

**KEKERABATAN GENETIK ANTAR JENIS KANTONG SEMAR
(*Nepenthes* spp.) BERDASARKAN PENANDA RAPD
(RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)**

GENETIC RELATIONSHIP OF KANTONG SEMAR (*Nepenthes* spp.) BASED
ON RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA) MARKERS

Rita Elfianis^{1*}, Zulfahmi¹, dan Rowmaina¹

¹Laboratorium Genetika dan Pemuliaan, Fakultas Pertanian dan Peternakan
Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim, Riau

*Email Korenspondensi: elfianisrita@gmail.com

ABSTRACT

Pitcher plants (*Nepenthes* spp.) are an important economically as ornamental and medicine plants. They have a high degree of morphological variation and after ambiguis to distinguish among picher plants. The objective of research was to observe the genetic relationship among pitcher plant based on RAPD markers. Nine pitcher plants were analyzed using five RAPD primers. The result of this study showed that five RAPD primers selected were generated total 60 DNA fragments ranging from 150-1.450 bp. Genetic distance among pitcher plants ranged from 0.105 [*N. trichocarpa* (NXT) vs *N. mirabilis* (MIR)] to 0.545 [*N. ampularia hijau* (AHI) vs *N. ampularia peristom merah* (APM)]. Based on the dendogram of UPGMA, pitcher plants divided into four clusters. First cluster was formed six pitcher plants, e.g. *Nepenthes ampularia corong* (ACO), *Nepenthes mirabilis* (MIR), *Nepenthes x trichocarpa* (NXT), *Nepenthes ampularia batik* (ABA), *Nepenthes grasilis merah* (GME), *Nepenthes grasilis hijau* (GHI). Second, third, and fourth clusters having only one species, namely *Nepenthes ampularia hijau* (AHI), *Nepenthes ampularia panjang batik* (APB), *Nepenthes ampularia peristom merah* (APM), respectively. The result of this investigation will help breeders for pitcher plants improvement program in future.

Keywords: Genetic relationship, *Nepenthes*, RAPD markers

PENDAHULUAN

Kantong Semar (*Nepenthes* spp.) merupakan salah satu anggota famili Nepentheceae. *Nepenthes* merupakan tumbuhan insektivora yang mampu

mencerna serangga yang terjebak di dalam kantong pada ujung sulur daunnya. Serangga yang terperangkap tersebut dihancurkan, kemudian

dijadikan sebagai sumber nutrisi. Cairan dalam kantongnya juga mengandung protein (Witarto, 2006).

Azwar *et al.*, (2006) menyatakan bahwa *Nepenthes* merupakan tanaman hias yang unik karena memiliki kantong yang beranekaragam bentuk dan warnanya. Variasi morfologi kantong *Nepenthes* ini banyak dan memiliki daya tarik yang sangat spesifik serta memungkinkan untuk dilakukan persilangan baru untuk mendapatkan variasi bentuk kantong yang lebih banyak lagi (Handayani & Samsuddin, 1998).

Variasi bentuk kantong dan warna pada tanaman *Nepenthes* sering membingungkan dalam menentukan jenis *Nepenthes*, seperti jenis *Nepenthes ampularia*, yang pernah dilaporkan oleh (Rosmaina & Zulfahmi, 2011; Irwanto, 2007; Mansur, 2006) bahwa berdasarkan warna dan bentuk kantongnya ada *Nepenthes ampularia* hijau, *Nepenthes ampularia* batik, *Nepenthes ampularia* batik lonjong, *Nepenthes ampularia* hijau peristom merah, dan *Nepenthes ampularia* batik bulat. Penilaian secara morfologi untuk membedakan antar jenis tanaman *Nepenthes* sedikit sulit dan seringkali membingungkan karena karakter

morfologi tersebut dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Oleh karena itu, diperlukan analisis yang menggunakan suatu penanda yang tidak dipengaruhi lingkungan.

Variasi genetik merupakan landasan bagi pemulia untuk memulai kegiatan pemuliaan tanaman. Besarnya keragaman genetik dapat menjadi dasar untuk menduga keberhasilan perbaikan genetik di dalam program pemuliaan. Penanda DNA dalam identifikasi keanekaragaman hayati antara lain penanda isozim, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphic*) dan RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphic*) (Yunus, 2004; Finkeldey, 2000).

Dalam penelitian ini, untuk melihat keragaman dan tingkat kekerabatan genetik tanaman *Nepenthes*, penanda molekuler yang digunakan adalah RAPD. Kelebihan teknik RAPD, dibandingkan metode penanda molekuler lainnya, lebih murah, lebih cepat, dan DNA yang diperlukan cukup sedikit (0,5-50 ng), tidak memerlukan informasi genom awal tanaman yang akan dianalisis dan tidak memerlukan radioisotop (Welsh

dan McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Penanda RAPD telah banyak digunakan untuk mengetahui keragaman dan kekerabatan genetik pada tanaman pasak bumi (Zulfahmi, 2011), pisang (Rosmaina, 2003), jeruk (Karsinah *et al.*, 2002), kelapa (Pandin, 2009), dan mentimun (Julisaniah, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat keragaman dan kekerabatan genetik tanaman *Nepenthes* menggunakan penanda RAPD.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau pada bulan September sampai Desember 2011.

Pengambilan Sampel

Tabel 1. Sampel *Nepenthes* yang digunakan untuk Analisis RAPD

No	Jenis <i>Nepenthes</i>	Singkatan
1	<i>N. ampularia</i> corong	ACO
2	<i>N. mirabilis</i>	MIR
3	<i>N. grasilis</i> merah	GME
4	<i>N. grasilis</i> hijau	GHI
5	<i>N. ampularia</i> panjang batik	APB
6	<i>N. ampularia peristum</i> merah	APM
7	<i>N. ampularia</i> batik	ABA
8	<i>N. ampularia</i> hijau	AHI
9	<i>N. x trichocarpa</i> (<i>N. ampularia</i> X <i>N. grasilis</i>)	NXT

Daun muda *Nepenthes* (Tabel 1) diambil dengan ukuran sekitar 2 x 2 cm diambil dari lapangan dan rumah kaca Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN Suska Riau. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam mikrotube yang berisi *buffer* ekstraksi. Sampel kemudian disimpan di kulkas pada suhu 5°C (*refrigerator*) sampai isolasi DNA dilakukan.

Isolasi DNA

Metode isolasi DNA dilakukan mengikuti prosedur yang dikembangkan oleh Doyle and Doyle (1990) dengan sedikit modifikasi. Daun muda *Nepenthes* ditambahkan 500 µl *buffer* ekstraksi CTAB (CTAB 10%, 5 M NaCl, 5 M EDTA pH 8,0, Tris HCl 1 M pH 8,0 dan air yang telah dipanaskan pada suhu 65°C), kemudian digerus sampai halus dalam mortar.

Tahap selanjutnya adalah sampel dipindahkan ke *microtube* baru dan ditambahkan 500 µl *buffer*

ekstraksi kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 65°C selama 45-60 menit, dengan sesekali dikocok atau divortek. Setelah itu sampel didinginkan di suhu ruangan.

Langkah berikutnya ditambah 500 µl *buffer* purifikasi kloroform: IAA (24:1) ke dalam sampel untuk pemurnian DNA, kemudian *disentrifuge* 11.000 rpm selama tiga menit untuk memisahkan supernatan dan serat sisa ekstraksi. Fase cair yang di bagian atas (supernatan) dipindahkan ke dalam tabung mikro baru, purifikasi dengan kloroform: IAA diulangi sekali lagi, kemudian ditambahkan 500 µl isopropanol dingin, dikocok perlahan-lahan dan diinkubasi dalam *freezer* pada suhu -15°C selama 30 menit.

Sampel kemudian *disentrifuge* 11.000 rpm selama 3 menit. Pellet DNA yang terbentuk kemudian dicuci dengan 500 µl *buffer* pencuci (etanol 76% (v/v), 10 mM amonium asetat) dan selanjutnya dikeringkan dengan cara membalikkan *mikrotube* atau tabung mikro diatas kertas tisu. Endapan DNA dilarutkan dengan 500 µl TE (10 Mm Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0) dan disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C

sampai dilakukan analisis selanjutnya. Hasil isolasi kemudian diuji kualitas dengan elektroforesis pada gel *agarose* dengan konsentrasi 0.8% (w/v). Elektroforesis dilakukan selama ± 30 menit menggunakan *buffer TAE* 1× dengan *voltase* 100 V ± 30 menit. Setelah elektroforesis dilakukan, gel direndam dalam larutan pewarna (*staining*) *ethidium bromide* (5 µl/500 ml air) selama ±15 menit, lalu dibilas menggunakan air destilasi selama ± 25 menit. Setelah itu gel diletakkan di Gel doc (Bio-rad) untuk didokumentasikan.

Seleksi Primer

Seleksi primer bertujuan untuk mendapatkan primer yang cocok digunakan dalam penelitian ini. Seleksi primer dilakukan terhadap 15 primer acak yaitu OPD-8, OPO-5, OPO-6, OPO-11, OPO-13, OPO-16, OPT-7, OPT-9, OPY-6, OPY-7, OPY-8, OPY-12, OPY-14, OPY-17, OPY-19, sekuen DNA masing-masing primer dapat dilihat pada Tabel 2. Seleksi dari 15 primer ini selanjutnya akan dipilih lima primer untuk amplifikasi DNA tanaman *Nepenthes*. Volume reaksi PCR adalah 15 µl yang terdiri dari 7.5 µl *Hot Star Taq Plus Master Mix*

(Qiagen), 1.8 µl primer (5 µM). 1.5 µl *coral load* 10x, 2.0 µl DNA template dan 2.2 µl H₂O bebas R-Nase. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan PCR CFX 9600 (Bio-rad). Pengaturan mesin PCR adalah sebagai berikut *pre-denaturation* 95°C selama 5 menit, diikuti 39 siklus yang terdiri *denaturation* pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 37°C selama 1 menit, *extention* pada suhu 72°C selama 1 menit, dan *final extention* pada suhu 72°C selama 8 menit.

Hasil PCR dielektroforesis pada gel *agarose* 1% (w/v). Setiap sampel

(5 µl) dimasukkan ke dalam sumur agarosa dan satu sumur terakhir dimasukkan *DNA ladder* 100 bp sebagai penanda. Elektroforesis dilakukan selama ± 30 menit menggunakan *buffer TAE* 1× dengan voltase 100 V ± 30 menit. Setelah elektroforesis dilakukan, gel direndam dalam *ethidium bromide* (5 µl/500 ml air) selama ±15 menit, lalu dibilas menggunakan air selama ± 25 menit. Setelah itu gel diletakkan di Gel doc (Bio-rad). Deteksi pola dan panjang pita dilakukan dengan menggunakan *Software Image Lab* versi 2.01.

Tabel 2. Jenis dan Sekuen Primer yang digunakan pada Seleksi Primer

No	Nama Primer	Urutan Basa
1	OPD-08	5'GTGCCCCATG'3
2	OPO-05	5'CCCAGTCACT'3
3	OPO-06	5'CCACGGGAAG'3
4	OPO-11	5'GACAGGAGGT'3
5	OPO-13	5'GTCAGAGTCC'3
6	OPO-16	5'TCGGCGGTTC'3
7	OPT-07	5'GGCAGGCTGT'3
8	OPT-09	5'CACCCCTGAG'3
9	OPY-06	5'AAGGCTCACC'3
10	OPY-07	5'AGAGGGGTGA'3
11	OPY-08	5'AGGCAGAGCA'3
12	OPY-12	5'AAGCCTGCGA'3
13	OPY-14	5'GGTCGATCTG'3
14	OPY-17	5'GACGTGGTGA'3
15	OPY-19	5'TGAGGGTCCC'3

Analisis Data Genetik

Data yang diperoleh dari hasil elektroforesis berupa pita-pita diskrit

dengan ukuran tertentu dari masing-masing sampel. Penentuan ukuran DNA sampel dilakukan dengan

membandingkan berat molekul DNA ladder (100 bp) dengan menggunakan *software image lab* versi 2.01 (Bio-rad). Pita dianalisis berdasarkan ada atau tidaknya pita. Profil pita DNA diterjemahkan ke dalam data biner dengan ketentuan nilai 1 untuk adanya pita DNA dan 0 untuk tidak ada pita DNA pada satu posisi sama dari individu-individu yang dibandingkan.

Perbedaan antar *Nepenthes* akan ditunjukkan oleh jumlah dan ukuran panjang pitanya. Parameter yang dihitung adalah jarak genetik berdasarkan Nei (1972) yaitu: $D_s = -\log_e [J_{xy} / (J_x J_y)^{0.5}]$

Dimana, $J_{xy} = \sum x_i y_i$, $J_x = \sum x_i^2$, $J_y = \sum y_i^2$ dan x_i dan y_i adalah jumlah frekuensi dari individu X dan Y. Parameter jarak genetik dihitung dengan menggunakan *software* POPGEN versi 3.2. Analisis kluster (pengelompokan) dan pembuatan dendogram dilakukan dengan metode *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic* (UPGMA) menggunakan *software* NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate System*) versi 2.00 (Rohlf *et al.*, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi Primer

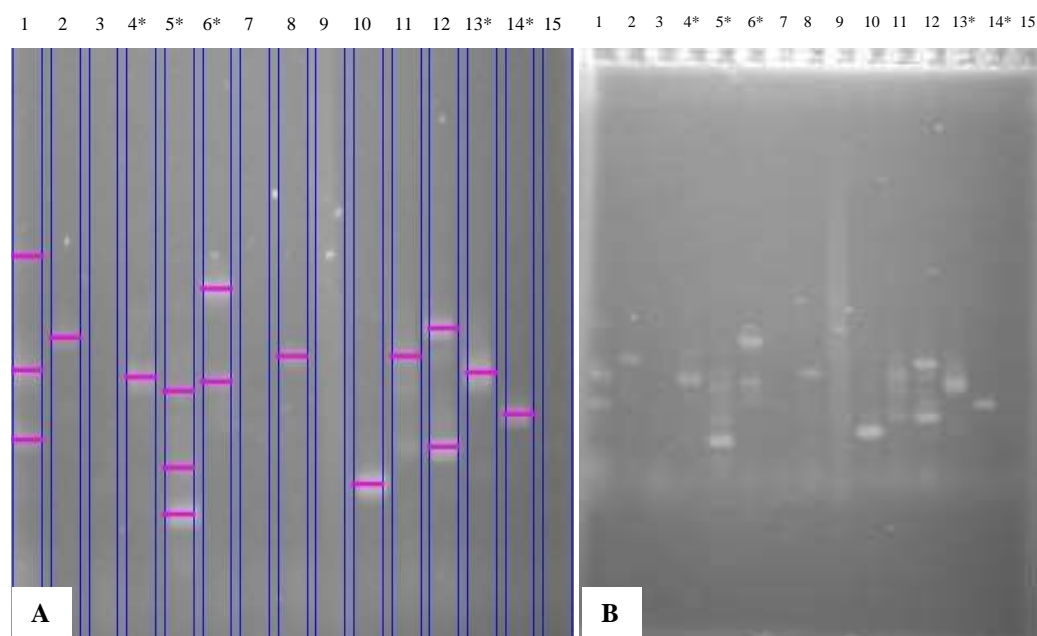
Lima belas primer diseleksi untuk memilih primer yang akan digunakan untuk analisis RAPD selanjutnya. Pola pita 15 primer yang diseleksi dapat dilihat pada Gambar 1. Dari 15 primer yang diseleksi, 11 primer sukses menghasilkan produk amplifikasi, yaitu OPD-08, OPO-05, OPO-06, OPO-11, OPO-13, OPT-07, OPY-06, OPY-07, OPY-14, OPY-17, OPY-19, sedangkan empat primer tidak sukses diamplifikasi yaitu OPY-08, OPO-16, OPY-12, dan OPT-09.

Adanya primer yang gagal diamplifikasi kemungkinan disebabkan oleh *pertama*, karena suhu annealing yang tidak sesuai dan mengakibatkan sekuen nukleotida primer yang digunakan tidak dapat berkomplemen dengan sekuen DNA template. *Kedua*, karena jauhnya jarak urutan sekuen DNA cetakan dengan komplemen basa primer. *Ketiga*, karena rendahnya kualitas DNA *Nepenthes* yang dihasilkan. Seleksi primer dilakukan berdasarkan tingkat ketebalan pita dan polimorfik dari 11 primer yang sukses amplifikasi untuk analisis RAPD tanaman *Nepenthes*. Lima primer yang terpilih adalah primer OPO-11, OPO-13, OPT-7, OPY-14 dan OPY-17.

Adanya primer yang gagal diamplifikasi kemungkinan disebabkan oleh *pertama*, karena suhu annealing yang tidak sesuai dan mengakibatkan sekuen nukleotida primer yang digunakan tidak dapat berkomplemen dengan sekuen DNA template.

Kedua, karena jauhnya jarak urutan sekuen DNA cetakan dengan komplemen basa primer. *Ketiga*, karena

rendahnya kualitas DNA *Nepenthes* yang dihasilkan. Seleksi primer dilakukan berdasarkan tingkat ketebalan pita dan polimorfik dari 11 primer yang sukses amplifikasi untuk analisis RAPD tanaman *Nepenthes*. Lima primer yang terpilih adalah primer OPO-11, OPO-13, OPT-7, OPY-14 dan OPY-17.



Gambar 1. Hasil Amplifikasi pada Seleksi Primer menggunakan Lima belas Primer A. Gambar yang dipertegas pitanya menggunakan *soft ware image lab*. B. Gambar sebelum dipertegas pitanya menggunakan *soft ware image lab*. 1. OPY-07; 2. OPY-06; 3. OPY-08; 4. OPO-13; 5. OPT-07; 6. OPY-14; 7. OPT-09; 8. OPO-05; 9. OPY-12; 10. OPO-06; 11. OPY-19; 12. OPD-08; 13. OPO-11; 14. OPY-17; 15. OPO-16.
* Primer yang dipilih

Primer ini dipilih karena menghasilkan pola pita yang mampu mengamplifikasi dengan jelas. Ruwaida

(2009) menyatakan bahwa seleksi primer dilakukan untuk mencari primer yang dapat mengamplifikasi pita DNA

yang jelas dan dalam jumlah banyak. Selain itu, seleksi primer juga dilakukan untuk mencari primer yang menghasilkan pita-pita yang polimorfik.

Variabilitas Genetik *Nepenthes*

Jumlah lokus dan jumlah pita hasil amplifikasi dari lima primer terpilih dapat dilihat pada Tabel 4.1. Variasi jumlah lokus dan pita yang dihasilkan tergantung pada jenis primer yang digunakan dan sampel DNA yang dianalisis. Ukuran pita DNA yang dihasilkan berkisar dari 150 bp (OPT-07) - 1.450 bp (OPO-13). Jumlah total lokus yang dihasilkan adalah 50 lokus. Jumlah lokus tertinggi dihasilkan pada primer OPO-13 yaitu 17 lokus dan jumlah lokus yang terendah dihasilkan oleh primer OPY-17 yaitu 4 lokus. Jumlah total pita yang dihasilkan dalam studi ini adalah 60 pita. Jumlah pita paling banyak dihasilkan oleh primer OPO-13 yaitu 21 pita, sedangkan jumlah pita paling sedikit diperoleh pada primer OPY-17 yaitu 6 pita. Pita DNA merupakan hasil berpasangnya nukleotida primer dengan nukleotida genom tanaman. Oleh karena itu,

semakin banyak primer yang digunakan akan semakin terwakili bagian-bagian genom tanaman (Karsinah *et al.*, 2002). Jumlah pita yang dihasilkan setelah amplifikasi DNA dengan PCR sangat tergantung pada primer mengenal homolognya pada cetakan DNA yang akan digunakan (Tingey *et al.*, 1994).

Dilihat dari jumlah pita, primer OPO-11 dan OPO-13 dalam studi ini menghasilkan jumlah pita yang lebih tinggi dibandingkan dengan primer OPO-11 dan OPO-13 yang juga pernah dicobakan oleh Siregar *et al.*, (2008) pada tanaman *Shorea johorensis* yang menghasilkan 1-10 fragmen pita. Hasil analisis PCR tanaman *Nepenthes* dengan menggunakan 5 jenis primer dapat dilihat pada Tabel 3. Panjang pita dan pola pita spesifik untuk masing-masing *Nepenthes* pada masing-masing primer dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 3. Analisis RAPD dari Sembilan Jenis *Nepenthes*

Primer	Urutan Basa	Ukuran Pita (bp)	Jumlah Lokus	Jumlah Pita
---------------	--------------------	-----------------------------	-------------------------	------------------------

OPO-11	5'GACAGGAGGT'3	200 - 850	10	14
OPO-13	5'GTCAGAGTCC'3	500 - 1.450	17	21
OPT-07	5'GGCAGGCTGT'3	150 - 600	12	12
OPY-14	5'GGTCGATCTG'3	200 - 850	7	7
OPY-17	5'GACGTGGTGA'3	500 - 900	4	6
Total	-	-	50	60

Tabel 4. Ukuran Pita Hasil Amplifikasi dan Pita Spesifik pada Masing-Masing Primer

Jenis <i>Nepenthes</i>	Ukuran Pita (bp)					Ukuran Pita Spesifik (bp)				
	OPO-11	OPO-13	OPT-07	OPY-14	OPY-17	OPO-11	OPO-13	OPT-07	OPY-14	OPY-17
ACO	348	1.140	534	-	-	348	-	534	-	-
	248	710	270					270		
MIR	-	1.155	-	-	-	-	1.155	-	-	-
		730					730			
GME	830	1.172	169	-	530	830	751	169	-	-
	413	751								
GHI	816	1.172	175	834	-	816	663	175	834	-
	413	663		403					403	
APB	724	1.404	580	-	530	-	1.404	580	-	-
	342	1.155	475				1.155	475		
	248	741					741			
APM	724	1.140	589	-	802	450	828	589	-	802
	450	828	525		521	244	681	525		
	342	681	293				516	293		
	244	516								
ABA	788	1.078	-	396	521	788	1.078	-	396	-
		553		247			553		247	
AHI	-	1.020	483	848	882	-	1.020	483	848	882
		710	261	511				261	511	
				269					269	
NXT	-	1.222	164	-	-	-	1.222	164	-	-
		701					701			

Pola pita yang spesifik untuk membedakan *Nepenthes ampularia* corong (ACO) dengan *Nepenthes* lainnya adalah primer OPO-11 (348 bp), dan OPT-07 (534 bp dan 270 bp). *Nepenthes mirabilis* (MIR) dengan jenis *Nepenthes* lain dalam studi ini dapat dibedakan dengan menggunakan primer OPO-13 dengan panjang pita 1.155 bp dan 730 bp. *Nepenthes gracilis* merah

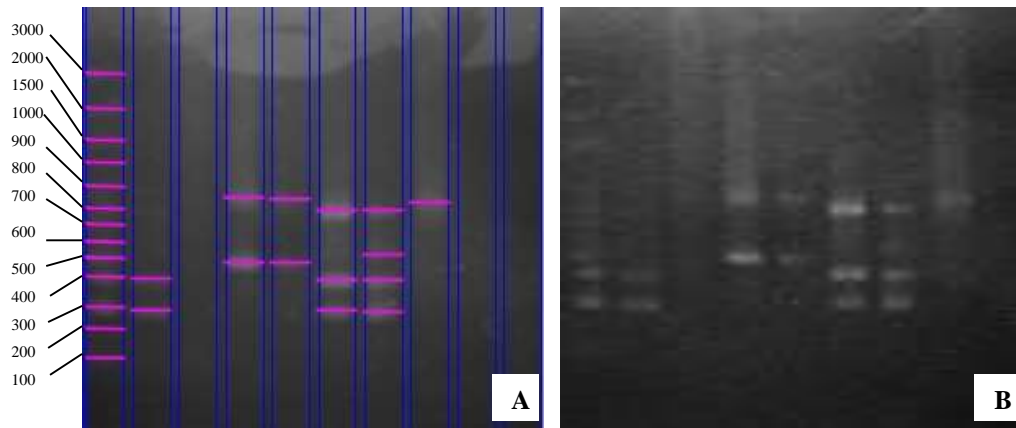
(GME) dengan jenis *Nepenthes* lainnya dibedakan dengan menggunakan primer OPO-11 (830 bp) dan OPO-13 (751 bp), dan OPT-07 (169 bp).

Nepenthes gracilis hijau (GHI) dengan jenis *Nepenthes* lainnya dapat dibedakan dengan menggunakan primer OPO-11 (816 bp), OPO-13 (663 bp), OPT-07 (175 bp), dan OPY-14 (834 bp dan 403 bp). *Nepenthes ampularia*

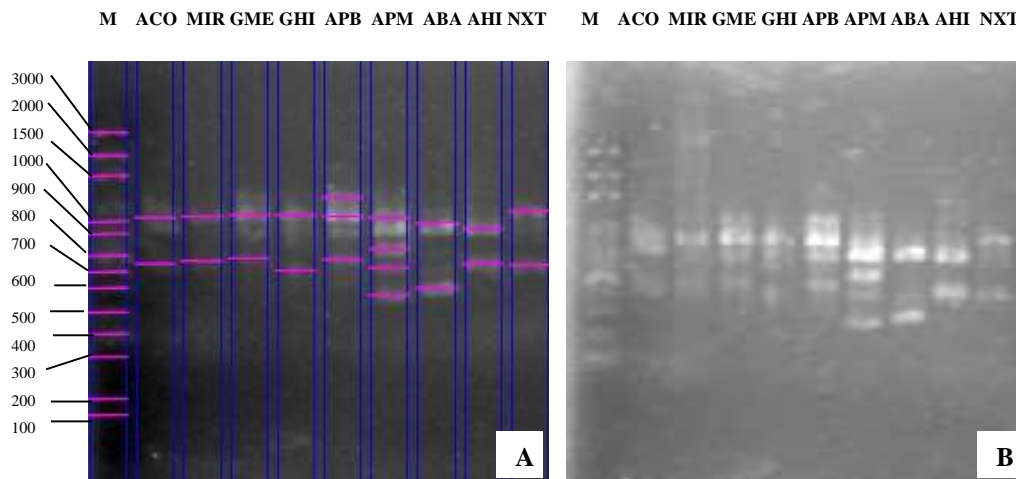
panjang batik (APB) dengan jenis *Nepenthes* lainnya dapat dibedakan dengan menggunakan primer OPO-13 (1.404 bp, 1.155 bp, dan 741 bp) dan OPT-07 (580 bp dan 475 bp). *Nepenthes ampularia* peristom merah (APM) dengan jenis *Nepenthes* lainnya dapat dibedakan dengan menggunakan primer OPO-11 (450 bp, dan 244 bp), OPO-13 (828 bp, 681 bp, dan 516 bp), OPT-07 (589 bp, 525 bp dan 293 bp) dan OPY-17 (802 bp). *Nepenthes ampularia* batik (ABA) dengan *Nepenthes* lainnya dapat dibedakan dengan menggunakan primer OPO-11 (788 bp), OPO-13 (1078 bp dan 553 bp) dan OPY-14 (396 bp dan 247 bp). *Nepenthes ampularia* hijau (AHI) dengan *Nepenthes* lainnya dapat dibedakan dengan menggunakan primer OPO-13 (1020 bp), OPT-07 (483 bp, dan 261 bp), OPY-14 (848 bp, 511 bp, dan 269 bp) dan OPY-17 (882 bp).

Nepenthes x trichocarpa (NXT) dengan jenis *Nepenthes* lainnya dapat dibedakan dengan menggunakan primer OPO-13 (1.222 bp, dan 701 bp) dan OPT-07 (164 bp).

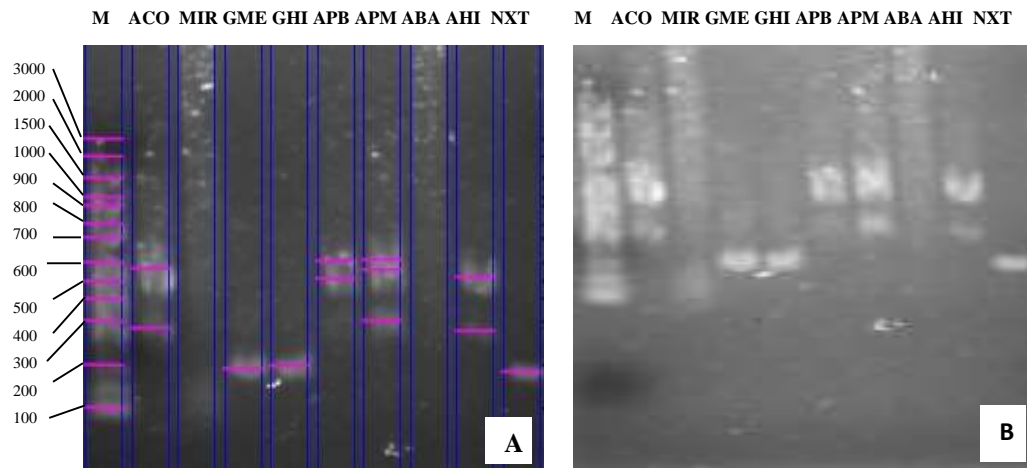
Pita-pita spesifik yang terdeteksi ini dapat digunakan sebagai informasi awal untuk identifikasi jenis tanaman *Nepenthes* berdasarkan analisis molekuler DNA dan sekaligus dapat mengatasi kelemahan identifikasi secara morfologi. Namun demikian masih diperlukan pengujian lebih lanjut dengan menggunakan banyak primer lagi. Hasil amplifikasi *Nepenthes* pada masing-masing primer yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 2-6. Lima *Nepenthes ampularia* dalam studi ini yang secara morfologi berbeda satu sama lain, ternyata berdasarkan penanda DNA yang digunakan memiliki pola pita yang berbeda.



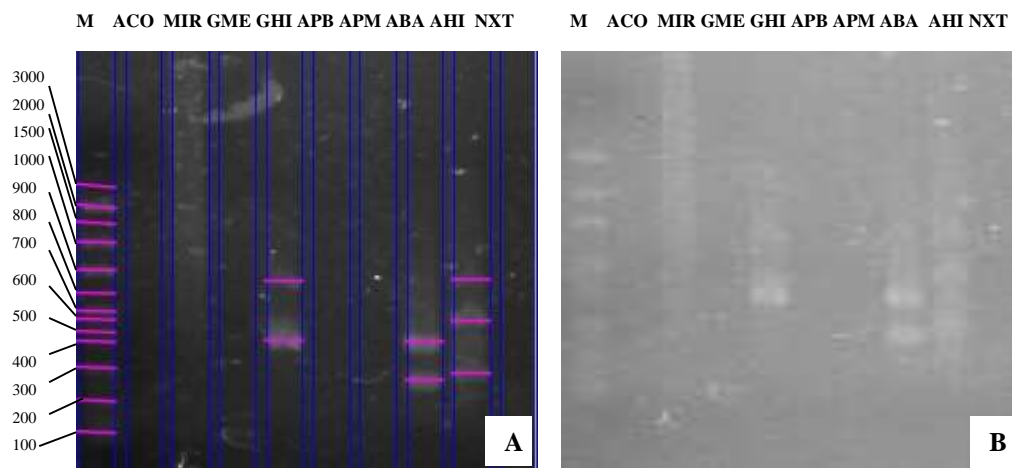
Gambar 2. Pola Pita *Nepenthes* pada Primer OPO-11 A. Gambar yang dipertegas pitanya dengan *image lab* B. Gambar sebelum menggunakan *image lab*



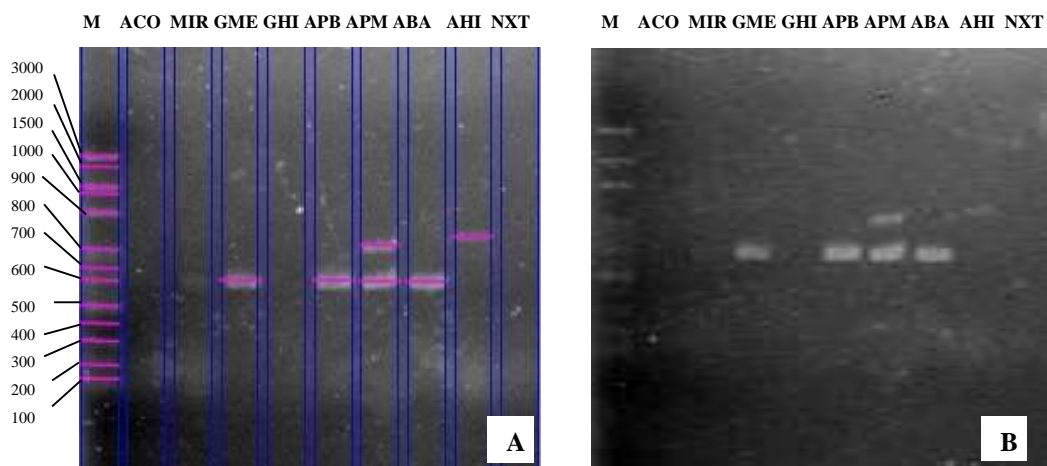
Gambar 3. Pola Pita *Nepenthes* pada Primer OPO-13 A. Gambar yang dipertegas pitanya dengan *image lab* B. Gambar sebelum menggunakan *image lab*



Gambar 4. Pola Pita *Nepenthes* pada Primer OPT-07 A. Gambar yang dipertegas pitanya dengan *image lab* B. Gambar sebelum menggunakan *image lab*



Gambar 5. Pola Pita *Nepenthes* pada Primer OPY-14 A. Gambar yang dipertegas pitanya dengan *image lab* B. Gambar sebelum menggunakan *image lab*



Gambar 6. Pola Pita *Nepenthes* pada Primer OPY-17 A. Gambar dipertegas dengan *image lab* B. Gambar sebelum menggunakan *image lab*

Hasil dari amplifikasi *Nepenthes* menunjukkan bahwa Jenis *Nepenthes ampularia* satu dengan yang lainnya dapat dibedakan oleh kelima primer (OPO-11, OPO-13, OPT-07, OPY-14, dan OPY-17) yang digunakan dalam studi ini dengan ukuran pita DNA dapat dilihat pada Tabel 4. Hal yang sama juga diamati pada *Nepenthes gracilis* hijau dan *Nepenthes gracilis* merah, dimana secara morfologi mereka berbeda warna kantongnya (Rosmaina dan Zulfahmi, 2011), ternyata keduanya dapat dibedakan menggunakan primer OPO-13, OPO-11 dan OPT-07 seperti terlihat pada Tabel 4. Tingginya variasi ukuran pita yang dihasilkan pada masing-masing *Nepenthes* kemungkinan erat kaitannya dengan sistem perkawinan pada tanaman *Nepenthes* ini yaitu menyerbuk silang. Tanaman *Nepenthes* adalah tanaman *diocious*, sehingga memiliki sistem penyerbukan

silang. Tanaman yang menyerbuk silang biasanya memiliki tingkat keragaman yang tinggi, akibat adanya penggabungan gamet jantan dan betina pada proses pembuahan. Adanya pola pita yang spesifik dalam membedakan antar jenis *Nepenthes* ini menunjukkan bahwa RAPD adalah penanda yang dapat membedakan antar jenis *Nepenthes*.

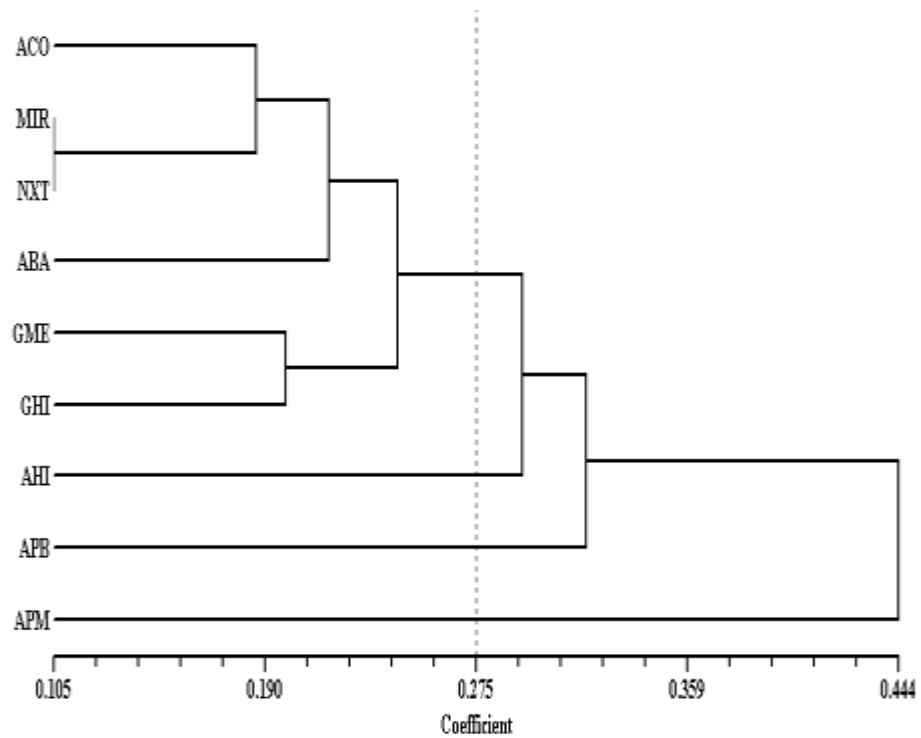
Jarak genetik merupakan parameter untuk melihat tingkat kekerabatan genetik spesies yang diteliti. Nilai jarak genetik berkisar dari 0-1. Nilai 0 menunjukkan spesies-spesies yang diamati memiliki hubungan kekerabatan yang sangat dekat, dan nilai 1 menunjukkan spesies-spesies yang diamati memiliki hubungan kekerabatan yang jauh. Jarak genetik antar tanaman *Nepenthes* dalam studi ini berkisar dari 0.105 - 0.545 seperti terlihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Nilai Jarak Genetik *Nepenthes* Berdasarkan Nei (1972)

Jenis	ACO	MIR	GME	GHI	APB	APM	ABA	AHI	NXT
ACO	0								
MIR	0.174	0							
GME	0.274	0.174	0						
GHI	0.301	0.198	0.198	0					
APB	0.301	0.198	0.301	0.386	0				
APM	0.415	0.357	0.478	0.511	0.446	0			
ABA	0.274	0.174	0.274	0.301	0.357	0.415	0		
AHI	0.274	0.223	0.328	0.357	0.415	0.545	0.328	0	
NXT	0.198	0.105	0.198	0.223	0.274	0.386	0.198	0.248	0

Jarak genetik terendah yang diamati adalah *Nepenthes x trichocarpa* (NHB) dengan *N. mirabilis* (MIR) yaitu 0.105, sedangkan Jarak genetik tertinggi terlihat pada *Nepenthes ampularia* hijau (AHI) dan *Nepenthes ampularia peristom* merah (APM) yaitu 0.545. Hasil jarak genetik berdasarkan lima primer yang digunakan dapat disimpulkan bahwa *Nepenthes trichocarpa* (NXT) dan *Nepenthes mirabilis* (MIR) memiliki hubungan kekerabatan yang dekat. Sedangkan *Nepenthes Ampularia* hijau (AHI) dengan *Nepenthes ampularia* peristom merah (APM) memiliki hubungan kekerabatan yang jauh. Analisis kluster tanaman *Nepenthes* berdasarkan *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic* (UPGMA) menggunakan *software* NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate System*) versi 2.00., dihasilkan dendogram seperti terlihat pada Gambar 4.8. Dimana pada jarak genetik 0.275, tanaman *Nepenthes* dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok, yaitu kelompok pertama terdiri dari *Nepenthes ampularia* corong (ACO), *Nepenthes mirabilis* (MIR),

Nepenthes x trichocarpa (NXT), *Nepenthes ampularia* batik (ABA), *Nepenthes gracilis* merah (GME), *Nepenthes gracilis* hijau (GHI); kelompok kedua, ketiga dan keempat masing-masing terdiri atas satu jenis yaitu *Nepenthes ampularia* hijau (AHI), *Nepenthes ampularia* panjang batik (APB), dan *Nepenthes ampularia* peristom merah (APM). Koefisien jarak genetik 0.190, *Nepenthes* dikelompokkan pada empat sub kelompok yaitu (i) *Nepenthes ampularia* corong (ACO), *Nepenthes mirabilis* (MIR), dan *Nepenthes x trichocarpa* (NXT), (ii) *Nepenthes ampularia* batik (ABA), (iii) *Nepenthes gracilis* merah (GME), (iv) *Nepenthes gracilis* hijau (GHI). Hasil yang cukup menakjubkan pada dendogram ini adalah *Nepenthes mirabilis* (MIR) dan *Nepenthes x trichocarpa* (NXT) berada dalam satu kelompok, jika dibandingkan secara morfologi *Nepenthes mirabilis* (MIR) dan *N. x trichocarpa* (NXT) memiliki ciri yang sangat berbeda.



Gambar 7. Dendrogram Sembilan Sampel *Nepenthes* yang dihasilkan dari Analisis NTSYS Gabungan Lima Primer



Sumber : Rosmaina & Zulfahmi, 2011

Gambar 8. Foto *Nepenthes* A. Daun *Nepenthes mirabilis* (MIR) B. Kantong *Nepenthes mirabilis* (MIR) C. Daun dan kantong *Nepenthes x trichocarpa* (NXT)

Hal lain yang mungkin menyebabkan kedua jenis ini berada dalam satu kelompok adalah hasil analisis RAPD menunjukkan bahwa pada *Nepenthes mirabilis* (MIR) hanya bisa dideteksi oleh satu primer yaitu

primer OPO-13 (1.155 bp, 730 bp) dan empat primer lainnya tidak mengamplifikasi pola pita *Nepenthes mirabilis*, demikian juga dengan *N. x trichocarpa* (NXT), namun ada dua primer yang mampu menghasilkan pita

yaitu OPO-13 (1.222 bp, dan 701 bp) dan OPT-07 (164 bp), sehingga diduga hal inilah yang menyebabkan *Nepenthes mirabilis* (MIR) dan *N. x trichocarpa* (NXT) memiliki jarak genetik yang dekat yaitu 0,105 (Tabel 6) dan berada dalam satu kelompok di dendogram (Gambar 7). Oleh karena itu perlu lebih banyak primer lagi untuk membedakan kedua jenis ini.

Menurut Mansur (2006) *Nepenthes x trichocarpa* merupakan hasil persilangan antara *Nepenthes ampularia* dengan *Nepenthes gracilis*. Informasi mengenai hubungan kekerabatan antar jenis *Nepenthes* ini dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan dalam menyusun strategi pemuliaan *Nepenthes* di masa mendatang, seperti dalam pemilihan tetua yang akan digunakan dalam persilangan. Untuk meningkatkan heterozigot suatu jenis tanaman maka persilangan dilakukan pada jenis tanaman yang memiliki jarak genetik jauh dan untuk meningkatkan homozigot suatu tanaman maka persilangan dilakukan pada jenis tanaman yang memiliki jarak genetik dekat.

KESIMPULAN

1. Nilai jarak genetik tanaman *Nepenthes* berkisar dari 0.105-0.545.
2. Tanaman *Nepenthes* dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok, berdasarkan Dendogram UPGMA pada jarak genetik 0.275 yaitu kelompok pertama terdiri dari *Nepenthes ampularia* corong (ACO), *Nepenthes mirabilis* (MIR), *Nepenthes x trichocarpa* (NXT), *Nepenthes ampularia* batik (ABA), *Nepenthes gracilis* merah (GME), *Nepenthes gracilis* hijau (GHI); kelompok kedua, ketiga dan keempat masing-masing terdiri atas satu jenis yaitu *Nepenthes ampularia* hijau (AHI), *Nepenthes ampularia* panjang batik (APB), *Nepenthes ampularia* peristum merah (APM).

SARAN

Perlu analisis RAPD pada tanaman *Nepenthes* dengan menggunakan lebih banyak primer yang berbeda, khususnya pada *Nepenthes mirabilis* dan *N. x trichocarpa* (*N. ampularia* X *N. gracilis*).

DAFTAR PUSTAKA

- Azwar, F., Kusarno, A., & Rahman, S.T. 2006. Kantong semar (*Nepenthes* spp) di hutan sumatera, Tanaman Unik yang Semakin Langka. *In* Prosiding ekspose hasil-hasil penelitian. Hal.173-181.
- Doyle, J.J., & J.L. Doyle. 1990. Isolation of Plant DNA From Fresh Tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Finkeldey, R. 2000. An Introduction of Forest Genetic and Tree Breeding. Universitas Goettingen. 241 p.
- Handayani, T & Syamsudin. 1998. *Nepenthes Raflesiana* jack, dan Keturunannya. *In* UPT Balai Pengembangan Kebun Raya – LIPI. Bogor.
- Irwanto, R. 2007. *Inventarisasi Tumbuhan berpotensi Hias di Pasi Singkawang- Kalimantan Barat*. UPT BKT Kebun Raya Purwodadi – LIPI, Pasuruan Indonesia.
- Julisaniah, N. I., L. Sulistyowati., & A. N. Sugiharto. 2008. Analisis Kekerabatan Mentimun (*Cucumis Sativum* L) menggunakan metode RAPD-PCR dan isozim. *Biodiversitas*, 9(2): 8-12.
- Karsinah, S., L. Sulistyowati., & H. Aswidinnoor. 2002. Keragaman Genetik Plasma Nuftah Jeruk Berdasarkan Analisis Penanda RAPD. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, 7(1) : 8-16.
- Mansur, M. 2006. *Nepenthes, Kantong Semar yang Unik*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Nei, M. 1972. *Genetic Distance Between Populations*. *American Naturalist*, 106: 283-92.
- Pandin, D. S. 2010. Penanda DNA untuk Pemuliaan Kelapa (*Cocos nucifera* L). *Perspektif*, 9(1): 21-23.
- Rohlf FJ. 1998. NTSYS-pc version 2.0. Numerical Taxonomi and Multivariate Analisis System. *Exeter Software, Setauket*. New York.
- Rosmaina. 2003. The Study of Genetic Diversity and Relationship on *Musa* spp By Mean Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD). *Skripsi*. Departmen of agronomi faculty of agriculture. Bogor Agriculture University.
- Rosmaina & Zulfahmi. 2011. Eksplorasi dan Karakterisasi Kantong Semar (*Nepenthes* sp.) Di Kampus Uin Suska Riau. *Jurnal Agroteknologi*, 2(1): 51-56
- Ruwaida, I., P. Supriadi & Parjanto. 2009. Variability Analysis of Sukun Durian Plant (*Durio zibethinus*) based on RAPD Marker. *Bioscebnce*, 1(2): 84-91.
- Siregar, I.Z., Tedi, Y., & Prijanto, P. 2008. Implikasi genetik metode pembiakan tanaman *Shorea Johorensis* Foxw pada sistem silvikultur tebang pilih tanam jalur (TPTJ). *Biodiversitas*, 9(4): 250-254.