



dapat diakses melalui <http://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/jmuo>



Barcode DNA Tanaman Leilem (*Clerodendrum minahassae* L.) Berdasarkan Gen *matK*

Cindy Kalangja^a, Vanda S. Kamu^a, Maureen Kumaunanga^{a*}

^aJurusan Kimia, FMIPA, Unsrat, Manado

KATA KUNCI

Tanaman Leilem
matK
Barcode DNA

ABSTRAK

Gen *matK* merupakan gen pengkode protein maturaseK yang terdapat pada kloroplas tumbuhan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan urutan nukleotida dari barcode DNA tanaman leilem (*Clerodendrum minahassae* L.) berdasarkan gen *matK*. Prosedur penelitian yang dilakukan meliputi: isolasi DNA total tanaman leilem, amplifikasi gen *matK* melalui PCR, sekuensing hasil PCR, serta penentuan barcode DNA leilem. Isolasi DNA total dari tanaman leilem telah dilakukan berdasarkan prosedur manual dari InnuPrep Plant DNA Kit yang dimodifikasi dengan menghasilkan larutan berwarna hijau kekuningan yang menunjukkan adanya klorofil yang larut. Gen *matK* parsial telah diisolasi dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) menggunakan Primer Forward *matK-1RKIM-f* dan Primer Reverse *matK-3FKIM-r*. Analisis urutan nukleotida *matK* menghasilkan fragmen berukuran 843 pb. Kedua urutan nukleotida *matK* dari sampel tanaman leilem yang berasal dari Kauditan dan Tomohon menunjukkan hasil barcode DNA yang sama.

KEYWORDS

Leilem plant
matK
DNA barcode

ABSTRACT

MaturaseK is a protein encoded by *matK* gene which is located in plant chloroplast. The aim of this research was to determine the DNA barcode of leilem plant (*Clerodendrum minahassae* L.) based on *matK* nucleotides sequence. This research was done by isolating total DNA of leilem, amplified *matK* gene by PCR, sequencing the PCR product, and determined the DNA barcode of leilem. Total DNA of leilem plant was isolated by using the modified procedure from InnuPrep Plant DNA Kit. The DNA isolation resulted a green-yellowish solution which shows dissolved chlorophyll. Partial *matK* gene was amplified using PCR method with *matK-1RKIM-f* as forward primer and *matK-3FKIM-r* as reverse primer. Amplification by PCR resulted a 843 bp DNA fragment of *matK*. Both nucleotide sequences of *matK* from two samples of leilem plant taken from Kauditan and Tomohon showed the same DNA barcode.

TERSEDIA ONLINE

20 Oktober 2014

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang kaya dengan keanekaragaman hayati dengan jenis tumbuhan yang bervariasi dan memiliki peranan penting dalam perkembangan ilmu dan teknologi. Dalam bidang kimia, keanekaragaman hayati ini termasuk dalam sumber daya alam yang menghasilkan senyawa kimia yang tidak terbatas

jenis dan jumlahnya. Khususnya di daerah Minahasa, jenis tanaman yang banyak tumbuh dan dimanfaatkan sebagai sumber makanan yaitu tanaman leilem (*Clerodendrum minahassae* L.). Tanaman leilem ini termasuk dalam genus *Clerodendrum* dan famili *Verbenaceae* (Wart, 2002). Bagian tanaman leilem ini yaitu daun, biasanya dikonsumsi sebagai sayuran oleh masyarakat di Minahasa. Manfaat lain dari daun

*Corresponding author: Jurusan Kimia FMIPA UNSRAT, Jl. Kampus Unsrat, Manado, Indonesia 95115; Email address: maureen273@yahoo.com

leilem ini yaitu sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan beberapa penyakit, seperti sakit perut dan cacangan (Patel and Shrivastava, 2007). Tanaman leilem ini biasanya tumbuh di sekitar pekarangan rumah. Tanaman leilem juga dapat tumbuh di daerah yang berbeda ketinggiannya, misalnya di desa Kauditan yang ketinggiannya 0 s/d 240 m di atas permukaan laut dan di Kota Tomohon yang ketinggiannya 700 s/d 800 m di atas permukaan laut.

Identifikasi spesies tumbuhan awalnya menggunakan metode morfologi yang diidentifikasi dari bentuk fisiknya (bunga, daun, batang, cabang dan biji). Namun, dengan adanya perkembangan teknologi elektronika dan genetika saat ini telah dikembangkan suatu metode terbaru dalam identifikasi spesies tumbuhan dan hewan, yaitu teknologi DNA *barcoding* yang menggunakan potongan DNA pendek standar (*barcode DNA*) (Herbert *et al.*, 2003). Untuk identifikasi tanaman dalam teknologi DNA *barcoding*, disepakati menggunakan gen pengkode standar yaitu gen ribulosa-1,5-bisfosfat karboksilase (*rbcL*) dan gen maturaseK (*matK*) yang terdapat pada kloroplas (CBOL Plant Working Group, 2009). Gen *matK* lebih banyak digunakan dalam berbagai penelitian dibandingkan gen *rbcL*, karena tingkat keakuratannya yang lebih spesifik pada yaitu pada tingkat spesies. Gen *matK* dijadikan gen pengkode standar untuk barcode DNA sejak tahun 2003 dan telah diuji melalui beberapa penelitian. Gen maturaseK (*matK*) diidentifikasi pertama kali oleh Sugita *et al.* (1985) dari tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*). Gen *matK* merupakan gen pengkode enzim maturase bagian sub-unit K yang terdapat dalam kloroplas pada tanaman. Daerah urutan nukleotida gen *matK* ini dapat menghasilkan kira-kira 1500 pb (pasang basa) (Soltis *et al.*, 1998).

Sampai saat ini belum ditemukan publikasi ilmiah mengenai identitas *barcode DNA* tanaman leilem (*C. minahassae* L.), yang telah tersimpan dalam BOLD (*Barcode of Life Database*) Systems (www.boldsystems.org). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai sekuens *barcode DNA* tanaman leilem sebagai data inventaris identitas molekuler tanaman asli daerah Minahasa.

2. Metode

2.1. Material

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, hot plate, tabung Eppendorf 1,5 mL, tabung PCR 50 μ L, mikropipet, termoblok (Biometra), mikrosentrifugasi, alat PCR (Biometra T-personal, Jerman), elektroforesis, UV-Transiluminator dan lemari pembeku.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun leilem yang diperoleh dari desa Kauditan Kabupaten Minahasa Utara (CKK) dan Kota Tomohon (CKT). Kit untuk isolasi DNA tanaman menggunakan *InnuPREP Plant DNA kit* (Analytik Jena), primer forward *matK-1RKIM-f* dan primer

reverse *matK-3FKIM-r* (Integrated DNA Technology (IDT), Singapura), master mix untuk PCR *GoTaq[®] Green Master Mix* (Promega), agarosa (Merck), akuades, etidium bromida (Merck) dan bufer Tris-borat-EDTA (TBE, Promega).

2.2. Isolasi DNA Total Tanaman Leilem

Isolasi DNA total tanaman leilem dilakukan berdasarkan prosedur manual dari *InnuPrep Plant DNA Kit* yang dimodifikasi. Sampel dalam bentuk lembaran daun tanaman leilem berukuran 5x5 mm dalam tabung Eppendorf ditambahkan larutan lisis sebanyak 300 μ L dan proteinase K sebanyak 25 μ L dengan menggunakan mikropipet dan diinversikan beberapa kali agar homogen. Setelah itu, diinkubasi selama 45 menit pada suhu 55 °C menggunakan termoblok sambil diinversikan setiap 10 menit. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam prefilter untuk difiltrasi dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit filtrat yang diperoleh ditambahkan dengan larutan pengikat sebanyak 200 μ L dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang, dan dimasukkan ke dalam tabung receiver dan ditambahkan dengan larutan pencuci HS sebanyak 500 μ L dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit dan difiltrasi kembali menggunakan spin filter. Setelah itu, ditambahkan larutan pencuci MS sebanyak 750 μ L dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya, filtrat dibuang dan spin filter dimasukkan kembali ke dalam tabung receiver dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Kemudian spin filter dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf baru dan ditambahkan dengan bufer elusi sebanyak 100 μ L dan didiamkan selama 1 menit pada suhu ruang. Selanjutnya disentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit. Sampel isolat DNA disimpan pada -20 °C.

2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Penentuan Urutan Nukleotida *matK*

Isolasi gen *matK* dilakukan dengan cara amplifikasi atau perbanyakan gen menggunakan PCR berdasarkan prosedur Kolondam *et al.* (2013) yang dimodifikasi. Reaksi PCR dalam penelitian ini menggunakan *GoTaq[®] Green Master Mix* (Promega). Komposisi PCR (volume total 40 μ L), yaitu 1,25 Unit *Taq DNA polimerase*, 0,2 mM masing-masing dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM masing-masing primer dan kira-kira 0,6 μ g DNA total sampel. Primer yang digunakan, adalah primer *forward matK-1RKIM-f* (5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC-3') dan primer *reverse matK-3FKIM-r* (5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTT ACGAG-3').

Kondisi reaksi PCR adalah: denaturasi awal pada 95°C selama 2 menit kemudian dilanjutkan 35 siklus [denaturasi: 95 °C, 30 detik; penempelan primer: 50 °C, 30 detik; dan pemanjangan DNA: 72°C, 50 detik]. Pita DNA hasil PCR selanjutnya dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dan divisualisasi menggunakan UV-Transiluminator. Produk PCR selanjutnya disekuensing di First Base Laboratories Sdn Bhd, Malaysia.

2.4. Analisis Barcode DNA

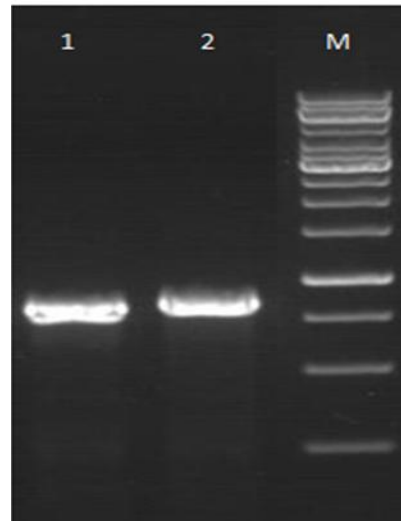
Kromatogram DNA hasil sekuensing disunting menggunakan perangkat lunak Geneious v5.6 (Drummond et al., 2012). Bagian awal dan akhir hasil kromatogram DNA tersebut dihapus kira-kira 30 pb (pasang basa) dan untuk pembacaan nukleotida yang keliru diperbaiki berdasarkan tingkat keakuratan yang terbaca. Untuk keakuratan amplifikasi gen target yang diuji menggunakan gen *matK*, dilakukan identifikasi melalui *BOLD (Barcode of Life Database) Systems* (www.boldsystems.org) (Ratnasingham and Hebert, 2007).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Hasil Isolasi DNA Total Tanaman Leilem

Isolasi DNA total tanaman leilem dilakukan untuk mengamplifikasi gen target *matK* yang terdapat dalam kloroplas. Hasil isolasi DNA total untuk kedua sampel yang berasal dari Kauditan (CKK) dan Tomohon (CKT) berupa larutan jernih berwarna hijau kekuningan yang menunjukkan adanya klorofil pada daun leilem yang larut dalam larutan bufer yang digunakan selama proses isolasi. Hal ini disebabkan karena DNA target yang digunakan terdapat dalam kloroplas.

Produk PCR amplifikasi gen *matK* menghasilkan fragmen DNA seperti yang ditunjukkan dengan elektroforegram (Gambar 1). Pita DNA yang teramplifikasi yaitu 864 pb (sampel CKK) dan 856 pb (sampel CKT) untuk primer forward, sedangkan untuk primer reverse yaitu 867 pb (sampel CKK) dan 866 pb (sampel CKT).



Gambar 1. Elektroforegram hasil PCR (M: marker DNA ladder 1 kb, 1: sampel CKT, 2: sampel CKK)

3.2. Hasil Isolasi DNA Total Tanaman Leilem

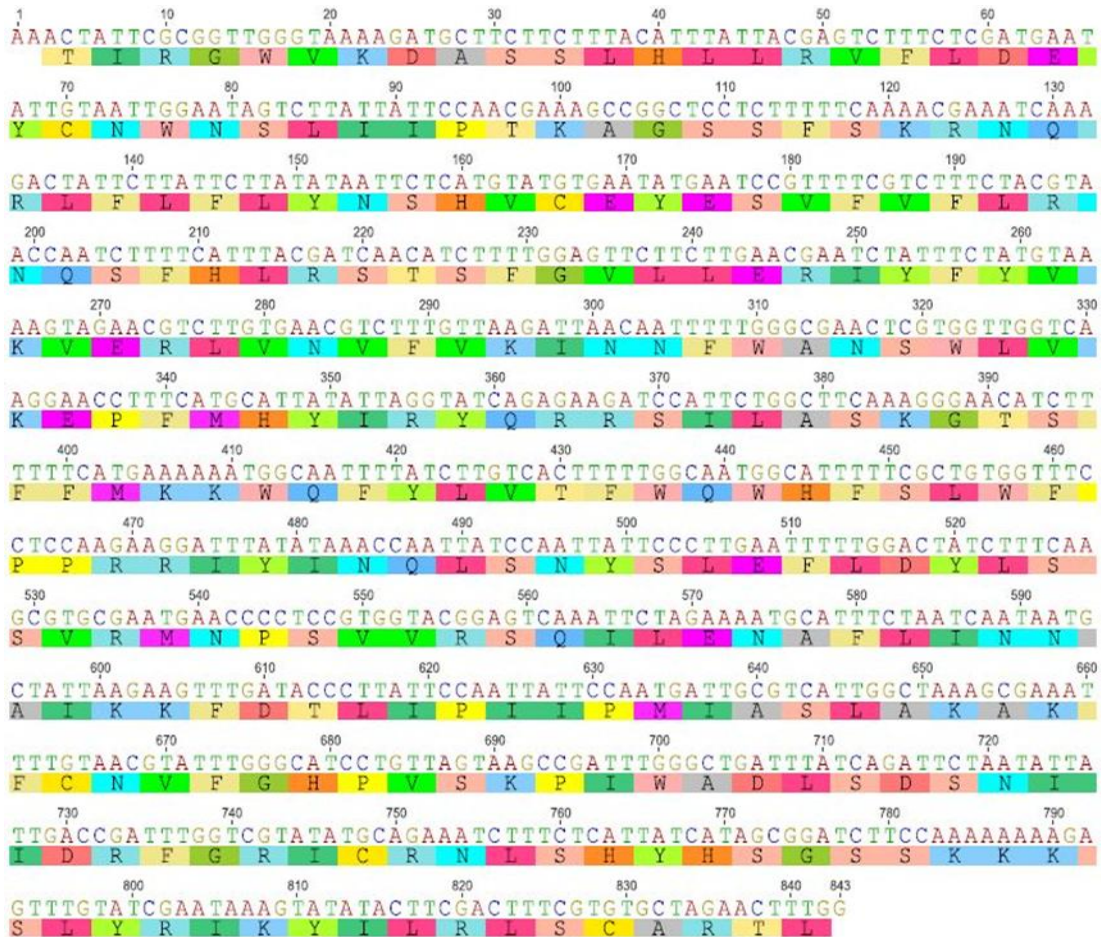
Hasil sekuensing dari produk PCR gen *matK* menghasilkan kromatogram yang berkualitas tinggi, yang ditunjukkan dengan nilai High Quality (HQ%) kromatogram yang terbaca pada Geneious v5.6 yaitu > 90%. Pita DNA teramplifikasi telah dihapus 33 pb untuk bagian awal (primer forward *matK-1RKIM-f*) dan 26 pb untuk bagian akhir (primer reverse *matK-3FKIM-r*), sehingga ukuran pita DNA menjadi 843 pb. Sebagian kromatogram hasil sekuensing diperlihatkan dalam Gambar 2.



Gambar 2. Sebagian kromatogram hasil sekuensing sampel leilem (CKK)

Barcode tanaman leilem diperlihatkan dalam Gambar 3. Penentuan barcode tanaman leilem diperkuat dengan penerjemahan nukleotida yang teramplifikasi menggunakan frame 3 (dibaca mulai dari nukleotida urutan ketiga) dalam program Geneious v5.6 (Drummond *et al.*, 2012). Apabila

menggunakan frame 1 dan 2 (dibaca mulai dari nukleotida urutan pertama dan kedua) akan menunjukkan adanya kodon stop di tengah urutan nukleotida. Gen *matK* merupakan gen aktif, sehingga tidak mungkin ada kodon stop yang terbentuk ditengah sekuens (Jing *et al.*, 2011).



Gambar 2. Urutan Nukleotida Barcode DNA *matK* dan Asam Amino Tanaman Leilem. Baris bagian atas menunjukkan urutan nukleotida dan baris bagian bawah menunjukkan urutan asam amino.

Hasil identifikasi melalui BOLD (Barcode of Life Database) Systems (www.boldsystems.org) menunjukkan bahwa sampel tanaman leilem termasuk dalam genus *Clerodendrum*, karena urutan nukleotidanya mirip dengan genus *Clerodendrum* yang lain dengan tingkat kemiripan > 98% (data tidak ditampilkan). Berdasarkan hasil penelusuran dalam data BOLD System, belum ditemukan barcode DNA untuk tanaman leilem (*C. minahassae* L.).

4. Kesimpulan

Hasil isolasi DNA total kedua tanaman leilem yang berasal dari dua lokasi berbeda ketinggian, yaitu Tomohon dan Kauditan, berupa larutan jernih berwarna hijau kekuningan, serta pita DNA teramplifikasi yang terbaca yaitu 843 pb (pasang basa). Selain itu, kedua tanaman leilem adalah spesies yang sama, yaitu *Clerodendrum minahassae*

L., ditunjukkan dengan kesamaan barcode DNA keduanya berdasarkan urutan nukleotida gen *matK*.

Daftar Pustaka

CBOL (Consortium for the Barcode of Life) Plant Working Group. 2009. A DNA Barcode for Land Plant. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. **106**: 12794-12797.

Drummond, A. J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, M. Kearse, S. Markowitz, S. Sturrock, T. Thierer, and A. Wilson. 2012. Geneious v5.6. Biomatters, New Zeland.

Hebert, P. D. N., N. A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. de Waard. 2003. Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*. **270**: 313-321.

Jing, Y., X. Jian-Hua, and Z. Shi-Liang. 2011. New Universal *matK* Primers for DNA Barcoding Angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*. **49**: 176-181.

- Kolondam, B. J., E. Lengkong, J. Mandang, S. Runtunuwu, dan A. Pinaria. 2013. Barcode DNA *Anthurium Gelombang Cinta* (*Anthurium plowmanii*) Berdasarkan Gen *rbcL* dan *matK*. *Jurnal Bioslogos*. **3**:17-25.
- Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt, and D. H. Janzen. 2005. Use of DNA Barcodes to Identify Flowering Plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. **102**: 8369-8374.
- Patel, T. and N. Shrivastava. 2007. *Clerodendrum* and Heathcare. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. **1**: 142-150.
- Ratnasingham, S. and P. D. N. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*. **7**: 355-364.
- Soltis, P. S., D. E. Soltis, and J. J. Doyle. 1998. *Molecular Systematics of Plants*. International Thomson Publishing, New York.
- Sugita, M., K. Shinozaki, and M. Sugiura. 1985. Tobacco Chloroplast *tRNA^{Lys}(UUU)* Gene Contains a 2,5-kilobase-pair Intron. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. **82**: 3557-3561.
- Wiat, C. 2002. *Medicinal Plants of Southeast Asia*. Prentice Hall, Malaysia.