



**ANALISIS EMPAT SEKUEN BARKODE DNA  
PADA PANDAN (*Benstonea* sp.) ASAL DANAU KAJUIK, RIAU**  
**ANALYSIS OF FOUR DNA BARCODES ON PANDAN (*Benstonea* sp.)  
ORIGINATING FROM RIAU**

**Dewi Indriyani Roslim\*, Intan Sari Nuraini, Siti Nurhayati, Ciska Vivian Sianturi,  
At Thahirah, Herman**

*Universitas Riau, Jl HR Soebrantas, Kampus Bina Widya Km 12,5 Panam, Pekanbaru 28293, Riau*

*\*Corresponding author: dewiindriyaniroslim@gmail.com*

Naskah Diterima: 18 Juli 2021; Direvisi: 6 Desember 2021; Disetujui: 10 Januari 2022

**Abstrak**

Barkode DNA merupakan sekuen DNA berukuran pendek yang digunakan untuk identifikasi organisme secara molekuler. Penelitian bertujuan menganalisis empat barkode DNA pada tumbuhan pandan (*Benstonea* sp.) asal Danau Kajuik, Riau. Metode meliputi isolasi DNA, PCR, elektroforesis, purifikasi, sekuesing, serta analisis bioinformatika. Pada penelitian ini telah diperoleh sekuen DNA untuk *atpB-rbcL* IGS, *trnV-ndhC* IGS, *ndhF-rpl32* IGS, dan *trnQ-5'rps16* IGS sepanjang 812 pb, 924 pb, 952 pb, dan 886 pb, secara berturut-turut. Aksesori yang muncul paling atas pada analisis BLASTn pada keempat sekuen tersebut tidak ada yang memiliki kemiripan 100% dengan *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau. Walaupun nilai *query cover* tinggi (93–100%) dan *E-value* sebesar 0,00. Pada keempat barkode DNA yang diteliti, terdapat beberapa perbedaan nukleotida yang disebabkan oleh mutasi insersi-delesi (indel) (6,99%) maupun substitusi (4,96%). Mutasi indel paling banyak dijumpai pada sekuen *trnV-ndhC* IGS dan mutasi substitusi paling banyak terjadi pada sekuen *ndhF-rpl32* IGS. Nukleotida kritis yang menjadi penciri bagi *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau, dijumpai pada sekuen *ndhF-rpl32* IGS dan *trnQ-5'rps16* IGS. Simpulan, dua sekuen DNA yaitu *ndhF-rpl32* IGS dan *trnQ-5'rps16* IGS berpotensi menjadi barkode DNA untuk identifikasi tumbuhan ini secara molekuler. Ketersediaan barkode DNA pada *database* publik sangat diperlukan untuk menunjang identifikasi organisme secara molekuler.

**Kata kunci:** *atpB-rbcL* IGS; Barkode DNA; *Benstonea* sp.; *ndhF-rpl32* IGS; *trnQ-5'rps16* IGS; *trnV-ndhC* IGS

**Abstract**

DNA barcode is a piece of short DNA that is developed for molecular identification of organisms. This study aims to analyze four DNA barcodes in pandan plant (*Benstonea* sp.) from Kajuik Lake, Riau. Methods included DNA extraction, PCR, electrophoresis, purification, sequencing, and bioinformatics analysis. The DNA sequences of *atpB-rbcL* IGS, *trnV-ndhC* IGS, *ndhF-rpl32* IGS, and *trnQ-5'rps16* IGS have been obtained with the length of 812 pb, 924 pb, 952 pb, and 886 pb, respectively. The top accession in BLASTn analysis results showed that there was no accession that had 100% similarity to *Benstonea* sp. from Kajuik Lake, Riau even though the query cover high (93–100%) and *E-value* of 0,00. There were some nucleotide variations caused by insertion-deletion (indel) mutation (6,99%) and substitution (4,96%). Indel was most occur in *trnV-ndhC* IGS and substitution in *ndhF-rpl32* IGS. Critical nucleotides that were be a characteristic for *Benstonea* sp. from Kajuik Lake, Riau were seen in *ndhF-rpl32* IGS and *trnQ-5'rps16* IGS. Conclusion, both of *ndhF-rpl32* IGS and *trnQ-5'rps16* IGS are potentially as DNA barcodes for molecular identification of this plant. The availability of the DNA barcodes is very important to support of organisms molecular identifications.

**Keywords:** *atpB-rbcL* IGS; *Benstonea* sp.; DNA barcode; *ndhF-rpl32* IGS; *trnQ-5'rps16* IGS; *trnV-ndhC* IGS

**Permalink/DOI:** <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v16i1.21697>

## PENDAHULUAN

Danau Kajuik di Kabupaten Pelalawan yang terletak di Provinsi Riau menyimpan keanekaragaman flora dan fauna. Flora yang tumbuh di dalam dan di sekitar danau tersebut sangat penting untuk menunjang kehidupan ekosistem danau, terutama ikan selais yang sering migrasi ke danau untuk bertelur, memijah, dan merawat anak-anak ikan (Elvyra & Yus, 2012). Namun, pada beberapa flora yang tumbuh di ekosistem Danau Kajuik belum teridentifikasi, seperti jambu liar (*Syzygium* sp.) dan pandan (*Benstonea* sp.) yang telah diidentifikasi sebelumnya secara morfologi oleh Roslim et al. (2016a; 2017; 2018; 2019).

Identifikasi tumbuhan dapat dilakukan dengan melakukan pengamatan morfologi pada daun, batang, bunga, dan buah. Cara ini lebih mudah dan murah, namun memiliki beberapa kendala seperti harus menunggu tumbuhan berbunga lalu berbuah. Kendala lainnya, apabila spesimen yang dikumpulkan rusak misal benang sari rusak, buah busuk, atau daun rusak. Untuk mengatasi hal tersebut ilmuwan telah mengembangkan banyak sekuen barkode DNA untuk identifikasi tumbuhan dengan teknik barkoding DNA. Teknik ini menggunakan sekuen barkode DNA, yaitu sekuen DNA berukuran pendek (sekitar 700–1.500 pb) yang sudah diketahui lokasinya di genom organisme (Hebert et al., 2003). Sampai saat ini telah dikembangkan beberapa barkode DNA terstandarisasi untuk identifikasi tumbuhan secara molekuler. Sekuen *rbcL* dan *matK* adalah dua sekuen DNA yang pertama kali terstandarisasi sebagai barkode DNA untuk identifikasi tumbuhan (CBOL Plant Working Group, 2009). Keduanya sama-sama menyandikan protein namun sekuen DNA dari *rbcL* lebih konservatif dari pada *matK* (Guo et al., 2016). Teknik barkoding DNA memiliki kelebihan bahwa spesimen yang rusak atau tidak lengkap tetap dapat diidentifikasi (Hebert et al., 2003) asalkan *database* sekuen DNA di *GenBank* tersedia dalam jumlah melimpah (Roslim, 2018).

Identifikasi tumbuhan secara molekuler memerlukan kombinasi lebih dari dua barkode DNA (CBOL Plant Working Group, 2009). Barkode DNA yang telah dikembangkan, yaitu *rbcL* dan *matK*. Selain itu, barkode DNA yang telah dikembangkan, yaitu pada daerah intron dan di antara dua buah gen (*intergenic spacer*, IGS). Daerah DNA tersebut bukan penyandi protein. Beberapa sekuen DNA tersebut, yaitu *rpl16 intron*, *rps16 intron*, *trnL-trnL-trnF IGS*, *ndhC-trnV IGS*, *rpl16 intron*, *atpB-rbcL IGS*, *trnQ-rps16 IGS*, *trnV-ndhC IGS*, *ndhF-rpl32 IGS* (Biffin et al., 2006; Shaw et al., 2007; de-Groot et al., 2011; Buerki et al., 2016). Kelebihan dari intron dan IGS dibandingkan daerah DNA penyandi protein adalah intron dan IGS mudah mengalami mutasi dan dengan demikian memiliki laju mutasi yang tinggi (Kress et al., 2005). Oleh karena itu, variasinya antar spesies yang dihasilkan juga tinggi. Daerah DNA ini dapat membedakan antar spesies dan sangat baik digunakan untuk mengidentifikasi tumbuhan dengan teknik barkoding DNA.

Teknik barkoding DNA digunakan dalam mengidentifikasi *Benstonea* sp. yang merupakan genus baru dari famili *Pandanaceae*. Genus ini awalnya anggota dari genus *Pandanus* sect. *Acrostigma* (Buerki et al., 2012). Sampai saat ini telah terdeteksi 60 spesies di dalam genus *Benstonea* (Callmander et al., 2012). Salah satu spesiesnya ditemukan di Kabupaten Pelalawan, Provinsi Riau, Indonesia dan disebut *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau. Tumbuhan ini telah dikonfirmasi sebagai *Benstonea* sp. berdasarkan barkode DNA *rbcL*, *matK*, dan *trnL-trnF intergenic spacer* (Roslim et al., 2017). Oleh karena itu, belum diketahui nama spesies dari *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau tersebut. Maka dari itu, penelitian ini dilakukan dengan menganalisis empat sekuen barkode DNA pada *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau.

## MATERIAL DAN METODE

### Material Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan adalah tumbuhan pandan (*Benstonea* sp.). Tumbuhan ini diambil dari Danau Kajuik yang berlokasi di Kecamatan Langgam, Kabupaten Pelalawan, Provinsi Riau, Indonesia yang juga telah dikoleksi dan dibuat herbariumnya tahun 2018. Spesimen herbarium telah disimpan di Herbarium Bogoriense (DIR001) dan Herbarium Universitas Andalas (DIR002). Daunnya digunakan untuk isolasi DNA total. Empat pasang primer digunakan untuk mengamplifikasi empat sekuen barkode DNA (Tabel 1).

**Tabel 1.** Empat pasang primer untuk amplifikasi empat sekuen barkode DNA

Nama primer	5'-----3'	Daerah DNA	Suhu <i>annealing</i> (°C)	referensi
atpB-1	ACATCKARTACKGGACCAATAA	<i>atpB-rbcL-IGS</i>	50,2	Chiang et al. (1998)
rbcL-1	AACACCAGCTTTRAATCCAA			
trnQ(UUG)	GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC	<i>trnQ-5'rps16-IGS</i>	58,0	
rpS16x1	GTTGCTTTYTACCACATCGTTT			
trnV(UAC)x2	GTCTACGGTTCGARTCCGTA	<i>3'trnV-ndhC-IGS</i>	48,7	Shaw et al. (2007)
ndhC	TATTATTAGAAATGYCCARAAAAT ATCATA TTC			
rpl32-R	CCAATATCCCTTYTTTCCAA	<i>ndhF-rpl32-IGS</i>	50,3	
ndhF	GAAAGGTATKATCCAYGMATATT			

## Prosedur Penelitian

### Ekstraksi DNA Total

Daun pandan diambil untuk keperluan ekstraksi DNA. Tulang daun utama dan tepi daun yang berduri dibuang. Helai daun dipotong-potong menggunakan gunting steril. Potongan daun ditimbang sebanyak 100 mg dan digerus menggunakan mortar dan pestel dengan bantuan nitrogen cair. Bubuk daun dipindahkan ke dalam tabung 1,5 mL. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Plant)* mengikuti prosedur instruksi pabrik (*Geneaid*) (Roslim et al., 2020). Sebanyak 2 µL larutan DNA total yang diperoleh dimigrasikan pada 1% gel agarosa dengan *buffer* 1x TBE pH 8,0 dengan teknik elektroforesis untuk menentukan keberhasilan ekstraksi DNA dan memperkirakan konsentrasi DNA berdasarkan pita-pita DNA pada 1 kb DNA *ladder* (*Thermo Scientific*). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 V selama 20 menit. Pita-pita DNA pada gel divisualisasikan di atas lampu UV lalu didokumentasikan menggunakan kamera digital berfilter UV (Roslim et al., 2020).

### Amplifikasi dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR)

Larutan DNA total yang diperoleh, digunakan sebagai cetakan untuk mengamplifikasi sekuen barkode DNA dengan teknik PCR. Komponen PCR yang digunakan mengacu instruksi pabrik (*Thermo Scientific*), yaitu 1x *buffer* PCR (+ Mg<sup>2+</sup>), 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM primer *forward*, 0,5 µM primer *reverse*, 2 unit *dreamTaq DNA polymerase*, 2 µL DNA total dan ddH<sub>2</sub>O untuk menggenapkan reaksi PCR menjadi 50 µL. Program PCR mengikuti instruksi pabrik (*Thermo Scientific*), meliputi pra-PCR pada 94 °C selama 5 menit; diikuti 35 siklus terdiri dari denaturasi pada 94 °C selama 45 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu *annealing* seperti yang tertera di Tabel 1 untuk setiap pasangan primer selama 45 detik, elongasi 68 °C selama 1 menit 30 detik; dan diakhiri dengan pasca-PCR 68 °C selama 10 menit. Keberhasilan PCR dideteksi dengan teknik elektroforesis. Sebanyak 2 µL produk PCR dimigrasikan pada 1% gel agarosa dengan 1x *buffer* TBE pH 8,0 pada tegangan 50 V selama 30 menit. Pita-pita DNA pada gel divisualisasikan di atas lampu UV lalu didokumentasikan menggunakan kamera digital berfilter UV.

### Sekuensing

Tabung PCR yang berisi produk PCR (lebih kurang 45 µL) dan masing-masing primer *forward* dan *reverse* sebanyak 30 µL di dalam tabung 1,5 mL ditutup rapat dengan bantuan parafilm. Produk PCR dan primer tersebut dikirim ke PT Genetika *Science* Indonesia sebagai agen perantara sekuensing dari perusahaan 1<sup>st</sup> Base Malaysia.

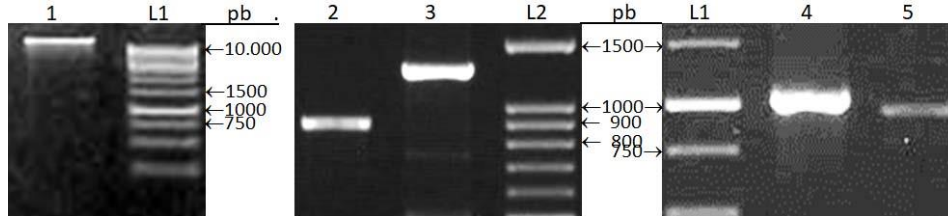
### Analisis Data

Data sekuen DNA *forward* dan *reverse* disatukan menggunakan program BioEdit versi 7. Sekuen DNA tersebut dianalisis menggunakan program BLASTn untuk menentukan kemiripannya dengan sekuen yang ada di *database GenBank* dengan opsi *Highly similar sequences (megablast)*.

Semua sekuen DNA dari genus *Benstonea* yang muncul pada hasil analisis BLASTn diunduh untuk keperluan analisis menggunakan program MEGA versi 6.

## HASIL

Molekul DNA total diperoleh dengan pita yang tebal, utuh, dan layak untuk digunakan sebagai cetakan pada proses PCR. Produk PCR setiap barcode DNA diperoleh berupa pita DNA tunggal dengan ukuran sesuai target, yaitu ukuran pita DNA pada *atpB-rbcL IGS* sekitar 900 pb, *trnV-ndhC IGS* 1250 pb, *ndhF-rpl32 IGS* 1000 pb, dan *trnQ-5'rps16 IGS* 900 (Gambar 1). Pita-pita DNA tersebut layak disequensing untuk menentukan urutan DNA masing-masing barcode DNA.



**Gambar 1.** Profil pita DNA total dan produk PCR. Pita DNA total (1); produk PCR: *atpB-rbcL IGS* (2), *trnV-ndhC IGS* (3), *ndhF-rpl32 IGS* (4), dan *trnQ-5'rps16 IGS* (5). 1 kb DNA ladder (L1) dan 100 bp DNA ladder (L2) (Thermo Scientific)

Setelah dilakukan sekuensing dan pengolahan data sekuen DNA, diperoleh sekuen DNA untuk *atpB-rbcL IGS*, *trnV-ndhC IGS*, *ndhF-rpl32 IGS*, dan *trnQ-5'rps16 IGS* sepanjang 812 pb, 924 pb, 952 pb, dan 886 pb secara berturut-turut. Keempat sekuen tersebut didaftarkan di *database GenBank* dengan nomor registrasi secara berturut-turut MT702739, MT702735, MT702736, dan MT702737. Rata-rata frekuensi basa nitrogen A (34,66%) dan T/U (37,15%) pada keempat sekuen barcode DNA yang diteliti lebih besar daripada C (14,41%) dan G (13,79%) (Tabel 2).

**Tabel 2.** Frekuensi basa nitrogen (%) pada empat sekuen barcode DNA yang dianalisis

Daerah DNA	Frekuensi basa nitrogen (%)			
	A	T/U	C	G
<i>atpB-rbcL IGS</i>	32,88	37,33	15,17	14,62
<i>trnV-ndhC IGS</i>	33,88	38,73	13,86	13,53
<i>ndhF-rpl32 IGS</i>	39,78	34,76	13,58	11,88
<i>trnQ-5'rps16 IGS</i>	32,09	37,77	15,02	15,12
Rata-rata	34,66	37,15	14,41	13,79

Analisis BLASTn pada keempat sekuen barcode DNA menunjukkan bahwa pada aksesori yang muncul paling atas tidak ada yang memiliki kemiripan 100% dengan *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau walaupun nilai *query cover* tinggi, yaitu 93–100% dan *E-value* sebesar 0,00 (Tabel 3).

**Tabel 3.** Hasil analisis BLASTn empat sekuen barcode DNA *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau

Daerah DNA	Jumlah aksesori yang dianalisis	Aksesori teratas	<i>Query cover</i> (%)	<i>E-value</i>	Kemiripan (%)
<i>atpB-rbcL IGS</i>	40	<i>B. korthalsii</i>	94	0,00	99,35
<i>trnV-ndhC IGS</i>	38	<i>B. copelandii</i>	97	0,00	92,97
<i>ndhF-rpl32 IGS</i>	53	<i>B. monticola</i>	100	0,00	98,12
<i>trnQ-5'rps16 IGS</i>	66	<i>B. copelandii</i>	93	0,00	98,63

Nukleotida kritis yaitu nukleotida yang menjadi penciri bagi *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau, dijumpai pada sekuen DNA *ndhF-rpl32 IGS* dan *trnQ-5'rps16 IGS* (Tabel 4, Lampiran 1, 2, 3, dan 4). Enam nukleotida kritis dijumpai pada sekuen DNA *ndhF-rpl32 IGS*. Dua nukleotida kritis yang berada pada posisi nukleotida ke-576 dan 588 terjadi karena mutasi substitusi. Nukleotida ke-576 pada *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau berupa Adenin (A) dan pada spesies lain berupa Guanin (G). Sementara itu, pada posisi ke-588, nukleotida pada *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau berupa Timin (T) dan pada spesies lain berupa G dan delesi pada *B. fortuita* voucher Callmander 1197. Empat nukleotida kritis lainnya berada pada posisi nukleotida ke 615-618 dan

perbedaan tersebut karena mutasi delesi, yaitu TTAT pada *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau dan delesi pada spesies lain yang dianalisis (Tabel 5, Lampiran 1, 2, 3, dan 4).

**Tabel 4.** Perbedaan nukleotida, mutasi, dan jumlah nukleotida kritis pada empat sekuen barkode DNA yang dianalisis

Daerah DNA	Perbedaan nukleotida		Mutasi indel		Mutasi substitusi		Nukleotida kritis	
	(pb)	(%)	(pb)	(%)	(pb)	(%)	(pb)	(%)
<i>atpB-rbcL IGS</i>	50	6,16	9	1,11	41	5,05	0	0
<i>trnV-ndhC IGS</i>	119	12,88	103	11,15	16	1,73	0	0
<i>ndhF-rpl32 IGS</i>	159	16,70	83	8,72	76	7,98	6	0,63
<i>trnQ-5'rps16 IGS</i>	107	12,08	62	7,00	45	5,08	3	0,34
Rata-rata	108,75	11,95	64,25	6,99	44,50	4,96	2,25	0,24

**Tabel 5.** Nukleotida kritis yang dijumpai pada sekuen DNA *ndhF-rpl32 IGS*

Spesies	Nomor nukleotida					
	576	588	615	616	617	618
<i>B. sp. from Riau</i>	A	T	T	T	A	T
<i>B. monticola</i> isolate T0143	G	G	-	-	-	-
<i>B. lauterbachii</i> isolate T0151	G	G	-	-	-	-
<i>B. lauterbachii</i> vc Sands 7218	G	G	-	-	-	-
<i>B. affinis</i> isolate T0072	G	G	-	-	-	-
<i>B. affinis</i> vc Buerki 326	G	G	-	-	-	-
<i>B. affinis</i> vc Callmander 1018	G	G	-	-	-	-
<i>B. affinis</i> vc Dowe 290809A	G	G	-	-	-	-
<i>B. aff. inquilina</i> SB-2017 vc Callmander 1192	G	G	-	-	-	-
<i>B. gibbsiana</i> vc Callmander 1030	G	G	-	-	-	-
<i>B. gibbsiana</i> vc Perreira SAN150851	G	G	-	-	-	-
<i>B. foetida</i> vc Zanan 4	G	G	-	-	-	-
<i>B. nana</i> vc Beentje 75773	G	G	-	-	-	-
<i>B. nana</i> vc Callmander 1055	G	G	-	-	-	-
<i>B. thomissophylla</i> vc Callmander 1009	G	G	-	-	-	-
<i>B. ornata</i> vc Callmander 998	G	G	-	-	-	-
<i>B. ornata</i> vc Callmander 997	G	G	-	-	-	-
<i>B. atrocarpa</i> vc Callmander 987	G	G	-	-	-	-
<i>B. platystigma</i> vc Callmander 1001	G	G	-	-	-	-
<i>B. permicron</i> vc Wiriadinata HW 13274	G	G	-	-	-	-
<i>B. brunigii</i> vc Callmander 1012	G	G	-	-	-	-
<i>B. serpentinica</i> vc Buerki 342	G	G	-	-	-	-
<i>B. serpentinica</i> vc Callmander 1187	G	G	-	-	-	-
<i>B. herbacea</i> vc Beentje 75785	G	G	-	-	-	-
<i>B. herbacea</i> vc Callmander 1053	G	G	-	-	-	-
<i>B. epiphytica</i> vc Callmander 1193	G	G	-	-	-	-
<i>B. brevistylis</i> vc Callmander 1199	G	G	-	-	-	-
<i>B. tunicata</i> vc Callmander 1026	G	G	-	-	-	-
<i>B. pectinata</i> vc Callmander 1024	G	G	-	-	-	-
<i>B. alticola</i> vc Callmander 1010	G	G	-	-	-	-
<i>B. rupestris</i> vc Callmander 1028	G	G	-	-	-	-
<i>B. rustica</i> vc Callmander 1011	G	G	-	-	-	-
<i>B. fortuita</i> vc Callmander 1197	G	-	-	-	-	-
<i>B. kurzii</i> vc Callmander s.n.	G	G	-	-	-	-
<i>B. stenocarpa</i> vc Bau s.n.2	G	G	-	-	-	-
<i>B. stenocarpa</i> vc Bau s.n.3	G	G	-	-	-	-
<i>B. copelandii</i> vc Gallaher 7/21/12-002	G	G	-	-	-	-

Tiga nukleotida kritis dijumpai pada sekuen DNA *trnQ-5'rps16 IGS*. Nukleotida tersebut berada pada posisi nukleotida ke-258, 402, dan 530. Tipe perbedaannya disebabkan oleh mutasi substitusi, yaitu TCT pada *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau dan CAC pada spesies lain yang dianalisis (Tabel 6, Lampiran 1, 2, 3, dan 4).

**Tabel 6.** Nukleotida kritis yang dijumpai pada sekuen DNA *trnQ-5'rps16 IGS*

Spesies	Nomor nukleotida		
	258	402	530
<i>B. sp. from Riau</i>	T	C	T
<i>B. copelandii</i> vc Gallaher 8/4/12-001	C	A	C
<i>B. copelandii</i> vc Gallaher 7/21/12-002	C	A	C
<i>B. fortuita</i> vc Callmander 1197	C	A	C
<i>B. affinis</i> isolate T0072	C	A	C
<i>B. affinis</i> vc Low s.n.	C	A	C
<i>B. affinis</i> vc Callmander 1018	C	A	C
<i>B. affinis</i> vc Dowe 290809A	C	A	C
<i>B. affinis</i> vc Buerki 326	C	A	C
<i>B. aff. pumila</i> SB-2017 vc Callmander 1036	C	A	C
<i>B. aff. inquilina</i> SB-2017 vc Callmander 1192	C	A	C
<i>B. aff. pilaris</i> SB-2017 vc Low s.n.	C	A	C
<i>B. ashtonii</i> vc Low 217	C	A	C
<i>B. brevistylis</i> vc Callmander 1199	C	A	C
<i>B. monticola</i> isolate T0143	C	A	C
<i>B. thwaitesii</i> vc Zanan 58	C	A	C
<i>B. gibbsiana</i> vc Perreira SAN150851	C	A	C
<i>B. gibbsiana</i> vc Callmander 1030	C	A	C
<i>B. foetida</i> vc Zanan 4	C	A	C
<i>B. pectinata</i> vc Callmander 1024	C	A	C
<i>B. nana</i> vc Beentje 75788	C	A	C
<i>B. kurzii</i> vc Callmander s.n.	C	A	C
<i>B. brunigii</i> vc Callmander 1012	C	A	C
<i>B. thurstonii</i> vc Callmander 40963	C	A	C
<i>B. pectinata</i> vc Buerki 331	C	A	C
<i>B. serpentinica</i> vc Callmander 1187	C	A	C
<i>B. serpentinica</i> vc Buerki 342	C	A	C
<i>B. nana</i> vc Callmander 1055	C	A	C
<i>B. stenocarpa</i> vc Bau s.n.1	C	A	C
<i>B. stenocarpa</i> vc Bau s.n.3	C	A	C
<i>B. herbacea</i> vc Beentje 75785	C	A	C
<i>B. herbacea</i> vc Callmander 1051	C	A	C
<i>B. herbacea</i> vc Callmander 1053	C	A	C
<i>B. pachyphylla</i> vc Callmander 1020	C	A	C
<i>B. ornata</i> vc Callmander 998	C	A	C
<i>B. platystigma</i> vc Callmander 1001	C	A	C

## PEMBAHASAN

Teknik barkoding DNA untuk menentukan nama spesies tumbuhan telah teruji asalkan *database* sekuen barcode DNA target tersedia di *database* publik seperti *GenBank*. Pada penelitian ini, analisis empat barcode DNA pada daerah *IGS* telah dilakukan dan sekuen tersebut telah didaftarkan di *database GenBank* untuk memperkaya *database* sekuen DNA tumbuhan pandan sehingga dapat diakses dan dimanfaatkan publik untuk identifikasi secara molekuler.

Pada penelitian ini, ketiadaan akses di *GenBank* yang mirip 100% dengan *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau mengindikasikan dua kemungkinan bahwa tumbuhan ini merupakan spesies

yang telah teridentifikasi namun sekuennya belum tersedia di *database GenBank* atau spesies baru yang belum dilaporkan. Diperlukan langkah selanjutnya untuk memastikannya, yaitu dengan mendeskripsikan dan membandingkan karakter kunci dengan seluruh spesies *Benstonea* yang ada.

Pada penentuan status taksonomi tumbuhan, suatu spesies dikatakan sama apabila memiliki nilai identiti atau nilai kemiripan 100%, query cover 100%, dan E-value 0,0 (Roslim et al., 2016b; Roslim & Herman, 2017). Lebih lanjut, untuk identifikasi tumbuhan dengan teknik barkoding DNA membutuhkan lebih dari dua barkode DNA. Oleh karena itu, ilmuwan telah mengembangkan dan menguji beberapa kombinasi barkode DNA serta mengembangkan primer universal untuk tujuan tersebut (Taberlet et al., 1991; Chiang et al., 1998; Shaw et al., 2005; 2007).

Genom kloroplas merupakan pilihan terbaik untuk studi filogenetik molekuler pada tumbuhan. Daerah yang pertama kali diteliti dan dikembangkan primer universalnya adalah *trnT-trnL-trnF IGS* (Taberlet et al., 1991) dan *atpB-rbcL IGS* (Golenberg et al., 1993; Chiang et al., 1998). Analisis menggunakan barkode DNA *atpB-rbcL IGS* telah menempatkan *Eugenia boerlagei* (Merr.) Govaerts ke dalam genus *Syzygium*, sehingga *E. boerlagei* direvisi menjadi *S. boerlagei* (Widodo et al., 2019).

Sejak tahun 1995 sampai 2002 terjadi peningkatan studi filogenetik berbasis daerah DNA non-penyandi pada genom kloroplas, yaitu daerah intron dan *intergenic spacer*. Daerah *trnL-trnL-trnF IGS* dan *trnK-matK IGS* telah memadai untuk membedakan spesies pada beberapa taksa. Namun untuk memberikan resolusi yang lebih baik maka sekuen tersebut sering dikombinasikan dengan barkode DNA yang lain (Shaw et al., 2005).

Shaw et al. (2007) melaporkan bahwa sembilan barkode DNA, diantaranya *trnV-ndhC IGS*, *ndhF-rpl32 IGS*, dan *trnQ-5'rps16 IGS*, memiliki nilai PIC (*potentially informative character*) yang tinggi dibandingkan *trnL-trnL-trnF IGS* dan *trnK-matK IGS* serta 19 barkode DNA lain yang diteliti oleh Shaw et al. (2005). Lebih jauh lagi, *ndhF-rpl32 IGS* dan *trnQ-5'rps16 IGS* memiliki variabilitas lebih tinggi dibandingkan *trnV-ndhC IGS* (Shaw et al., 2007).

Perbedaan nukleotida yang terdeteksi pada penelitian ini mengimplikasikan adanya variasi nukleotida pada barkode DNA yang diteliti (Tabel 4). Pada penelitian ini, variasi yang tinggi dijumpai pada tiga barkode DNA yang diteliti selain *atpB-rbcL IGS*. Lebih lanjut, tingginya perbedaan nukleotida pada sekuen DNA *ndhF-rpl32 IGS* menunjukkan bahwa laju mutasi pada daerah ini lebih tinggi dibandingkan tiga barkode DNA lainnya yang diteliti. Hal ini didukung dengan total frekuensi mutasi indel dan substitusi yang lebih besar pada daerah *ndhF-rpl32 IGS* (Tabel 4), yaitu 16,70% (8,72% + 7,98%), dibandingkan pada tiga sekuen DNA *IGS* lainnya.

Pada tumbuhan dari genus *Gratiola* dan *Trillium* telah dilaporkan mengalami mutasi indel yang tinggi pada sekuen DNA *trnV-ndhC IGS*, *ndhF-rpl32 IGS*, dan *trnQ-5'rps16 IGS*. Sebagai contoh, pada sekuen DNA *trnQ-5'rps16 IGS* ada 53 pb indel pada *Gratiola* dan 54 pb pada *Trillium* (Shaw et al., 2005; Timme et al., 2007). Enam nukleotida kritis pada sekuen DNA *ndhF-rpl32 IGS* dan tiga pada *trnQ-5'rps16 IGS* merupakan nukleotida penciri bagi *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau yang diteliti. Kedua sekuen DNA tersebut berpotensi menjadi barkode DNA untuk identifikasi tumbuhan ini secara molekuler.

Identifikasi organisme dengan barkode DNA merupakan hal yang menjanjikan bagi setiap orang yang ingin melakukannya walaupun tidak mempunyai keahlian di bidang taksonomi. Namun ada beberapa tahapan yang perlu dilalui untuk melakukan identifikasi secara molekuler. Tahapan penggunaan barkode DNA untuk identifikasi organisme meliputi (1) identifikasi secara morfologi untuk memperkirakan status taksonominya pada tingkatan famili, genus, atau spesies; (2) melakukan pencarian di *database* publik seperti *GenBank* untuk mendeteksi sekuen barkode DNA apa saja yang telah tersedia melimpah pada famili, genus, atau spesies tersebut; dan (3) melakukan pencarian primer universal untuk barkode DNA target.

## SIMPULAN DAN SARAN

Sekuen DNA untuk *atpB-rbcL IGS*, *trnV-ndhC IGS*, *ndhF-rpl32 IGS*, dan *trnQ-5'rps16 IGS* telah diperoleh sepanjang 812 pb, 924 pb, 952 pb, dan 886 pb secara berturut-turut. Keempat sekuen tersebut telah didaftarkan di *database GenBank* dengan nomor registrasi secara berturut-



turut MT702739, MT702735, MT702736, dan MT702737. Berdasarkan hasil analisis empat sekuen barkode DNA, nama spesies dari tumbuhan pandan yang diteliti masih belum dapat ditentukan. Namun demikian, dua sekuen DNA, yaitu *ndhF-rpl32 IGS* dan *trnQ-5'rps16 IGS*, berpotensi menjadi barkode DNA untuk identifikasi tumbuhan *Benstonea* sp. asal Danau Kajuik, Riau secara molekuler. Ketersediaan sekuen barkode DNA pada *database* publik sangat diperlukan untuk menunjang identifikasi organisme secara molekuler.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, Republik Indonesia tahun 2019 melalui Hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) dengan nomor kontrak 756/UN.19.5.1.3/PT.01.03/2019. Ucapan terima kasih kepada LPPM Universitas Riau yang telah memfasilitasi penelitian ini.

## REFERENSI

- Biffin, E., Craven, L.A., Crisp, M.D., & Gadek P.A. (2006). Molecular systematics of *Syzygium* and allied genera (Myrtaceae): Evidence from the chloroplast genome. *Taxon*, 55(1), 79-94.
- Buerki, S., Callmender, M.W., Devey, D.S., Chappell, L., Gallaher, T., Munzinger, J., ... Forest, F. (2012). Straightening out the screw-pines: A first step in understanding phylogenetic relationships within Pandanaceae. *Taxon*, 61(5), 1010-1020.
- Buerki, S., Gallaher, T., Booth, T., Brewer, G., Forest, F., Pereira, J.T., & Callmender, M.W. (2016). Biogeography and evolution of the screw-pine genus *Benstonea* Callm. & Buerki (Pandanaceae). *Candollea*, 71(2), 217-229.
- Callmender, M.W., Lowry II, P.P., Forest, F., Devey, Beentje, H., & Buerki, S. (2012). *Benstonea* Callm. & Buerki (Pandanaceae): characterization, circumscription, and distribution of a new genus of screw-pines, with a synopsis of accepted species. *Candollea*, 67(2), 323-345.
- CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12794-12797.
- Chiang, T.Y., Schaal, B.A., & Peng, C.I. (1998). Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39, 245-250.
- De-Groot, G.A., During, H.J., Maas, J.W., Schneider, H., Vogel, J.C., & Erkens, R.H.J. (2011). Use of *rbcL* and *trnL-F* as a two-locus DNA barcode for identification of NW-European ferns: An ecological perspective. *PLoS ONE*, 6(1), e16371. doi:10.1371/journal.pone.0016371
- Elvyra, R. & Yus, Y. (2012). *Ikan Lais dan Sungai Paparan Banjir di Provinsi Riau*. Pekanbaru: UNRI Press.
- Golenberg, E.M., Clegg, M.T., Durbin, M.L., Doebley, J., & Ma, D.P. (1993). Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2(1), 52-64.
- Guo, Y-Y, Huang, L-Q, Liu, Z-J, & Wang, X-Q. (2016). Promise and Challenge of DNA Barcoding in Venus Slipper (*Paphiopedilum*). *PLoS ONE*, 11(1), e0146880.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., & deWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Royal Society London B.*, 270(1512), 313-321.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., & Janzen, D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8369-8374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>
- Roslim, D. I., Nurkhairani, P., Herman, & Elvyra, R. (2016a). Identification of durik-durik plant (*Syzygium* sp) using the *psbA-trnH* intergenic spacer and ITS regions. *Transaction of Persatuan Genetic Malaysia*, 3, 11-16.
- Roslim, D.I., Khumairoh, S., & Herman. (2016b). Confirmation of tuntun angin (*Elaeocarpus floribundus*) taxonomic status using *matK* and *ITS* sequences. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 8(3), 392-399.
- Roslim, D. I. (2017). Identification of Pandan Plant (*Benstonea* sp) from Riau, Indonesia Using Three DNA Barcodes. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 49(4), 346-360.**



- Roslim, D. I. & Herman. (2017). *Application of rps16 Intron and trnL-trnF Intergenic Spacer Sequences to Identify Rengas clone Riau*. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 9(2), 209-216.
- Roslim, D. I. (2018). Pandan (*Pandanus* sp), Rotan (*Calamus* sp), and Rengas (*Gluta* sp) from Kajuik Lake, Riau Province, Indonesia. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61, e18160419.
- Roslim, D. I. (2019). Analysis of *matK*, *rbcL* and *trnL-trnF* intergenic spacer sequences on durik-durik (*Syzygium* sp). *Journal of Physics: Conference Series*, 1351, 012023.
- Roslim, D.I., Asih, H., & Herman. (2020). Sekuen DNA parsial dari gen *gapdh* pada tumbuhan sirsak (*Annona muricata* L.). *Al-Kauniyah*, 13(2), 209-217.
- Shaw, J., Lickey, E., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E., & Small, R. L. (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92(1), 142–166.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., & Small, R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94(3), 275–288.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., & Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.
- Timme, R., Kuehl, E.J., Boore, J.L., & Jansen, R.K. (2007). A comparative analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae) plastid genomes: identification of divergent regions and categorization of shared repeats. *American Journal of Botany*, 94, 302–313.
- Widodo, P., Chickmawati, T., Kusuma, & Y.W.C. (2019). Placement of *Syzygium boerlagei* (Merr.) govaerts (Myrtaceae) confirmed with *atpB-rbcL* intergenic spacer. *Biotropia*, 26(1), 9-15.















**Lampiran 4.** Perbedaan nukleotida berdasarkan sekuen DNA dari *trnQ-5'rps16 intergenic spacer*

No	Spesies	Nomor nukleotida*																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
1	<i>B. sp. from Riau</i>	A	T	A	-	A	T	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	<i>B. copelandii</i> vc Gallaher 8/4/12-001	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	<i>B. copelandii</i> vc Gallaher 7/21/12-002	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	<i>B. fortuita</i> vc Callmander 1197	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	<i>B. affinis</i> isolate T0072	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	<i>B. affinis</i> vc Low s.n.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	<i>B. affinis</i> vc Callmander 1018	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	<i>B. affinis</i> vc Dowe 290809A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	<i>B. affinis</i> vc Buerki 326	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	<i>B. aff. pumila</i> SB-2017 vc Callmander 1036	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	<i>B. aff. inquilina</i> SB-2017 vc Callmander 1192	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	<i>B. aff. pilaris</i> SB-2017 vc Low s.n.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	<i>B. ashtonii</i> vc Low 217	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	<i>B. brevistylis</i> vc Callmander 1199	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	<i>B. monticola</i> isolate T0143	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	<i>B. thwaitesii</i> vc Zanan 58	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	<i>B. gibbsiana</i> vc Perreira SAN150851	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	<i>B. gibbsiana</i> vc Callmander 1030	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19	<i>B. foetida</i> vc Zanan 4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20	<i>B. pectinata</i> vc Callmander 1024	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21	<i>B. pectinata</i> vc Buerki 331	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22	<i>B. nana</i> vc Beentje 75788	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23	<i>B. nana</i> vc Callmander 1055	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
24	<i>B. kurzii</i> vc Callmander s.n.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
25	<i>B. brunigii</i> vc Callmander 1012	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26	<i>B. thurstonii</i> vc Callmander 40963	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27	<i>B. serpentinica</i> vc Callmander 1187	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28	<i>B. serpentinica</i> vc Buerki 342	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
29	<i>B. stenocarpa</i> vc Bau s.n.1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
30	<i>B. stenocarpa</i> vc Bau s.n.3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
31	<i>B. herbacea</i> vc Beentje 75785	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32	<i>B. herbacea</i> vc Callmander 1051	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
33	<i>B. herbacea</i> vc Callmander 1053	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
34	<i>B. pachyphylla</i> vc Callmander 1020	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
35	<i>B. ornata</i> vc Callmander 998	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
36	<i>B. platystigma</i> vc Callmander 1001	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

