

Identifikasi Gulma Sembung Rambut Berbasis Molekuler

¹Dimas Frananta Simatupang, ²Ing Mayfa Situmorang, ³Hendra Saputra

¹Politeknik Teknologi Kimia Industri, Medan, Indonesia

²STIKES Prima Indonesia, Bekasi, Indonesia

³Politeknik Kelapa Sawit Citra Widya Edukasi, Bekasi, Indonesia

difratas@ptki.ac.id, ingmayfasitumorang@gmail.com, endsaputra11@gmail.com

ARTICLE INFO

Article History:

Diterima : 04-02-2023

Disetujui : 02-03-2023

Keywords:

Identification;

Sembung Rambut;

DNA Molecular;

Phylogenetic tree;

Mikania micrantha



ABSTRACT

Abstract: Weed Sembung rambut is a plant that have invasive growth, difficult to control and can damage natural ecosystems. However, several studies have revealed the superiority of this weed as an antibacterial and antidiarrheal because it has a high chemical content of phenolics and flavonoids and as an herbicide. This research was conducted with the aim of identifying weed species molecularly in order to obtain a more specific plant identity compared to the morphological approach and also to add to the plant library in Indonesia. The research method uses *in vitro* and *in silico* molecular biotechnology experimental techniques. The genomic DNA of sembung rambut was isolated and amplified using specific primers 18S rRNA V4 then analyzed by agarose electrophoresis, nucleotide sequencing and phylogenetic tree construction using the MEGA-X software. The results of genomic DNA isolation showed that the amplicon as the product of amplification using Polymerase Chain Reaction (PCR) measured 651 base pairs and the nucleotide sequence was obtained. Based on the results of the phylogenetic tree analysis, weed sembung rambut has a family closeness of 86% with *Mikania micrantha*.

Abstrak: Gulma sembung rambut merupakan tanaman yang memiliki pertumbuhan invasif yang sulit dikendalikan dan dapat merusak ekosistem lingkungan alami. Namun beberapa penelitian telah mengungkapkan keunggulan gulma ini sebagai antibakteri dan antidiare karena memiliki kandungan kimia fenolik dan flavonoid yang tinggi serta sebagai herbisida. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengidentifikasi spesies gulma secara molekuler sehingga diperoleh identitas tanaman yang lebih spesifik dibandingkan dengan pendekatan secara morfologi dan juga menambah pustaka tanaman di Indonesia. Metode penelitian menggunakan teknik eksperimen bioteknologi molekuler secara *in vitro* dan *in silico*. DNA genomik sembung rambut di isolasi dan di amplifikasi menggunakan primer spesifik 18S rRNA V4 kemudian di analisis dengan elektroforesis agarosa, *sequencing* nukleotida dan konstruksi pohon filogenetik menggunakan aplikasi bioinformatika MEGA-X. Hasil isolasi DNA genomik menunjukkan bahwa amplicon dari hasil amplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) berukuran 651 pasang basa dan telah berhasil diperoleh urutan sekuens nukleotida. Berdasarkan hasil analisis pohon filogenetik maka sembung rambut memiliki kekerabatan sebesar 86% dengan *Mikania micrantha*.



<https://doi.org/10.31764/justek.vXIY.ZZZ>



This is an open access article under the [CC-BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license

A. LATAR BELAKANG

Tanaman liar yang tumbuh dan berkembang biak dengan cepat atau dikenal dengan sebutan gulma merupakan salah satu gangguan di lingkungan yang dapat menimbulkan banyak kerugian bagi tanaman potensial lainnya seperti tanaman budidaya dalam penyerapan unsur penting meliputi unsur hara, air dalam tanah dan cahaya untuk proses fotosintesis (Pebriani et al., 2013). Salah satu gulma yang memiliki tingkat reproduksi secara vegetatif dengan tingkat pertumbuhan yang sangat cepat adalah tanaman sembung rambat. Gulma sembung rambat banyak ditemukan dan dijumpai di lingkungan sekitar seperti lahan perkebunan dan pertanian yang tidak terjaga lagi. Gulma ini memiliki potensi sebagai gulma yang berbahaya karena dapat menyebabkan kerusakan di lahan-lahan produktif karena pertumbuhannya yang masif dan liar. Pertumbuhan tanaman sembung rambat yang cepat diduga dipicu oleh banyaknya mikroba yang terlibat dalam perolehan nutrisi pada rizosfer sembung rambat (Yin et al., 2020).

Tanaman sembung rambat yang memiliki kekurangan sebagai inisiator merusak lingkungan sekitar ini ternyata memiliki banyak keunggulan yang telah banyak diteliti. Gulma daun sembung rambat memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans* karena melalui uji fitokimianya membuktikan bahwa ekstrak etanol daun ini mengandung polifenol, flavonoid, steroid, alkaloid dan steroid (Perawati et al., 2018; Polakitan et al., 2017). Selain itu, tanaman sembung rambat banyak digunakan sebagai obat tradisional karena memiliki bioaktivitas antioksidan alami dan potensi dalam pencegahan penyakit yang disebabkan oleh kerusakan oksidatif (Ishak et al., 2018). Kandungan ekstrak etanol dari sembung rambat juga memiliki kemampuan sebagai antidiare dengan dosis paling efektif adalah 200 mg/kg dari berat badan manusia (Ardianto et al., 2022).

Daun sembung rambat juga menunjukkan potensi sebagai herbisida alami terhadap gulma lainnya karena sembung rambat digolongkan sebagai gulma yang bersifat alelopati (aman karena mudah terdekomposisi dalam tanah dan tidak meninggalkan residu). Kandungan kimia dalam daun rambat seperti terpenoid, fenol dan flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan tanaman liar lainnya. Penelitian yang menggunakan ekstrak daun sembung rambat menunjukkan hasil yang positif dalam menghambat pertumbuhan gulma mangan ungu dan rumput bahia (Pebriani et al., 2013). Studi lainnya mengungkapkan bahwa ekstrak gulma sembung rambat dengan konsentrasi 20-100% mampu menekan bobot total gulma jajagoan dan memacu pertumbuhan jumlah bibit tanaman padi sawah (Alridiwersah et al., 2020).

Identifikasi tanaman sembung rambat perlu dilakukan agar mendapat informasi yang jelas terhadap suatu tanaman dan tidak salah dalam mengenali suatu tanaman. Identifikasi identitas tanaman yang digunakan dalam penelitian ini masih sebatas secara morfologi yang mengamati ciri-ciri fisik dari suatu tanaman. Melalui morfologi, sampel tanaman ini diduga adalah sebagai sembung rambat. Identifikasi secara morfologi memiliki beberapa kelemahan sehingga diperlukan identifikasi spesies tanaman secara molekuler. Identifikasi spesies tanaman sembung rambat secara molekuler masih jarang

ditemukan dan teknik identifikasi ini melibatkan DNA (*DeoxyriboNucleic Acid*) genomik dari sampel target (Astuti et al., 2021). Identifikasi berbasis molekuler melibatkan pendekatan teknik biologi molekuler dan bioinformatika modern yang dapat mendukung data identifikasi suatu spesies secara morfologi. Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi tanaman gulma pada tingkat spesies secara molekuler sehingga diperoleh informasi yang lebih spesifik terhadap identitas tanaman tersebut dan juga untuk menambah pustaka terhadap tanaman target berbasis molekuler selain secara morfologi.

B. METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan bahan-bahan yang meliputi daun sembung rambat segar, nitrogen cair. *Genomic DNA Mini Kit (Plant) Geneaid* (buffer GP1, GP2, GP3, W1, *wash buffer*, elusi), *primer* maju-mundur V4 dan *PCR (Polymerase Chain Reaction) reagent*. Selanjutnya alat yang digunakan meliputi neraca analitik, mortar dan alu, tabung mikro 1,5 mL, *vortex*, kolom GD, sentrifugasi, *PCR Thermal Cycler Bio-Rad*, elektroforesis agarose dan aplikasi bioinformatika.

Isolasi DNA Genomik

Sampel daun sembung rambat diperoleh dari lahan kosong sekitar rumah warga. Sampel diambil kemudian dicuci bersih sampai pengotornya hilang. Sebanyak 100 mg sampel ditimbang menggunakan neraca analitik dan dibekukan dengan nitrogen cair. Sampel beku kemudian digiling sampai menjadi bubuk halus dan dipindahkan ke tabung mikro bervolum 1,5 mL. Isolasi DNA genomik menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Plant) Geneaid* (Geneaid, 2017). Sebanyak 400 μ L buffer GP1 dan 5 μ L RNase A ke dalam tabung mikro dan di aduk dengan *vortex*. Campuran diinkubasi pada suhu 60 $^{\circ}$ C selama 10 menit dengan membolak-balikkan tabung setiap 5 menit sekali. Kemudian ditambahkan 100 μ L buffer GP2 dan diaduk dengan *vortex* dan diinkubasi dingin selama 3 menit. Campuran dipindahkan ke tabung mikro dengan kolom penyaring bervolum 2 mL dan disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 1000 x *g*. Supernatan dipindahkan ke tabung mikro bervolum 1,5 mL yang baru. Sebanyak 1,5 kali dari volum supernatan ditambahkan buffer GP3 dan diaduk cepat selama 5 detik. Campuran reaksi ini diambil sebanyak 700 μ L dan dimasukkan ke tabung mikro dengan kolom GD lalu disentrifugasi pada kecepatan 16000 x *g* selama 2 menit dan prosedur ini diulang 2 kali. Supernatan dibuang dan kolom GD ditempatkan pada tabung mikro baru dan ditambahkan buffer W1 sebanyak 400 μ L lalu disentrifugasi selama 30 detik. Sebanyak 600 μ L ditambahkan *wash buffer* dan disentrifugasi kembali. Supernatan dibuang dan kolom GD ditempatkan kembali pada tabung mikro yang baru dan disentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan yang sama. Setelah itu, kolom GD ditempatkan kembali pada tabung mikro yang baru dan ditambahkan 100 μ L buffer elusi lalu di inkubasi pada suhu ruang selama 3-5 menit. Selanjutnya tabung disentrifugasi selama 30 detik untuk mengelusi DNA sampel yang murni.

Amplifikasi DNA Genomik

Setelah diperoleh DNA sampel murni maka selanjutnya dilakukan amplifikasi DNA genomik menggunakan *primer* maju-mundur spesifik 18S rRNA V4 yang hanya mengamplifikasi daerah variabel 4 pada fragmen gen 18S rRNA. Proses amplifikasi ini menggunakan PCR selama 36 siklus dengan tahapan pra denaturasi pada suhu 95 °C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, penempelan *primer* pada suhu 50 °C selama 30 detik dan perpanjangan sekuens pada suhu 72 °C selama 1 menit. Hasil PCR berupa amplicon selanjutnya dianalisis menggunakan elektroforesis agarosa (Simatupang et al., 2018).

Analisis Filogenetik

Amplicon hasil PCR kemudian dilanjutkan dengan analisis *sequencing* DNA yang dilakukan oleh *First Base Inc*, Singapura menggunakan teknik *Dye Terminator Method* (Simatupang et al., 2022). Hasil analisis *sequencing* kemudian dilanjutkan dengan analisis filogenetik dengan konstruksi pohon kekerabatan keluarga menggunakan aplikasi *DNA Baser* dan *MEGA-X* (Kumar et al., 2018).

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Amplifikasi DNA Genomik Sembung Rambat

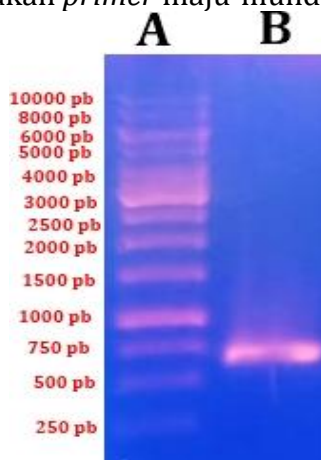
Daun sembung rambat yang digunakan sebagai sampel diambil langsung pada lahan kosong yang tidak terawat lagi oleh pemiliknya di sekitar rumah warga. Penampakan keadaan lingkungan tempat pengambilan sampel daun sembung rambat ditampilkan pada Gambar 1. Daun sembung rambat yang dipilih adalah yang memiliki kondisi daun utuh, segar dan tidak ada bagian yang koyak, layu maupun yang memiliki lubang bekas jejak ulat.



Gambar 1. Visual Daun Sembung Rambat

Daun sembung rambat kemudian dilakukan isolasi DNA genomik dengan mengikuti prosedur yang sesuai protokol kit mini (*Genomic DNA Mini Kit*). Hasil isolasi DNA genomik ini kemudian diamplifikasi menggunakan PCR dengan *primer* maju-mundur 18S rRNA V4 spesifik yang hanya mengamplifikasi fragmen gen di area variabel 4 pada gen 18S rRNA tanaman. Adapun urutan atau sekuens *primer* maju V4 adalah 5'-CAGCAGCCGCGTAATTCC-3' sedangkan *primer* mundur V4 adalah 5'CCCGTGTGAGTCAAATTAGGC-3' (Hadziavdic et al., 2014). Fragmen ini hanya memiliki panjang sekitar 650 pasang basa (pb) dan merupakan salah satu area yang konservatif dalam penentuan spesies eukariotik yang dalam hal ini tanaman termasuk

dalam eukariotik (Simatupang, 2016). Hasil amplifikasi dikonfirmasi dengan analisis migrasi amplicon pada elektroforesis agarosa yang ditunjukkan pada Gambar 2. Amplicon hasil PCR berada di bawah dan dekat penanda DNA 750 pb dan di atas 250 pb sehingga prediksi panjang amplicon adalah sekitar 650 pb yang sesuai dengan panjang basa hasil amplifikasi menggunakan *primer* maju-mundur V4 spesifik.

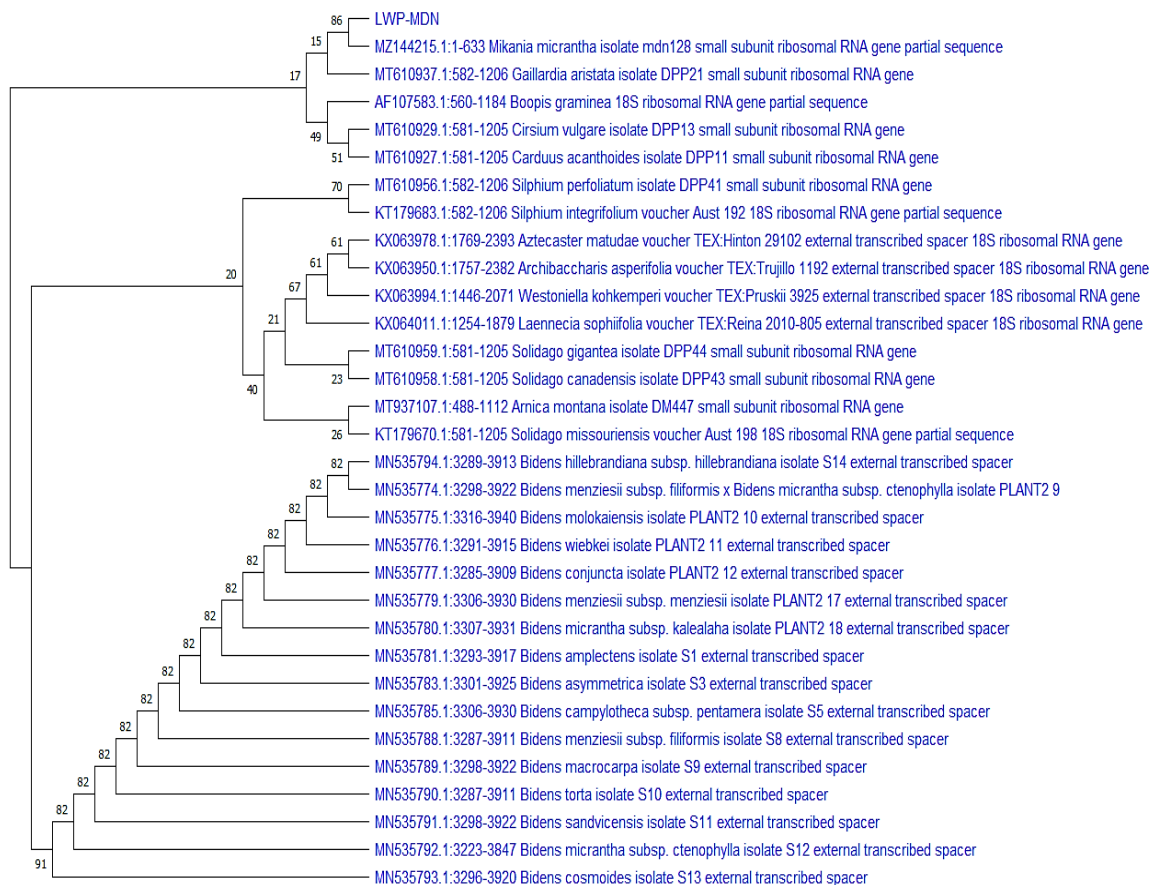


Gambar 2. Elektroforegram Agarosa dengan Penanda DNA 1 kb (A) dan Amplicon Hasil PCR (B)

Konstruksi Filogenetik Sembung Rambut

Setelah diperoleh amplicon hasil PCR maka amplicon ini dilakukan analisis *sequencing* nukleotida untuk menentukan penjajaran atau urutan nukleotida (Simatupang et al., 2019) yang diperlukan untuk konstruksi pohon filogenetik. Berdasarkan hasil *sequencing* menunjukkan bahwa terdapat 651 pb yang berhasil disejajarkan dan ditentukan nukleotidanya. Sekuens ini kemudian dilakukan analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) secara daring untuk menentukan prediksi kekerabatan spesiesnya (Gareth Gordon Syngai et al., 2013; Samal et al., 2021). Selanjutnya hasil analisis BLAST diambil sebanyak 30 kekerabatan yang paling dekat untuk dapat membuat konstruksi pohon filogenetik menggunakan aplikasi MEGA-X. Pohon filogenetik ditampilkan pada Gambar 3 dengan kode LWP-MDN yang menunjukkan sampel.

Pada pohon filogenetik mengungkapkan bahwa sampel dengan kode LWP-MDN merupakan spesies yang memiliki kedekatan tertinggi dengan *Mikania micrantha* sebanyak 86%. Berdasarkan pengamatan secara visual dan morfologinya, gulma sembung rambut ini merupakan spesies *Mikania micrantha* yang banyak tumbuh dan berkembang biak di lahan-lahan kosong yang lembap di Indonesia. Tanaman sembung rambut atau *M. micrantha* termasuk top 100 spesies yang tumbuh invasif dan mengakibatkan kerusakan ekosistem alami serta kehilangan nilai ekonomi yang substantial (Cui et al., 2021; Liu et al., 2020). Penelitian mengenai penyebab tingginya angka pertumbuhan *M. micrantha* disebabkan karena adanya gen *MmYUC* yang berperan dalam tingkat ekspresi yang tinggi dan biosintesis auksin serta perkembangan tanaman (Luo et al., 2022). Sembung rambut atau *M. micrantha* sangat mudah di jumpai di alam dan tumbuh baik pada lingkungan yang terpapar sinar matahari dan tanah yang lembap.



Gambar 3. Pohon Filogenetik dengan Aplikasi MEGA-X

D. SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan maka dapat disimpulkan bahwa telah berhasil dilakukan identifikasi spesies tanaman gulma sembung rambat secara molekuler baik *in vitro* dan *in silico*. Gulma sembung rambat memiliki kedekatan kekerabatan dengan *Mikania micrantha* sebanyak 86% dengan pendekatan molekuler. Adapun saran yang diusulkan untuk penelitian lanjutan adalah melakukan variasi konsentrasi DNA genomik yang digunakan untuk amplifikasi melalui teknik pengenceran larutan campuran PCR agar diperoleh pita DNA yang semakin jelas dan terang dan juga melakukan eksplorasi potensial lainnya dari tanaman gulma sembung rambat (*Mikania micrantha*) melalui pendekatan ekstraksi dan isolasi senyawa aktif.

REFERENSI

- Alridiwersah, A., Tampubolon, K., Sihombing, F. N., Barus, W. A., Syofia, I., Zulkifli, T. B. H., & Purba, Z. (2020). Skrining dan Efektivitas Metabolit Sekunder *Mikania micrantha* pada Gulma Jajagoan serta Dampaknya terhadap Padi Sawah. *Agrotechnology Research Journal*, 4(2), 84. <https://doi.org/10.20961/agrotechresj.v4i2.44976>
- Ardianto, A., Munarsih, D., Rahayu, I. N., Aslam, M. M., Aditya, M. F., Estiningsih, D., Fatmawati, A., & Saputro, P. H. (2022). Screening and Antidiarrheal Activity Testing of Sembung Rambat (*Mikania micrantha*) Leaves. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 10(T8), 194–199. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.9458>
- Astuti, D. W., Lestari, M. F., Zuhairiah, N., Priastomo, Y., & Frananta, D. (2021). *Biokimia: Senyawa*

Utama dalam Metabolisme. Galiono Digdaya Kawthar.

- Cui, C., Wang, Z., Su, Y., & Wang, T. (2021). New insight into the rapid growth of the *Mikania micrantha* stem based on DIA proteomic and RNA-Seq analysis. *Journal of Proteomics*, 236(104126), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104126>
- Gareth Gordon Syngai, Pranjan Barman, Rupjyoti Bharali, & Sudip Dey. (2013). BLAST: An introductory tool for students to Bioinformatics Applications. *Keanean Journal of Science*, 2:(December), 67–76. https://www.researchgate.net/profile/Gareth_Syngai2/contributions
- Geneaid. (2017). *Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Plant) Ver.02.10.17*. <https://geneaid.com/data/files/1605671461714176511.pdf>
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18s rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS ONE*, 9(2), e87624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>
- Ishak, A. H., Shafie, N. H., Esa, N. M., Bahari, H., & Ismail, A. (2018). From weed to medicinal plant: Antioxidant capacities and phytochemicals of various extracts of *Mikania micrantha*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 20(3), 561–568. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0522>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Liu, B., Yan, J., Li, W., Yin, L., Li, P., Yu, H., Xing, L., Cai, M., Wang, H., Zhao, M., Zheng, J., Sun, F., Wang, Z., Jiang, Z., Ou, Q., Li, S., Qu, L., Zhang, Q., Zheng, Y., ... Wan, F. (2020). *Mikania micrantha* genome provides insights into the molecular mechanism of rapid growth. *Nature Communications*, 11(340), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13926-4>
- Luo, W., Xiao, N., Wu, F., Mo, B., Kong, W., & Yu, Y. (2022). Genome-Wide Identification and Characterization of YUCCA Gene Family in *Mikania micrantha*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13037), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms232113037>
- Pebriani, Linda, R., & Mukarlina. (2013). Potensi ekstrak daun Sembung Rambat (*Mikania micrantha* H.B.K) sebagai bioherbisida terhadap Gulma Maman Ungu (*Cleome rutidosperma* D.C) dan Rumput Bahia (*Paspalum notatum* Flugge). *Jurnal Protobiont*, 2(2), 32–38.
- Perawati, S., Andriani, L., & Pratiwi, P. (2018). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sembung Rambat (*Mikania micrantha* Kunth). *Chempublish Journal*, 3(2), 40–45. <https://doi.org/10.22437/chp.v3i2.5554>
- Polakitan, I. R., Fatimawali, & Leman, M. A. (2017). Uji daya hambat ekstrak daun sembung rambat (*Mikania micrantha*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 6(1), 1–8.
- Samal, K. C., Sahoo, J. P., Behera, L., & Dash, T. (2021). Understanding the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Program and a Step-by-step Guide for its use in Life Science Research. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, 36(1), 55–61. <https://doi.org/10.18805/bkap283>
- Simatupang, D. F. (2016). *DNA Isolation of Macro Algae from Indonesia's Tropical Coastal Area and Identification of Its Species Based on Genetic Variation*. La Rochelle Université France.
- Simatupang, D. F., Sofi Yanty, J., Rachmayanti, Y., Madayanti Warganegara, F., & Akhmaloka, A. (2018). Diversity of Tropical Marine Macroalgae from Coastal Area of Sayang Heulang, West Java Indonesia. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 15(1), 139–144. <https://doi.org/10.13005/bbra/2616>

- Simatupang, D. F., Widhiastuty, M. P., Madayanti, F., & Akhmaloka, A. (2022). Lipolytic activity of Itb1.1 and Lk3 thermostable lipases expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(9), 34–42. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2022.120905>
- Simatupang, D. F., Widhiastuty, M. P., Madayanti, F., & Akhmaloka, A. (2019). Subcloning and heterologous expression of thermostable lipases ITB1.1 and LK3 from local isolate bacteria through *Pichia pastoris* and its lipolytic activity. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 31–32. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13326>
- Yin, L., Liu, B., Wang, H., Zhang, Y., Wang, S., Jiang, F., Ren, Y., Liu, H., Liu, C., Wan, F., Wang, H., Qian, W., & Fan, W. (2020). The Rhizosphere Microbiome of *Mikania micrantha* Provides Insight Into Adaptation and Invasion. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01462>