

**Identifikasi Tumbuhan Paku Air (*Azolla* sp.) Secara Morfologi dan Molekuler dengan Menggunakan Gen *rbcL***  
**(Identification of Water Ferns (*Azolla* sp.) Based on Morphological Traits and Molecular Marker Using *rbcL* Gene)**

Wianita Mantang<sup>1\*)</sup>, Feky R. Mantiri<sup>1)</sup>, Beivy J. Kolondam<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Biologi, Jurusan Biologi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

\*Email korespondensi: Wianitamantang@gmail.com

Diterima 30 Juli 2018, diterima untuk dipublikasi 30 Agustus 2018

**Abstrak**

*Azolla* merupakan salah satu tumbuhan paku air yang memiliki banyak manfaat, namun belum banyak dikenal dan sering dianggap sebagai tumbuhan gulma. Pengidentifikasian akan keberadaan jenis-jenis tumbuhan paku air (*Azolla* sp.) penting untuk dilakukan guna mendukung upaya pengembangan, pembudidayaan dan eksplorasi tumbuhan *Azolla* sp. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesies tumbuhan paku air (*Azolla* sp.) secara morfologi dan molekuler dengan menggunakan gen *rbcL*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan karakter morfologi sampel tumbuhan *Azolla* sp. asal Tondano Sulawesi Utara menunjukkan kemiripan dengan spesies *A. pinnata* dan *Azolla* asal Magelang Jawa Tengah menunjukkan kemiripan dengan spesies *A. microphylla*. Identifikasi menggunakan sekuens gen *rbcL* menunjukkan bahwa sekuens sampel tumbuhan *Azolla* asal Tondano (WM1) memiliki tingkat kemiripan 100% dengan *A. pinnata* dan *Azolla* asal Magelang (WM2) memiliki tingkat kemiripan 100% dengan *A. microphylla* yang terdapat dalam GenBank. Analisis jarak genetik menunjukkan kedua sampel WM1 dan WM2 memiliki hubungan kekerabatan yang cukup dekat dengan nilai jarak genetik 0,060. Kata kunci: *Azolla* sp., identifikasi morfologi, identifikasi molekuler, gen *rbcL*

**Abstract**

*Azolla* is one of the water ferns that has many benefits, but it is not yet widely known and is often regarded as a weed plant. Identification of water ferns (*Azolla* sp.) is important to be carried out to support the development, cultivation, and exploration of *Azolla* sp. This study aimed to identify species of aquatic plants (*Azolla* sp.) morphologically and molecularly using the gene *rbcL*. The results demonstrated that based on the morphological characters, the *Azolla* sp. from Tondano, North Sulawesi, showed similarity with species *A. pinnata* and *Azolla* from Magelang, Central Java, showed similarity to species *A. microphylla*. Identification using *rbcL* gene sequences showed that the sample sequence of plants *Azolla* from Tondano (WM1) had a 100% similarity level with *A. pinnata* and *Azolla* from Magelang (WM2) had a 100% similarity level with *A. microphylla* available in GenBank. Genetic distance analysis showed that both WM1 and WM2 samples had a close relationship with the genetic distance value of 0.060. Key words: *Azolla* sp., morphological identification, molecular identification, *rbcL* gene

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara tropis yang memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi, baik hewan maupun tumbuhan. Salah satu keanekaragaman hayati tumbuhan yang banyak di Indonesia adalah tumbuhan paku (*Pteridophyta*) (Sandy *et al.*, 2016). *Azolla* sp. adalah salah satu jenis tumbuhan paku berukuran kecil yang hidup di perairan. Tumbuhan ini secara tidak langsung mampu mengikat nitrogen bebas yang ada di udara, karena adanya simbiosis antara tumbuhan *Azolla* sp. dengan *Anabaena azollae* (Arifin, 1996). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa *Azolla* sp. merupakan tumbuhan gulma eksotik yang memiliki peranan penting dalam konservasi dan dapat membantu dalam pengelolaan tanah di lahan basah (Sadeghi *et al.*, 2013).

Tumbuhan *Azolla* sp. dapat ditemukan pada semua persawahan di Indonesia (Hidayat *et al.*, 2011). Tumbuhan ini banyak tumbuh secara liar dan berkembang tanpa dibudidayakan. Kurangnya informasi mengenai pengenalan serta manfaat tumbuhan ini, sehingga pada beberapa daerah masih banyak petani yang menganggap tumbuhan *Azolla* sp. sebagai tumbuhan gulma (pengganggu) (Sudjana, 2014). Pengidentifikasi jenis-jenis tumbuhan paku air (*Azolla* sp.) penting untuk dilakukan guna mendukung upaya pengembangan, pembudidayaan, dan eksplorasi tumbuhan *Azolla* sp.

Identifikasi merupakan suatu kegiatan karakterisasi semua sifat yang dimiliki oleh keragaman genetik spesies sebagai pangkalan data (*data base*) sebelum memulai rencana pemuliaan (Ferita *et al.*, 2015). Identifikasi organisme dapat dilakukan dengan karakterisasi secara morfologi dan secara molekuler. Identifikasi berdasarkan karakteristik morfologi bertujuan

untuk mengetahui berbagai jenis dan keragaman varietas dilihat dari bentuk luar tubuh organisme (Syah, 2016). Penggunaan karakter morfologi dalam identifikasi mudah dilakukan dan cepat, namun mudah berubah karena dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti faktor lingkungan dan perbedaan umur tumbuhan (Khanuja *et al.*, 2005).

Identifikasi spesies secara molekuler merupakan salah satu cara baru untuk mengkonfirmasi identifikasi dan pengklasifikasian yang sudah ada (Darus, 2016). Identifikasi secara molekuler dapat dilakukan melalui teknik DNA *barcoding* (Herbert *et al.*, 2003). Dalam proses DNA *barcoding*, *the Consortium for the Barcoding of Life* (CBOL) merekombinasikan penggunaan dua gen standar yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi tumbuhan yaitu *rbcL* (*ribulose-1,5- biphosphate carboxylase oxygenase*) dan *matK* (*maturase K*) (Kress *et al.*, 2010). Dalam beberapa penelitian tumbuhan paku air (*Azolla* sp.) lebih banyak menggunakan gen *rbcL* dibandingkan gen *matK*, karena pada tumbuhan paku sekuen *rbcL* telah diaplikasikan hingga tingkat marga dan jenis (Wolf, 1995). Di lain sisi, walaupun gen *matK* memberikan resolusi yang lebih tinggi dibandingkan dengan gen *rbcL*, pada tumbuhan paku, data *matK* sulit untuk diperoleh (Lestari, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi tumbuhan paku air (*Azolla* sp.) berdasarkan karakter morfologi dan profil molekuler dengan menggunakan gen *rbcL*. Sampel tumbuhan *Azolla* sp. diperoleh dari Tondano Sulawesi Utara dan Magelang Jawa Tengah. Lokasi dipilih karena berdasarkan hasil survei dari beberapa lokasi di Sulawesi Utara, tumbuhan *Azolla* sp. hanya ditemukan di Tondano Sulawesi Utara. Oleh karena itu,

untuk membandingkan dengan tumbuhan *Azolla* sp. dari tempat lain, satu sampel dipesan dari Magelang Jawa Tengah. Lokasi dipilih karena berdasarkan pencarian lewat literatur, diketahui bahwa pada beberapa daerah di Jawa salah satunya di Magelang Jawa Tengah, tumbuhan *Azolla* sp. ini sudah dibudidayakan dan tersedia dalam pemesanan secara online.

## METODE

### Identifikasi Karakter Morfologi

Identifikasi karakter morfologi dilakukan dengan mengamati dan mengukur tumbuhan *Azolla* sp. secara langsung. Bagian-bagian yang diamati adalah daun, batang, dan akar. Data hasil pengamatan dianalisa secara deskriptif dan disesuaikan dengan morfologi tumbuhan paku air (*Azolla* sp) yang terdapat dalam artikel ilmiah seperti *Federal Noxious Weed Disseminules of the U.S* pada situs <http://keys.lucidcentral.org>, *Dave's Garden* pada situs <https://davesgarden.com>, *Ferns of Texas* pada situs <http://ferns.brit.org>, dan *iNaturalist* pada situs <https://www.inaturalist.org>.

### Ekstraksi DNA Tumbuhan *Azolla*

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)*. DNA genomic diekstrak dari tumbuhan *Azolla* sp. yang diperoleh dari Tondano Sulawesi Utara dan Magelang Jawa Tengah.

### Amplifikasi Gen *rbcl*

Pasangan primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *rbcl* yaitu *rbcl*-1F-R (5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC-3') dan *rbcl*-724R-F (5'-TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC-3') (Oshingboye *et al.*, 2017). Proses amplifikasi dilakukan dengan membuat *Master Mix* PCR dalam 40 µL reaksi PCR. Komponen yang dicampur untuk satu kali reaksi

yaitu 20 µL 2X *My Taq HS Red Mix (Bioline)*, 1,5µL *primer forward*, 1,5µL *primer reverse*, 15µL ddH<sub>2</sub>O dan 2 µL templat DNA. Pengaturan suhu untuk proses PCR dimulai dengan pengaturan suhu denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit yang dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 50°C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 50 detik, dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 1 menit (Kolondam, 2015). DNA hasil PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8% dan sisanya dikirim untuk sekuensing ke First Base Malaysia. Proses sekuensing dilakukan sebanyak dua kali dengan arah yang berbeda (*forward* dan *reverse*) sesuai primer yang tersedia.

### Analisis Data

Data hasil sekuensing disunting menggunakan software *Genious V.5.6*. Sekuens DNA dianalisis menggunakan software *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* pada situs (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk mencari sekuens yang serupa yang tersedia di GenBank. Setelah itu, untuk mengukur jarak genetik digunakan metode *Kimura's 2-parameter* pada MEGA6.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Identifikasi Karakter Morfologi

Hasil identifikasi karakter morfologi dari kunci identifikasi, menunjukkan bahwa *Azolla* sp. yang ditemukan di Tondano Sulawesi Utara (Gambar 1A) memiliki karakter morfologi yang sama dengan *A. pinnata*, sedangkan *Azolla* sp. yang dipesan dari Magelang Jawa Tengah (Gambar 2B) memiliki karakter morfologi yang sama dengan *A. microphylla*. Data hasil pengamatan karakter morfologi pada tumbuhan

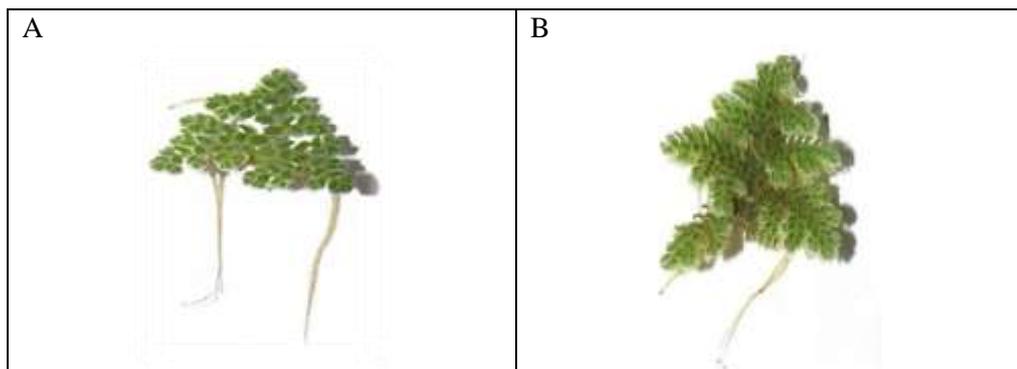
*Azolla* sp. yang terdapat di Tondano dan Magelang dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil karakter morfologi (Tabel 1), sampel tumbuhan *Azolla* sp. asal Tondano dengan Magelang memiliki beberapa

perbedaan dan kemiripan. Perbedaan ini terlihat pada ukuran tumbuhan, tata letak daun, warna daun, bentuk akar, dan panjang akar.

Tabel 1. Karakter Morfologi Tumbuhan *Azolla* sp. di Tondano, Sulawesi Utara dan Magelang, Jawa Tengah

| Karakteristik        | Morfologi <i>Azolla</i> sp.                              |  |
|----------------------|--|--|
|                      | Tondano  | Magelang                                       |
| Tinggi tumbuhan      | 0,8 – 1 cm   | 1 – 2 cm                                       |
| Warna daun           | Hijau tua  | Hijau tua dengan tepi hijau muda               |
| Panjang daun         | 1 mm – 1,5 mm  | 1 – 1,5 mm                                     |
| Lebar daun           | 0,8 – 1 mm   | 0,9 – 1 mm                                     |
| Sifat permukaan daun | Terdapat trikoma Berseling                               | Terdapat trikoma Tumpang tindih                |
| Letak daun           |  |  |
| Panjang akar         | 1 – 5 cm   | 1 – 3 cm                                       |
| Bentuk akar          | Menyerupai benang (filiformis), berbulu, tidak bercabang | Seperti rambut, tidak berbulu, tidak bercabang |
| Warna batang         | Hijau muda   | Hijau muda                                     |

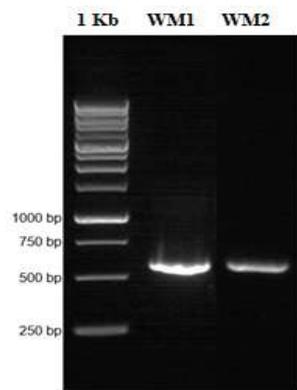


Gambar 1. Bentuk Morfologi *Azolla* sp., (A) Tondano Sulawesi Utara dan (B) Magelang Jawa Tengah

### Identifikasi Molekuler dengan Menggunakan Gen *rbcL*

Sampel tumbuhan *Azolla* sp. yang diambil dari Tondano Sulawesi Utara yaitu WM1 dan Magelang Jawa Tengah yaitu WM2 berhasil diamplifikasi dengan menggunakan teknik PCR. Sampel DNA hasil isolasi dan amplifikasi gen *rbcL*

memperlihatkan hasil pola pita yang terlihat jelas (Gambar 2). Hasil amplifikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan primer *rbcL*-1F-R dan *rbcL*-724R-F menunjukkan bahwa sampel WM1 dan WM2 memiliki urutan nukleotida sekitar 600 bp.

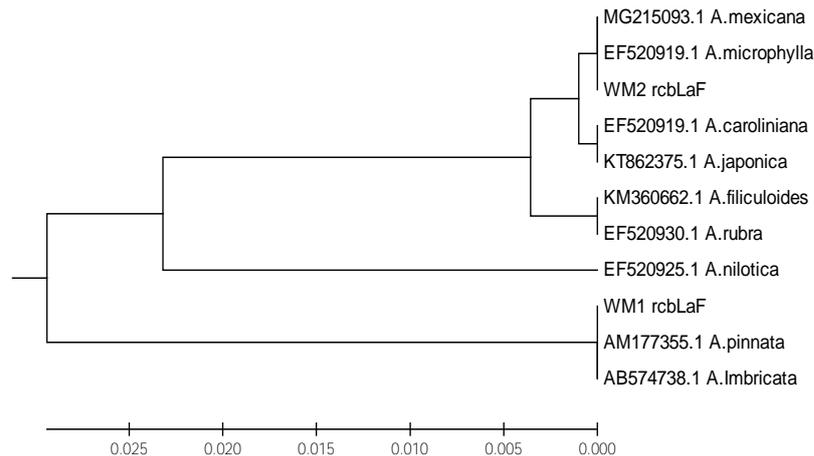


Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi DNA gen *rbcL* sampel WM1 dan WM2.

Sekuens sampel tumbuhan *Azolla* sp. WM1 dan WM2 dianalisis dengan menggunakan program *Geneious* v5.6.4, kemudian diubah menjadi format FASTA dan digunakan dalam pencarian sekuens yang serupa di GenBank dengan menggunakan *BLAST*. Berdasarkan hasil penelusuran dengan menggunakan *BLAST*, sekuens yang memiliki identitas paling serupa dengan sampel WM1 adalah *A. pinnata* AM177355.1 dan *A. imbricata* AB574738.1 dengan tingkat kemiripan 100%. IUCN (2017) menyebutkan bahwa tumbuhan *A. pinnata* memiliki nama yang bersinonim dengan *A. africana*, *A. guineensis* dan *A. imbricata*. Sebayang (1996) juga menambahkan bahwa berdasarkan persebarannya *A. pinnata* terbagi menjadi dua subspecies yaitu *A. pinnata* var. *Imbricata* yang tersebar di sekitaran Asia dan *A. pinnata* var. *Pinnata* yang tersebar di Afrika dan biasa dikenal dengan Afrika Strain. Hal tersebut menandakan bahwa kedua jenis tumbuhan *Azolla* sp. tersebut merupakan spesies yang sama dan merupakan subspecies.

Sekuens yang memiliki identitas paling serupa dengan sampel WM2 yaitu *A. microphylla* EF520921.1 dan *A. mexicana* MG215093.1 dengan tingkat kemiripan 100%. Studi molekuler sebelumnya (Reid *et al.*, 2006; Metzgar *et al.*, 2007) telah melaporkan bahwa *A. mexicana* dan *A. microphylla* adalah spesies yang sama. Evrard and Van Hove (2004) juga menyimpulkan bahwa berdasarkan morfologi *A. microphylla* dan *A. mexicana* adalah spesies yang sama. Hasil tersebut menandakan bahwa *A. microphylla* dengan *A. mexicana* merupakan spesies yang sama dengan nama yang berbeda.

Jarak genetik antara sampel dengan kerabat *Azolla* sp. dihitung menggunakan metode *Kimura-2-Parameter* pada MEGA6. Hasil menunjukkan bahwa jarak genetik antara sampel WM1 dan WM2 yaitu 0,060. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kedua tumbuhan tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang cukup dekat. Tallei *et al.* (2016) menyatakan bahwa hubungan kekerabatan antar spesies dapat dilihat dari besar kecilnya nilai jarak genetik. Semakin sedikit nilai jarak genetik antara dua organisme, maka hubungan kekerabatan keduanya semakin dekat. Pohon filogenetik antara sampel WM1 dan WM2 dengan kerabat terdekatnya dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pohon filogenetik *Azolla* sp. menggunakan metode UPGMA dalam MEGA6

### KESIMPULAN

Identifikasi karakter morfologi dan molekuler menggunakan sekuens gen *rbcL* menunjukkan bahwa sampel *Azolla* sp. asal Tondano Sulawesi Utara memiliki kemiripan dengan *A. pinnata* dan sampel tumbuhan *Azolla* sp. asal Magelang Jawa Tengah memiliki kemiripan dengan *A. microphylla* dengan tingkat kemiripan 100% dengan sekuens yang terdapat dalam *GenBank*.

### DAFTAR PUSTAKA

- Arifin (1996) *Azolla* Pembudidayaan dan Pemanfaatan pada Tanaman Padi. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Darus, FR (2016) Perbandingan Karakter Morfologi dan Molekuler Antara Karang *Acanthophyllia deshayesiana* (Michelin, 1850) dengan *Cynarina lacrymalis* (Milne Edwards & Haime, 1848). Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Dave's Garden. *Azolla pinnata* (2009) [www.davesgarden.com](http://www.davesgarden.com). Diakses pada 10 Mei 2018.
- Evrard C, Van Hove C (2004) Taxonomy of the American *Azolla* Species (*Azollaceae*): a critical review. *Syst. Geogr. Plants*. 74: 301 – 318.
- Federal Noxious Weed Disseminules of the U.S (2018) <http://keys.lucidcentral.org>. Diakses pada 10 Mei 2018
- Ferita I, Tawarati, Syarif Z (2015) Identifikasi dan Karakterisasi Tanaman Enau (*Arenga pinnata*) di Kabupaten Gayo
- Lues. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 1(1): 31 – 37.
- Ferns of Texas (2014) [www.ferns.brit.org](http://www.ferns.brit.org). Diakses pada 10 Mei 2018.
- Hebert PDN, Cywinska NA, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Roy Soc B-Biol Sci*, 270: 313 – 321.
- Hidayat C, Fanindi A, Sopiyan S, Komarudin (2011) Peluang Pemanfaatan Tepung *Azolla* Sebagai Bahan Pakan Sumber Protein untuk Ternak Ayam. Di dalam: *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Balai Penelitian Ternak. Bogor.
- INaturalist. (2018) [www.inaturalist.org](http://www.inaturalist.org). Diakses pada 10 Mei 2018

- IUCN (2017) *Azolla* sp. IUCN Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Diakses pada 22 Juni 2018.
- Khanuja SPS, Shasany AK, Pawar A, Lal RK, Darokar MP, Naqvi AA, Rajkumar S, Sundaresan V, Lal N, Kumar S (2005) Essential Oil Constituents and RAPD Markers to Establish Species Relationship in *Cymbopogon* Spreng (Poaceae). *Biochemical systematics and ecology* 33(2): 171 – 186.
- Kolondam BJ (2015) Applying *Matk* Gene For Identification Of Liliopsida Plant Species From North Sulawesi Through Bold Systems. *International Journal Of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 6(2): 242 – 245.
- 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).
- Lestari WS (2013) Keanekaragaman dan Hubungan Kekerbatan Marga *Adiantum* dari Kepulauan Sunda Kecil Berdasarkan Variasi Sekuen Pada DNA Kloroplas (*rbcl* dan *trnl-f*). Tesis. Denpasar: Universitas Udayana.
- Metzgar JS, Schneider H, Pryer KM (2007) Phylogeny and Divergence Time Estimates for the Fern Genus *Azolla* (Salvinaceae). *Int. J. Plant Sci.* 168: 1045–1053.
- Oshingboye A, Nodza G, Onuminya T, Ogundipe O (2017) Evaluating the Utility of *rbcl* in Identifying Nigerian Species of the Genus *Azolla* Sm. (*Fabaceae; Caesalpinioideae*). *Turkish Journal of Botany* 41: 455 – 463.
- Reid JD, Plunkett GM, Peters GA (2006) Phylogenetic Relationships In The Heterosporous Fern Genus *Azolla* (Azollaceae) Based On DNA Sequence Data From Three Noncoding Regions. *Int. J. Plant Sci.* 167: 529–538.
- Sadeghi R, Zarkani R, Sabretafar K, Van Damme P (2013) A Review of Some Ecological Factors Affecting the Growth of *Azolla* spp. *Environment Science*, 11(1): 65 – 76.
- Sandy FS, Pantiwati Y, Hudha MA, Latifa R (2016) Keanekaragaman Jenis Tumbuhan Paku (Pteridophyta) Di Kawasan Air Terjun Lawean Sendang Kabupaten Tulungagung. Universitas Muhammadiyah Malang.
- Sebayang HT (1996) *Azolla*, Suatu Kajian Produksi dan Potensinya dalam Bidang Pertanian. *Habitat* 97(8): 45 – 48.
- Sudjana B (2014) Penggunaan *Azolla* Untuk Pertanian Berkelanjutan. *Jurnal Ilmiah Solusi* 1(2): 72 – 81.
- Syah MA (2016) Karakterisasi Morfologi Dan Fragmen rDNA *Trichoderma* sp. Asal Perkebunan Kakao (*Theobromacacao* L.) Konawe. Skripsi. Universitas Haluoleo. Kendari.
- Tallei TE, Rembet RE, Pelealu JJ, Kolondam BJ (2016) Sequence Variation and Phylogenetic Analysis of *Sansevieria trifasciata* (Asparagaceae). *Bioscience Research* 13(1): 01 – 07.
- Wolf PG (1995) Phylogenetic Analysis of *rbcl* and Nuclear Ribosomal RNA Gene Sequences in Dennstaedtiaceae. *American Fern Journal* 85: 306 – 327.