

Paku Kawat *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. (Lycopodiaceae-Lycopodiales) dari Provinsi Riau – Kajian Morfologi dan Sekuen DNA berdasarkan Primer *RBCL*

Club Moss *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. (Lycopodiaceae-Lycopodiales) From Riau Province – Morphological Study and Its DNA Sequence Based on *RBCL* Primer

Nery Sofiyanti, Mayta Novaliza Isda

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau
Kampus Bina Widya Jl. Pekanbaru Bangkinang KM 12.5, Panam, Pekanbaru, Riau. 28295.
Email : nery.sofiyanti@lecturer.unri.ac.id

Abstract

Moss club (*Lycopodiella cernua*) is one of fern members distributed in Riau Province. The aimed of this study were to characterized the morphological characters and to analyzed its DNA sequence based on *rbcl* primer. Samples were collected from the field, documented and characterized the morphological charaters. DNA were isolated and amplified using PCR method and *rbcl* primer. DNA sequnces were then analyzed using BLAST *Lycopodiella cernua* collected from Riau Province was characterized by having creeping and erect rhizome that covered by microphyl, and terminal strobili. *Rbcl* fragmen of *Lycopodiella cernua* was succsesfully amplified with 643 bp length. BLAST result confirmed the *rbcl* fragmen of this club moss.

Keywords: club moss, DNA, morphology, rbcl.

Pendahuluan

Paku kawat *Lycopodiella cernua* merupakan salah satu paku yang mempunyai daun bertipe mikrofil yang ditemukan di Provinsi Riau (Sofiyanti *et al.* 2015). Jenis ini tergolong dalam Famili Lycopodiaceae, Ordo Lycopodiales (Wikstrom & Kenrick 2000) kelas Lycopsidea. Pada umumnya anggota Lycopodiaceae mempunyai karakteristik rizom yang menjalar dengan cabang tegak, daun kecil dan menyerupai sisik tersusun pada seluruh permukaan batang, sporangia tersusun terminal pada ujung cabang membentuk strobilus (Zhang & Iwatsuki 2013).

Lycopodiella cernua pada umumnya merupakan paku helofit, yaitu paku yang hidup pada habitat yang sedikit berair (Zhang & Iwatsuki 2013). Namun inventarisasi paku ini di Provinsi Riau menunjukkan adanya tipe habitat yang berbeda, yaitu terestrial pada daerah terbuka maupun teraungi serta pada daerah berair

(helofit) (Sofiyanti *et al.* 2015; Sofiyanti & Isda 2017 dan 2018. *Unpubl.*).

Dewasa ini, kajian sistematika tumbuhan termasuk tumbuhan paku telah menggunakan pendekatan data molekuler yang berkaitan dengan karakteristik pita atau pun sekuen DNA. Salah satu penanda DNA untuk mengetahui karakteristik sekuen DNA adalah ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcl*) (Gielly & Taberlet 1994; Wikstrom & Kenrick 2000, 2001, 2008; Ebihara 2011; Bafeel *et al.* 2012) karena menunjukkan adanya variasi sekuen pada jenis yang berbeda sehingga dapat digunakan dalam identifikasi dan klasifikasi tumbuhan termasuk tumbuhan paku (Hasebe 1995).

Pada golongan tumbuhan paku, analisis DNA dengan primer *rbcl* telah dilakukan pada Famili Hymenophyllaceae, genus *Trihomanes* (Dubuisson *et al.* 2003) serta Famili Cyatheaceae, Lycopodiaceae dan Ophiglossaceae (Ebihara 2011). Kajian

ini bertujuan untuk mengkarakterisasi morfologi Paku Kawat *Lycopodiella cernua* dari Provinsi Riau serta menganalisis sekuen DNA menggunakan primer *rbcl*.

Metode Penelitian

Pengambilan sampel

Pengambilan sampel di lapangan dilakukan dengan metode eksplorasi. Untuk kajian morfologi sampel yang diambil adalah individu dewasa yang sudah menghasilkan spora. Sampel didokumentasikan dan dibuat herbarium. Nama ilmiah dan sinonim dicek di situs www.theplantlist.org. Sedangkan untuk analisis DNA sampel yang diambil adalah daun muda. Sampel dimasukan kedalam plastik dan diberi label, kemudian sampel disimpan dalam lemari pendingin 4C sampai digunakan. Tabel 1 menyajikan sampel yang diamati

Tabel 1. Sampel *Lycopodiella cernua* untuk karakterisasi morfologi

No	Lokasi	Kode spesimen
1	Panam, Pekanbaru	LCP*, LCP2, LCP3, Nery 2017; LCP4 Nery 2018
2	Bagan Siapi Api, Rokan Hilir	LCB1, 2017 Nery & Kusnita
3	Koto Gasip, Siak	LCS1, LCS2 Nery 2017
4	Pandau, Kampar	LCK Nery 2018

* Sampel yang digunakan untuk isolasi DNA

Analisis DNA dilakukan di di Laboratorium Genetika, Jurusan biologi FMIPA Universitas Riau, yaitu meliputi isolasi DNA, elektroforesis hasil isolasi DNA, amplifikasi menggunakan PCR, elektroforesis hasil amplifikasi PCR serta pembuatan sekuen DNA (untuk sekuen DNA dilakukan di PT Genetiak Science, Jakarta).

Isolasi DNA dan elektroforesis hasil isolasi: Isolasi DNA dilakukan menggunakan DNA isolation Kit (Thermo Fisher Scientific). DNA hasil isolasi kemudian di cek dengan metode elektroforesis menggunakan agrose

0.8 % dalam Bufer TAE. Untuk mengetahui kuantitas DNA maka digunakan marker 100 bp (Vivantis).

Amplifikasi PCR dan elektroforesis hasil PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) dilakukan. dengan menggunakan Gradient Master Cycle Eppendorf. Komponen PCR mengacu pada protokol Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Primer yang digunakan pada amplifikasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Sekuen Primer *rbcl* untuk analisi PCR

Primer	Sekuen
rbcla-F	ATGTCACCACAAACAGAGACT AAAGC
rbcla-R	CTTCTGCTACAAATAAGAATC GATCTCTCA

Sumber: Hasebe *et al.* 1994; Maloukh *et al.* 2017.

Siklus PCR mengacu pada kajian Watto *et al.* (2016) dengan modifikasi, yaitu sebagai berikut: Denaturasi awal (94°C) 2 menit, 30 siklus (Denaturasi (94 °C) 1 menit, Annealing primer (56 °C) 1 menit), Pemanjangan akhir (72 °C) 10 menit, Penyimpanan 4 °C. Hasil PCR dilanjutkan dengan elektroforesis menggunakan 1.5 % agarose dengan buffer TAE. Untuk mengetahui kuantitas dan kualitas hasil PCR digunakan marker 100 bp dan 1KB (Vivantis).

Sekuen DNA dan Analisis BLAST

Hasil PCR kemudian dilanjutkan dengan melakukan sekuen (PT Genetika Science). Hasil sekuen berupa Chromas file, diedit dengan software *Biological Sequence Alligment Editor* (BioEdit). dan disajikan dalam bentuk Fasta file. Kemudian dilanjutkan dengan analisis *Basic Local Alligment Search Tool* (BLAST) untuk mengetahui keserasian sekuen *rbcl* dengan data di NCBI. Pembuatan pohon kekerabatan juga dilakukan dengan BLAST berdasarkan *BLAST pairwise alignment* dengan metode *fast minimum evolution*.

Tabel 3 menunjukkan situs software Chromas, BioEdit dan BLAST.

Tabel 3. Situs software Chromas, BioEdit dan BLAST

Program	situs
Chromas	https://technelysium.com.au/wp/chromas/
BioEdit	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Hasil Dan Pembahasan

Taxonomic treatment

Lycopodiella cernua (L.) Pic. Serm. Webbia 23(1): 166 1968.

Deskripsi: Terrestrial. Rhizom merayap, panjang, bercabang merayap atau tegak

mencapai 100 cm, warna hijau. Daun mikrofil, isophilus, menyelubungi batang dan cabang, ujung runcing dan melengkung ke atas, ukuran sekitar 0.5 x 2.5 – 4.0 mm. Strobili terminal pada ujung cabang, sekitar 9 – 10 mm, melengkung ke bawah.

Sinonim

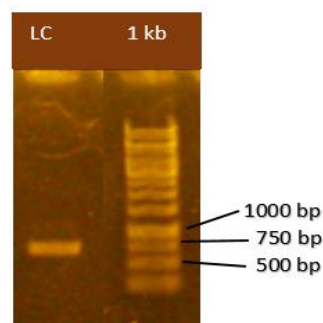
Lepidotis cernua (L.). P. Beauv., *Lycopodiella cernua* var. *cernua*, *Lycopodiella boryanum* A. Rich., *Lycopodium capillaceum* (Spring) Hieron, *Lycopodium cernuum* L. *Lycopodium cernuum* var. *capillaceum* Spring., *Lycopodium cernuum* var. *panamanse* Nessel, *Lycopodium cernuum* var. *watsonianum* Nessel, *Lygodium hesschii* Mull. Har., *Lygodium moritzii* O.F. Mull., *Pahilhanhea capillacea* (Spring) Holub, *Pahinhaea cernua* (L.) Franco & Vasc.



Gambar 1. Morfologi *Lycopodiella cernua* dari Provinsi Riau. Kiri: Habitus, tengah : daun pada batang utama, kanan : daun pada ujung cabang yang mendukung strobilus.

Amplifikasi PCR

Hasil amplifikasi PCR fragmen rbcL dari *Lycopodiella cernua* menunjukkan pita tunggal dengan panjang sekitar 650 bp (Gambar 2). Setelah amplifikasi PCR, dilanjutkan dengan proses sekuen DNA.



Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR fragmen *rbcl* *Lycopodiella cernua*

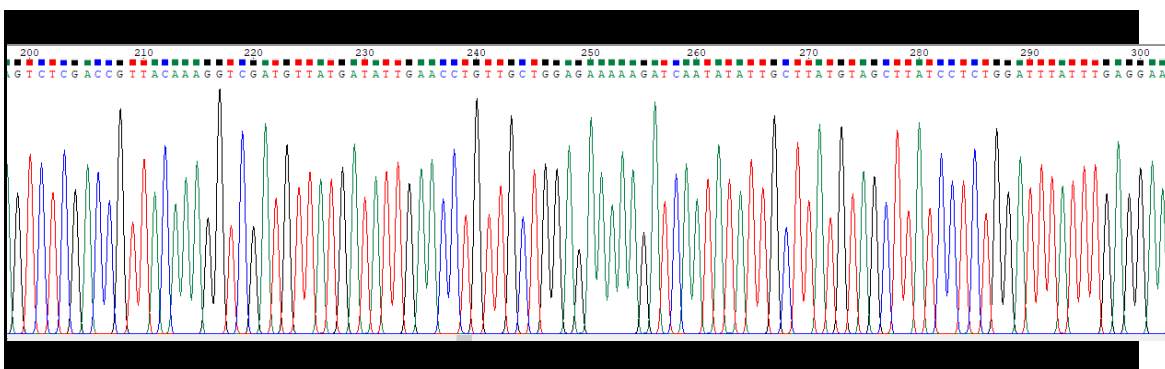
Sekuen DNA dan BLAST

Hasil sekuen disajikan dalam Chromas file (gambar 3) dalam bentuk kromatogram. Kromatogram hasil sekuen menggunakan primer *rbcla*-F menunjukkan hasil yang baik hal ini ditunjukkan dengan adanya *peak* tunggal untuk setiap basanya.

Sekuen fragmen *rbcl* dari *Lycopodiella cernua* yang diperoleh menggunakan primer *rbcla*-F dan *rbcla*-R diedit menggunakan BioEdit. Kemudian sekuen disimpan dalam Fasta File untuk dilanjutkan dengan analisis BLAST. Tabel 4 menunjukkan hasil BLAST Paku Kawat *Lycopodiella cernua* dari Riau dengan sekuen *rbcl* dari aksesori yang tersimpan dalam data NCBI dengan nilai keserasian 99 % dengan spesies *Lycopodiella glaucescens*, *Lycopodiella pendulina*, *Palhinhaea tomentosa* dan juga spesimen dari jenis yang sama (*Lycopodiella . cernua*) Dari tabel tersebut dapat diketahui deskripsi

sekuen yang disajikan, nilai *Max Score*, *Total Score*, persentase *Query Coverage*, *E Value*, persentase *Identity* serta no aksesori.

Pada deskripsi diuraikan mengenai nama jenis dan fragmen yang diamplifikasi, yaitu jenis yang tergolong genus *Lycopodiella* dan *Palhinhaea*. Kedua genus ini tergolong dalam famili yang sama yaitu *Lycopodiaceae* (Zhang & Iwatzuki 2013). Selain nama jenis, pada deskripsi juga diketahui bahwa fragmen yang teramplifikasi sesuai dengan data pada NCBI yaitu fragmen *rbcl*. Untuk nilai *Max Score* menunjukkan score keserasian tertinggi segmen yang disejajarkan dari sekuen yang sama pada database (Fassler & Cooper 2011). Sedangkan persentase *Query Coverage* (QC) menunjukkan persentase nukleotida yang serasi dengan sekuen yang ada di database NCBI. Pada tabel 4 diketahui nilai QC berkisar pada 92% sampai 98 %.



Gambar 3. Bagian kromatogram hasil sekuen fragmen *rbcl* *Lycopodiella cernua* (200 – 300 bp).

Nilai Expectation Value (EV) menggambarkan jumlah perbedaan pensejajaran dengan skor yang sesuai yang diharapkan ada pada database (Fassler & Cooper 2011). Semakin tinggi nilai EV maka semakin tinggi perbedaannya, sedangkan nilai EV yang mendekati 0 menunjukkan tingkat homologi sekuen yang tinggi. Pada tabel 4 diketahui bahwa nilai EV pada semua aksesori adalah 0.0. Sedangkan persentase *Identity* (ID) merupakan persentase kesamaan tertinggi dari suatu segmen sekuen dengan subyek sekuen yang sama. Pada kajian ini nilai ID

99 % dijumpai pada 6 aksesori (Tabel 3), 4 aksesori merupakan genus *Lycopodiella* dan 2 aksesori dari genus *Palhinhaea*.

Gambar 4 menunjukkan contoh pensejajaran sekuen *Lycopodiella cernua* dari Provinsi Riau dengan salah satu aksesori yang mempunyai keserasian 99 % yaitu *Lycopodiella glaucescens*. Panjang nukleotida dari *Lycopodiella cernua* Riau yang teramplifikasi menggunakan primer *rbcl* adalah 643 bp. Hasil pensejajaran pada gambar 4 menunjukkan bahwa keserasian sekuen dimulai pada urutan nukleotida ke – 35. Dari 609 nukleotida yang disejajarkan,

terdapat 605 nukleotida yang serasi dan 4 gap.

Pada sekuen *rbcl Lycopodiella cernua* dari Provinsi Riau, gap dijumpai pada urutan nukleotida ke 620, 623, 632 dan 635. Gap pada sekuen DNA menunjukkan adanya mutasi, baik itu *insertion* (penyisipan) maupun *deletion* (pengurangan) suatu nukleotida, atau yang dikenal dengan istilah *indels* (Evans & Warnow 2018). Menurut Yamuna &

Elakkiya (2015) adanya gap pada sekuen DNA saat proses pensejajaran ditandai dengan tanda *dash* seperti terlihat pada gambar 4, hal ini bertujuan untuk menyamakan panjang dari sekuen yang disejajarkan.

Tabel 4. Hasil BLAST fragmen *rbcl Lycopodiella cernua* dari Riau

Description	MS	TS	QC (%)	EV	ID (%)	ACC
<i>Lycopodiella glaucescens</i> chloroplast <i>rbcl</i> gene, partial	1114	1114	98%	0.0	99%	AJ133260.1
<i>Lycopodiella pendulina</i> chloroplast <i>rbcL</i> gene, partial	1104	1104	97%	0.0	99%	AJ133259.1
<i>Lycopodiella cernua</i> chloroplast <i>rbcL</i> gene, partial	1077	1077	93%	0.0	99%	AJ133258.1
<i>Palhinhaea cernua</i> ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxugenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, partial cds; chloroplast	1076	1076	93%	0.0	99%	KJ773661.1
<i>Palhinhaea tomentosa</i> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcL</i>) gene, partial cds; chloroplast	1058	1058	93%	0.0	99%	MG560497.1
<i>Lycopodiella cernua</i> chloroplast <i>rbcL</i> gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds, specimen_voucher: TNS:759265	1050	1050	92%	0.0	99%	AB574625.1

Keterangan : MS = Max Score, TS = Total Score, QC = Query coverage, EV = Expected Value, ID = Identity, ACC = Accession

Score	Expect	Identities	Gaps
1077 bits(1194)	0.0	605/609(99%)	1/609(0%)
Query 35	AATAACCTATTACACTCCTGAGTATGAGACCAAGGACACTGATATTCTGGCAGCATTTTCG		
Sbjct 1	AATAACCTATTACACTCCTGAGTATGAGACCAAGGACACTGATATTCTGGCAGCATTTTCG		
Query 95	AATGACTCCTCAACCTGGAGTACCACCTGAGGAGGCCGGGAGCCGCAGTAGCTGCTGAATC		
Sbjct 61	AATGACTCCTCAACCTGGAGTACCACCTGAGGAGGCCGGGAGCCGCAGTAGCTGCTGAATC		
Query 155	CTCCACTGGTACATGGACCACCTGTTTGGACCAGGATGGACTTACAAGTCTCGACCAGTTACAA		
Sbjct 121	CTCCACTGGTACATGGACCACCTGTTTGGACCAGGATGGACTTACAAGTCTCGACCAGTTACAA		
Query 215	AGGTCGATGTTATGATATTGAACCTGTTGCTGGAGAAAAAGATCAATATATTGCTTATGT		
Sbjct 181	AGGTCGATGTTATGATATTGAACCTGTTGCTGGAGAAAAAGATCAATATATTGCTTATGT		
Query 275	AGCTTATCCTCTGGATTTATTTGAGGAAAGGTTCTGTTACTAATTTGTTTACCTCCATTGT		
Sbjct 241	AGCTTATCCTCTGGATTTATTTGAGGAAAGGTTCTGTTACTAATTTGTTTACCTCCATTGT		
Query 335	AGGTAATGTATTTGGATTCAAAGCCTTGCGAGCCTTACGTTTGGAAAGATTTGCGAATTCC		
Sbjct 301	AGGTAATGTATTTGGATTCAAAGCCTTGCGAGCCTTACGTTTGGAAAGATTTGCGAATTCC		
Query 395	TCCTGCTTATTCAAAACTTTTCATAGGTCACCCCATGGTATCCAAGTCGAAAAGAGACAA		
Sbjct 361	TCCTGCTTATTCAAAACTTTTCATAGGTCACCCCATGGTATCCAAGTCGAAAAGAGACAA		
Query 455	ATTGAACAAAATATGGTCGTCCTTTATTAGGATGTACTATTAACCAAAAATTAGGTTTATC		
Sbjct 421	ATTGAACAAAATATGGTCGTCCTTTATTAGGATGTACTATTAACCAAAAATTAGGTTTATC		
Query 515	TGCTAAAAAATTATGGTAGAGCTGTCTATGAATGTCTTCGTTGGTGGACTTGATTTCACTAA		
Sbjct 481	TGCTAAAAAATTATGGTAGAGCTGTCTATGAATGTCTTCGTTGGTGGACTTGATTTCACTAA		
Query 575	GGATGATGAAAACGTGAATTCTCAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGATTCTTATTTGT		
Sbjct 541	GGATGATGAAAACGTGAATTCTCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTCGT		
Query 635	AAGCAGAAG 643		
Sbjct 601	-AGCAGAAG 608		

Daftar Pustaka

- Bafeel, S.O, Arif, I.A., Baki, M.A., Al Homaidan, A.A., Al Farhan, A.H., Khan, H.A. 2012. DNA barcoding of arid wild plants using *rbcL* gene sequences. *Genet Mol Res.* 11(3):1934-41. doi: 10.4238/2012.July.19.12
- Chuang, S. & Hu, J. 2004 The Evolution of Chloroplast *matK* Genes, Including Identification of New Homologues from *Ophioglossum petiolatum* and Two Lycophytes *Taiwania*, 49(4): 273-287
- Dubuisson, J., Hennequin, S., Douzery, E.J.P., Cranfill, R.B., Smith, A.R., & Pryer, K.M. 2003. *Rbcl* Phylogeny Of The Fern Genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae), With Special Reference To Neotropical Taxa. *Int. J. Plant Sci.* 164(5):753–761.
- Ebihara, A.. 2011. *RbcL* Phylogeny of Japanese Pteridophyte Flora and Implications on Intrafamilial Systematics *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B*, 37(2), pp. 63–74, May 22, 2011
- Evans, S. & Warnow, T. 2018. 2Phylogenetic analyses of alignments with gaps . <https://statistics.berkeley.edu/sites/default/files/tech-reports/807.pdf>
- Gielly, L. & Taberlet, P. 1994. The Use of Chloroplast DNA to Resolve Plant Phylogenies: Noncoding versus *rbcL* Sequences *Mol. Biol. Evol.* 11(5):769-777.
- Hasebe, M. 1995. Fern Phylogeny Based on *rbcl* Nucleotide Sequence. *American Fern Journal* 85(4): 134 – 181.
- NCBI.2008. <https://ncbi.nlm.nih.gov>.
- Sofiyanti N, D. Iriani, A.A. Roza. 2015a. *Morfologi tumbuhan Paku di Taman Hutan Raya Sultan Syarif Hasyim, Riau*. Unri Press, Pekanbaru.
- Sofiyanti, N. & Isda, MN. 2017. Pengembangan Metode SEM dan analisis DNA dalam sistematika tumbuhan paku. Laporan PBK tahun I (Tidak dipublikasikan).
- Sofiyanti, N. & Isda, MN. 2018. Pengembangan Metode SEM dan analisis DNA dalam sistematika tumbuhan paku. Laporan PBK tahun II (Tidak dipublikasikan).
- Wikstrom, N. & Kenrick, P. 2000. Relationships of Lycopodium and Lycopodiella Based on Combined Plastid *rbcL* Gene and *trnL* Intron Sequence Data *Systematic Botany* 25(3): 495-510
- Wikstrom, N. & Kenrick, P. 2001. Evolution of Lycopodiaceae (Lycopsidea): Estimating Divergence Times from *rbcL* Gene Sequences by Use of Nonparametric Rate Smoothing. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19(2): 177-186. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0936>.
- Wikstrom, N. & Kenrick, P. 2008. Phylogeny of epiphytic *Huperzia* (Lycopodiaceae): paleotropical and neotropical clades corroborated by *rbcL* sequences. *Nordic Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2000.tb01561.x>
- Zhang, L.B. & Iwatsuki, K. 2013. Lycopodiaceae. Pp. 13–34 in Z. Y. Wu, P. H. Raven & D. Y. Hong, eds., *Flora of China*, Vol. 2–3 (Pteridophytes). Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.