

**Variasi Gen *matK* dan Filogenetik Tumbuhan Kantong Semar (*Nepenthes* sp.) dari Gunung Mahawu dan Gunung Sopotan di Sulawesi Utara
(The Variation of *matK* Gene and the Phylogeny of *Nepenthes* sp. Obtained from Mount Mahawu and Mount Sopotan in North Sulawesi)**

Jennifer S. Tambuwun¹⁾, Beivy J. Kolondam¹⁾, Trina E. Tallei^{1)*}

¹⁾Program Studi Biologi, Jurusan Biologi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

*Email korespondensi: trina_tallei@unsrat.ac.id

Diterima 7 Januari 2017, diterima untuk dipublikasikan 7 Februari 2017

Abstrak

Kantong semar (*Nepenthes* sp.) merupakan salah satu tumbuhan langka yang dilindungi. Eksploitasi yang berlebihan, serta alih fungsi hutan menjadi ancaman bagi kehidupan *Nepenthes* sp. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan variasi gen *matK* dari tumbuhan *Nepenthes* sp. di Gunung Mahawu (JTM) dan Gunung Sopotan (JTS) di Sulawesi Utara dan membandingkannya dengan kerabat terdekat di GenBank, serta membuat pohon filogenetiknya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya terdapat satu perbedaan nukleotida sekuens gen *matK* antara *Nepenthes* sp. dari Gunung Mahawu dan Gunung Sopotan. Selain itu, variasi juga ditunjukkan pada *Nepenthes* sp. yang diperoleh dari basis data GenBank dengan adanya perbedaan 1-7 basa nukleotida dengan sampel penelitian ini. Hasil analisis menggunakan ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) menunjukkan bahwa variasi intraspesies untuk *Nepenthes* sp. berada dalam rentang 0,000 – 0,004. Apabila mempertimbangkan barcode gap tersebut sebagai pembatas spesies, maka diasumsikan bahwa JTM, JTS, *N. fusca*, *N. pilosa*, *N. maxima*, *N. faizaliana*, dan *N. clipeata* merupakan spesies yang sama. Hal ini ditunjang oleh rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan gen *matK*.
Kata Kunci: ABGD, barcode gap, gen *matK*, *Nepenthes* sp., pohon filogenetik, variasi sekuens.

Abstract

Tropical pitcher plant (*Nepenthes* sp.) is listed as one of the endangered and protected plants. Excessive exploitation and forest conversion threaten the life of this *Nepenthes* sp. This research was aimed to determine variation in *matK* gene of *Nepenthes* sp. obtained from Mount Mahawu (JTM) and Mount Sopotan (JTS) North Sulawesi, and compare the *matK* sequences with their allied taxa in public domain data base. Analysis of *matK* gene showed that there was only one nucleotide difference of *matK* gene sequence between Mahawu and Sopotan samples. There were 1-7 different nucleotides between those samples and their allied taxa. Analysis of barcode gap using ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) showed that the range of intraspecies variation of *Nepenthes* sp. was 0,000 – 0,004. Considering this barcode gap generated from ABGD as species delimitation, it could be assumed that JTM, JTS, *N. fusca*, *N. pilosa*, *N. maxima*, *N. faizaliana*, dan *N. clipeata* were the same species. These results were also supported by the reconstruction of phylogenetic tree using *matK* gene.
Keywords: ABGD, barcode gap, *matK* gene, *Nepenthes* sp., phylogenetic tree, sequence variation.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki tingkat keanekaragaman plasma nutfah yang tinggi. Salah satu plasma nutfah yang banyak terdapat di Indonesia yaitu kantong semar (*Nepenthes* sp.) (Mansur 2008). *Nepenthes* sp. merupakan tumbuhan yang unik karena pada ujung daunnya terbentuk sebuah kantong yang disebut *pitcher*. Kantong tersebut digunakan *Nepenthes* sp. untuk menjebak serangga sehingga tumbuhan *Nepenthes* sp. dapat menyerap nutrisi dari serangga yang terjebak dalam kantongnya (Scholz *et al.* 2010, Mithofer 2011).

Populasi *Nepenthes* sp. semakin berkurang di alam disebabkan oleh alih fungsi lahan menjadi kawasan pemukiman, perkebunan, perladangan, pertanian, dan faktor kebakaran hutan serta eksploitasi tumbuhan ini untuk kepentingan ekonomi (Shingh *et al.* 2011, Robinson *et al.* 2009). Populasi *Nepenthes* sp. yang semakin berkurang membuat pemerintah menetapkan *Nepenthes* sp. sebagai salah satu tumbuhan yang harus dilindungi berdasarkan UU No. 5 Tahun 1990, Peraturan Pemerintah No. 7 Tahun 1999 dan masuk dalam kategori *Red List* IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) sebagai tumbuhan yang rentan kepunahan (Samsurianto 2010).

Penelitian mengenai variasi genetik *Nepenthes* sp. di beberapa daerah di Sulawesi Utara perlu dilakukan untuk tujuan konservasi. Variasi genetik tersebut diperoleh dari sekuens DNA *barcode*. DNA *barcoding* merupakan salah satu metode yang telah banyak berkembang untuk mempelajari, mengidentifikasi serta menganalisis keragaman genetik antar spesies secara molekuler (Kress dan Erickson 2008). Dalam menggunakan teknologi DNA *barcoding* terdapat dua gen standar

yang telah di setuju dan direkomendasikan oleh *Konsorsium Barcode of Life* (CBOL). Kedua gen tersebut yaitu *rbcL* (*ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygenase*) dan *matK* (*maturase K*) (Kress *et al.* 2010).

Sampel *Nepenthes* sp. diperoleh dari Gunung Mahawu dan Gunung Soputan. Kedua lokasi ini dipilih karena masih kurangnya konservasi spesies tumbuhan ini pada lokasi tersebut (Butarbutar *et al.* 2014) Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi genetik tumbuhan *Nepenthes* sp. dari Gunung Mahawu dan Gunung Soputan dan membandingkannya dengan kerabat terdekat di GenBank serta membuat pohon filogenetik *Nepenthes* sp.

METODE

Ekstraksi DNA tumbuhan *Nepenthes* sp.

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *Axyprep Multisource Genomic DNA miniprep kit* (Axygen). Modifikasi dilakukan untuk memaksimalkan lisis dengan waktu inkubasi 1 jam dalam suhu 60°C (Kolondam *et al.*, 2013). Bagian sampel yang digunakan dalam ekstraksi yaitu potongan kecil daun muda tumbuhan *Nepenthes* sp. yang diperoleh dari Gunung Mahawu (JTM) dan Gunung Soputan (JTS).

Amplifikasi Gen *matK* dengan Teknik PCR

Proses amplifikasi dilakukan dengan membuat *Master Mix* PCR dalam 40 µL reaksi PCR. Komponen yang di campur untuk satu kali reaksi yaitu 20 µL 2X *KapaTaq*, 1,5µL *primer forward*, 1,5µL *primer reverse*, 15µL ddH₂O dan 2 µL templat DNA. Pasangan primer yang digunakan untuk amplifikasi *sekuensing* gen *matK* yaitu *matK-3F-R* (5'-CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G-3') dan *matK-1R-F* (5'ACC CAG TCC

ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3') (Kuzmina *et al.*, 2012). Pengaturan suhu untuk proses PCR dimulai dengan kondisi denaturasi awal pada suhu 95°C selama 2 menit yang kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada cetakan suhu 50°C selama 30 detik, dan polimerisasi pada 72°C selama 50 detik (Tallei *et al.* 2016). DNA hasil PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% dan sisanya dikirim untuk sekuensing ke First Base Malaysia. sekuensing bersama primer. Proses sekuensing dilakukan sebanyak dua kali dengan arah yang berbeda (*forward* dan *reverse*) sesuai primer yang ada.

Analisis Data

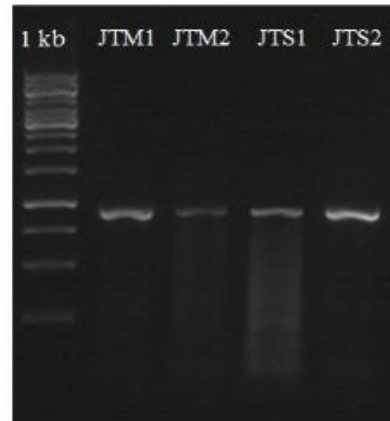
Data hasil sekuensing disunting menggunakan *Genious* v5.6 mengikuti prosedur Tallei dan Kolondam (2015). *Global Alignment* yang terintegrasi dalam *Geneious* digunakan dalam proses *pairwise alignment* untuk memadukan hasil sekuensing yang menggunakan *primer reverse (matK-1R-f)* dengan *primer forward (matK-3F-r)*. Sekuens *matK* digunakan untuk mencari sekuens serupa di basis data publik (GenBank). Semua sekuens *matK* dijajarkan menggunakan *Multalin* V.5.4.1

(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Penjajaran akhir dan matriks persentase identitas (*percent identity matrix*) dibuat menggunakan *Clustal Omega*

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Metode UPGMA digunakan untuk membuat pohon filogenetik dan untuk perhitungan jarak genetik menggunakan metode *Kimura's 2-parameter* yang terintegrasi di dalam piranti lunak MEGA7 (Tamura *et al.* 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi berhasil dilakukan untuk keempat sampel tumbuhan *Nepenthes* sp. dari Gunung Mahawu (JTM1 dan JTM2) dan dari Gunung Soputan (JTS1 dan JTS2). Pita hasil amplifikasi DNA terlihat jelas untuk keempat sampel seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi DNA gen *matK* dari sampel tumbuhan *Nepenthes* sp. dari Gunung Mahawu (JTM) dan Gunung Soputan (JTS)

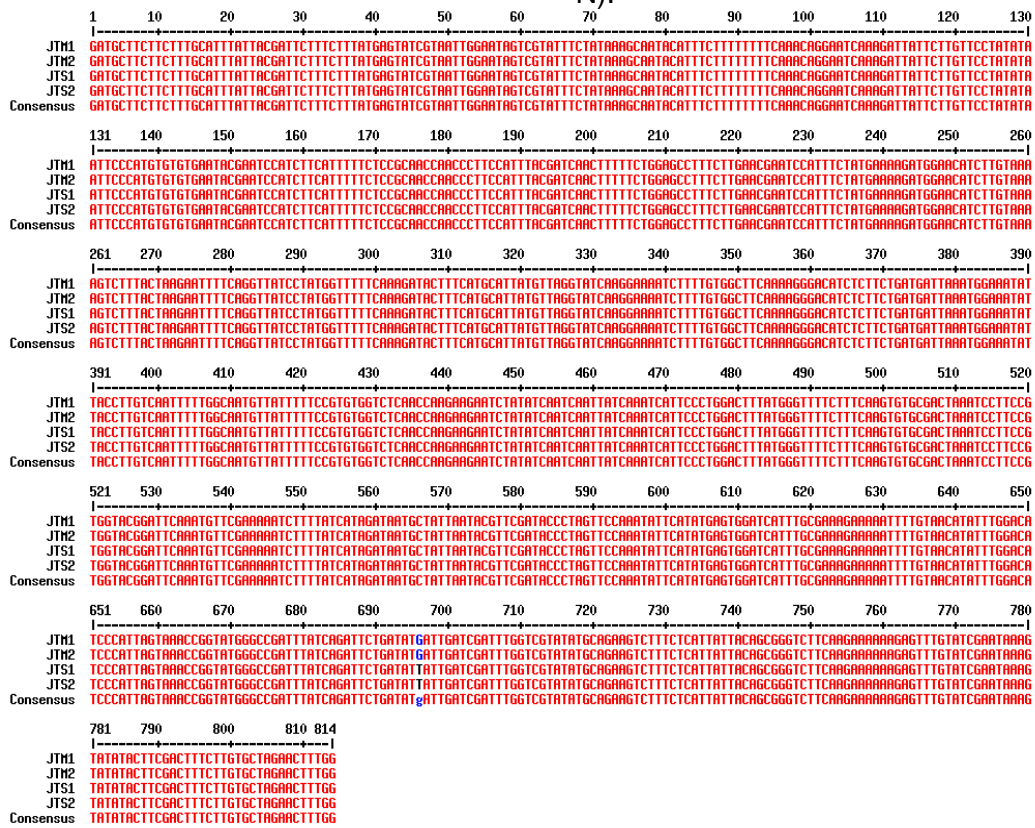
Hasil penjajaran menunjukkan kemiripan 100% antara sampel dari Gunung Mahawu (JTM1 dan JTM2) dan juga dari Gunung Soputan (JTS1 dan JTS2), akan tetapi terdapat perbedaan satu basa nukleotida antara sampel dari Gunung Mahawu dan Gunung Soputan. Pada basa nukleotida ke 697, sampel *Nepenthes* sp. dari Gunung Mahawu memiliki basa G (Guanin) sedangkan sampel dari Gunung Soputan memiliki basa T (Timin) seperti yang terlihat pada Gambar 2. Perbedaan tersebut terjadi karena adanya transversi basa antara G ↔ T. Transversi jarang ditemukan dan frekuensinya lebih rendah dibandingkan transisi. Transisi cenderung menghasilkan lebih sedikit substitusi asam amino sehingga cenderung lebih stabil didalam populasi dan dianggap

sebagai fenomena polimorfisme nukleotida tunggal (*Single nucleotide polymorphism*) (Tallei *et al* 2016).

Hasil penelitian menunjukkan kemiripan 99% untuk *Nepenthes* sp. dari Gunung Mahawu (JTM) dan 100% untuk *Nepenthes* sp. dari Gunung Sopotan (JTS) dengan spesies *N. fusca* AF315936 dan *N. pilosa* AF315919, sedangkan spesies *N. faizaliana* hanya berbeda satu nukleotida dengan keempat sampel (JTM1, JTM2, JTS1, dan JTS2) pada posisi 677. *N. clipeata* memiliki dua nukleotida yang berbeda dengan keempat sampel yaitu pada posisi 198 dan 744, Spesies kerabat terjauh dengan keempat sampel adalah *N. danseri* di mana perbedaan yaitu 7 nukleotida pada posisi 185, 416, 602, 607, 608, 663, 702, serta spesies *N. sibuyanensis* dan *N. bellii* masing-masing berbeda 6 nukleotida pada

posisi 185, 416, 602, 607, 608, 702 (Gambar 3).

Pohon filogenetik dibuat dengan menggunakan model UPGMA yang mengasumsikan bahwa laju evolusi adalah konstan di sepanjang sejarah evolusi dari taksa yang diuji dan menggunakan jarak genetik *Kimura 2-parameter* (Kimura, 1980). Gambar 4, menunjukkan posisi JTM dan JTS di dalam pohon filogenetik. Sampel JTS terletak di dalam satu kluster dengan *N. pilosa*, *N. fusca* dan *N. maxima*. Meski tingkat kemiripan sampel JTS dengan *N. maxima* 99,75 %, mereka berada dalam satu kluster dengan *N. fusca* dan *N. pilosa* yang tingkat kemiripannya 100% dengan JTS. Perbedaan nukleotida antara JTS dengan *N. maxima* hanya disebabkan oleh adanya ketidakterbacaan nukleotida pada posisi 719 dan 741 (ditandai dengan N).

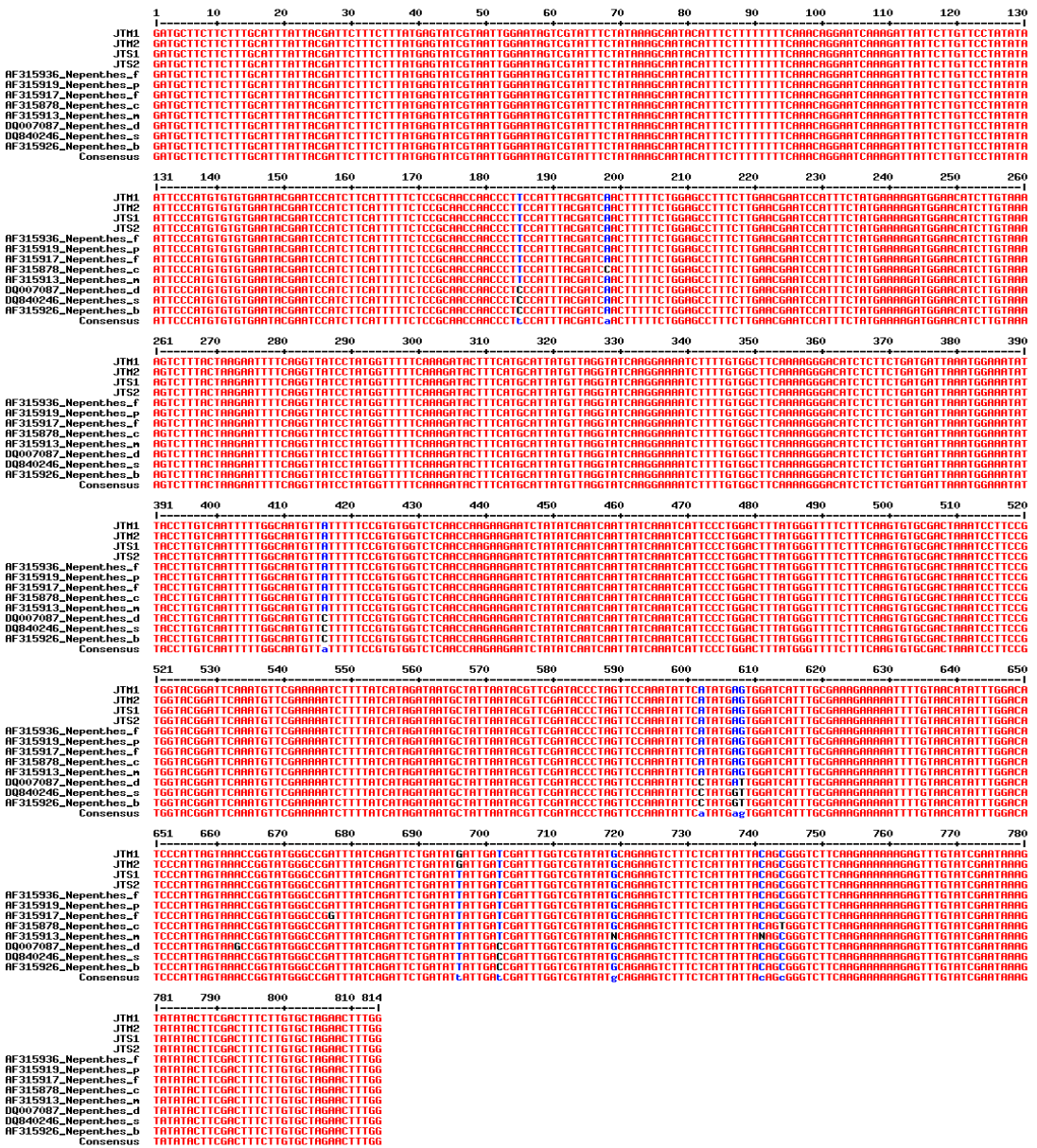


Gambar 2. Penajaran urutan sekuens JTM1, JTM2, JTS1 dan JTS2 menggunakan software Multalin

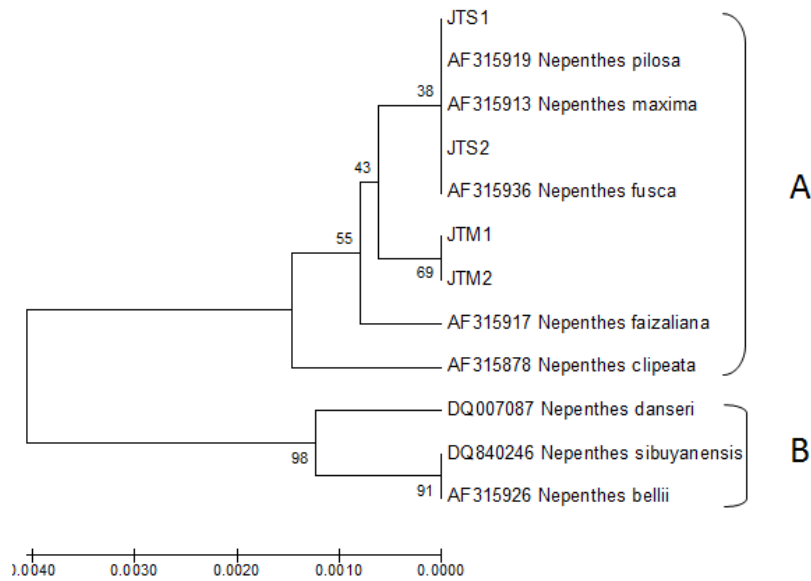
Dengan demikian diduga *N. maxima* memiliki tingkat kemiripan 100% dengan JTM, JTS, *N. pilosa*, dan *N. fusca*.

Metode *Kimura-2-parameter* digunakan dalam menentukan jarak genetik dalam penelitian ini karena dapat menunjukkan substitusi basa per situs antar sekuen sampel

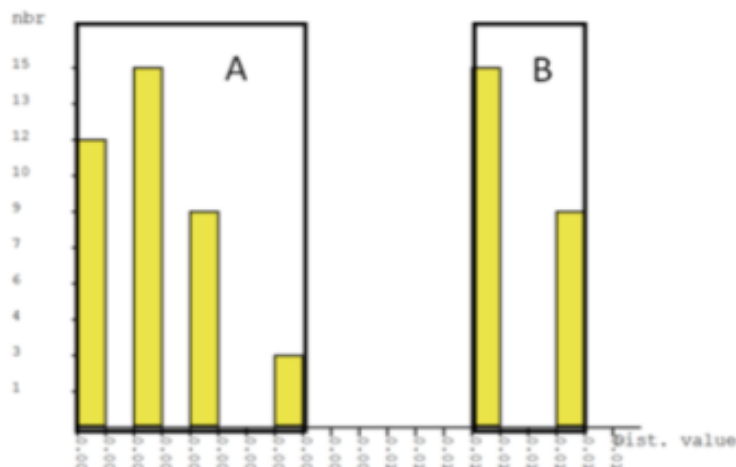
Nepenthes sp. Jarak genetik di antara klaster JTS yaitu 0,000, sedangkan jarak antara klaster JTS dengan JTM yaitu 0,001. Hasil tersebut menandakan bahwa kemungkinan besar kedua tumbuhan tersebut merupakan spesies yang sama atau merupakan subspecies.



Gambar 3. Penjajaran sekuen gen *matK* *Nepenthes* sp. dari Gunung Mahawu dan Sopotan dengan kerabat terdekat dari jenis *Nepenthes* di GenBank dan BOLD Systems



Gambar 4. Pohon filogenetik diperoleh menggunakan metode UPGMA (Sneath dan Sokal, 1973). Jarak evolusi dihitung menggunakan metode Kimura 2-parameter (Kimura 1980). Analisis evolusi dilakukan dalam MEGA7 (Kumar *et al.* 2016)



Gambar 5. Analisis menggunakan ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) untuk membatasi spesies-spesies *Nepenthes* sp. yang digunakan dalam penelitian ini

Menurut Tallei *et al.* (2016), hubungan kekerabatan akan semakin dekat jika memiliki nilai jarak genetik yang kecil. Nilai jarak genetik interspesies di antara genus *Nepenthes* sp. berkisar antara 0,000-0,010. Jarak genetik tersebut cukup besar bila dibandingkan dengan hasil jarak genetik *matK* kelompok

tumbuhan *Astragalus* (Fabaceae), di mana rata-rata minimal jarak genetik interspesies (*interspecific distance*) untuk setiap spesies yaitu $0,0071 \pm 0,0064$, sedangkan jarak intraspesies (*intraspecific distance*) yaitu $0,0014 \pm 0,0022$ (Zheng *et al.*, 2014). rata-rata jarak genetik interspesies $0,042 \pm 0,0030$ dan intraspesies $0,005$

untuk tumbuhan famili Myristicaceae (Newmaster *et al.* 2008), serta jarak genetik rata-rata interspesies 0.0093 ± 0.0081 dan intraspesies $0,0016 \pm 0,0016$ untuk tumbuhan Rosaceae (Pang *et al.* 2010). Apabila merujuk kepada penelitian-penelitian tersebut dan berasumsi bahwa ambang batas jarak intraspesies berkisar antara 0 sampai 0,0026, maka tumbuhan JTM, JTS, *N. fusca*, *N. pilosa*, *N. maxima*, dan *N. faizaliana* merupakan spesies yang berkerabat dekat. Hal ini ditunjang dengan pohon filogenetik yang menempatkan tumbuhan-tumbuhan tersebut dalam posisi yang berdekatan.

Untuk delimitasi spesies digunakan ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) yang merupakan perhitungan komputer yang secara efisien digunakan untuk membedakan intraspesies sehingga dapat digunakan untuk membatasi spesies dalam kelompok organisme uji (Puillandre *et al.* 2011). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Nepenthes* sp. terbagi menjadi 2 kelompok besar (A dan B) seperti yang terlihat pada Gambar 4 dan 5. Kelompok A terdiri atas 4 kelompok yaitu kelompok I merupakan *JTS1*, *JTS2*, *Nepenthes fusca* AF315936, *Nepenthes pilosa* AF315919. Kelompok II terdiri atas *JTM1* dan *JTM2*. Kelompok III terdiri atas *Nepenthes faizaliana* AF315917. Kelompok IV terdiri atas *Nepenthes clipeata* AF315878S. Kelompok B terdiri atas 2 kelompok, yaitu Kelompok I merupakan *Nepenthes danseri* DQ007087. Kelompok II terdiri atas *Nepenthes sibuyanensis* DQ840246 dan *Nepenthes bellii* AF315926. Apabila dilihat dari Gambar 5, terdapat *barcode gap* di antara Kelompok I dengan Kelompok II. Apabila mempertimbangkan *barcode gap* tersebut sebagai pembatas spesies, maka diasumsikan bahwa JTM, JTS, *N. fusca*, *N. pilosa*, *N. maxima*, *N.*

faizaliana, dan *N. clipeata* merupakan spesies yang sama. sehingga variasi intraspesies untuk *Nepenthes* berada dalam rentang 0,000 – 0,004.

KESIMPULAN

Perbandingan sekuens gen *matK* menunjukkan adanya variasi sekuens dengan perbedaan satu basa nukleotida antara sampel *Nepenthes* sp. dari Gunung Mahawu (JTM1 dan JTM2) dan Gunung Soputan (JTS1 dan JTS2). Perbandingan sekuens sampel *Nepenthes* sp. dari Gunung Mahawu dan Gunung Soputan dengan kerabat terdekatnya di GenBank dan Bold system menunjukkan perbedaan 1-7 basa nukleotida. Nilai jarak genetik interspesies *Nepenthes* sp. yaitu berkisar antara 0.000 sampai 0.010. Hasil analisis menggunakan ABGD mengasumsikan bahwa JTM, JTS, *N. fusca*, *N. pilosa*, *N. maxima*, *N. faizaliana*, dan *N. clipeata* merupakan spesies yang sama, karena variasi intraspesies untuk *Nepenthes* berada dalam rentang 0,000 – 0,004.

DAFTAR PUSTAKA

- Butarbutar RR, Purnomo M, Hakim L, Sastrahidayati IR, Soemarno (2014) Strategic development of nature tourism based on plant species at the Mahawu mountainous region, North Sulawesi, Indonesia. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 5 (5):241-252
- Kimura M (1980) A Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution* 16:111-120
- Kolondam BJ, Lengkong E, Polii-Mandang J, Pinaria A, Runtuuwu S (2013) Barcode DNA *Anthurium* gelombang cinta (*Anthurium plowmanii*)

- berdasarkan gen *rbcL* dan *matK*.
 Jurnal Bios Logos 3 (1):17-25
- Kress WJ, Erickson DL (2008) DNA barcodes: Genes, genomics and bioinformatics. Departement of Botany. Proceedings of The National Academy of Sciences USA 105:2761-2762
- Kress WJ, Erickson DL, Swenson NG, Thompson J, Uriarte M, Zimmer JK (2010) Advances in the use of DNA barcodes to build a community phylogeny for tropical trees in a Puerto Rican forest dynamics plot. Plos One 5 (11):e15409
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33:1870-1874
- Mansur M (2008) Penelitian ekologi *Nepenthes* di laboratorium alam hutan gambut Sabangau kereng bangkirai Kalimantan Tengah. Jurnal Teknologi Lingkungan 9: 67-73
- Mithofer A (2011) Carnivorous pitcher plants: Insights in an old topic. Phytochem 72 (13): 1678–1682
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves AD, Janovec J (2008) Testing candidate plant barcodes regions in the Myristicaceae. Molecular Ecology Resources 8(3): 480-490
- Pang X, Song J, Zhu Y, Xu H, Huang L, Chen S (2010) Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. Cladistics 27(2):165-170
- Pavlovic A, Slováková L, Šantrùček J (2011) Nutritional benefit from leaf litter utilization in the pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. Plant Cell Environment 34:1865–1873
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2011) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species. Molecular Ecology 21 (8):1864-1877
- Samsurianto (2010) Induksi tunas mikro kantong semar (*Nepenthes* sp.) *in vitro*. Bioprospek 7 (2):67-76
- Scholz I, Buckins M, Dolge L (2010) Slippery surfaces of pitcher plants: *Nepenthes* crystals minimize insect attachment via microscopic surface. Journal of Experimental Biology 213:1115-1125
- Shingh B, Phukan S, Singh VN, Borthakur SK (2011) Conservation strategies for *Nepenthes khasiana* in Nokrek biosphere reserve of Garo hills, Northeast, India. International Journal of Conversation Science 2(1):55-64
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6, Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30:2725-2729
- Tallei TE, Kolondam BJ (2015) DNA barcoding of Sangihe Nutmeg (*Myristica fragrans*) using *matK* gene. HAYATI Journal of Biosciences 22(1):41-47
- Tallei TE, Rembet RE, Pelealu JJ, Kolondam BJ (2016) Sequence variation and phylogenetic analysis of *Sansevieria trifasciata* (Asparagaceae). Bioscience Research 13(1):01-07
- Zhang X, Xuan G, Guo Z, Li L, Song X, Liu S, Zang Y, Li Y, Lin C, Wei S (2014) Genetic diversity and population structure of *Rheum tanguticum* (Dahuang) in China. Chinese Medicine 9:26