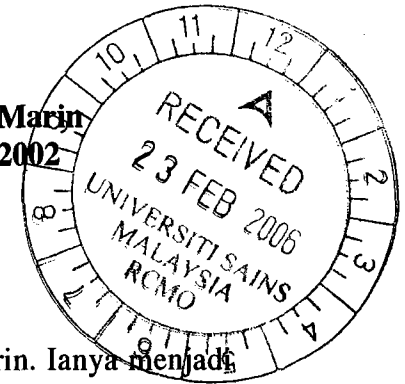


## Laporan Akhir Geran Jangka Pendek

**“Ekologi Molekul Rumput Laut di Beberapa Ekosistem Marin di Semenanjung Malaysia” – 1 Mei 2000 – 30 Oktober 2002**



### Pengenalan

Rumput laut berperanan penting dalam ruang persekitaran marin. Ianya menjadi sumber makanan utama kepada beberapa spesies ikan termasuk ikan duyung atau dugong, *Dugong dugon*. Selain itu rumput laut juga berfungsi sebagai mikrohabitat untuk pelbagai jenis mikroflora epifit dan makroflora yang bergantung hidup di permukaan daunnya Thayer *et al.*, (1975). Di samping mempunyai produktiviti yang tinggi, akar tumbuhan ini yang mencengkam substrat menolong menstabilkan permukaan dasar laut. Ini membantu menghalang hakisan dengan memperlambatkan pergerakan arus air di bahagian bawah atau dasar laut.

Di Malaysia kajian tentang rumput laut yang telah dijalankan meliputi aspek-aspek taburan, kepelbagaian spesies serta indeks-indeks ekologi yang berkaitan (Bujang, 1994; Phang, 1989; Amir, 1995; Mansor *et al.*, 1995). Kajian yang melibatkan penilaian variasi genetik spesies-spesies rumput laut di Malaysia hampir tidak pernah dilakukan. Kajian ini dijalankan bertujuan mendapatkan maklumat awal tentang kepelbagaian genetik salah satu spesies rumput laut yang ada di Semenanjung Malaysia, *Halophila ovalis*. akan dilakukan dengan terperinci. Spesies ini dipilih kerana ianya tersebar agak meluas iaitu di beberapa buah pulau di perairan Johor serta di Pulau Pinang. Pencirian variasi genetik dilakukan dengan menggunakan teknik RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) atau penjana polimorfisme DNA rawak (Welsh dan McClelland, 1990). Variasi genetik yang diperolehi untuk populasi-populasi ini akan memberikan maklumat tentang status serta kemampuan kemandirian genetik spesies berkenaan di habitat mereka yang kebelakangan ini diancam pencemaran yang meluas. Maklumat ini penting untuk menyusun strategi pengendalian habitat rumput laut yang secara langsung menyumbang kepada pemuliharaan spesies marin lain yang bergantung kepada kehadiran mereka seperti pelbagai spesies ikan termasuk dugong.

## **Kaedah**

### **1) Persampelan Lapangan**

Untuk kajian variasi genetik sejumlah 71 individu *H. ovalis* telah digunakan yang diambil dari dua kawasan iaitu Pulau Pinang dan Pulau Besar di Johor. Di Pulau Pinang sampel *H. ovalis* dikutip dari 3 lokasi iaitu di Beting Tengah, pulau gazumbo 1 (500m dari Beting Bengah) dan pulau gazumbo 2 (650m dari Beting Tengah). Dari Pulau Besar pula, sample diambil dari 3 lokasi iaitu di bahagian utara, barat dan selatan Pulau Besar.

### **2) Pengekstrakkan DNA & Analisis RAPD**

Pengekstrakkan DNA dari rumput laut akan dilakukan dengan menggunakan kaedah CTAB (Murray & Thompson, 1980).

Untuk tindakbalas RAPD, 40 pencetus masing-masing dari kit OPF dan OPC (dari OPERON Technology) telah digunakan pada mulanya untuk memilih pencetus yang memberikan profil variasi yang baik.

Tindakbalas RAPD dilakukan dalam isipadu 25 ul yang mengandungi 2.5ul penimbal DNA polimerase, 2.0mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 1 pmol pencetus, 0.5 U enzim Taq DNA polimerase (Promega) dan 15 ng DNA sampel.

Amplifikasi dijalankan menggunakan mesin kitar haba MJ Research dengan profil suhu seperti berikut: 1.5 min denaturasi pada suhu 94°C, diikuti dengan 35 kitaran suhu yang mengandungi suhu-suhu berikut; 94°C untuk 45 saat, 40°C untuk 30 saat, 50°C untuk 45 saat, 60°C untuk 30 saat dan 72°C untuk 2 minit. Kitar terakhir ini diikuti dengan suhu 72°C selama 6 minit.. kesemua produk RAPD dipisahkan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1.5% dalam penimbal TBE 0.5X.

### **3) Analisis Data**

Fragment DNA yang terhasil yang dilihat dibawah pemisahan gel agarosa akan direkodkan sebagai hadir/tidak hadir (0/1) ke dalam data matriks. Dari data tersebut, nilai kesamaan antara dua individu dihitung dengan menggunakan indeks kesamaan Jaccard

(1908) dengan menggunakan perisian RAPDistance (Armstrong *et al.*, 1995). Dari indeks kesamaan ini jarak genetik akan dihitung dengan menggunakan perisian PHYLIP (Felsenstein, 1993). Seterusnya satu gambarajah pohon akan dijana melalui perisian TreeView.

## **Keputusan & Perbincangan**

### **Pemencilan DNA**

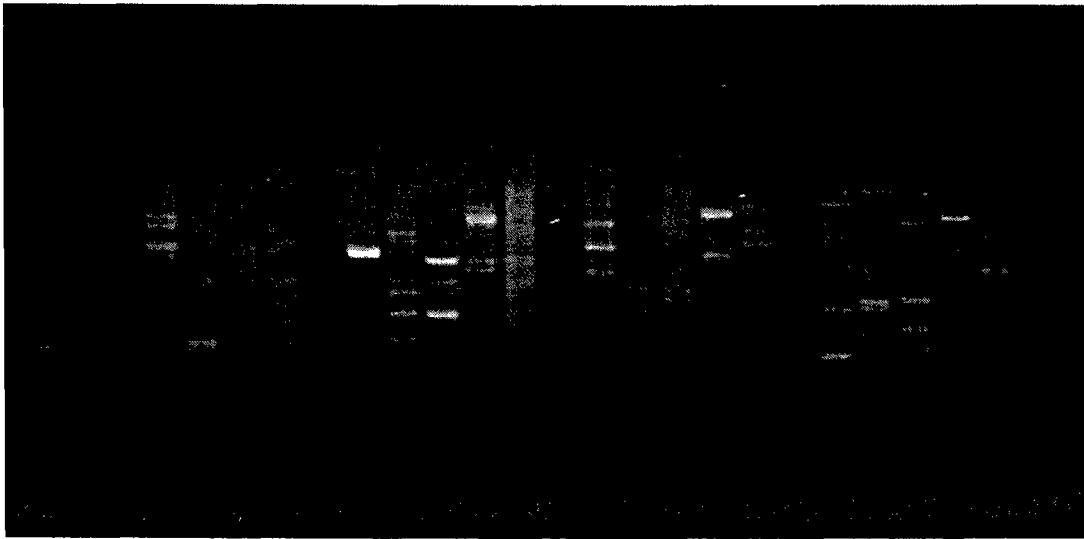
DNA berjaya dipencilkan untuk kebanyakan sampel. Quantiti DNA yang dipencilkan berjulat antara 100 – 500 ng/ul. Namun masalah timbul untuk sampel yang diperolehi dari Pulau Besar. Majoriti sampel yang dipungut tidak dapat dipencilkan dengan baik. Walaupun lebih 40 sampel dari Pulau besar digunakan pada kali pertama persampelan untuk pemencilan DNA hanya 5 sampel sahaja yang dapat dipencilkan DNANYA dalam bentuk yang tepulihara (tiada pemutusan DNA). Persampelan kali kedua dilakukan dan untuk kali ini pemencilan berjaya untk 6 individu.. Secara keseluruhannya hanya 11 individu dari Pulau Besar yang digunakan untuk analisis RAPD.

Kegagalan mendapatkan DNA yang tepulihara terutamanya tumbuhan dari Johor adalah mungkin kaedah penyimpanan sampel yang kurang sesuai dari lapangan ke makmal. Pemencilan DNA dilakukan ke atas daum segar. Masalah yang timbul mungkin disebabkan masa yang agak lama (3 hari) antara masa persampelan dilakukan di Johor sebelum ianya sampai di USM untuk dipencilkan DNA.

Kaedah pengeringan menggunakan gel silica juga digunakan untuk mengeringkan daun tumbuhan sebelum dipencilkan DNA sebagai salah satu cara alternatif untuk persediaan sampel sebelum pemencilan dilakukan. Ini bertujuan agar daun tersebut tidak rosak dalam masa 3 hari yang diambil dalam perjalanan dari lapangan ke makmal. Namun hasil pemencilan DNA dari daun kering amat tidak berkesan untuk memencilkan DNA yang tepulihara untuk tumbuhan *H. ovalis*. Oleh itu pemencilan DNA hanya dilakukan ke atas daun segar sahaja.

## Amplifikasi RAPD

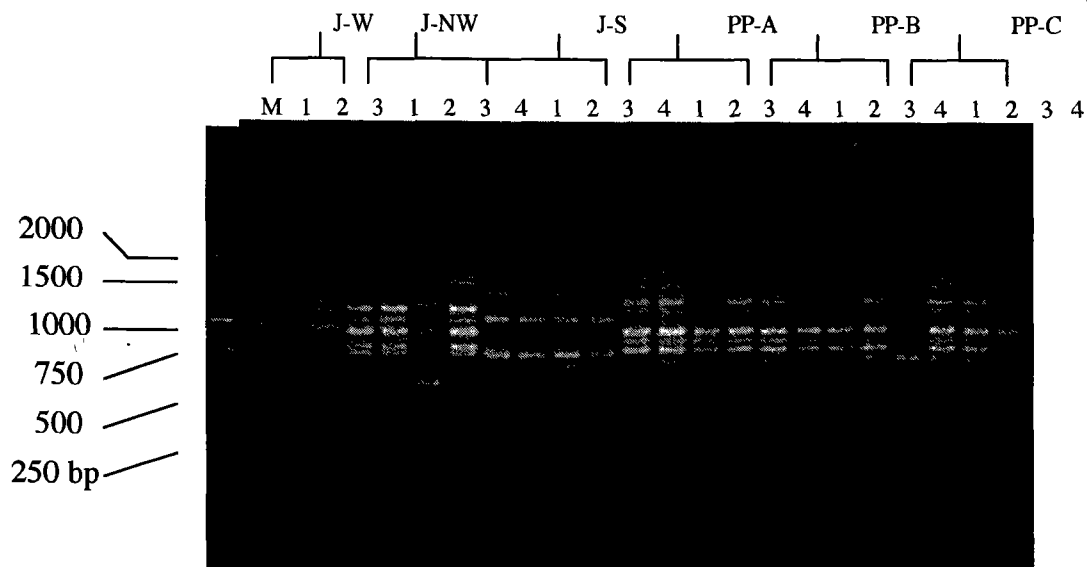
Daripada sejumlah 40 pencetus yang digunakan pada awalnya (contohnya rajah 1) hanya 6 yang dipilih berdasarkan kualiti dan kebolehulangan hasil amplifikasi yang diperolehi. Sejumlah 70 jalur DNA yang terhasil. Jumlah jalur DNA untuk satu-satu pencetus berjulat antara 8 – 15 jalur dan saiz jalur berjulat antara 300 pasang bes (bp) kepada 1877 bp. Hasil amplifikasi yang terhasil dari salah satu pencetus (OPC-19) diberikan di dalam rajah 2.



Rajah 1. Rajah menunjukkan profil analisis RAPD dari pengskrinan 20 pencetus rawak dengan menggunakan DNA dari *H. ovalis*. Daripada sejumlah 20 pencetus rawak ini sekurang-kurangnya 13 pencetus yang memberikan profil RAPD yang terang dan sesuai untuk digunakan bagi kajian populasi tumbuhan berkenaan. Setelah analisis dilakukan dengan lebih teliti akhirnya hanya 6 pencetus sahaja yang dipilih.

## Analisis jarak Genetik & Rajah Pohon

Analisis pengelompokkan (kaedah Neighbor-Joining) digunakan untuk menjana rajah pohon. Secara amnya rajah pohon (Rajah 3) mengelompokkan individu sampel ini ke dalam 2 kelompok besar berdasarkan kawasan tumbuhan ini diambil iaitu satu kelompok mewakili tumbuhan dari Pulau Pinang dan satu lagi dari Johor.



**Rajah 2:** Profil RAPD yang dihasilkan dengan pencetus OPC-19 dan pisahkan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1.5%. and separated by agarosa (1.5% w/v) gel electrophoresis. Lorong M. 1 Kbp DNA Ladder. J adalah sample dari Johor dan PP adalah sampel dari Pulau Pinang.

Satu yang jelas ialah tiada variasi intralokasi yang terlihat. Dengan kata lain untuk setiap lokasi persampelan tiada perbezaan genetik yang terlihat untuk individu-individu yang disampel dari satu-satu lokasi. Perkara ini dapat dilihat untuk setiap lokasi.

Ini menunjukkan bahawa berkemungkinan besar sampel-sampel dari setiap lokasi itu mungkin berasal dari satu koloni tunggal dan apa yang boleh dilihat kini adalah satu klon yang besar di satu-satu lokasi. Ini tidaklah begitu menghairankan memandangkan spesies ini membiak secara dominan melalui pembiakan vegetatif.

Walaupun pembiakan seksual mungkin berlaku namun penanda RAPD yang digunakan dalam kajian ini tidak dapat mengesannya. Kegagalan mengesan perbezaan genetik antara individu di sesebuah lokasi mungkin disebabkan oleh salah satu dari yang berikut:

1. sememangnya di sesebuah lokasi itu berasal dari satu pokok /tumbuhan tunggal dan apa yang dilihat kini adalah satu klon yang beaser
2. persampelan yang dilakukan di setiap lokasi tidak membezakan individu dari klon yang berbeza. Persampelan yang dilakukan adalah berteraskan kuadrat dan

kuadrat-kuadrat ini diletakkan dalam satu garis lurus dan dipisahkan antara satu kuadrat dengan yang satu lagi sepanjang 5 meter. Setiap kuadrat hanya diambil 5 sampel. Kaedah ini dilakukan dengan andaian mengurangkan kemungkinan mana-mana tumbuhan yang disampel tidak dari koloni yang sama. Namun dari keputusan walaupun kaedah persampelan dilakukan sedemikian masih tidak terdapat sebarang kevariabelan genetic introlokasi ditemui. Jadi kesimpulan yang mungkin adalah kesemuanya mungkin berasal dari satu tumbuhan sahaja.

3. Berkemungkinan juga kawasan genom yang dikaji melalui kaedah RAPD tidak dapat menggambarkan keseluruhan genom. Dengan kata lain variasi itu mungkin ada bagi individu berbeza tapi kaedah yang digunakan tidak dapat mengenalpasti kawasan genom yang mungkin menunjukkan variasi. Walaupun demikian ini bukan sahaja masalah kaedah RAPD sahaja, kaedah lain juga adalah sama kerana hanya sebahagian genom sahaja yang dianalisis.

Satu perkara yang menarik dan yang perlu dikaji dengan lebih mendalam ialah populasi *H. ovalis* di Johor. Ini kerana walaupun tiada perbezaan intralokasi bagi tumbuhan di situ terdapat perbezaan yang dapat dicerap antara lokasi di tempat berbeza di Pulau Besar.

### **Kesimpulan**

Dari kajian yang dilakukan didapati bahawa *H. ovalis* dapat dibezakan secara genetik untuk dua kawasan berbeza iaitu *H. ovalis* dari Pulau Pinang menunjukkan perbezaan genetic berbanding dengan dari Johor..

Untuk tumbuhan dari Pulau Pinang sampel untuk ke tiga-tiga lokasi yang dikaji tidak menunjukkan perbezaan yang besar. Sebaliknya untuk sampel dari Johor walaupun saiz sampel adalah kecil terdapat perbezaan yang dapat dicerap antara tumbuhan dari lokasi berbeza di Pulau Besar.



## **Rujukan**

Ahmad, A. 1995. Kajian rumput laut di Beting Tengah, Pulau Pinang. *Thesis Sarjana Muda. Universiti Sains Malaysia.*

Armstrong, J., A. Gibbs, R. Peakall and G. Weiller 1995. *RAPDistance Program version 1.03 for the Analysis of Patterns of RAPD Fragments.* Australian National University, Canberra.

Bujang, J.S. 1994. Status of seagrass resources in Malaysia. AASEAN- Australia *Third Symposium on Living Coastal Resources.* Chulalongkon University, Bangkok, Thailand.

Felsenstein, J. 1993. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5s.* Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Societe Vaudense des Sciences Naturelles* 44:223-270.

Mansor, M., Z. Yasin, A.R. Latun and G. Muthaiya 1995. Notes on the distribution of microphytes in the coastal waters of Pulau Besar, Johor, Malaysia. *Marine Research* 4(1):47-52.

Murray, M.G. and W. F. Thompson 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, 8, 4321-4325.

Phang, S.M. 1989. Seagrasses - A neglected natural resource in Malaysia. *Proceeding of the 12th. Annual Seminar of the Malaysian Society of Marine Sciences.*

Thayer, G.W., D.A. Wolfe and R.B. Williams 1975. The impact of man on seagrass system. *American Scientists.* 63: 288-296.