VARIASI ALOZIM MENADIONE REDUKTASE PADA RANUNCULUS JAPONICUS THUNB. DI JEPANG

Syamsuardi
Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Univ. Andalas, Limau Manis, Padang, 25163

INTISARI

Penelitian tentang variasi alozim Menadione Reductase (Mnr) terhadap 60 populasi Ranunculus japonicus telah dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi alozim Mnr pada tumbuhan ini sangat tinggi. Elektroforesis enzim Mnr dalam gel pati menghasilkan 14 pola pita yang sesuai dengan pola enzim tetramer. Berdasarkan pola pita tersebut telah diidentifikasi tujuh alele. Enam dari alele tersebut terdistribusi pada daerah Honshu, Kyushu and Shikoku, tetapi alele unik Mnr-g hanya ditemukan di daerah Kyushu. Frekuensi alele Mnr berbeda nyata antar populasi (G_{ST} = 0.231). Frekuensi Mnr-a dan Mnr-d cenderung menurun, tetapi frekuensi Mnr-f cenderung meningkat dengan peningkatan posisi populasi pada garis bujur atau lintang.

Kata kunci: Alele unik, variasi alozim, Ranunculus japonicus, enzim tetramer.

ABSTRACT

Polymorphism of Menadione Reductase (Mnr) enzyme in sixty populations of Ranunculus japonicus were analyzed. The results indicated that Mnr showed the great polymorphism. Electrophoresis Mnr enzyme on starch gel produced fourteen banding patterns which suggested tetrameric enzyme. Seven alleles of Mnr were identified, based on those banding patterns. Six of those aleles were observed in Honshu, Kyushu and Shikoku regions, but unique allele Mnr-g was detected only in the Kyushu region. Analyses for allele frequency of Mnr heterogeneity revealed significant differences among populations (G_{ST} = 0.231). A trend for decreasing frequency of Mnr-a and Mnr-d, and increasing frequency of Mnr-f were detected with increasing latitude and longitude position of populations.

Keywords: Allozyme polymorphism, Ranunculus japonicus, tetrameric enzyme, unique alele.

PENDAHULUAN

Sampai sekarang ini studi biokimia menggunakan teknik elektroforesis masih menjadi pilihan untuk memecahkan persoalan-persoalan genetika, sistematika dan biologi populasi tumbuhan[1,2,3,4]. Penggunaan protein dalam studi tersebut dinilai sangat menguntungkan karena umumnya merupakan hasil ekspresi gen yang diturunkan secara genetik dan tidak dipengaruhi faktor lingkungan[5]. Melalui pola pita enzim yang dideteksi dengan elektroforesis, akan dapat ditentukan lungkang gen (locus) dan variasi pasangan gen (alele) dalam locus tersebut (alozim) [6]. Berdasarkan variasi alozim tersebut akan dapat ditentukan variabilitas genetik ataupun kekerabatan genetik yang merupakan fokus utama dalam genetika populasi untuk menentukan struktur populasi, gene flow, proses mikro-evolusi tumbuhan[7].

Para peneliti populasi biologi dan "biochemical systematics" mencari berbagai enzim yang mempunyai variabilitas alozim sebagai penanda genetik untuk kepentingan studinya. Nakai dan Sakamoto[8] menggunakan variasi enzim Esterase untuk mengkaji pola distribusi Taeniatherum di daerah Mediterania. Shiraishi[9] telah menganalisis 19 sistem enzim pada tanaman Pinus thunbergii dan Soltis et. al.[10] menggunakan 22 sistem enzim yang diterapkan pada paku-pakuan. Rendahnya variabilitas enzim Menadione reduktase mungkin penyebab enzim ini tidak dipakai dalam studi tersebut. Tetapi hasil survei pada R. japonicus menunjukkan bahwa variasi alozim Menadione reduktase sangat tinggi. Tulisan ini memaparkan variasi alozim Menadione reduktase pada tumbuhan R. japonicus Thunb. yang ditemukan pada berbagai daerah geografis yang berbeda di Jepang.

METODOLOGI

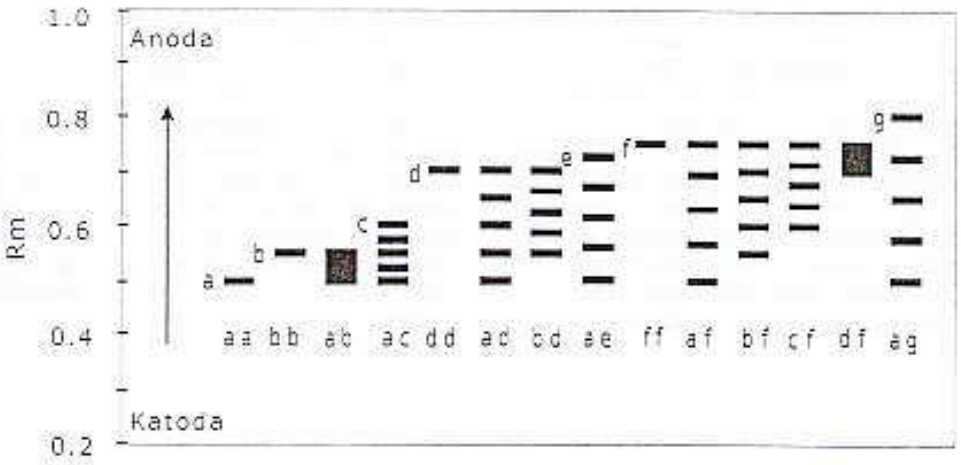
Ranunculus japonicus Thunb. Merupakan salah satu dari empat jenis Ranunculus sect. Acris di Jepang yang mempunyai daerah distribusi yang luas dan ditemukan pada berbagai habitat seperti pinggir jalan, jalan setapak di gunung, daerah perkebunan dan padang rumput di gunung pada ketinggian 10-1000 m dpl. di Jepang[11,12]. Total 1920 individu R. japonicus dikoleksi dari 36 populasi di Pulau Honshu, 6 populasi di Shikoku dan 18 populasi di Kyushu, dan selanjutnya ditanam di Kebun Botani Osaka City University, Jepang. Voucher spesimen di simpan di Kebun Botani Osaka City University dan Herbarium Univ. Andalas, Padang.

Variasi alozim ditentukan dengan terlebih dahulu menggerus 200 mg daun muda masing-masing individu dalam 2 ml buffer grinding menurut prosedur Stanton et al.[13]. Elektroforesis enzim Mnr dilakukan dalam buffer Tris-HCl dengan menggunakan gel pati, dan lokasi enzim ditentukan dengan pewarnaan menurut prosedur Soltis et al.[10]. Pola pita dikode berdasarkan Kephart[14], Shield et al.[15] dan Wendel & Weeden[16], dan dari pola pita tersebut ditentukan genotip individu. Selanjutnya frekuensi alele Mnr pada masing-masing populasi dihitung dengan menggunakan program komputer Genetic Data Analysis (GDA) versi 1.0 (d16c)[17].

Berdasarkan nilai diferensiasi genetik (G_{ST}) dapat ditentukan apakah frekuensi alele Mnr bervariasi atau tidak diantara populasi yang diperiksa. Nilai G_{ST} dihitung dengan menggunakan Program FSTAT 2.9.3.[18], dan diuji secara statistik[19] dengan Uji χ^2. Hubungan level frekuensi alele Mnr dengan posisi geografis secara lintang (altitude) dan bujur (latitude) ditentukan dengan analisis korelasi dan diuji secara statistik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pita hasil elektroforesis enzim Mnr R. japonicus dengan gel pati kentang (starch) sangat jelas dan dapat dinterpretasi secara genetik. Pada penelitian ini juga telah dicoba menggunakan gel poliakrilamid, namun hasilnya tidak memuaskan. Umumnya enzim Mnr pada tumbuhan bersifat tetramer[14,20] yang memperlihatkan satu pita pada individu homozigot dan lima pita pada individu heterozigot[14,15]. Hasil penelitian ini juga memperlihatkan satu atau lima pita, dengan 14 pola yang terbentuk (Gambar 1).



Gambar 1. Representasi pola pita enzim *Mnr* yang terdeteksi pada 60 populasi *R. japonicus* di Jepang

Berdasarkan 14 pola yang terdeteksi tersebut dapat ditentukan 7 alele, yaitu alele a dari lokus *Mnr* (selanjutnya disebut dengan *Mnr-a*), *Mnr-b*, *Mnr-c*, *Mnr-d*, *Mnr-e*, *Mnr-f* dan *Mnr-g*). *Mnr-a* diwakili oleh pita dengan "relative mobility" (Rm) yang paling rendah pada Rm 0.50. *Mnr-b* terletak pada Rm 0.54, *Mnr-c* berada pada Rm 0.60, *Mnr-d* terlihat pada Rm 0.70, *Mnr-e* terletak pada Rm 0.72, sedangkan *Mnr-f* berada pada Rm 0.75. Pita dengan mobilitas tertinggi mewakili *Mnr-g* terletak pada Rm 0.80. Hasil ini menunjukkan bahwa *R. japonicus* memiliki variabilitas alozim *Mnr* relatif lebih tinggi dibandingkan dengan tumbuhan lain[20]. Hanya penelitian Shiraishi[9] pada tumbuhan *Pinus thunbergii* yang juga menunjukkan variabilitas alozim yang tinggi (mempunyai 7 alele per lokusnya), itupun ditemukan pada sistem enzim lain (*shikimate*

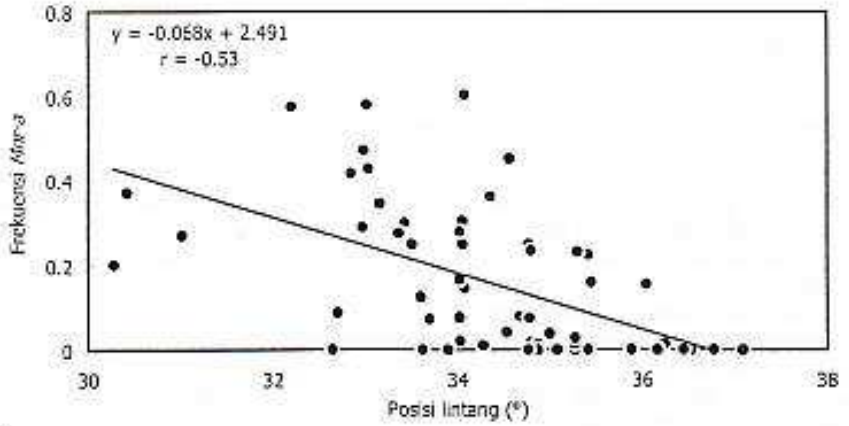
dehidrogenase dan *tetrazolium oksidase*). Penemuan tingginya variabilitas alozim *Mnr* pada tumbuhan *R. japonicus* ini perlu mendapat catatan. Pola distribusi yang luas dan "gene flow" yang ekstensif dengan melibatkan polen dari individu lain untuk reproduksinya, mungkin faktor penyebab tingginya variasi alozim[3,21] pada *R. japonicus*.

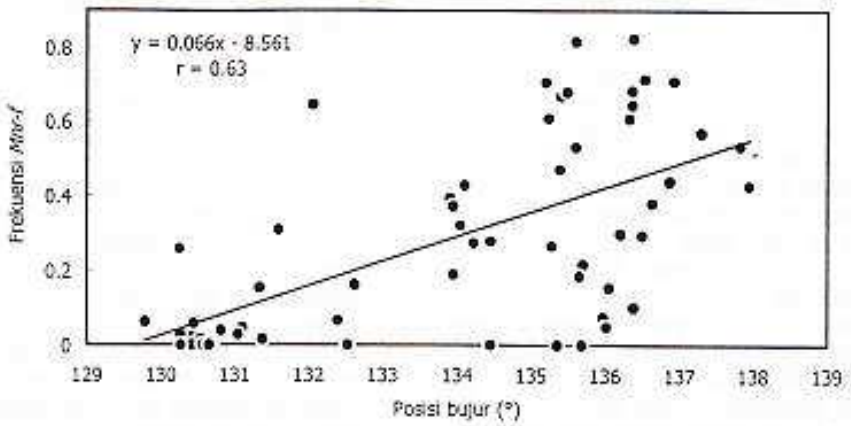
Hasil perhitungan diferensiasi genetik (G_{ST}) terhadap 60 populasi *R. japonicus* menunjukkan nilainya relatif tinggi (G_{ST} = 0.231) dan dari analisis χ^2 menunjukkan bahwa frekuensi alele *Mnr* berbeda sangat nyata (P<0.01) antar populasi yang diperiksa. Walaupun enam alele (*Mnr-a* sampai dengan *Mnr-f*) ditemukan pada ke tiga daerah geografis yang berbeda (Honshu, Shikoku dan Kyushu), akan tetapi terlihat kecendrungan perbedaan frekuensinya pada masing-masing daerah. Sebagai contoh: rata-rata frekuensi *Mnr-a* di daerah Honshu (0.090) lebih rendah dibandingkan nilai pada daerah Shikoku (0.183) dan Kyushu (0.277). *Mnr-d* juga menunjukkan pola yang sama, (Table 1). Sedangkan rata-rata frekuensi *Mnr-b*, *Mnr-c* dan *Mnr-e* hampir merata pada ke tiga daerah geografis yang berbeda tersebut. *Mnr-g* merupakan alele unik yang hanya ditemukan di daerah Kyushu tepatnya pada populasi 47 (kota Haki, Fukuoka Pref.).

Tabel 1. Rata-rata nilai frekuensi 7 alele *Mnr* pada populasi di 3 daerah geografis yang berbeda di Jepang. Angka di dalam kurung menunjukkan nilai kisaran frekuensi.

Mnr	Daerah		
	Honshu	Shikoku	Kyushu
a	0.090 (0.000-0.603)	0.183 (0.022-0.304)	0.277 (0.000-0.581)
b	0.278 (0.000-0.600)	0.253 (0.043-0.417)	0.226 (0.000-0.956)
c	0.024 (0.000-0.413)	0.047 (0.000-0.283)	0.005 (0.000-0.056)
d	0.178 (0.000-0.838)	0.228 (0.044-0.370)	0.377 (0.000-0.638)
e	0.038 (0.000-0.350)	0.012 (0.000-0.050)	0.003 (0.000-0.029)
f	0.392 (0.000-0.824)	0.277 (0.000-0.426)	0.107 (0.000-0.900)
f	0.392 (0.000-0.824)	0.277 (0.000-0.426)	0.107 (0.000-0.900)
g	0.000 (0.000-0.000)	0.000 (0.000-0.000)	0.004 (0.000-0.063)

Hasil analisis menunjukkan bahwa ditemukan korelasi yang sangat nyata (P<0.01) antara frekuensi *Mnr-a*, *Mnr-d* dan *Mnr-f* dengan posisi lintang (r = -0.52; r = -0.57; dan r = 0.57) dan bujur (r = -0.66; r = -0.41; dan r = 0.63). Korelasi *Mnr-a* dengan posisi lintang dan *Mnr-f* dengan posisi bujur ditunjukkan pada Gambar 2. Berbagai penyebab penurunan ataupun peningkatan frekuensi alele sepanjang daerah geografis tertentu telah dikemukakan oleh para ahli, sebagai contoh: disebabkan adanya peristiwa glasiasi dan rekolonisasi setelah glasiasi[22,20,23] ataupun akibat seleksi habitat[24]. Pada kasus *R. japonicus*, tanpa bukti fosil pollen, sangat sulit untuk membuktikan peristiwa glasiasi sebagai faktor penyebab. Kombinasi seleksi habitat dan "founder effect" selama proses isolasi, fragmentasi ataupun kolonisasi mungkin faktor penyebab terjadinya kecendrungan penurunan ataupun peningkatan frekuensi alele *Mnr* tersebut sepanjang posisi geografis dari populasi *R. japonicus*[25].





Gambar 2. Korelasi frekuensi *Mnr-a* dengan posisi lintang (atas) dan frekuensi *Mnr-f* dengan posisi bujur (bawah).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan:

1. Variasi alozim *Menadione reductase* pada *R. japonicus* sangat tinggi.
2. Berdasarkan nilai diferensiasi genetik (G_{ST} = 0.231) diketahui bahwa frekuensi alele berbeda nyata antar populasi.
3. Frekuensi *Mnr-a* dan *Mnr-d* menurun, sebaliknya frekuensi *Mnr-f* meningkat dengan peningkatan posisi geografis dari populasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. A.H.D. Brown, Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theor. Pop. Biol.* 15: 1-42 (1979).
2. L.D. Gottlieb, Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64: 161-180 (1977).
3. J.L. Hamrick and J.W. Godt, Allozyme diversity in plant species. *In* A.H.D.Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir (Eds.). *Plant Population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer. Sunderland, MA (1990), pp. 43-63.
4. H.W. Lee, M.G. Chung, Y. Suh and C.W. Park, Allozyme variation and genetic relationship among species of *Cimcifuga* (Ranunculaceae) from Korea. *Int. J. Pl. Sci.* 161: 413-423 (2000).
5. P.J.Thorpe, The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13: 139-168 (1982).
6. C.R. Werth, Implementing an isozyme laboratory at a field station. *Virginia J. Sci.* 36: 53-76 (1985).
7. D.G. Buth and R.W. Murphy, The use isozyme characters in systematic studies, *Biochem. Syst. Ecol.* 27: 117-129 (1999).
8. Y. Nakai and S. Sakamoto, Variation and distribution of esterase isozymes in *Heterenthelium* and *Taeniatherum* of the Tribe Triticeae, Gramineae, *Bot. Mag. Tokyo* 99: 269-276 (1977).
9. S. Shiraishi, Inheritance of isozyme variations in Japanese black pine, *Pinus thunbergii* Parl. *Silvae genet.* 37: 93-99 (1988).
10. D.E. Soltis, C.H. Haufler, D.C. Darrow and G.J. Gastony. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern J.* 73: 9-27 (1983).
11. H. Hara and S. Kurosawa, Cytotaxonomical notes in the *Ranunculus acris* group in Japan. *Bot. Mag.Tokyo* 69: 345-352 (1956).
12. J. Ohwi and M. Kitagawa, *New flora of Japan*. Shibundo Co. Ltd. Publishers. Tokyo. (1983), pp. 688-696 (Dalam bahasa Jepang).
13. M.L. Stanton, C. Galen and J. Shore. Population structure along a steep environmental gradient: consequences of flowering time and habitat variation in the snow buttercup, *Ranunculus adoneus*. *Evolution* 51: 79-94 (1997).
14. S.R. Kephart. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.* 77: 693-712 (1990).

15. C.R. Shield, T.J. Orton and C.W. Stuber, An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. *In*: S.D. Tanskley and T. J. Orton (eds.) *Isozyme in Plant Genetics and Breeding, Part A, B*. Amsterdam: Elsevier (1983), pp. 443-468.
16. J.F. Wendel and N.F. Weeden, Visualization and interpretation of plant isozyme. *In* , D.E. Soltis and P.S. Soltis (Eds.) *Isozymes in plant biology*, Dioscoridos Press, Portland, OR (1989), pp. 5-45.
17. P.O. Lewis and D. Zaykin, *Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data*. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from the GDA Home Page at http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/ (2001).
18. J. Goudet, *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices* (version 2.9.3). Available from http://www.unil.ch/izea/softwares/ fstat.html. (2001).
19. P.L. Workman and J.D. Niswander, Population studies on southwestern Indian Tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *Amer. J. Human Genet.* 22: 24-49 (1970).
20. G. Mahy, X. Verkemans, A.L. Jaquemart and De Sloover Jr., Allozyme diversity and genetic structure in southwestern populations of heather, *Calluna vulgaris*. *New Phytol.* 137: 325-334 (1997).
21. M.D. Loveless and J. L. Hamrick, Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95 (1984).
22. N. Fujii, K. Ueda, Y. Watano and T. Shimizu, Further analyses of intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Primula cuneifolia* Ledeb. (Primulaceae): Implications for biogeography of Japanese alpine flora. *J. Pl. Res.* 112: 87-95 (1999).
23. S.L.Sherman-Broyles, S.B. Broyles and J.L. Hamrick, Geographic distribution of allozyme variation in *Ulmus crassifolia*. *Syst. Bot.* 17: 33-41 (1992).
24. S.I. Warwick, B.K. Thompson and L.D. Black, Genetic variation in Canadian and European populations of the colonizing weed species *Apera spicaventi*. *New Phytol.* 106: 301-317 (1987).
25. Syamsuardi, Genetic diversity, population structure of *Ranunculus japonicus* Thunb., sect. *Acris*, Ranunculaceae, and its genetic relationships to relative species in Japan. *Doctor of Science Thesis of graduate School of Science, Osaka City University*. Osaka, Japan (2002).