

**Barcode DNA berdasarkan Gen *rbcL* dan *matK* Anggrek Payus
Limondok (*Phaius tancarvilleae*)
(DNA Barcode of Payus Limondok Orchid (*Phaius tancarvilleae*) Based on
the *rbcL* and *matK* genes)**

Beivy J. Kolondam^{1)*}, Edy Lengkong²⁾, J. Polii-Mandang²⁾,
Arthur Pinaria²⁾, Samuel Runtuuwu²⁾

¹⁾Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sam Ratulangi Manado

²⁾Jurusan Agroekoteknologi Fakultas Pertanian dan Program Studi Agronomi Program
Pascasarjana Universitas Sam Ratulangi Manado

^{*)}Email korespondensi: beivy_jk@yahoo.com

Diterima 1 Agustus 2012, diterima untuk dipublikasikan 25 Agustus 2012

Abstrak

*Metode identifikasi spesies telah disepakati menggunakan barcode DNA standar yaitu gen *rbcL* dan gen *matK*. Tujuan penelitian ini untuk menentukan tingkat kemiripan sekuens barcode DNA tanaman Anggrek Payus Limondok (*Phaius tancarvilleae*) dengan spesies kerabatnya yang sudah terdata dalam BOLD Systems, merekomendasi penggunaan barcode untuk mengidentifikasi atau mengkonfirmasi spesies ini, dan mengamati variasi intraspesifik. Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) digunakan untuk mengamplifikasi sekuens gen *rbcL* dan *matK* melalui primer universal. Barcode *rbcL* menunjukkan kemiripan 100% (identik) dengan dua spesies berbeda dalam famili yang sama (Orchidaceae), sehingga tidak bisa diandalkan untuk identifikasi spesies *P. tancarvilleae* secara akurat. Sekuens *matK* sampel menghasilkan kemiripan 100% dengan spesies sama yang sebelumnya telah terdata dalam BOLD Systems. Kemiripan ini mengindikasikan rendahnya variasi genetik intraspesies tetapi sekuens *matK* dapat diandalkan untuk identifikasi atau konfirmasi spesies anggrek *P. tancarvilleae*.*

*Kata Kunci: barcode, *rbcL*, *matK*, *Phaius tancarvilleae**

Abstract

*Species identification methods convention have been recommended to use standard DNA barcode for plants; the *rbcL* and *matK* genes. The aims of this research were to determine similarities in barcode DNA sequences of Payus Limondok Orchid (*Phaius tancarvilleae*) with its close relatives that listed in BOLD Systems, to recommend the use of DNA barcodes for identification or confirmation of this species, and to observe intraspecific variations. Polymerase Chain Reaction technique was employed to amplify *rbcL* and *matK* genes using universal primers. The *rbcL* barcode of Payus Limondok resulted identical hit with other two different species in the same family (Orchidaceae), therefore, unreliable for accurate *P. tancarvilleae* species identification. The *matK* sequence of this plant was 100% similar with the same plant species listed in BOLD Systems. This similarity indicated low genetic variation within the species, but the *matK* sequence was found to be reliable for *P. tancarvilleae* orchid species identification or confirmation.*

*Keywords: barcode, *rbcL*, *matK*, *Phaius tancarvilleae**

PENDAHULUAN

Metode identifikasi spesies makhluk hidup telah berkembang dari identifikasi morfologi sampai pada identifikasi molekuler berdasarkan potongan DNA pendek yang disebut "barcode DNA" (Hebert *et al.* 2003). Barcode DNA memiliki fungsi-fungsi aplikatif misalnya untuk survei ekologi (Dick dan Kress 2009), identifikasi takson-takson kriptik (Lahaye *et al.* 2008), dan konfirmasi sampel-sampel tanaman obat (Xue dan Li 2011). The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) merekomendasikan penggunaan dua gen plastida yaitu *rbcL* dan *matK* sebagai barcode standar (Hollingsworth *et al.* 2009).

Indonesia sebagai negara megabiodiversitas memiliki berbagai macam sumber daya. Pendataan terhadap keragaman jenis tumbuhan di Indonesia harus terus dilakukan untuk memenuhi kebutuhan penelitian dan tujuan praktis di masa depan serta untuk mengimbangi laju hilangnya keragaman. Salah satu tanaman yang populer di Sulawesi Utara yaitu Anggrek Payus Limondok (*Phaius tancarvilleae*). Tanaman anggrek ini telah dikenal sebagai anggrek khas Sulawesi Utara, tetapi beberapa negara, misalnya Australia dan Thailand, juga terdata memiliki spesies dengan nama yang sama. Untuk itu diperlukan perbandingan secara genetik molekuler dalam membedakan tanaman ini untuk berbagai kepentingan.

Sebagai salah satu instrumen penting dalam penelitian-penelitian yang multidisiplin, barcode DNA perlu disokong oleh ketersediaan database untuk identifikasi. Berdasarkan penelusuran singkat dalam BOLD (Barcode of Life Database) Systems yang terhubung dengan database sekuens dari beberapa negara, data sekuens DNA barcode standar (*rbcL* dan *matK*) banyak spesies belum

tersedia atau belum lengkap untuk kedua gen barcode. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan tingkat kemiripan sekuens DNA barcode tanaman anggrek Payus Limondok dengan spesies kerabatnya yang sudah terdata dalam BOLD Systems, merekomendasi penggunaan barcode DNA untuk identifikasi atau mengkonfirmasi spesies ini, dan mengamati variasi intraspesifik.

METODE

Ekstraksi DNA Total Tanaman

DNA diekstrak dari potongan kecil lembaran daun satu tanaman *P. tancarvilleae* menggunakan *Multisource Genomic DNA Miniprep Kit* (Axygen) sesuai petunjuk manual. Kit ini memanfaatkan teknik purifikasi kolom yang mampu mengekstraksi DNA total sel (DNA inti, kloroplas, dan mitokondria). Sel mengalami lisis oleh penggerusan dalam buffer lisis dan Proteinase K. Protein dipresipitasi dan hancuran-hancuran sel dipisahkan melalui sentrifugasi pada 14.000 rpm selama tiga menit. Supernatan dilewatkan melalui kolom bermembran silika. DNA total dicuci dari sisa-sisa protein dan garam kemudian dilusikan dalam tabung mikro 1,5 ml dan disimpan dalam suhu -20°C.

Polymerase Chain Reaction

Kit untuk PCR menggunakan *5X Ready-to-Load Master Mix* (Solis Biodyne). Kondisi akhir tiap reaksi 50 µL yaitu 1.25 Unit *Taq* DNA polimerase, 0,2 mM masing-masing dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM masing-masing primer dan kira-kira 0,6 µg DNA total sampel. Untuk primer digunakan primer universal yaitu *rbcLaF* (5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-3') dan *rbcLaR* (5'-GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG-3') untuk amplifikasi gen *rbcL* (Kress dan Erickson 2007)

serta untuk gen *matK* digunakan *matK*-3F (5'-CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G-3') dan *matK*-1R (5'-ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3').

Pengaturan suhu thermocycler dimulai dengan denaturasi awal pada 95°C selama 2 menit kemudian dilanjutkan 35 siklus [95°C 30 detik, X°C 30 detik, dan 72°C 1 menit]. Suhu X untuk perlekatan primer (*annealing*) yang disarankan Stoeckle *et al.* (2011) adalah 55°C untuk *rbcL* dan 52°C untuk *matK*. Pita DNA hasil PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% dan dikirim untuk sekuensing ke penyedia jasa sekuensing menggunakan primer yang sama. Sekuensing dilakukan dua kali dengan arah yang berbeda (*forward* dan *reverse*).

Analisis Data

Kromatogram DNA hasil sekuensing disunting menggunakan software Geneious v5.6 (Drummond *et al.* 2012). Bagian awal DNA dihapus kira-kira 30 bp dan pembacaan nukleotida yang keliru diperbaiki berdasarkan tingkat keakuratan terbaca. Hasil sekuensing yang menggunakan primer *reverse* dilakukan proses *reverse and complement* kemudian dipadukan dengan hasil sekuensing primer *forward* menggunakan MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) oleh Edgar (2004).

Keakuratan amplifikasi gen target diuji dengan memprediksi urutan asam amino berdasarkan masing-masing sekuens *rbcL* dan *matK*. Hal ini bertujuan untuk melihat adanya kodon stop (UAA, UAG atau UGA) di tengah sekuens gen-gen aktif tersebut sehingga diketahui pasti bahwa yang teramplifikasi bukan gen semu (*pseudogene*). Potongan gen *rbcL* dan *matK* diidentifikasi lewat BOLD (Barcode of Life Database) Systems

(www.boldsystems.org) (Ratnasingham dan Hebert 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kromatogram hasil sekuensing menampilkan hasil yang berkualitas tinggi. Nilai HQ% kromatogram yang terbaca dalam Geneious v5.6 menunjukkan nilai >91.0% untuk *rbcL* dan >97.0% untuk *matK* (data tidak ditampilkan). Sampel *P. tancarvilleae* memiliki 599 bp sekuens *rbcL* dan 889 bp sekuens *matK*. Pengujian terhadap asam amino yang dikode dari sekuens DNA kloroplas ini menunjukkan tidak adanya kodon stop di tengah-tengah sekuens (Gambar 1 dan Gambar 2). Hal ini berarti bahwa hasil amplifikasi DNA yang dilakukan bersifat valid mengingat kedua gen tersebut adalah fragmen yang termasuk dalam bingkai bacaan terbuka (*open reading frame*) enzim-enzim fotosintesis. Gen *rbcL* menggunakan frame 1 (pembacaan dimulai asam dari amino pertama) sedangkan gen *matK* menggunakan frame 3 (pembacaan dimulai dari asam amino ketiga).

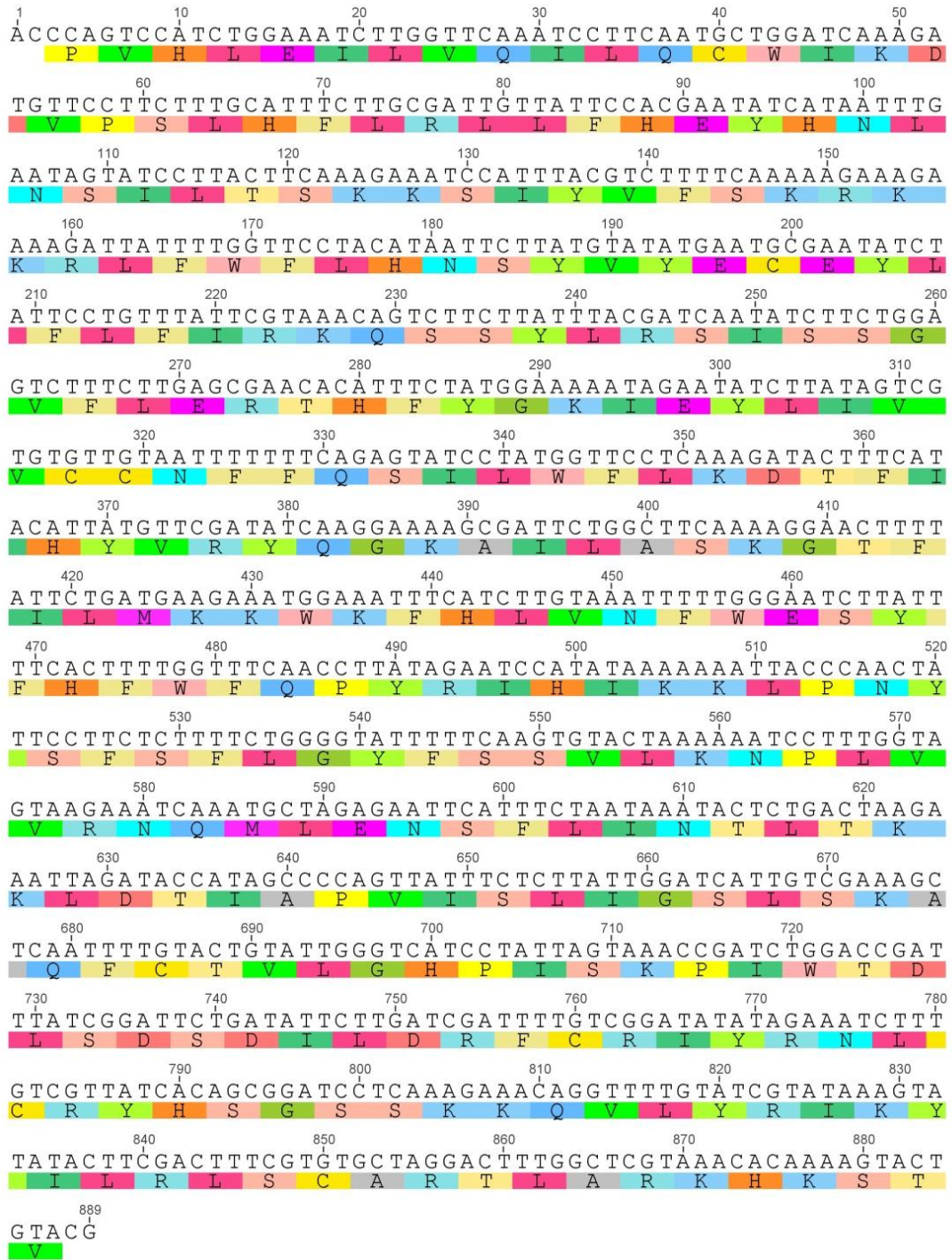
Penelusuran dalam BOLD Systems untuk sekuens *rbcL* sampel PL (Payus Limondok) menghasilkan tingkat kemiripan 100% (identik) dengan *Coelia macrostachya* dan *C. densiflora* (Gambar 3). Konfirmasi jenis anggrek dilakukan dengan mencocokkan tanaman sampel PL dengan gambar kedua tanaman yang mirip dalam Pfahl (2012a dan 2012b) dan ternyata terdapat perbedaan nyata berdasarkan morfologi bunga. Ini berarti gen *rbcL* ini terkonservasi dan *barcode rbcL* tidak mampu untuk membedakan beberapa anggota famili Orchidaceae yang berkerabat dekat. Dugaan ini semakin diperkuat dengan adanya 15 spesies lain yang semuanya memiliki tingkat kemiripan

yang tinggi dan persentase yang sama saat dibandingkan dengan sampel PL yaitu 99,82%. Pencocokan sekuens *matK* sampel PL menghasilkan tingkat kemiripan 100% (identik) dengan spesies *P. tancarvilleae* yang sudah terdata di dalam BOLD Systems (Gambar 4). Terdapat dua specimen dari spesies ini yang berbeda cakupan panjang (837 bp dan 786 bp) dan keduanya identik dengan sekuens sampel PL. Perbandingan dengan spesies lain dalam database menghasilkan

tingkat kemiripan kurang dari 98%. Spesies-spesies yang mirip juga berasal dari genus yang bervariasi tetapi masih termasuk dalam famili Orchidaceae. Ini menandakan bahwa *barcode* berdasarkan gen *matK* telah mampu membedakan spesies ini dengan baik dan bisa dimanfaatkan untuk identifikasi, meskipun hanya menggunakan *barcode* DNA tunggal.



Gambar 1. Sekuens DNA *barcode* *rbcL* dan Asam Amino



Gambar 2. Sekuens DNA barcode *matK* dan Asam Amino

Processid	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Score	Similarity	E-Value
ACCCO197-09	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Coelia	<i>macrostachya</i>	553	100	0
ACCCO18-09	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Coelia	<i>densiflora</i>	553	100	0
GBVB3296-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Glomera	<i>pulchra</i>	551	99.82	0
GBVC961-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Spathoglottis	<i>plicata</i>	551	99.82	0
GBVB3711-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Isochilus	<i>amparoanus</i>	551	99.82	0
GBVC1102-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Thunia	<i>alba</i>	551	99.82	0
GBVC1110-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Thunia	<i>alba</i>	551	99.82	0
GBVC1108-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Thunia	<i>alba</i>	551	99.82	0
GBVC932-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Sobralia	<i>macrantha</i>	551	99.82	0
GBVA4993-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Dendrobium	<i>ochreatum</i>	551	99.82	0
GBVA4872-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Dendrobium	<i>jenkinsii</i>	551	99.82	0
GBVB2734-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Dendrobium	<i>fimbriatum</i>	551	99.82	0
GBVA4751-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Dendrobium	<i>densiflorum</i>	551	99.82	0
CPRA112-09	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Dendrobium	<i>nobileLindl.</i>	551	99.82	0
ACCCO208-09	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Helleriella	<i>guerrerensis</i>	551	99.82	0
GBVA4978-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Dendrobium	<i>nobile</i>	551	99.82	0
ACCCO030-09	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Lepanthes	<i>tenuiloba</i>	551	99.82	0
GBVA4203-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Coraliorhiza	<i>bulbosa</i>	551	99.82	0
MHPAF1583-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Sobralia	<i>Jorge156</i>	550	99.82	0
MHPAF1582-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Sobralia	<i>Jorge156</i>	550	99.82	0

Gambar 3. Penelusuran BOLD Systems untuk Sekuens *rbcl* Tanaman Payus Limondok (*Phaius tancarvilleae*) Tanggal 8 Agustus 2012

Processid	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Score	Similarity	E-Value
GBVC076-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Phaius	<i>tancarvilleae</i>	837	100	0
GBVB2455-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Coelia	<i>triptera</i>	797	97.61	0
GBVB2963-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae			797	97.61	0
GBVB2405-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Calanthe	<i>vestita</i>	796	97.84	0
GBVB2381-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Bothriochilus	<i>bellus</i>	795	97.49	0
GBVB3092-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Encyclia	<i>dichroma</i>	793	97.37	0
GBVB2469-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Coelogyne	<i>cristata</i>	793	97.37	0
GBVA4130-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Coelogyne	<i>cristata</i>	793	97.37	0
GBVB3100-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Encyclia	<i>randii</i>	791	97.25	0
GBVC114-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Pholidota	<i>chinensis</i>	791	97.25	0
GBVA4154-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Collabium	<i>sp.ChaseO-821</i>	790	97.37	0
GBVB2376-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Bletia	<i>rosea</i>	789	97.13	0
GBVA3860-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Bletia	<i>purpurea</i>	789	97.13	0
GBVB2744-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Dendrobium	<i>kingianum</i>	788	97.13	0
GBVB4452-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Microepidendrum	<i>subulatifolium</i>	787	97.01	0
GBVC638-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Rhynchoalelia	<i>glauca</i>	787	97.01	0
GBVC400-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Ponera	<i>striata</i>	787	97.01	0
GBVC077-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Phaius	<i>tancarvilleae</i>	786	100	0
GBVB3063-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Elleanthus	<i>cynarocephalus</i>	785	96.89	0
GBVC832-11	Magnoliophyta	Liliopsida	Asparagales	Orchidaceae	Scaphyglottis	<i>amparoana</i>	785	96.89	0

Gambar 4. Penelusuran BOLD Systems untuk Sekuens *matK* Tanaman Payus Limondok (*Phaius tancarvilleae*) Tanggal 8 Agustus 2012

Kemampuan diskriminasi (*discrimination power*) *barcode rbcL* telah diperkirakan oleh beberapa publikasi ilmiah yang merekomendasikan *barcode* menggunakan gen ini (Hollingsworth *et al.* 2009, 2011). Meskipun tidak memiliki kemampuan diskriminasi terbaik tetapi *barcode rbcL* memiliki tingkat keberhasilan amplifikasi yang tinggi untuk banyak spesies serta mudah untuk disekuensing (Hollingsworth *et al.*, 2011). Meskipun demikian, kemampuan *barcode rbcL* dalam penelitian ini hanya mampu membedakan sampel yang ada sampai pada tingkat famili saja.

Di dalam hal variasi interspesies, *barcode matK* memiliki kemampuan pembeda yang lebih baik untuk identifikasi sampel dalam penelitian ini. Kecepatan mutasi pada gen *matK* memegang peranan penting dalam variasi intraspesifik. Meskipun perbedaan secara genetik sesama anggota famili Orchidaceae yang berkerabat dekat dengan *P. tancarvilleae* hanya kurang dari 2%, perbedaan ini cukup untuk identifikasi sampai pada tingkat spesies. Miripnya sekuens spesies *P. tancarvilleae* menunjukkan juga variasi intraspesifik yang sedikit. Rekomendasi yang bisa diberikan untuk identifikasi atau konfirmasi spesies ini adalah dengan melihat sekuens *barcode matK*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa dengan terdapatnya kemiripan 100% sekuens anggrek *P. tancarvilleae* dengan dua spesies kerabat dekatnya maka *barcode DNA rbcL* tidak dapat digunakan untuk identifikasi tingkat spesies. Kemampuan diskriminasi *barcode matK* untuk tanaman *P. tancarvilleae* lebih baik daripada *barcode rbcL* sehingga dapat digunakan untuk

identifikasi spesies secara akurat. Tidak terdapat variasi intraspesifik berdasarkan sekuens *barcode matK* antara *P. tancarvilleae* sampel penelitian dengan yang sampel yang sudah terdata di dalam BOLD Systems.

DAFTAR PUSTAKA

- Dick CW, Kress WJ (2009) Dissecting tropical plant diversity with forest plots and a molecular toolkit. *Bioscience* 59: 745-755
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A (2012) Geneious v5.6. Biomatters. New Zealand
- Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Res.* 32 (5): 1792-1797
- Hebert, P.D.N., Cywinska, N.A., Ball, S.L. dan de Waard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 270: 313-321
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP (2011) Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* (6): e19254
- 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
- Kress WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2 (6): e508
- Lahaye R, Van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot

- G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 105(8): 2923-2928
- Pfahl J (2012a) *Coelia macrostachys*.
<http://www.orchidspecies.com/coeliacmacrostachys.htm>
[diakses pada 10 Agustus 2012]
- Pfahl J (2012b) *Coelia densiflora*.
<http://www.orchidspecies.com/coeldensiflora.htm>
[diakses pada 10 Agustus 2012]
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BOLD: The barcode of life data system. *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364
- Stoeckle MY, Gamble CC, Kirpekar R, Young G, Ahmed S, Little DP (2011) Commercial teas highlight plant DNA barcode identification successes and obstacles. *Sci. Rep.* 1(42): 1-7
- Xue CY, Li DZ (2011) Use of dna barcode *sensu lato* to identify traditional Tibetan medicinal plant *Gentianopsis paludosa* (Gentianaceae). *J. Sys. Evol.*, 49 (3): 267-270