



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



Isolasi dan Karakterisasi Barcode DNA Tanaman Nusa indah putih (*Mussaenda frondosa*) Berdasarkan Gen *matK*

Jein Damanisa^a, Lidya Irma Momuata^a, Meiske S. Sangia^a, Maureen Kumaunanga^{a*}

^aJurusan Kimia, FMIPA, Unsrat, Manado

KATA KUNCI

tanaman nusa indah putih
matK
Barcode DNA
in-silico

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk menentukan urutan nukleotida dari *barcode* DNA tanaman Nusa indah putih berdasarkan gen *matK* dan mengkarakterisasi *matK* tanaman nusa indah putih dengan analisis *in-silico*. Isolasi DNA dari tanaman Nusa indah putih telah dilakukan berdasarkan manual prosedur dari *InnuPrep Plant DNA kit* yang dilanjutkan dengan amplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer *forward matK-1RKIM-f* dan primer *reverse matK-3FKIM-r* kemudian dielektroforesis dan disekuensing. Sekuensing tanaman Nusa indah putih menghasilkan kromatogram yang berkualitas tinggi, dengan panjang sekuens 843 bp. Hasil Analisis *in-silico* menunjukkan *matK* tanaman nusa indah putih bersifat basa, stabil, dan berinteraksi baik dengan air.

KEYWORDS

nusa indah putih plant
matK
Barcode DNA
in-silico

ABSTRACT

A study to determine the nucleotide sequence of the DNA barcode Nusa indah putih plants based on gene *matK* and to characterize the *matK* of Nusa indah putih plant using *in-silico* analysis had been done. Isolation of DNA from Nusa indah putih plant was conducted by manual procedures of *InnuPrep Plant DNA kit*, followed by amplification using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method using *matK-1RKIM-f* as forward primer and *matK-3FKIM-r* as reverse primer then electrophoresis and sequenced. Nusa indah putih plants sequencing produced a high-quality chromatogram produce, with a length of 843 bp sequences. Results of *in-silico* analysis showed that *matK* Nusa indah putih plant is a base, stable, and well-interacted with water.

TERSEDIA ONLINE

5 Juli 2015

1. Pendahuluan

Nusa indah putih (*Mussaenda frondosa* L) dari famili Rubiaceae tumbuh di berbagai tempat, dan dapat digunakan dalam pengobatan tradisional. Masyarakat menggunakan tanaman ini dengan cara meminum air rebusan daun, bunga, atau akar untuk mengobati berbagai macam penyakit (Heyne, 1987). Ekstrak daun nusa indah putih mengandung sitosterol (Dalimartha, 2009), sedangkan batang memiliki aktifitas antimikroba (Jayasinghe et al., 2002). Teknologi genetika saat ini telah berkembang, sehingga dapat membantu penelitian

khususnya di bidang biokimia, misalnya teknologi deoxyribonucleic acid (DNA) barcoding yang didasarkan pada metode identifikasi spesies makhluk hidup dengan menggunakan potongan DNA pendek (Hebert et al., 2003).

Potongan DNA pendek standar yang digunakan dalam penentuan barcode tumbuhan, adalah gen *ribulosa-1,5-bisfosfat karboksilase (rbcL)* dan gen *maturase K (matK)* (Kress et al., 2005). Gen *matK* lebih sulit di amplifikasi tetapi memberikan resolusi yang lebih tinggi dalam membandingkan spesies tumbuhan, sedangkan gen *rbcL* lebih mudah

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

diampifikasi, akan tetapi resolusinya rendah untuk dapat membedakan beberapa spesies yang berkerabat dekat (Hollingsworth et al., 2009). Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan gen *matK* sebagai gen penanda.

2. Metode

2.1. Material

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, *hot plate*, tabung Eppendorf, mikropipet, termoblok, mikrosentrifugasi, alat PCR (Biometra T-personal, Jerman), elektroforesis, spektrofotometer UV-Vis, UV-Transiluminator dan Lemari pembeku (*freezer*).

Bahan yang digunakan adalah daun nusa indah putih segar yang diperoleh dari kelurahan Paal 4 Manado. Kit untuk isolasi DNA tanaman menggunakan InnuPREP Plant DNA kit (Analytik Jena), *primer forward* dan *reverse*, master mix untuk PCR (5x *Ready-to-Load Master Mix*), agarosa, akuades, dan bufer Tris-borat-EDTA (TBE).

2.2. Prosedur

2.2.1. Isolasi DNA Total Tanaman Nusa indah putih

Sampel daun nusa indah putih yang masih segar dipotong dengan ukuran kira-kira 5 x 5 mm dan digerus dalam tabung Eppendorf. Selanjutnya sampel daun nusa indah putih yang sudah disiapkan dalam tabung Eppendorf ditambahkan *lysis solution* sebanyak 300 µL dan proteinase K sebanyak 25 µL dengan menggunakan mikropipet dan diinversikan beberapa kali agar homogen. Setelah itu, diinkubasi selama 45 menit pada suhu 55 °C menggunakan termoblok dan diinversikan kembali setiap 10 menit. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam prefilter untuk difiltrasi, lalu disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat yang diperoleh ditambahkan *binding solution* sebanyak 200 µL dan dicampurkan. Setelah itu, filtrat dituangkan ke dalam *spin filter* untuk difiltrasi kembali, lalu disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang, dimasukkan *spin filter* ke dalam *receiver tube* dan ditambahkan dengan *washing solution* HS sebanyak 500 µL dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit dan difiltrasi kembali menggunakan *spin filter*. Setelah itu, ditambahkan *washing solution* MS sebanyak 750 µL dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya, filtrat dibuang dan dimasukkan kembali *spin filter* ke dalam *receiver tube* dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. *Spin filter* dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf dan ditambahkan dengan *elution buffer* sebanyak 100 µL dan didiamkan selama 1 menit pada suhu ruang. Selanjutnya disentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit. Sampel DNA disimpan di dalam *freezer* bersuhu -10 °C.

2.2.2. Amplifikasi gen *matK* dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Kolondam et al., 2012).

Reaksi PCR dilakukan untuk amplifikasi gen *matK* menggunakan *primer forward* *matK*-3F (5'-CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G-3') sebanyak 1 µM, *primer reverse* *matK*-1R (5'-ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3') sebanyak 1 µM. Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 25 µL yaitu terdiri dari DNA templat 2 µL, *firepol Master Mix* 5x 5µL, *primer forward* 1µL, *primer reverse* 1µL, dd H₂O 16 µL. Denaturasi awal dilakukan pada suhu 95 °C selama 2 menit. Denaturasi dilakukan pada suhu 95 °C selama 30 detik. Penempelan primer (*annealing*) dilakukan pada suhu 50 °C selama 30 detik. Reaksi polimerisasi dilakukan pada suhu 72 °C selama 1 menit. Siklus ini dilakukan sebanyak 35 kali.

Hasil PCR berupa fragmen DNA kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dan divisualisasi dengan uv-transiluminator. Sampel hasil PCR selanjutnya disekuensing.

2.2.3. Pengolahan dan Analisis Data Urutan Nukleotida secara *In-silico*

Kromatogram DNA hasil sekuensing disunting menggunakan software Geneious v5.6. Bagian awal hasil kromatogram DNA tersebut dihapus kira-kira 30 bp dan untuk pembacaan nukleotida yang keliru diperbaiki berdasarkan tingkat keakuratan yang terbaca.

Hasil sekuensing yang menggunakan primer *reverse* dilakukan proses *reverse* dan *complement* (Drummond et al., 2012). Untuk keakuratan amplifikasi gen target yang diuji yaitu gen *matK*, maka diidentifikasi melalui BOLD (*Barcode of Life Database*) Systems (www.boldsystems.org) (Ratnasingham dan Hebert, 2007). Hasil suntingan sekuens *matK* nusa indah putih, selanjutnya dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk membandingkan urutan sekuens *matK* tanaman nusa indah putih dengan kerabat terdekat di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Selanjutnya, dilakukan penjajaran urutan nukleotida dari tumbuhan tersebut. Setelah itu, dilakukan analisis *in-silico* terhadap *matK* dari 9 kerabat terdekat nusa indah putih, yang meliputi analisis urutan asam amino dan sifat fisika-kimia protein *matK* tanaman nusa indah putih dengan menggunakan program *ProtParam* (<http://expasy.org/protparam/>).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. DNA Total Tanaman Nusa Indah Putih

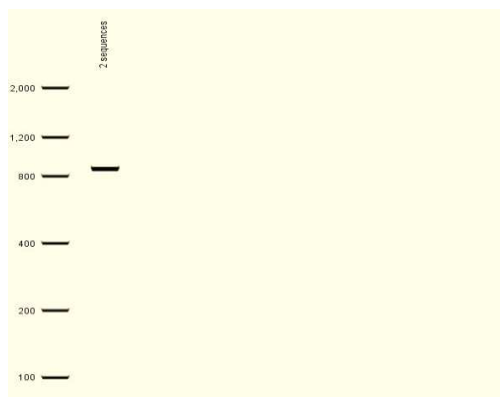
DNA total Tanaman nusa indah putih diperoleh setelah melalui proses isolasi DNA yang telah dilakukan dan menghasilkan larutan jernih yang berwarna kuning muda kehijauan. Isolasi DNA total dilakukan untuk mengamplifikasi gen target *matK* yang terdapat dalam kloroplas. Gambar 1

menunjukkan DNA total dari tanaman nusa indah putih.



Gambar 1. DNA total tanaman nusa indah putih

Hasil PCR tanaman nusa indah putih setelah dielektroforesis menghasilkan fragmen DNA yang ditunjukkan oleh elektroforegram yang tertera pada Gambar 2. Pita DNA yang teramplifikasi yaitu sebanyak 864 bp untuk *primer forward* dan 862 bp untuk *primer reverse*. DNA hasil PCR dari tanaman nusa indah putih selanjutnya disebut gen *matK* tanaman nusa indah putih.



Gambar 2. Elektroforegram hasil amplifikasi *matK* dengan PCR

3.2. Barcode DNA dan Karakteristik Asam Amino

Sekuensing gen *matK* tanaman nusa indah putih menghasilkan kromatogram yang berkualitas

tinggi, dengan nilai *High Quality* (HQ%) kromatogram yang terbaca pada Geneious v5.6 adalah >92,7%. Sekuens *matK* yang teramplifikasi telah dihapus $\pm$ 30 bp untuk *primer forward* dan *primer reverse*, sehingga panjang sekuens menjadi 843 bp. Gambar 3 menunjukkan hasil sekuensing gen *matK* tanaman nusa indah putih, baris bagian atas menunjukkan nukleotida dan baris bagian bawah yang berwarna menunjukkan asam amino. Pada Gambar 3 tidak ada kodon stop yang terbentuk di tengah-tengah sekuens, yang berarti bahwa hasil amplifikasi DNA yang dilakukan bersifat valid.

Sifat-sifat fisika kimia protein *matK* meliputi ukuran (asam amino dan urutan nukleotida), bobot molekul (Da), titik isoelektrik (pI), Indeks ketidakstabilan atau *Instability Index* (II), dan *Grand Average hydropathy* (GRAVY). Hasil analisis sifat fisika kimia protein *matK* tanaman nusa indah putih dengan menggunakan program *ProtParam* yang tersedia dalam situs <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>

Nilai pI teoritis dari protein *matK* tanaman Nusa Indah putih adalah 9.53. Hal ini menunjukkan bahwa Nusa Indah putih bersifat basa, karena memiliki nilai pI lebih dari 7. Nilai pI didefinisikan sebagai pH dimana jumlah muatan negatif yang sama dengan jumlah muatan positif dari suatu protein. Nilai pI < 7 bersifat asam dan > 7 bersifat basa.

Indeks ketidakstabilan (*Instability Index*, II) menunjukkan stabil tidaknya struktur dari protein. Protein yang tidak stabil memiliki indeks ketidakstabilan (II) > 40 dan semua protein yang stabil memiliki indeks ketidakstabilan < 40 (Guruprasad et al., 1990). Nusa indah putih memiliki indeks ketidakstabilan 37.75 sehingga protein tersebut bersifat stabil. Untuk indeks *Grand Average hydropathy* (GRAVY) protein *matK* Nusa indah putih memiliki nilai yang rendah (negatif). Kyte dan Dolittle (1982) mengemukakan bahwa protein yang memiliki nilai indeks GRAVY < -0,4 bersifat larut dalam air. Indeks GRAVY protein *matK* Nusa indah putih pada penelitian ini memiliki nilai < -0,4 yang berarti dapat berinteraksi baik dengan air (hidrofilik).



Gambar 3. Barcode DNA tanaman nusa indah putih

4. Kesimpulan

Gen *matK* *Mussaenda frondosa* yang diamplifikasi dengan PCR memiliki urutan nukleotida 843 bp. Karakteristik fisika kimia protein *matK* *Mussaenda frondosa* adalah bersifat basa, stabil, dan berinteraksi baik dengan air.

Daftar Pustaka

- Dalimartha, S. 2009. *36 Resep Tumbuhan Obat Untuk Menurunkan Kolesterol*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Guruprasad, K., B. V. B. Reddy, and M. W. Pandit. 1990. Correlation Between Stability of A Protein and Its Dipeptide Composition: A Novel Approach for Predicting *In Vivo* Stability of A Protein From Its Primary Sequence. *Protein Engineering*. **4**: 155-161.
- 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.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid III. Yayasan Sarana Wanajaya, Jakarta.
- 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.
- Jayasinghe, L. B., C. P. Jayasooriya. 2002. Bandara BMR. Antimicrobial activity of some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae. *Fitoterapia*. **73**(5): 424-7.
- Kolondam, B. J., E. Lengkong dan J. Polii-Mandang. 2012. Barcode DNA Berdasarkan Gen *rbcL* dan *matK* Anggrek Payus Limondok (*Phalus tancarvilleae*). *Bioslogos*. **2**: 55-62.
- 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.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle. 1982. A Simple Method for Displaying The Hydropathic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.