



Biogenerasi Vol 10 No 1, 2024

Biogenerasi

Jurnal Pendidikan Biologi

<https://e-journal.my.id/biogenerasi>



IDENTIFIKASI DNA BARCODING TUMBUHAN BALAKKA (*Phyllanthus emblica* L.) BERDASARKAN LOKUS GEN *rbcL*

Zahratul Idami, Universitas Islam Negeri Sumatera Utara, Indonesia

E-mail: zahratulidami@uinsu.ac.id

Abstract

This study aims to identify DNA barcodes with the *rbcL* gene locus and reconstruct the phylogenetic relationship of the Balakka plant with species belonging to the genus *Phyllanthus*. This research includes experimental research by isolating DNA, amplification DNA using *rbcL* gene as primer, electrophoresis and sequencing. DNA was isolated with a commercial kit, amplification was carried out using the Polymerase Chain Reaction method. Sequence results and phylogenetic tree reconstruction were analyzed by Bioinformatics (MEGA 11). The results showed that the number of amplicons from the consensus of the two primers on the balakka plant sample was 557 bp. The phylogenetic tree of the Balakka sequence formed a sister clade with *Phyllanthus emblica* KY9888320.1 with 66% similarity, and *P. emblica* grouped together, but still had common ancestor branches with other species of the *Phyllanthus* genus using the Neighbor-Joining method, and Kimura 2-parameter calculations.

Keywords: DNA Barcoding, *rbcL*, *Phyllanthus emblica*, Phylogenetic

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi barcode DNA dengan lokus gen *rbcL* dan merekonstruksi hubungan filogenetik dari tumbuhan Balakka dengan spesies anggota genus *Phyllanthus*. Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental dengan cara mengisolasi DNA, amplifikasi DNA menggunakan primer gen *rbcL*, elektroforesis dan sekuensing. DNA tumbuhan diisolasi dengan kit komersial, amplifikasi dilakukan dengan metode Polymerase Chain Reaction. Hasil sekuen dan rekonstruksi pohon filogenetik dianalisis dengan Bioinformatika (MEGA 11). Hasil penelitian menunjukkan jumlah ampikon hasil konsensus kedua primer terhadap sampel tumbuhan balakka didapatkan sebesar 557 bp. Pohon filogenetik sekuen Balakka membentuk *sister clade* dengan *Phyllanthus emblica* KY9888320.1 dengan similaritas 66%, dan *P. emblica* mengelompok sesamanya, namun tetap memiliki percabangan *common ancensor* dengan spesies lain dari genus *Phyllanthus* menggunakan metode Neighbor-Joining, perhitungan Kimura 2-parameter.

Kata Kunci: DNA Barcoding, *rbcL*, *Phyllanthus emblica*, Filogenetik

© 2024 Universitas Cokroaminoto palopo

Correspondence Author :
Universitas Islam Negeri Sumatera Utara

p-ISSN 2573-5163
e-ISSN 2579-7085

PENDAHULUAN

Tumbuhan balakka (*Phyllanthus emblica* L.) merupakan salah satu tumbuhan yang ditemukan di Indonesia, termasuk di Sumatera Utara. Wilayah persebaran tumbuhan balakka ditemukan di Sumatera Utara bagian selatan yaitu Tapanuli Selatan, Labuhan Batu Selatan, Padang Lawas, Padang Sidempuan dan Mandailing Natal (Gustianty, 2018). Identifikasi secara morfologi secara umum dari pengamatan buah balakka yang berbentuk bundar dan berwarna kuning pucat. Masyarakat Sumatera Utara bagian Selatan memanfaatkan buah balakka dan kulit pohon sebagai campuran bumbu masakan tradisional untuk Ikan Jurung/Ikan Mas yang dikenal dengan holat. Direktorat Warisan dan Diplomasi Budaya, Dirjend Kebudayaan, Kemendikbud telah menetapkan holat yang berasal dari Padang Bolak sebagai Warisan Budaya Tak Benda Indonesia Sumatera Utara Direktorat Warisan dan Diplomasi Budaya, Dirjend Kebudayaan, Kemendikbud, 2017).

Namun, seiring dengan pengurangan habitat dari tumbuhan balakka di Sumatera Utara bagian Selatan, maka berkurang pula jumlah tanamannya. Pengurangan habitat terjadi karena peralihan fungsi menjadi perkebunan sawit dan adanya pembangunan pemukiman. Pengidentifikasian genetik sangat dibutuhkan untuk membantu upaya konservasi dan mencegah tumbuhan tersebut punah sebelum diketahui identitas DNANYA (Rahayu & Jannah, 2022). Identifikasi DNA juga berfungsi untuk memberikan informasi terhadap kekerabatan tumbuhan balakka yang ada di Sumatera Utara dengan provinsi lain di Indonesia maupun dari negara lain.

Adapun penelitian yang dilakukan di Indonesia masih belum merambah ke arah molekuler terutama penggunaan gen dalam hal identifikasi genetik. Penelitian mengenai DNA barcoding tumbuhan balakka (*Phyllanthus emblica* L.) dengan menggunakan gen *rbcL* hanya ditemukan dari peneliti yang berasal dari luar Indonesia. Hal ini dapat ditemukan pada website bioinformatika NCBI (*The National Center for Biotechnology*

Information). Adapun dari data DNA barcoding diperoleh dari peneliti India yaitu Lee, *et al* pada tahun 2006 dengan judul penelitian “*Phylogeny of medicinal Phyllanthus species in China based on nuclear ITS and chloroplast atpB-rbcL sequences and multiplex PCR detection assay analysis*”; Sairkar, *et al* pada tahun 2019 dengan judul “*Development of DNA Barcode for identification and authentication for important medicinal plants of MP*”; dan Tank, *et al* pada tahun 2017 dengan judul penelitian “*DNA Barcode Library of Urban Tree Flora of Rajkot*”. Peneliti dari negara Kamboja yaitu Toyama, *et al* pada tahun 2015 dengan judul penelitian “*Effects of logging and recruitment on community phylogenetic structure in 32 permanent forest plots of Kampong Thom, Cambodia*”. Peneliti di negara China yaitu Chen dan Pang pada tahun 2010 dengan judul penelitian “*Using DNA barcoding to identify species in Euphorbiaceae*”. Peneliti dari Thailand Sukrong, *et al* di tahun 2018 dengan judul penelitian “*DNA barcode of Selected Thai Materia Medica Project*” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Salah satu pendekatan identifikasi genetik yang digunakan adalah DNA Barcoding. DNA barcoding pada tumbuhan terdiri dari DNA mitokondria, DNA nukleus dan DNA kloroplas. Oleh karena tumbuhan memiliki zat hijau daun, maka DNA kloroplas (cqDNA) yang digunakan untuk mengamati evolusi DNA. Salah satu primer yang digunakan dalam DNA barcoding yaitu *rbcL* (*Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase large subunit gene*) atau disebut gen RuBisCO. Gen *rbcL* memiliki kelebihan yaitu lokus gen yang sudah terstandar karena memiliki tingkat keberhasilan yang tinggi terhadap *bidirectional sequencing* (sekuensing yang menggunakan primer *forward* dan *reverse*) pada tumbuhan darat (Letsiou, 2023; Basith, 2015).

Saat ini para peneliti di bidang genetika telah meneliti data DNA dan menyimpannya dalam situs GenBank seperti NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Adanya bank gen ini memudahkan peneliti selanjutnya

untuk melakukan pengecekan terhadap spesies yang telah diidentifikasi DNAny dan selanjutnya diolah menggunakan software bioinformatika. Salah satu softwarenya adalah MEGA versi 11 (*Molecular Evoluution Genetic Analisis*) yang ditemukan oleh Kimura, Neil dan Kumar pada tahun 1993 untuk melakukan analisis evolusi secara molecular (Tamura *et al.*, 2021). Hal ini berarti, data DNA *barcoding* tumbuhan balakka (*Phyllanthus emblica* L.) yang diteliti ini dapat dibandingkan dengan peneliti lain dengan lokus gen *rbcL* untuk mengamati evolusi dan filogenetiknya.

METODE

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental yaitu mengisolasi DNA (*Deoxyribo Nucleat Acid*) tumbuhan Balakka (*P. emblica*) dari organ daun yang diperoleh dari Kabupaten Padang Lawas Utara dengan kit komersial (FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Kit). DNA genom yang diperoleh diamplifikasi dengan menggunakan primer gen *rbcL* (*rbcLaf* 5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-3' dan *rbcLa-rev* 5'GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG-3' (Hashim *et al.*, 2021). Amplifikasi DNA menggunakan kit PCR yaitu Powerpol 2xPCR Mix with Dye, dengan komponen 25 µl kit PCR, 5 µl masing-masing primer *rbcLaf* dan *rbcLa-rev*, 6 µl *Template* DNA sampel, dan 9 µl ddH₂O. Proses amplifikasi pada mesin PCR dilakukan sebanyak 35 siklus. *Thermocycler* disetting untuk predenaturasi 97°C selama 4 menit, denaturasi 94°C selama 45 detik, *annealing* 52°C selama 50 detik, *extention* 72°C selama 1 menit, dan final *extention* 7 menit (Sagala *et al.*, 2021). Hasil amplifikasi diamati menggunakan *Gel documentation* setelah di *running* pada alat *Mini Horizontal Electrophoresis* dengan gel agarose 1%. Hasil pita DNA yang terlihat menunjukkan keberhasilan amplifikasi yang dilanjutkan ke tahapan sekuensing dengan mengirimkan sampel ke Perusahaan 1st BASE Malaysia. Hasil sekuensing DNA yang diperoleh berupa kromatogram yang diterjemahkan menjadi basa nukleotida (Adenin, Citosin, Guanin dan Timin).

Hasil sekuensing DNA *barcoding* yang diperoleh dari tumbuhan balakka akan dianalisis menggunakan aplikasi Bioinformatika. Hasil sekuensing berupa kromatogram diedit konsensus sekuennya. Sekuens konsensus yang diperoleh, *dialignment* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Data dengan similaritas yang tinggi dengan sampel diikuti dalam analisis pohon filogenetik. Pohon filogenetik direkonstruksi dengan menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) 11 menggunakan metode Neighbor-Joining dengan Kimura 2-Parameter dan Bootstrap 1000.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tumbuhan balakka (*Phyllanthus emblica* L.) merupakan anggota Famili *Phyllanthaceae*. Balakka merupakan tanaman yang secara luas tersebar di belahan dunia daerah tropis dan subtropis seperti Semenanjung Malaya, Indonesia, India, Cina dan Tibet. Tumbuhan balakka dapat ditemukan pada daerah savana, ukuran pohon sedang dengan tinggi 10-20 m, dan memiliki cabang yang banyak. Perakaran balakka termasuk akar tunggang, waktu pertumbuhan tergolong lambat (Bakshi *et al.*, 2016). Bagian tumbuhan balakka yang dimanfaatkan mulai dari buah balakka yang segar, buah kering, daun, biji, akar, bunga dan kulit batang (Ananda *et al.*, 2024).



Gambar 1. Tumbuhan Balakka (*Phyllanthus emblica* L.)

DNA Barcoding Tumbuhan Balakka (*Phyllanthus emblica* L.)

DNA *barcoding* hasil konsensus kromatogram dari kedua primer *rbcL* (*rbcLaf* dan *rbcLarev*) terhadap DNA

kloroplas tumbuhan balakka (*P. emblica*) diperoleh panjang amplikon 557 bp, dengan basa nukleotida Adenin sebanyak 26,9 %, Cytosin 20,5%, Guanin 23,3 % dan Timin 29,3%. Jumlah amplikon tumbuhan balakka memiliki jumlah basa nukleotida <1000 bp yang memudahkan dalam alignment saat rekonstruksi pohon filogenetik tanpa perlu melakukan *editing* secara manual (Wang, *et al.*, 2017). DNA barcoding dengan lokus gen *rbcL* (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase large subunit gene) memiliki keunggulan karena berasal dari kloroplas yang memiliki parental tunggal karena diturunkan hanya dari maternal dan kurangnya kombinasi (Xu *et al.*, 2021).

DNA barcoding tumbuhan balakka (Sampel P4) yang telah didapatkan dianalisis dengan memasukkan urutan basa nukleotida pada website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> yang telah dipilih Blast Nucleotida. Analisis pensejajaran dengan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) menunjukkan Ident, Percentage tertinggi 99,64 dengan spesies *P. emblica*, *max score* dan total *score* 1005, *query cover* 95%, dan Acc. lenght 553.

Rekonstruksi Pohon Filogenetik

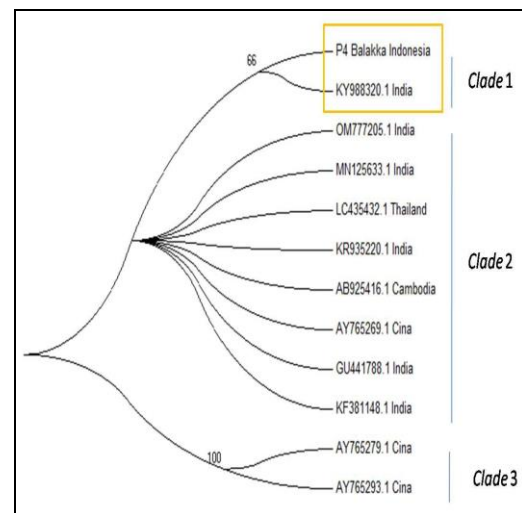
Rekonstruksi pohon filogenetik didasarkan hasil alignment sekuen DNA menggunakan MEGA 11. Metode yang digunakan dalam rekonstruksi yaitu Neighbor-Joining untuk melihat tingkat kekerabatan berdasarkan banyaknya jumlah basa nukleotida yang mirip.

Metode *Neighbor-Joining* yang mengacu pada nilai jarak filogenetik dan evolusi antar clade (Taksa) dalam merekonstruksi pohon filogenetik, yang menunjukkan setiap cabang memiliki laju evolusi yang berbeda-beda. Umumnya pohon relatif lebih akurat, dan proses komputasi atau running lebih cepat dibandingkan Metode *Maximum likelihood* dan *minimum parsimony*. Selanjutnya model rekonstruksi menggunakan Kimura 2-Parameter yang menentukan *pairwise distance* atau jarak genetik. Hall (2018) menjelaskan, *pairwise distance* dihitung berdasarkan sekuen yang berbeda antar individu sehingga memperlihatkan terdapat

substitusi, transversi atau transisi. Data ini akan memperkuat analisis dari pohon filogenetik. MEGA 11 juga menyediakan analisis statistika dengan melakukan Bootstrap 1000 kali, agar data lebih real.

Filogenetik Tumbuhan Balakka (Sampel P4) dengan *Phyllanthus emblica* dari India, Cina, Thailand dan Cambodia.

Sekuen DNA lokus gen *rbcL* tumbuhan Balakka (Sampel P4) dianalisis hubungan kekerabatan dengan 11 sekuen dari GeneBank dengan Ascesion No.: AB925416.1, AY765269.1, AY765279.1, AY765293.1, GU441788.1, KF381148.1, KR935220.1, KY988320.1, LC435432.1, MN125633.1, dan OM777205.1. Pohon filogenetik dibuat menggunakan software bioinformatika MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) yang akan menunjukkan sekuen sampel spesies tanaman balakka P4 yang berasal dari Sumatera Utara memiliki kekerabatan lebih dekat dengan spesies *Phyllanthus emblica* (KY988320.1) dari negara India (Gambar 2). Maka hal ini menunjukkan kemungkinan tumbuhan balakka di Indonesia berasal dari India, yang telah mengalami mutasi akibat perbedaan geografi antar negara.



Gambar 2. Rekonstruksi Pohon Filogenetik Sekuen DNA lokus gen *rbcL* dari Sampel Tumbuhan Balakka (P4) dengan spesies *Phyllanthus emblica* dari beberapa negara di GeneBank

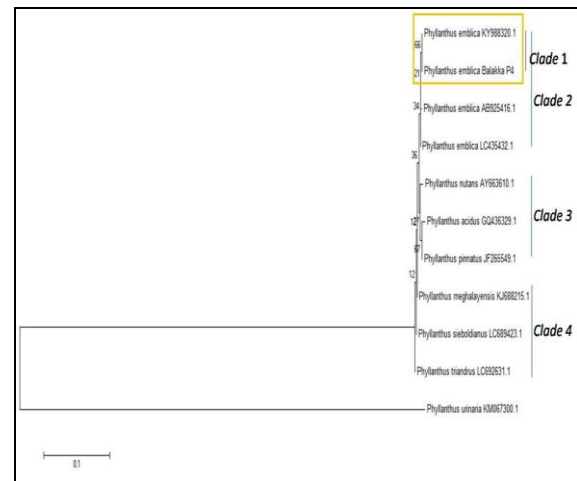
Hasil rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan lokus gen *rbcL* untuk spesies *P. emblica* diatas menunjukkan bahwa seluruh spesies pada pohon membentuk 3 *clade* (taksa). *Clade* 1 terdiri dari 2 spesies yaitu sampel P4 Balakka membentuk hubungan kekerabatan dengan *P. emblica* dari India (KY988320.1) dengan jarak evolusi similaritas 66%. Selanjutnya *clade* 1 bergabung dengan *clade* 2. *Clade* 2 terdiri dari spesies *P. emblica* dari India, Cambodia, Thailand, dan Cina (AY765269.1). Sedangkan dua spesies *P. emblica* dari Cina membentuk kelompok sendiri dengan similaritas 100%. Masing-masing *clade* merupakan monofiletik yang memiliki urutan basa nukleotida yang diturunkan dari nenek moyang yang sama (Yan *et al.*, 2023).

Filogenetik Tumbuhan Balakka (Sampel P4) dengan *Phyllanthus emblica* dan spesies anggota genus *Phyllanthus*, Famili *Phyllanthaceae*

DNA barcoding sampel tumbuhan balakka (P4) dengan lokus gen *rbcL* dianalisis filogenetik dengan 12 sekuen yang berasal dari Genbank. Tiga sekuen DNA merupakan spesies *P. emblica* dengan Assecor No. KY988320.1, AB925416.1, LC435432.1. Delapan sekuen DNA lainnya merupakan spesies-spesies dari Genus *Phyllanthus*, Famili *Phyllanthaceae*. Adapun spesiesnya yaitu *P. nutans*, *P. acidus*, *P. pinnatus*, *P. megalayensis*, *P. seiboldians*, *P. triandrus*, dan *P. unnaria*. Rekonstruksi dapat diamati pada Gambar 3.

Rekonstruksi pohon filogenetik dari sekuen DNA lokus gen *rbcL* dari sampel P4 Balakka dengan spesies anggota Genus *Phyllanthus*, Famili *Phyllanthaceae* (Gambar 3) menunjukkan terbentuk 4 *clade* dengan 1 spesies membentuk outgroup. *Clade* 1 terdiri dari sampel P4 Balakka (*Phyllanthus emblica*) memiliki kekerabatan dengan *P. emblica* (KY98320.1), *clade* 1 ini bergabung dengan *clade* 2 yang terdiri spesies *P. emblica*. Hal ini menunjukkan spesies *P. emblica* memiliki sifat yang diturunkan dari *common ancensor* sehingga mengelompok. *Clade* 3 terdiri dari spesies *P. nutans*, *P. acidus*, dan *P. pinnatus*. Dari *clade* 3

terlihat bahwa *P. acidus*, dan *P. pinnatus* memiliki tingkat similaritas yang paling tinggi. *Clade* 4 terdiri dari spesies *P. megalayensis*, *P. seiboldians*, dan *P. triandrus*. Keempat *clade* tadi membentuk kelompok terpisah dengan 1 spesies anggota Genus *Phyllanthus* yaitu *P. unnaria*. Hal ini berarti menjadi outgroup dari *common ancensor* spesies *Phyllanthus* lainnya.



Gambar 3. Rekonstruksi Pohon Filogenetik Sekuen DNA lokus *rbcL* Sampel Tumbuhan Balakka dengan spesies anggota Genus *Phyllanthus*, Famili *Phyllanthaceae* yang dianalisis dengan MEGA 11

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa identifikasi genetik DNA barcoding pada tumbuhan balakka (*Phyllanthus emblica*) dari lokus gen *rbcL* yang dikonsensus dari primer forward dan reverse didapatkan sekuen DNA dengan ukuran 557 bp yang memiliki AT content 56% dan GC content 43,8%. Analisis hubungan filogenetik tumbuhan balakka (*Phyllanthus emblica*) menggunakan MEGA 11 sebagai aplikasi bioinformatika menunjukkan sister taksa dari sampel membentuk kekerabatan yang erat dengan *P. emblica* dari India dengan Ancensor No. KY988320.1. Setiap spesies *P. emblica* membentuk kelompok sendiri yang memiliki *common ancensor* yang sama dengan spesies lain dari anggota Genus *Phyllanthus*.

DAFTAR RUJUKAN

- Ananda, L., Tanjung, I. F., & Irwan Syahputra. (2024). Pengembangan Ensiklopedia Terintegrasi Potensi Lokal Sumatera Utara Tumbuhan Balakka (*Phyllanthus emblica* L) Sebagai Alternatif Bahan Ajar Biologi. *Bioedusains: Jurnal Pendidikan Biologi Dan Sains*, 15(1), 37–48.
- Bakshi, P., Wali, V.K., Jasrotia, A., Bhushan, B., and Bakshi, M. (2016). *Aonla Cultivation*. Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences & Technology of Jammu.
- Basith A. (2015). Peluang Gen *rbcL* sebagai *DNA Barcode* Berbasis DNA Kloroplas untuk Mengungkap Keanekaragaman Genetik Padi Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) Lokal Indonesia. *Biologi, Sains, Lingkungan, dan Pembelajarannya*, 1, 938-941.
- Direktorat Warisan dan Diplomasi Budaya, Dirjend Kebudayaan, Kemendikbud. (2017). *Penetapan Warisan Budaya Takbenda Indoensia Tahun 2017*. Jakarta. Direktorat Warisan dan Diplomasi Budaya, Dirjend Kebudayaan, Kemendikbud.
- Gustianty, L.R. (2018). Kajian Pustaka: Balakka (*Phyllanthus emblica* L) sebagai Hasil Hutan Bukan Kayu yang Tidak Terkelola dengan Baik di Sumatera Utara. *Jurnal Pionir*, 2(5), 70-75.
- Hall, B. G. (2018). *Phylogenetic Tree Made Easy : A How-to Manual*. Oxford. Oxford University Press.
- Hashim, A. M., Alatawi, A., Altaf, F. M., Qari, S. H., Elhady, M. E., Osman, G. H., & Abouseadaa, H. H. (2021). Phylogenetic relationships and DNA barcoding of nine endangered medicinal plant species endemic to Saint Katherine protectorate. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1919–1930.
- Letsiou, S., Madesis, P., Vasdekis, E., Montemurro, C., Grigoriou, M. E., Skavdis, G., Moussis, V., Koutelidakis, A. E., & Tzakos, A. G. (2024). DNA Barcoding as a Plant Identification Method. *Applied Sciences (Switzerland)*, 14(4), 1–12.
- Rahayu, D. A., & Jannah, M. (2022). *Dna Barcode Hewan Dan Tumbuhan Indonesia*. 9–25.
- Sagala, L.R., Lazuardi, Harahap., F., Manalu, K., Idami, Z., & Prasetya, E. (2021). DNA Barcoding *Zingiber loerzingii* Valetton menggunakan lokus gen Ribulose-1,5- biphosphate Carboxylase-OxygenaseLarge subunit Gene (*rbcL*). *Jurnal Biosains*, 7(3), 166-173.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Wang, D-Y., Wang, Q., Wang, Y-L., Xiang, X-G., Huang, L-Q., and Jin, X-H. (2017). Evaluation of DNA Barcodes in *Codonopsis* (Campanulaceae) and in some Large Angiosperm Plant Genera. *PLoS ONE*, 12(2), 1-14..
- Xu, J., Zang, F., Wu, Q., Wang, Y., Wang, B., Huang, P., Zang, D., Ma, Y., & Zheng, Y. (2021). Analysis of the genetic diversity and molecular phylogeography of the endangered wild rose (*Rosa rugosa*) in China based on chloroplast genes. *Global Ecology and Conservation*, 28, 1-12.
- Yan, M., Dong, S., Gong, Q., Xu, Q., & Ge, Y. (2023). Comparative chloroplast genome analysis of four *Polygonatum* species insights into DNA barcoding, evolution, and phylogeny. *Scientific Reports*, 13(1), 1–23.