

# Variasi Genetik pada Marga *Dicksonia* Koleksi Kebun Raya Bali – Deteksi dengan PCR - SSCP

Wenni S. Lestari dan Bayu Adjie

UPT Balai Konservasi Tumbuhan, Kebun Raya “Eka Karya” Bali – LIPI

e-mail : [fernsmania@yahoo.com](mailto:fernsmania@yahoo.com)

Diterima Maret 2006 Disetujui untuk diterbitkan September 2006

## Abstract

*Dicksonia* is one of tree ferns species that can be found in Indonesian highlands. Due to their wide distribution this species was suggested to have genetic variation among their population. Samples from Bali, West Java (Cibodas) and East Nusa Tenggara were compared using the PCR-SSCP methods to detect genetic variation of trnL-trnF intergenic spacer from the cpDNA plastid genome. Sample from Bali and West Java (Cibodas) did not morphologically and genetically varied, but they were varied to samples from East Nusa Tenggara.

**Key words:** *Dicksonia*, genetic variation, PCR-SSCP, cpDNA, trnL-trnF, conservation.

## Pendahuluan

Suku Dicksoniaceae meliputi tujuh marga yaitu *Calochlaena*, *Cibotium*, *Culcita*, *Cystodium*, *Dicksonia*, *Lophosoria* dan *Thyrsopteris*. Dalam marga *Dicksonia* sendiri terdapat 20 – 25 jenis namun hingga kini hanya dua jenis yang terdapat di Indonesia yaitu *Dicksonia mollis* dan *Dicksonia blumei* (Large dan Braggins, 2004). Kedua jenis paku ini berbentuk pohon (Lawrence, 1955). Di Indonesia *Dicksonia blumei* (Kunze) Moore yang sering pula disebut sebagai *Balantium blumei* Kunze atau *Dicksonia chrysotricha* Moore dan masyarakat menyebutnya dengan Paku Kidang (Sastrapradja *et al.*, 1979) dapat ditemukan di Dataran Tinggi Karo, Sumatera, Jawa, Kalimantan dan Sulawesi Tengah pada ketinggian antara 1.500 – 2.500 m dpl (Large dan Braggins, 2004).

*Dicksonia blumei* memiliki batang yang dapat mencapai panjang 6 meter, entalnya majemuk menyirip ganda dua (bipinatus) atau tiga (tripinatus) dengan panjang mencapai 2 meter dan anak daun (pinna) bagian bawah yang mencapai 70 cm. Tangkai entalnya berambut terutama saat masih muda dengan bagian pangkal yang berwarna gelap dan tertutup oleh rambut-rambut berwarna kemerahan hingga coklat gelap terutama pada bagian yang terletak dekat dasar. Sorus besar, bulat dan terdapat di bagian tepi daun, tersusun dua hingga enam setiap pinnula (Large dan Braggins, 2004).

Kebun Raya “Eka Karya” Bali sebagai salah satu lembaga konservasi tumbuhan saat ini memiliki koleksi *Dicksonia blumei* yang berasal dari Bukit Pohen, Bali. Populasi alamiahnya sendiri sudah sangat mengkhawatirkan akibat pengambilan secara berlebihan. Selain sebagai tanaman hias, paku ini dimanfaatkan pula sebagai obat pencegah pendarahan (Sastrapradja *et al.*, 1979; de Winter dan Amoroso, 2003). Sayangnya, masyarakat masih mengandalkan ketersediaannya di alam dan belum ada yang berhasil membudidayakan.

Arinasa (1999) berhasil mengoleksi satu spesimen *Dicksonia* sebagai *Dicksonia blumei* dari perjalanan eksplorasi di Gunung Mutis (Timor), Nusa Tenggara Timur (NTT). Paku ini hanya ditemukan satu populasi tunggal dengan beberapa individu saja (Arinasa, 1999). Jika dibandingkan dengan *Dicksonia blumei* yang berasal dari Bali, *Dicksonia* yang berasal dari NTT tersebut menunjukkan perbedaan. Perbedaan tersebut dapat dilihat pada tangkai entalnya yang lebih kecil dengan roset yang lebih rapat dan warna rambutnya yang tidak semerah *Dicksonia blumei* dari Bali, namun cenderung coklat pucat dan terasa lebih halus bila disentuh. Namun demikian sporanya sama-sama berbentuk segitiga dan berwarna kuning cerah.

Untuk mengetahui ada atau tidaknya variasi genetik diantara kedua koleksi *Dicksonia* tersebut dapat dilakukan dengan analisis *single-stranded conformation polymorphism* (SSCP) yang berupa metode sederhana untuk mendeteksi adanya variasi genetik pada sampel DNA. Salah satu fragmen DNA yang sering digunakan dalam studi sistematik molekuler tumbuhan adalah segmen *trnL-trnF intergenic spacer* dari genom DNA kloroplas yang memiliki panjang antara 300–800 pasang basa tergantung pada panjang penyisipan/penghilangan asam aminonya (*insertion/deletion* 'indels'). Sebagai pembanding dalam hal ini digunakan pula spesimen *Dicksonia blumei* yang berasal dari Taman Nasional Gunung Gede – Pangrango, Jawa Barat yang merupakan koleksi Kebun Raya Cibodas. *Dicksonia blumei* koleksi Kebun Raya Cibodas ini apabila dibandingkan dengan *Dicksonia blumei* yang berasal dari Bali secara morfologi tidak menunjukkan perbedaan yang jelas. Namun demikian belum diketahui variasi genetik di antara ketiganya.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemungkinan adanya variasi genetik pada ketiga spesimen *Dicksonia* yang berasal dari tiga populasi tersebut di atas berdasar pada DNA kloroplasnya. Untuk memudahkan, selanjutnya ketiganya akan disebut sebagai *Dicksonia blumei* strain Bali, *Dicksonia* sp. strain NTT dan *D. blumei* strain Cibodas.

## Materi dan metode

Sampel *Dicksonia blumei* berasal dari tanaman hidup yang merupakan koleksi Kebun Raya “Eka Karya” Bali dan Kebun Raya Cibodas (Jawa Barat) (Tabel 1). Daun disimpan dalam *silica gel* sampai DNA siap untuk diekstraksi. Total DNA diekstrak dengan menggunakan *2X CTAB* menurut Doyle dan Doyle (1987). Total DNA ini diuji dengan elektroforesis pada 1% agarose dan divisualisasikan dengan *ethidium bromide* dan  $\Phi$ X174 DNA-Hae III Digest sebagai penanda (Gambar 1a.).

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) terhadap segmen DNA kloroplas (*cpDNA*) *trnL(UAA)-trnF(GAA) intergenic spacer* (IGS) menggunakan *universal primer “e”* dan *“f”* dari Taberlet *dkk.* (1991). Kondisi PCR adalah pemanasan awal 95 °C (3 menit), diikuti dengan denaturasi pada 94 °C (60 detik), penempelan primer pada 55 °C (60 detik) dan tahap perpanjangan rantai polimer pada 72 °C (60 detik) yang kesemuanya ini diulang sebanyak 25 kali putaran, dan proses perpanjangan akhir dilakukan pada 72 °C (10 menit). Produk PCR kemudian diuji pula dengan metode seperti di atas (Gambar 1b.).

Analisis PCR-SSCP dilakukan menurut Yap dan McGee (1994) dan Watano, *dkk.* (2004). Sebagian produk PCR (3  $\mu$ l) dicampurkan pada solusi *formamide-dye* (90% formamide, 0,005% bromophenol blue, 8% glycerol) kemudian didenaturisasi pada suhu 95 °C selama 3 menit. Sampel yang didenaturisasi tersebut segera didinginkan dengan es dan sebanyak 5  $\mu$ L diisikan pada 0,5X MDE *gel* (Cambrex BioScience, Rockland Inc.) dengan dimensi lebar 135 mm, panjang 130 mm dan tebal 0,75 mm. Elektroporesis dilakukan dalam 2 *gel* dengan konsentrasi gliserol masing-masing 2% dan 5 % pada suhu 20 °C, 300 volt selama 8 jam dengan 0,5X TBE (50 mmol/L Tris, 41,5 mmol/L boric acid dan 1 mmol/L EDTA-2Na) sebagai buffer. Alat elektroporesis yang digunakan merupakan alat yang suhunya dikendalikan dengan sirkulasi air dingin (ATTO AE-6290, Tokyo, Japan). Pita DNA kemudian divisualisasikan menggunakan *DNA Silver Staining Kit* (PlusOne, Pharmacia Biotech).

Tabel 1. Jenis *Dicksonia* sp dan asal sampel yang diteliti  
Table1. *Dicksonia* species and sample origin

| No. | Jenis                   | Koleksi                     | Asal                  |
|-----|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 1.  | <i>Dicksonia blumei</i> | Kebun Raya “Eka Karya” Bali | Bukit Pohen, Bali     |
| 2.  | <i>Dicksonia</i> sp.    | Kebun Raya “Eka Karya” Bali | Gunung Mutis, NTT     |
| 3.  | <i>Dicksonia blumei</i> | Kebun Raya Cibodas          | TN. G. Gede-Pangrango |

## Hasil dan Pembahasan

Adanya kesamaan maupun perbedaan morfologi antara ketiga spesimen *Dicksonia* dari ketiga tempat yang secara geografis berjauhan tersebut memungkinkan terjadinya variasi genetik di antara ketiganya. Untuk memastikan hal ini telah dilakukan serangkaian uji PCR-SSCP.

Istilah SSCP pertama kali dipakai oleh Hayasi (1991) untuk menjelaskan perbedaan mobilitas sekuens guna mendeteksi polimorfisme DNA pada analisis *Southern Blots*. Analisis SSCP ini diterapkan pada genomik DNA berukuran kecil dan juga *cDNA* yang dihasilkan dari proses *PCR*. Variasi pada genom berupa mutasi satu basa sekalipun yang terdapat pada rangkaian DNA dapat dideteksi melalui metode ini.



Gambar 1. Struktur Morfologi Rambut *Dicksonia* sp.: a. strain NTT dan b. strain Bali  
Figure 1. Morphological structures of *Dicksonia* hair : a. NTT strain and b. Bali strain

SSCP dilakukan dengan mendenaturasikan *dsDNA* menjadi *ssDNA* dan memisahkan fragmen DNA tersebut pada *non-denaturing polyacrylamide gel*. Di bawah kondisi yang sesuai, mobilitas elektroforesis DNA tergantung tidak hanya pada panjang dan berat molekulnya saja tetapi juga pada pola kesesuaiannya (*conformation*). Sensitivitas metode ini sangat baik pada DNA dengan panjang kurang dari 400 pasang basa. Mobilitas sampel DNA pada gel akan dipengaruhi oleh suhu, komposisi gel dan kondisi elektroforesis. Perbedaan urutan DNA akan terlihat berupa pola dan letak pita yang berbeda pada gel.

Produk DNA yang dihasilkan dari proses PCR menunjukkan bahwa panjang segmen *trnL-trnF* pada *D. blumei* kira-kira 350 pasang basa (Gambar 2b.), panjang segmen DNA ini cukup ideal untuk analisis SSCP. Selanjutnya proses *SSCP-Silver staining* menghasilkan pola pita yang nampak pada gel seperti yang terlihat pada Gambar 3. Pada konsentrasi 2% glycerol masing-masing strand DNA terpisah dengan baik, sedangkan pada konsentrasi 5% glycerol masing-masing hanya menunjukkan satu pita. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi yang ideal untuk analisis PCR-SSCP pada segmen *trnL-F D. blumei* adalah pada konsentrasi 2% glycerol, pada suhu 20 °C, tegangan 300 V dan selama 8 jam.



Gambar 2. (a) Visualisasi total DNA dari berbagai *Dicksonia* sp: 1. penanda DNA; 2. *Acrostichum aureum* (tidak digunakan dalam penelitian ini); 3. strain Bali; 4. strain NTT; 5. strain Cibodas. (b) Visualisasi produk PCR segmen *trnL-trnF* dari berbagai *Dicksonia* sp: 1. penanda DNA; 2. strain Bali; 3. strain NTT dan 4. strain Cibodas.

Figure 2. (a) DNA visualisation: 1. DNA marker; 2. *Acrostichum aureum*; 3 Bali strain; 4. NTT strain and 5. Cibodas strain. (b) Visualisation of PCR: 1. DNA marker, 2. Bali strain; 3. NTT strain and 4. Cibodas strain

Pola pita DNA pada Gambar 3. menunjukkan adanya persamaan genetik antara strain Bali dan strain Cibodas yang ditunjukkan dengan jumlah dan posisi pita yang sama pada gel (adanya pita tambahan paling atas yang nampak pada kolom satu berasal dari produk non-spesifik PCR). Sedangkan pada strain NTT memperlihatkan pola pita yang berbeda dengan dua strain lainnya. Hal ini menunjukkan adanya variasi susunan DNA pada strain NTT jika dibandingkan dengan strain Bali dan Cibodas.

Menurut Arinasa (1999), populasi *Dicksonia blumei* dari Bali menunjukkan kondisi yang memprihatinkan. Populasinya di alam yang pada mulanya dapat ditemui di Bukit Pohen sekarang sudah tidak dapat ditemui lagi. Hal ini dikarenakan banyak diambil orang untuk dijual sebagai tanaman hias. Saat ini tanaman hidupnya hanya ditemui sebagai koleksi di Kebun Raya "Eka Karya" Bali, sedangkan populasi *D. blumei* dari Jawa Barat dapat ditemui sebagai koleksi Kebun Raya Cibodas dan populasi di alamnya masih dapat dijumpai di Taman Nasional Gunung Gede-Pangrango. *Dicksonia* strain NTT hanya ditemukan di Gunung Mutis yang populasinya hanya terdiri dari beberapa individu saja dan beberapa diantaranya telah dijadikan koleksi Kebun Raya "Eka Karya" Bali. Melihat dari penyebaran dan karakteristik yang berbeda dari *D. blumei* yang pernah dideskripsikan sebelumnya, strain NTT ini mungkin merupakan jenis endemik atau bahkan jenis baru yang berbeda dengan *D. blumei*.



Gambar 3. Visualisasi SSCP-Silver staining: 1. strain Bali, 2. strain Cibodas; 3. strain NTT; a. 2 % glycerol; b. 5 % glycerol.

Figure 3. Visualisation of Staining Silver SSCP: 1. Bali strain; 2. Cibodas strain 3. NTT strain, a. 2% of Glycerol, b. 5%

Seperti telah disadari sebelumnya bahwa populasi suatu jenis yang terdistribusi sangat luas baik secara horizontal maupun vertikal sangat memungkinkan terjadinya variasi genetik di dalam populasinya yang kerap kali memunculkan *cryptic species* atau *sibling species* seperti yang telah diketahui pada *Adiantum*, *Botrychium*, *Pityrogramma* dan lainnya (Paris *et al.*, 1989), *Athyrium* (Kurihara *et al.*, 1996), *Asplenium* (Yatabe *et al.*, 2001) dan *Ceratopteris* (Masuyama *et al.*, 2002). Studi ini hanya meliputi sebagian kecil sampel dari jumlah populasi yang ada hingga masih dibutuhkan penelitian dengan jumlah sampel yang lebih besar lagi. Metode seperti sitologi, *Isozyme*, *PCR-SSCP*, dan *DNA sequences* sangat membantu dalam mengungkapkan keberadaan variasi genetik pada suatu populasi tumbuhan.

### Kesimpulan dan Rekomendasi

*Dicksonia blumei* yang berasal dari Bali ternyata memiliki struktur genetik yang sama dengan spesimen yang berasal dari Cibodas. Sedangkan variasi genetik terdapat pada spesimen *Dicksonia* dari NTT. Untuk lebih memperjelas variasi susunan asam aminonya, perlu dilakukan *sequencing* DNA-nya. Usaha konservasi terhadap *D. blumei* ini perlu segera dilakukan mengingat ancaman dari pengambilan dan degradasi habitatnya yang semakin besar. Mengingat penyebaran dan populasi *Dicksonia* sp. strain NTT ini yang sangat terbatas dan unik, dibutuhkan penelitian yang lebih intensif terutama pada status taksonominya, yang mungkin merupakan jenis baru dan endemik.

Konsekuensi praktis dari tidak dikenalnya variasi genetik karena ketidaksadaran kita akan keanekaragaman dalam suatu kelompok taksa akan berakibat kurangnya perhatian pada substansi konservasi dan kepentingan ekonominya.

### Daftar Pustaka

- Arinasa, I.B.K. 1999. Persebaran Paku Kidang (*Dicksonia blumei* Moore) di Nusa Tenggara. Workshop dan Promosi Flora Kawasan Timur Indonesia. Kebun Raya Bali 15 – 17 Juli 1999.
- de Winter, W. P. and V. B. Amoroso (eds). 2003. Plant resources of South-East Asia : 15 (2) Cryptogams – Fern and Fern Allies. Prosea Foundation. Bogor.
- Doyle J.J. and J.L. Doyle. 1987. A Rapid DNA isolation procedure for small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemistry* 19:11-15

- Hayasi, K. 1991. PCR-SSCP: A Simple and sensitive method for detection of mutation in genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1 (34).
- Kurihara, T., Y. Watano, M Takamiya and T. Shimizu. 1996. Electrophoretic and cytological evidence for genetic heterogeneity and hybrid origin of *Athyrium oblitescens*. *J. Plant Res.* 109: 29-36.
- Large, M. F. and J. E. Braggins. 2004. *Tree Ferns*. Timber Press. Portland. pp: 287 – 292.
- Lawrence, G.. H. M. 1955. *Taxonomy of Vascular Plants*. The Macmilan Company. New York.
- Masuyama, S., Y. Yatabe. N. Murakami and Y. Watano. 2002. Cryptic species in the fern *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn. (Parkeriaceae). I. Molecular analyses and crossing tests. *J. Plant Res.* 115:87-97.
- Paris, C.A., F.S. Wagner and W.H. Wagner. 1989. Cryptic species, species delimitation, and taxonomic practice in homosporous ferns. *Amer. Fern J.* 79(2):46-54.
- Sastrapradja, S., J. J. Afriastini, D. Darnaedi dan E. A. Widjaja. 1979. *Jenis Paku Indonesia*. Lembaga Biologi Nasional – LIPI. Bogor.
- Taberlet, P., L. Gielly, G.. Pautau and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding region of chloroplast DNA. *Plant Molec. Biol.* 17:1105-1110.
- Watano, Y., A. Kanai and N. Tani. 2004. Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinnaceae) revealed by Molecular hybrid index analysis. *Am. J. Bot.* 9(1):65-72
- Yap, E. P. H and J. O. D. McGee. 1994. *PCR Technology Current Innovation*. Griffin and Griffin (eds.). CRC, London.
- Yatabe, Y., S. Masuyama, D. Darnaedi and N. Murakami. 2001. Molecular systematics of the *Asplenium nidus* complex from Mt. Halimun National Park, Indonesia: evidence for reproductive isolation among three sympatric *rbcL* sequence types. *Amer. J. Bot.* 88(8):1517-1522.