

STUDI FILOGENETIK DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER ANGGREK *Phalaenopsis* sp MENGUNAKAN MARKA MICROSATELIT

Fatimah¹ dan Dewi Sukma²

¹ Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Bioteknologi Dan Sumber Daya Genetik
Pertanian, Departemen Pertanian,

² Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.
fathyapril@yahoo.com

Anggrek merupakan tanaman hias yang sangat populer karena memiliki jenis yang beragam dan diperhitungkan sebagai tanaman penting dalam industri florikultur di Indonesia. Faktor Pembatas keberhasilan persilangan adalah tanaman ini memiliki fase juvenil yang relatif panjang, persilangan antar individu yang berkerabat jauh biasanya sulit dilakukan, dan apabila diperoleh hibrida, biji yang dihasilkannya sukar berkecambah atau steril. Oleh karena itu untuk mencapai keberhasilan dalam perbaikan genetik melalui persilangan, perlu mengetahui hubungan kekerabatan antar tetua yang dipilih sebagai bahan persilangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi secara molekuler beberapa spesies anggrek *Phalaenopsis* yang ada di Indonesia dan melihat hubungan kekerabatan dari spesies-spesies yang ada. Dalam studi ini, dilakukan karakterisasi kekerabatan genetik menggunakan marka DNA mikrosatelit untuk 13 *Phalaenopsis* spesies di Indonesia. Sebanyak 164 alel terdeteksi pada 12 primer mikrosatelit dari 13 spesies anggrek *Phalaenopsis*. Jumlah alel per lokus antara 2 alel (Pman02, Pam8, PGA6) hingga 5 alel (Plue6) dengan rata-rata 3.3 alel dari 12 loci. Nilai PIC berkisar antara 0.1319 (Pam8 and PGA6) hingga 0.6580 (Plue6) dengan rata-rata 0.4795. Berdasarkan *unrooted neighbor-joining tree* hubungan kekerabatan pada 13 anggrek *Phalaenopsis* terbagi menjadi 4 major klaster. Klaster 1 terdiri dari *P.lueddemänniana*, *P.cornucervi*, *P.violaceae*, *P.gigantea*. Klaster 2 terdiri dari *P.schilleriana*, *P.mannii*, *P.florescens*, *P.bellina*. Klaster 3 terdiri dari *P.amabilis*, *P.fuscata*, *P.zebrina*, *P.javanica*. dan Klaster 4 yaitu *P.amboinensis*.

Kata kunci: *Phalaenopsis*, primer mikrosatelit, kekerabatan genetik

PENDAHULUAN

Sejalan dengan permintaan anggrek baik sebagai tanaman maupun sebagai bunga potong yang cukup besar, maka usaha peningkatan dan penganekaragaman produk anggrek menjadi sangat penting. Untuk memperluas pasar dan meningkatkan kemampuan bersaing di pasar dalam dan luar negeri, diperlukan teknologi untuk menghasilkan anggrek dengan warna yang beragam, bentuk yang menarik, dan tahan lama dengan harga yang relatif terjangkau.

Keterbatasan sumber plasma nutfah anggrek yang mempunyai karakteristik unggul dan koleksi plasma nutfah yang tidak tertata dan terkarakterisasi dengan baik menyebabkan pemanfaatan koleksi plasma nutfah masih kurang optimal. Teknik pemuliaan saat ini masih terbatas pada persilangan konvensional. Padahal jenis-jenis unggul umumnya diperoleh melalui introgresi gen di luar spesies. Bioteknologi menjadi sangat penting dalam upaya perbaikan genetik anggrek. Untuk meningkatkan produksi tanaman dan bunga anggrek yang rata-rata produktivitasnya saat ini masih tergolong rendah bila dibandingkan potensinya, diperlukan upaya meningkatkan potensi genetik.

Manajemen plasma nutfah untuk anggrek-anggrek ini menjadi menantang karena tanaman ini memiliki fase juvenil yang relatif panjang. Persilangan antar individu yang berkerabat jauh biasanya sulit dilakukan, dan apabila diperoleh hibrida, biji yang dihasilkannya sukar berkecambah atau steril. Oleh karena itu untuk mencapai keberhasilan dalam perbaikan genetik melalui

persilangan yang dikendalikan oleh manusia, perlu mengetahui hubungan kekerabatan antar tetua yang dipilih sebagai sumber gen. Salah satu pembatas keberhasilan persilangan adalah kedekatan hubungan kekerabatan genetik antar tetua.

Genus *Phalaenopsis* termasuk ke dalam famili Orchidaceae, subfamili Epidendroideae, tribe Vandeeae dan subtribe Aeridiniinae (Criley, 2008). Anggota dari genus ini umumnya adalah epifit di pepohonan, biasanya berada di bawah naungan dan sedikit lembab. Beberapa spesies bahkan tumbuh sebagai litofit (Fighetti, 2004). Tanaman *Phalaenopsis* memiliki batang yang pendek biasanya dengan tiga hingga 6 daun. Secara hortikultura, *Phalaenopsis* merupakan genus yang penting dimana spesies liarnya seringkali digunakan sebagai tetua dalam persilangan anggrek.

Mikrosatelit atau simple sequence repeat (SSR) merupakan sequence DNA berulang yang pendek, sekitar 2-6 basa dan telah banyak dibuktikan sebagai alat yang berguna pada studi-studi karakterisasi, konservasi dan perbaikan tanaman pertanian penting. Prinsip dasar keberhasilan SSR sebagai alat molekuler adalah karena menyediakan kesempatan polimorfisme yang mudah dideteksi dari teknik lainnya seperti RFLP dan RAPD. Marka-marka ini memiliki nilai yang tinggi karena hipervariabel, ko-dominan, melimpah, dapat direproduksi dan mudah untuk dideteksi dengan menggunakan metode PCR. Sidik jari menggunakan marka mikrosatelit (SSR) telah berhasil digunakan untuk mengkonstruksi peta pautan genetik dan untuk identifikasi dan penandaan untuk gen-gen yang secara ekonomis penting pada sejumlah besar spesies tanaman (McCouch *et al.*, 2002).

Studi terkini di Indonesia mengenai hubungan kekerabatan genetik diantara 13 genotipe anggrek sub tribe Sarcanthinae berdasarkan 38 data fenotip dan 14 primer RAPD. Hubungan kekerabatan diantara tanaman anggrek berdasarkan fenotip tidak konsisten dengan pola pita DNA. Berdasarkan fenotip hubungan kekerabatan anggrek 'sub tribe' Sarcanthinae adalah dekat tetapi berdasarkan pola pita DNA dan gabungan keduanya adalah jauh (Kartikaningrum S, 2002). Dwiatmini (2003) melaporkan bahwa hubungan kekerabatan genetik diantara 19 genotipe anggrek *Phalaenopsis* dianalisis menggunakan marka RAPD tidak dapat mengidentifikasi pita spesifik untuk karakter atau genotip tertentu. Nilai koefisien determinasi yang kecil menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan diantara variabel-variabelnya lemah dimana jarak taksonomi rata-rata tidak dapat digunakan untuk mengestimasi kemiripan genetiknya. Studi lain yang dilakukan untuk analisis filogenetik menggunakan data dua sekuen DNA yang berasal dari matK, gen yang mengkode maturase yang berlokasi pada intron di gen plastid trnK dan ITS dan daerah (Internal transcribed spacer) 18S-26S DNA ribosom inti untuk melihat hubungan kekerabatan pada subtribe Aeridinae. Hasil penelitian menunjukkan inkonsistensi dengan klasifikasi sebelumnya dari subtribe ini yang disebabkan oleh homoplasi pada karakter-karakter ini (Taufik, 2005;2008). Purwantoro (2005) melaporkan hubungan kekerabatan enam belas jenis anggrek spesies berdasarkan karakter morfologinya. Hasil analisis cluster menunjukkan bahwa *Phalaenopsis* membentuk satu cluster, berdasarkan kesamaan tipe pertumbuhan batang, keragaan tanaman, daun, jumlah kuntum bunga, panjang tangkai bunga, diameter bunga dan panjang kelopak bunga.

Penelitian ini bertujuan untuk (i) mengevaluasi variasi genetik dan mendeteksi polimorfisme pada beberapa genotipe. (ii) mendapatkan hubungan kekerabatan genetik pada setiap spesies dan subspeciesnya.

METODE PENELITIAN

Studi keragaman genetik, di dalam koleksi plasma nutfah ini, 13 spesies *Phalaenopsis* spesies diperoleh dari koleksi berbagai nursery (Tabel 1). Sampel daun yang di panen dari 2 atau 3 individu dari setiap spesies dan di simpan di -20°C untuk ekstraksi DNA genomik. DNA genomik di ekstraksi sampel daun menggunakan cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) dengan sedikit modifikasi (Wang, 2009). Primer mikrosatelit didesain berdasarkan sekuen mikrosatelit NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan menggunakan program BatchPrimer3 (<http://probes.pw.usda.gov/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi>.) teridentifikasi repeat motif di-

tri- dan tetra-repeat. Sebanyak dua puluh pasang kandidat primer telah didesain untuk melihat tingkat polimorfismenya. dan terseleksi sebanyak 12 primer yang akan digunakan untuk SSR amplification menggunakan semua sampel *Phalaenopsis*. SSR amplification sebanyak 20 µL dari koktail PCR. Reaksi PCR menggunakan MJ Research thermal cycler dengan inisial denaturasi pada 94°C selama 3 menit diikuti dengan 30 siklus dari 30 detik pada 94°C, 40 detik pada suhu annealingnya, 30 detik pada 72°C dan ekstensi akhir selama 7 menit pada 72°C. Untuk profil marka SSR, Produk PCR akan dielektroforasi pada 4% agarose gel, dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan ethidium bromide. Pola yang diperoleh dari hasil elektroforesis produk PCR products akan disimpan menggunakan Gel-Doc.

Tabel 1. Koleksi Sampel *Phalaenopsis* yang telah diinventarisasi

No.	Nama	Asal koleksi
1.	<i>Phalaenopsis amabilis</i>	Kebun Raya Bogor
2.	<i>Phalaenopsis amboinensis</i>	Kebun Raya Bogor
3.	<i>Phalaenopsis cornucervi</i>	Kebun Raya Bogor
4.	<i>Phalaenopsis fuscata</i>	Kebun Raya Bogor
5.	<i>Phalaenopsis javanica</i>	Kebun Raya Bogor
6.	<i>Phalaenopsis zebrina</i>	Kebun Raya Bogor
7.	<i>Phalaenopsis violaceae</i>	TAIP Jakarta
8.	<i>Phalaenopsis floresensis</i>	TAIP Jakarta
9.	<i>Phalaenopsis bellina</i>	TAIP Jakarta
10.	<i>Phalaenopsis gigantea</i>	Indoflowers,Bogor
11.	<i>Phalaenopsis schileriana</i>	Indoflowers,Bogor
12.	<i>Phalaenopsis luddemania</i>	Indoflowers,Bogor
13.	<i>Phalaenopsis mannii</i>	Indoflowers,Bogor

Analisis fragmen mikrosatelit

Data yang diperoleh berupa alel-alel perlokusnya akan dievaluasi dari 32 spesies *Phalaenopsis*. Berdasarkan ukuran alel, analisis statistika memakai software, (i) Jarak genetik akan dikalkulasi menggunakan Dc (Cavalli-Sforza dan Edwards, 1967). Konstruksi filogenetik berdasarkan metode Neighbor-joining (Saitou dan Nei 1987) yang diimplementasikan pada program PowerMarker ([http://www/powermarker.net](http://www.powermarker.net)).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Variasi Marka Mikrosatelit

Sebanyak 164 alel terdeteksi pada 12 marka mikrosatelit dari 13 spesies anggrek *Phalaenopsis*. Jumlah alel per lokus antara 2 alel (Pman02, Pam8, PGA6) hingga 5 alel (Plue6) dengan rata-rata 3.3 alel dari 12 loci. Nilai PIC berkisar antara 0.1319 (Pam8 and PGA6) hingga 0.6580 (Plue6) dengan rata-rata 0.4795 dapat dilihat pada Tabel 2.

Analisis Jarak Genetik

Berdasarkan jarak genetik (*Genetic distance*) pada 13 anggrek *Phalaenopsis* sp bervariasi dari minimum 0.1501 (antara *P.florescens* dan *P.bellina*) hingga maksimal 0.6752 (antara *P.mannii* dan *P.amabilis*, *P.bellina* dan *P.amboinensis*, *P.violacea* dan *P.amboinensis*, *P.violacea* dan *P.fuscata*, *P.zebrina* dan *P.violaceae*) (Tabel 3). Hal ini menunjukkan tingginya variasi genetik yang ada pada spesies *Phalaenopsis*. Berdasarkan *unrooted neighbor-joining tree* merefleksikan hubungan

kekerabatan *Phalaenopsis* terbagi menjadi 4 major klaster pada anggrek *Phalaenopsis sp* terkoleksi (Gambar 1). Klaster 1 terdiri dari *P.lueddemanniana*, *P.cornucervi*, *P.violaceae*, *P.gigantea*.

Table 2. Data summary dari 12 primer mikrosatelit pada 13 anggrek *Phalaenopsis sp*.

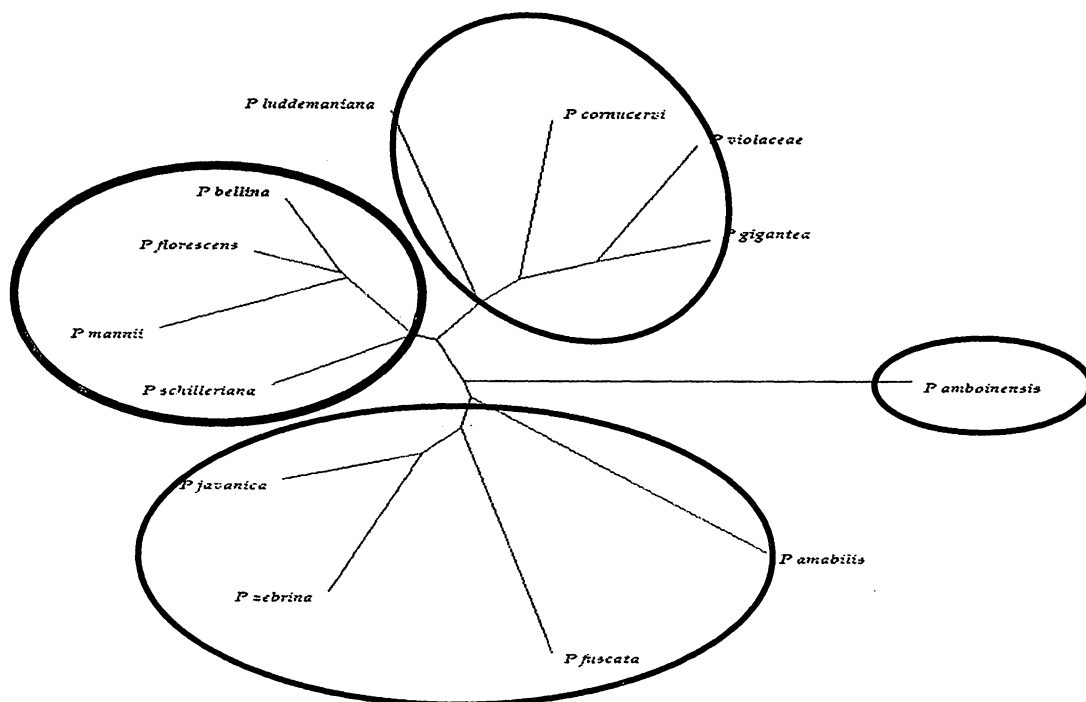
Marker	Motif	Size Range (bp)	Jumlah alel	Major Allele Freq.	PIC	GenBank Acc.
Pvio01	(AG)7	129-140	3	0.6154	0.4836	AJ575763
Pmano2	(AG)10	136-140	2	0.5385	0.3735	AJ575760
Plue03	(AG)7	129-139	3	0.7692	0.3434	AJ575759
Pambo4	(AG)6	125-130	4	0.6154	0.5056	AJ575750
Pambo5	(AG)6	127-130	3	0.4615	0.4723	AJ566347
Plue6	(AG)7	135-160	5	0.5000	0.6198	AJ575759
Pam8	(GTGA)4	100-120	2	0.9231	0.1319	AJ888295
Pcor9	(AG)7	110-140	4	0.5385	0.5945	AJ575752
PGA6	(CA)10	150-160	2	0.9231	0.1319	EF462862
Plue13	(AG)6	137-160	4	0.3846	0.6580	AJ566353
Pmads52	(TTG)6	140-190	3	0.8462	0.2552	AY378151
Pnos10	(AG)7	120-170	5	0.5385	0.5958	AJ566356

Tabel 3. Matriks jarak genetik CsChord pada 13 *Phalaenopsis* berdasarkan data mikrosatelit

	P_a ma	P_a mbo	P_b ell	P_co rnu	P_flo res	P_f usc	P_g ig	P_j ava	P_l ue	P_ma nnii	P_sc hill	P_vi ola	P_z ebr
P_amabilis	0.00												
P_amboinensis	0.60	0.000											
P_bellina	0.60	0.675	0.00										
P_cornucervi	0.52	0.600	0.37	0.000									
P_florescens	0.52	0.600	0.15	0.450	0.000								
P_fuscata	0.52	0.675	0.52	0.600	0.450	0.00							
P_gigantea	0.52	0.600	0.30	0.375	0.300	0.52	0.00						
P_javanica	0.45	0.565	0.41	0.525	0.265	0.41	0.52	0.00					
P_lueddemanniana	0.60	0.525	0.45	0.375	0.450	0.60	0.37	0.56	0.00				
P_mannii	0.67	0.525	0.22	0.600	0.225	0.45	0.30	0.49	0.52	0.000			
P_schilleriana	0.45	0.600	0.22	0.375	0.225	0.37	0.45	0.34	0.37	0.375	0.00		
P_violacea	0.60	0.675	0.22	0.300	0.375	0.67	0.22	0.60	0.52	0.375	0.45	0.00	
P_zebrina	0.52	0.450	0.52	0.600	0.450	0.41	0.52	0.27	0.60	0.525	0.45	0.67	0.00

Klaster 2 terdiri dari *P.schilleriana*, *P.mannii*, *P.florescens*, *P.bellina*. Klaster 3 terdiri dari *P.amabilis*, *P.fuscata*, *P.zebrina*, *P.javanica*. dan Klaster 4 yaitu *P.amboinensis*. Berbeda dengan penelitian Niknejad *et al* (2009) menggunakan RAPD pada 20 anggrek *Phalaenopsis*. Berdasarkan

hasil dendogram UPGMA diperoleh tiga grup. Grup 1 *Ph. violacea blue*, *Ph. belina*, *Ph. violacea malaysia*, *Ph. violacea witte*, dan *Ph. gigantea*; Grup 2, *Ph. lamelligera*, *Ph. amabilis*, *Ph. parishii*, *Ph. labbi nepal*, *Ph. speciosa*, *Ph. lobbi yellow*, *Ph. venosa*, *Ph. hieroglyphica*, dan *Ph. Maculate* dan



Gambar 1. Pohon *unrooted neighbor-joining* menunjukkan hubungan kekerabatan genetik di antara 13 anggrek *Phalaenopsis* sp. berdasarkan 12 primer mikrosatelit membagi menjadi 4 klaster.

Grup 3, *Ph. minho princess*, *Ph. leopard prince*, *Ph. mannii*, *Ph. modesta*, *Ph. cornucervi* and *Ph. pantherina*.

Varietas *Phalaenopsis* yang digunakan dalam pemuliaan biasanya terbagi menjadi dua grup. Grup bunga besar (standard) dan grup bunga kecil. Grup berbunga besar termasuk bunga yang berwarna putih, pink dan yang bergaris-garis, biasanya untuk warna putih berasal dari *P. amabilis* dan warna pink berasal dari *P. schilleriana*. Grup berbunga kecil dengan warna khusus dan beberapa berbau harum seperti *P. violaceae*, *P. amboinensis* dan *P. venosa*. Target pemuliaan anggrek *Phalaenopsis* melalui teknik molekuler adalah modifikasi warna bunga, bentuk/arsitek bunga, wangi/fragrance, kontrol pembungaan, ketahanan terhadap penyakit, dan germinasi.

Teknik pemuliaan saat ini masih terbatas pada persilangan konvensional. Padahal jenis-jenis unggul umumnya diperoleh melalui introgresi gen di luar spesies. Bioteknologi menjadi sangat penting dalam upaya perbaikan genetik anggrek. Saat ini dengan semakin meningkatnya jumlah *Phalaenopsis* hibrida dan pentingnya plasma nutfah eksotik untuk program pemuliaan, maka menjadi perlu untuk mengevaluasi keragaman genetik dan hubungan filogenetik *Phalaenopsis*.

Pengetahuan ini dapat menyediakan informasi yang berguna untuk menyeleksi spesies yang berkerabat dekat untuk introgressi sifat-sifat hortikultur pada tanaman *Phalaenopsis*.

KESIMPULAN

Hasil Studi marka mikrosatelit pada penelitian ini mengindikasikan bahwa *Phalaenopsis* dapat dibedakan satu sama lain. Studi ini menunjukkan bahwa marka mikrosatelit berdasarkan DNA genomik *Phalaenopsis* memberikan informasi filogenetik yang mengarah pada hubungan genetik, polimorfisme dan pohon filogenetik. Penggunaan marka mikrosatelit akan menjadi sangat berguna untuk mengidentifikasi genotipe untuk pembudidaya anggrek dalam upaya peningkatan kualitas sumber genetik dan plasma nutfah. Pada studi ini, kami mengkarakterisasi kekerabatan genetik menggunakan marka DNA mikrosatelit untuk *Phalaenopsis* spesies di Indonesia. Marka-marka yang digunakan pada studi ini dapat dijadikan alat yang berharga untuk pemuliaan secara molekuler.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Ibu Yupi dari Kebun Raya Bogor-LIPI atas material anggrek *Phalaenopsis* yang digunakan dalam penelitian ini. Masumah atas bantuan teknis pelaksanaan penelitian. Penelitian ini didanai melalui proyek Hibah Strategis Nasional DIKTI No. 550/SP2H/PP/DP2M/PP/2010 kepada Dr. Dewi Sukma, Institut Pertanian Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. 1967. Phylogenetic analysis: model and estimation procedures. *Am J Hum Gen* 19:233-257.
- Criley RA. 2008. Ornamentals-more that just beautiful, *Acta Horticulture*, 30 April, Thailand, hal. 788.
- Dwiatmini,K; N.A. Mattjik; H. Aswidinnoor, N.L. Toruan Matius 2003. Analisis Pengelompokan dan Hubungan Kekerabatan Spesies Anggrek *Phalaenopsis* Berdasarkan Kunci Determinasi Fenotipik dan Marka Molekuler RAPD. *Jurnal Hortikultura*. Vol. 13(1):16 – 27.
- Fighetti C. 2004. Passing the torch. *Phalaenopsis*. *Journal International Phalaenopsis All*, Winter, hal. 20-31.
- Kartianingrum S., Nani H., Achmad B., Murdaningsih H.K, and Nurita T.M., 2002. Kekerabatan antar genus anggrek sub tibe Sarcanthinae berdasarkan data fenotip dan pola pita DNA. *Zuriat*, Vol. 13(1): 1-10.
- McCouch SR. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 9:199-207.
- Niknejad, M. A. Kadir, S. B. Kadzimin, N. A. P. Abdullah and K. Sorkheh, 2009. Molecular characterization and phylogenetic relationships among and within species of *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae) based on RAPD analysis. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (20), pp. 5225-5240.
- Purwanto A., E. Ambarwati dan F. Setyaningsih.2005. Kekerabatan antar anggrek spesies berdasarkan sifat morfologi tanaman dan bunga. *Ilmu pertanian* 12 (1):1-11.
- Saitou N, Nei M, 1987. The Neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Topik H, Yukawa T., Ito M., 2005. Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): insights from plastid matK and nuclear ribosomal ITS sequences. *J.Plant Res.* 118(4):271-84.

- Topik H, and Adi P., 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen* 4(1):35-40.
- Wang H.Z.Shang-Guo F., Jiang-Jie L., Nong-nong S., Jun-Jun L.2009. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Sci.Horti* 122:440-447.