

**DNA Barcoding Dalugha (*Cyrtosperma Merkusii*) di Kepulauan Talaud dan  
Minahasa Selatan Berdasarkan Gen *rbcL***

*(DNA barcoding of Dalugha (Cyrtosperma merkusii) in Talaud Islands and  
North Minahasa Based on rbcL Gene*

Marlin Taariwuan<sup>1\*</sup>, Jantje Ngangi<sup>2</sup>, Yermia Mokusuli<sup>2</sup>, Sukmarayu Gedoan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa S2 Biologi PPs Universitas Negeri Manado

<sup>2</sup>Staf Pengajar Prodi Biologi PPs UNIMA

\*Email: bernadettaariwuan@gmail.com

*(Article History: Received June 28, 2021; Revised August 30, 2021; Accepted Sept 3, 2021)*

**ABSTRAK**

Dalugha (*Cyrtosperma merkusii* (Hassk.) Schott) merupakan tanaman endemik Sulawesi Utara yang digunakan sebagai pangan alternatif (pengganti beras). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan spesies daluga di Kepulauan Talaud dan Minahasa Selatan menggunakan DNA barcode gen *rbcL* (*ribulose 1,5 biphosphate carboxylase large*). Perbandingan barcode DNA yang dilakukan pada empat sampel yang berbeda lokasi tersebut keduanya menghasilkan tingkat kesamaan 100% (identik). Dengan demikian, tidak ada variasi intra spesies yang ditemukan dari semua sampel yang ada. Selanjutnya, kemiripan sampel-sampel ini telusuri kemiripannya dengan kerabat terdekat yang tercatat di GenBank menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Tanaman dalugha dalam penelitian ini memiliki kemiripan 99,82% dengan tumbuhan *Anaphyllopsis americana* (AM905753.1), dan kemiripannya 99,63% dengan *Cyrtosperma macrotum* (AM905750.1), *Lasimorpha senegalensis* (AM905755.1), *Pycnospatha arietina* (AM905751.1), dan *Podolasia stipitata* (AM905752.1). Belum ada rekor sekuens DNA gen *rbcL* dari spesies ini yang dibisa dibandingkan di GenBank.

Kata Kunci: Dalugha; DNA barcoding; gen *rbcL*

**ABSTRACT**

*Dalugha (Cyrtosperma merkusii (Hassk.) Schott) is an endemic plant in North Sulawesi that is used as alternative food (substitute for rice). This research aimed to compare the DNA barcode of dalugha in Talaud Islands and in South Minahasa using rbcL (ribulose 1,5 biphosphate carboxylase large) gene. The DNA barcoding comparison of all four samples in both area resulted in 100% similarity (identical). Therefore, there is no intraspecific variation found in all samples. Furthermore, the similarity of these samples were conducted with BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) to compare with its closest relatives in GenBank. The closest relatives of this plant, based on similarity information, are 99.82% with Anaphyllopsis americana (AM905753.1) and all 99.63% with Cyrtosperma macrotum (AM905750.1), Lasimorpha senegalensis (AM905755.1), Pycnospatha arietina (AM905751.1), and Podolasia stipitata (AM905752.1). There is no record yet of rbcL gene sequence of C. merkusii in GenBank for comparison.*

*Keywords: Dalugha; DNA barcoding; rbcL gene*

**PENDAHULUAN**

Genus *Cyrtosperma* memiliki jumlah spesies paling sedikit yaitu 12 spesies yang tersebar di Papua, Semenanjung Malaya, Filipina, Kalimantan, Sumatera, Jawa dan Oseania. Hasil penelitian terbaru di Federated States of Micronesia mengatakan bahwa di daerah Micronesia dan sekitarnya terdapat 37 kultivar *Cyrtosperma* dan masing-masing kultivar memiliki karakter

morfologi berbeda (Rao *et al.* 2014). Propinsi Sulawesi Utara memiliki beragam pangan lokal yang berasal dari umbi dan berpotensi sebagai sumber pangan alternative untuk mendukung ketahanan pangan, seperti, Dalugha (*Cyrtosperma merkusii*) dan Kolorea (*Colocasia sp*) yang berasal dari Kepulauan Sangihe dan Talaud, Umbi wongkai (*Dioscorea sp*) di Kabupaten Minahasa Tenggara dan umbi Longki

(*Xanthosoma sp*) di kota Bitung (Taulu dan Layuk 2014). Dalugha adalah nama lokal yang diberikan oleh Masyarakat untuk tanaman talas rawa merupakan sumber makanan (penganti beras) (Agustina *et al.* 2016).

Identifikasi spesies berdasarkan morfologi memiliki beberapa kendala, yaitu pada beberapa takson hanya bisa dilakukan pada tumbuhan dewasa (berbunga), sehingga memerlukan waktu yang lama untuk pengambilan sampel dan pengamatan harus menunggu masa berbunga atau berbuah (Virgilio *et al.* 2012). Seiring dengan kemajuan pesat biologi molekuler (*DNA barcode*) Gen *COI* untuk identifikasi secara molekuler khususnya pada hewan, sedangkan *ITS*, *matK* dan *rbcL* untuk tumbuhan (Rahayu *et al.* 2019). *The Consortium for the Barcode of Life (CBOL)* merekomendasikan penggunaan dua gen plastida *rbcL* dan *matK* sebagai *barcode* standar (Hollingsworth *et al.* 2009). Gen *rbcL* (*ribulose 1,5 biphosphat carboxylase large*) dapat diamplifikasi dengan tingkat keberhasilan tinggi dari satu atau dua macam primer universal. Lebih lanjut dikemukakan jika dibandingkan dengan kandidat gen barcode yang lain, gen *rbcL* memiliki tingkat keberhasilan *bidirectional sequencing* (proses *sequencing* dua arah dengan primer forward dan reverse) yang tinggi (Fazekas *et al.* 2008).

Berdasarkan observasi di lapangan, dalugha tumbuh subur di rawa-rawa di Kabupaten Minahasa Selatan Desa Rap-Rap. Informasi masyarakat setempat bahwa dalugha digunakan sebagai bahan makanan untuk mengatasi krisis pangan. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan spesies dalugha di Minahasa Selatan dengan di kepulauan Talaud menggunakan sekuens barcode DNA berdasarkan gen *rbcL*. Serta membandingkan sekuens dalugha dengan beberapa kerabat terdekatnya yang terdata di GenBank.

## METODE

### Isolasi DNA Tumbuhan Dalugha

Tumbuhan dalugha dengan kode sampel AM, RP, TN, TA (telah melalui proses diidentifikasi secara morfologi sebelumnya) masing-masing diambil daunnya kira-kira 50 mg, kemudian digerus dalam tabung *Eppendorf*. Sampel yang sudah disiapkan dalam tabung *Eppendorf* diisolasi menggunakan *Genomic DNA Mini Kit Plant (Geneaid)* sesuai dengan prosedur manual yang disediakan perusahaan.

### Amplifikasi dengan Polimerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 40  $\mu$ L. Komposisi reaksi PCR mengandung 20  $\mu$ L *MyTaq HS Red Mix (Bioline)*, 1,5  $\mu$ L untuk masing-masing primer, 3  $\mu$ L templat DNA sampel, dan 14  $\mu$ L air (deionisasi, bebas nuklease). Primer yang digunakan berdasarkan Kress dan Erickson (2007) yaitu *rbcL-aF* (5' ATG TCA CCA CAA ACA GAC ACT AAA GC- 3') sebagai primer maju dan *rbcL-aR* (5' GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG-3') sebagai primer mundur.

Tahapan proses amplifikasi PCR meliputi denaturasi DNA awal pada suhu 95°C selama 3 menit, (i) denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, (ii) perlekatan primer pada suhu 50°C selama 30 detik, (iii) pemanjangan DNA pada suhu 72°C selama 30 detik. Tahapan i, ii, dan iii berlangsung sebanyak 35 kali dan tahap pemanjangan akhir pada 72°C selama 60 detik (Kolondam, 2015). Proses amplifikasi dilakukan mesin PCR T-Personal (Biometra). Proses sekuensing dilakukan penyedia jasa sekuensing First Base C.O. di Malaysia.

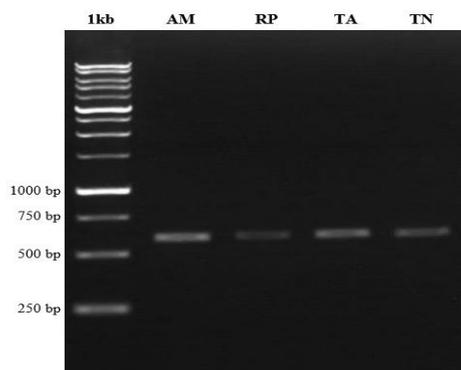
### ANALISIS DATA

Pembacaan kromatogram dan penyuntingan DNA dilakukan menggunakan piranti lunak *Geneious v5.6* (Kearse *et al.* 2012). Penjajaran untuk dua arah sekuensing dilakukan menggunakan algoritma MUSCLE (Edgar 2004). Sekuens barcode DNA sampel dibuat dalam format FASTA untuk analisis selanjutnya. Identifikasi

barcode DNA menggunakan BLAST (Basic Local Search Tool) yang tersedia secara daring (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) tanggal 27 Juni 2021 (Altschul *et al.* 1990).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi analisis DNA, bertujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak dan karbohidrat. Hasil isolasi dan amplifikasi gen *rbcL* daluga memperlihatkan pola pita yang jelas dan tunggal, ditunjukkan dengan elektroforesis yang divisualisasikan dengan UV-Transluminator (Gambar 1).



Gambar 1. Elektroforesis gel agarosa 0,8% produk PCR gen *rbcL* sampel

Pita DNA tunggal artinya DNA yang diperoleh tersebut utuh atau tidak ada *smear* ketika DNA dielektroforesis. DNA yang berkualitas baik dicirikan oleh pita DNA yang terlihat tebal dan bersih bila divisualisasikan foto gel elektroforesis (Ardiana 2009). Hal ini menjadi penting karena pada proses sekuensing DNA yang masih utuh akan memberikan hasil yang lebih akurat. Berdasarkan ukuran DNA *ladder* 1 kb, pita DNA yang terbaca berukuran antara 500 bp dan 750 bp. Hasil ini sesuai dengan panjang pita yang diharapkan, yaitu 600 bp.

Hasil sekuensing produk PCR gen *rbcL* untuk semua sampel menghasilkan kromatogram yang berkualitas tinggi dengan nilai High Quality (HQ) lebih dari 90%. Kromatogram hasil sekuensing menunjukkan hasil berkualitas tinggi, di mana puncak yang dihasilkan jelas dan tidak

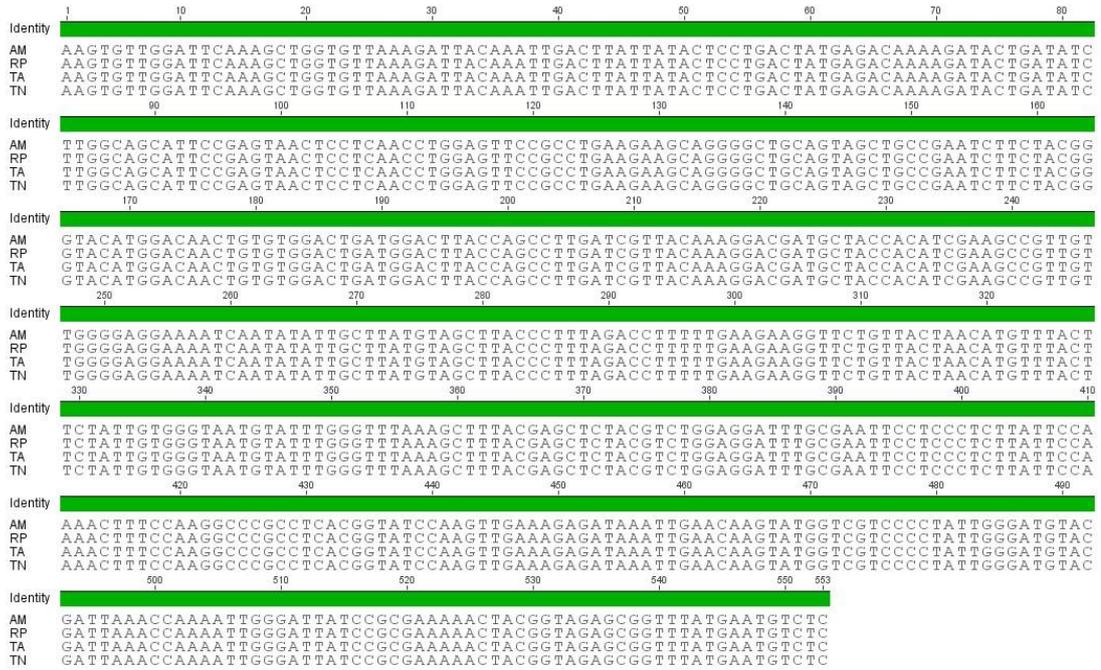
saling tumpang tindih antara satu puncak yang satu dengan yang lainnya, semakin tinggi nilai HQ suatu kromatogram maka semakin bagus pula puncak kromatogram.

Hasil penjajaran (alignment) menunjukkan bahwa keempat sekuens tanaman daluga AM, RP, TA dan TN semuanya identik (kesamaan 100%). Hasil penjajaran sekuens gen *rbcL* menggunakan algoritma MUSCLE dapat dilihat pada Gambar 2. Ini berarti bahwa berdasarkan sekuens gen *rbcL*, perbedaan ciri morfologi dari tanaman daluga yang berbeda lokasi tidak berarti menunjukkan perbedaan spesies. Secara genetik keempatnya sama persis atau identik.

Hal ini disebabkan karena variasi genetik intraspesies sangat kecil. Selain itu, untuk mengetahui variasi intraspesies yang lebih akurat dibutuhkan dua atau lebih kombinasi lokus sehingga dapat menghasilkan data yang lebih signifikan (Newmaster dan Ragupathy 2009; Tallei dan Kolondam 2015).

Hasil ini mirip dengan penelitian Julianti *et al.* (2015) yang sebelumnya membandingkan tanaman dalugha menggunakan DNA barcoding gen *matK*. Seperti layaknya gen *matK*, gen *rbcL* yang digunakan dalam penelitian ini tidak menunjukkan adanya variasi sama sekali antar sampel dari beberapa lokasi. Gen ini tidak menunjukkan adanya variasi intraspesies antar tanaman dalugha.

Hasil *BLAST* gen *rbcL* sampel keempat sampel dalugha yang identik tersebut menunjukkan tingkat kemiripan 99,82% (Gambar 3) dengan tumbuhan *Anaphyllopsis americana* (AM905753.1), yang masih merupakan satu famili Araceae dengan tanaman Dalugha. Spesies yang paling mirip di urutan kedua ada empat spesies yang tingkat kemiripannya 99,63% yaitu *Cyrtosperma macrotum* (AM905750.1), *Lasimorpha senegalensis* (AM905755.1), *Pycnospatha arietina* (AM905751.1), dan *Podolasia stipitata* (AM905752.1). Lima spesies ini sama-sama termasuk family Araceae dan sub family Lasioideae.



Gambar 2. Alignment (penjajaran) sekuens gen *rbcL* sampel daluga menggunakan algoritma MUSCLE.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lasia spinosa voucher 71753 (MO) chloroplast_complete genome</a>	<a href="#">Lasia spinosa</a>	1005	1005	100%	0.0	99.46%	169982	<a href="#">MT226772.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lasia spinosa voucher 71753 (MO) chloroplast_complete genome</a>	<a href="#">Lasia spinosa</a>	1005	1005	100%	0.0	99.46%	169982	<a href="#">NC_048970.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lasia spinosa voucher PS1402MT03 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxy...</a>	<a href="#">Lasia spinosa</a>	1005	1005	100%	0.0	99.46%	703	<a href="#">GQ436687.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Araceae sp. Jorge176 voucher BioBot06550 ribulose-1,5-bisphosphate carboxyl...</a>	<a href="#">Araceae sp...</a>	1003	1003	99%	0.0	99.46%	552	<a href="#">JQ590293.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lasia spinosa ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcL) gene...</a>	<a href="#">Lasia spinosa</a>	1002	1002	99%	0.0	99.46%	1327	<a href="#">L10250.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Anaphyllopsis americana plastid partial rbcL gene for ribulose-biphosphate carb...</a>	<a href="#">Anaphyllops...</a>	996	996	98%	0.0	99.82%	1391	<a href="#">AM905753.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lasimorpha senegalensis plastid partial rbcL gene for ribulose-biphosphate carb...</a>	<a href="#">Lasimorpha...</a>	990	990	98%	0.0	99.63%	1391	<a href="#">AM905755.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Podolasia stipitata plastid partial rbcL gene for ribulose-biphosphate carboxylase</a>	<a href="#">Podolasia st...</a>	990	990	98%	0.0	99.63%	1391	<a href="#">AM905752.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Pycnospatha arietina plastid partial rbcL gene for ribulose-biphosphate carboxyl...</a>	<a href="#">Pycnospath...</a>	990	990	98%	0.0	99.63%	1391	<a href="#">AM905751.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Cyrto sperma macrotrum plastid partial rbcL gene for ribulose-biphosphate carbox...</a>	<a href="#">Cyrto sperm...</a>	990	990	98%	0.0	99.63%	1391	<a href="#">AM905750.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Aglaonema costatum voucher MO:101495b chloroplast_complete genome</a>	<a href="#">Aglaonema...</a>	989	989	100%	0.0	98.92%	165344	<a href="#">MN046881.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Aglaonema crispum isolate AD3HI83 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxy...</a>	<a href="#">Aglaonema...</a>	989	989	100%	0.0	98.92%	553	<a href="#">MF349528.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Aglaonema commutatum isolate AD3HI88 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylas...</a>	<a href="#">Aglaonema...</a>	989	989	100%	0.0	98.92%	553	<a href="#">MF349494.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Jasarum steyermarkii voucher US:3632230 ribulose-1,5-bisphosphate carboxyla...</a>	<a href="#">Jasarum ste...</a>	987	987	99%	0.0	98.91%	553	<a href="#">MF786302.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Aglaonema commutatum voucher Hosam00271 ribulose-1,5-bisphosphate carb...</a>	<a href="#">Aglaonema...</a>	987	987	99%	0.0	98.91%	552	<a href="#">KX783817.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Caladium bicolor chloroplast_complete genome</a>	<a href="#">Caladium bi...</a>	987	987	99%	0.0	98.91%	163149	<a href="#">MN972441.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Xanthosoma sagittifolium chloroplast_complete genome</a>	<a href="#">Xanthosom...</a>	987	987	99%	0.0	98.91%	165169	<a href="#">MW628970.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Xanthosoma sagittifolium voucher J.R. Abbott 24707 (FLAS) ribulose-1,5-bispho...</a>	<a href="#">Xanthosom...</a>	987	987	99%	0.0	98.91%	566	<a href="#">GU135182.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Colocasias esculenta voucher BioBot05994 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylas...</a>	<a href="#">Colocasias e...</a>	985	985	99%	0.0	98.91%	552	<a href="#">JQ590298.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lasia spinosa plastid partial rbcL gene for ribulose-biphosphate carboxylase</a>	<a href="#">Lasia spinosa</a>	985	985	98%	0.0	99.45%	1391	<a href="#">AM905749.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Xanthosoma maffa rbcL gene, partial</a>	<a href="#">Xanthosom...</a>	985	985	99%	0.0	98.91%	1347	<a href="#">AJ007543.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stylochaeton bogneri voucher 87579 (MO) chloroplast_complete genome</a>	<a href="#">Stylochaeto...</a>	983	983	100%	0.0	98.73%	163770	<a href="#">MT226774.1</a>

Gambar 3. Hasil BLAST sampel

**KESIMPULAN**

DNA barcoding berdasarkan penanda gen *rbcL* yang dilakukan pada empat sampel yang berbeda lokasi (Kepulauan Talaud dan

Minahasa Selatan) menghasilkan tingkat kesamaan 100% atau disebut identik. Tidak ada variasi intraspesies yang ditemukan dari sampel yang ada. Kerabat terdekat tanaman

dalugha dalam penelitian ini memiliki kemiripan 99,82% dengan tumbuhan *Anaphyllopsis americana* (AM905753.1), dan kemiripannya 99,63% dengan *Cyrtosperma macrotum* (AM905750.1), *Lasimorpha senegalensis* (AM905755.1), *Pycnospatha arietina* (AM905751.1), dan *Podolasia stipitata* (AM905752.1) yang termasuk famili Araceae dan sub famili Lasioideae.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Agustina DN, Faridah, Jenie BSL, (2016) Pengaruh Retrogradasi dan perlakuan kelembaban panas terhadap kadar pati resisten tipe 3. Daluga. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 27:78-86. DOI:10.6066/Jtip.2016.27.1.78.
- Altschul, SF., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ardiana D, 2009. Teknik Isolasi DNA genom tanaman papaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi Buffer Ctab. *Buletin teknik Pertanian* 14(1):12-16.
- Consortium Barcode of Life (CBOL). (2009). A DNA Barcode for Land Plants. *PNAS*, 106 (31).
- Edgar, RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Research* 5:1792-1797.
- Fazekas, AJ, Burgess KS, Kesanakurti, PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barret S C H, 2008. Multiple multicolour DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *Plos one* 3: 2802.
- Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham R. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106: 12794 – 12797.
- Julianti E., Pinaria, A., Lengkong EF, Kolondam BJ. 2015. DNA Barcoding Tanaman Daluga (*Cyrtosperma* spp) dari Kepulauan Sangihe berdasarkan Gen matK. *Jurnal Bio Logos* 5(2): 47-52.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Meintjes, and A. Drummond (2012) Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data. *BIOINFORMATICS* 28(12), 1647-1649.
- Kress WJ, Erickson DL, 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants, the coding *rbcl* gene complements with the non coding *trnH-psbA* spacer region. *Plos One* 2(6) Doi:10.1371/0000508.
- Newmaster SG, Ragupathy S (2009). Testing plant barcoding in a sister complex of Pantropical acacia (Mimosoideae, Fabaceae). *Molecular Ecology Resources* 9:172-182.
- Rao, S; M. Taylor, A. Jokhan, 2014. A descriptor list for giant swamp taro (*Cyrtosperma merkusii*) and its cultivars in the Federated States of Micronesia. *TELOPEA*. 16:95-117.
- Rahayu, DW; Jannah, M. 2019. *DNA Barcode Hewan dan Tumbuhan Indonesia*. Yayasan Inspirasi Ide Berdaya.
- Tallei, T., Kolondam BJ. 2015. DNA Barcoding of Sangihe Nutmeg (*Myristica fragrans*) using matK Gene. *HAYATI Journal of Biosciences* 22(1): 41-47.
- Taulu, L.P., Layuk, 2014. Dukungan teknologi untuk memperkuat daya saing pangan lokal di Sulawesi Utara. *Buku Memperkuat daya saing produk pertanian*. IAARD Press. 389-400.
- Virgilio M, Jordaens K, Breman F. 2012. Turning DNA barcodes into an alternative tool for identification African fruits, files as a model (poster). *Consortium Barcode of Life (CBOL)*.