



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



Identifikasi *Barcode* Tumbuhan Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L. medik) dan Gedi Hijau (*Abelmoschus moschatus*) Berdasarkan Gen *matK*

Yusuf R. Fattah^a, Vanda S. Kamu^a, Max R.J. Runtuwene^a
Maureen Kumaunanga^{a*}, Lidya I. Momuat^a

^aJurusan Kimia, FMIPA, Unsrat, Manado

KATA KUNCI

Tumbuhan gedi
matK
DNA *barcoding*
in silico

ABSTRAK

Gedi (*Abelmoschus* L.) merupakan tumbuhan tropis. Tumbuhan ini memiliki efek farmakologis. Masyarakat Minahasa mengkonsumsi daun gedi yang direbus tanpa diberi bumbu sebagai obat tradisional untuk menurunkan kadar kolesterol, antihipertensi dan antidiabetes. Suatu metode baru untuk mengidentifikasi dan menganalisis keanekaragaman genetika spesies telah dikembangkan dengan menggunakan potongan gen standar yang dikenal dengan teknik DNA *barcoding*. Salah satu gen yang terdapat pada tumbuhan yaitu gen *matK* telah digunakan sebagai gen standar untuk *barcoding*. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi DNA total dan gen *matK* penanda *barcode* DNA dari gedi merah dan gedi hijau, serta analisis *in-silico* terhadap produk gen *matK* gedi merah, gedi hijau, dan kerabat terdekatnya. Gen *matK* diisolasi dan diamplifikasi menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer *forward* (5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTT ACGAG-3') dan primer *reverse* (5'-ACCCAGTCCATCTGGAATCTTGTTTC-3'). Hasil pengurutan nukleotida DNA *barcode matK* menunjukkan bahwa sebanyak 828 pb *matK* berhasil diisolasi untuk tumbuhan gedi merah dan tumbuhan gedi hijau. Urutan nukleotida *matK* gedi merah dan gedi hijau menunjukkan tingkat kemiripan yang tinggi, yaitu > 95%. Selain itu, hasil analisis *in-silico* menunjukkan bahwa protein *MatK* gedi dan kerabat terdekatnya bersifat hidrofobik.

KEYWORDS

Abelmoschus
matK
DNA *barcoding*
in silico

ABSTRACT

Gedi (*Abelmoschus* L.) is a tropical plant. This plant has the pharmacological effects. Minahasan people consumed boiled gedi without any spices addition to lower cholesterol level, blood pressure, and glucose level. A new method for identifying and analyzing the genetic diversity of species has been developed using standard gene known as DNA *barcoding* technique. One of the genes found in plants called *matK* gene was used as standard for DNA *barcoding*. In this research, identification of DNA barcode of red gedi and green gedi based on *matK* gene, and *in-silico* analysis on the *matK* gene products of red gedi, green gedi, and its closest relatives gedi have been done. *matK* gene was isolated with *Polymerase Chain Reaction* (PCR) using forward primer (5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3') and reverse primer (5'-ACCCAGTCCATCTGGAATCTTGTTTC-3'). Barcode DNA of red and green gedi showed 828 bp nucleotide sequence based on *matK* gene. In addition, *matK* of both gedi showed high similarity, i.e. >95%. Furthermore, *in-silico* analysis of *MatK* gedi and its closest relative showed that this protein is hydrophobic.

TERSEDIA ONLINE

22 Oktober 2014

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

1. Pendahuluan

Gedi (*Abelmoschus* L.) merupakan tumbuhan tropis famili Malvaceae, secara tradisional telah lama dikenal di Sulawesi Utara sebagai tanaman sayuran. Tumbuhan ini memiliki efek farmakologis untuk membantu penyembuhan berbagai jenis penyakit (Mamahit dan Sukanto, 2010). Masyarakat memanfaatkan daun gedi yang direbus tanpa diberi bumbu sebagai obat tradisional untuk menurunkan kadar kolesterol, hipertensi dan antidiabetes (Suoth et al., 2013).

Tumbuhan genus *Abelmoschus* hanya dapat ditemui di daerah beriklim tropik, terutama di Afrika dan Asia. *Abelmoschus* terdiri dari 15 spesies, di Indonesia hanya dikenal 3 spesies yaitu: *Abelmoschus moschatus*, *A. esculentus* dan *A. manihot*. *Abelmoschus* adalah kelompok tanaman herbal dengan pertumbuhan cepat, tinggi tanaman sampai 2 meter, panjang daun 20-40 cm, bentuk daun menjari sebanyak 3-7 helai daun (Bourdy dan Walter, 1992). *Abelmoschus* menunjukkan kandungan lendir pada daun segar ketika dipotong-potong kecil (Morris, 2006).

Kemajuan teknologi pada bidang biokimia memungkinkan para ahli melakukan rekayasa secara genetika dengan mengubah susunan asam amino pada DNA dari genus tanaman tertentu untuk membuat tanaman yang lebih unggul dalam bidang farmakologi, pangan, dan pertanian (Hidayati dan Dermawan, 2012). Hal ini memungkinkan hilangnya sumberdaya genetika dari genus tanaman yang sebagian besar belum teridentifikasi (Krismawati dan Sabran, 2004). Suatu metode baru untuk mengidentifikasi dan menganalisis keanekaragaman genetika spesies telah dikembangkan dengan menggunakan potongan gen standar yang dikenal dengan teknik (DNA) barcoding (Kress et al., 2005).

Teknik DNA barcoding pada tumbuhan dapat digunakan sebagai identifikasi dan konfirmasi penemuan spesies baru dan monitoring perubahannya dari waktu ke waktu dengan biaya yang efektif. Teknologi barcoding ini hanya bertujuan untuk mengidentifikasi suatu spesies baik hewan atau tumbuhan dengan metode yang efisien (Cowan et al., 2012).

Untuk mengidentifikasi DNA tanaman telah disepakati menggunakan potongan DNA pendek standar yaitu gen *ribulosa-1,5-bisfosfat karboksilase (rbcL)* dan *maturase K (matK)*. Gen pengkode yang di gunakan adalah gen *matK* karena lebih baik dan lebih akurat dibandingkan gen *rbcL* untuk mengidentifikasi suatu spesies (Kolondam et al., 2012).

Analisis DNA dapat juga dilakukan dengan cara analisis *in-silico*, yang dilakukan dengan menggunakan piranti lunak komputer, yang bertujuan untuk mengetahui hubungan antara struktur, fungsi, dan stabilitas suatu protein sebagai produk gen (Radford and Dobson, 1999). Melalui

hasil analisis *in-silico*, dapat diketahui sifat fisika-kimia suatu protein, sehingga dapat dijadikan studi pendahuluan mengenai manfaat suatu organisme. Misalnya, tumbuhan gedi yang diketahui mempunyai efek farmakologis, terdiri atas 15 spesies (Mamahit, 2009). Masing-masing spesies memiliki keunggulan tersendiri. Melalui analisis *in-silico* tentang protein yang ada dalam tanaman gedi, maka dapat dilakukan studi lanjut tentang efek farmakologis tumbuhan gedi.

Berdasarkan penelusuran data publikasi barcode DNA melalui Barcode of Life Database (BOLD) Systems (www.boldsystems.org), belum ada publikasi yang mencantumkan DNA barcode untuk tumbuhan gedi merah (*Abelmoschus manihot* L.). Selain itu juga belum ada publikasi yang mencantumkan urutan nukleotida *matK* tumbuhan gedi hijau (*Abelmoschus moschatus*) dalam situs National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Berdasarkan tinjauan tersebut, perlu dilakukan pengkodean DNA (DNA barcoding) untuk mengidentifikasi DNA tumbuhan gedi merah dan gedi hijau berdasarkan urutan nukleotida *matK*. Selanjutnya dilakukan analisis *in-silico* untuk mengetahui fungsi fisiologis aktif *MatK* tumbuhan gedi.

2. Metode

2.1. Material

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, hot plate, tabung Eppendorf, mikropipet, inkubator, sentrifugator, alat PCR (Biometra T-personal, Jerman), elektroforesis, spektrofotometer UV-Vis dan freezer.

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 Gedi

Jaringan daun gedi merah dan gedi hijau masing-masing diambil 0,004 gram, dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf kemudian digerus menggunakan penggerus tabung Eppendorf. Sampel daun gedi yang sudah disiapkan dalam tabung Eppendorf diekstraksi menggunakan *InnuPREP Plant DNA kit* (Analytik Jena) sesuai petunjuk manual, dengan menambahkan bufer lisis dan proteinase K. Kemudian diinkubasi selama 45 menit pada suhu 55°C. Setelah itu, sel dipisahkan dengan sentrifugasi selama 1 menit pada 12.000 rpm. Supernatan yang diperoleh dilewatkan melalui kolom bermembran. DNA total yang diperoleh dicuci dari sisa-sisa protein dan garam, selanjutnya dielusikan dalam tabung mikro dan disimpan dalam lemari pembeku dengan suhu -20°C.

2.3. Amplifikasi dengan Polimerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 25 µL. Komposisi dari reaksi PCR yaitu: DNA templat 2 µL, *Firepol Master Mix* 5x 5 µL, primer *forward* matK-1RKIM-f (5'-CGTACAGTACTTTGTGTTTACGAG-3') 1 µL, *Primer Reverse* matK-3FKIM-r (5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3') 1 µL, dd H₂O 16 µL.

Tahapan dalam proses amplifikasi PCR meliputi: Denaturasi DNA (awal) pada suhu 95 °C selama 120 detik, i) denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, ii) *primer annealing* pada suhu 50 °C selama 30 detik, iii) *DNA extension* pada suhu 72 °C selama 50 detik. Ketiga tahapan (i,ii,iii) akan berlangsung dalam siklus sebanyak 35 kali, dan tahap akhir *final extension* pada suhu 72 °C selama 60 detik.

2.4. Pengolahan Data Sekuens dan Analisis Data Secara *In Silico*

Hasil sekuensing DNA disunting menggunakan software Geneious v5.6. dengan langkah sebagai berikut: bagian awal DNA dihapus kira-kira 30bp. Hasil sekuensing menggunakan primer *reverse* (matK-R) dilakukan proses *reverse and complement* kemudian dipadukan dengan hasil sekuens primer *forward* (matK-F) menggunakan MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) oleh Edgar (2004). Sepuluh kerabat terdekat dari *Abelmoschus* yang memiliki kemiripan matK 97-99% (Tabel 1) dianalisis *in-silico*, meliputi: analisis sifat fisika kimia, analisis kandungan asam amino (%), dan penajajaran matK *Abelmoschus* menggunakan piranti lunak *ClustalX* dan divisualisasikan dengan *GeneDoc* (Ratnasingham and Hebert, 2007). Keakuratan amplifikasi gen target yang diuji yaitu gen *matK* diidentifikasi melalui BOLD (*Barcode of Life Database*) Systems. Hasil sekuens dibandingkan dengan GenBank menggunakan BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool. Protein; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

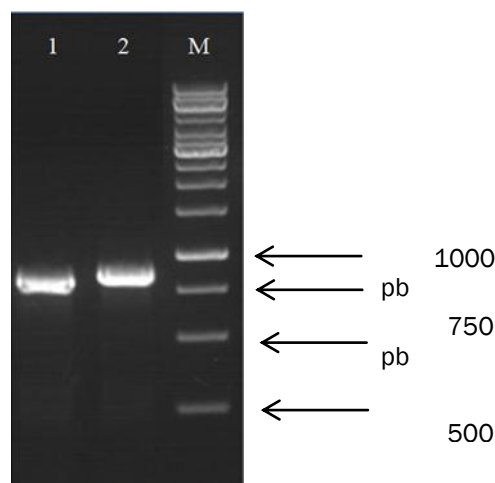
Tabel 1. Protein matK dari tumbuhan yang digunakan untuk analisis *in-silico*

No.	Kode protein	Nama Protein	Organisme
1	AFK09827.1	maturase K	<i>Abelmoschus manihot L</i>
2	ABU85043.1	maturase K	<i>Abelmoschus esculentus</i>
3	ABR14768.1	maturase K	<i>Hibiscus surattensis</i>
4	AAU06170.1	maturase K	<i>Pavonia cauliflora</i>
5	AAU06175.1	maturase K	<i>Malvaviscus arboreus</i>
6	BEA80201.1	maturase	<i>Talipariti tiliaceum</i>
7	BAD89713.1	maturase	<i>Talipariti tiliaceum</i>
8	BAD89703.1	maturase	<i>Talipariti tiliaceum</i>
9	BAD89694.1	maturase	<i>Talipariti glabrum</i>
10	ABR14770.1	maturase K	<i>Kydia calycina</i>

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Amplifikasi dan Sekuensing Gen *matK*

Hasil amplifikasi *matK* gedi merah dan gedi hijau diperlihatkan dalam Gambar 1. Hasil elektroforegram tumbuhan gedi merah dan gedi hijau menunjukkan pita DNA yang terbaca berada di ukuran sekitar 750 – 1000 kb. Keberhasilan amplifikasi dengan PCR dibuktikan dengan proses sekuensing. Hasil sekuensing produk PCR *matK* gedi merah dan gedi hijau memiliki nilai HQ (*high quality*) yang baik, berturut-turut sebesar 93,7% dan 92,7%. Nukleotida yang terbaca dari hasil sekuensing untuk *matK* gedi merah maupun gedi hijau adalah 828 pb.



Gambar 1. Elektroforegram hasil amplifikasi *matK* dengan PCR (1: sampel gedi merah; 2: sampel gedi hijau; M: marker DNA ladder 1 kb)

3.2. Barcode DNA Tumbuhan Gedi Merah dan Gedi Hijau

Barcode DNA gedi merah dan gedi hijau yang ditunjukkan dalam Gambar 2. Dari hasil perbandingan hasil sekuen DNA *barcode* antara gedi merah dan gedi hijau menunjukkan kemiripan yang lestari yaitu sekitar >95%, dan hanya terdapat perbedaan nukleotida pada permulaan sekuen dan akhir sekuen yang disebabkan pada saat pembacaan sekuen DNA pada proses *sequencing* fragmen DNA bertumpuk sehingga tidak terbaca oleh *sequencer* yang ditunjukkan dengan warna abu-abu pada Gambar 2. Hal ini menunjukkan bahwa gen *matK* pada tumbuhan gedi merah dan gedi hijau memiliki tingkat kemiripan yang tinggi.



Gambar 2. Perbandingan sekuens DNA barcode dari tumbuhan gedi merah (YFM) dan gedi hijau dengan (YFH).

3.3. Analisis *In-silico*

3.3.1. Sifat Fisika-Kimia MatK

Sifat fisika kimia MatK masing-masing organisme (dari Tabel 1) ditampilkan dalam Tabel 2. Sifat fisika kimia yang dari protein matK tumbuhan gedi dengan beberapa tanaman lainnya pada Tabel 2 memperlihatkan berat molekul (BM) dari kesepuluh spesies tersebut berkisar antara

20422,1-59904,1 Da. Kesepuluh spesies tanaman tersebut memiliki nilai isoelektrik (pI) lebih dari 7 yang menunjukkan pH dari suatu protein yang berarti bersifat basa. Dari sepuluh protein matK pada tabel diatas menunjukkan nilai GRAVY yang berkisar -0,062 sampai -0,165 yang menunjukkan bahwa kesepuluh protein tersebut membentuk ion negatif dan dalam suasana basa yang tidak larut dalam air.

Tabel 2. Hasil Analisis Sifat fisika kimia matK

No	Protein	BM (Da)	pI	Rumus molekul	JA	II	AI	GRAVY
1	AFK09827.1	20631,8	9,61	$C_{984}H_{1436}N_{238}O_{246}S_3$	2907	37,91	91,62	-0,165
2	ABU85043.1	69910,2	9,51	$C_{2779}H_{4215}N_{725}O_{732}S_{13}$	8464	39,79	96,88	-0,123
3	ABR14768.1	59880,3	9,37		8468	38,81	96,69	-0,123
4	AAU06170.1	59904,1	9,46	$C_{2772}H_{4213}N_{725}O_{737}S_{13}$	8460	40,5	96,88	-0,145
5	AAU06175.1	59793	9,48	$C_{2774}H_{4212}N_{720}O_{735}S_{12}$	8453	39,98	97,86	-0,121
6	BEA80201.1	59917,1	9,43	$C_{2779}H_{4212}N_{720}O_{739}S_{12}$	8462	39,89	96,46	-0,145
7	BAD89713.1	59869	9,43	$C_{2775}H_{4212}N_{720}O_{739}S_{12}$	8458	39,89	97,26	-0,142
8	BAD89703.1	60028,3	9,47	$C_{2785}H_{4225}N_{723}O_{738}S_{12}$	8483	40,77	97,26	-0,143
9	BAD89694.1	59929,1	9,43	$C_{2781}H_{4216}N_{720}O_{738}S_{12}$	8467	39,89	97,26	-0,135
10	ABR14770.1	20422,1	9,21		2684	34,41	86,05	-0,062

Catatan :Bobot molekul (BM), Titik isoelektrik (pI), Jumlah Asam amino (JA) Indeks ketidakstabilan (II), Grand average hydropathy (GRAVY).

3.3.2. Analisis Asam Amino

Berdasarkan analisis komposisi asam amino matK tumbuhan gedi dengan kerabatnya, terlihat residu asam amino leusin (L) yang tinggi pada masing-masing protein matK dari ke sepuluh tumbuhan yaitu 11,1 % - 12,3 % residu asam amino.

Sedangkan residu asam amino yang paling rendah dari ke sepuluh protein adalah sistein (C) dengan residu asam amino 0,6 % - 1,2 %. Pada Protein dengan kode AFK09827.1 (*Abelmoschus manihot*) memiliki residu asam amino fenilalanin (F), lisin (K) dan leusin (L) yang tinggi dari protein lainnya dan tidak memiliki residu asam amino tirosin (Y) dan

valin (V) yaitu 0,0 %. Berdasarkan pada Tabel 3 sebagian besar residu asam amino memiliki kesamaan antara protein dengan kode AFK09827.1

(*Abelmoschus manihot*) dengan kesembilan protein lainnya.

Tabel 3. Analisis komposisi asam amino matK menggunakan *Protparam*

Residu Asam Amino	Komposisi Asam Amino (% mol)									
	Protein matK									
	AFK09827.1	ABU85043.1	ABR14768.1	AAU06170.1	AAU06175.1	BAE80201.1	BAD89713.1	BAD89703.1	BAD89694.1	ABR14770.1
Ala (A)	1.8	3.0	3.0	3.0	3.2	3.0	3.0	3.0	3.0	2.4
Arg (R)	6.0	6.3	6.0	6.5	6.3	6.3	6.3	6.5	6.3	4.8
Asn (N)	5.4	6.0	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.6
Asp (D)	3.6	3.2	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	2.8
Cys (C)	0.6	1.2	1.2	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.6
Gln (Q)	4.8	3.4	3.8	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
Glu (E)	3.0	5.0	5.0	5.0	4.8	5.0	5.0	5.0	5.0	4.6
Gly (G)	2.4	3.4	3.4	3.4	3.6	3.4	3.4	3.2	3.4	3.0
His (H)	2.4	4.2	3.6	4.0	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.2
Ile (I)	6.6	8.7	8.5	8.7	3.7	8.1	8.3	8.3	8.3	7.5
Leu (L)	12.1	12.1	12.1	12.1	12.3	12.3	12.3	12.3	12.3	11.1
Lys (K)	10.2	5.8	6.0	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	4.2
Met (M)	1.8	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Phe (F)	11.4	8.5	8.3	8.1	8.1	8.1	7.9	8.1	8.1	7.3
Pro (P)	1.8	2.8	2.6	2.6	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.6
Ser (S)	3.0	10.9	10.7	11.1	10.9	10.9	11.1	10.9	10.9	8.5
Thr (T)	10.2	2.6	2.8	2.6	2.6	2.8	2.6	2.6	2.6	2.0
Trp (W)	3.6	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.2
Tyr (Y)	0.0	6.0	6.3	6.2	6.3	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0
Val (V)	0.0	4.4	4.6	4.4	4.4	4.8	4.8	4.8	4.8	3.8

4. Kesimpulan

Hasil pengurutan nukleotida DNA *barcode matK* menghasilkan 828 pb untuk tumbuhan gedi merah dan tumbuhan gedi hijau. Dari hasil sekuens DNA *barcode matK* dari gedi merah dan gedi hijau menunjukkan kode *barcode* DNA dari gedi merah dan gedi hijau memiliki tingkat kemiripan yang tinggi, yaitu > 95%. Kesepuluh *matK* tumbuhan gedi yang dianalisis, semuanya bersifat hidrofobik.

Daftar Pustaka

- Bourdy, G. and A. Walter. 1992. Maternity and Medicinal Plants in Vanuatu I. The Cycle of Reproduction. *J. Ethnopharmacology*. **37** : 179-196.
- Cowan, R. S. and M. F. Fay. 2012. *Challenge in The DNA Barcoding of Material Plant*. Springer Science, New York.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Res.* **5** : 1792-1797.
- Hidayati, N. dan R. Dermawan. 2012. Tomat Unggul. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Kolondam, B. J., E. Lengkong dan J. Polii-Mandang. 2012. Barcode DNA Berdasarkan Gen *rbcl* dan *matK* Anggrek Payus Limondok (*Phalus tancarvilleae*). *J. Bioslogos*. **2**: 55-62.

- Krismawati, A. dan E. Sabran. 2004. Pengelolaan sumber daya genetik tanaman obat spesifik kalimantan tengah. *Buletin Plasma Nutrafah*. **12** : 16-23.
- 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. *PNAS*. **102**: 8369-8374.
- Mamahit, L. P. 2009. Satu Senyawa Steroid dari Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L. Medik.) asal Sulawesi Utara. *Chemistry Pogress*. **2** : 33-38.
- Mamahit, L.P dan N.H. Soekamto. 2010. Satu Senyawa Asam Organik yang Diisolasi dari Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L. Medik). *Chemistry Progress*. **3** : 42-45.
- Morris, R. 2006. Plant for A Future: Edible, Medicinal and Useful Plants for A Healthier Word (Online), (www.ptaf.org/database/plants, <http://books.google.co.id>) [diakses 29 april 2014].
- Radford, S. E. and C. M. Dobson. 1999. From Computer Simulations to Human Disease: Emerging Themes in Protein Folding. *Cell*. **97**: 291-296.
- Ratnasingham, S dan PDN. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molec. Ecology Notes*. **7**: 355-364.
- Suoth, E., H. Kaempe dan A. Tampi. 2013. Evaluasi Kandungan Total Polifenol dan Isolasi senyawa Flavonoid Pada Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L.). *Chemistry Pogress*. **6** : 86-91