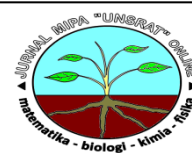




dapat diakses melalui <http://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/jmuo>



## Penentuan *Barcode* DNA berdasarkan Gen *matK* dan Analisis In-silico *MatK* Rumput Macan (*Lantana camara* L.)

Billy L. Mokoagow<sup>a\*</sup>, Feti Fatimah<sup>a</sup>, Maureen Kumaunang<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Jurusan Kimia, FMIPA, Unsrat, Manado

### KATA KUNCI

tumbuhan rumput macan  
*Lantana camara* L.  
*matK*  
Barcode DNA  
analisis in-silico

### ABSTRAK

DNA *barcoding* merupakan metode identifikasi spesies menggunakan potongan DNA pendek yang disebut *barcode* DNA. Gen *matK* merupakan gen standar untuk penentuan *barcode* DNA tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan *barcode* DNA tumbuhan rumput macan (*L. camara* L.) berdasarkan gen *matK*, serta melakukan analisis in-silico terhadap produk gen *matK* tumbuhan rumput macan (*L. camara* L.) dengan kerabat terdekatnya. Gen *matK* *L. camara* L. telah berhasil diamplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer *forward* *matK*-1RKIM-f dan primer *reverse* *matK*-3FKIM-r. Analisis terhadap sekuens *matK* *L. camara* L. menunjukkan bahwa *barcode* DNA tumbuhan rumput macan (*L. camara* L.) terdiri dari 843 nukleotida. Selanjutnya, hasil analisis in-silico menunjukkan bahwa *matK* *Lantana camara* L. bersifat basa, stabil, dan dapat berinteraksi baik dengan air.

### KEYWORDS

Rumput macan plant  
*Lantana camara* L.  
*matK*  
Barcode DNA  
In-silico analysis

### ABSTRACT

DNA *barcoding* is a method of species identification using short pieces of DNA called DNA barcode. *matK* is a standard gene to determine DNA barcode of a plant. The aim of this research was to determine the DNA barcode of Rumput Macan plant (*Lantana camara* L.) based on *matK* gene, as well as in-silico analysis of the product *matK* gene Rumput Macan (*L. camara* L.) with its closest relatives. *L. camara* L. *matK* gene was successfully amplified by *Polymerase Chain Reaction* (PCR) using forward primer *MATK*-1RKIM-f and reverse primer *MATK*-3FKIM-r. Analysis of the *matK* sequence of *L. camara* L. showed that the barcode DNA of rumput macan plant (*L. camara* L.) consisting of 843 nucleotides. Furthermore, the result of in-silico analysis showed that the *matK* of *L. camara* L. is alkaline, stable, and able to interact well with water.

### AVAILABLE ONLINE

10 Februari 2015

### 1. Pendahuluan

Daun Rumput Macan mengandung saponin, flavanoid dan minyak atsiri. Senyawa flavanoid telah dikenal memiliki efek antiinflamasi dan juga memiliki efek antipiretik yang bekerja sebagai inhibitor *cyclooxygenase* (COX) yang berfungsi memicu pembentukan prostaglandin. Prostaglandin berperan dalam proses inflamasi dan peningkatan suhu tubuh. Apabila prostaglandin tidak dihambat akan terjadi peningkatan suhu tubuh yang akan mengakibatkan demam (Hidayati, 2005).

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 Plant Working Group, 2009) merekomendasikan penggunaan dua gen plastida yaitu *ribulosa-1,5-bifosfat karboksilase* (*rbcL*) dan gen *maturase* K (*matK*) sebagai *barcode* standar untuk DNA tumbuhan (Hollingsworth *et al.* 2009).

\*Corresponding author: Jurusan Kimia FMIPA UNSRAT, Jl. Kampus Unsrat, Manado, Indonesia 95115; Email address: mokoagow.basaan@gmail.com

Sampai saat ini, penelitian tentang *barcode DNA* dan karakteristik *matK* rumput macan asal Indonesia belum pernah dipublikasikan. Untuk itu, perlu dilakukan penelitian mengenai *barcode DNA* dan karakterisasi produk gen *matK* tumbuhan rumput macan (*L. camara* L.).

## 2. Metode

### 2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, *hot plate*, tabung Eppendorf 1,5 mL, tabung PCR 50  $\mu$ L, mikropipet, inkubator, *microcentrifuge*, alat PCR (Biometra T-personal, Jerman), elektroforesis, *UV-transiluminator*, dan lemari pembeku.

### 2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Rumput Macan yang diperoleh dari desa Basaan Kabupaten Minahasa Tenggara. 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<sup>®</sup> Master Mix*, Promega), agarosa (Merck), akuades, etidium bromida (Merck) dan bufer Tris-borat-EDTA (TBE, Promega).

### 2.3. Prosedur Penelitian

#### 2.3.1. Isolasi DNA total Tumbuhan Ruumpu Macan

Isolasi DNA total dilakukan berdasarkan manual prosedur dari *InnuPrep Plant DNA Kit* yang dimodifikasi. Sampel rumput macan dalam tabung Eppendorf ditambahkan *Lysis Solution (LS)* sebanyak 300  $\mu$ L dan proteinase K sebanyak 25  $\mu$ L dengan menggunakan mikropipet dan diinversikan beberapa kali agar homogen. Diinkubasi selama 45 menit pada suhu 55 °C menggunakan termoblok dan diinversikan kembali setiap 10 menit. Sampel dimasukkan dalam prefilter untuk difiltrasi. Kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat diambil dan ditambahkan binding solution SBS 200  $\mu$ L, dicampurkan dengan menggunakan pipet. Filtrat dituang dalam spin filter untuk difiltrasi kembali. Disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit kemudian filtrat dibuang dan dimasukkan kembali Spin Filter kedalam Receiver Tube. Ditambahkan Washing Solution HS 500  $\mu$ L dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang dan Spin Filter dimasukkan kembali ke Receiver Tube. Ditambahkan Washing Solution MS 750  $\mu$ L dan di sentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang dan Spin Filter dimasukkan kembali ke *Receiver Tube*. Sentrifugasi 12.000 rpm (atau full speed) selama 1 menit. Spin Filter dipindahkan ke dalam *Elusion Tube* (tabung Eppendorf) Ditambahkan Elusion Buffer 100  $\mu$ L dan di diamkan pada suhu ruang selama 1 menit kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit. DNA disimpan dalam lemari pendingin pada suhu -10°C.

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

Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 40  $\mu$ L dalam tabung PCR 50 $\mu$ L. Di dalam setiap reaksi memiliki 2 $\mu$ L DNA sampel(DNA templat), 20 $\mu$ L *Go Tag Master Mix 2x*, 1,5 $\mu$ L *Primer Forward* (5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'), 1,5 $\mu$ L *Primer Reverse* (5'CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3') dan 15 $\mu$ L dd H<sub>2</sub>O. Pengaturan suhu mesin PCR yang digunakan, yaitu denaturasi awal templat DNA dilakukan pada suhu 95°C selama 2 menit. Selanjutnya siklus amplifikasi dilaksanakan sebanyak 35 kali, yaitu denaturasi dilakukan pada suhu 95 °C selama 30 detik, penempelan primer dilakukan pada suhu 50°C selama 30 detik, dan *DNA extension* pada suhu 72 °C selama 50 detik. Tahap pemantapan yaitu *final extension* dilakukan pada suhu 72 °C selama 1 menit. Hasil PCR berupa fragmen DNA kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dan divisualisasi dengan uv-transiluminator. Sampel hasil PCR selanjutnya disekuensing di *First Base Laboratories Sdn Bhd, Malaysia*.

### 2.3.3. Analisis Barcode DNA

Kromatogram DNA hasil sekuensing disunting menggunakan perangkat lunak Geneious v5.6.4. Bagian awal dan akhir hasil kromatogram DNA tersebut dihapus kira-kira 30 bp (pasang basa) dan untuk pembacaan nukleotida yang keliru diperbaiki berdasarkan tingkat keakuratan yang terbaca (Drummond *et al.*, 2012). Selanjutnya keakuratan amplifikasi gen target yang diuji menggunakan gen *matK*, diidentifikasi melalui BOLD (*Barcode of Life Database*) Systems ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)), yang dapat diakses secara gratis (Ratnasingham and Hebert, 2007).

### 2.3.4. Analisis Sekuen *matK* secara In-silico

Tahapan analisis *in-silico* *matK* dilakukan dengan cara dipilih 7 sekuen protein *matK* *lantana camara* L. yang tersedia di *National Center of Biotechnology Information (NCBI)* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Tabel 1 menunjukkan protein yang dipilih dalam analisis *in-silico*. Sekuen protein diunduh dalam format FASTA, dan dilakukan penjajaran terhadap kesepuluh sekuen protein tersebut menggunakan ClustalX (<http://www.clustal.org/clustal2/>) dan Genedoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Kemudian, dilakukan analisis selanjutnya yang meliputi analisis struktur primer yaitu analisis urutan asam amino dan sifat fisika kimia protein *matK* tanaman Rumput Macan menggunakan program yang tersedia yaitu ExPasy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

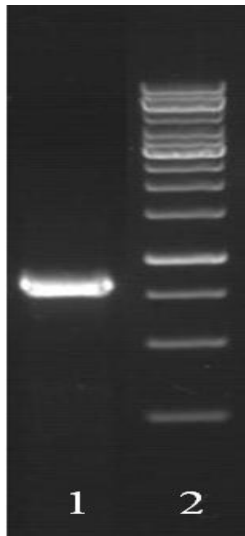
## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1. Hasil Isolasi DNA Total Tumbuhan Rumput Macan

DNA total Rumput Macan diperoleh setelah melalui proses isolasi DNA yang telah dilakukan. Isolasi DNA total dilakukan untuk mengamplifikasi gen target *matK* yang terdapat dalam kloroplas tumbuhan rumput macan.

Produk PCR amplifikasi gen *matK* menghasilkan fragmen DNA seperti yang ditunjukkan dengan elektroforegram (Gambar 1). Pita DNA yang

teramplifikasi yaitu 746 pb untuk primer *forward*, sedangkan untuk primer *reverse* yaitu 810.



Gambar 1 – Elektroforegram hasil PCR Rumput Macan (Keterangan: 1. Sampel Rumput Macan, 2. Marker DNA ladder 1 pb)



Gambar 2 – Urutan nukleotida dan asam amino hasil sekuensing primer *forward matK* Rumput Macan. Baris atas menunjukkan urutan nukleotida dan baris bawah menunjukkan urutan asam amino.

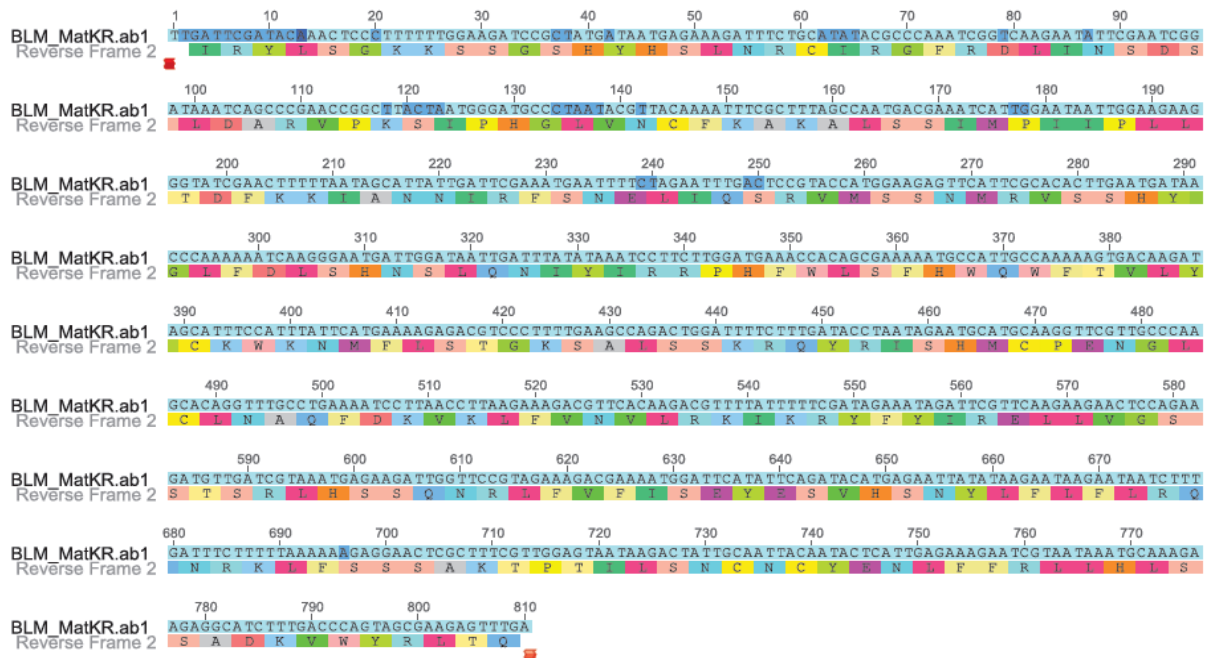
Amplifikasi gen *matK* rumput macan dengan PCR menunjukkan hasil positif seperti yang ditunjukkan Gambar 3. Hasil positif diperlihatkan dengan adanya pita berukuran ± 746pb dan 810pb dalam Gambar 3. Hasil positif ini juga menandakan bahwa gen *matK* rumput macan telah berhasil diampifikasi menggunakan berurut-turut primer *forward* dan *reverse*.

### 3.2. Hasil Sekuensing

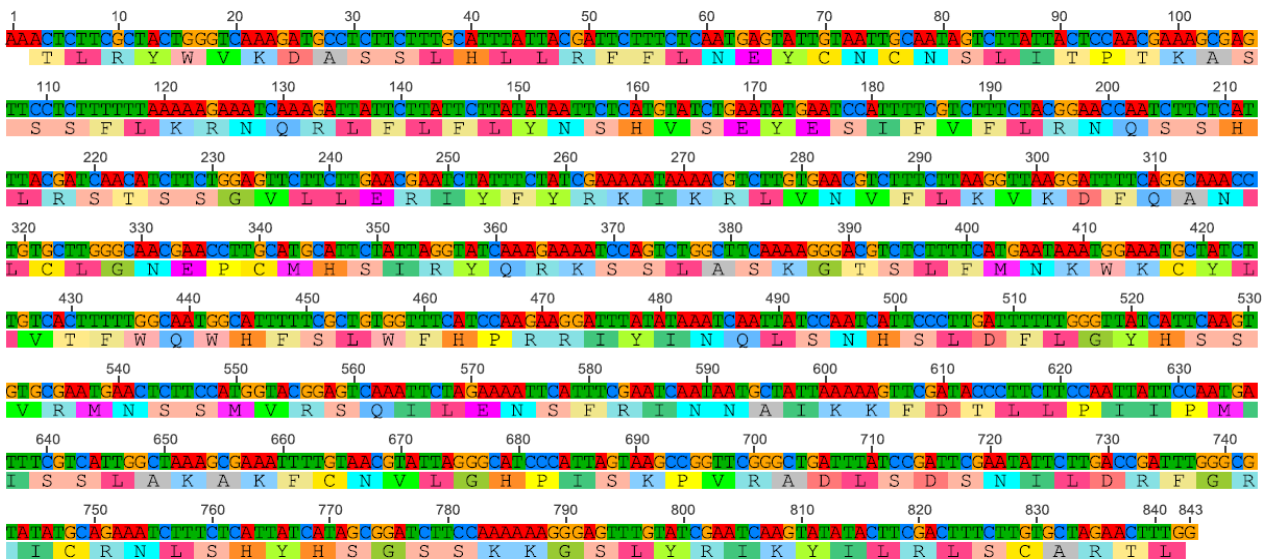
Penentuan *barcode* DNA *L. camara* L. dilakukan berdasarkan hasil sekuensing produk PCR terhadap gen *matK*. Proses sekuensing menghasilkan dua sekuens yaitu, hasil sekuens yang menggunakan primer *forward* (Gambar 2) dan hasil sekuens yang menggunakan primer *reverse* (Gambar 3) yang disunting dengan menggunakan aplikasi *Geneious v5.6.4*.

Pada gambar 4 menunjukkan hasil penggabungan sekuens primer forward dengan sekuens primer reverse menggunakan MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) yang terintegrasi dalam program Geneious sehingga menghasilkan sekuens yang menjadi barcode DNA

rumpun macam (*L. camara* L.). Hasil sekuens kemudian disimpan dalam bentuk FASTA (*Fast Alignment*) untuk dibandingkan dengan sekuens kerabat terdekat yang diambil dari GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).



Gambar 3 – Urutan nukleotida dan asam amino hasil sekuensing primer reverse *matK* Rumpun Macan. Baris atas menunjukkan urutan nukleotida dan baris bawah menunjukkan urutan asam amino.



Gambar 4 – Barcode DNA Rumpun Macan (*L. camara* L.). Baris atas menunjukkan urutan nukleotida dan baris bawah menunjukkan urutan asam amino.

### 3.3. Sifat Fisika-Kimia Maturase K

Berdasarkan komposisi asam-asam amino penyusunnya, maka dilakukan analisis sifat fisika-kimia produk gen *matK* *L. camara* L. dengan menggunakan *ProtParam* yang tersedia dalam situs <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>. hasil

analisis sifat fisika-kimia *matK* *L. camara* L. menunjukkan nilai isoelektrik (pI) 10,00 yang menandakan bahwa *L. camara* L. bersifat basa. Nilai indeksinstabilitas (II) adalah 39,47 sehingga protein tersebut bersifat stabil. Untuk indeks *Grand Average of Hydrophaticity* (GRAVY), suatu nilai yang menunjukkan kemampuan suatu protein untuk

berinteraksi dengan air, menunjukkan nilai yang rendah atau negatif yang menandakan bahwa protein *L. camara* L. dapat berinteraksi baik dengan air (hidrofobik) (Kyte dan Doolittle, 1982).

---

#### 4. Kesimpulan

Gen *matK* *Lantana camara* berhasil diisolasi dan diamplifikasi dengan PCR. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa sebanyak 746 pb berhasil diamplifikasi menggunakan primer *forward*, sedangkan primer *reverse* berhasil mengamplifikasi sebanyak 810 pb. Penggabungan hasil *sekuensing* primer *forward* dan *reverse* tersebut menghasilkan *barcode* DNA *L. camara* L sebanyak 843 pb. Untuk sifat-sifat fisika kimia menunjukkan bahwa *matK* *Lantana camara* L. bersifat basa, stabil, dan dapat berinteraksi baik dengan air.

---

#### Daftar Pustaka

- CBOL (Consortium for the Barcode of Life) Plant Working Group. 2009. A DNA Barcode for Land Plant. *PNAS*. **106**: 12794-12797.
- Dick, C. W. and W. J. Kress. 2009. Dissecting tropical plant diversity with forest plots and a molecular toolkit. *Bioscience*. **59**: 745-755.
- Hebert, P.D.N., N.A. Cywinska, S.L. Ball and J.R. de Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **270**: 313-321.
- Hidayati, N. A., S. Listyawati dan A. D. Setyawan. 2008. Kandungan Kimia dan Uji Antiinflamasi Ekstrak Etanol *Lantana camara* L. pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Jantan. *Bioteknologi*. **5**: 10-17.
- Hollingsworth, P. M., L. L. Forrest, J. L. Spouge, M. Hajibabaei, and R. Ratnasingham. 2009. A DNA Barcode for Land Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**: 12794-97.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle. 1982. A Simple Method for Displaying The Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Lahaye, R., M. V. D. Bank, D. Bogarin, J. Warner, F. Pupulin, G. Gigot, O. Maurin, S. Duthoit, T. G. Barraclough and V. Savolainen. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **105**: 2923-2928.
- Xue, C.Y. and D.Z. Li. 2011. Use of DNA barcode *sensu lato* to identify traditional Tibetan medicinal plant *Gentianopsis paludosa* (*Gentianaceae*). *J. Sys. Evol.* **49**: 267.