

BARKOD DNA TUMBUHAN PEGAGAN (*Centella asiatica* (L) Urban) BERDASARKAN GEN *rbcL* DAN *matK*

Bastian Nova^{1*}, Epi Supri Wardi², Irwandi³ dan Atika Aulia Sari⁴

¹Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian,
Kampus Limau Manis, Universitas Andalas, Sumatra Barat, Indonesia

^{2,3,4}Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Perintis Indonesia, Sumatra
Barat, Indonesia.

E-Mail: bastiannova@ae.unand.ac.id (*Corresponding author)

Submit: 28-01-2024

Revisi: 20-06-2024

Diterima: 01-12-2025

ABSTRAK

Barkod Dna Tumbuhan Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) Berdasarkan Gen *rbcL* Dan *matK*. Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) adalah tanaman yang banyak digunakan dalam pengobatan tradisional untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Identifikasi tanaman pegagan diperlukan untuk memastikan spesiesnya. Salah satu metode identifikasi tanaman adalah DNA barcoding. Primer yang umum digunakan dalam DNA barcoding tanaman adalah primer *rbcL* dan *matK*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui primer DNA barcoding terbaik yang digunakan dalam mengidentifikasi pegagan hijau, merah, embun, dan kapsul pegagan menggunakan gen *matK* dan *rbcL*. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan Thermo Scientific GeneJet Plant Genomic DNA Purification Mini Kit. Berdasarkan pencarian pada sistem BOLD, primer *matK* untuk pegagan hijau menunjukkan identitas 100% dengan *Centella asiatica*, sementara pegagan merah menunjukkan kemiripan 99,13% dengan *Hydrocotyle ranunculoides*, pegagan embun menunjukkan kemiripan 98,13% dengan *Hydrocotyle hyrta*, dan kapsul pegagan menunjukkan kemiripan 99,03% dengan *Hydrocotyle hyrta*. Untuk primer *rbcL*, pegagan hijau menunjukkan kemiripan 99,81% dengan *Hydrocotyle bowlesioides*, dan pegagan merah menunjukkan kemiripan 100% dengan *Hydrocotyle vulgaris*. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa gen *matK* lebih baik digunakan dalam mengidentifikasi tanaman pegagan karena memiliki kemampuan untuk membedakan tanaman hingga tingkat spesies daripada gen *rbcL*.

Kata kunci : DNA barcoding, *matK*, Pegagan, Primer, *rbcL*.

ABSTRACT

DNA Barcode Of Gotu Gotu Plant (*Centella asiatica* (L) Urban) Based On *RbcL* And *matK* Genes. Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) is a plant that is widely used as a traditional medicine to cure various diseases. Identification of gotu kola plants is needed to ascertain the species. One method of identifying plants is DNA barcoding. Primers commonly used in plant barkod DNA are *rbcL* and *matK* primers. This research was conducted to find out the best barkod DNA used in identifying green, red, dew gotu kola and gotu kola capsules using *matK* and *rbcL* genes. DNA isolation was carried out using Thermo Scientific GeneJet Plant Genomic DNA Purification Mini Kit. Based on the BOLD system search for green pegagan primer *matK* 100% identical to *Centella asiatica*, red pegagan 99.13% similarity to *Hydrocotyle ranunculoides*, pegagan embun 98.13% similarity to *Hydrocotyle hyrta* and pegagan capsule 99.03% similar to *Hydrocotyle hyrta*. For the *rbcL* primers, the green pegagan similar 99.81% with *Hydrocotyle bowlesioides* and red pegagan similiar 100% with *Hydrocotyle vulgaris*. From the research it can be concluded that the *matK* gene is better used in identifying pegagan plants because it has the ability to distinguish plants up to species leves rather than the *rbcL* gene.

Key words : Growmore fertilizer, Hot chilli, Petroganic fertilizer.



1. PENDAHULUAN

Tumbuhan pegagan merupakan tumbuhan obat yang sudah digunakan secara luas untuk mengobati berbagai macam penyakit, baik digunakan dalam bentuk ramuan maupun dalam bentuk bahan tunggal (Soerahso et al., 1992). Menurut penelitian yang telah dilakukan Januwati (2002) pegagan mengandung asiaticosida berupa glikosida dan banyak dipakai dalam ramuan obat tradisional atau jamu. Beberapa khasiat tumbuhan pegagan lainnya adalah sebagai obat lemah syaraf, demam, bronkhitis, kencing manis, psikoneurosis, wasir, tekanan darah tinggi, penambah nafsu makan, dan penguat daya ingat (Soerahso et al., 1992). Banyaknya manfaat tumbuhan pegagan, maka perlu dilakukan pengembangan. Dalam pengembangan diperlukan berbagai data pendukung, salah satunya yaitu identifikasi status genetik tumbuhan pegagan (Julianti et al., 2015).

Selama ini orang melakukan identifikasi pada tumbuhan dengan menggunakan metode morfologi konvensional yang diidentifikasi dari bentuk fisiknya seperti bunga, daun, batang, cabang dan biji (Kalangi et al., 2014). Metode identifikasi ini membutuhkan waktu yang lama, relatif mahal, dipengaruhi oleh lingkungan sehingga keragaman identifikasi yang diperoleh terbatas, tidak bisa mengidentifikasi tumbuhan jika sudah dalam bentuk sediaan dan tidak konsisten serta hanya bisa diterapkan pada tanaman dewasa. Selain itu pengamatan morfologi membutuhkan seorang pakar taksonomi yang sampai saat ini jumlahnya sangat terbatas (Virgilio et al., 2012). Karena kelemahan tersebut perlu dikembangkan suatu metode terbaru yang lebih tepat, cepat dan efisien untuk mengidentifikasi. Metode yang saat ini mulai dikembangkan untuk identifikasi genetik tumbuhan adalah barkod DNA (Kalangi et al., 2014).

Barkod DNA adalah suatu metode yang digunakan untuk identifikasi organisme secara genetik. Barkod DNA menggunakan sekuens/potongan DNA pendek (Hebert et al., 2003). Barkod DNA memiliki fungsi-fungsi aplikatif misalnya untuk survey ekologi (Dick CW, 2009), identifikasi takson-takson kriptik (Lahaye et al., 2008) dan konfirmasi sampel-sampel tanaman obat (Xue CY, 2011) serta mengidentifikasi sampel yang sudah dalam bentuk sediaan. Keuntungan dari barkod DNA ini yaitu stabil, cepat dan dapat dideteksi dalam semua jaringan tumbuhan, serta tidak dipengaruhi oleh lingkungan. Untuk mengidentifikasi tumbuhan dalam teknologi barkod DNA perlu menggunakan gen pengkode standart. Gen yang biasa digunakan adalah gen *rbcL* dan *matK* karena eksistensi, efektifitas, dan kelestarian laju mutasi kedua gen tersebut yang ditemukan pada hampir semua tumbuhan. Penggunaan dua gen plastid *rbcL* dan *matK* direkomendasikan oleh *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) sebagai barkod standar untuk tumbuhan (CBOL, 2009). Sehingga pada saat ini, gen *rbcL* dan *matK* sudah dipergunakan sebagai penanda DNA untuk spesies tumbuhan (Hebert dkk. 2003; Hajibabaei dkk).

Berdasarkan penelusuran singkat dalam BOLD (*Barcode of Life Database*) sistem yang terhubung dengan *database sequence* dari beberapa negara, data *sequence* barkod DNA standar (*rbcL* dan *matK*) banyak spesies belum tersedia atau belum lengkap khususnya untuk kedua gen barcode tumbuhan pegagan, karena hal tersebut peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang barkod DNA tumbuhan pegagan dengan primer gen *rbcL* dan *matK* sebagai data inventaris identitas molekuler tanaman ini.

2. METODA PENELITIAN

2.1. Pengambilan Sampel

Sampel tumbuhan pegagan diambil di daerah Alahan Panjang, Kecamatan Lembah Gumanti, Kabupaten Solok, Padang, Sumatera Barat, Indonesia. Sampel sedian pegagan (kapsul X) dibeli dari salah satu toko obat herbal yang ada di Padang.

2.2. Identifikasi Sampel

Identifikasi sampel dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Universitas Andalas Padang.

2.3. Isolasi DNA

Isolasi sampel pegagan menggunakan Protocol Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0792. Sampel daun pegagan segar tanpa tulang daun pegagan digerus menggunakan mortar, kemudian ditimbang 0.3 g didalam mikrotube 1.5 ml ditambahkan 350 µl Lysis Buffer A, kemudian divortex selama 10-20 detik. Tambahkan 50 µl Lysis Buffer B dan 20 µl RNase A, divortex selama 1 menit. Inkubasi sampel selama 10 menit pada suhu 65°C di waterbath. Tambahkan 130 µl Precipitation Solution dan dibolak-balik 2-3 kali, kemudian diinkubasi dalam es selama 5 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 5 menit pada 14.000 rpm sehingga terbentuk 2 lapisan, supernatant dan pellet. Ambil supernatant (450-500 µl) dan pindahkan ke mikrotube baru, tambahkan 400 µl Plant gDNA Binding Solution dan 400 µl etanol 96% kemudian kocok. Pindahkan (600-700 µl) larutan yang sudah dikocok kedalam spin colum, disentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm, kemudian buang larutan yang terdapat pada collection tube. Tambahkan sisa larutan yang sudah dikocok sebelumnya kedalam spin

colum kemudian sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm dan buang kembali larutan yang terdapat pada collection tube. Tambahkan 500 µl Wash Buffer I, sentrifugasi selama 1 menit pada 10.000 rpm, buang larutan yang terdapat pada collection tube. Tambahkan 500 µl Wash Buffer II, sentrifugasi selama 1 menit pada 14.000 rpm. Ganti collection tube dengan collection tube steril yang baru kemudian tambahkan 100 µl elution buffer, diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang dan sentrifugasi selama 1 menit pada 10.000 rpm. Pindahkan template DNA kedalam mikrotube baru. Kemudian dilakukan elektroforesis dengan 1 µl λ DNA ditambah 2 µl template DNA dan 7 µl TE 1 X lalu dirunning pada 100 volt selama 30 menit dan diamati dibawah sinar UV 250λ. DNA di simpan pada -20°C.

2.4. Amplifikasi DNA

Untuk sampel tumbuhan pegagan amplifikasi DNA dengan menggunakan 3 µl DNA template, 13 µl Dream Tag Green PCR, 7 µl Free Water Nuclease. Untuk primer digunakan primer universal yaitu 1 µl rbcLaF (5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-3') dan 1µl rbcLaR (5'-GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG-3') untuk amplifikasi gen rbcL (Kress dan Erickson, 2007) serta untuk gen matK digunakan 1µl matK-3F (5'-CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G-3') dan 1 µl matK-1R (5'-ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3'). Untuk sampel kapsul pegagan amplifikasi DNA menggunakan 2 µl DNA template, 25 µl KOD, 21 µl Free Water Nuclease. Untuk primer masing-masing 1,5 µl untuk forward dan reverse.

Pengaturan suhu thermocycler untuk primer *rbcL* dimulai dengan denaturasi awal pada 95°C selama 2 menit kemudian dilanjutkan 35 siklus (95°C 30 detik, 55°C 30 detik, 70°C 30 detik dan 72°C 1 menit). Untuk primer *matK* dimulai dengan denaturasi awal pada 95°C selama 2 menit, kemudian dilanjutkan 35 siklus (95°C 30 detik, 55°C 30 detik, dan 72°C 1 menit).

2.5. Elektroforesis

Hasil amplifikasi selanjutnya dielektroforesis dengan gel agarosa 0.8%. Gel dibuat dengan melarutkan 0,4 gram bubuk agarosa dalam 50 ml TBE untuk kemudian dihomogenkan dan dipanaskan dengan microwave hingga mendidih. Setelah agarose larut, ke dalam botol Scott ditambahkan 1 tetes ETBr, kemudian kocok sebentar. Selanjutnya dituangkan pada cetakan gel yang sebelumnya telah ditempatkan comb (sisir) untuk membuat lubang/sumur dan didiamkan hingga gel mengeras. Gel agarose yang sudah beku direndam dalam running buffer TBE. Setiap sumur diisi 5 µl DNA hasil PCR dan penanda (marker) berat molekul di satu sumur lainnya diisi

dengan 5 µl DNA Ladder 1 kb. Setelah lubang-lubang pada gel selesai diisi, tangki elektroforesis diberi aliran listrik. Sisi yang berisi hasil amplifikasi diberi arus negatif. Proses elektroforesis dijalankan selama 30 menit pada voltase 100 volt. Setelah proses running selesai, gel diamati di atas UV trans-illuminator dan di amati pada computer.

2.6. Sequencing DNA

Sequencing sampel dikirim ke 1stbase Asia di Singapura.

2.7. Analisis Barkod DNA

Kromatogram DNA hasil *sequencing* divisualisasi dengan menggunakan program *Geneious v5.6* dan disunting menggunakan aplikasi Bioedit. Bagian awal DNA dihapus beberapa bp dan pembacaan nukleotida yang keliru diperbaiki berdasarkan tingkat keakuratan terbaca. Untuk keakuratan amplifikasi gen target yang diuji menggunakan primer *rbcL* dan *matK*, dilakukan identifikasi melalui *BOLD (Barcode of Life Database) system* (www.boldsystem.org).

3. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan diambil dari daerah kabupaten Solok. Dari hasil identifikasi yang dilakukan di Herbarium ANDA sampel yang telah diambil berupa *Centella asiatica* (L) Urb. Untuk sampel pegagan hijau dan pegagan merah, dan 1 sampel berupa *Hydr cotyle sibthorpioides lam.* Setelah sampel diidentifikasi kemudian baru dilakukan isolasi DNA. Organ tumbuhan yang diambil untuk isolasi DNA adalah daun. Bagian daun dipilih untuk digunakan dalam isolasi

DNA karena di dalam DNA pada daun terdapat kloroplas yang mengandung gen *rbcL* (*Ribulose-bisphosphate carboxylase*) dan *matK* (*Maturase-K*). Daun diambil tanpa tulang daun untuk memudahkan proses penggerusan. Untuk sampel pegagan kapsul langsung dilakukan isolasi DNA tanpa melalui proses penggerusan terlebih dahulu. Ini karena sampel yang dalam kapsul sudah berbentuk serbuk halus.

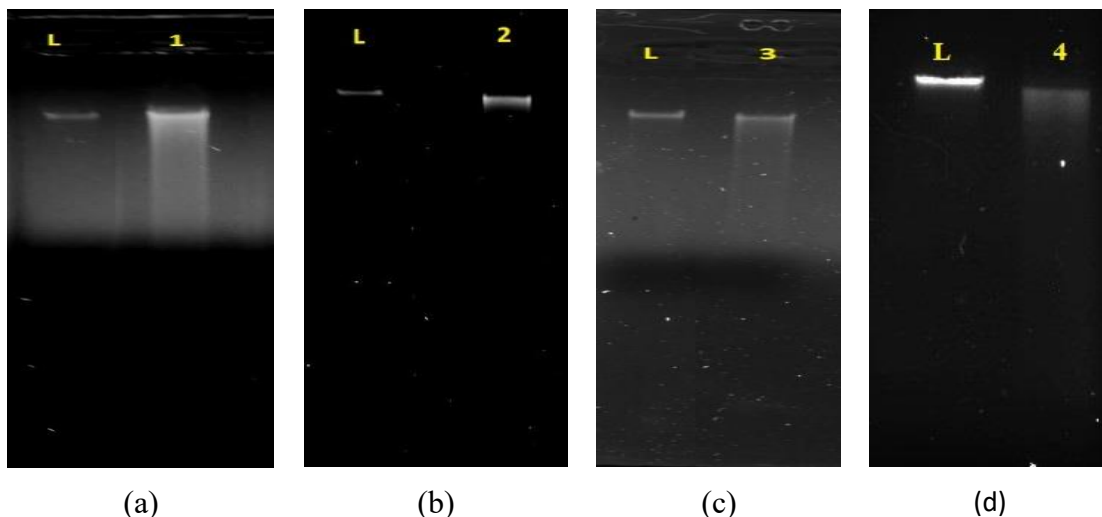
Isolasi DNA sampel pegagan dilakukan untuk mengamplifikasi gen target dari primer *rbcL* dan *matK* yang terdapat didalam kloroplas. Proses isolasi DNA menggunakan *GeneJET Plant*

Genomic DNA purification Mini Kit #K0971 dimana prinsipnya adalah Sampel dilisis dalam buffer lisis A dan B yang menghasilkan polisakarida, protein, *RNase* A dan pengotor-pengotor lainnya yang kemudian dihilangkan dengan larutan presipitasi sehingga terbentuk endapan. lisat kemudian dicampur dengan larutan pengikat gDNA tanaman, etanol dan dimuat pada kolom pemurnian tempat DNA akan berikatan dengan membran silika. kotoran secara efektif dihilangkan dengan mencuci kolom dengan *wash buffer* I dan II. DNA genom kemudian dielusi dengan *elution buffer*.

Proses utama isolasi DNA yaitu merusak atau penghancuran membran dan dinding sel. Pemecahan sel (lisis) bertujuan untuk mengeluarkan isi sel. Tahap penghancuran sel atau jaringan dilakukan dengan cara menggerus sampel pegagan menggunakan mortar. Fungsi penambahan *lysis buffer* adalah untuk menjaga struktur DNA selama proses penghancuran dan purifikasi sehingga memudahkan dalam menghilangkan protein dan RNA serta mencegah aktivitas enzim pendegradasi DNA dan mencegah perubahan pada molekul DNA.

Penambahan *precipitation solution* untuk memecahkan dan mengkoagulasi protein dan pengotor-pengotor yang kemudian dilakukan pemisahan dengan cara disentrifugasi. DNA kemudian akan diikat dengan *gDNA binding solution* dan etanol sehingga akan melekat pada silikagel yang terdapat pada *spin column*. Template DNA dicuci dengan *wash buffer* 1 dan II yang kemudian DNA yang terikat pada silika dilepaskan dengan *elution buffer*.

Hasil isolasi DNA yang terbentuk berupa larutan jernih tidak berwarna yang menunjukkan bahwa tidak adanya klorofil daun yang larut dalam larutan buffer yang digunakan selama proses isolasi DNA. Untuk melihat adanya DNA yang terbawa selama proses isolasi DNA dilakukan elektroforesis. TE 1X bertindak sebagai larutan penyangga yang berguna untuk menambah densitas DNA sehingga DNA tetap berada dibagian bawah dari sumur untuk dapat bergerak ke arah muatan positif. Setelah proses running selesai maka untuk melihat hasil elektroforesis media agar ditempatkan dibawah lampu UVtrans-illuminator 250Å dan dilihat dengan menggunakan computer (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil elektroforesis isolasi DNA; (a) Sampel pegagan embun (PE) L: λ DNA, 1: PE, (b) Sampel pegagan hijau (PH) L: λ DNA, 2: PH, (c) sampel pegagan merah (PM) L: λ DNA, 3: PM, (d) sampel pegagan kapsul (PK) L: λ DNA, 4: PK

Terbentuknya pita DNA pada elektroforegram hasil elektroforesis menunjukkan adanya DNA (Gambar 1). Garis *smear* yang terlihat pada DNA sampel pegagan embun, pegagan merah dan pegagan kapsul (Gambar 1 (a), (c) dan (d)) menunjukkan bahwa masih terdapat pengotor didalam template DNA. Pita DNA tunggal pada sampel pegagan hijau (Gambar 1.b) artinya DNA yang diperoleh tersebut utuh atau tidak ada *smear* ketika DNA dielektroforesis. DNA yang berkualitas baik dicirikan oleh pita DNA yang terlihat tebal dan bersih bila divisualisasikan foto gel elektroforesis (Ardiana 2009). Ini terlihat pada sampel pegagan hijau dimana pita yang dihasilkan tebal yang menandakan bahwa konsentrasi DNA yang terdapat dalam template DNA tinggi. Sedangkan untuk sampel pegagan embun, pegagan merah dan pegagan kapsul pita yang dihasilkan tipis, ini menandakan bahwa konsentrasi DNA dalam template DNA rendah. Hal ini menjadi penting karena pada proses sekuensing DNA yang masih utuh akan memberikan hasil yang lebih akurat. Setelah dilihat adanya DNA pada proses elektroforesis kemudian dilanjutkan dengan proses PCR untuk menggandakan DNA yang terbentuk.

Prinsip kerja dari PCR adalah proses yang diulang-ulang antara 20-40 kali siklus (Muladno, 2010). Menurut Newton dan Graham (1994) tahap-tahap dalam proses PCR meliputi: (i) *denaturasi* DNA, pembukaan utas ganda DNA menjadi utas tunggal (biasanya pada suhu 92-95°C), (ii) tahap *annealing*, penempelan primer pada DNA cetakan biasanya tergantung pada Melting Temperatur primer yang digunakan), serta (iii) tahap *extension*, pemanjangan primer dengan melakukan reaksi polimerisasi nukleotida untuk membentuk rantai DNA (biasanya pada suhu 72°C). Ketiga

tahap tersebut akan dilakukan secara berulang.

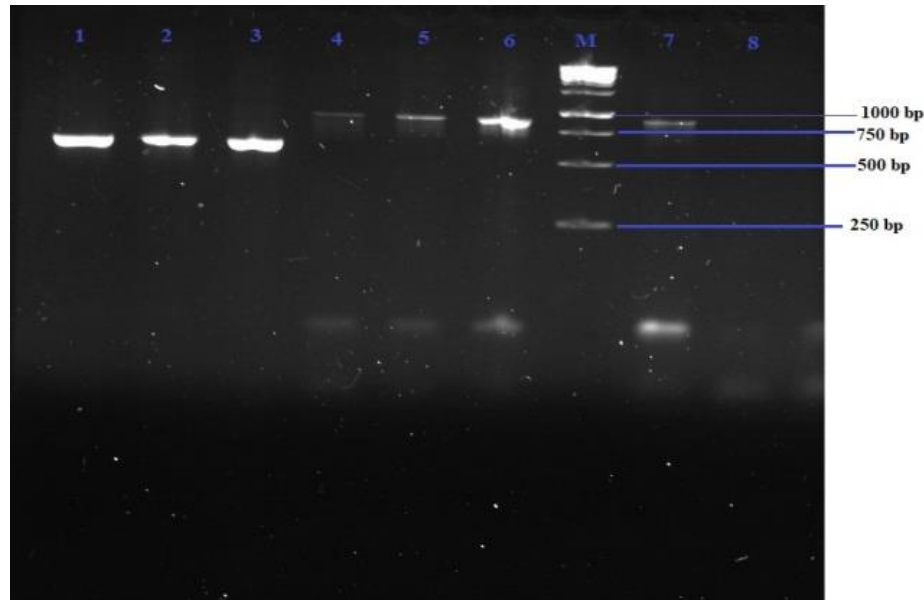
Pada PCR sampel tumbuhan pegagan menggunakan 35 kali siklus berulang, dimana dimulai pada tahap peleburan yang dilakukan pada suhu tinggi untuk memutus ikatan hidrogen DNA dari untai ganda menjadi untai tunggal yang dilakukan dalam waktu 1 menit untuk siklus awal dan 30 detik untuk siklus berikutnya. Ini untuk memastikan semua berkas DNA terpisah dan menyebabkan DNA tidak stabil dan siap menjadi template bagi primer (Muladno, 2010). Pada tahap peleburan menggunakan suhu 95° selama 1 menit. Untuk tahap penempelan suhu diturunkan sehingga primer yang spesifik akan berikatan dengan DNA target. primer *rbcL* dan *matK* menggunakan suhu 55°, yang merupakan suhu yang optimum untuk penempelan kedua primer ini. Untuk tahap elongasi suhu dinaikkan kembali karena pada tahap ini DNA polimerase dapat memanjangkan primer dengan cara menambah nukleotida pada untai DNA. Ini dilakukan pada suhu 72°C selama 1 menit untuk mensintesis fragmen PCR. Setelah selesai tahap elongasi kemudian diulang kembali tahap awal sebanyak 35 siklus.

Dalam proses amplifikasi gen *rbcL* lebih mudah menempel dari pada gen *matK*, tetapi *matK* memberikan resolusi yang lebih tinggi dalam membandingkan spesies tumbuhan, sedangkan gen *rbcL* lebih mudah diamplifikasi, akan tetapi resolusinya rendah untuk dapat membedakan beberapa spesies yang berkerabat dekat. Konfirmasi keberhasilan amplifikasi fragmen gen dilakukan dengan visualisasi melalui elektroforesis. Fragmen gen yang berhasil diamplifikasi akan dianalisis untuk *sequencing* DNA (Hollingsworth *et al.* 2011).

Proses elektroforesis dilakukan untuk melihat ukuran dari product PCR.

Untuk melihat ukuran DNA menggunakan marker. Marker adalah segmen DNA spesifik yang sudah diketahui ukurannya. Pada penelitian ini menggunakan ladder 1 Kb. Hasil amplifikasi fragmen DNA target dapat disajikan pada Gambar 2. yang

divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 0.8%. Gen *rbcL* tervisualisasi dalam gel agarose pada 600 bp dan gen *matK* $\pm$ 800 bp dengan berpatokan pada marker ladder.



Gambar 2. Hasil elektroforesis PCR; 1: sampel pegagan hijau *rbcL*; 2: sampel pegagan merah *rbcL*; 3: sampel pegagan embun *rbcL*; 4: sampel pegagan hijau *matK*; 5: sampel pegagan merah *matK*; 6: sampel pegagan embun *matK*; M: marker DNA ladder 1 kb; 7: sampel pegagan kapsul *matK*; 8: sampel pegagan kapsul *rbcL*.

Hasil elektroforesis PCR menunjukkan untuk primer *rbcL* pegagan hijau, pegagan merah, dan pegagan embun berada pada rentang antara 500-750 bp. Sedangkan untuk primer *matK* pegagan hijau, pegagan merah, pegagan embun dan pegagan kapsul berada pada rentang 750-1000 bp. Untuk pegagan kapsul yang menggunakan primer *rbcL* proses amplifikasi tidak berhasil dilakukan. Ini terlihat dari tidak adanya pita DNA yang terbentuk pada hasil visualisasi elektroforesis. Ini dapat terjadi karena tidak adanya sequens target untuk primer *rbcL* pada template DNA sampel pegagan kapsul, dan karena kualitas dan kemurnian dari template DNA itu sendiri.

Hasil PCR kemudian dilanjutkan dengan proses *sequencing*. Produk PCR dikirim ke *1stbase Asia* untuk dilakukan proses *sequencing*. Tujuan dari *sequencing* adalah untuk menentukan urutan basa DNA dalam segmen molekul DNA yang relatif pendek sehingga memungkinkan untuk mengetahui kode genetik dari molekul DNA. Amplikon yang berhasil diurutkan di laboratorium *First Base* Singapura diperoleh urutan basa nukleotida dari masing-masing sampel, merupakan hasil yang baik, hal ini menyatakan bahwa proses *sequencing* ini berhasil.

Hasil *sequencing* dari produk PCR primer *rbcL* dan *matK* menghasilkan kromatogram yang berkualitas tinggi

untuk sampel pegagan merah *rbcl*, pegagan embun *rbcl*, pegagan hijau *matK*, pegagan merah *matK* dan pegagan embun *matK*. Ini dilihat dari HQ% kromatogram yang terbaca dalam *geneious v5.6* menunjukkan nilai >93.0% untuk sampel gen *rbcl* pegagan merah dan embun serta >94.0% untuk sampel

gen *matK* pegagan hijau, merah dan embun (Table.1). dan 64.5% untuk sampel pegagan kapsul. Sedangkan untuk pegagan hijau *rbcl* menunjukkan nilai HQ% kromatogram 0.0% (Table.1). ini menyatakan bahwa kromatogram yang dihasilkan memiliki kualitas buruk.

Table.1. Nilai HQ% Kromatogram Yang Terbaca Dalam *Geneious v5.6*

NamA	HQ%	Sequence length
P_hijau_rbcL	0.0%	316
P_merah_rbcL	93.6%	574
P_embun_rbcL	94.9%	573
P_hijau_matK	95.8%	855
P_Merah_matK	95.3%	852
P_Embun_matK	94.9%	857
P_kapsul_matK	64.5%	837

Hasil *sequencing* kemudian diedit dengan menggunakan aplikasi bioedit. tujuan dari proses pengeditan sekuen adalah untuk membuang sekuen yang tidak jelas dan dilakukan penghapusan pita DNA yang tidak terbaca sequensnya dan tidak memiliki puncak kromatogram yang bagus. Sampel pegagan hijau memiliki 316 bp *sequence* *rbcl*. pita DNA teramplifikasi telah dihapus 5 bp untuk bagian awal dan 4 bp untuk bagian akhir, Sehingga ukuran pita DNA menjadi 307 bp. Sampel pegagan merah memiliki 574 bp *sequence* *rbcl*. Pita DNA teramplifikasi telah dihapus 8 bp untuk bagian awal dan 12 bp untuk bagian akhir, sehingga ukuran pita DNA menjadi 554 bp. Sampel pegagan embun memiliki 574 bp *sequence* *rbcl*. Pita DNA yang teramplifikasi telah dihapus 3 bp pada bagian awal dan 1 bp untuk bagian akhir,

sehingga ukuran pita DNA menjadi 553 bp.

Sampel pegagan hijau memiliki 854 bp *sequence* *matK*. Pita DNA teramplifikasi telah dihapus 13 bp pada bagian awal dan 5 bp pada bagian akhir sehingga ukuran pita menjadi 836 bp. Sampel pegagan merah memiliki 910 bp *sequence* *matK*. Pita DNA teramplifikasi telah dihapus 30 bp pada bagian awal dan 27 bp pada bagian akhir, sehingga ukuran pita menjadi 853 bp. Sampel pegagan embun memiliki 900 bp *sequence* *matK*. Pita DNA teramplifikasi telah dihapus 13 bp pada bagian awal dan 42 bp pada bagian akhir, sehingga ukuran pita menjadi 845 bp. Sampel pegagan kapsul memiliki 837 bp *sequence* *matK*. Pita DNA teramplifikasi telah dihapus 27 bp pada bagian awal dan 488 bp pada bagian akhir, sehingga ukuran pita menjadi 322 bp.

Data hasil *sequencing* yang sudah di analisis kemudian dimasukkan ke Genbank seperti BOLD. Output dari proses ini adalah informasi lengkap mengenai spesies (data morfologi, taksonomi, dan pendukung) yang kita masukkan bila spesies yang kita input sudah terdapat datanya di sistem.

Penelusuran dalam *BOLD system* untuk *sequence rbcL* sampel pegagan hijau tidak ditemukan dalam *BOLD system* ini berarti bahwa data tentang pegagan hijau yang menggunakan gen *rbcL* belum ada pada *BOLD system*. sedangkan pencocokan *sequence matK* sampel pegagan hijau menghasilkan tingkat kemiripan 100% (identik) dengan *Centella asiatica*. Penelusuran dalam *BOLD system* untuk *sequens rbcL* sampel pegagan merah menghasilkan tingkat kemiripan 99.81% dengan *Hydrocotyle bowlesioides*. pencocokan *sequence matK* sampel pegagan merah menghasilkan tingkat kemiripan 99.13% dengan *Hydrocotyle ranunculoides*.

Penelusuran dalam *BOLD system* untuk *sequence rbcL* sampel pegagan embun menghasilkan tingkat kemiripan 100% dengan *Hydrocotyle vulgaris*. Pencocokan *sequence matK* sampel pegagan embun menghasilkan tingkat kemiripan 98.13% dengan *Hydrocotyle hirta*. Pencocokan *sequence matK* sampel pegagan kapsul menghasilkan tingkat kemiripan 99.03% dengan *Hydrocotyle hirta*

Sinonim merupakan istilah atau nama lain yang digunakan untuk menyebut jenis suatu spesies. pegagan merupakan tumbuhan yang memiliki

sinonim yaitu *Hydrokotil asiatica* (Hyne, 1987). Apabila sinonim pada pegagan tersebut tidak dipublikasikan, maka cenderung membedakan spesies pegagan yang memiliki sinonim menjadi spesies yang berbeda. Sehingga penting sekali adanya publikasi mengenai sinonim dan nama yang telah diterima secara luas pada suatu spesies (Rohimah *et al.*, 2018). Dari penelusuran tersebut ternyata sampel pegagan dari daerah alahan panjang memiliki kekerabatan dekat dalam tingkat spesies dengan *Hydrocotyle hirta*, *Hydrokotyl vulgaris*, *Hydocotyle ranunculoides*, *Hydrocotyle bowlesioides*. Untuk sampel sediaan pegagan (kapsul X) berdasarkan hasil penelusuran dari *BOLD system* yang terkandung didalam kapsul X adalah 99.03% adalah *Hydrokotil hyrta* bukan *Centella asiatica*. Berdasarkan penelitian ini tingkat keberhasilan amplifikasi PCR untuk primer *rbcL* adalah 58,33% untuk pegagan hijau, 72,72% untuk pegagan merah, 66,67% untuk pegagan embun dan 0% untuk pegagan kapsul. Sedangkan untuk primer *matK* 50% untuk pegagan hijau, 54,54% untuk pegagan merah, 66.67% untuk pegagan embun dan 23.07% untuk pegagan kapsul (Table 3). Tingkat keberhasilan identifikasi pada penelitian ini dihitung berdasarkan nilai HQ% yang >90% terhadap jumlah seluruh sampel yang dikirim untuk proses *sequencing* sehingga didapatkan pesentase tingkat keberhasilan identifikasi *rbcL* dan *matK* adalah 66.67% dan 75%. Tingkat keberhasilan *matK* lebih tinggi bila dibandingkan dengan *rbcL*.

Tabel 2. Penelusuran hasil *BOLD System*.

No	Sampel	Penelusuran <i>BOLD system</i>	
		rbcL	MatK
1	Pegagan hijau	-	<i>Centella asiatica</i>
2	Pegagan merah	Hydrocotyle bowlesioides	Hydrocotyle ranunculoides
3	Pegagan embun	Hydrocotyle vulgaris	Hydrocotyle hirta

Tabel 3. Persentase keberhasilan amplifikasi PCR

No	Sampel	Primer	Total PCR amplifikasi	Amplifikasi PCR sukses	% amplifikasi PCR sukses
1	Pegagan hijau	rbcL	12	7	58,33%
		matK	10	5	50%
2	Pegagan merah	rbcL	11	8	72,72%
		matK	11	6	54,54%
3	Pegagan embun	rbcL	12	8	66,67%
		matK	9	6	66,67%
4	Pegagan kapsul	rbcL	13	0	0%
		matK	13	3	23,07%

Dari data ini, ternyata kemampuan diskriminasi (*discrimination power*) barkod oleh gen rbcL lemah, hal ini telah diperkirakan oleh beberapa publikasi ilmiah yang menggunakan gen ini untuk barkod (Lahaye *et al.*, 2008). rbcL merupakan penanda molekuler yang universalitasnya tinggi namun resolusinya rendah, sedangkan matK memberikan universalitas rendah namun memiliki resolusi tinggi diantara jenis-jenis yang berbeda hasil yang didapatkan adalah gen rbcL hanya dapat membedakan pada tingkatan genus saja, sedangkan gen matK dapat membedakan pada tingkat spesies secara akurat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kolondam (2012) yang menyatakan gen matK memiliki tingkat evolusi yang tinggi dan urutan sekuen yang lebih bervariasi sehingga gen matK dianggap lebih baik dan lebih akurat

dalam membedakan dan mengidentifikasi suatu jenis. Karena tingkat keakuratannya yang lebih baik dalam mengidentifikasi jenis tanaman, sehingga gen matK lebih banyak digunakan dalam penelitian dibandingkan dengan gen rbcL. Hal senada juga dikemukakan Barthet (2012) bahwa gen matK lebih banyak digunakan dalam penelitian dibandingkan dengan gen rbcL karena gen matK dapat membedakan sampai tingkat spesies.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan penelusuran *BOLD System* yaitu pegagan hijau dari daerah Alahan Panjang identik (100%) dengan *Centella asiatica* yang ada pada Genebank berdasarkan gen matK, sedangkan pada gen rbcL semua jenis tumbuhan pegagan memiliki tingkat kemiripan >95%

terhadap jenis *Hydrocotyle sp.* yang ada di *system BOLD*. Untuk sediaan pegagan tumbuhan yang terkandung didalam kapsul X berdasarkan gen matK adalah 99.03% *Hydrocotyle hyrta*. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa gen matK lebih baik digunakan dalam mengidentifikasi tumbuhan pegagan karena memiliki kemampuan dalam membedakan tumbuhan sampai ke leves jenis daripada gen rbcL.

DAFTAR PUSTAKA

- CBOL (Consortium for the Barcode of Life) Plant Working Group (2009) *A DNA Barcode for Land Plant. Proceeding of the National Academy of Sciences*.
- Dick CW, K. W. (2009) 'Dissecting tropical plant diversity with forest plots and a molecular toolkit', 59(Bioscience), pp. 745–755.
- Hebert, P. D. (2003). Biological identifications through DNA barcoding. *Proc. r. Soc. Lond.,(B)*, 270, 313-321.
- Hyne, K. (1987) 'Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid II. Terjemahan Litbang Kehutanan', in *Terjemahan Badan Litbang Kehutanan*. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya.
- Julianti, E., Pinaria, A., Lengkong, E. F., & Kolondam, B. J. (2015). DNA barcoding tanaman daluga (*Cyrtosperma spp*) dari kepulauan Sangihe berdasarkan gen matK (DNA barcoding daluga plant (*Cyrtosperma spp*) of Sangihe Island based on matK gene). *Jurnal Bios Logos*, 5(2), 46-54.
- Kalangi, C. Kamu, V.S. & Kumaunang, M. (2014) 'DNA Tanaman leilem (*minahassae L.*) berdasarkan Gen matK', *Clerodendrum.*, 3(2).pp, pp. 108–112.
- Kalangi, C., Kamu, V. S. and Kumaunang, M. (2014) 'DNA Tanaman Leilem *minahassae L.*) Berdasarkan Gen matK (*Clerodendrum*', 3(2), pp. 108–112.
- Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., ... & Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2923-2928.
- Maurin, O., Duthoit, S. and Savolainen, V. (2008) 'A DNA barcode for the flora of the Kruger National Park (South Africa)', *South African Journal of Botany*, 74(2), pp. 370–371. doi: 10.1016/j.sajb.2008.01.073.
- Muladno (2010) *Teknologi Rekaya Genetika Edisi Kedua*. Bogor: IPB Press.
- Rohimah, S., Mukarramah, L., Sindiya, V., S., V. Y., K., G. A. and Su'udi, M. (2018) 'Eksplorasi Jenis dan Potensi DNA BARCODE ANGGREK *Thrixspermum* Secara In Silico', *Jurnal Biodjati*, 3(2), pp. 50–58. doi: 10.15575/biodjati.v3i2.3409.
- Soerahso, Y. Widiastuti, dan J. R. H. (1992) 'Tinjauan penggunaan pegagan sebagai obat tradisional dari berbagai perpustakaan', 1(2)(Warta Tumbuhan Obat Indonesia), p. 69–70.

Virgilio M, Jordaens K, Breman F, et al (2012) 'Turning DNA barcodes into an alternative tool for identification: African fruit flies as a model (Poster).', *Consortium for the Barcode of Life (CBOL)*.

Xue CY, L. D. (2011) 'Use of dna barcode sensu lato to identify traditional Tibetan medicinal plant *Gentianopsis paludosa* (Gentianaceae)', 49 (3):(J. Sys. Evol), pp. 267–270.