

ANALISIS SEKUENS DAN FILOGENETIK BEBERAPA TUMBUHAN *Syzygium* (MYRTACEAE) DI SULAWESI UTARA BERDASARKAN GEN *matK*

Presticilla D. Irawan¹⁾ Trina E. Tallei¹⁾ Beivy J. Kolondam¹⁾

¹⁾ Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sam Ratulangi
Jl. Kampus UNSRAT FMIPA, Manado 95115

e-mail: presticilla@ymail.com; trina_tallei@unsrat.ac.id; beivy.kolondam@unsrat.ac.id

ABSTRAK

Syzygium (Myrtaceae) merupakan tumbuhan yang memiliki banyak manfaat di bidang ekonomi dan kesehatan. Informasi dan publikasi mengenai klasifikasi tumbuhan *Syzygium* masih sedikit. Pengelompokan beberapa jenis tumbuhan dalam genus ini masih ditemui masalah, antara lain tumpang tindihnya nama *Syzygium* dengan *Eugenia* dan beberapa tumbuhan belum diketahui posisinya dalam klasifikasi. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis variasi sekuens gen *matK* dan mengkonstruksi pohon filogenetik pada beberapa tumbuhan *Syzygium* di Sulawesi Utara, yaitu pakoba, jamblang dan bombongan. Analisis variasi sekuens menunjukkan adanya perbedaan satu nukleotida antara tumbuhan pakoba dan jamblang, serta perbedaan 5-6 nukleotida antara bombongan dengan jamblang dan pakoba. Selain itu, variasi juga ditunjukkan antara sekuens sampel tumbuhan *Syzygium* dengan sekuens kerabat yang diperoleh dari basis data GenBank yaitu adanya perbedaan 2-3 nukleotida dengan spesies kerabat terdekat dan perbedaan 5-6 nukleotida dengan spesies kerabat terjauh. Hasil perhitungan jarak genetik menggunakan Kimura-2-parameter menunjukkan nilai jarak interspesies kecil, yaitu 0.000-0.011.

Kata Kunci: Variasi Genetik, Gen *matK*, *Syzygium*, Sulawesi Utara.

SEQUENCES AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Syzygium* (MYRTACEAE) PLANTS IN NORTH SULAWESI BASED ON *matK* GENE

ABSTRACT

Syzygium (family: Myrtaceae) is a genus of plants with many benefits in economics and health. Information and publications on the classification of *Syzygium* are still few in number. Grouping several plant species in this genus is still problematic, among other there is overlapping of *Syzygium* and *Eugenia* and the position in the classification of some plants are yet unknown. This study was conducted to analyze the sequences variations of *matK* genes and to construct phylogenetic tree of some *Syzygium* plants found in North Sulawesi, namely pakoba, jamblang and bombongan. There are one nucleotide difference between pakoba and jamblang, as well as 5-6 nucleotide differences between bombongan with jamblang and pakoba. In addition, 2-3 sequence variations also occur between our *Syzygium* samples and their closest allied species and 5-6 nucleotides differences with their farthest allied species, all of which are retrieved from GenBank. Genetic distance calculated using Kimura-2-parameter shows a very low (0.000-0.011) interspecific distance.

Keywords: Genetic Variation, *matK* Gene, *Syzygium*, Sulawesi Utara.

PENDAHULUAN

Syzygium salah satu genus dari suku Myrtaceae (jambu-jambuan), memiliki lebih dari 1000 spesies, dan merupakan tumbuhan utama flora hutan hujan tropis di daerah Malesia (Asif *et al.*, 2013). Di Indonesia, jumlah tumbuhan *Syzygium* mencapai 300 jenis, dan di Jawa terdapat sekitar 60 jenis

(Sunarti, 2015). Banyak anggota dari genus ini memiliki nilai ekonomis dan telah digunakan sebagai obat-obatan, makanan, bahan bangunan, dan tanaman hias. *Syzygium* merupakan genus yang sulit untuk diklasifikasikan karena hanya memiliki sedikit karakter morfologi yang secara konsisten menghubungkan suatu spesies ke dalam kelompok spesies tertentu. Hal ini juga

didukung dengan tumpang tindihnya nama *Syzygium* dengan *Eugenia*. Hingga saat ini hanya relatif sedikit publikasi mengenai klasifikasi *Syzygium* (Craven dan Biffin, 2010).

Identifikasi spesies secara akurat menggunakan metode tradisional bisa memakan waktu yang lama disebabkan kurangnya pengetahuan mengenai tumbuhan dan/atau kurangnya karakter bunga dan buah yang dibutuhkan untuk identifikasi (Colpaert *et al.*, 2005). Identifikasi spesies berbasis sekuens DNA merupakan metode yang dianggap cepat, dapat dipertanggungjawabkan, dan konsisten, sehingga penting dalam penelitian biologi konservasi dan keanekaragaman (Waugh, 2007). Identifikasi dengan sekuens DNA dilakukan menggunakan penanda molekuler. Salah satu penanda molekuler yang saat ini digunakan dalam mengungkapkan taksonomi yaitu kode batang DNA (*DNA barcoding*) yang merupakan urutan sekuens pendek DNA yang dapat menunjukkan variasi genetik dalam suatu spesies (Chippindale *et al.*, 1999). Dalam proses *DNA Barcoding*, gen tertentu dapat digunakan sebagai *marker* dalam pembagian genetik spesies dan rekonstruksi filogenetik. Salah satu gen yang digunakan yaitu *matK* (*Maturase K*), yang merupakan gen kloroplas berukuran sekitar 1500 pasang basa (bp) yang berlokasi di intron *trnK* (Selvaraj *et al.*, 2008; Jethra *et al.*, 2014). Saat ini gen *matK* telah digunakan sebagai alat yang penting untuk memeriksa keanekaragaman genetik intraspesies dan interspesies karena memiliki laju substitusi yang tinggi (Hollingsworth *et al.*, 2011). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan menganalisis variasi sekuens gen *matK* dan membangun pohon filogenetik beberapa jenis *Syzygium* yang ada di Sulawesi Utara, yaitu pakoba, jamblang, dan bombongan.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA menggunakan *Axyprep Multisource Genomic DNA miniprep kit* (Axygen). Modifikasi dilakukan untuk memaksimalkan lisis dengan waktu inkubasi 1 jam dalam suhu 60°C (Kolondam *et al.*, 2013). Bagian sampel yang digunakan dalam ekstraksi yaitu potongan kecil lembaran daun muda.

Amplifikasi Gen *matK* dengan metode PCR dan Sekuensing

Primer gen *matK* yang digunakan yaitu *matK-3F-R* (5'-CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G-3') dan *matK-1R-F* (5'-ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3') yang dirancang oleh Ki-Joong Kim (Kuzmina *et al.*, 2012). Amplifikasi gen *matK* dilakukan di dalam 40 µL reaksi PCR menggunakan 2x KapaTaq PCR MasterMix. Komponen yang dicampur yaitu 20 µL 2X KapaTaq, 1,5µL primer forward, 1,5µL primer reverse, 2 µL templat DNA, dan 15µL ddH₂O (air terdeionisasi) untuk satu kali reaksi. Pengaturan suhu untuk mesin PCR TPersonal (Bimetra) dimulai dengan denaturasi awal (*initial denaturation*) pada 95°C selama 2 menit, 35 siklus yang terdiri atas tahap denaturasi, penempelan primer pada cetakan, dan ekstensi DNA. Suhu dan waktu berturut-turut yaitu 95°C selama 30 detik, 50°C selama 30 detik, dan 72°C selama 50 detik (Tallei *et al.*, 2016). Sekuensing dilakukan oleh penyedia jasa sekuensing *1st BASE Malaysia*.

Analisis Data

Data sekuens dirakit dan diedit menggunakan Genious v 5.6 mengikuti prosedur Tallei dan Kolondam (2015). Proses *pairwise alignment* dilakukan untuk hasil sekuensing menggunakan primer reverse (*matK-1R-f*), kemudian dipadukan dengan hasil sekuensing primer forward (*matK-3F-r*) menggunakan *Global Alignment* yang terintegrasi dalam Geneious. Kedua ujung sekuens dipotong pada saat penjajaran untuk menghindari salah pembacaan sehingga semua sekuens dipotong hingga menyisakan 648 nukleotida. Sekuens *matK* dari sampel digunakan untuk mencari sekuens serupa di *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sekuens-sekuens *matK* kemudian diujarkan menggunakan Multalin v.5.4.1 (multalin.toulouse.inra.fr/multalin/). Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode UPGMA dan jarak genetik dihitung menggunakan metode Kimura's 2-parameter yang terintegrasi di dalam piranti lunak MEGA6 yang dikembangkan oleh Tamura *et al.* (2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

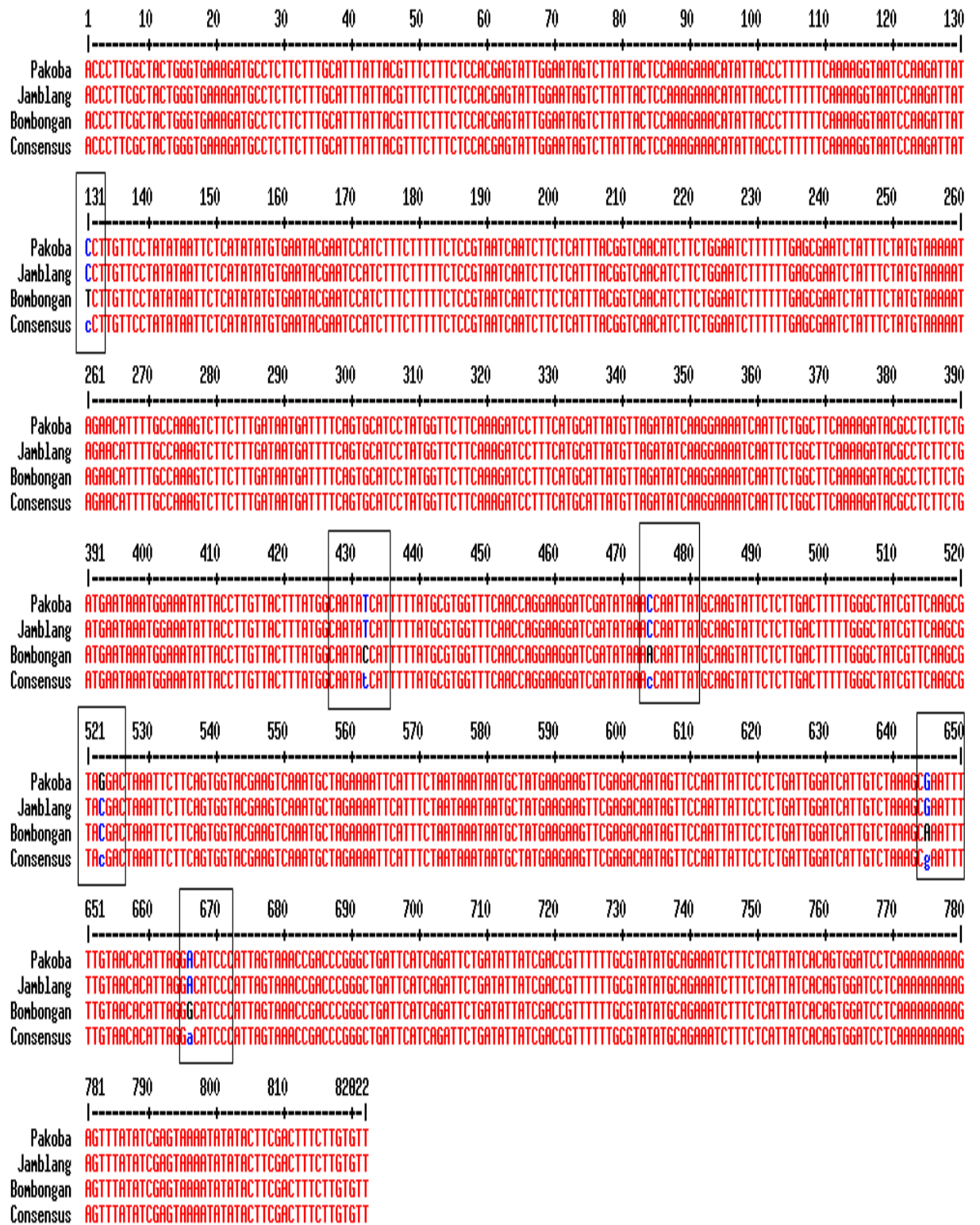
Penjajaran awal dilakukan antara sekuens pakoba, jamblang, dan bombongan. Hasil pada Gambar 1 menunjukkan perbedaan hanya satu nukleotida antara pakoba dan jamblang, yaitu pada posisi ke-523. Perbedaan nukleotida antara bombongan dengan pakoba yaitu sebanyak 6 nukleotida, yaitu pada posisi ke-131, 432, 474, 523, 645, dan 666. Perbedaan nukleotida bombongan dengan jamblang yaitu 5 nukleotida, yaitu pada posisi ke-131, 432, 474, 645, dan 666.

Masing-masing sekuens sampel yang telah diedit menggunakan Geneious digunakan dalam pencarian sekuens kerabat terdekatnya di GenBank (Gambar 2). Dilihat dari perbedaan jumlah variasi nukleotida, spesies yang mendekati kelima sampel tersebut yaitu *Syzygium ngoyense* dan *Syzygium sandwicense*. Perbedaan dua nukleotida terdapat antara *Syzygium ngoyense* dengan jamblang (posisi 77, 612), serta berbeda tiga nukleotida dengan pakoba (posisi 77, 469, 612) dan bombongan (posisi 378, 420, 591). *Syzygium sandwicense* berbeda dua nukleotida dengan sekuens jamblang (posisi 77, 612), serta berbeda tiga nukleotida dengan sekuens pakoba (posisi 77, 469, 612) dan bombongan (posisi 378, 420, 591). Spesies kerabat terjauh dengan ketiga sampel yaitu *Syzygium glenum*, di mana perbedaan sekuens dengan jamblang 5 nukleotida (posisi 77, 387, 416, 612, 613), serta dengan pakoba (posisi 77, 387, 416, 469, 612, 613) dan bombongan (posisi 378, 387, 416, 420, 591, 613) yaitu 6 nukleotida. Hasil penjajaran sekuens jamblang dengan beberapa sekuens *Syzygium cumini* di GenBank (DQ088575, JX495762, GU134997, AB924857, AB924961, AB925017, AB925174, AB925241, AB925007, AB 925038, GU135062, JN 114772) menunjukkan perbedaan 4-10 nukleotida (Gambar 3).

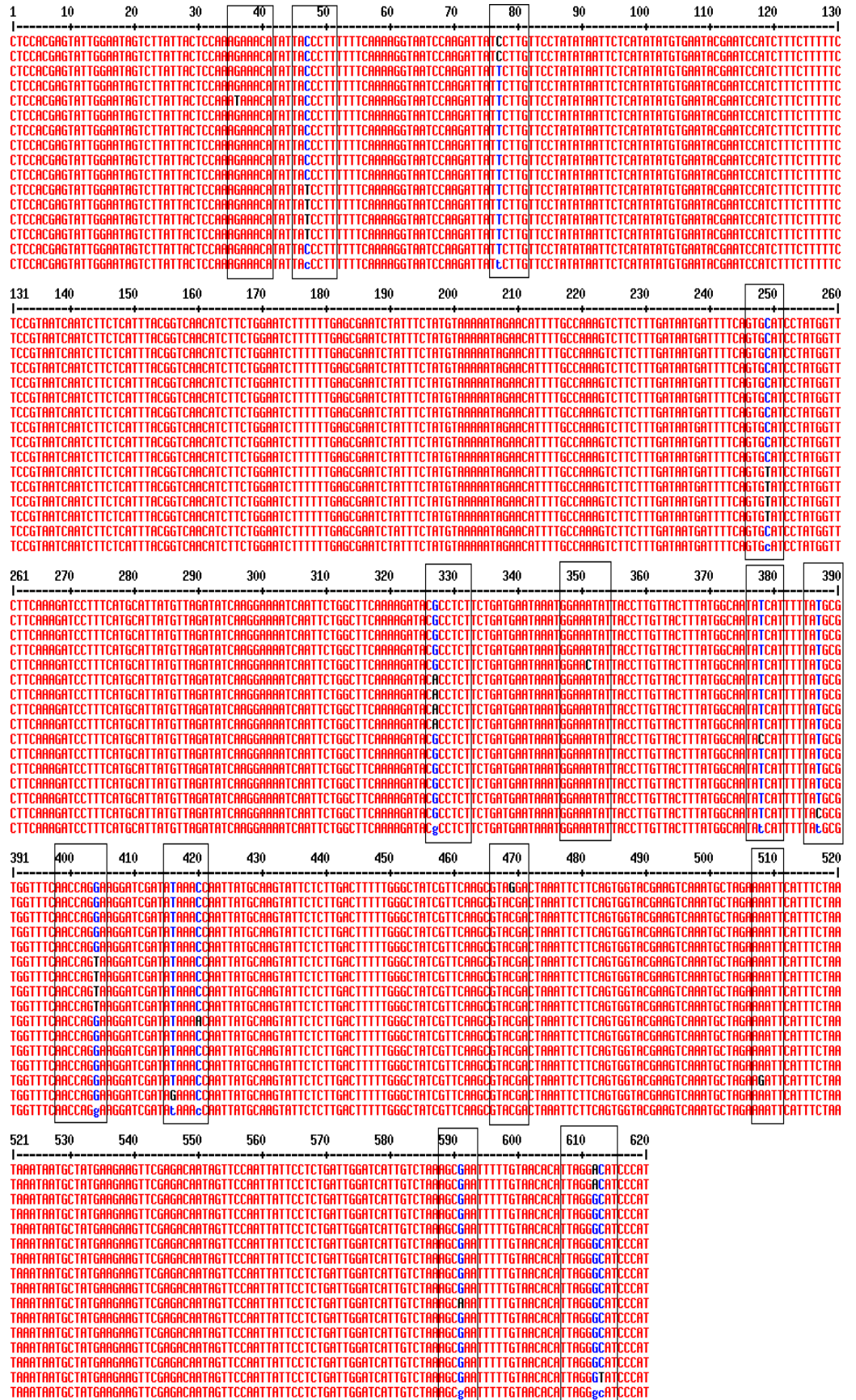
Hasil sekuens dibuat dalam format FASTA untuk konstruksi pohon filogenetik menggunakan MEGA6. Pohon dikonstruksi dengan model UPGMA dan jarak genetik Kimura-2-Parameter. Pada proses pembuatan pohon tersebut, sekuens tumbuhan Myrtaceae lain yaitu *Psidium guajava* (AB354958)

digunakan sebagai *outgroup*. Selain itu sekuens *Eugenia*, yaitu *Eugenia capensis* (KF147400), *Eugenia salamensis* (JQ588488), dan *Eugenia nesiotica* (GQ981989) digunakan untuk memperjelas hubungan dengan *Syzygium* karena penamaan dengan keduanya yang tumpang tindih (Craven dan Biffin, 2010). Pohon tersebut menunjukkan posisi sampel dengan spesies kerabatnya (Gambar 4). Posisi jamblang dengan pakoba dalam pohon filogenetik terletak pada satu klaster, sehingga menunjukkan bahwa keduanya berkerabat dekat. Akan tetapi, posisi *Syzygium cumini* (DQ088575) berada pada klaster yang berbeda, sehingga jamblang tampaknya memiliki kekerabatan yang jauh dari *S. cumini* tersebut. Pohon filogenetik mengindikasikan hubungan yang jauh antara *Eugenia* dengan *Syzygium*.

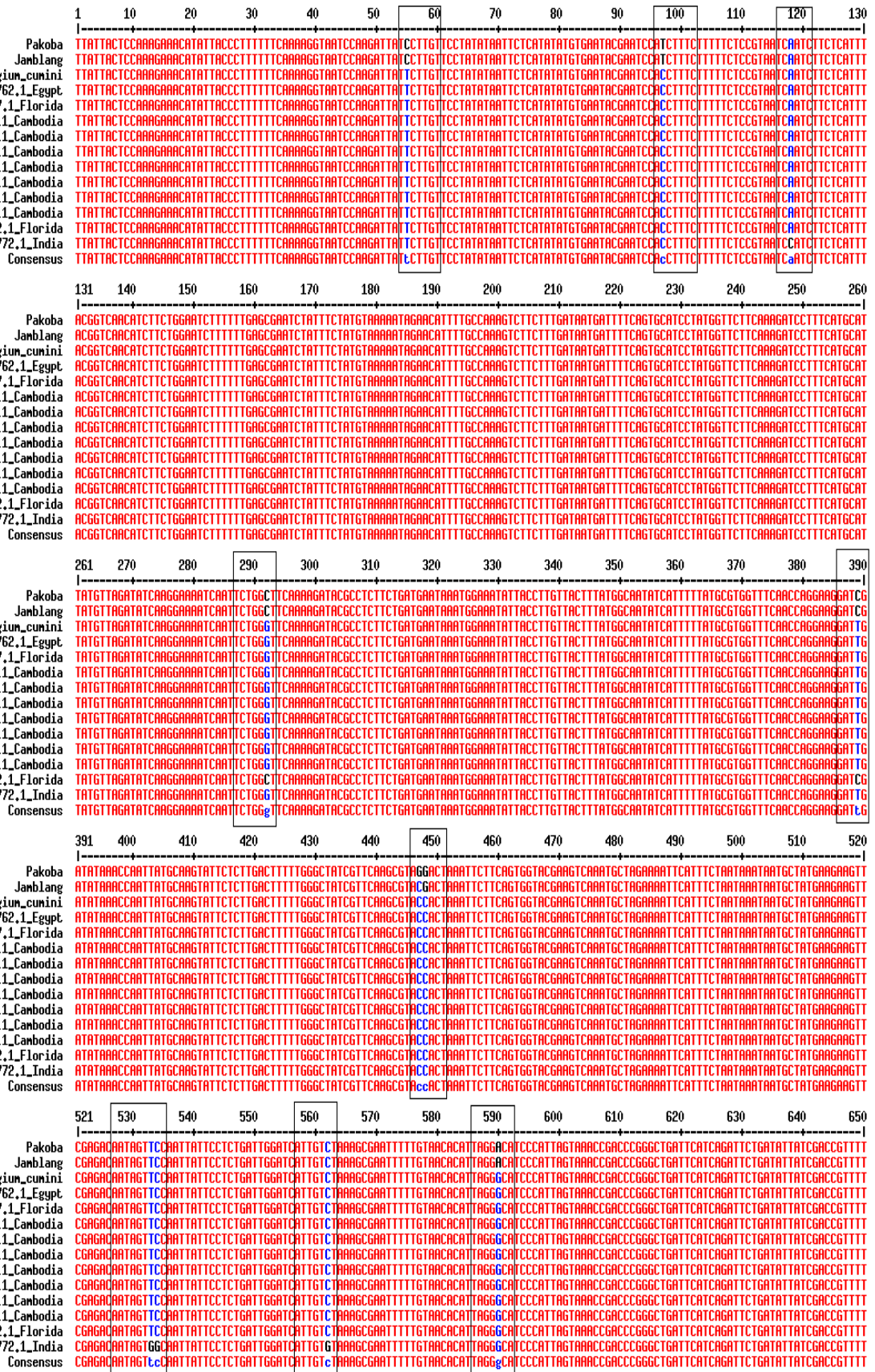
Jarak genetik antara sampel tumbuhan dengan kerabat *Syzygium* dihitung menggunakan metode Kimura-2-Parameter pada MEGA6 (Kimura, 1980). Hasil menunjukkan jarak genetik antara pakoba dan jamblang yaitu 0.002. Menurut Tallei *et al.* (2016), semakin sedikit nilai jarak genetik antara dua organisme, semakin dekat pula hubungan kekerabatan keduanya. Hasil tersebut menandakan bahwa kemungkinan besar tumbuhan pakoba dan jamblang berkerabat dekat, dan bahkan cenderung sebagai spesies yang sama atau merupakan subspecies. Jarak genetik antara jamblang dengan *Syzygium cumini* yaitu 0.010. Nilai ini jauh lebih besar dibandingkan nilai antara pakoba dan jamblang. Nilai jarak genetik antara bombongan dengan *Syzygium* lainnya yang diperoleh dari GenBank berkisar antara 0.005-0.010. Nilai jarak interspesies di antara genus *Syzygium* yaitu 0.000-0.011. Kisaran tersebut sangat kecil dibandingkan dengan hasil jarak genetik interspesies 0.0023-0.0291 untuk tumbuhan *Acacia* (Newmaster dan Ragupathy, 2009), rata-rata jarak genetik interspesies 0.042 ± 0.0030 untuk tumbuhan dari famili Myristicaceae (Newmaster *et al.*, 2008), serta rata-rata jarak genetik interspesies 0.0093 ± 0.0081 untuk tumbuhan Rosaceae (Pang *et al.*, 2010). Berdasarkan hasil tersebut, kemampuan gen *matK* untuk memisahkan tumbuhan *Syzygium* dalam hal ini rendah.



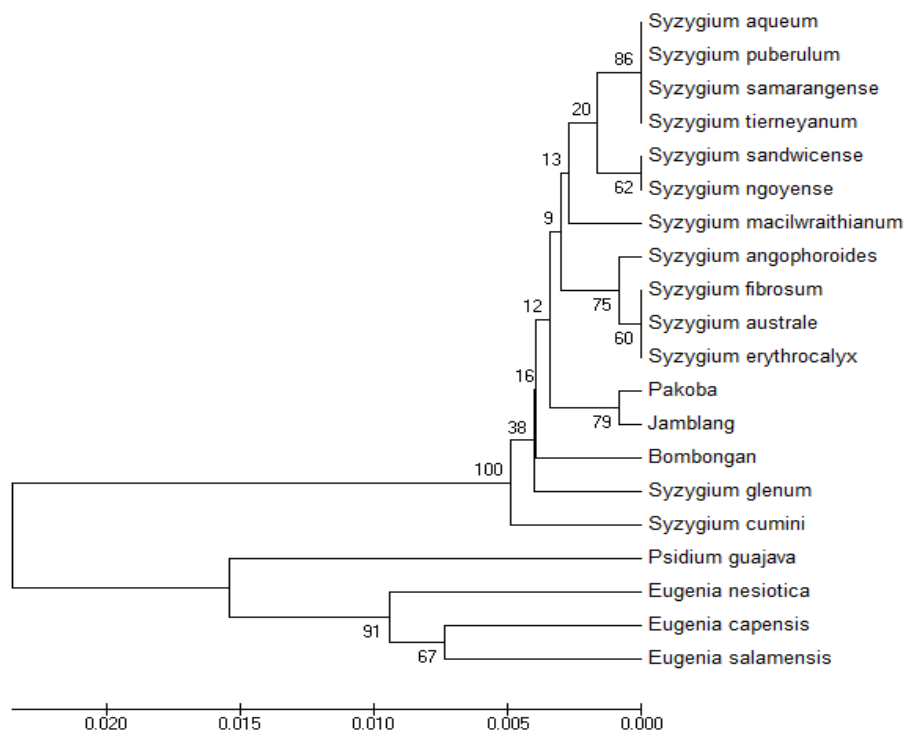
Gambar 1. Penjajaran sekuens gen *matK* tumbuhan *Syzygium* di Sulawesi Utara, yaitu pakoba, jambalang, dan bombongan menggunakan *software* Multalin v5.4.1.



Gambar 2. Penjajaran sekuens gen *matK* tumbuhan *Syzygium* di Sulawesi Utara dengan kerabat terdekat dari genus *Syzygium* yang diperoleh dari GenBank



Gambar 3. Penjajaran sekuens gen *matK* tumbuhan jamblang dengan sekuens *Syzygium cumini* yang diperoleh dari GenBank



Gambar 4. Pohon Filogenetik *Syzygium* yang dikonstruksi menggunakan metode UPGMA dalam software MEGA6

KESIMPULAN

Perbandingan variasi genetik *matK* sampel menunjukkan perbedaan hanya 1 nukleotida antara jamblang dan pakoba, serta perbedaan 5-6 nukleotida antara keduanya dengan bombongan. Perbedaan nukleotida sekuens sampel dengan kerabatnya di GenBank yaitu 2-6 nukleotida. Nilai jarak genetik interspesies *Syzygium* termasuk rendah, yaitu 0.000-0.011.

DAFTAR PUSTAKA

Asif, H., Khan, A., Iqbal, A., Khan, I.A., Heinze, B. 2013. The chloroplast genome sequence of *Syzygium cumini* (L.) and its relationship with other angiosperms. *Tree Genetics & Genomes* 9(3): 867-877.

Chippindale, P.T., Dave, V.K., Whitmore, D.H., Robinson, J.V. 1999. Phylogenetic relationships of North American damselflies of the genus *Ischnura* (Odonata: Zygoptera: Coenagrionidae) based on sequences of three mitochondrial genes.

Molecular Phylogenetics and Evolution 11(1): 110-121.

Colpaert, N., Cavers, S., Bandou, E., Caron, H., Gheysen, G., Lowe, A.J. 2005. Sampling Tissue for DNA Analysis of Trees: Trunk Cambium as an Alternative to Canopy Leaves. *Silvae Genetica* 54(6): 265-269.

Craven, L.A., Biffin, E. 2010. An infrageneric classification of *Syzygium* (Myrtaceae). *Blumea* 55(1): 94-99.

Hollingsworth, P.M., Graham, S.W., Little, D.P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE* 6(5): e19254.

Kolondam, B. J. 2015. Applying *matK* Gene For Identification of Liliopsida Plant Species From North Sulawesi Through Bold Systems. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 6(2): 242-245.

- Kolondam, B.J., Lengkong, E., Polii-Mandang, J., Runtunuwu, S., Pinaria, A. 2013. *Barcode* DNA Anthurium Gelombang Cinta (*Anthurium plowmanii*) berdasarkan gen rbcL dan matK. *BIOSLOGOS* 3(1): 17-25.
- Kuzmina, M.L., Johnson, K.L., Barron, H.R., Herbert, P.D.N., 2012. Identification of vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library. *BMC Ecology* 12 (1):1-11. DOI:10.1186/1472-6785-12-25
- Pang, X., Song, J., Zhu, Y., Xu, H., Huang, L., Chen, S. 2010. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. *Cladistics* 27(2): 165-170.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, A.D., Janovec, J. 2008. Testing candidate plant barcodes regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources* 8(3): 480-490.
- Newmaster, S.G., Ragupathy, S. 2009. Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae). *Molecular Ecology Resources* 9 Suppl s1: 172-180.
- Sunarti, S. 2015. Persebaran *Syzygium* endemik Jawa. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* 1(5): 1093-1098.
- Tallei, T.E., Kolondam, B.J. 2015. DNA Barcoding of Sangehe Nutmeg (*Myristica fragrans*) using matK Gene. *HAYATI Journal of Biosciences* 22(1): 41-47.
- Tallei, T.E., Rembet, R.E., Pelealu, J.J., Kolondam, B.J. 2016. Sequence Variation and Phylogenetic Analysis of *Sansevieria trifasciata* (Asparagaceae). *Bioscience Research* 13(1): 01-07.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729.
- Waugh, J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays* 29(2): 188–197.