

Analisis Filogenetik *Mangifera odorata* Sumatera Tengah dan Kerabatnya Menggunakan Gen *rbcL*

ERWINA JULIANTARI^{1*}, FITMAWATI², NERY SOFIYANTI³

¹²³Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Kampus Bina Widya, Jl. HR Soebrantas, Panam, Pekanbaru 28293, Riau, Indonesia

*email: erwinajuliantari24@gmail.com

ABSTRAK

Mangifera Sumatera bagian Tengah memiliki kemampuan unik dalam beradaptasi pada wilayah dengan curah hujan yang tinggi, sehingga berpotensi sebagai sumber plasma nutfah Sumatera. Secara morfologi genus *Mangifera* cukup sulit dibedakan karena tingginya plastisitas morfologi. *Mangifera odorata* diduga sebagai spesies hibrid dari *M. indica* dan *M. foetida*, sehingga diperlukan analisis untuk memperkuat status taksonomi *M. odorata*. Tujuan penelitian ini untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan *M. odorata* dan kerabatnya berdasarkan gen *rbcL*. Rekonstruksi menggunakan program PAUP* Versi 4.0b10 dengan metode *maximum parsimony* (MP). Kladoogram dengan metode MP membentuk klad monofiletik dengan dua klad utama *Mangifera*. Klad pertama yaitu *M. indica* dan klad kedua terdiri dari *M. foetida* dan *M. odorata*. Kladoogram mendukung asumsi bahwa *M. odorata* adalah hibrid dari *M. foetida* dan *M. indica*.

Kata Kunci: analisis filogenetik, gen *rbcL*, *Mangifera odorata*, Sumatera Tengah

ABSTRACT

Mangifera from Central Sumatera has a unique ability to adapt on the high rainfall region. Therefore, this genus is a potential germplasm source in Sumatera. Based on morphological character, *Mangifera* are difficult to be distinguished among the species and have high morphological plasticity. *M. odorata* is considered as a hybrid species from *M. indica* and *M. foetida*, therefore an analysis is necessary to reinforce the taxonomical status of *M. odorata*. The aim of this study was to reconstruct the relationship of *M. odorata* and its related species based on the *rbcL* gene. The phylogenetic reconstruction was conducted using PAUP* Version 4.0b10, Maximum Parsimony (MP). Cladogram using MP showed monophyletic tree of *Mangifera* and it was divided into two main clades. The first clad was consisted of a species only, *M. indica* while the second clad consisted of *M. foetida* dan *M. odorata*. Cladogram supported the assumption that *M. odorata* is a hybrid species.

Key words: Central Sumatra, *Mangifera odorata*, phylogenetic analysis, *rbcL* gene

PENDAHULUAN

Pulau Sumatera memiliki keanekaragaman flora yang tinggi di antaranya wilayah Sumatera bagian Tengah. Mangga (*Mangifera*) dari famili Anacardiaceae (Kostermans & Bompert 1993) yang secara alami terdistribusi luas di wilayah ini, memiliki kemampuan yang unik dalam beradaptasi pada wilayah tropis, seperti mampu berbunga pada curah hujan yang tinggi dan mempunyai ketahanan terhadap kerontokan buah, sehingga Sumatera berpotensi sebagai sumber plasma nutfah *Mangifera*. Fitmawati *et al.* (2013) melakukan eksplorasi dan identifikasi *Mangifera* di Sumatera bagian Tengah yang terdiri dari Provinsi Riau, Sumatera Barat dan Jambi dan menyatakan bahwa keanekaragaman *Mangifera* ini semakin menurun karena berbagai faktor seperti deforestasi, perubahan habitat dan lain-lain yang akan menyebabkan hilangnya informasi keanekaragaman *Mangifera* sedangkan keanekaragaman tersebut belum teridentifikasi dengan baik.

Secara morfologi genus *Mangifera* cukup sulit dibedakan terutama pada jenis-jenis yang berkerabat dekat. Hal ini disebabkan karena plastisitas morfologi yang tinggi, sehingga kemiripan morfologi sangat umum dijumpai dalam genus ini. Menurut Hou (1978) spesies *M. odorata* adalah hibrid dari *M. indica* dan *M. foetida*, namun Kosterman dan Bompard (1993) menolak pernyataan tersebut. Oleh karena itu selain karakterisasi menggunakan penanda morfologi, juga diperlukan dukungan data yang lebih komprehensif untuk memperkuat status taksonomi *M. odorata* salah satunya dengan penanda molekuler. Pendekatan ini dapat menganalisis hubungan kekerabatan berdasarkan garis evolusi dari kelompok organisme (Hidayat & Adi 2006).

Pada penelitian ini penanda yang digunakan adalah sekuen gen cpDNA *rbcL* sebagai penyanding *ribulosa-1,5-bisphosphate carboxylase* (RuBisCO). Penanda ini ditetapkan oleh Barcode of Life Database (BOLD) sebagai salah satu sekuen DNA barcode dalam menganalisis keanekaragaman genetik spesies tanaman (Judd *et al.* 2002), dan merupakan penanda yang konservatif (Newmaster *et al.* 2006). Penelitian tentang studi filogenetik *Mangifera* Indonesia berdasarkan penanda *rbcL* sudah pernah dilakukan oleh Suparman *et al.* (2013). Akan tetapi untuk mangga Sumatera, khususnya di Sumatera bagian Tengah belum dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah merekonstruksi hubungan kekerabatan spesies *Mangifera odorata* Sumatera Tengah dan kerabatnya berdasarkan sekuen *rbcL*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Botani dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah mortar, sentrifus, *waterbath*, tabung 1,5 ml, tabung PCR, mikropipet dan mikrotip, apparatus elektroforesis, mesin PCR *thermal cycle* dan UV transluminator. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: 2X CTAB, Nitrogen cair, 0,2% mercaptoethanol, kloroform, isopropanol, bufer TE, PCR Kit, DNA *template*. Primer yang digunakan adalah primer Forward 5'(CTTGGCATTCCGAGTA)3' dan primer Reverse 5'(TCACAAGCAGCCAGTTC)3' (Suparman 2013), gel agarose, buffer TAE. Sampel yang digunakan adalah daun *M. indica*, *M. foetida*, *M. odorata* dan *Bouea macrophylla* sebagai *outgroup*.

Prosedur Kerja

Isolasi DNA

Prosedur isolasi DNA menggunakan metode CTAB (Doyle dan Doyle 1987). Kualitas DNA hasil isolasi diperiksa menggunakan mesin elektroforesis dengan konsentrasi gel agarose 1%.

Amplifikasi dan Sekuensing

Amplifikasi sekuen *rbcL* dengan menggunakan mesin PCR (GeneAmp PCR sistem 2400 Perkin Elmer). Proses amplifikasi gen *rbcL* diawali dengan 1 siklus pada 95⁰C (pre-denaturasi) selama 4 menit; 35 siklus pada 94⁰C (denaturasi) selama 30 detik, 53⁰C (*annealing*) selama 30 detik, 72⁰C (ekstensi) selama 2 menit dan diakhiri dengan 1 siklus pada 72⁰C (ekstensi akhir) selama 10 menit.

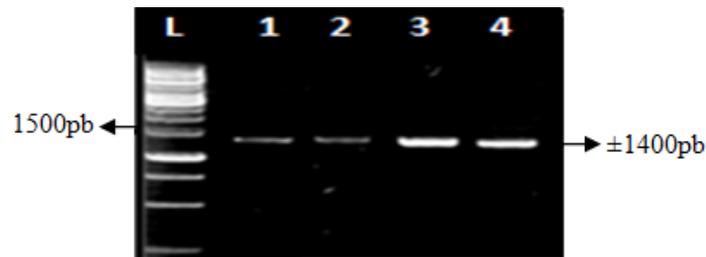
Analisis Filogenetik *Mangifera*

Data sekuen disejajarkan menggunakan ClustalW dan kemudian diperiksa secara manual dengan BioEdit. Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan program PAUP* versi 4.0b10 dengan metode *Maximum Parsimony* menggunakan analisis bootstrap 100x.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi Sekuen *rbcL*

Profil pita hasil amplifikasi, diperoleh ukuran panjang fragmen DNA sekitar 1400 pb (Gambar 1). Ukuran panjang gen *rbcL* sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu 1428 pb (Judd *et al.* 2002; Suparman *et al.* 2013).



Gambar 1. Profil pita dari gen *rbcL*. Keterangan: (L) GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (1) *Bouea macrophylla*, (2) *Mangifera foetida*, (3) *M. indica*, (4) *M. odorata*

Analisis Filogenetik *Mangifera Sumatera Tengah* Berdasarkan Sekuen *rbcL*

Analisis pohon filogenetik menggunakan metode *maximum parsimony* (MP) yaitu cara untuk merekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan jumlah perubahan (evolusi) terkecil. Hasil pensejajaran sekuen dari sampel *Mangifera* dengan total karakter yang digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik sebanyak 481 karakter dengan 4 karakter *parsimony-informative* yaitu situs yang menunjukkan adanya perbedaan jumlah substitusi pada pola percabangan kladogram untuk menjelaskan variasi pada situs tersebut yang terjadi karena evolusi dalam jangka waktu yang panjang (Farris 1989). Kladogram hasil analisis MP memiliki nilai *consistency index* (CI)=1 dan nilai *retention index* (RI)=1. Hal ini menunjukkan kladogram yang dihasilkan memiliki tingkat parsimoni yang tinggi. Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan *outgroup* yaitu *Bouea macrophylla* dari famili Anacardiaceae .

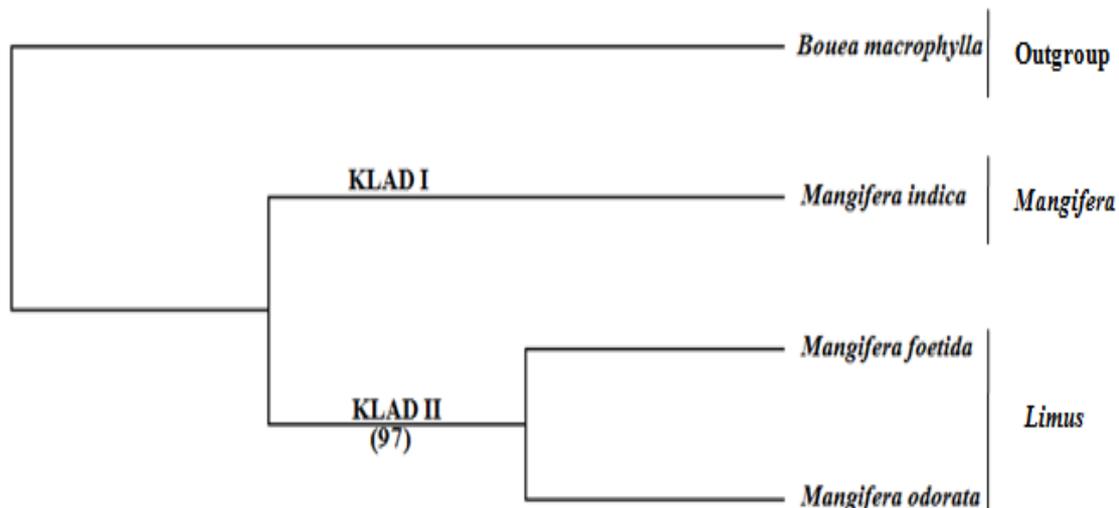
Kladogram dengan metode MP terbagi menjadi dua klad utama *Mangifera* (Gambar 2). Klad I terdiri dari *Mangifera indica*, Kosterman & Bompard (1993) mengelompokkan *Mangifera* berdasarkan karakter morfologi *disk* pada bunga menjadi dua subgenus yaitu subgenus *Limus* yang memiliki bentuk *disk* datar, lebih sempit dari ovarium atau tidak memiliki *disk* dan merupakan subgenus yang lebih pernitif, dan subgenus *Mangifera* dengan *disk* lebih luas dari ovarium dan sebagai jenis *Mangifera* yang lebih maju. *M. indica* diklasifikasikan dalam subgenus *Mangifera* dengan *disk* bunga *cushion-like* (seperti bantal). Berdasarkan karakter Morfologi, *M. indica* memiliki tekstur daun *certaceous* (mengertas), bunga kuning pucat sampai hijau kemerahan, bunga *glomerulate* terdapat rambut pada tangkai bunga, jumlah stamen fertil 1 dan buah berwarna hijau dengan kuantitas serat sedang (Fitmawati *et al.* 2013)

Klad II terdiri dari *M. foetida* dan *M. Odorata*. Kosterman & Bompard (1993) mengklasifikasikan kedua jenis ini dalam subgenus *Limus*. Berdasarkan karakter morfologi kedua spesies tersebut memiliki kemiripan dari karakter bunga *non glomerulate*, bentuk, aroma, rasa dan struktur isi buah, sedangkan karakter yang membedakan adalah kandungan serat buah *M. foetida* lebih tinggi dibandingkan *M. odorata* (Anto 2014) dan perbungaan *M. foetida* berbentuk kerucut dengan warna bunga merah tua sedangkan *M. odorata* memiliki perbungaan jorong ke atas dengan warna bunga merah keputih-putihan (Fitmawati *et al.* 2013).

Spesies *M. odorata* adalah hibrid alam dari *M. indica* dan *M. foetida* (Hou 1978). Hal ini didukung oleh Yonemori *et al.* (2002) yang meneliti 14 spesies *Mangifera* dari Thailand berdasarkan sekuen DNA daerah ITS dan menyatakan bahwa adanya aditivitas dua basa nukleotida pada sekuen *M. odorata* yang diturunkan dari kedua tetua yang bersifat dominan. Selanjutnya Suparman *et al.* (2013) menganalisis 16 spesies *Mangifera* dari Indonesia dan Thailand berdasarkan sekuen *rbcL* mendukung asumsi bahwa *M. odorata* adalah spesies hibrid. Namun Kosterman & Bompard (1993) tidak menerima asumsi tersebut, karena berdasarkan karakter morfologi dari tonjolan retikulasi daun *M. odorata* berbeda dengan *M. foetida* dan pembungaan *M. odorata* berbeda dari *M. indica* dan *M. foetida*.

Kladogram (Gambar 2) menunjukkan *M. foetida* dan *M. odorata* membentuk klad *sister group* dengan nilai bootstrap 97% dan membentuk kelompok monofiletik dengan *M. indica*. Hal ini didukung oleh Teo *et al.* (2002); Kiew *et al.* (2003) yang menganalisis status hibrid *M. odorta* berdasarkan penanda AFLP yang berpendapat bahwa *M. odorata* lebih berkerabat dekat dengan *M. foetida* daripada *M. indica* dan Suparman *et al.* (2013). Namun analisis 19 *Mangifera* dari Indonesia dan Thailand berdasarkan sekuen *matK* menunjukkan hasil yang berbeda, bahwa *M. odorata* dan *M. indica* membentuk klad *sister group*, Hal ini menunjukkan *M. odorata* lebih dekat hubungannya dengan *M. indica* daripada *M. foetida* (Hidayat *et al.* 2012). Rekonstruksi hubungan kekerabatan *Mangifera* berdasarkan penanda AFLP serta sekuen gen ITS, *rbcL* dan *matK* mendukung status hibrid dari *M. odorata*. Kladogram hasil analisis

maximum parsimony *Mangifera* Sumatera Tengah berdasarkan sekuen *rbcL* (Gambar 2) juga dapat mendukung asumsi bahwa *M. odorata* adalah hibrid dari *M. foetida* dan *M. indica*.



Gambar 2. Pohon filogenetik *maximum parsimony* jenis *Mangifera* berdasarkan sekuen *rbcL*. Angka dalam kurung di bawah cabang menunjukkan nilai bootstrap 100x, dengan CI=1; RI=1; RC=1

Kladogram dengan metode MP membentuk klad monofiletik yaitu berasal dari nenek moyang yang sama (Mukherjee 1953). Hal ini didukung oleh pernyataan (Suparman *et al.* 2013), (Yonemori *et al.* 2002) dan (Hidayat *et al.* 2012). Hasil keseluruhan dari karakter monofiletik didukung dengan karakter stomata anomositik pada *Mangifera* (Hidayat *et al.* 2009). Variasi basa nukleotida yang diperoleh berdasarkan sekuen gen *rbcL* cukup tinggi, sehingga sekuen ini dapat digunakan dalam analisis hubungan filogenetik pada level genus, spesies maupun infraspecies.

KESIMPULAN

Studi filogenetik 3 jenis *Mangifera* Sumatera Tengah berdasarkan sekuen *rbcL* dapat disimpulkan bahwa, kladogram hasil analisis *Maximum Parsimony* (MP) membentuk klad monofiletik dengan dua klad utama *Mangifera*. Klad pertama terdiri *Mangifera indica* dan klad kedua terdiri dari *M. foetida* dan *M. odorata* yang membentuk klad *sister group*. Kladogram mendukung asumsi bahwa *M. odorata* adalah hibrid dari *M. foetida* dan *M. indica*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Hibah Kompetensi (HIKOM) atas nama Dr. Fitmawati, M.Si yang telah mendanai penelitian ini. Terimakasih juga penulis ucapkan kepada semua pihak terkait yang telah bekerja sama dan mendukung penulis baik moril maupun materil.

DAFTAR PUSTAKA

- Anto. 2013. Analisis Hubungan Kekerabatan Macang (*Mangifera foetida* Lour.) di Sumatera Bagian Tengah [skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau. Pekanbaru.
- Doyle JJ, Doyel JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Farris IS. 1989. The Retention Index and The Rescaled Consistency Index. *Cladistics*. 5:417-419.
- Fitmawati, Suwita A, Sofiyanti N & Herrnan. 2013. Analisis Kekerabatan *Mangifera* dari Sumatera Tengah. *Floribunda* 4(7): 169-179.
- Hidayat, T, Adi P. 2006. Kursus Singkat Aplikasi Perangkat Lunak PAUP dan Mr Bayes untuk Penelitian Filogenetika Molekuler. ITB. Bandung.

- Hidayat T, Rahmi T, Kusdianti. 2009. Diversity of Stomata in Genus *Mangifera*. Indonesia University of Education (UPI). Bandung.
- Hidayat T, Adi P, Kusumawaty D, Eiadthong W. 2012. Development *matK* Gene as DNA Barcode to Assess Evolutionary Relationship of important tropical forest tree genus *Mangifera* (Anacardiaceae) in Indonesia and Thailand. *Jurnal Teknologi (Science & Engineering)* 59: 17-20.
- Hou, D. 1978. *Mangifera*. *Flora Malesiana* I. 8: 423-440.
- Judd WS, Campbell CS, Kellog EA, Stevens PF & Donoghue MJ. 2002. *Plant Systematics : Phylogenetic Approach*, 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Publisher, Sunderland. Massachusetts USA.
- Kiew R, Teo LL, Gan YY. 2003. Assesment of The Hybrid Status of Some Malesian Plants Using Amplified Fragmen Length Polymorphism. *Telopea* 10 (1): 225-232.
- Kosterman AJGH, Bompert JM. 1993. *The Mangoes Their Botany, Nomenclatur and Utilization*. IBPGR (International Boar for Plant Genetic Resource) Academic Press. San Diego.
- Mukherjee SK. 1953. Origin, distribution and phylogenetic affinities of the species of *Mangifera* L. Di dalam: Litz RE, editor. *The Mango: Botany, Production and Uses*. 2nd Edition. CABI. Massachussets.
- Newmaster SG, Fazekas AJ & Ragupathy S. 2006. DNA Barcoding in Land Plants: Evaluation of *rbcL* in a Multigene Tiered Approach. *Canadian Journal of Botany* 84:335-341.
- Suparman. 2013. Desain Primer PCR In Silico untuk Amplifikasi Gen *rbcL* pada Genus *Mangifera*. *Jurnal Bioedukasi*. Vol 2(1). 163-170.
- Suparman, Pancoro A, Hidayat T. 2013. Phylogenetic Analisis Of *Mangifera* Base On *rbcL* Sequences, Chloroplast DNA. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*. LVII: 235-240.
- Teo LL, Kiew R, Set O, Lee SK, Gan YY. 2002. Hybrid Status of Kuwini, *Mangifera odorata* Griff. (Anacardiaceae) Verified by Amplified Fragment Length Polymorphism. *Molecular Ecology* 11: 1465-1469
- Yonemori K, Honsho C, Kanzaki S, Eiadthong W, Sugiura A. 2002. Phylogenetic relationships of *Mangifera* species revealed by ITS sequences of nuclear ribosomal DNA and a possibility of their hybrid origin. *Plant Systematics and Evolution* 231: 59-75.