**PENYEBARAN SERBUK SARI DAN KERAGAMAN GENETIK BIJI YANG
DIHASILKAN KEBUN BENIH *Pinus merkusii* DI JEMBER**

*Pollen movement and genetic diversity of seed crops in a seedling seed orchard of
Pinus merkusii in Jember*

I.L.G. Nurtjahjaningsih

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan Yogyakarta

Jl. Palagan Tentara Pelajar Km. 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta 55582

Telp. (0274) 895954, 896080, Fax. (0274) 896080

ABSTRACT

*Pollen movement is a critical determinant in population genetic, plays important role in forest tree improvement and conservation genetic. This study was conducted to understand physical pollen movement and to determine seasonal genetic diversity of seed crops in a seedling seed orchard (SSO) of *Pinus merkusii*, located at Jember, East Java. Physical pollen movements were measured using 25 pollen traps conducted at three flowering seasons i.e. August 2005, November 2005 and March 2006. For offspring populations, seeds were collected at June, September and December that represented mating in each pollen observation season. Then, genetic diversity of the seed crops were analyzed using five microsatellites markers for *P. merkusii*. Results showed that number of pollen grains was significantly difference among seasons, but insignificant to both trap locations and interaction season-trap locations. The trapped pollen number was low in both August and March, but it was abundant in November. Value of gene diversity of offspring was highest in August ($H_E = 0.402$) compared to other seasons. This study showed that physical pollen movement in the SSO might synchronize, however level of the H_E varied among seasons. Seasonal variation in mating status was briefly discussed.*

Key Words : *Pollen movement, genetic diversity, seedling seed orchard, *Pinus merkusii**

ABSTRAK

Pola penyebaran serbuk sari merupakan faktor penting dalam populasi genetik, memegang peranan penting dalam pemuliaan pohon dan konservasi genetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penyebaran serbuk sari secara fisik dan keragaman genetik biji yang dihasilkan di kebun benih *Pinus merkusii* yang terletak di Jember, Jawa Timur. Penyebaran serbuk sari secara fisik diukur menggunakan 25 perangkap serbuk sari dan dilakukan di 3 musim berbunga, yaitu Agustus 2005, November 2005 dan Maret 2006. Sebagai populasi keturunan, biji diunduh di bulan Juni, September dan Desember yang merupakan hasil penyerbukan terbuka pada saat pengamatan serbuk sari.

Keragaman genetik biji-biji tersebut dianalisa menggunakan 5 penanda *microsatellite* untuk *P. merkusii*. Hasil penelitian menunjukkan jumlah serbuk sari secara signifikan berbeda antar musim, tetapi tidak signifikan baik antar lokasi *trap* maupun interaksi antara musim dan lokasi *trap*. Serbuk sari yang tertangkap mempunyai jumlah yang sedikit di bulan Agustus dan Maret, tetapi jumlahnya berlimpah di bulan November. Keragaman genetik populasi keturunan mempunyai level yang paling tinggi di bulan Agustus ($H_E = 0,402$) dibanding bulan lainnya. Penelitian ini menunjukkan penyebaran serbuk sari secara fisik yang serempak di kebun benih, namun nilai keragaman genetik biji yang dihasilkan berbeda-beda setiap musim. Variasi status perkawinan di kebun benih didiskusikan secara singkat.

Kata Kunci : Penyebaran serbuk sari, keragaman genetik, kebun benih semai, *Pinus merkusii*

I. PENDAHULUAN

Kebun benih adalah hutan tanaman yang dibangun untuk menghasilkan benih yang secara genetik dimuliakan dan digunakan untuk tujuan penghutanan kembali dan tujuan komersial lainnya. Untuk menjamin sebuah kebun benih menghasilkan benih yang baik secara kuantitas dan kualitas, beberapa asumsi mengenai pola perkawinan *panmixia* (acak dan seimbang) harus dapat dipastikan. Pola perkawinan harus acak, dimana tidak ada indikasi memilih pasangannya maupun menyerbuki sendiri, dan kontribusi yang seimbang antar tetuanya. Melalui perkawinan *panmixia*, sifat genetik terpilih dan keragaman genetik dari tetuanya dapat dipertahankan pada populasi keturunannya. Namun, kondisi ideal tersebut jarang terjadi di kebun benih (Chaix *et al.*, 2003), sebaliknya yang justru terjadi adalah penyerbukan sendiri (El-Kassaby *et al.*, 1988), memilih pasangannya, dan kontribusi yang tidak seimbang antar tetuanya (Burczyk *et al.*, 1998).

Pola pergerakan *gene* (*gene flow*) melalui serbuk sari menunjukkan jarak dan jumlah serbuk sari yang berkontribusi pada sistem perkawinan, sehingga pola pergerakan *gene* ini menentukan keragaman dan struktur genetik benih yang dihasilkan (Adams, 1992). Studi pola penyebaran serbuk sari yang telah dilakukan di kebun benih di daerah temperate, dimana pembungaan terjadi sekali dalam setahun, menunjukkan bahwa pola penyebaran serbuk sari jauh dari seimbang (Choi *et al.*, 2004; Burczyk *et al.*, 1998). Idealnya, penyebaran serbuk sari harus tanpa batas, sehingga meningkatkan kondisi ideal dari suatu sistem perkawinan. Namun sebaliknya, apabila penyebaran serbuk sari terhalang, maka akan mengganggu kondisi ideal tersebut, sehingga meningkatkan *inbreeding* (El-Kassaby *et al.*, 1988), embrio aborsi (O'Reilly *et al.*, 1982; Bilir *et al.*, 2002), biji tanpa embrio (El-Kassaby *et al.*, 1984) dan kontaminasi serbuk sari yang semua itu akan menurunkan nilai genetik benih

yang dihasilkan dari kebun benih (Burczyk dan Prat, 1997). Penelitian-penelitian sebelumnya melaporkan bahwa penyebaran serbuk sari yang terbatas dapat disebabkan karena perbedaan phenology pembungaan antar klon yang berasal dari provenan yang berbeda (Choi *et al.* 2004; Kassaby *et al.* 1984; Burczyk *et al.* 2002; Chaix *et al.*, 2003) dan produksi bunga jantan yang sedikit (Burczyk dan Chalupta, 1997; Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004).

Pinus merkusii merupakan satu-satunya genus Pinus yang tumbuh secara alami di daerah khatulistiwa seperti Indochina, Thailand, Myanmar, Pilipina dan Indonesia, bahkan bisa melalui ke sebelah selatan garis khatulistiwa, yaitu di Gunung Kerinci (Cooling, 1968). Oleh karena suhu dan pencahayaan sinar matahari di daerah khatulistiwa mempunyai fluktuasi yang tidak berbeda jauh sehingga Pinus jenis ini dapat memproduksi bunga dan buah sepanjang tahun (Mirov, 1967). Seperti pada konifer lainnya, penyerbukan pada *P. merkusii* dibantu oleh angin. Di Indonesia, kebun benih semai untuk jenis ini dibangun pada tahun 1978-1983, dimana merupakan konversi dari uji keturunan yang melibatkan 1.000 pohon plus yang ada di hutan tanaman di Pulau Jawa (Soeseno, 1988). Namun demikian, *P. merkusii* yang ada di Pulau Jawa berasal dari satu sub populasi di Aceh (Siregar dan Hattermen, 2005), sehingga pohon induk di kebun benih mempunyai kekerabatan yang tinggi secara genetik (Nurtjahjaningsih *et al.*, 2007). Selain itu, pohon induk berasal dari ras lahan sehingga pertumbuhan dan pembungaannya sudah beradaptasi dengan lingkungan eksotiknya (untuk review Zobel dan Talbert, 1991). Dari penelitian di atas mengindikasikan ada ke-

ungkinan pohon induk di kebun benih mempunyai karakter pembungaan yang sama. Namun, di hutan alam di Thailand, *P. merkusii* cenderung mempunyai tingkat *selfing* yang tinggi karena karakter pembungaan yang tidak serempak (Changtragoon dan Finkeldey, 1995). Selain itu, telah dilaporkan pula bahwa banyaknya produksi bunga jantan sering berkorelasi dengan kelimpahan serbuk sari (Burczyk dan Chalupta, 1997). Apabila karakter pembungaan yang tidak serempak terjadi secara alami pada *P. merkusii*, maka penyebaran serbuk sari di kebun benih ada kemungkinan tidak serempak. Namun, informasi penyebaran serbuk sari di kebun benih *P. merkusii* belum banyak dilaporkan.

Penelitian tentang pentingnya menduga penyebaran serbuk telah banyak dilakukan dengan beberapa metode pendekatan. Penyebaran serbuk sari bisa diukur secara tidak langsung yaitu mengukur penyebaran serbuk sari secara fisik menggunakan perangkap (*trap*). Selain biayanya tidak mahal, penggunaan perangkap serbuk sari ini juga mudah dilakukan. Walaupun pendugaan dengan cara ini bersifat kasar, namun penyebaran serbuk sari menggunakan *trap* dapat menduga pola penyebaran serbuk baik di populasi alam maupun di kebun benih (Adams, 1992). Selain itu, untuk memberikan penilaian yang lebih akurat, pendugaan penyebaran serbuk sari dapat dilakukan secara langsung terhadap biji-biji hasil perkawinan menggunakan analisa isozyme atau penanda DNA, meskipun analisa ini memerlukan waktu dan biaya yang lebih banyak.

Penanda *microsatellite* atau SSR (*simple sequence repeat*) adalah penanda *co-dominant* dan mempunyai *polymorphism* yang tinggi. Oleh

karenanya, penanda DNA jenis ini merupakan penanda yang sangat kuat untuk menduga keragaman genetik dan penyebaran serbuk sari baik di populasi alam maupun di kebun benih (Doy dan Ashley, 1998).

Analisa tetua menggunakan penanda DNA sering digunakan untuk menduga penyebaran serbuk sari secara langsung. Namun analisa ini harus menggunakan penanda *microsatellite* yang mempunyai pembeda yang tinggi terhadap kandidat-kandidat tetuanya (*paternity exclusion*, Devlin & Ellstrand, 1990; Dow & Ashley, 1998). Sebagai alternatif, penyebaran serbuk sari dapat diduga melalui parameter keragaman genetik dengan analisa isozyme atau penanda *microsatellite* meskipun tingkat *polymorphism*-nya rendah (El-Kassaby *et al.* 1984; Nurtjahjaningsih *et al.*, 2007).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui penyebaran serbuk sari secara fisik dan menetapkan keragaman genetik biji yang dihasilkan di kebun benih *P. merkusii*. Oleh karena penyebaran serbuk sari, baik secara fisik maupun analisa genetika ini dapat memprediksi kemungkinan status perkawinan yang terjadi di kebun benih, maka hasil penelitian ini bisa diaplikasikan untuk meningkatkan efisiensi manajemen kebun benih untuk menghasilkan benih yang berkualitas.

II. BAHAN DAN METODE

A. Deskripsi Plot Pengamatan

Penelitian ini dilakukan di kebun benih *P. merkusii* yang terletak di Jember, Jawa Timur, 600 meter diatas permukaan laut (113° 52' U, 7° 67'S). Pada awal penanaman, kebun benih ini

menggunakan 1.000 famili, 10 blok ulangan per tahun tanam, dan 5 *treeplot* (Soeseno, 1988). Setelah seleksi akhir, jumlah total famili /pohon di kebun benih sekitar 600 famili atau 6.000 pohon. Luas kebun benih 96 ha dengan topografi datar, dikelilingi oleh jalur isolasi berupa hutan tanaman *Swietenia mahagony*, *Eucalyptus* spp. dan *P. merkusii*.

Kebun benih *P. merkusii* dibangun selama 6 tahun penanaman (1978-1983) dengan komposisi dan jumlah famili yang berbeda pada setiap tahun tanam. Studi ini dilakukan di 6 blok yang terletak di tengah kebun benih tepatnya di dua tahun tanam yaitu 1979 dan 1980 (Gambar 1, kanan). Plot pengamatan berukuran 250 m x 250 m, dan terdiri dari 4-6 pohon, 145 famili sehingga jumlah total 664 pohon.

Masing-masing posisi pohon digambarkan menggunakan metode garis transek. Data x, y yang menunjukkan posisi pohon dianalisa menggunakan *Microimages TNTMips software version 6.9* (MicroImages Inc.) (Gambar 1, kiri).

Gambar 1. Plot pengamatan di tengah kebun benih *P. merkusii* (kanan). Lokasi perangkat serbuk sari diletakkan secara acak di plot pengamatan (kiri). Lokasi 44 pohon induk yang diambil bijinya untuk analisa DNA (kiri)

Data curah hujan dan data angin (arah dan kecepatan) masing-masing digunakan sebagai data pendukung mengingat pola penyebaran

serbuk sari sering dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti faktor-faktor di atas. Kondisi rata-rata curah hujan pada tahun 2005 dan 2006 dari empat stasiun Badan Meteorologi dan Geofisika (BMG) terdekat dengan kebun benih seperti terlihat pada Grafik 1.

Grafik 1. Data curah hujan diambil dari stasiun BMG terdekat dengan plot pengamatan

Arah dan kecepatan angin diukur menggunakan alat sensor angin model 034 (*Met One Instrument*). Alat ini dipasang di atas pohon yang terletak di tengah-tengah plot pengamatan selama pengamatan penyebaran serbuk sari (dua minggu). Data arah dan kecepatan angin pada bulan November 2005 dan Maret 2006 dilihat di Grafik 2.

B. Pengukuran jumlah serbuk sari

Pengamatan kelimpahan serbuk sari dilakukan sebanyak 3 kali yaitu di bulan Agustus 2005, November 2005 dan Maret 2006. Jumlah serbuk sari diukur menggunakan perangkat (*trap*) serbuk sari yang terbuat dari batang bambu dan kaca perangkat (Gambar 2). Ukuran masing-masing batang bambu sepanjang 10 m, di ujungnya disambungkan dengan potongan bambu yang masing-masing panjangnya 50 cm, dan diatas potongan ini dipasang objek glass berukuran 4 x 2,5 x 7,5 cm yang menunjukkan arah: Utara,

Grafik 2. Arah dan kecepatan angin yang diukur di tengah kebun benih selama masa penyerbukan di bulan November 2005 dan Maret 2006

Selatan, Timur dan Barat. Antara Utara-Selatan, dan Timur-Barat masing-masing berjarak 100 cm dan arah-arah tersebut digunakan sebagai ulangan percobaan. Jumlah alat perangkat serbuk sari sebanyak 25 *trap* dan diletakkan secara acak di plot pengamatan. Supaya letak *trap* tersebar merata, plot pengamatan dibagi menjadi 10 bagian berdasarkan radius dengan interval 12 m. Ukuran radius berkisar antara 12-120 m (Gambar 1, kiri). Kemudian di setiap radius dipasang masing-masing 1-6 *trap*; radius yang berukuran kecil (12 m) dipasang 1 *trap*, dan radius yang berukuran lebih besar (120 m) dipasang 6 *trap*.

Pada saat mengukur kelimpahan serbuk sari, untuk membuat serbuk sari menempel, kaca preparat diolesi dengan vaseline (Wako). Dalam satu batang bambu, 4 kaca preparat yang telah

dilapisi dengan vaseline dihadapkan ke atas. Pengumpulan serbuk sari dilakukan setiap 2 hari sekali, kemudian kaca preparat yang sudah berisi serbuk sari diganti dengan yang baru. Pengamatan dilakukan selama periode bunga betina reseptif (siap untuk diserbuki), kurang lebih 14 hari (Danarto, 1983). Kelimpahan serbuk sari diukur sebagai banyaknya butir serbuk sari per cm^2 . Secara total, setiap musim yang diamati, terdapat 700 sampel (4 arah x 25 perangkap serbuk sari x 7 kali pengamatan).

Gambar 2. Perangkap serbuk sari terbuat dari bambu

C. Pengumpulan biji

Untuk mengetahui keragaman genetik biji yang dihasilkan pada saat pengukuran jumlah serbuk sari, dilakukan penandaan terhadap bunga betina reseptif dari 44 pohon induk di bulan Agustus 2005, November 2005 dan Maret 2006. Pada masing-masing pohon induk terdapat 8 bunga betina reseptif yang ditandai dengan pita plastik. Sehingga jumlah total bunga yang ditandai ada 352 (44 pohon induk x 8 bunga betina reseptif). Lokasi 44 pohon induk seperti terlihat di Gambar 1 (kiri).

Setelah buah sudah terlihat masak (warna kecoklatan), atau sekitar 10 bulan setelah diserbuki, buah yang berasal dari penyerbukan terbuka tersebut, dipanen masing-masing di bulan Juni, September dan Desember 2006. Masing-masing buah dipisahkan berdasarkan waktu panen dan pohon induk, kemudian dimasukkan dalam kantung nilon yang berukuran kecil. Buah dikeringkan dengan cara dijemur hingga biji bisa dipisahkan. Untuk mempermudah pengamatan, biji yang dikumpulkan pada bulan Juni, September dan Desember masing-masing diberi nama sesuai bulan penandaan bunga betina reseptif, yaitu populasi keturunan di bulan Agustus, November dan Maret.

D. Pengumpulan sampel untuk analisa DNA

Untuk menduga keragaman genetik populasi keturunan, 48-96 embrio yang berasal dari biji yang dikumpulkan seperti metode di atas digunakan sebagai sumber DNA. Kemudian populasi-populasi keturunan tersebut disebut populasi Agustus, November dan Maret. Untuk menduga keragaman genetik populasi pohon induk, dikumpulkan sampel daun dari semua pohon dewasa yang ada di plot pengamatan ($N=574$). Sampel-sampel tersebut dimasukkan ke dalam kantong plastik klip yang berukuran kecil dan diisi dengan silika gel. Sampel disimpan pada suhu ruang sampai dilakukan ekstraksi untuk analisa DNA. Selanjutnya populasi ini disebut populasi pohon induk.

E. Ekstraksi DNA dan analisa *microsatellite*

Penelitian analisa genetik dilakukan di *Laboratory of Forest Ecosystem, Department of Ecosystem Studies, The University of Tokyo*,

Jepang. DNA diekstraksi menggunakan metode modifikasi *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) (Zhou *et al.*, 1999) menggunakan sebuah mesin otomatis isolasi DNA versi 1.4 A (PI-50 a Kurabo Industries, LTD). Penelitian ini menggunakan 5 penanda *microsatellite* untuk *P. merkusii*, karakteristik kelima penanda tersebut telah digambarkan dalam Nurtjahjaningsih *et al.* (2005). Amplifikasi PCR menggunakan PCR *thermal cycler* (Takara) dan *Gene amp PCR system 9700* (Applied Biosystems), dalam campuran reaksi (5 μ L) mengandung 5 ng template DNA, 0,2 μ M masing-masing pasangan primer dan 1 x PCR *Master Mix* (Qiagen Multiplex) dengan konsentrasi akhir 3 mM MgCl₂. Kondisi PCR meliputi: 15 menit pada suhu 95°C diikuti dengan 30 cycle selama 30 detik pada suhu 94°C, 1 menit 30 detik pada masing-masing spesifik suhu *annealing*, 1 menit pada suhu 72°C dan sebuah *step* akhir pemanjangan 30 menit pada suhu 60°C. Amplifikasi fragmen hasil PCR dideteksi dan *disequence* menggunakan ABI 3100 *genetic analyzer* (Applied Biosystems). Amplifikasi fragmen dianalisa menggunakan *gene mapper* (Applied Biosystems).

F. Analisa statistik

1. Penyebaran serbuk sari secara fisik

Analisa varian (ANOVA) dilakukan untuk menguji pengaruh musim, lokasi *trap* dan interaksi antara musim dan lokasi *trap* terhadap kelimpahan serbuk sari dengan menggunakan uji F dengan taraf 5%. Selanjutnya apabila terdapat peubah yang berpengaruh nyata terhadap kelimpahan serbuk sari maka tingkat signifikan diuji dengan uji lanjutan T test (LSD). Analisa

varian dan T test dianalisa menggunakan SPSS 11.0 software.

2. Keragaman genetik populasi keturunan

Untuk masing-masing populasi, keragaman genetik dievaluasi menggunakan parameter seperti jumlah *allele* yang terdeteksi (N_A = number of allele), *allele* yang muncul dengan frekuensi 0,05% (R_A = rare allele), *allele* yang terdeteksi hanya pada satu populasi (P_A = private allele), keragaman *allele* (A_{1148} = allelic diversity; El Mousadik dan Petit, 1996), heterozygositas harapan (H_E = expected heterozygosity; Nei 1987), tingkat *inbreeding* (F_{IS} = coefficient inbreeding), *linkage* yang tidak seimbang secara signifikan ($L-D$ = significant linkage disequilibrium). Keragaman *allele* adalah sebuah parameter yang menunjukkan keragaman *allele* pada sebuah lokus untuk ukuran sampel yang ditetapkan (El Mousadik dan Petit, 1996). Dalam hal ini keragaman *allele* ditetapkan pada jumlah sampel $N = 574$ ($2n = 1148$). Secara signifikan menyimpang dari Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), seperti dibuktikan oleh penyimpangan F_{IS} dari nol, diuji dengan randomisasi. Nilai $L-D$ antar lokus bisa menunjukkan status perkawinan, nilai ini diuji untuk seluruh pasangan lokus untuk masing-masing populasi dengan randomisasi dan perolehan nilai P ($< 0,05$) ditetapkan oleh koreksi sequensial Bonferroni (Rice, 1989) untuk menghindari kesalahan yang positif.

Perbedaan genetik antara populasi pohon induk dan masing-masing populasi keturunan dievaluasi dengan nilai F_{ST} (Weir dan Cockerham 1984), dan signifikansi diuji dengan membandingkan antar populasi dengan interval

konfiden 95% dengan 1.000 permutasi *bootstrap*. Signifikansi perbedaan pada setiap lokus diuji dengan uji nyata *log-likelihood* (G) (Goudet *et al.*, 1996). Nilai pasangan " F "_{ST} dihitung dan signifikan diuji dengan randomisasi genotip multilokus antara dua populasi dengan koreksi *Bonferroni standard*.

Parameter keragaman genetik dan perbedaan genetik dihitung menggunakan FSTAT *software* versi 2.9.3.2 (Goudet, 2001).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Penyebaran serbuk sari secara fisik

Berdasarkan hasil analisis varian pada Tabel 1, menunjukkan bahwa kelimpahan jumlah serbuk sari secara signifikan dipengaruhi oleh musim, tetapi tidak signifikan dipengaruhi oleh lokasi *trap* maupun interaksi musim-lokasi *trap*.

Adanya pengaruh nyata terhadap musim terhadap kelimpahan serbuk sari, kemudian dilanjutkan dengan uji T (LSD). Jumlah serbuk sari per cm² setiap musim yang diamati dan taraf signifikan dirangkum di Tabel 2. Butir serbuk sari paling banyak diamati pada bulan November (rata-rata = $3,4 \pm 6,1$) dibandingkan bulan Agustus dan Maret (masing-masing rata-rata = $1,2 \pm 0,7$ dan $1,3 \pm 1,5$).

Tabel 2. Rata-rata jumlah serbuk sari per cm²

Bulan	N	Rata-rata jumlah serbuk sari / cm ²			
Agustus	700	1.2	±	0.7	b
November	700	3.4	±	6.1	a
Maret	700	1.3	±	1.5	b

Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama mempunyai perbedaan yang tidak signifikan; N = jumlah sampel

2. Keragaman genetik antar populasi keturunan

Parameter keragaman genetik pada masing-masing populasi seperti nilai " N "_A, " R "_A, " P "_A, " A "₁₁₄₈, " H "_E, " F "_{IS}, " $L-D$ " dapat dilihat di Tabel 3. Antar populasi keturunan, nilai " N "_A mencapai nilai tertinggi di bulan Agustus (" N "_A = 27) dibandingkan bulan November dan Maret (masing-masing 21 dan 22). Demikian pula dengan nilai " R "_A dan keragaman *allele* (" A "₁₁₄₈), nilai tertinggi di bulan Agustus (" R "_A = 4, " A "₁₁₄₈ = 4,5) dibandingkan bulan November dan Maret (" R "_A = 3, " A "₁₁₄₈ = 3,8 untuk masing-masing). Adanya kemiripan nilai " H "_E dan nilainya tinggi antara keturunan di bulan Agustus (" H "_E = 0,402) dan November (" H "_E = 0,397), sedangkan nilai " H "_E rendah di bulan Maret (" H "_E = 0,361). Nilai " F "_{IS} mengindikasikan secara signifikan menyimpang dari hukum HWE pada masing-masing populasi keturunan dengan level yang berbeda-beda. Sebaliknya, nilai " $L-D$ " paling tinggi terlihat di populasi Agustus (" $L-D$ " = 6) dibandingkan November dan Maret (masing-masing " $L-D$ " = 2).

Tabel 1. Analisis varian menunjukkan pengaruh musim, lokasi trap, interaksi musim x lokasi trap terhadap jumlah serbuk sari

Sumber keragaman	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Rata-rata kuadrat	F	Sig.
Musim	779370.784	2	389685.392	81.901	0.000 *
Lokasi	78281.516	24	3261.730	0.686	0.870
Musim * Lokasi	129728.407	48	2702.675	0.568	0.993

R² = 0.093

* signifikan $P < 0.05$

Tabel 3. Paramater keragaman genetik populasi pohon induk dan keturunan

Bulan	N	N_A	R_A	P_A	A_{1148}	H_E	F_{IS}	$L-D$
Agustus	2095	27	4	0	4.5	0.402	0.046*	6
November	1857	21	3	2	3.8	0.397	0.120*	2
Maret	1948	22	3	0	3.8	0.361	0.131*	2
Pop. pohon induk	574	22	3	0	4.4	0.477	0.109*	10

Keterangan:

N: jumlah sampel, N_A : jumlah *allele* yang terdeteksi, R_A : jumlah *allele* yang muncul dengan frekuensi 0,05%, P_A : *Allele* yang muncul hanya pada satu populasi (*unique allele*), A_{1148} : keragaman *allele*, H_E : heterozygositas harapan, F_{IS} : koefisien *inbreeding*, $L-D$: *linkage disequilibrium*

Tabel 4. Perbedaan genetik antara populasi pohon induk dan keturunan

Populasi	Agustus	November	Maret
Pohon induk	0.034 *	0.031 *	0.054 *

* signifikan $P < 0.05$

Perbedaan genetik (nilai " F_{ST} ") antara populasi pohon induk dan masing-masing populasi keturunan ditunjukkan pada Tabel 4. Nilai " F_{ST} " menunjukkan nilai yang secara signifikan berbeda, dan nilai tersebut adalah 0,034, 0,031 dan 0,054 masing-masing pada bulan Agustus, November dan Maret.

B. Pembahasan

1. Penyebaran serbuk sari secara fisik

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelimpahan produksi serbuk sari hanya dipengaruhi oleh musim. Pada kebun benih yang sama, adanya indikasi yang menunjukkan korelasi antara produksi bunga jantan dan ketersediaan jumlah serbuk sari. Diantara ketiga musim yang diamati, jumlah bunga jantan paling banyak diproduksi pada bulan November yang ternyata berkorelasi terhadap banyaknya jumlah serbuk sari. Sedangkan seperti penelitian-penelitian sebelumnya, pembungaan sering dipengaruhi oleh genetik maupun lingkungan

(Dominguez dan Dirzo, 1995). Hal yang sama juga dilaporkan di kebun benih *E. deglupta* bahwa produksi serbuk sari meningkat seiring dengan meningkatnya produksi bunga jantan (Burczyk dan Chalupta, 1997). Selain itu ketersediaan serbuk sari yang cukup mempengaruhi kontribusi tetua jantan pada sistem perkawinan (Burczyk dan Prat, 1997). Di bulan November, persen biji bernas (biji yang berisi embrio) mempunyai level yang paling tinggi dibandingkan bulan Agustus dan Maret (data tidak dipublikasikan). Sehingga, diduga tingkat keberhasilan sistem perkawinan di bulan November akan lebih tinggi dibandingkan bulan lainnya.

Selain hasil di atas, studi ini menunjukkan bahwa kelimpahan produksi polen tidak dipengaruhi oleh lokasi *trap* serbuk sari. Hal ini menunjukkan bahwa produksi serbuk sari merata di seluruh kebun benih. Pohon induk yang berasal dari satu provenan bisa menyebabkan karakteristik pembungaan yang hampir sama (Zobel dan Talbert, 1997), sehingga penyebaran serbuk sari di kebun benih *P. merkusii* ini menjadi serempak. Sebaliknya, penyebaran serbuk sari yang tidak bersamaan diduga karena klon berasal dari beberapa provenan yang berbeda, yang merupakan salah satu permasalahan yang penting di

kebun benih (Burczyk *et al.*, 2002; Chaix *et al.*, 2003).

Selain faktor biologis, seperti produksi bunga jantan, ketersediaan serbuk sari bisa dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti kepadatan pohon, angin dan curah hujan (Mitton, 1992). Meskipun kepadatan pohon yang tinggi menyebabkan terbatasnya penyebaran serbuk sari (Mitton, 1992), namun pada kebun benih *P. merkusii* ini meskipun mempunyai kepadatan pohon yang cukup tinggi tapi menunjukkan penyebaran serbuk sari yang tidak terbatas (densitas pohon = 60 pohon/ha). Sebagai data pendukung, walaupun penelitian ini tidak difokuskan pada pengaruh angin, namun data rata-rata arah maupun kecepatan angin pada saat pengukuran jumlah serbuk sari di bulan November 2005 dan Maret 2006 bisa dilihat di Grafik 1. Dari data tersebut menunjukkan pola arah dan kecepatan yang hampir sama antara kedua musim tersebut. Hal ini cukup beralasan mengingat kebun benih ini mempunyai topografi yang datar. Selain itu, pergerakan serbuk sari jenis konifer diterbangkan oleh angin turbulen sehingga serbuk sari dapat disebarkan dalam jarak yang jauh dan kadang tidak dapat diduga (Mitton, 1992). Sedangkan data rata-rata curah hujan di tahun 2005 dan 2006 dari 4 stasiun Badan Meteorologi dan Geofisika (BMG) terdekat dengan plot pengamatan dirangkum di Grafik 2. Seperti gambaran curah hujan di Indonesia pada umumnya, bulan Maret merupakan musim hujan, Agustus merupakan musim kemarau dan November menunjukkan musim peralihan antara kemarau dan hujan. Meskipun Maret dan Agustus mempunyai kondisi curah hujan yang berlawanan (hujan *vs.* kemarau),

namun serbuk sari yang tertangkap mempunyai jumlah yang sama. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ketersediaan serbuk sari lebih dipengaruhi oleh ketersediaan bunga jantan, dibandingkan dengan faktor lingkungan seperti angin dan curah hujan. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Burczyk dan Chalupta (1997) di kebun benih *P. sylvestris* bahwa faktor genetik lebih sering berpengaruh pada ketersediaan serbuk sari dibandingkan faktor lingkungan.

2. Keragaman genetik antar populasi keturunan

Meskipun penyebaran serbuk sari secara fisik telah dibuktikan hampir merata di seluruh kebun benih, akan tetapi dengan analisa genetik menunjukkan bahwa nilai genetik bervariasi pada masing-masing populasi keturunan. Hal ini mengindikasikan bahwa komposisi serbuk sari yang berkontribusi pada sistem perkawinan berbeda di setiap musim dan menentukan kombinasi *allele* yang berbeda pada populasi keturunannya. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa apabila perkawinan dibawah kondisi serbuk sari tidak cukup, kompetisi serbuk sari untuk menyerbuki ovul akan melemah, sehingga serbuk sari yang mempunyai kualitas kurang bagus pun bisa menyerbuki ovul, walaupun pada akhirnya akan menghasilkan benih yang kurang baik, disebabkan oleh *inbreeding* atau *lethal gen* (Janse dan Verhaegh, 1993; Hegland dan Totland, 2007). Sehingga beberapa studi melaporkan bahwa sistem perkawinan dibawah serbuk sari yang tidak cukup (seperti Agustus dan Maret) mempunyai dua pola perkawinan yang saling berlawanan. Pertama, apabila di sekitar pohon induk tidak ada serbuk sari yang menyerbuki, maka akan terjadi fertilisasi serbuk

sari dari pohon yang berjauhan yang mempunyai sinkronisasi secara fenologi dengan pohon induk (Kang dan Lindgren, 1998; Kaya *et al.*, 2006). Tingginya nilai " N "_A dan " R "_A populasi Agustus dibandingkan dengan populasi pohon induk menunjukkan adanya penambahan kontribusi *allele* baru dari luar plot. Hal ini menyebabkan nilai " H "_E tinggi pada populasi Agustus. Walaupun fertilisasi serbuk sari yang luas ini sering menyebabkan resiko meningkatnya laju kontaminasi serbuk sari dan menurunkan perolehan genetik, yang merupakan salah satu masalah utama di kebun benih (Plomion *et al.*, 2001; Burczyk *et al.*, 2004). Kedua, serbuk sari yang tidak cukup akan menyebabkan penyebaran serbuk sari yang terhalang sehingga akan terjadi penyerbukan sendiri (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004). Tingginya nilai signifikan " $L-D$ " pada populasi Agustus menunjukkan sistem perkawinan yang tidak acak. Meningkatnya kemungkinan nilai *inbreeding* dibawah kondisi kekurangan serbuk sari juga diamati di kebun benih di daerah temperate, *Pseudotsuga menziesii* (El-Kassaby *et al.*, 1984). Sedangkan pada populasi Maret, adanya kemiripan nilai " N "_A dan " R "_A pada populasi Maret dan populasi pohon induk menunjukkan bahwa perkawinan hanya terjadi antar pohon induk yang ada di dalam plot pengamatan. Bahkan dengan tingginya nilai signifikan " F "_{IS} menunjukkan tingginya *level inbreeding* pada populasi Maret. Parameter-parameter tersebut menyebabkan rendahnya nilai " H "_E pada populasi ini. Selain itu, tingginya nilai perbedaan genetik (" F "_{ST}) antara populasi pohon induk dan populasi Maret juga menunjukkan pola penyebaran serbuk sari yang terbatas di populasi ini.

Kebun benih yang ideal adalah apabila jumlah serbuk sari tercukupi (El-Kassaby *et al.*, 1984; 1988). Sistem perkawinan dibawah kondisi jumlah serbuk sari yang lebih mencukupi (dalam hal ini November), akan meningkatkan perkawinan yang acak dan memaksimalkan kontribusi *allele* tetuanya (El-Kassaby *et al.*, 1988; Burczyk dan Chalupka 1997). Tingginya nilai keragaman genetik dan rendahnya nilai $L-D$ populasi keturunan di bulan November menunjukkan bahwa perkawinan di musim ini lebih ideal dibandingkan dengan musim-musim yang lain.

Banyaknya faktor (genetik maupun lingkungan) yang berpengaruh pada sistem perkawinan menyebabkan sistem perkawinan menjadi sulit untuk diduga. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ketersediaan dan keseimbangan jumlah bunga betina dan jantan sering sebagai penyebab variasi dalam pola perkawinan (El-Kassaby *et al.*, 1984; 1988). Pada penelitian ini, meskipun perkawinan di bulan Agustus dan Maret dibawah kondisi jumlah serbuk sari yang terbatas, namun karena di bulan Agustus mempunyai jumlah bunga betina lebih banyak dibandingkan Maret, hal ini bisa menyebabkan fertilisasi yang lebih luas di bulan Agustus dibanding Maret. Sedangkan jumlah yang seimbang antara bunga betina dan serbuk sari di bulan November, menyebabkan kondisi yang optimal untuk menghasilkan benih yang berkualitas (data tidak dipublikasikan). Pendugaan sistem perkawinan pada spesies yang penyerbukannya dibantu oleh angin seperti *P. merkusii* sering menjadi bias karena penyebaran serbuk sari sangat dipengaruhi oleh kondisi angin dan curah hujan (Di-Giovanni dan Kevan, 1991),

selain faktor kontabilitas secara genetik (Burczyk dan Chalupka, 1997). Walaupun kondisi angin di kebun benih relatif stabil (Grafik 1), tetapi curah hujan yang berbeda di setiap musim (Grafik 2) bisa menyebabkan perbedaan sistem perkawinan pada masing-masing musim tersebut. Namun demikian, karena masih banyak faktor yang berpengaruh pada keberhasilan sistem perkawinan, studi ini belum bisa menduga pengaruh faktor lingkungan tersebut terhadap pola perkawinan yang ada.

V. KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa penyebaran serbuk sari secara fisik di kebun benih *P. merkusii* mendekati serempak. Namun, penelitian secara genetik memastikan adanya variasi serbuk sari yang berkontribusi pada pola perkawinannya, yang menyebabkan perbedaan parameter genetik populasi keturunan di setiap musim yang diamati. Penelitian ini menunjukkan kebun benih tidak selamanya menghasilkan benih yang berkualitas baik. Pengunduhan buah sebaiknya dilakukan pada saat produksi serbuk sari mencukupi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Yuji Ide yang telah memberikan dukungan dan menyediakan fasilitas baik peralatan penelitian dan finansial selama penelitian. Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Prof. Moh. Naiem, Dekan Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada dan Bapak Sadardjo, M.Sc., Perum Perhutani yang telah memberikan izin untuk menggunakan kebun

benih semai *P. merkusii* di Jember, Jawa Timur sebagai obyek penelitian. Ucapan terima kasih disampaikan pula kepada Bapak Suka Harja, Perum Perhutani yang telah banyak membantu selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, W.T. (1992) Gene Dispersal Within Forest Tree Populations. *New Forest* **6**: 217-240
- Bilir, N., Kang, K.S., Ozturk, H. (2002) Fertility Variation And Gene Diversity in Clonal Seed Orchards of *Pinus brutia*, *Pinus nigra* and *Pinus sylvestris* in Turkey. *Silvae Genetica* **52** (2-3): 112-115
- Burczyk, J., Adams, W.T., Moran, G.F. and Griffin, A.R. (2002) Complex Patterns of Mating Revealed in *Eucalyptus regnans* Seed Orchard Using Allozyme Markers And The Neighbourhood Model. *Molecular Ecology* **11**: 2379-2391
- Burczyk, J., Chalupka, W. (1997) Flowering And Cone Productin Variability And Its Effect on Parental Balance in A Scots Pine Clonal Seed Orchard. *Ann. Sci. For.* **54**: 129-144
- Burczyk, J., Lewandowski, A., Chalupka, W. (2004) Local Pollen Dispersal Gene Flow in Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst. *Forest Ecology and Management* **197**: 39-48
- Burczyk, J., Nikkanen, T., Lewandowski, A. (1997) Evidence of An Unbalances Mating Pattern in A Seed Orchard Composed Of Two Larch Species. *Silvae Genetica* **46** (2-3): 176-181

- Burczyk, J. and Prat, D. (1997) Male Reproductive Success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: The Effects Of Spatial Structure And Flowering Characteristics. *Heredity* **79**: 638-647
- Chaix, G., Gerber, S., Razafimaharo, V., Vigneron, P., Verhaegen, D., Hamon, S. (2003) Gene Flow Estimates with Microsatellites in A Malagasy Seed Orchard of *Eucalyptus grandis*. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 705-712
- Changtragoon, S., Finkeldey, R. (1995) Patterns of Genetic Variation And Characterization of The Mating System of *Pinus merkusii* in Thailand. *Forest Genetics* **2**: 87-97
- Choi, W.Y., Kang, K.S., Jang, K.W., Han, S.U., Kim, C.S. (2004) Sexual Asymmetry Based on Flowering Assessment in A Clonal Seed Orchard of *Pinus densiflora*. *Silvae Genetica* **53** (2): 55-59
- Danarto, S. (1983) Studi Fenologi Pembungan, Pembuahan dan Penyerbukan Terkendali *Pinus merkusii* Jungh, et de Vriese di Sempolan Jember. Master Thesis, Gadjah Mada University, Indonesia, 99 p.
- Di-Giovanni, F., Kevan, P.G. (1991) Factors Affecting Pollen Dynamics and Its Importance to Pollen Contamination: A Review. *Canadian Journal of Forest Research*. **21**: 1155-1170
- Devlin B, Ellstrand N.C (1990) The Development and Application of A Refined Method for Estimating Gene Flow Angiosperm Paternity Analysis. *Evolution* **44**: 248-259
- Dominguez, C.A., Dirzo, R. (1995) Rainfall and Flowering Synchrony in A Tropical Shrub: Variable Selection on The Flowering Time of *Erythxylum havanense*. *Evolutionary Ecology* **9**: 204-216
- Dow, B.D. and Ashley, M.V. (1998) High Levels of Gene Flow in Bur Oak Revealed by Paternity Analysis Using Microatellites. *The Journal of Heredity* **89** (1): 62-70
- El-Kassaby, Y.A., Fashler, A.M.K., Sziklai, O. (1984) Reproductive Penology and Its Impact on Genetically Improve Seed Production in A Douglass-Fir Seed Orchard. *Silvae Genetica* **33** (4-5): 120-125
- El-Kassaby, Y.A., Ritland, K., Fashler, A.M.K., Devitt, W.J.B. (1988) The Role of Reproductive Phenology Upon The Mating System of A Douglas-Fir Seed Orchard. *Silvae Genetica* **37** (2): 76-82
- El Mousadik, A. Petit, R.J. (1996) High Level of Genetic Differentiation for Allelic Richness Among Populations of The Argan Tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) Endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 832-839
- Goudet, J. (2001) FSTAT (version 2.9.3.2): A Program to Estimate And Test Gene Diversities And Fixation Indices. [Www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html](http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html)
- Goudet, J., Raymond, M., de Meeus, T., Rousset, F. (1996) Testing Differentiation in Diploid Populations. *Genetics* **144**: 1933-1940.
- Hegland, S.J., Totland, O. (2007) Pollen Limitation Affects Progeny Vigour And Subsequent Recruitment in The Insect-

- Pollinated Herb *Ranunculus Acris*. *Oikos* **116**: 1204-1210
- Janse, J. Verhaegh, J.J. (1993) Effects of Varying Pollen Load on Fruit Set, Seed Set And Seedling Performance in Apple And Pear. *Sexual Plant Reproduction* **6**: 122-126
- Kang, K.S., Lindgren, D. (1998) Fertility Variation And Its Effect on The Relatedness of Seeds in *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii* and *Pinus koraiensis* Clonal Seed Orchards. *Silvae Genetica* **47** (4): 196-201
- Kaya, N., Isik, K., Adams, W.T. (2006) Mating System And Pollen Contamination in A *Pinus Brutia* Seed Orchard. *New Forests* **31**: 409-416
- Mirov, N.T. (1967) The genus of *Pinus*. Roland Press Company. New York. 602 pp.
- Mitton, J.B. (1992) The Dynamic Mating Systems of Conifers. *New Forest* **6**: 197-216
- Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York 512pp.
- Nurtjahjaningsih, I.L.G., Saito, Y., Lian, C.L., Tsuda, Y., Ide, Y. (2005) Development And Characteristics of Microsatellite Markers in *Pinus merkusii*. *Molecular Ecology Notes* **5**: 552-553.
- Nurtjahjaningsih, I.L.G., Saito, Y., Tsuda, Y. and Ide, Y. (2007) Genetic Diversity of Parental And Offspring Populations in A *Pinus Merkusii* Seedling Seed Orchard Detected By Microsatellite Markers. *Bulletin of the Tokyo University Forest*, The Tokyo University Forests **118**: 1-14
- O'Relly, C., Parker, W.H., Barker, J.E. (1982) Effect of Pollination Period And Strobili Number on Random Mating in A Clonal Seed Orchard of *Picea mariana*. *Silvae Genetica* **31** (2-3): 90-94
- Plomion, C., Le Provost, G., Pot, D., Vendramin, G., Gerber, S., Decroocq, S., Branch, J., Raffin, A., Pastuszka, P. (2001) Pollen Contamination in A Maritime Pine Polycross Seed Orchard And Certification of Improved Seeds Using Chloroplast Microsatellites. *Canadian Journal of Forest Research* **31**: 1816-1825.
- Rice W.R. (1989) Analyzing Tables of statistical Tests. *Evolution* **43**: 223-225.
- Robledo-Arnuncio, J.J. Alia, R., Gil, L. (2004) Increased Selfing And Correlated Paternity in A Small Population of A Predominantly Outcrossing Conifer, *Pinus sylvestris*. *Molecular Ecology* **13**: 2567-2577
- Soeseno, O. H. (1988) Genetic Variation And Improvement of *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese. Doctoral Thesis, Gadjah Mada University, Indonesia 266pp.
- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984) Estimating F-Statistics for The Analysis of Population Structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- Zhou Z., Miwa M., Hogetsu T (1999) Analysis of Genetic Structure of *Suillus grevillei* Population in A *Larix Kaempferi* Stand By Polymorphism of Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR). *New Phytologist* **144**: 55-63.
- Zobel, B. and Talbert, J. (1991) Applied forest tree improvement. Waveland Press, Inc. U.S.A. 505pp