detik dan pemanjangan fragmen DNA (*extension*) pada suhu 72°C selama 90 detik. Proses PCR diakhiri dengan proses pemanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72°C selama 5 menit.

Tabel 2. Daftar primer RAPD yang dipilih dari hasil tahapan skrining / seleksi primer

No	Nama primer	Sekuen (5'- 3')
1.	OPO-6	GGTCCCTGAC
2.	OPW-1	CTCAGTGTCC
3.	OPW-3	GTCCGGAGTG
4.	OPW-4	CAGAAGCGGA
5.	OPY- 6	AAGGCTCACC
6.	OPY-15	AGTCGCCCTT

Proses elektroforesis untuk pemisahan fragmen DNA hasil amplifikasi DNA, dilakukan

menggunakan agarose gel konsentrasi 1,2 % dengan pewarnaan *ethidium bromide*. Elektroforesis dilakukan di dalam buffer elektroforesis TBE yang dialiri listrik dengan tegangan 120 V selama kurang lebih 2,5 – 3 jam. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan menggunakan alat Gel Doc EQ *Imaging System* (BIORAD) dengan program Quantity One (BIORAD).

3. Analisis data

Analisis visual produk hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan pemberian skor, yaitu nilai 1 bila ada pita dan nilai 0 bila tidak ada pita. Data binary skor tersebut ditabulasi pada program EXCEL dan dikonversi dalam bentuk *txt* untuk digunakan sebagai input data pada program analisis keragaman genetik menggunakan POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999). Program analisis GenAlEx ver. 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) juga digunakan untuk mengukur jarak genetik dan melihat sebaran variasi genetik antar individu maupun antar populasi. Program analisa GenAlEx merupakan Add-Ins pada program EXCEL sehingga input data untuk program ini dalam bentuk *xls* data.

Program POPGENE menghitung nilai keragaman genetik dan jarak genetik berdasarkan *Nei's Gene Diversity* (1978) dan *Nei's Original Measures of Genetic Distance* (1978). Nilai keragaman genetik diperoleh dari perhitungan nilai heterosigositas (*h*) yang menggambarkan keragaman genetik dalam suatu populasi, sedangkan nilai rata-rata jarak genetik antara dua populasi menggambarkan keragaman genetik antar populasi. Analisis kluster mengelompokkan populasi dalam suatu konsep jarak genetik menggunakan metode UPGMA (*Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Averaging*). Hasil analisis kluster ditampilkan dalam bentuk dendrogram. Adapun program GenAlEx selain digunakan untuk menghitung jumlah alel (N_A), juga dapat mendeteksi adanya alel privat atau alel yang hanya dimiliki oleh satu populasi saja (P_A) dan mengetahui nilai *unbiased* heterosigositas

harapan (H_E). *Unbiased* heterozygosititas harapan menunjukkan keragaman gen di dalam populasi dengan mengabaikan sampel yang berkerabat hanya memperhitungkan ukuran sampel (Nurtjahjansih et al., 2020). Pengujian AMOVA (*analysis of molecular variance*) pada GenAEx dilakukan untuk melihat perbedaan keragaman genetik dalam populasi maupun antar populasi.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Seleksi primer RAPD dan alel polimorfik RAPD pada jenis andalas

Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA dari kambium jenis andalas berhasil diamplifikasi dan enam primer RAPD yang digunakan dalam penelitian ini cukup polimorfik dengan menghasilkan alel pada ukuran 300-1400 bp. Pada penelitian ini, secara keseluruhan,

sebanyak 52 alel polimorfik teramati dari 32 individu andalas dari lima populasi alam. Primer RAPD yang digunakan menghasilkan jumlah alel polimorfik yang berbeda, dengan kisaran 4-12 alel (Tabel 3). Jumlah alel polimorfik yang dihasilkan oleh enam primer RAPD pada penelitian ini lebih besar dibandingkan dengan jumlah alel poliformik yang dihasilkan oleh penelitian sebelumnya dengan jumlah primer RAPD yang sama, namun berbeda jenisnya. Penelitian sebelumnya mendapatkan 30 alel polimorfik dari primer OPA-14, OPA-16, OPA-17, OPA-18, SBH-13 dan SBH-19 menggunakan 24 individu andalas dari 3 populasi alam di Sumatera Barat (Pohan, 2008). Adapun penelitian serupa pada beberapa jenis *Morus* menggunakan 16 primer RAPD menghasilkan 61 alel polimorfik (Chikkaswamy & Prasad, 2012).

Tabel 3. Jumlah losi polimorfik dan ukuran lokus enam primer RAPD yang digunakan pada jenis andalas dari Jambi dan Sumatera Barat

No	Nama Primer	Jumlah alel polimorfik	Ukuran alel dalam bp (base-pair)
1.	OPO-6	12	300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200
2.	OPW-1	4	500, 600, 700, 1000
3.	OPW-3	10	300, 400, 450, 500, 600, 650, 700, 800, 900, 1000
4.	OPW-4	12	250, 300, 400, 450, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 1100
5.	OPY- 6	4	500, 600, 700, 900
6.	OPY-15	10	500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400
	Jumlah	52	

Tahapan pemilihan primer RAPD sebelum memulai penelitian menggunakan primer tersebut pada sampel yang lebih besar, merupakan tahapan yang penting untuk mendapatkan primer RAPD yang sesuai untuk setiap jenis tumbuhan yang berbeda. Penanda RAPD merupakan penanda DNA yang tidak stabil (Nurtjahjansih et al., 2020) serta *irreproducible* pada laboratorium yang berbeda (Penner et al., 1993), sehingga setiap laboratorium perlu mengembangkan metode dalam aplikasi penanda tersebut sebelum memulai kegiatan penelitian dengan jenis tumbuhan yang berbeda. Pemilihan primer RAPD berdasarkan hasil seleksi dari penelitian sebelumnya pada jenis tumbuhan yang sama

bisa dilakukan namun tahapan pengujian kondisi PCR perlu dilakukan terlebih dahulu. Pengujian awal dengan jumlah sampel yang kecil diperlukan untuk menghindari kegagalan proses amplifikasi DNA dengan jumlah sampel yang banyak.

B. Keragaman genetik pada populasi andalas

Pada penelitian ini keragaman genetik populasi andalas yang digambarkan melalui nilai heterosigositas (h) dihitung menggunakan POPGENE dan mendapatkan nilai yang bervariasi pada setiap populasi. Nilai heterosigositas berkisar antara $0,205 \pm 0,224$ (Halaban) hingga $0,351 \pm 0,160$ (Batipuah).

Adapun nilai rata-rata keragaman genetik jenis andalus di seluruh populasi alam adalah sebesar $0,399 \pm 0,121$ (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa nilai keragaman genetik dari sampel berupa kambium ini menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan penelitian sebelumnya menggunakan penanda yang sama (RAPD), dimana nilai h berkisar antara $0,162 \pm 0,185$ hingga $0,179 \pm 0,202$ (Pohan, 2008).

Penggunaan penanda lain, misalnya *Sequence Related Amplified Polymorphism*

(SRAP), yang telah diujikan pada jenis andalus dari tiga populasi di Sumatera Barat mendapatkan nilai keragaman genetik yang lebih rendah ($h=0,168$) (Aseny et al., 2021). Penelitian menggunakan penanda RAPD dan *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) pada beberapa jenis *Morus* mendapatkan nilai keragaman genetik *M. macrourea* yang rendah, baik pada penanda RAPD ($h = 0,15 \pm 0,19$) maupun pada penggunaan penanda ISSR ($h= 0,16 \pm 0,19$) (Chikkaswamy & Prasad, 2012).

Tabel 4. Rata-rata nilai parameter keragaman genetik dalam populasi andalus di Kerinci (Jambi), Tanah Datar dan Lima Puluh Kota (Sumatera Barat) yang dihitung menggunakan POPGENE.

Populasi	Jumlah sampel	h	lokus polimorfik	plp (%)
Gunung Kerinci, <i>Kerinci</i>	5	0,325 \pm 0,180	38	73,08
Sunggayang, <i>Tanah Datar</i>	11	0,332 \pm 0,167	45	86,54
Tanjung Bonai, <i>Tanah Datar</i>	5	0,333 \pm 0,166	46	88,46
Batipuah, <i>Tanah Datar</i>	8	0,351 \pm 0,160	43	82,69
Halaban, <i>Lima Puluh Kota</i>	3	0,205 \pm 0,224	24	46,15
Total	32	0,399 \pm 0,121	51	98,08

Keterangan: na = jumlah alel yang teramati; ne = jumlah efektif alel; h = keragaman genetik berdasarkan Nei's (1973); plp = prosentasi lokus polimorfik

Tingginya nilai heterosigositas atau keragaman genetik yang terdeteksi pada penelitian ini jika dibandingkan dengan penelitian yang serupa sebelumnya (Pohan, 2008) dapat disebabkan karena jenis penanda RAPD yang berbeda, meskipun jumlah primer yang digunakan sama (6 primer). Hal ini juga sesuai dengan jumlah alel polimorfik yang teramati pada penelitian ini lebih banyak (52 alel), sedangkan penelitian sebelumnya (Pohan, 2008) mendapatkan jumlah alel polimorfik lebih sedikit (30 alel).

Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian dapat memberikan pengaruh pada nilai keragaman genetik seperti yang teramati pada jenis *Aquilaria malaccensis* (Banu et al., 2015), namun hal ini tidak teramati pada penelitian ini. Nilai keragaman genetik populasi Gunung Kerinci ($0,325 \pm 0,180$) dan Tanjung Bonai ($0,333 \pm 0,166$) yang masing-masing terdiri dari 5 sampel, tidak jauh berbeda dengan nilai keragaman genetik pada populasi Sunggayang ($0,332 \pm 0,167$) dan Batipuah

($0,351 \pm 0,160$) yang terdiri dari 11 dan 8 sampel andalus. Seiring dengan hal tersebut populasi Tanjung Bonai dan Gunung Kerinci, juga memiliki persentase alel polimorfik yang tinggi meskipun jumlah individunya hanya 5. Nilai keragaman genetik paling rendah yang teramati pada penelitian ini ditemukan pada populasi Halaban ($0,205 \pm 0,224$) dengan jumlah sampel paling sedikit (3 pohon), hal ini didukung oleh persentase jumlah alel polimorfik yang rendah. Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian keragaman genetik andalus sebelumnya oleh Pohan (Pohan, 2008) berkisar antara 6–10, namun nilai keragaman genetik yang teramati cukup rendah ($0,162 - 0,179$). Hal ini turut mendukung bahwa jumlah sampel yang rendah tidak selalu menyebabkan nilai heterosigositas menjadi rendah.

Penggunaan sampel materi genetik dari kambium seperti yang dilakukan pada penelitian ini juga dapat memberikan pengaruh pada nilai keragaman genetik. Pengambilan sampel kambium lebih mudah dilakukan dibandingkan

dengan pengambilan sampel daun yang sulit dijangkau terutama pada pohon-pohon yang tinggi atau tidak tersedianya daun saat pohon andalas meranggas, dimana hal ini dapat berlangsung hingga satu bulan (Anwar & Ismanto, 2012).

Pada pengamatan alel privat menggunakan program GeneAIEx diketahui bahwa setiap populasi yang diuji tidak memiliki alel privat (data tidak ditunjukkan). Penghitungan heterosigositas harapan *unbiased* (u_{He}) juga dilakukan menggunakan program tersebut, untuk melihat keragaman gen di dalam populasi dengan jumlah sampel yang tidak seragam. Nilai u_{He} yang teramati pada penelitian ini adalah sebesar $0,381 \pm 0,033$. Nilai keragaman genetik ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan jenis lain misalnya pada ulin ($u_{He} = 0,258 \pm 0,012$) (Nurtjahjaningsih et al., 2017), namun sedikit lebih rendah dibandingkan hasil yang diperoleh menggunakan penanda SSR pada jenis kacang gude dengan nilai $u_{He} = 0,46 \pm 0,002$ (Kimaro et al., 2020). Penggunaan parameter keragaman genetik menggunakan nilai u_{He} dapat lebih menggambarkan kondisi di lapangan pada penggunaan dengan analisis keragaman genetik dengan jumlah sampel yang terbatas maupun tidak seimbang (Nurtjahjaningsih et al., 2017). Pada penelitian ini nilai heterosigitas (h) yang diperoleh dengan program POPGENE dengan nilai heterosigositas *unbiased* (u_{He}) menggunakan program GeneAIEx menunjukkan nilai yang tidak jauh berbeda baik pada setiap populasi, maupun rata-rata semua populasi, namun nilai u_{He} umumnya lebih besar daripada nilai h (data tidak ditampilkan).

C. Keragaman genetik antar populasi andalas

Jarak genetik (D) merupakan parameter yang digunakan untuk mengetahui perbedaan genetik antar populasi. Pada penelitian ini jarak genetik dihitung menggunakan program POPGENE yang menghitung jarak genetik sesuai dengan rumus yang diajukan oleh Nei

(1972). Nilai D yang diperoleh pada penelitian ini (tabel data tidak ditampilkan), digunakan untuk menyusun dendrogram menggunakan metode UPGMA yang terdapat pada program POPGENE (Gambar 4). Nilai D yang teramati menunjukkan jarak genetik antar populasi yang bervariasi antara 0,113-0,269. Jarak genetik terjauh ditunjukkan oleh populasi Gunung Kerinci dengan empat populasi lain di Sumatera Barat (0,217-0,269). Populasi Batipuah juga memiliki jarak genetik (D) diatas 0,20, dengan dua populasi lain dari Tanah Datar, namun populasi ini lebih dekat dengan populasi Halaban dari wilayah administrasi yang lain (Lima Puluh Kota) dengan nilai $D = 0,113$. Jarak genetik yang rendah juga teramati antara Sunggayang dan Tanjung Bonai ($D = 0,118$) dan tertinggi 0,269 (antara Halaban dan Gunung Kerinci).



Gambar 4. Dendrogram yang disusun menggunakan nilai jarak genetik dengan rumus Nei's (Nei, 1972) dengan metode UPGMA pada program POPGENE.

Uji Amova menggunakan program GeneAIEx dilakukan untuk mengetahui kontribusi keragaman genetik antara individu maupun antar populasi. Keragaman genetik yang teramati pada jenis andalas pada penelitian ini 91% merupakan kontribusi dari keragaman genetik antara individu dan hanya 9% merupakan kontribusi variasi genetik antar populasi (Tabel 5). Penghitungan serupa menggunakan program POPGENE dilakukan dengan mengukur nilai parameter keragaman genetik berupa keragaman gen total/semua individu dari semua populasi (H_T), keragaman gen rata-rata pada setiap populasi (H_S), dan perbedaan gen antar populasi (G_{ST}), kemudian

akan didapatkan nilai keragaman gen yang terdistribusi di dalam setiap populasi (D_{ST}). Penelitian ini mendapatkan nilai $H_T = 0,399 \pm 0,014$; $H_s = 0,308 \pm 0,011$; $G_{ST}=0,228$, dan nilai $D_{ST} = 0,091$ (tabel data tidak ditampilkan). Hal ini sesuai dengan hasil yang teramati pada penelitian sebelumnya pada jenis yang sama

menggunakan penanda yang sama ($H_T = 0,225$; $H_s = 0,170$; $G_{ST}=0,244$; $D_{ST}=0,055$) yang dilakukan oleh Pohan (Pohan, 2008) dan dengan penanda yang berbeda ($H_T = 0,209$; $H_s = 0,155$; $G_{ST}=0,249$; $D_{ST}=0,064$) yang dilakukan oleh Chikkaswamy dan Prasad (Chikkaswamy & Prasad, 2012).

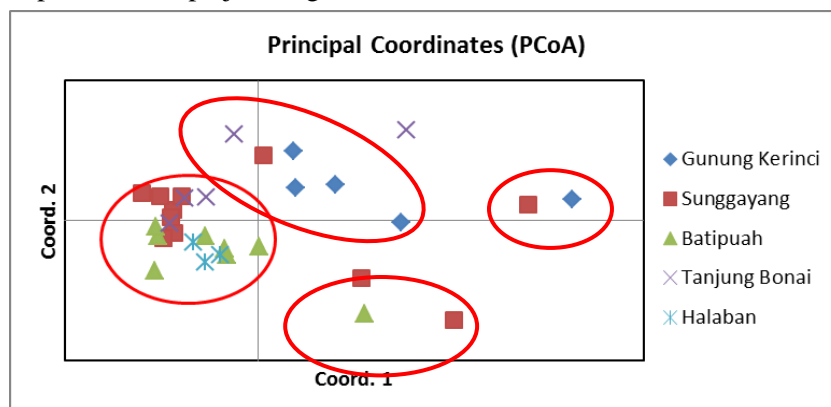
Tabel 5. Amova (*Analysis of Molecular Variance*) antar populasi dan di dalam populasi

Sumber keragaman	df	SS	MS	Variance (%)	P value
Antar populasi	4	77.451	19.363	9%	0,001***
Antar individu (dalam populasi)	27	325.861	12.069	91%	0,001***
Total	31	403.313		100%	

Keterangan : df = derajat bebas, SS = jumlah kuadrat, MS = rata-rata kuadrat, *** = berbeda nyata pada taraf uji 0,1%

Nilai H_s pada jenis andalas lebih besar dibandingkan dengan nilai D_{ST} , menunjukkan bahwa keragaman genetik antar individu andalas lebih besar daripada keragaman genetik antar populasi atau dengan kata lain karakter genetik antara populasi andalas di Sumatera Barat dan Jambi saling menyerupai satu sama lain. Meskipun jarak genetik antar populasi bervariasi dan memisahkan setiap populasi namun jika dilihat nilainya tidak terlalu besar ($<0,3$). Jarak geografis antar populasi tidak terlihat memberikan dampak terhadap jarak genetik

misalnya antara Batipuah dengan Halaban dan antara Gunung Kerinci dengan empat populasi yang lain, memiliki jarak yang cukup jauh, namun jarak genetik tidak cukup besar. Pada semua penelitian keragaman genetik andalas menggunakan penanda RAPD (Pohan, 2008) ataupun penanda lain (Chikkaswamy & Prasad, 2012) didapatkan hasil yang sama bahwa keragaman genetik antar populasi lebih kecil dari pada keragaman genetik antar individu, terlepas dari asal populasi yang diamati.



Gambar 5. Analisis *Principal Coordinates* (PCoA) berdasarkan jarak genetik 32 individu andalas dari 5 alam

Analisis *Principal Coordinates* (PCoA) menggunakan program GeneAIEx dilakukan terhadap semua individu andalas sebanyak 32 untuk melihat sebaran individu berdasarkan

jarak genetik antar individu. Pengujian AMOVA telah membuktikan bahwa tidak ada variasi genetik antar populasi sehingga pada analisis PcoA juga terlihat sebaran individu andalas

yang tidak berkelompok sesuai dengan asal populasinya (Gambar 5). Pengelompokan individu dalam 4 klaster menunjukkan variasi antar individu yang cukup tinggi dari setiap populasi. Klaster terbesar dengan 30 anggota yang berasal dari 4 populasi yang berbeda (Batipuah, Sunggayang, Halaban dan Tanjung Bonai). Individu andalas dari Gunung Kerinci mengelompok menjadi 2 bergabung beberapa individu dari populasi lain, sedangkan individu dari Sunggayang menempati semua klaster yang ada. Gambaran analisis PCoA tersebut turut memperkuat kesimpulan bahwa nilai keragaman genetik andalas dipengaruhi oleh variasi genetik antar individu.

Kondisi pembungaan yang tidak serempak seperti yang teramati pada andalas (Anwar & Ismanto, 2012), berpeluang terjadinya peningkatan *outcrossing* yang akan berdampak pada menurunnya nilai keragaman genetik populasi (Nurtjahjaningsih et al., 2017). Namun hal ini mungkin terjadi pada andalas karena merupakan tumbuhan yang berumah dua (*dioecious*) (Dahlan, 1993). Studi mengenai sistem penyerbukan pada tanaman andalas tidak dapat membuktikan adanya peran serangga dalam proses penyerbukan, sehingga diperkirakan penyerbukan dapat terjadi karena angin yang membawa serbuk sari dari pohon jantan ke pohon betina (Anwar & Ismanto, 2012). Studi tersebut juga memperkirakan terjadinya proses reproduksi aseksual melalui pembentukan biji apomiksis, dimana biji dapat terbentuk pada bunga betina tanpa melalui proses penyerbukan dan pembuahan. Pembentukan biji apomiksis akan menghasilkan individu yang memiliki struktur genetik sama seperti induknya. Pembentukan biji apomiksis banyak ditemukan pada jenis tumbuhan berkayu yang bersifat *dioecious* yang memiliki bunga berlimpah namun jauh dari sumber serbuk sari (Molloy, 2019).

Keragaman genetik yang cukup tinggi dan tersebar pada beberapa populasi andalas pada jarak geografis yang luas mungkin disebabkan oleh keragaman genetik andalas yang sudah

menyebarkan sejak awal. Perkawinan silang antar individu dalam populasi dibatasi oleh kondisi pembungaan yang tidak serempak. Perkawinan silang dari populasi luar juga sulit dibayangkan karena belum diketahuinya jenis polinator untuk andalas. Terbentuknya biji apomiksis pada andalas mungkin turut berpengaruh dalam mempertahankan keragaman genetik yang dimiliki oleh setiap individu, meskipun jumlah individu dalam populasi semakin berkurang.

D. Upaya konservasi jenis andalas yang dapat dilakukan berdasarkan informasi keragaman genetik

Kegiatan konservasi andalas telah dimulai dengan banyaknya penelitian yang dilakukan pada jenis andalas. Penelitian pada berbagai aspek genetik antara lain studi keragaman genetik (Aseny et al., 2021; Pohan, 2008; Syamsuardi, 2015), identifikasi jenis melalui penanda barkoding (Erma Nuratika, Nindi Aseny, Syamsuardi, Nurainas, Fitmawati, 2020), mempelajari sistem reproduksi (Anwar & Ismanto, 2012) serta pengembangan metode pembiakan vegetatif (Rahmatullah, 2018). Distribusi pohon andalas yang tersisa di populasi alam juga telah diamati (Alhadi & Zulmardi, 2021; Mahdane, 2013), dan menemukan bahwa masih terdapat potensi genetik andalas yang cukup besar misalnya di Taman Nasional Kerinci Seblat yang dapat digunakan sebagai tambahan materi genetik dalam pembangunan plot konservasi andalas.

Beberapa penelitian mengenai keragaman genetik yang dilakukan pada populasi andalas di wilayah Sumatra bagian tengah meliputi Jambi dan Sumatra Barat telah menemukan bahwa keragaman genetik individu andalas lebih dominan daripada keragaman genetik antar populasi. Pada beberapa populasi andalas yang diamati, tidak menunjukkan adanya variasi genetik antar populasi, sehingga sumber genetik dalam konservasi dapat ditingkatkan jumlahnya dari suatu populasi tertentu saja. Namun pengambilan materi genetik pada populasi-populasi yang lain juga perlu dilakukan

mengingat ada beberapa karakter genetik yang hanya terdapat pada populasi tertentu saja, meskipun tidak muncul dalam alel privat. Program konservasi di masa mendatang sebaiknya dapat melibatkan materi genetik dari beberapa populasi lain seperti di Sumatera bagian Utara maupun Selatan.

Jenis andalas merupakan tegakan yang sulit berkembang biak secara alami karena anakan jarang ditemukan di populasi alam (Alhadi & Zulmardi, 2021), karena itu pengembangan materi genetik melalui pembiakan vegetatif sebaiknya lebih ditingkatkan, terutama pada pohon-pohon yang tumbuh pada lahan masyarakat mengingat potensi ancaman terhadap hilangnya materi genetik tersebut sangat besar.

Penelitian mengenai reproduksi seksual dan aseksual masih perlu dilakukan, terutama pada individu-individu yang ada pada lahan konservasi *ex-situ* untuk dapat mempertahankan atau bahkan meningkatkan potensi keragaman genetik jenis andalas. Penggunaan materi genetik pohon jantan dan pohon betina perlu dilakukan sehingga dapat meningkatkan terjadinya penyerbukan silang sehingga pembentukan biji apomiksis dapat ditekan.

IV. KESIMPULAN

Enam primer RAPD yang digunakan pada penelitian ini memberikan jumlah alel polimorfik yang cukup banyak, yang dapat memberikan gambaran nilai keragaman genetik yang lebih baik. Keragaman genetik andalas dari populasi alam di Sumatera bagian tengah dalam kategori nilai sedang dan lebih banyak dipengaruhi oleh keragaman genetik antar individu dibandingkan keragaman genetik antar populasi. Hasil penelitian awal ini dapat digunakan sebagai dasar untuk mempelajari keragaman genetik andalas dari populasi yang lain serta dapat menjadi informasi tambahan dalam penyusunan strategi konservasi yang lebih baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh ITTO Project PD 710/13 Rev.1 (F) *Promoting Conservation of Selected High-Value Indigenous Species of Sumatra*. Kami mengucapkan terima kasih kepada Wahyunisari dan Haryanti yang telah membantu dalam pekerjaan di laboratorium dan pihak-pihak yang telah membantu dalam kegiatan pengambilan sampel di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alhadi, D., & Zulmardi. (2021). Sebaran spasial andalas (*Morus macroura* Miq.) di kawasan hutan konservasi Taman Nasional Kerinci Seblat. *Journal of Sumatera Tropical Forest Research (Strofor)*, 5(1), 694–704.
- Anwar, A., & Ismanto, S. D. (2012). Kajian pola reproduksi sebagai langkah awal konservasi dan pemuliaan tanaman andalas (*Morus macroura* Miq.). *Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya Genetik Dan Pemuliaan Tanaman*, 640–647.
- Aseny, N., Syamsuardi, S., & Nurainas, N. (2021). Molecular characterization of andalas tree dioecious plant [*Morus macroura* Miq.] using SRAP marker. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 741(1), 1–7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/741/1/012050>
- Banu, S., Baruah, D., Bhagwat, R. M., Sarkar, P., Bhwmick, A., & KaoN, Y. (2015). Analysis of genetic variability in *Aquilaria malaccensis* from Bramhaputra valley, Assam, India using ISSR marker. *Flora*, 217, 24–32.
- Chikkaswamy, B. K., & Prasad, M. P. (2012). *Evaluation of genetic diversity and relationships in mulberry varieties using RAPD and ISSR molecular markers*. 3(3), 62–70.
- Dahlan, S. (1993). Studi pendahuluan perbungaan pohon andalas (*Morus macroura* Miq.). *Jurnal Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 2(2), 9–13.
- Dahlan, S. (1994). Mengenal *Morus macroura* MIQ. maskot flora Sumatera Barat. *Jurnal Penelitian Andalas*, 15, 17–20.
- Erma Nuratika, Nindi Aseny, Syamsuardi, Nurainas, Fitmawati, F. (2020). Clarification of Sumatran mulberry (*Morus macroura* var. *macroura*, Moraceae) from West Sumatra,

- Indonesia using Nucleus Ribosomal ITS (Internal Transcribed Spacer) Gene. *Indian Journal Of Agricultural Research*, 54, 635–640.
- Kimaro, D., Melis, R., Sibiyi, J., Shimelis, H., & Shayanowako, A. (2020). Analysis of genetic diversity and population genetic structure of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp] accessions using SSR markers. *Plants*, 9(1643), 1–14.
- Mahdane, A. (2013). *Potensi andalas* (*Morus macroura* Miq.) di tanah Ulayat Kecamatan X Koto Kabupaten Tanah Datar Sumatera Barat. Institut Pertanian Bogor.
- Molloy, B. (2019). Apomixis in indigenous New Zealand woody seed plants and its ecological and wider significance. *New Zealand Journal of Ecology*, 43, 1–11.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321–4325.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106, 283–291.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70, 3321–3323.
- Nurtjahjaningsih, I., Sukartiningsih, Saranti, A., Sulistyawati, P., & Rimbawanto, A. (2017). Kekerabatan genetik anakan alam ulin (*Eusideroxylon zwageri* TEIJSM. & BINN.) menggunakan penanda Random Amplified Polymorphism DNA. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 11(1), 25–31.
- Nurtjahjaningsih, I., Widyatmoko, A., Haryjanto, L., Yuliah, & Hadiyan, Y. (2020). Genetic diversity of *Aquilaria malaccensis* from Western Bangka and its implication for manage seed stands. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 14(2), 121 – 128.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539.
- Penner, G. A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. J., & Fedak, G. (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *Genome Research*, 2(4), 341–345. <https://doi.org/10.1101/gr.2.4.341>
- Pohan, S. (2008). *Penentuan variasi genetik dalam populasi tumbuhan andalas* (*Morus macroura* Miq.) dengan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA*). Universitas Andalas.
- Priambudi, A. (2015). Kebijakan yang menaungi konservasi jenis-jenis lokal Sumatra. *Proceeding Workshop of Improving Appreciation and Awareness on Conservation of High Value Indigenous Wood Species of Sumatra*, 3–10.
- Rahmatullah, W. (2018). Respon pertumbuhan tunas andalas (*Morus macroura* Miq.) hasil enkapsulasi pada suhu penyimpanan yang berbeda. *Jurnal Riset Sains Dan Teknologi*, 2(1), 9–14.
- Roskov, Y., Abucay, L., Orrel, T., Nicholson, D., Flann, C., Bailly, N., Kirk, P., Burgoin, T., DeWalt, R., W, D., & A, D. W. (2014). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2014 Annual Checklist*. Digital Resource at Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands.
- Shiraishi, S., & Watanabe, A. (1995). Identifikasi of chloroplast genome between *Pinus densiflora* Sieb et Zucc and *P. thumbergii* Parl based on the polymorphism in rbct gene. *Journal of Japanese Forestry Society*, 77, 429–436.
- Syamsuardi. (2015). Diversitas morfologis dan genetik pohon andalas (*Morus macroura* Miq.), flora identitas Sumatera Barat, dan pemanfaatannya secara berkelanjutan. *Proceeding Workshop of Improving Appreciation and Awareness on Conservation of High Value Indigenous Wood Species of Sumatra*, 42–53.
- Widyatmoko, A., & Yudohartono, T. P. (2015). Teknik eksplorasi untuk konservasi jenis lokal Sumatra bernilai ekonomi tinggi. *Improving Appreciation and Awareness on Conservation of High Value Indigenous Wood Species of Sumatra*, 11–19.
- Yeh, F. C., Yang, R.-C., Boyle, T. B. J., Ye, Z.-H., & Mao, J. X. (1999). *POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.