

DNA Barcoding* Tanaman Mangga Kasturi (*Mangifera casturi*) Asal Kalimantan Selatan Berbasis DNA Kloroplas Gen *rbcL* dan *matK

(DNA Barcoding of Mango Casturi (*Mangifera casturi*) Origin of South Borneo Based on DNA Chloroplas *rbcL* Gene and *matK* Gene)

ZURAIIDA SAGALA, SOGANDI*

Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945, Jl Sunter Permai Raya, Jakarta 14350, Indonesia

Diterima 11 Januari 2022, Disetujui 23 April 2022

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk melihat keragaman genetik tanaman mangga kasturi (*Mangifera casturi*) di Kalimantan Selatan menggunakan sekuens dari gen *rbcL* dan gen *matK*. Sampel tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mangga kasturi (*Mangifera casturi*) yang diambil dari delapan kabupaten dan kota di Provinsi Kalimantan Selatan yaitu dari Kota Amuntai, Astambul, Barito Kuala, Gambut, Kandanga, Babirik, Tabalong, dan Tanah Laut. Isolasi dan analisis DNA tanaman mangga kasturi dilakukan di laboratorium penelitian Fakultas Bioteknologi Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta. Analisis keragaman genetik mangga kasturi dimulai dengan tahap amplifikasi DNA genom (gDNA) menggunakan primer *rbcL* dan *matK*. Hasil isolasi DNA sampel menunjukkan konsentrasi yang tinggi yaitu 17-91 ng/ μ L dengan kemurnian berkisar antara 1,72-1,92 ng/ μ L. Pada saat PCR dilakukan dengan primer *rbcL* dan *matK*, dari 8 wilayah di Kalimantan Selatan, terdapat 5 sampel (Babirik, Tabalong, Kandanga, Amuntai, Batola, Gambut, dan Tanah Laut) dapat teramplifikasi menggunakan primer *rbcL* dan 6 sampel (Tanah Laut, Babirik, Tabalong, Amuntai, Gambut, dan Kandanga) teramplifikasi menggunakan primer *matK*. Hubungan antara mangga kasturi di Kalimantan Selatan dapat dilihat dari pohon filogenetiknya.

Kata kunci: *DNA barcoding*, filogenetik, genetik, kasturi, *Mangifera*.

Abstract: This study aims to see the genetic diversity of the musk mango (*Mangifera casturi*) plant in South Kalimantan based on DNA barcode techniques using sequences from the *rbcL* gene and the *matK* gene. The plant samples used in this study were the leaves of the musk mango (*Mangifera casturi*) taken from eight regencies and cities in South Kalimantan Province, namely from Amuntai, Astambul, Barito Kuala, Peat, Kandanga, Babirik, Tabalong, and Tanah Laut. Isolation and DNA analysis of the musk mango plant was carried out in the research laboratory of the Faculty of Biotechnology, Atma Jaya Catholic University of Indonesia, Jakarta. The analysis of the genetic diversity of the musk mango began with the stage of amplifying genomic DNA (gDNA) using *rbcL* and *matK* primers. The results of the DNA isolation samples showed a high concentration level of 17-91 ng/ μ L with a purity of 1.72 -1.92 ng/ μ L. When PCR was carried out using *rbcL* and *matK* primers, from 8 areas in South Kalimantan, 5 samples (Babirik, Tabalong, Kandanga, Amuntai, Batola, Peat, and Tanah Laut) were amplified with *rbcL* primers and 6 samples (Tanah Laut, Babirik, Tabalong, Amuntai, Peat, and Kandanga) amplified with *matK* primer. The relationship between the musk mango in South Kalimantan can be seen from the phylogenetic tree.

Keywords: DNA barcoding, casturi, genetic, *Mangifera*, phylogenetic.

*Penulis korespondensi
Email: sogandi@uta45jakarta.ac.id

PENDAHULUAN

INFORMASI keragaman genetik, berupa tingkat dan distribusi keragaman yang ada pada suatu jenis tanaman sangat penting untuk diketahui berkaitan dengan penyusunan strategi pemuliaan (*breeding*) dan juga konservasinya. Informasi yang lengkap dapat mendukung upaya pemuliaan dan konservasi tanaman mangga kasturi termasuk informasi terkait keanekaragaman genetik yang masih belum banyak dilakukan. Keanekaragaman genetik timbul karena setiap individu mempunyai pola keterulangan susunan basa nitrogen yang khas. Keanekaragaman genetik terjadi melalui mekanisme mutasi dan rekombinasi⁽¹⁾.

Salah satu pendekatan yang digunakan untuk mengkaji keanekaragaman genetik adalah dengan DNA *barcode*. DNA *barcode* yang sering digunakan pada tanaman umumnya adalah DNA kloroplas (cpDNA)⁽²⁾. Istilah DNA *barcode* mengisyaratkan bahwa setiap spesies makhluk hidup dicirikan oleh suatu sekuen atau urutan DNA tertentu sehingga dapat menunjukkan variasi genetik di dalam suatu spesies dan antar spesies. DNA *barcode* merupakan salah satu sarana molekuler dan bioinformatik untuk identifikasi spesies biologi. Gagasan mendasar pemanfaatan DNA *barcode* adalah bahwa analisis variabilitas pada satu atau beberapa penanda molekuler terstandar yang memungkinkan untuk membedakan tingkat taksonomi spesies. Penggunaan DNA *barcode* untuk analisis variasi genetik didasarkan pada asumsi bahwa variasi genetik antar spesies melebihi variasi intraspesies⁽³⁾. DNA *barcode* digunakan untuk dua tujuan, yaitu identifikasi molekuler spesies yang sudah terdeskripsikan maupun untuk spesies yang belum terdeskripsikan. DNA *barcode* dapat memberikan kontribusi kuat untuk penelitian keanekaragaman hayati dan taksonomi.

Sumber karakter data untuk mengidentifikasi keanekaragaman genetik secara molekuler dapat diperoleh dari DNA inti (nDNA), kloroplas (cpDNA) dan mitokondria (mtDNA). Sumber data keanekaragaman genetik yang banyak dipilih untuk objek penelitian tanaman adalah cpDNA. cpDNA mengontrol produksi RNA transfer (tRNA), RNA ribosomal (rRNA), dan sebagian besar protein yang terdapat di dalam organel kloroplas⁽⁴⁾. Setidaknya terdapat 19 DNA kloroplas yang telah diketahui urutannya, terdapat ratusan gen yang terdapat di dalam cpDNA genom. Tumbuhan berpembuluh, umumnya memiliki kemiripan kandungan dan fungsi gen dalam cpDNA⁽⁵⁾. Sekuen DNA yang berpotensi untuk dijadikan sebagai DNA *barcode* adalah gen *rbcL* dan *matK*.

Gen *rbcL* dan *matK* berukuran panjang sekitar 500 - 1400 bp, sehingga menyediakan banyak karakter untuk kajian filogenetik⁽⁶⁾. Peranan gen *rbcL* yang mengkode protein RuBisCO diduga menyebabkan sekuen gen ini memiliki tingkat mutasi yang rendah dibandingkan dengan gen *barcode* lain dalam cpDNA sehingga tingkat kesamaan antar spesies cukup tinggi^(7,8). Tingkat mutasi yang rendah ini memberikan keuntungan untuk kajian mendalam tentang variasi genetik dan filogenetik intraspesies.

Penelitian tentang studi filogenetik jenis *Mangifera* Indonesia berdasarkan penanda *rbcL* sudah pernah dilakukan oleh Suparman⁽⁶⁾. Akan tetapi untuk jenis mangga kasturi (*Mangifera casturi*) asal Kalimantan Selatan belum pernah dilaporkan. Tujuan dari penelitian ini adalah merekonstruksi hubungan kekerabatan spesies *Mangifera casturi* yang berasal dari delapan Kabupaten Kota di Kalimantan Selatan dan kerabatnya berdasarkan sekuen gen *rbcL* dan juga *matK*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun mangga kasturi yang diambil dari 8 Kabupaten Kota di Kalimantan Selatan (Gambar 1), tips ukuran 1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L, agaros gel, PCR kit, etanol, dan kit ekstraksi.

Alat. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pipet mikro, mortal, pastel, tube rack, mesin PCR, mesin elektroforesis, hot plate, gel doc, sentrifuse, UV transluminator, gelas ukur, dan timbangan.



Gambar 1. Peta wilayah Kalimantan Selatan.

METODE. Pengambilan Sampel. Sampel daun mangga kasturi dalam penelitian ini diambil dari 8 daerah Kabupaten Kota yang ada di Kalimantan Selatan. Sampel diambil dari daerah Amuntai, Astambul, Barito Kuala, Gambut, Kandangan, Babirik, Tabalong, dan Tanah Laut.

Isolasi DNA. Metode yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) yang telah dimodifikasi. Daun dipotong kecil-kecil, kemudian digerus dengan menambahkan nitrogen cair dan diekstraksi dengan *buffer* ekstraksi sebanyak 750 μL . Genomik DNA hasil ekstraksi ditambahkan dengan larutan TE sebanyak 30 μL , divortex dan kemudian disimpan didalam *freezer*⁽⁹⁾.

PCR (Polymerase Chain Reaction). Proses PCR diawali dengan membuat campuran antara genomik DNA 1,5 μL dicampurkan dengan (*HotStar Mix* 7,5 μL , *Nuclease-free water* 2,5 μL dan primer 1,5 μL). *Sequence primer forward rbcL* (5-TGTCACCACCAACAGAGACTAAAGC-3), *primer reverse rbcL* (5-GTAAATCAAGTCCACCRG-3) (10), *sequence primer forward matK* (5-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3), dan *primer reverse matK* (5-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3)⁽¹¹⁾. Proses PCR dilakukan dengan tahapan pre-denaturasi 95 °C selama 1 menit untuk 1 siklus dan dilanjutkan dengan tahapan denaturasi 95 °C 15 detik, *annealing* 52 °C 30 detik, ekstensi 72 °C 45 detik sebanyak 35 siklus dan ekstensi akhir 72 °C selama 3 menit 1 siklus. Pengujian polimorfisme dilakukan dengan melihat pita hasil PCR yang divisualisasi berdasarkan hasil elektroforesis. Target PCR gene *rbcL* adalah 700 bp (*base pair*) dan 1500 bp untuk gen *matK*⁽¹²⁾.

DNA Sequencing dan Analisis Filogenetik. Produk PCR *disequencing* untuk melihat urutan basa

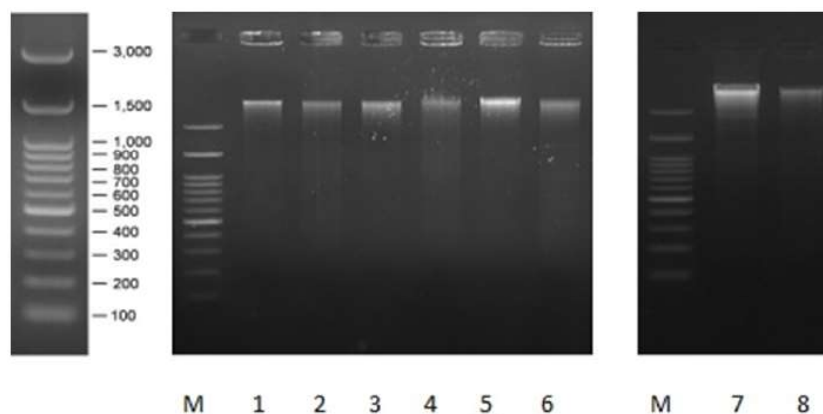
DNA yang terdapat disetiap sampel daun mangga kasturi berdasarkan hasil amplifikasi dengan primer *rbcL* dan *matK*. Proses *sequencing* dilakukan oleh *Macrogen*. Kemudian untuk proses pencarian kesamaan urutan basa nitrogen DNA dilakukan dengan analisis BLAST secara *online* (<http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>). Untuk analisis filogenetik, sekuens disejajarkan dengan menggunakan CLUSTAL X⁽¹³⁾. Pohon filogenetik dibangun dengan metode *neighbor joining* dan strain *Streptococcus pyogenes* digunakan sebagai *out grup*⁽¹⁴⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA. Metode yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) yang telah dimodifikasi. Daun dipotong kecil-kecil, kemudian digerus dengan menambahkan nitrogen cair dan diekstraksi dengan *buffer* ekstraksi sebanyak 750 μL . Genomik DNA hasil ekstraksi ditambahkan dengan larutan TE sebanyak 30 μL , divortex dan kemudian disimpan didalam *freezer*⁽¹⁵⁾.

Berdasarkan Gambar 2 dapat diketahui bahwa genomik DNA dari sampel mangga kasturi berhasil diisolasi dengan baik yang ditunjukkan oleh pita yang terbentuk tidak mengalami *smear* saat dilakukan elektroforesis gel. Sampel DNA yang konsentrasinya rendah adalah sampel Kandangan (HSS) dengan konsentrasi hanya 17,1 ng/ μL , sedangkan yang paling tinggi terdapat pada sampel Amuntai (HSU) dengan nilai konsentrasi 191,4 ng/ μL (Tabel 1).

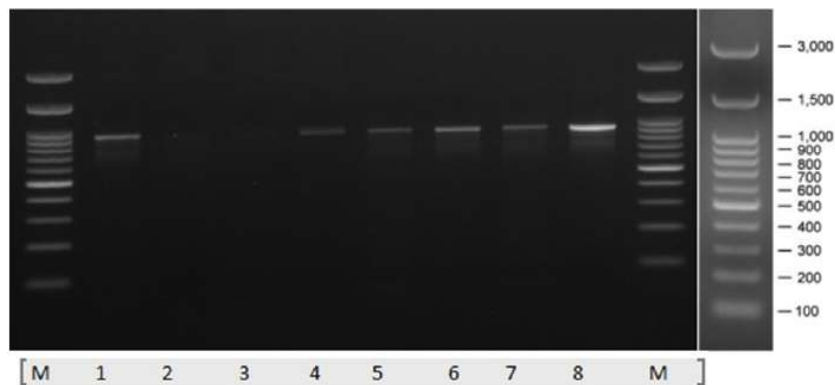
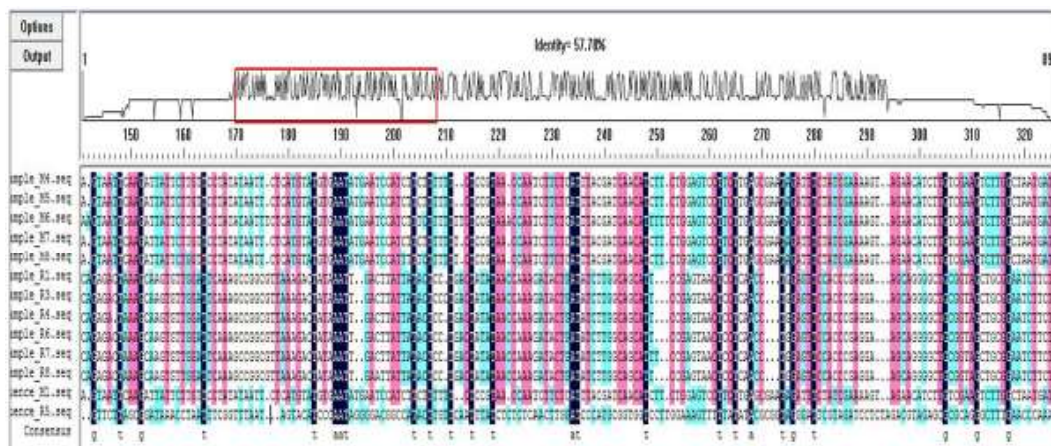
Hasil kemurnian DNA berdasarkan spektrofotometer menghasilkan sampel yang murni yaitu sampel kasturi yang berasal dari daerah Tabalong dengan nilai 260/280 sebesar 1,91 dan 260/230 sebesar 1,78. Nilai konsentrasi genomik DNA yang didapatkan dalam penelitian ini sudah cukup tinggi dan murni



Gambar 2. Hasil elektroforesis genomik DNA. Keterangan sumur: (1) Sampel Kasturi berasal dari Amuntai, (2) Astambul, (3) Batola, (4) Gambut, (5) Kandangan, (6) Babirik, (7) Tabalong, dan (8) Tanah Laut.

Tabel 1. Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian genomik DNA.

No.	Nama sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)	A _{260/280}	A _{260/230}	Volume (μ L)
1	Amuntai (HSU)	191,4	1,79	0,66	50
2	Astambul	157,9	1,89	0,89	50
3	Batola	66,6	1,77	0,73	50
4	Gambut	170,9	1,72	0,68	50
5	Kandangan (HSS)	17,1	1,75	0,33	50
6	Rawa-Rawa Babirik	23,0	1,79	1,78	50
7	Tabalong	22,1	1,91	1,78	50
8	Tanah Laut	81,5	1,75	2,27	50

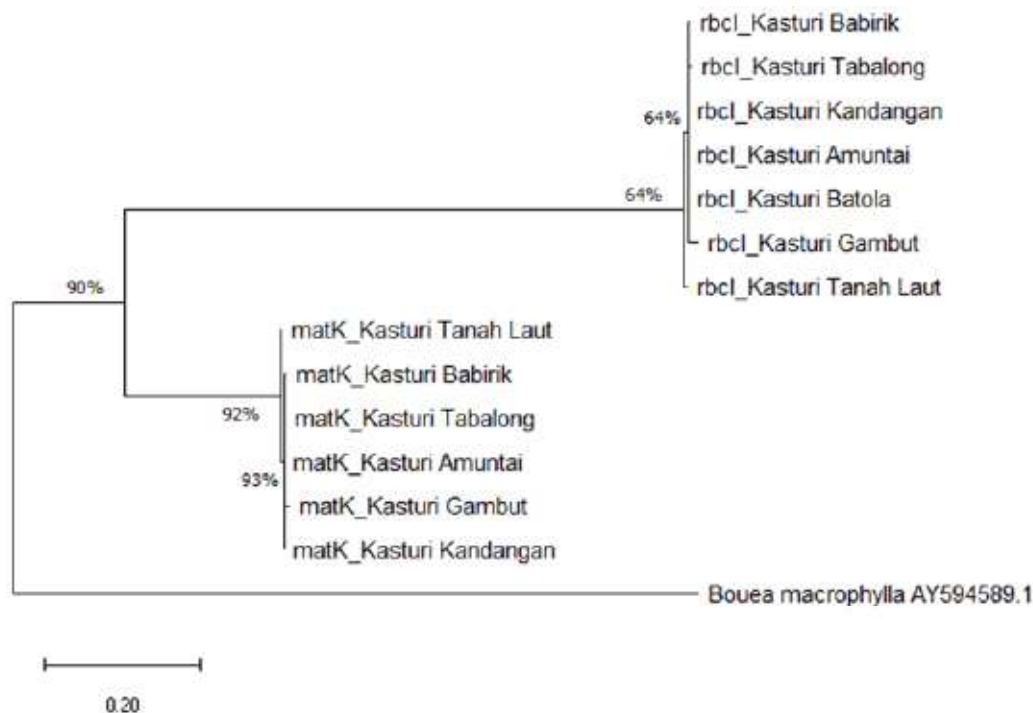
Gambar 3. Hasil PCR sampel mangga kasturi dengan primer *matK*. Keterangan : Sumuran (1) Sampel kasturi berasal dari Amuntai, (2) Astambul, (3) Batola, (4) Gambut, (5) Kandangan, (6) Babirik, (7) Tabalong, dan (8) Tanah Laut.Gambar 4. Pensejajaran 8 *sequence* sampel DNA mangga kasturi.

dilihat dari hasil pembacaan spektrofotometer 260/230 yang lebih dari 1,0⁽¹⁶⁾.

PCR (Polymerase Chain Reaction). Hasil isolasi DNA tanaman mangga kasturi yang diperoleh dilanjutkan ke proses amplifikasi PCR menggunakan pemanasan. Dalam pemanasan ini DNA akan melewati 5 tahapan yaitu pradenaturasi DNA, denaturasi DNA, penempelan primer, polimerisasi DNA dan polimerisasi DNA akhir⁽¹⁷⁾. Tahapan ini disebut dengan proses replikasi DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Dengan teknik ini, DNA dapat dihasilkan dalam jumlah besar serta

waktu relatif singkat dan memudahkan teknik lain yang menggunakan DNA seperti elektroforesis dan sekuensing. Hasil amplifikasi gen *matK* dengan PCR mangga kasturi yang dilakukan dalam proses elektroforesis dapat dilihat pada (Gambar 3). Berdasarkan ukuran DNA *ladder*, menunjukkan bahwa pita DNA mangga kasturi dengan primer *rbcl* berada pada ukuran ± 600 bp.

Barcode DNA berupa hasil penjajaran sekuens DNA dari *primer forward* dan *primer reverse* mangga kasturi (Gambar 4) menunjukkan kemiripan genetik yang lestari. Dengan demikian bahwa kedua primer



Gambar 5. Kladogram metode *neighbor-joining* untuk gen *rbcL* dan *matK*.

tersebut teramplifikasi gen *matK* dalam teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan baik⁽¹⁸⁾.

Konstruksi Pohon Filogenetik. Urutan DNA hasil amplifikasi ditentukan dan disejajarkan dengan urutan dasar yang diambil dari database NCBI. *Sequence alignment* ditemukan \pm 600 bp untuk primer *rbcL* dan 1500 bp untuk primer *matK*. Hasil pencarian dengan metode BLAST di NCBI-GenBank menunjukkan bahwa semua mangga kasturi memiliki kemiripan dengan spesies *Mangifera indica* sebesar 99,88% (nomor akses: MN711724.1) untuk *matK* primer, dan primer *rbcL* memiliki kemiripan 100% dengan *Mangifera indica* (Acc no MN711724.1). Hasil ini belum pernah dilaporkan sebelumnya.

Selanjutnya hasil penelitian ini dilanjutkan dengan membuat pohon filogenetik untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies. Pensejajaran urutan mangga kasturi yang diamati dengan urutan mangga lain yang diperoleh dari database NCBI-GenBank dilakukan menggunakan Clustal X. Selanjutnya hasil alignment tersebut dimasukkan ke dalam NJPlot untuk membuat pohon filogenetik. Pohon filogenetik yang dibangun berdasarkan urutan *rbcL* dan *matK* tersebut menunjukkan bahwa mangga kasturi dari Kalimantan Selatan termasuk dalam famili *Mangifera indica clade*⁽¹⁷⁾ (Gambar 5).

SIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa dengan

menggunakan primer spesifik *rbcL* dan *matK*, dari 8 wilayah di Kalimantan Selatan, terdapat 5 sampel kasturi (Babirik, Tabalong, Kandangan, Amuntai, Batola, Gambut, dan Tanah Laut) dapat diamplifikasi menggunakan primer *rbcL* dan 6 sampel (Tanah Laut, Babirik, Tabalong, Amuntai, Gambut, dan Kandangan) dapat diamplifikasi menggunakan primer *matK*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Farmasi Universitas 17 Agustus 1945, Jakarta, Indonesia yang telah menyediakan fasilitas yang dibutuhkan untuk melaksanakan pekerjaan ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Indrawan M, Primack RB, Supriatna J. Biologi Konservasi: Edisi Revisi. Yayasan Pustaka Obor Indonesia; 2012 Mar 20.
2. Geffen E, Luikart G, Waples RS. Impacts of modern molecular genetic techniques on conservation biology. *Key topics in conservation biology*. 2007;46.
3. Mayer F, Dietz C, Kiefer A. Molecular species identification boosts bat diversity. *Frontiers in zoology*. 2007 Dec;4(1):1-5.
4. Hidayat T, Pancoro A, Kusumawaty D, Eiadthong W. Development *matK* gene as DNA barcode to assess evolutionary relationship of important tropical forest tree genus *Mangifera* (*Anacardiaceae*) in Indonesia and Thailand. *Jurnal Teknologi*. 2012 Sep 15;59(1): 17-20.

5. Pierce BA. *Genetiks: A Conceptual Approach*. New York: W. H. Freeman and Company. 2002.
6. Suparman. Desain Primer PCR In Silico untuk Amplifikasi Gen *rbcL* pada Genus *Mangifera*. *Jurnal Bioedukasi*. 2013; 2(1):163-170.
7. Teletchea F. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2009 Sep;19(3):265-93.
8. Chen X, Liao B, Song J, Pang X, Han J, Chen S. A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding. *Gene*. 2013 Nov 1;530(1):39-43.
9. Sogandi S, Riyanto J. Investigating the anti-acne potential of endophytic bacterial extracts isolated from *Mangifera casturi* in indigenous South Borneo, Indonesia. *Journal of Agriculture and Applied Biology*. 2020 Dec 24;1(2):54-63.
10. Erwina J, Fitmawati, Nery S. Analisis Filogenetik *Mangifera odorata* Sumatera Tengah dan Kerabatnya Menggunakan Gen *rbcL*. *Jurnal Riau Biologia*. 2016;1(2): 155 -159
11. Fattah YR, Kamu VS, Runtuwene MR, Momuat LI. Identifikasi barcode tumbuhan gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. medik) dan gedi hijau (*Abelmoschus moschatus*) berdasarkan gen *matK*. *Jurnal MIPA*. 2014;3(2):120-4.
12. Sogandi S, Triandriani W, Saputri D, Suhendar U. Antioxidant Activity of Endophytic Bacterial Extract Isolated from Clove Leaf (*Syzygium aromaticum* L.). *Journal of Agriculture and Applied Biology*. 2020 Jun 5;1(1):9-17.
13. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 2011 Oct 1;28(10):2731-9.
14. Cheng T, Xu C, Lei L, Li C, Zhang Y, Zhou S. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular ecology resources*. 2016 Jan;16(1):138-49.
15. Ali MA, Gyulai G, Hidvegi N, Kerti B, Al Hemaïd FM, Pandey AK, Lee J. The changing epitome of species identification—DNA barcoding. *Saudi journal of biological sciences*. 2014 Jul 1;21(3):204-31.
16. Fitmawati F, Swita A, Sofyanti N, Herman H. Analisis Kekerabatan Morfologi *Mangifera* Dari Sumatera Tengah. *Floribunda*. 2013;4(7).
17. Priyono, Putranto RA. Molecular markers and their application for DNA fingerprinting and genetic diversity studies in *Coffea* species. *Menara Perkebunan*. 2014; 82: 39-50.
18. Arif IA, Khan HA, Bahkali AH, Al Homaidan AA, Al Farhan AH, Al Sadoon M, Shobrak M. DNA marker technology for wildlife conservation. *Saudi journal of biological sciences*. 2011 Jul 1;18(3):219-25.