

BIOINFORMATIK DAN ANALISIS GENETIK MIKROPROPAGASI

Cibotium barometz

Devi Anugrah¹⁾, Susilo²⁾, Hilman Faruq³⁾

Pendidikan Biologi, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka

email: devi.anugrah@uhamka.ac.id

BIOINFORMATICS AND GENETIC ANALYSIS OF MICROPROPAGATION

Cibotium barometz

ABSTRACT

In vitro culture is very important for the development of Simpei (*Cibotium barometz*) cultivars. Nitrogen could affect the sustainability of breeding traits. The aims of the study is to investigate the effect of variations in nitrogen concentration (KNO_3) to the genetic diversity of the *Cibotium barometz* planlet from in vitro culture. Buds were collected and cultured in Murashige and Skoog (MS) medium with different nitrogen concentrations (KNO_3). In this study, RAPD analysis was applied to identify 4 *Cibotium barometz* planlets. Five RAPD primers were prepared for this analysis. The results showed that the DNA band pattern polymorphism produced from 5 RAPD primers shows very high diversity up to 100%. The results of the RAPD band pattern clustering analysis using the UPGMA method on the similarity coefficient of 0.68 and the analysis of the main components were able to be clearly differentiated into 3 groups.

Key words : *Cibotium barometz*, Genetic Diversity, Micropropagation, Nitrogen, PCR-RAPD

ABSTRAK

Kultur in vitro sangat penting untuk pengembangan kultivar Simpei (*Cibotium barometz*) yang jumlahnya semakin langka. Penggunaan nitrogen dapat berpengaruh terhadap keberlanjutan sifat pemuliaan. Penelitian ini bertujuan untuk lebih menginvestifigasis pengaruh pemberian variasi konsentrasi nitrogen (KNO_3) terhadap keragaman genetic plantet *Cibotium barometz* yang dihasilkan dari kultur in vitro. Tunas tunas dikumpulkan dan dikultur pada medium Murashige dan Skoog (MS) dengan konsentrasi nitrogen (KNO_3) yang berbeda untuk pembentukan kultur in vitro. Dalam penelitian ini, analisis RAPD diterapkan untuk mengidentifikasi 4 planlet *Cibotium barometz*. Lima primer RAPD disusun untuk analisis ini. Hasil penelitian kami menunjukkan bahwa Polimorfisme pola pita DNA yang dihasilkan dari 5 primer RAPD menunjukkan keberagaman yang sangat tinggi hingga mencapai 100%. Hasil analisis klustering pola pita RAPD menggunakan metode UPGMA pada koefisien kemiripan 0.68 dan analisis komponen utama mampu dibedakan dengan tegas menjadi 3 kelompok.

Kata Kunci : ; *Cibotium barometz*, Keragaman Genetik, Micropropagation, Nitrogen, PCR-RAPD

PENDAHULUAN

Pakis simpei (*Cibotium barometz*) sering dikenal sebagai pakis hias yang memiliki aktivitas sebagai anti-peradangan dan anti-osteoporosis. Karena memiliki banyak manfaat pakis simpei banyak dicari oleh masyarakat hingga akhirnya jumlah tanaman ini semakin sulit untuk ditemukan. Pakis simpei terdaftar sebagai tanaman yang terancam punah dari Perlindungan Nasional Kelas II, dan dalam Lampiran II dari Konvensi Perdagangan Internasional Spesies Fauna dan Flora Liar yang Terancam Punah (CITES 2017). Oleh karena itu, perolehan seluruh genom kloroplas (cp) dari Pakis simpei akan berkontribusi terhadap perlindungan sumber daya dan filogenetik.

Pakis simpei merupakan salah satu jenis paku pohon yang telah dikenal sejak lama sebagai tumbuhan obat. Paku ini juga dikenal dengan sebutan pakis emas atau pakis wol, pakis monyet, gou ji (Cina) dan lain-lain. Tumbuhan ini merupakan tanaman asli dari China yang tersebar dari Tiongkok Selatan hingga Malaya termasuk Sumatera dan Jawa. Pakis simpei dapat hidup pada hutan tropika basah dengan ketinggian 600-800 mdpl (Jennifer *et al.*, 2013). *Cibotium barometz* di Asia Tenggara digunakan untuk tujuan pengobatan, baik pengobatan tradisional maupun pengobatan modern (Zhang *et al.*, 2008). Rimpang dan akar tumbuhan ini dapat digunakan untuk bahan obat rematik, *typus*, dan untuk mempercepat pembekuan darah. Selain itu, tanaman ini juga dapat dijadikan sebagai tanaman hias karena memiliki morfologi yang unik dan khas (Yu *et al.*, 2016).

Untuk memenuhi permintaan pakis simpei dan menjaga kelestariannya di alam, perlu adanya upaya budidaya tanaman. Salah satu upaya budidaya yang dapat dilakukan adalah dengan teknik kultur jaringan (Lestari, 2008; Mikula *et al.*, 2017). Kultur jaringan atau teknik in vitro pakis simpei telah dilakukan oleh beberapa peneliti seperti Isnaini dan Praptosuwiryo (2015) yang menggunakan media dasar MS (Murashige & Skoog) dengan penambahan berbagai konsentrasi ZPT (Zat Pengatur Tumbuh). Penelitian lainnya adalah yang dilakukan Rahayu dkk. (2015) dan Mikula *et al.*, (2017) dengan menggunakan berbagai konsentrasi media MS (Murashige & Skoog) dengan tujuan untuk menginduksi pembentukan sporofit pada massa *prothallus 4 genotipe*. Hasil penelitian Rahayu dkk. (2015) menunjukkan bahwa sporofit yang paling banyak tumbuh adalah pada media 1/12

MS untuk semua genotip dan jika dibandingkan antar genotip. Tetapi dari hasil penelitian tersebut sporofit yang dihasilkan perawakannya kurang subur dan diduga penyebabnya adalah kurangnya nutrisi yaitu nitrogen yang menyebabkan daun mengalami klorosis atau menguning. Gardner et al. (2008) menyatakan bahwa defisiensi N akan membatasi pembesaran dan pembelahan sel. Gejala defisiensi meliputi pertumbuhan umum yang tidak normal atau terbantut (kerdil) dan kuning, terutama di bagian-bagian tanaman yang lebih tua (Gabryszewska, 2011).

Penambahan unsur nitrogen memang diperlukan untuk media yang masih kekurangan nutrisi (Razaq *et al.*, 2017). Namun penambahan nitrogen yang tidak tepat dapat mempengaruhi pertumbuhan dan bahkan dapat menyebabkan kelainan pada generasi sporofitnya. Kelainan yang pernah terjadi adalah pada warna daun. Apabila media atau tanah mengandung banyak nitrogen maka daun akan berwarna hijau tua solid, sedangkan bila media kekurangan unsur nitrogen maka daun akan keriting, menguning atau coklat (nekrosis) yang berarti jaringan telah rusak atau mati (Liu *et al.*, 2014; Rahayu & Praptosuwiryo, 2017). Gejala ini biasanya sering dikaitkan dengan penyakit yang disebabkan oleh virus. Padahal daun menguning dapat disebabkan oleh kurangnya unsur nitrogen pada media atau tanah. Perubahan jaringan akibat kekurangan nitrogen dapat menyebabkan mutasi atau perubahan genetic (Movahedi *et al.*, 2013).

Untuk menguji suatu tanaman terjadi mutasi atau tidak dapat dilakukan dengan cara analisis DNA (Muladno, 2010). Analisis DNA pada tanaman dapat dilakukan dengan berbagai teknik seperti ELISA, RFLP, ISSR, dan RAPD. Zulkarnain (2014) menjelaskan bahwa kemampuan regenerasi setiap genotip sangat berbeda dan pengaruh genotip pada proliferasi sel dapat terlihat dari kapasitas regeneratifnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi genetik pada generasi sporofit tanaman pakis *Sempei* hasil kultur in vitro yang diberi perlakuan dosis nitrogen yang berbeda. Untuk mengetahui variasi yang terjadi, kami mencoba menggunakan metode RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) untuk analisis DNA tanaman pakis *Simpei* hasil kultur in vitro.

MATERIAL DAN METODE

Subyek Penelitian

DNA *Cibotium barometz*

Alat dan Bahan yang Digunakan

Alat yang digunakan : mortar, *sentrifuse*, mesin PCR. Bahan yang digunakan : *Cibotium barometz*, nitrogen cair, larutan CTAB, larutan CI.

Prosedur penelitian

Isolasi DNA pada penelitian ini mengacu pada prosedur yang dilakukan oleh Banting (2017). Langkah kerjanya sebagai berikut: 100 mg jaringan sampel ditambahkan dengan nitrogen cair secukupnya pada mortar. Campuran digerus hingga jaringan berubah menjadi serbuk yang kering. Serbuk sel dipindahkan ke dalam tabung eppendorf dan ditambahkan dengan 600 µl larutan CTAB. Larutan kemudian ditambahkan 600 µl larutan CI (24:1) dan dibolak-balik 8 hingga 10 kali. Sentrifugasi tabung dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰C. Supernatan yang terbentuk dipisahkan ke dalam tabung yang baru dan ditambahkan PCI (25:24:1) sebanyak 1 kali volume supernatan. Tabung dibolak balik hingga homogen dan disentrifugasi kembali pada dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰C. supernatan dipisahkan ke dalam tabung baru. Supernatan ditambahkan alkohol absolut sebanyak dua kali volume dan NaOAc sebanyak 0.1 kali volume. Tabung diinkubasi pada lemari pendingin selama minimal 2 jam. Setelah diinkubasi, tabung disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit pada suhu 4⁰C. Supernatan dibuang sedangkan pellet ditambahkan 500 µl alkohol 70%. Sentrifugasi kembali dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit pada suhu 4⁰C. Supernatan dibuang dan pellet dikeringkan. Setelah pellet kering, ditambahkan ddH₂O sebanyak 20 serta 0,4 µl RNase. Tabung diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 10 menit dan 70⁰C selama 10 menit.

5µl DNA genom ditambahkan 1µl Loadyng dye sampai tercampur. Amplifikasi segmen DNA dilakukan dengan menggunakan primer tunggal dekanukleotida. 15 µl total DNA sample yang terdiri atas 0,2 nM dNTPs; 1,5 ml bufer reaksi; 2mM MgCl₂; 10 ng DNA sample; 5 pmole primer; dan 1 unit Taq DNA polymerase (Promega) diamplifikasi pada *Thermalcycler* (Takara Gradient PCR) yang diprogram selama 45 siklus. Kondisi PCR untuk RAPD adalah sebagai berikut: pemanasan pertama pada suhu 94⁰C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45 siklus yang terdiri atas denaturasi 94⁰C selama 1 menit, annealing 36⁰C selama 1 menit, dan ekstensi 72⁰C selama 2 menit. Setelah 45 siklus

selesai, kemudian dilanjutkan proses ekstensi fragmen DNA 72⁰C selama 4 menit. Kemudian larutan pembebanan pewarna ditambahkan untuk menambah berat molekul DNA. Hasil amplifikasi PCR divisualisasikan menggunakan gel agarose 1% dalam *buffer* TEA (*Tris-EDTA*) elektroforesis horizontal. Gel agarose dicelupkan ke dalam larutan EtBr dengan konsentrasi akhir 1ml/100 ml selama 10 menit. Hasil pemisahan fragmen DNA dideteksi dengan menggunakan UV transluminator di bawah *Geldoc* ultraviolet, kemudian digambar dengan menggunakan kamera polaroid. Sebagai standar ukuran DNA digunakan 100 bp DNA ladder (Promega) untuk menetapkan ukuran pita hasil amplifikasi DNA.

Analisis dan Intepretasi Data

Hasil yang diperoleh di analisis secara deskriptif kualitatif. Data ini dilakukan berdasarkan skoring pita DNA yang muncul pada hasil elektroforesis, baik pada agarose 1,2% maupun agarose 1%. Pita-pita yang terlihat pada agarose dianggap sebagai satu alel. Pita-pita DNA yang memiliki laju migrasi yang sama diasumsikan sebagai lokus homolog. Pada laju migrasi yang sama, setiap pita yang tampak diberi nilai 1, sedangkan pita yang tidak tampak diberi nilai 0 sehingga hasil dari skoring pita berupa data biner. Data hasil skoring dianalisis dengan menggunakan program *Sequential Agglomerative Hierarchial and Nested* (SAHN)-UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic*) pada perangkat lunak menggunakan NTSYS versi 2.1. hasil analisis disajikan dalam bentuk dendogram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Empat planlet pakis simpei kami pilih sebagai sample untuk dianalisis dengan RAPD. Lima primer PCR-RAPD terpilih diujikan pada empat sampel *Cibotium barometz* yang menghasilkan produk PCR. Proses PCR pada penelitian ini hanya membutuhkan sedikit DNA template untuk dapat memperbanyak fragmen-fragmen DNA. Deteksi DNA dilakukan dengan mencampurkan media agarose 5 µl DNA genom yang ditambah 2µl *Loading dye*. Campuran dimasukan kedalam tiap lubang ependoft yang terdapat pada agarose 1,2% lalu di running selama 20 menit. Agarose dikeluarkan dari alat elektroforesis kemudian direndam dalam larutan Etidium Bromida selama 10 menit,

kemudian direndam dengan air selama 5 menit. Pergerakan DNA diamati dibawah sinar UV dengan menggunakan *Chemidoc*.

Tahap selanjutnya, kami melakukan uji kualitas dan konsentrasi DNA dengan menggunakan Nanodrop yang memakai sinar UV dengan panjang gelombang 260 dan 280 nm. Perbandingan dalam pengujian menggunakan sinar UV dengan panjang gelombang 260/280 nm memberikan suatu ukuran terhadap kontaminasi protein dalam suatu DNA. Sementara itu, penggunaan sinar UV dengan panjang 260 nm berfungsi untuk menghitung konsentrasi dari suatu DNA sample yang akan diuji konsentrasi dan kemurniannya. 2µl DNA genom masing-masing planlet diletakkan keatas lubang Nanodrop 2010 yang sebelumnya telah dimasukan 2µl TE. Hasil pengujian kuantitas DNA dengan Nanodrop ternyata menunjukkan hasil yang beragam. Hasil uji kuantitas DNA menggunakan Nanodrop selengkapnya disajikan pada Tabel 1. Hasil uji kuantitas dan kemurnian DNA tertinggi terdapat pada sampel CB2 dengan kemurnian 1,93 µg/µl dan konsentrasi 168,3 nm sedangkan CB3 menunjukkan nilai terendah yaitu dengan kemurnian 1,79 µg/µl dan konsentrasi 118,1 nm.

Tabel 1. Hasil uji kuantitas DNA menggunakan Nanodrop 2010

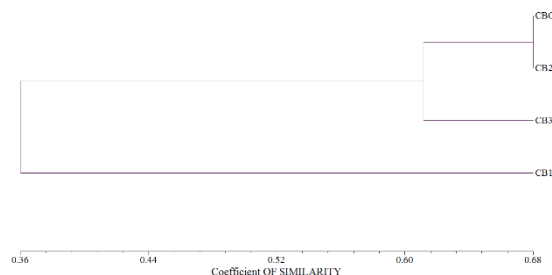
SAMPEL	KEMURNIAN (µg/µl)	KONSENTRASI (nm)
CB0	1,81	125,4
CB1	1,88	154,2
CB2	1,93	168,3
CB3	1,79	118,1

Polimorfisme yang terbentuk oleh penanda RAPD

Amplifikasi PCR dengan lima primer RAPD (OPT01, OPT02, OPT03, OPT04 dan OPT05) berhasil memproduksi 27 pita DNA dengan variasi ukuran antara 100 sampai 500 bp (Tabel 2). Dua puluh pita adalah polimorfik dan tujuh pita bersifat monomorfik. Pita polimorfik yang tertinggi yaitu primer OPT04 dengan ukuran fragmen antara 100 bp hingga 400 bp dengan presentase polimorfik 100% disusul dengan OPT02 dengan ukuran fragmen antara 91 sampai 340 dengan presentase polimorfik sebesar 90%. Primer yang bersifat polimorfis terdapat pada primer OPT01, OPT02, OPT04, dan OPT05 sedangkan OPT03 bersifat monomorfis yang menghasilkan 4 pita.

Hasil dari analisis menggunakan program *GelAnalyzer* terlihat jelas DNA yang banyak muncul terdapat pada primer OPT02, OPT03, OPT04 (Gambar 2). Pita DNA didominasi oleh primer OPT04, hal ini menunjukkan bahwa kecocokan primer dapat dilihat dari banyaknya pita DNA yang muncul. Primer OPT02 dan OPT04 dapat mengamplifikasi semua planlet *Cibotium barometz* dengan jelas. Sedangkan primer OPT01 dan OPT05 memperlihatkan pita yang tidak jelas. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa adanya pita DNA yang muncul pada suatu primer berbanding lurus dengan kecocokan sample pakis Simpei dengan primer tersebut. Hal ini berarti primer tersebut dapat menjadi acuan untuk tanaman pakis Simpei ataupun sejenisnya. Hasil skoring dilakukan dengan melihat pola pita hasil dari PCR kemudian dianalisis menggunakan program NTSYS untuk menampilkan dendogram. Hasil skoring Pita DNA ditunjukkan pada Tabel 3.

Analisis skoring menunjukkan pemisahan tumbuhan pakis Simpei ke dalam primer yang mengelompok berdasarkan muncul dan tidaknya DNA. Ditandai muncul atau tidaknya dengan simbol '1' berarti muncul dan '0' berarti tidak muncul. Tiap DNA yang muncul memiliki besaran yang beragam (MV). Nilai koefisien kesamaan genetik empat aksesori pakis Simpei berkisar antara 25% hingga 100%. Hasil elektroforesis pada pakis Simpei dengan menggunakan primer OPT-02, OPT-03, dan OPT-04 menunjukkan bahwa CB1 terdapat perbedaan dengan sampel lainnya, sedangkan sampel CB0 dan CB2 cenderung sama dan untuk sampel CB03 menunjukkan perbedaan pada tiga primer tersebut. Pada primer OPT-01 dan OPT-05 tidak menunjukkan adanya perbedaan antar sampel yang sudah di uji. Hasil dari skoring kemudian dianalisis dengan menggunakan program NTSYSPC, SAHN, SIM, dan NTED. Program itu banyak digunakan untuk mencari tahu kedekatan antar sampel. Hasil analisis dendogram pada penelitian ini membentuk tiga kluster (I, II, dan III). kluster I terdiri atas pakis Simpei CB1 (pakis emas), kluster II terdiri atas CB2 (pakis coklat) dan CB0 (pakis induk), dan kluster III terdiri atas CB3 (pakis bule). Untuk melihat kekerabatan terdekat diantara CB0, CB1, CB2, dan CB3 dapat dilihat pada dendogram Gambar 1.



Gambar 1. Kekerabatan antara CB0, CB1, CB2, dan CB3

Pakis Simpei (Indonesia) atau *golden chicken fern* (*Cibotium barometz*), secara ekologi merupakan tanaman langka karena jumlahnya yang terbatas dan dicari banyak orang untuk obat-obatan (Huang *et al.*, 2018). Oleh karena itu, usaha pemulihan tanaman dengan mikropropagasi menjadi sangat penting untuk memenuhi kebutuhan pasar. *Cibotium barometz* dari family Dicksoniaceae ini memiliki perkembangan yang sulit tergantung dari kondisi lingkungan dan tahap perkembangan. Pada penelitian kami telah melakukan perbanyakan induk *Cibotium barometz* dengan membedakan konsentrasi nitrogen pada media dan menghasilkan 3 genotip planlet. Planlet dari 3 genotip dan 1 induk kami uji secara molekular dengan RAPD untuk mengetahui kemungkinan variasi genetik yang terjadi. Amplifikasi PCR-RAPD pada 4 planlet telah berhasil dilakukan dengan menggunakan lima primer yang telah dipilih. Dalam karya ini, kami menggunakan primer yang sama yang dilaporkan oleh Escandón *et al.* (2007), yang mengidentifikasi enam varietas baru dari *Nierembergia linariaefolia*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penanda RAPD berguna dalam menentukan hubungan intra-genetik dalam genotip *Cibotium barometz*. Hasil dari penyinaran sinar UV *Chemidoc* dengan lima primer pada program *GelAnalyzer* dapat dilakukan skoring dengan jelas. Pita polimorfis DNA terdeteksi pada tiap-tiap primer dengan marker berkisar antara 100 hingga 500 bp. Sifat polimorfis nampak pada primer OPT01, OPT02, OPT04, dan OPT05. Primer OPT03 memiliki sifat monomorfis, hal tersebut menunjukkan bahwa primer OPT03 tidak mampu membedakan sampel satu dengan lainnya sehingga tidak cocok untuk aplikasi pakis Simpei. Pada Gambar 2 dapat dilihat pita DNA yang paling sedikit muncul terdapat pada primer OPT01 dibandingkan OPT03. Namun dilihat dari sifatnya, primer OPT02 justru lebih baik dibandingkan primer OPT03. Primer OPT02 bersifat polimorfis, sehingga dapat membedakan DNA pada

primer tersebut dibandingkan dengan OPT03 yang lebih banyak mengeluarkan DNA namun tidak dapat membedakan planlet CB0 hingga CB3.

Mengenai hubungan genetik dari genotip *Cibotium barometz*, penilaian koefisien kemiripan genetik dan penggabungan genotip mengakibatkan terpaparnya variabilitas genetik diantara genotip empat planlet. Gambar 3 merupakan penjelasan mengenai kekerabatan antar sampel CB0, CB1, CB2, dan CB3 dengan bantuan program NTSYSPC, SAHN, SIM, dan NTED dalam bentuk dendogram. Pada koefisien korelasi kemiripan ($r = 0.68$), dendogram digambar menggunakan metode cluster UPGMA yang menghasilkan tiga kelompok. Satu kelompok besar terdiri atas pakis Simpei CB2 (pakis coklat) dan CB0 (pakis induk), dan dua akses independen individu yaitu CB3 (pakis bule) dan CB1 (pakis emas). Sample CB1, CB2, dan CB3 secara morfologi hampir tidak memiliki perbedaan, hanya warna pada bulu yang membedakan yaitu kecoklatan, keemasan, dan bule. Dilihat dari pola pita DNA mereka memiliki perbedaan ukuran, letak bp dan sifat. Secara morfologi, CB1, CB2, CB3 miliki kesamaan satu dengan lainnya, namun dengan pengujian keragaman DNA dan tingkat kekerabatan, mereka justru memiliki perbedaan satu sama lain.

Kemiripan genetik antara CB0 dan CB2 cenderung lebih dekat (Gambar 3), meskipun genotipe memiliki karakteristik morfologi yang berbeda. Zhao *et al.* (2007) melaporkan bahwa genotip yang sama mengandung perbedaan meskipun mereka berasal dari ekotip yang sama. Ini adalah fakta yang diketahui bahwa keberlangsungan setiap populasi tanaman bergantung pada keragaman genetik mereka. Selain itu, faktor-faktor seperti isolasi populasi, pergeseran genetik, sistem perkawinan, aliran gen, seleksi, dan pergeseran distribusi bertanggung jawab untuk perubahan dalam pembentukan genetik yang kompleks dan selanjutnya menyebabkan variasi dalam multiplisitas herediter dalam populasi.

Studi kami mendukung pandangan ini sampai batas tertentu; Namun, mengingat sejumlah kecil genotip dan penanda yang digunakan untuk analisis ini, penelitian dengan berbagai jenis penanda dan sejumlah genotip yang lebih tinggi perlu dilakukan. Hasil penelitian ini, memvalidasi sekali lagi bahwa RAPD adalah penanda yang berguna dalam studi keragaman genetik, karena tingkat polimorfisme yang dapat terdeteksi oleh primer. Selain itu, ketika dasar genetik dari spesies atau genus yang akan dianalisis tidak

diketahui dengan baik dan hasil yang cepat dan kuat diperlukan, teknik ini sangat berguna karena sederhana dan memiliki biaya rendah. Kemungkinan karakterisasi setiap individu diperiksa, menawarkan perspektif yang menjanjikan sebagai alat molekuler untuk identifikasi varietas dan aplikasi program pemuliaan.

KESIMPULAN

Penelitian ini merupakan upaya untuk lebih memahami pengaruh pemberian nitrogen (KNO_3) terhadap keragaman genetik *Cibotium barometz*. Meskipun ada kesamaan genetik yang tinggi di antara mayoritas genotip *Cibotium barometz*, empat kelompok yang berbeda dapat diidentifikasi berdasarkan penanda molekuler RAPD. Polimorfisme pola pita DNA yang dihasilkan dari 5 primer RAPD menunjukkan keberagaman yang sangat tinggi hingga mencapai 100%. Hasil analisis klustering pola pita RAPD menggunakan metode UPGMA pada koefisien kemiripan 0.68 dan analisis komponen utama terhadap 4 genotipe *Cibotium barometz* hasil kultur in vitro mampu dibedakan dengan tegas menjadi 3 kelompok. Studi kami menunjukkan bahwa penggunaan penanda DNA RAPD yang diturunkan untuk mengotentikasi *Cibotium barometz* hasil kultur in vitro dapat membantu memperjelas keragaman genetik yang terjadi.

Ucapan Terima Kasih disajikan secara singkat; semua sumber dana penelitian perlu disebutkan, dan setiap potensi konflik kepentingan disebutkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Cuong NX, *et al.* 2009. Inhibitors of Osteoclast Formation from Rhizomes of *Cibotium barometz*. *Journal of J. Nat. Prod.* Vol. 72(9):1673-1677.
- Fu C, *et al.* 2017. *Cibotium barometz* Polysaccharides Stimulate Chondrocyte Proliferation in Vitro by Promoting G1/S Cell Cycle Transition. *Journal of Molecular Medicine Reports.* Vol. 15:3027-3034.
- Gabryszewska, E. 2011. Effect of Various Levels of Sucrose, Nitrogen Salts and Temperature on The Growth and Development of *Syringa Vulgaris L.* Shoots in Vitro. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.* Vol. 19(2):133-148.
- Govarthanan, *et al.* 2011. Genetic Variability among *Coleus sp.* Studied by RAPD Banding Pattern Analysis. *International Jurnal Biotechnology and Molecular Biology Research.* Vol. 2(12): 202-208.

- Khumaida & Handayani. 2010. Induksi dan Proliferasi Kalus Embriogenik pada Beberapa Genotipe Kedelai. *Jurnal Argon Indonesia* 38 (1): 19-24.
- Krizman, M, *et al.* 2007. Robust CTAB-Activated Charcoal Protocol for Plant DNA Extraction. *Journal of Acta Culture*. Vol. 87(2): 427-433.
- Jennifer, MO, Geigerpetra, KA, Ranker, AC. 2013. Molecular Phylogenetic Relationships of *Cibotium* and Origin of The Hawaiian Endemics. *Journal of American Fern Journal*. Vol. 103(3):141-152.
- Lestari, EG. 2008. *Kultur Jaringan*. Bogor: Akademia.
- Liu, CW, Sung, Y, Chen, BC, Lai, HY. 2014. Effects of Nitrogen Fertilizers on the Growth and Nitrate Content of Lettuce (*Lactuca sativa L.*). *Journal of Int. J. Environ. Res. Public Health*. Vol. 11:4427-4440.
- Langga, Fajarwati, I, Restu, M., Kuswinanti, T. 2012. Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitti (*Vitex coffasus reinw*) serta Analisis Keragaman Genetik dengan Teknik RAPD-PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi*. Vol. 12(3) : 265-276.
- Mai, W, Chen, D, Li, X. 2012. Antioxidant Activity of *Rhizoma cibotii* in vitro. *Journal of Advanced Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 2(1):107114.
- Mendes, R, Neto, RA, Nascimento, M, Lima, P. 2014. RAPD Analysis of The Genetic Diversity among Accessions of Fabaceous Forages (*Poincianella* spp) from the Caatinga. *Embrapa Meio-Norte-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. 13(3): p. 5832-5839.
- Mikula, A, Pozoga, M, Tomiczak, K, Rybczynski, JJ. 2014. Somatic Embryogenesis in Ferns: A New Experimental System. *Journal of Plant Cell Rep*.
- Movahedi, Z, Moieni, A, Soroushzadeh, A. 2013. The Effects of Different Concentrations of Nitrogen Sources on Growth of Micropropagated Potato Cultivars. *Journal of Plant Physiology and Breeding*. Vol. 3(1):35-44.
- Mukaromah L, *et al.* 2013. Pengaruh Sumber dan Konsentrasi Nitrogen terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiforum J.J Smith* secara in Vitro. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 2(1): 2337-3520. Fakultas MIPA Institut Teknologi Sepuluh November.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika Edisi Kedua*. Kampus IPB Taman Kencana Bogor : IPB Press.
- Rahayu, EMD, Isnaini, Y, Praptosuwiryo, TN. 2015. Induksi Pembentukan Sporofit pada Masa Prothallus Pakis Simpei (*Cibotium barometz*) secara in Vitro. *Journal of Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. Vol. 1(4):814-818.

- Razaq, M, Heikrujam, M, Chetri, SK, Agrawal, V. 2013. In Vitro Clonal Propagation and Genetic Fidelity of The Regenerants of *Spilanthes Calva* DC Using RAPD and ISSR Marker. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 19(2): p. 251-260.
- Razaq, M, Zhang, P, Shen, HL, Salahuddin. 2017. Influence of Nitrogen and Phosphorous on The Growth and Root Morphology of *Acer Mono*. *Journal of Plos One*.
- Ravi *et al.* 2014. In Vitro Spore Germination and Gametophytic Growth developoment of a Critically Endangered Fern *Pteris tripartite* SW. *African Journal of Biotechnology* 13 (23): 2350-2358.
- Sasmito, DEK, dkk. 2014. Karakteristik Primer pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk Sekuensing DNA : Mini Review. Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) V. Vol. 1: 93-102.
- Yu, R *et al.* 2016. In Vitro Propagation of The Endangered Tree Fern *Cibotium barometz* through Formation of Green Globular Bodies. *Journal of Plant Cell Tiss Organ Cult.*
- Zhang *et al.* 2008. Non-Detriment Finding for *Cibotium barometz* in China. NDF Workshop Case Studies. WG 2-perennials.
- Zhao, X *et al.* 2011. Anti-Osteoporosis Activity of *Cibotium barometz* Extract on Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rats. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 137:1083-1088.
- Zulkarnain. 2014. *Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyakkan Tanaman Budidaya*. Jakarta : Bumi Aksara.

