

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia dikenal sebagai negara megabiodiversitas dengan sumber daya alam yang sangat melimpah. Indonesia juga memiliki tingkat keberagaman kehidupan yang sangat tinggi, salah satunya yakni flora. Menurut catatan BAPPENAS (1993), dilihat dari letak biogeografinya, terdapat tujuh wilayah persebaran flora di Indonesia meliputi Jawa, Bali, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, dan Sunda Kecil. MacKinnon dan Artha (1981) dalam buku *A National Conservation Plan for Indonesia* menyebutkan bahwa jika dilihat dari aspek endemisme atau keaslian spesies flora dan tingkat kekayaan relatifnya, wilayah dengan posisi paling tinggi yakni Irian Jaya, disusul oleh Kalimantan dan Sumatera.

Baru sekitar 15,5% dari total flora di Indonesia yang telah teridentifikasi. Persentase tersebut meliputi 1.500 jenis alga, 80.000 jenis fungi, 595 jenis lumut, 2.197 jenis pakis, dan 30.000-40.000 jenis tumbuhan spermatofit (Retnowati *et al.*, 2019). Walaupun Indonesia dikenal sebagai salah satu wilayah dengan kekayaan tumbuhan yang tinggi, ternyata keragaman tumbuhannya belum seluruhnya diketahui. Kurangnya tenaga ahli di Indonesia pada bidang identifikasi tumbuhan menjadi salah satu faktor yang menyebabkan banyak tumbuhan di Indonesia punah sebelum teridentifikasi serta membuat beberapa tumbuhan beralih status menjadi tumbuhan langka karena penurunan populasinya.

Aktivitas manusia juga kerap menjadi faktor yang membuat jumlah spesies tumbuhan semakin berkurang dan akhirnya menyebabkan kelangkaan spesies tumbuhan tertentu. Konversi lahan hutan menjadi areal industri, penebangan hutan secara liar, perburuan dan perdagangan liar, pemanfaatan sumber daya alam sebagai tumpuan pembangunan secara berlebih, dan aktivitas semacamnya terkait eksploitasi terhadap keanekaragaman hayati tanpa diimbangi dengan upaya budidaya atau perawatan hutan itu sendiri merupakan faktor yang dapat memicu penurunan populasi suatu spesies.

Aktivitas tersebut juga dapat menyebabkan kelangkaan spesies bahkan hilangnya spesies di alam yang pastinya akan mengancam keanekaragaman hayati di Indonesia.

Kelangkaan tumbuhan yang dimaksud yakni apabila tumbuhan tersebut sulit dijumpai, maupun karena alami memiliki jumlah yang sedikit atau merupakan endemik yang wilayah sebarannya terbatas, serta habitatnya yang spesifik ataupun mengalami penurunan populasi karena aktivitas manusia. Indonesia tercatat sebagai salah satu negara yang memiliki tingkat keterancamannya serta laju kepunahan tumbuhan tertinggi di dunia. Sekitar 36 spesies kayu, diantaranya kayu pandak (Jawa), kayu hitam (Sulawesi), sawo kecil (Jawa Timur), kayu ulin (Kalimantan Selatan), serta beberapa tumbuhan seperti Anggrek Jawa (*Phalaenopsis javanica*), Pakis hias (*Ponia sylvestris*), Pakis haji (*Cycas rumphii*), dan sejenis rotan (*Ceratobulus glaucescens*) di daerah pantai selatan Jawa Barat sudah sulit ditemukan. Peraturan Pemerintah RI No. 7 Tahun 1999 telah menetapkan sekitar 58 spesies tumbuhan yang tergabung dalam enam famili dikategorikan dalam tumbuhan lindung atau tumbuhan yang status konservasinya dilindungi. Spesies tumbuhan tersebut, diantaranya anggrek (*Phalaenopsis javanica*), patma (*Rafflesia sp.*), kantong semar (*Nepenthes sp.*), bunga meranti (*Shorea sp.*), palem (*Ceratolobus glaucens*), dan talas (*Amorphohalus titanum*). Whitten *et al.* (1997) menyebutkan bahwa tiga jenis tanaman anggrek endemik Jawa, antara lain *Plocoglottis latifolia*, *Zeucine tjiampeana*, dan *Habenaria giriensis* telah punah.

Kondisi Indonesia yang memiliki keanekaragaman flora yang cukup besar menjadikan proses identifikasi menjadi sebuah keharusan untuk mengoptimalkan sumber daya alam yang terdapat di dalamnya. Mengenal dan memahami keanekaragaman flora menjadi tantangan bagi negara Indonesia selama berabad-abad, maka dari itu diperlukan solusi untuk menyelesaikan masalah identifikasi flora secara cepat untuk meminimalisir resiko kelangkaan dan kepunahan tumbuhan (Cristescu, 2014). Selama ini, penentuan status kelangkaan tumbuhan dilakukan berdasarkan distribusi populasinya, yang mana ini memerlukan waktu yang sangat lama. Kurangnya

informasi mengenai metode identifikasi yang tepat dan cepat menjadi salah satu faktor yang menyebabkan banyak tumbuhan di Indonesia punah sebelum teridentifikasi, sehingga diperlukan suatu teknik atau metode untuk mempersingkat proses identifikasi tersebut. Para ahli umumnya melakukan proses identifikasi berdasarkan ciri-ciri morfologi. Suparman (2012) menyebutkan bahwa terdapat beberapa kelemahan dalam penggunaan karakteristik morfologi sebagai instrumen identifikasi karena dipengaruhi oleh lingkungan yang berakibat pada sifatnya menjadi tidak konsisten. Kelemahan serta berbagai keterbatasan pada penanda morfologi memicu berkembangnya penanda lain untuk proses identifikasi yaitu penanda molekuler DNA (DNA Barkod). Analisis menggunakan DNA Barkod dapat menjadi alternatif dalam menyelesaikan permasalahan dalam proses identifikasi yang umumnya memerlukan waktu yang lama.

Pada tumbuhan langka terjadi ketidakstabilan genom yang menyebabkan tumbuhan tersebut tidak mampu beradaptasi dengan lingkungannya (Knight *et al.*, 2005; Kraaijeveld, 2010). Selain memerlukan waktu yang lebih singkat, penggunaan DNA Barkod dapat langsung mengakses sebagian material pengendali karakter dari suatu individu. Penanda ini lebih akurat karena sifatnya sebagai pembawa informasi genetik yang membuat metode DNA Barkod baik digunakan untuk membantu menyelesaikan permasalahan terkait ketidakstabilan genom yang terjadi pada tumbuhan langka. Asam deoksiribonukleat (DNA) terdapat dalam semua jaringan tumbuhan dan sifatnya stabil karena tidak terpengaruh oleh perubahan lingkungan, yang mana ini menjadi keunggulan dari penanda molekuler dibandingkan dengan penanda morfologi. Maka dari itu, metode analisis menggunakan DNA barkod sangat menjanjikan untuk deteksi awal dari kelangkaan suatu spesies tumbuhan pada masa yang akan datang.

Menurut Weising *et al.* (2005); Agarwal *et al.* (2008); dan Mondini *et al.* (2009) terdapat kriteria penanda DNA yang ideal, meliputi: a) tingkat polimorfismenya sedang hingga tinggi, b) tersebar pada keseluruhan genom, c) memiliki pewarisan sifat kodominan (pada organisme diploid dapat dibedakan kondisi heterozigot dan homozigot), d) berkaitan erat dengan

fenotip, e) perbedaan genetik dapat dilihat dengan resolusi yang cukup, f) hanya membutuhkan sedikit sampel, g) tidak diperlukan informasi tentang genom organisme, h) perilakunya netral, i) tekniknya mudah, murah, dan cepat, dan j) dapat dilakukan penukaran data antar laboratorium. Zulfahmi (2013) menyebutkan bahwa dari sekian banyak kriteria penanda DNA yang ideal, hingga saat ini belum ada penanda yang memenuhi semuanya, tetapi beberapa penanda dapat dikombinasikan untuk memenuhi semua kriteria di atas. Terdapat dua kelompok penanda DNA yakni *non-PCR based techniques* atau tanpa *Polymerase Chain Reaction* (PCR), contohnya penanda *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP), serta penanda DNA dengan PCR diantaranya *Sequence Characterized Amplified Region* (SCAR), *Single-Strand Conformation Polymorphisms* (SSCP), *Simple Sequence Repeats* (SSR), *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* (CAPS), *Random Amplified Polymorphisms DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP), dan DNA Barkoding.

Berbagai penelitian mengenai pengaplikasian DNA Barkod untuk identifikasi suatu spesies tumbuhan (Lahaye *et al.*, 2008), kegiatan survei ekologi (Dick dan Kress, 2009), dan identifikasi tumbuhan obat (etnobotani) (Xue dan Li, 2011) telah banyak dilakukan. Menurut DeSalle *et al.* (2005) tujuan utama dari DNA Barkoding yakni untuk membedakan antar spesies serta untuk menemukan spesies baru. Teknik ini digunakan untuk identifikasi tumbuhan memakai satu atau beberapa sekuen DNA pendek yang didapat pada suatu genom.

Kriteria minimal sekuen yang digunakan untuk DNA Barkod yakni memiliki perbedaan dan variabilitas genetik yang tinggi pada tingkat spesies, serta memiliki sekuen DNA yang pendek sehingga memudahkan pada saat ekstraksi dan amplifikasi menggunakan primer universal (Kress dan Erickson, 2008a; 2008b). DNA Barkod yang ideal meliputi: 1) bervariasi sebagai pembeda bagi setiap spesies, namun terkonsentrasi dengan tingkat variasi yang rendah di dalam dan diantara spesies; 2) distandarkan dengan daerah DNA yang sama agar dapat digunakan untuk membedakan taksonomi spesies; 3) agar dapat memudahkan proses identifikasi spesies serta taksonominya

(spesies, genus, famili dsb) dibutuhkan target DNA yang mengandung informasi filogenetik yang cukup; 4) lokasi primer terkonsentrasi, serta memiliki tingkat sekuensing DNA dan amplifikasi yang baik; dan 5) agar memudahkan proses amplifikasi DNA diperlukan sasaran daerah DNA yang tidak terlalu panjang (Taberlet *et al.*, 2007).

Umumnya, kandidat gen yang digunakan dalam DNA Barkod banyak terdapat pada DNA kloroplas, seperti gen *trnH-psbA* (Kress *et al.*, 2005; Kress dan Erickson, 2007), *trnL* intron (Taberlet *et al.*, 2006), *rbcL* (Kress dan Erickson, 2007), *ndhJ*, *matK*, *accD*, *rpoC1*, *rpoB2*, dan *ycf5* (Chase *et al.*, 2007; Lahaye *et al.*, 2008). Pada DNA inti terdapat *The Internal Transcribed Spacer* (ITS) (Kress *et al.*, 2005; Sass *et al.*, 2007). Dari berbagai penanda molekuler, *rbcL*, *matK* dan ITS yang paling sering digunakan untuk identifikasi tumbuhan (CboL, 2009).

Penelitian Ardiyani *et al.* (2019) menemukan metode identifikasi cepat marga gaharu di Indonesia yang mengalami kelangkaan akibat dari eksploitasi berlebihan dan perdagangan *illegal* dari genus ini. Metode identifikasi dilakukan dengan pengembangan DNA Barkoding menggunakan marka dari genom kloroplas dan genom inti. Dari hasil uji jarak berpasangan memakai sekuen ITS menunjukkan jarak genetik antar spesies yang lebih tinggi dan memiliki sekuen DNA yang lebih variatif dibandingkan *rbcL* dan *matK*. Resolusi pohon filogenetik pada penanda ITS juga lebih tinggi, serta tingginya tingkat polimorfisme pada ITS menunjukkan bahwa laju evolusi pada ITS kemungkinan lebih cepat dibandingkan *rbcL* dan *matK*. Dari hasil analisis filogenetika diperoleh data bahwa genus *Gyrinops* dan *Aquilaria* membentuk kelompok monofiletik terhadap *Pimelea* dan *Gonystylus* sebagai *outgroupnya*, hanya saja *Aquilaria* parafiletik terhadap *Gyrinops*. Penggunaan penanda ITS pada penelitian ini mengungkapkan bahwa identitas salah satu sampel yang belum teridentifikasi bukan merupakan genus dari *Gyrinops*, *Aquilaria*, *Pimelea*, dan *Gonystylus*. Penanda ITS membuktikan bahwa genus *Aquilaria* dan *Gyrinops* memiliki kekerabatan yang sangat dekat dilihat dari kesamaan jumlah tangkai sarinya (memiliki jumlah yang

sama dengan lobus kelopak bunga pada *Gyrinops* dan dua kali jumlah pada *Aquilaria*).

Tingkat keberhasilan yang tinggi pada proses amplifikasi PCR baik pada tumbuhan tingkat tinggi maupun rendah menjadikan penanda ITS banyak digunakan (Schoch *et al.*, 2011; Teachen *et al.*, 2014). *Internal Transcribed Spacer* dapat menyelesaikan permasalahan terkait filogenetik pada banyak familia tanaman karena daerah ITS memiliki ukuran yang kecil (<700 pasang basa) (Suetsugu *et al.*, 2018) dan susunan gen berulang (*tandem repeats array*) menyebabkan ITS mudah digunakan (Baldwin *et al.*, 1995). Alasan lain mengapa ITS banyak digunakan untuk identifikasi tingkat genus dan spesies karena variasi sekuen pada gen rDNA yang dimiliki tiap spesies relatif tinggi pada wilayah ITS (Buchan dan Newell, 2002). Terdapat dua wilayah ITS yakni ITS-1 yang berada diantara gen 18S dan 5.8S, serta ITS-2 yang berada diantara 5.8S dan 28S (O'Brien *et al.*, 2005). Hills dan Dixon (1991), Nilsson *et al.* (2008), Coleman (2009), dan Freire *et al.* (2012) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa urutan gen 5.8S pada wilayah ITS merupakan daerah yang paling konservatif, sedangkan urutan ITS 1 dan ITS 2 memiliki sifat polimorfik yang tinggi. Wilayah ITS yang telah banyak digunakan untuk identifikasi serta analisis filogenetik pada tumbuhan dan hewan yakni pada wilayah ITS1-5.8S-ITS2 (Baldwin *et al.*, 1995; Alvarez dan Wendel, 2003). Maka dari itu, penelitian ini bermaksud untuk mengembangkan primer diagnostik menggunakan penanda ITS secara *in-silico* untuk deteksi kelangkaan jenis tumbuhan di Indonesia secara tepat dan cepat.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang dapat dirumuskan berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, yakni “Bagaimana penggunaan DNA Barkod untuk identifikasi tumbuhan langka melalui perancangan primer diagnostik secara *in-silico* menggunakan penanda *Internal Transcribed Spacer* (ITS)?”.

1.3 Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut dapat diuraikan beberapa pertanyaan penelitian, yaitu:

- a. Bagaimana pasangan primer diagnostik untuk identifikasi kelangkaan jenis tumbuhan menggunakan penanda ITS?
- b. Bagaimana hasil uji *in-silico* pasangan primer diagnostik untuk identifikasi kelangkaan jenis tumbuhan menggunakan penanda ITS?
- c. Bagaimana hasil uji efektivitas dari pasangan primer untuk identifikasi kelangkaan jenis tumbuhan menggunakan penanda ITS?

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Mendapatkan primer diagnostik untuk identifikasi tumbuhan langka menggunakan penanda *Internal Transcribed Spacer* (ITS) secara *in-silico*.
- b. Memprediksi hasil uji *in-silico* pasangan primer diagnostik untuk identifikasi kelangkaan jenis tumbuhan menggunakan penanda ITS.
- c. Memprediksi hasil uji efektivitas dari pasangan primer untuk identifikasi kelangkaan jenis tumbuhan menggunakan penanda ITS.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Penggunaan data sekunder berupa sekuen DNA yang berasal dari *GenBank* NCBI.
- b. Penanda DNA yang digunakan yakni *Internal Transcribed Spacer* (ITS).
- c. Status kelangkaan diperoleh dari *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) dengan kategori *critically endangered* atau kritis (CR), *endangered* atau genting (EN), dan *vulnerable* atau rentan (VU).

1.6 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini diantaranya :

- a. Dapat memberikan solusi untuk membantu proses identifikasi tumbuhan langka secara cepat dan tepat melalui pengembangan primer diagnostik menggunakan *Internal Transcribed Spacer* (ITS).
- b. Dapat menjadi rujukan bagi penelitian selanjutnya terkait pengembangan primer diagnostik untuk identifikasi tumbuhan.

Dea Amalia, 2022

PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK UNTUK IDENTIFIKASI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA BERDASARKAN PENANDA *Internal Transcribed Spacer* (ITS) SECARA *IN-SILICO*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu