

Identifikasi Lamun Di Perairan Pulau Panjang Dan Perairan Pantai Sancang Menggunakan Primer *rbcL* Dan *matK*

Yuanita Prastika Wuri, M. Untung Kurnia A., Titin Herawati
Universitas Padjadjaran

Abstrak

Barkoding merupakan cara mengidentifikasi spesies pada tingkat gen berdasarkan susunan nukleotida masing-masing spesies. Polimerasi DNA hanya dapat dilakukan jika tersedia molekul primer. Dua gen di kloroplas, gen *rbcL* dan *matK* telah disepakati sebagai daerah barkode untuk mengidentifikasi tumbuhan. Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi lamun secara molekuler dan mengetahui efektifitas primer yang digunakan. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari hingga September 2015, terdiri dari pengambilan sampel, isolasi DNA, dan PCR. Identifikasi morfologi menunjukkan lamun yang berada di Pantai Sancang diduga spesies *Cymodocea rotundata* dan *Thalassia hemprichii*. Sedangkan lamun yang berada di Pulau Panjang diduga spesies *Cymodocea serrulata* dan *Enhalus acoroides*. DNA keempat sampel lamun berhasil diisolasi menggunakan metode CTAB dengan hasil kemurnian genom menggunakan spektrofotometer menunjukkan semua sampel memiliki rasio dibawah 1,8, yaitu untuk sampel YPW01 sebesar 1,369; YPW02 sebesar 1,192; YPW03 sebesar 1,397; dan YPW04 sebesar 1,267. Namun keempat tidak dapat teramplifikasi dengan primer *rbcL* maupun *matK*. Hal ini diduga karena kondisi kualitas genom yang kurang baik atau kemungkinan tidak komplemen antara sekuen primer dengan DNA target genom akibat mutasi.

Kata kunci : Barkoding, DNA lamun, *matK*, PCR, *primer rbcL*.

Abstract

Barcoding is a technique of identifying species at the level of genes based on nucleotide composition of each species. The polymerization of DNA can only be made if primers are available. Two genes in chloroplast DNA, *rbcL* and *matK* are agreed as a barcode area to identify plants. The purposes of this research is to identify seagrass by the molecular approach and know the effectiveness primers. The research was carried out in February to September 2015, consists of sampling, isolation of DNA, and PCR. Identification of morphology showed seagrasses on the beach Sancang were *Cymodocea rotundata* and *Thalassia hemprichii*. While the seagrass that were on Panjang Island were *Cymodocea serrulata* and *Enhalus acoroides*. All four DNA sample were isolated using CTAB method with the results of the genome purity using a spectrophotometer demonstrated ratio under 1.8, namely for sample YPW01 of 1,369; YPW02 of 1,192; YPW03 of 1,397; and YPW04 of 1,267. All DNA sample was not able to amplified using primers *rbcL* or *matK*. This is allegedly due to the poor quality of the genomes or the possibility of uncomplementary of primers with the DNA target due to mutations.

Keywords : Barcoding, DNA of seagrass, *matK*, PCR, *primer rbcL*.

Pendahuluan

Penelitian mengenai lamun di perairan Indonesia baru muncul beberapa tahun terakhir, sehingga penelitian mengenai lamun masih sangat sedikit bila dibandingkan dengan penelitian tentang mangrove dan terumbu karang. Romimohtarto dan Juwanda (2000) mengatakan bahwa di dunia ditemukan sekitar 50 jenis lamun yang tumbuh di perairan laut dangkal yang berpasir dan berlumpur atau pasir. Di Indonesia terdapat 12 jenis lamun yaitu: *Enhalus ocoroides*, *Halopila ovalis*, *Halopila minor*, *Halopila spinulosa*, *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea rotunda*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule pinifolia*, *Halodule uninervis*, *Syringodium isoetifolium*, dan *Thalassodendrom ciliatum*.

Secara geografis Pulau Panjang merupakan salah satu pulau yang berada di utara Pulau Jawa yaitu berada di Kabupaten Serang, Banten. Sedangkan Pantai Sancang secara geografis terletak di selatan Pulau Jawa yang langsung berbatasan dengan Samudera Hindia. Lokasi Pantai Sancang terletak di Kecamatan Cibalong, Kabupaten Garut, Jawa Barat. Dari dua lokasi yang berjauhan jaraknya, tidak menutup kemungkinan tingkat kekerabatan antar spesies lamun tersebut bedekatan. Karena diketahui ciri khusus reproduksi lamun yaitu melakukan penyerbukan di dalam air. Sifat air laut yang memiliki pasang surut serta mempunyai siklus arus, memungkinkan terjadi penyerbukan di tempat yang berbeda jauh karena terbawa arus air laut.

Berdasarkan hal tersebut perlu kiranya diteliti fenomena genetik yang menyangkut hubungan filogenetik dan keragaman genetik lamun yang ada di Pantai Sancang dan Pulau Panjang. Menurut Haymer (1994) dalam Riyantini (2014), tingkat keanekaragaman genetik dari organisme dapat dilakukan dengan analisis DNA.

Identifikasi lamun menggunakan teknik barkoding di Indonesia belum banyak digunakan. Herbert (2003) dalam Kusumasari (2014) mengatakan bahwa DNA barkode sebagai cara untuk mengidentifikasi spesies dengan menggunakan wilayah gen yang paling efektif untuk mengidentifikasi spesies. Gen yang digunakan dalam standar barkode untuk hampir semua kelompok hewan adalah COI (*Cytochrome oxidase I*). Gen COI terbukti efektif dalam mengidentifikasi burung, kupu-

kupu, ikan dan banyak kelompok hewan lainnya. Namun, gen COI bukan merupakan barkode yang efektif pada tumbuhan karena rendahnya tingkat perubahan sekuen dan variabilitas yang rendah antar spesies, tapi dua gen di kloroplas, gen *matK* dan gen *rbcL*, telah disepakati sebagai daerah barkode untuk mengidentifikasi tumbuhan.

Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu lamun, air tawar, *silica gel*, sel agarose, KAPA 2G Fast Ready Mix dan NFW. Sedangkan alat yang digunakan selama penelitian adalah gunting, tisu, *ziplock*, spektrofotometer, PCR dan kamera.

Pengambilan sampel dilakukan secara acak di Pulau Panjang dan Pantai Sancang. Daun muda sekitar 3-5 cm digunting kemudian di bilas menggunakan air tawar, kemudian dikeringkan menggunakan tisu, lalu dimasukkan ke dalam *ziplock* berisi *silica gel*. Sampel lamun yang diambil diberi kode YPW01, YPW02, YPW03 dan YPW04.

Ekstraksi DNA menggunakan metode CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) hasil modifikasi Anggraeni (2007) dan IBRC (2014). Kuantitas DNA dilihat menggunakan metode elektroforesis 1% agarose untuk hasil isolasi DNA dan 1,4% untuk hasil PCR. Sedangkan kuantitas DNA diukur menggunakan spektrofotometer.

Metode amplifikasi DNA, menggunakan PCR dengan urutan sekuen berdasarkan Lucas et al (2012), untuk gen *rbcL* sebesar 899 bp yaitu P609 5'-GTA AAA TCA AGT CCA CCRCG-'3 dan P610 5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-'3 sedangkan untuk gen *matK* sebesar 945 bp yaitu P646 5'-TAA TTT ACG ATC AAT TCA TTC-3'dan P647 5'-GTT CTA GCA CAA GAA AGT CG-3'. Komposisi PCR yang digunakan adalah 12,5 µL KAPA 2G Fast Ready Mix, 1,25-2,5 µL untuk masing-masing primer forward dan reverse, 1-2 µL DNA template kemudian ditambahkan NFW hingga volume sebanyak 25 µL. Siklus yang digunakan yaitu denaturasi awal dengan suhu 95° C selama 5 menit, denaturasi dengan suhu

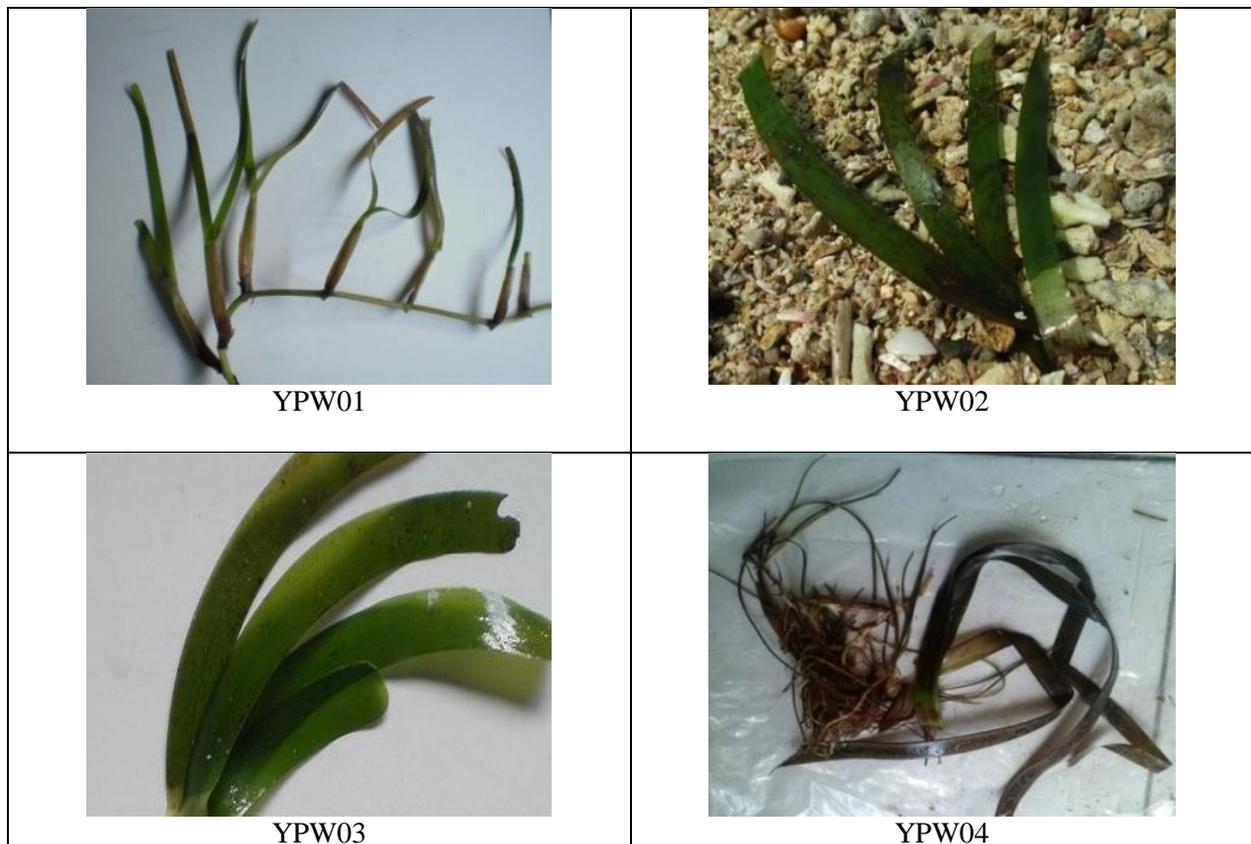
94° C selama 30 detik, annealing untuk primer *rbcL* adalah 55° C selama 35 detik dan untuk primer *matK* adalah 50° C selama 40 detik, extension dengan suhu 70° C selama 1 menit, final extension dengan suhu 72°C selama 8

menit. Hasil visualisasi isolasi genom dan PCR menggunakan metode elektroforesis dengan konsentrasi gel 1% untuk DNA genom dan 1-1,4% untuk hasil PCR.

Hasil dan Pembahasan

Keempat sampel melalui proses identifikasi secara fenotip di lapangan dan pengambilan gambar lamun menggunakan kamera. Identifikasi secara fenotip dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi. Pengamatan morfologi merujuk pada Azkab (1999) meliputi bentuk daun, bentuk ujung daun, jumlah tulang daun.

Di Pantai Sancang dan di Pulau Panjang masing-masing ditemukan 2 spesies. Lokasi pengambilan sampel lamun di Pantai Sancang dilakukan pada koordinat 07°73'91.3'' S dan 107°88'27.9'' E. Sampel dari Pantai Sancang diberi kode YPW01 dan YPW02, sedangkan sampel dari Pulau Panjang diberi kode YPW03 dan YPW04.



Gambar 1. Sampel Lamun

Sampel dengan kode YPW01 memiliki ciri morfologi daun yang ramping sekitar 4 mm dengan ujung daun berbentuk oval, permukaan daun yang halus, dan daun yang licin. Tulang daun vertikal sejajar dengan tegak daun dan rata-rata berjumlah 10. Ciri seperti ini diduga YPW01 adalah spesies *Cymodocea rotundata*. Ciri morfologi yang dimiliki kode sampel YPW02 yaitu tekstur

daun yang lebih kaku dan tebal. Walaupun daun bertekstur kaku, tetapi tidak memiliki rambut seperti ciri spesies *Enhalus acoroides*. Panjang daun sekitar 10 cm dan lebar tulang daun kisaran 0,4-1 cm. Berdasarkan ciri morfologinya tersebut diduga sampel YPW02 sebagai spesies *Thalassia hemprichii*.

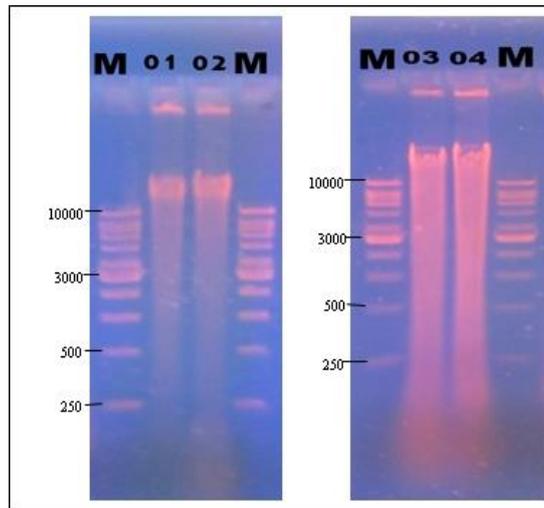
Sampel dengan kode YPW03 bercirikan ujung daun berbentuk oval dan

bergergi di pinggirannya, bentuk daun lebih lebar daripada sampel YPW01. Jumlah tulang daun juga lebih banyak, rata-rata sekitar 14 tulang daun, dan panjang daun lebih pendek daripada sampel YPW01. Dengan ciri tersebut diduga YPW03 merupakan *Cymodocea serrulata*.

Sampel YPW04 terlihat jelas sangat berbeda dengan yang lainnya sehingga mudah dikenali secara visual, berukuran paling besar dibandingkan dengan jenis lainnya, bercirikan daun bertepi rata dengan panjang sekitar 30-40 cm, tebal, dan kaku. Lebar daun lebih

dari 1 cm. Sampel YPW04 memiliki rimpang berdiameter lebih dari 1 cm dengan rambut-rambut kaku. Dengan ciri tersebut diduga sampel YPW04 adalah *Enhalus acoroides*.

Metode isolasi yang digunakan adalah metode CTAB hasil modifikasi Anggraeni (2007) dan IBRC (2014). Metode ini terbilang cukup efektif untuk mengisolasi DNA tumbuhan. Empat sampel lamun (YPW01, YPW02, YPW03, dan YPW04) yang telah diisolasi kemudian di elektroforesis dengan gel 1% dan menghasilkan visualisasi sebagai berikut:



Gambar 2. Elektroforesis Hasil Isolasi DNA Genom

Keterangan: M=Marker (DNA Ladder); 01=YPW01; 02=YPW02; 03=YPW03; 04=YPW04

Berdasarkan hasil elektroforesis (Gambar 1) tersebut dapat diketahui bahwa DNA sampel telah berhasil diisolasi. Namun dari hasil isolasi tersebut terlihat adanya smear pada sampel YPW03 dan YPW04. Artinya DNA masih belum murni atau terjadi degradasi DNA. Menurut Ayuningrum (2012) ketidakmurnian DNA dapat terjadi karena masih banyak kontaminan yang belum tercuci atau hilang saat ekstraksi DNA. Semakin

sedikit atau tidak adanya smear menunjukkan semakin baik kualitas DNA.

Elektroforesis pada gel agarose setelah proses isolasi genom DNA dilakukannya untuk memeriksa integritas DNA. Secara kasar gambaran yang diperoleh dari elektroforesis pada gel agarose tersebut juga dapat digunakan untuk menaksir konsentrasi kemurnian DNA dengan menggunakan spektrofotometer UV. Spektrometer perhitungan kemurnian DNA dapat dilihat dalam Tabel 1 berikut:

Tabel 1. Hasil Perhitungan Kemurnian DNA Genom Lamun

No.	Sampel	Abs 260 nm	Abs 280 nm	Rasio
1	YPW01	0,230	0,168	1,369
2	YPW02	0,186	0,156	1,192
3	YPW03	0,274	0,196	1,397
4	YPW04	0,057	0,045	1,267

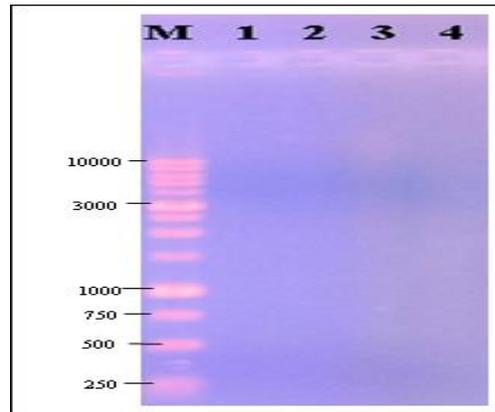
Berdasarkan hasil perhitungan kemurnian DNA genom yang dihasilkan dapat diketahui bahwa DNA genom yang dimiliki

oleh seluruh sampel dibawah 1,8, maka dapat dikatakan bahwa DNA genom masih kurang murni atau masih terdapat banyak pengotor

seperti protein atau lemak dalam sampel. Rasio paling tinggi yaitu 1,397 yang didapat dari sampel dengan kode YPW03. Sedangkan rasio paling rendah didapat dari sampel dengan kode YPW02 yaitu hanya sebesar 1,192.

Amplifikasi DNA menggunakan gen *rbcL* selain optimasi suhu annealing, juga dilakukan beberapa kali waktu *annealing* serta

suhu dan waktu siklus lainnya. Optimasi didasarkan pada protokol KAPA 2G Fast Ready Mix with Dye dan berdasarkan penelitian tentang barkoding lamun milik Kusumasari (2014) dan Lucas *et al* (2012). Namun pada beberapa kali percobaan tersebut, proses amplifikasi tidak juga menunjukkan hasil yang positif (Gambar 3).



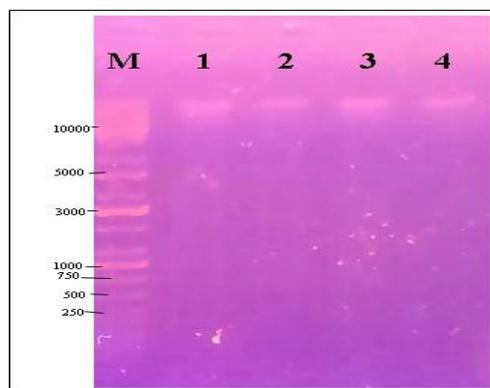
Gambar 3. Elektroforesis Hasil Amplifikasi Gen *rbcL* Pada Suhu *Annealing* 55°C

Keterangan: M=Marker; 1=YPW01, 2=YPW03, 3=YPW04

Berdasarkan Gambar 2, dapat dilihat dengan tidak terbentuknya pita dan tidak terdapatnya *smear* dari proses PCR. Terdapat beberapa faktor yang menyebabkan tidak berhasilnya amplifikasi PCR, yaitu komposisi PCR (kerusakan pada Master Mix), suhu *annealing*, *primer* yang rusak, dan atau kualitas DNA yang kurang baik. DNA yang permuniannya tidak sempurna kemungkinan masih mengandung polisakarida, senyawa fenolik atau kontaminan lain. Menurut Weeden *et al* (1992) dalam Pharmawati (2009), kontaminan dalam jumlah signifikan dapat mempengaruhi penempelan *primer* pada DNA

setan. Kandungan fenol, tanin, dan metabolit sekunder pada tumbuhan dapat mempengaruhi ekstraksi DNA dan akhirnya dapat mempengaruhi karakterisasi melalui PCR.

Selain memakai gen *rbcL*, amplifikasi DNA juga dilakukan dengan gen *matK*. Sama halnya dengan percobaan pada gen *rbcL*, pada gen *matK* ini juga telah melalui beberapa kali proses PCR dengan berbagai suhu *annealing* yang berbeda, namun pada penelitian kali ini sampel dengan kode YPW01, YPW02, YPW03, dan YPW04 juga tidak berhasil diamplifikasi, dibuktikan dengan hasil elektroforesis (Gambar 4).



Gambar 4. Elektroforesis Hasil Amplifikasi Gen *matK* pada Suhu *Annealing* 50°C

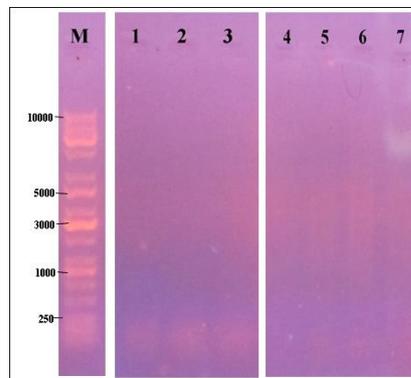
Keterangan: M=Marker; 1=YPW01; 2=YPW02; 3=YPW03; 4=YPW04

Selain faktor konsentrasi DNA yang kurang baik, bahan yang digunakan dalam komposisi PCR juga mempengaruhi hasilnya. *Band* yang tidak muncul pada penelitian kali ini dapat disebabkan tidak menempelnya *primer* pada situs penempelan *primer*.

Berdasarkan hasil PCR gen *rbcL* dan *matK* yang tidak dapat teramplifikasi, maka dilakukan pengecekan kesalahan menggunakan kontrol positif. Pengecekan dilakukan dengan cara keempat sampel (YPW01, YPW02, YPW03, dan YPW04) diamplifikasi menggunakan *primer rbcL* (R-753 dan F-777) dengan urutan sekuen yang berbeda yaitu R-753 dengan urutan basa GCT CTT TCA TAC ATA TCT TCC dan F-577 dengan urutan basa GTA TAT GAA GGT CTA AAA GGT GG yang digunakan untuk tanaman laut juga yaitu rumput laut yang sudah terbukti dapat mengamplifikasi sampel rumput laut dengan baik dengan DNA target sekitar 200 bp. Kemudian dilakukan juga pengecekan dengan cara DNA genom rumput laut yang telah terbukti positif dapat teramplifikasi dengan baik. Hal ini dapat membantu untuk mengetahui dimana masalah yang sebenarnya sehingga keempat sampel lamun yang dimiliki

tidak dapat teramplifikasi, padahal sudah terbukti dari 3 penelitian terdahulu yang ada, gen *rbcL* dan *matK* dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA lamun pada penelitian-penelitian sebelumnya mengenai barkoding lamun.

Pengecekan menggunakan *primer rbcL* (R-753 dan F-777) dengan urutan basa berbeda ini dilakukan karena gen tersebut masih dalam gen yang digunakan untuk mengamplifikasi tanaman, terlebih lagi telah berhasil mengamplifikasi DNA genom rumput laut yang merupakan salah satu tanaman yang juga hidup di laut seperti lamun. Oleh karena itu dianggap mungkin dapat mengamplifikasi DNA lamun juga, guna pengecekan apakah ada kerusakan pada *primer rbcL* (P609 dan P610) dan *matK* yang dipakai. *Primer rbcL* (P609 dan P610) juga digunakan dalam pengecekan ini. Sampel rumput laut yang sudah terbukti positif dalam keadaan baik diamplifikasi menggunakan *primer rbcL* (P609 dan P610) dengan 3 suhu *annealing* yang berbeda (55°C, 56°C, dan 57°C), dilakukan untuk mengecek apakah genom sampel lamun yang dimiliki dalam keadaan baik atau tidak.



Gambar 5. Hasil Elektroforesis Pengecekan Dengan Kontrol Positif

Keterangan:

M = Marker

1 = Genom rumput laut memakai *primer rbcL* (P609&P610) dengan suhu *annealing* 55°C

2 = Genom rumput laut memakai *primer rbcL* (P609&P610) dengan suhu *annealing* 56°C

3 = Genom rumput laut memakai *primer rbcL* (P609&P610) dengan suhu *annealing* 57°C

4= Sampel YPW01 dengan *primer rbcL* (R-753 & F-777)

5= Sampel YPW02 dengan *primer rbcL* (R-753 & F-777)

6= Sampel YPW03 dengan *primer rbcL* (R-753 & F-777)

7= Sampel YPW04 dengan *primer rbcL* (R-753 & F-777)

Gambar 4 menunjukkan bahwa *primer rbcL* (P609 dan P610) dalam kondisi baik, dengan terlihatnya terbentuk dimer pada jajaran *band* terbawah. Hal ini menandakan *primer* tidak rusak yang seharusnya dapat

mengamplifikasi genom lamun yang dimiliki (Sampel YPW01, YPW02, YPW03 dan YPW04). Kemudian pengecekan kualitas genom, terlihat pada Gambar 28, nomor 4, 5, 6, dan 7 yang merupakan genom lamun yang

dimiliki, tidak juga dapat teramplifikasi oleh primer *rbcL* (R-753 dan F-777), hal ini diduga karena primer memang tidak dapat mengamplifikasi genom lamun atau genom lamun yang dihasilkan berkualitas kurang baik.

Berdasarkan hasil pengecekan dengan kontrol positif ini, dapat diketahui bahwa kondisi primer dalam keadaan baik, yang menandakan bahwa kondisi kualitas genom lamun yang kurang baik sehingga primer spesifik seperti *rbcL* dan *matK* tidak dapat bekerja maksimal mengamplifikasi. Masih tingginya kandungan protein atau fenol yang ada dalam genom lamun diduga menjadi

penyebab tidak dapatnya genom teramplifikasi. Atau adanya kemungkinan memang tidak komplemennya sekuen primer dengan daerah target genom akibat adanya mutasi. Diduga pada sampel lamun dalam penelitian ini memiliki titik mutasi yang lebih banyak dari peneliti sebelumnya seperti Lucas *et al* (2012) sehingga terjadinya perubahan basa nitrogen yang terlalu banyak pada DNA target yang akan memberikan variasi sekuen, mengakibatkan gen *rbcL* dan *matK* tidak mampu mentoleransi lagi untuk menempelkan dirinya pada DNA target.

Simpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa identifikasi morfologi, sampel YPW01 diduga *Cymodocea rotundata*, YPW02 diduga *Thalassia hemprichii*, sampel YPW03 diduga *Cymodocea serrulata*, dan YPW04 diduga *Enhalus acoroides*. DNA genom dari sampel YPW01, YPW02, YPW03, dan YPW04 berhasil diisolasi menggunakan metode CTAB

dengan konsentrasi DNA sebesar 1,369; 1,192; 1,397; dan 1,267 untuk masing-masing sampel. Namun gen *rbcL* dan *matK* tidak dapat diamplifikasi dari genom sampel YPW01, YPW02, YPW03, dan YPW04. Kualitas DNA genom yang kurang baik atau adanya kemungkinan memang tidak komplemennya sekuen primer dengan daerah target genom akibat adanya mutasi diduga menjadi alasan keempat sampel tidak dapat teramplifikasi.

Daftar Pustaka

Azkab, M. Husni. 1999. *Pedoman Inventarisasi Lamun*. Oseana Volume XXIV Nomor 1.

IBRC. 2014. *Indonesian Research Center*. Denpasar.

Kusumasari, Andini. 2014. *Identifikasi Lamun Menggunakan DNA Kloroplas Gen *rbcl* (Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase) dan Gen *matK* (Megakaryocyte-associated Tyrosine Kinase) dari Perairan Kabupaten Malang dan Kabupaten Lamongan*. SKRIPSI. Universitas Brawijaya. Malang.

Lucas, Christina., T. Thangaradjou., J. Pepenbrock. 2012. *Development of DNA Barcoding System for Seagrasses: Successful but not Simple*. Plos One. United States of America.

Riyantini, Indah, Yuniar Mulyani, dan M. Untung K. A. 2014. *Hubungan Filogenetik Molekuler Beberapa Jenis Mangrove di Pulau Penjarangan, Ujung Kulon, Provinsi Banten*. Jurnal Akuatika Vol. V No. 1.

Romimohtarto, K. dan S. Juwanda. 2000. *Biologi Laut Ilmu Pengetahuan Tentang Biota Laut*. Djambatan. Jakarta.