

STUDI *IN SILICO* POTENSI DNA *BARCODE* PADA ANGGREK LANGKA *Paphiopedilum*

Vita Sindiya¹, Luluk Mukarramah², Siti Rohimah¹, Dian Al Ghifari Perwitasari¹,
dan Mukhamad Su'udi^{1,*}

¹Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Jember

²Program Studi Biologi, FKIP Universitas Jember

Jl. Kalimantan No.37, Jember 68121 Indonesia

e-mail: msuudi.rda@gmail.com

Abstrak

Anggrek adalah tumbuhan berbunga yang memiliki nilai komersial tinggi. Eksploitasi anggrek yang berlebihan menyebabkan keberadaannya di alam berkurang. DNA *barcoding* dapat menjadi alat yang efektif untuk deteksi anggrek langka seperti *Paphiopedilum*. Metode yang dilakukan dalam DNA *barcoding* anggrek *Paphiopedilum* adalah dengan studi *in silico* menggunakan Genbank (NCBI). Sekuen DNA dikoleksi dari *database* pada NCBI dengan cara menulis nama spesies dan gen yang dimaksud (*matK*, *rbcL*, dan *ITS*). Selanjutnya data dianalisis menggunakan CLUSTAL X untuk menentukan tingkat homologi antar sekuen melalui penjajaran sekuen, identifikasi sekuen yang berpotensi sebagai *barcode*, dan pembuatan pohon filogenetik. Analisis bioinformatik menunjukkan bahwa hasil *alignment* dengan menggunakan lokus *matK* dan *rbcL* memiliki tingkat homologi yang tinggi, meski demikian *matK* dapat menunjukkan karakter spesifik dari *P. sangii* yang dapat dijadikan sebagai *barcode*. Sedangkan *ITS* memiliki tingkat variasi genetik yang lebih tinggi dan homologi yang rendah daripada *matK* dan *rbcL*. Barcode *P. sangii* dihasilkan dari lokus *matK*. Sedangkan pada lokus *rbcL*, semua spesies memiliki tingkat homologi yang tinggi, sehingga tidak mendapatkan sekuen yang berpotensi sebagai *barcode*. Variasi genetik yang tinggi dapat dipelajari pada lokus *ITS*, namun tidak ditemukan sekuen yang berpotensi sebagai *barcode*.

Kata kunci: *Paphiopedilum*, DNA *barcoding*, sekuen

Abstract

Orchids are flowering plants that have high commercial value. Excessive orchid exploitation has reduced its existence in nature. DNA *barcoding* can be an effective tool for the detection of rare orchids such as *Paphiopedilum*. The method used in *Paphiopedilum* orchid *barcoding* DNA is *in silico* studies using Genbank (NCBI). DNA sequences are collected from the *database* at NCBI by writing the names of the species and genes in question (*matK*, *rbcL*, and *ITS*). Furthermore, the data is analyzed using CLUSTAL X to determine the level of homology between sequences through sequence alignment, identification of potential sequences as barcodes, and creation of phylogenetic trees. The results of the bioinformatics analysis show that the alignment results using *matK* and *rbcL* loci have a high level of homology, though *matK* can show the specific character of *P. sangii* which can be used as a barcode. While *ITS* has a higher level of genetic variation and low homology than *matK* and *rbcL*. The *P. sangii* barcode is generated from the *matus* locus. While at the *RBC* locus, all species have a high level of homology, so they do not get a sequence that has the potential as a barcode. High genetic variations can be studied at the *ITS* locus, but no sequences are found that have the potential as barcodes.

Keywords: *Paphiopedilum*, DNA *barcoding*, sequence

I. PENDAHULUAN

Indonesia memiliki biodiversitas anggrek yang tinggi. Terdapat sekitar 25.000 spesies anggrek di dunia dan sekitar 5.000 spesies ada di Indonesia. Keanekaragaman anggrek tersebar di wilayah tropis dan subtropis (Suhadyah, *et al.*, 2014). Anggrek adalah tumbuhan berbunga yang memiliki nilai komersial tinggi, karena memiliki keunikan yang khas dalam hal estetika. Hal tersebut mendorong koleksi anggrek dari alam yang berlebihan. Eksploitasi anggrek yang berlebihan tersebut menyebabkan keberadaannya di alam berkurang. Spesies yang tergolong langka disebabkan eksploitasi, fragmentasi habitat, deforestasi, kebakaran hutan dan konversi hutan. Sehingga perlu strategi konservasi yang komprehensif untuk melestarikannya (Wulanesa, *et al.*, 2017).

Salah satu contoh anggrek langka adalah *Paphiopedilum*. Genus *Paphiopedilum* terdiri dari 80 spesies yang tersebar dari Himalaya, Cina selatan sampai Malaysia dan Guadalcanal. Genus *Paphiopedilum* memiliki persebaran terbatas. Bunga spesies *Paphiopedilum* berbentuk seperti kasut dan sering disebut sebagai *slipper orchids*, di Indonesia dikenal sebagai anggrek selop. Populasinya di alam sangat terbatas dan menghadapi kepunahan karena koleksi berlebihan dan kerusakan habitat (Lee, *et al.*, 2017). *Paphiopedilum* memiliki 3 subgenera yaitu *Parvisepalum*, *Brachypetalum*, dan *Paphiopedilum* (Chochai, *et al.*, 2012).

Sejak akhir abad ke-20, perkembangan biologi molekuler mendukung penelitian di bidang biodiversitas dan sistematika tumbuhan. Salah satunya adalah untuk identifikasi jenis tumbuhan secara molekuler (*barcoding*). Penggunaan penanda molekuler (*barcode*) memiliki beberapa keuntungan yaitu, hasil konsisten dan dapat dideteksi pada semua jenis jaringan dengan berbagai tahap perkembangan dan tidak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (Nurkamila, *et al.*, 2014). Proses identifikasi suatu jenis

tumbuhan diawali dengan mengisolasi DNA genom dan memperbanyak

Melalui PCR. Primer yang disarankan untuk DNA *barcoding* anggrek adalah maturase-K (*matK*) dan ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase subunit besar (*rbcL*). Gen *matK* ditemukan pada intron dengan panjang 1500 bp. Sedangkan gen *rbcL* memiliki panjang 1400 bp. Selain itu gen ini dapat diamplifikasi dengan tingkat keberhasilan yang tinggi (Kumar, *et al.*, 2016).

Filogenetik merupakan klasifikasi secara taksonomi berdasarkan sejarah evolusi suatu organisme dan bertujuan untuk menentukan filogeni dari organisme berdasarkan karakteristiknya. Analisis filogenetik dapat mengikuti perubahan yang terjadi pada suatu spesies yang sangat berkaitan dengan evolusi. Evolusi merupakan perubahan pada suatu organisme secara genetik maupun fenotipik sebagai bentuk adaptasi terhadap lingkungannya, sehingga memungkinkan organisme yang sederhana menjadi organisme yang lebih kompleks. Sejarah evolusi spesies dapat diidentifikasi dari perubahan karakter yang terjadi akibat mutasi genetik dan rekombinasi pada suatu spesies. Karakter yang sama merupakan dasar untuk menganalisis hubungan satu spesies dengan spesies lainnya (Dharmayanti, 2011). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi sekuen pendek yang berpotensi sebagai *barcode*, dan menganalisis hubungan filogenetik spesies anggrek anggota genus *Paphiopedilum* menggunakan sekuen *matK*, *rbcL*, dan *ITS*.

II. METODE PENELITIAN

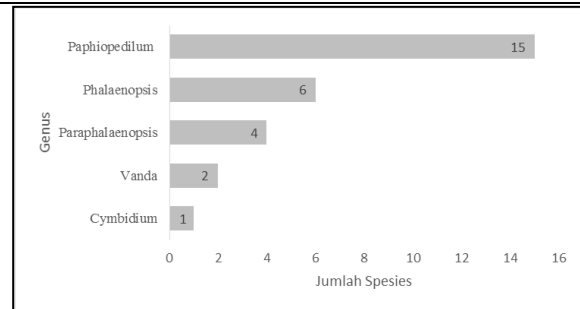
Sekuen DNA dikoleksi dari *database* yang tersedia di Genbank (NCBI) dengan cara menulis nama spesies dan gen yang dimaksud (*matK*, *rbcL*, dan *ITS*). Selanjutnya data tersebut digunakan untuk analisis bioinformatika yang meliputi pensejajaran sekuen (*alignment*), menentukan tingkat homologi antar sekuen, identifikasi sekuen yang berpotensi sebagai *barcode* menggunakan CLUSTAL X (Missener & Kraetz, 2000), dan pembuatan pohon filogenetik

menggunakan MEGA 7 (Barman & Devadas, 2013).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelusuran jenis anggrek langka menunjukkan bahwa berdasarkan Peraturan Pemerintah tahun 2018 tentang konservasi satwa dan tumbuhan, terdapat total 28 jenis anggrek yang tersebar di Indonesia. Dari total jumlah tersebut, anggrek yang mendominasi termasuk dalam genus *Paphiopedilum* (Gambar 1). Hal tersebut terjadi akibat pengaruh faktor abiotik dan faktor biotik. Faktor abiotik yang berpengaruh diantara ancaman antropogenik, perubahan iklim, bencana alam dan kondisi lingkungan habitatnya. Aktifitas antropogenik yang menurunkan populasi *Paphiopedilum* antara lain fragmentasi habitat, eksploitasi (koleksi yang berlebihan), deforestasi, kebakaran hutan, konversi hutan dan endemisitas (Herlina, 2012). Faktor biotik juga berpengaruh terhadap keberadaan anggrek *Paphiopedilum*, seperti asosiasi mikoriza dan fungi endofit yang mempengaruhi pertumbuhan, perkembangan serta reproduksi anggrek. Selain itu bunga *Paphiopedilum* tidak menarik bagi sebagian serangga, sehingga jumlah pollinator terbatas dan berdampak pada proses fertilisasinya. *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES) mengelompokkan *Paphiopedilum* ke dalam Appendix 1 [4], dan *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) menggolongkannya ke dalam status *endangered* (EN).

Appendix I berisi data spesies yang terancam punah dan dilarang dalam segala bentuk perdagangan, kecuali spesies yang digunakan untuk tujuan non komersial dengan izin ekspor impor, sehingga spesies yang termasuk di dalamnya dilarang keluar dari suatu negara tanpa izin.



Gambar. 1. Jumlah Genus anggrek yang masuk kategori dilindungi (*endangered*) di Indonesia.

Anggrek merupakan produk hasil hutan bukan kayu (*nontimber forest product*) yang memiliki nilai ekonomi tinggi (Herlina, 2012; Parveen, *et al.*, 2012). Oleh karena itu, inventarisasi dan konservasi anggrek perlu dilakukan untuk tujuan menyelamatkan dari kepunahan. Salah satu cara inventarisasi anggrek adalah dengan pendeteksian spesies langka menggunakan morfologi. Namun cara tersebut membutuhkan waktu lama, keahlian yang khusus dan sampel yang lengkap. Selain itu, dibutuhkan metode alternatif yang lebih cepat dan akurat, seperti *DNA barcoding*.

DNA barcoding dapat menjadi alat yang efektif untuk membatasi perdagangan ilegal. Hal ini berdasarkan kelebihanannya yaitu, dapat mengidentifikasi spesies tumbuhan atau hewan lebih cepat, tidak membutuhkan sampel yang lengkap serta tidak harus memiliki keahlian khusus. Sejauh ini telah ada contoh *DNA barcoding* yang efektif digunakan untuk mendeteksi perdagangan daging hasil buruan secara ilegal di Afrika Tengah dan Amerika Selatan menggunakan sekuen gen *COI* (Khan, 2017). Sehingga studi ini menggunakan data yang tersedia pada Genbank (NCBI) untuk mendapatkan *barcode* yang dapat digunakan untuk mencegah penyelundupan sebagai upaya konservasi *Paphiopedilum*.

Tabel 1. Data sekuen anggrek *Paphiopedilum* pada NCBI

Nama Spesies	<i>matK</i>			<i>rbcL</i>			<i>ITS</i>		
	Akses	Panjang (bp)	Asal	Akses	Panjang (bp)	Asal	Akses	Panjang (bp)	Asal
<i>Paphiopedilum gigantifolium</i>	KP312011	600 ^P	AT	KP311813	485 ^P	AT			
<i>Paphiopedilum glanduliferum</i>	JQ66087	1308 ^P	LU	KP311814	485 ^P	AT			
<i>Paphiopedilum glaucophyllum</i>	AY557205	1563 ^F	SW	KX755548	663 ^P	TH			
<i>Paphiopedilum kolopakingii</i>	KP312013	600 ^P	AT	KP311815	485 ^P	AT	KY931036	798 ^F	PLD
<i>Paphiopedilum liemianum</i>	KP312029	600 ^P	AT	KP311831	663 ^P	TH			
<i>Paphiopedilum mastersianum</i>	KP312070	600 ^P	AT	KP311833	485 ^P	AT	AY643466	739 ^F	USA
<i>Paphiopedilum violascens</i>	KP312083	600 ^P	AT	KP311884	485 ^P	AT	EF156160	662 ^P	CH
<i>Paphiopedilum victoria-regina</i>	JQ6608893	1320 ^P	VU	KP311834	485 ^P	AT	EF156157	631 ^P	CH
<i>Paphiopedilum wilhelminae</i>	KP312021	600 ^P	AT	KP311823	485 ^P	AT	JQ929367	649 ^P	UK
<i>Paphiopedilum supardii</i>	KX755567	605 ^P	TH	KX755547	663 ^P	TH			
<i>Paphiopedilum sangii</i>	KP312074	609 ^P	AT						
<i>Paphiopedilum victoria-mariae</i>				KP311833	485 ^P	TH	EF156156	633 ^P	CH
<i>Paphiopedilum primulinum</i>				KX755536	663 ^P	TH			

Keterangan : F= Full P= Parsial
 AT = Asia Tenggara UK = United Kingdom
 TH = Thailand USA = USA
 CH = China PLD = Polland
 LU = Laos Utara SW = Switzerland
 VU = Vietnam Utara

NCBI menyediakan banyak data dan informasi organisme yang meliputi sekuen DNA beserta panjang nukleotidanya, dan dilengkapi dengan nomor akses untuk membedakan publikasi setiap organisme. Berdasarkan hasil penelusuran, dari 15 anggota genus *Paphiopedilum* yang langka terdapat 13 spesies yang sekuennya telah tersedia di NCBI. Data tersebut didapatkan dari isolasi gen *matK*, *rbcL*, dan *ITS* (Tabel 1). Pada lokus *matK* hampir semua spesies memiliki sekuen parsial, kecuali *Paphiopedilum glaucophyllum* merupakan sekuen lengkap. Sehingga dapat dijadikan acuan untuk pemotongan DNA (*trimming*) yang akan di sejajarkan (*alignment*) dan menghitung urutan nukleotida yang unik

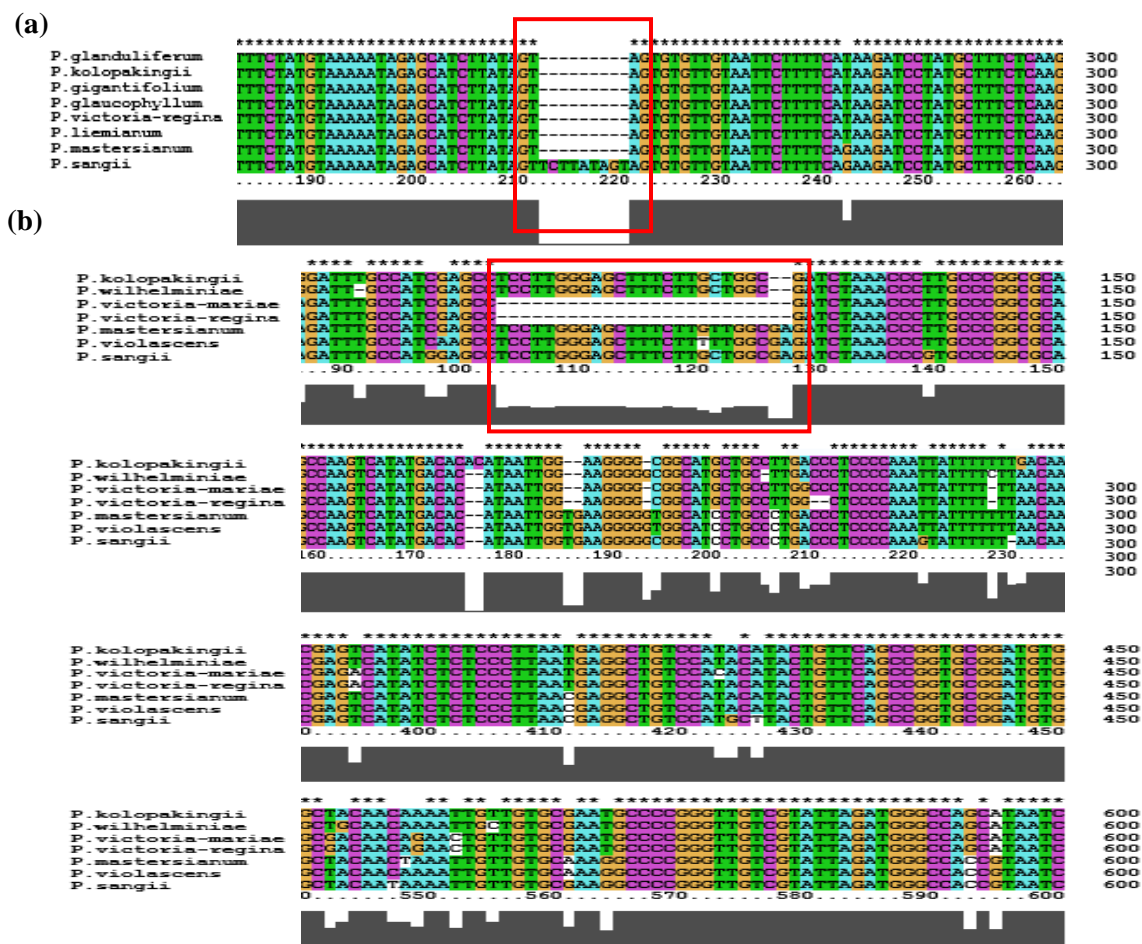
pada spesies lainnya. *Paphiopedilum glaucophyllum* di Indonesia dikenal sebagai anggrek selop atau anggrek kantung yang merupakan endemik Jawa Timur. Anggrek jenis ini hidup menempel pada dinding tebing yang tinggi dan curam dengan substrat humus karena *P. glaucophyllum* merupakan anggrek terestrial (Yulia, 2007).

Sebagian besar anggrek pada tabel di atas berasal dari Asia Tenggara, sedangkan spesies lainnya berasal dari Switzerland, Polland, dan USA. Salah satu alasan *Paphiopedilum* banyak ditemukan di Asia Tenggara adalah karena kondisi lingkungan yang sesuai dengan kebutuhan hidupnya. Dari 13 data spesies anggrek *Paphiopedilum* di NCBI, belum ada penelitian dari In-

donesia, sehingga analisis DNA *barcoding* ini dapat mengawali penelitian terhadap spesies anggota *Paphiopedilum* di Indonesia. Dua spesies yang belum tersedia di NCBI adalah *P. robinsonianum* dan *P. nataschae*.

Sekuen DNA *Paphiopedilum* diolah menggunakan *tools* bioinformatika. Sekuen DNA dianalisis menggunakan lokus *matK*, *rbcL* dan *ITS*. Terdapat tahap penting dalam analisis filogenetik molekuler, yaitu *sequence alignment* (pensejajaran), rekonstruksi pohon filogenetik

dan evaluasi pohon filogenetik (Hidayat & Pancoro, 2008). Tujuan dari proses pensejajaran adalah mencocokkan karakter yang homolog, dan menganalisis adanya *gap* (celah) pada sekuen yang mirip. *Gap* mempresentasikan adanya insersi, delesi maupun penyusunan ulang materi genetik dari satu atau lebih karakter sekuen selama evolusi (Dharmayanti, 2011). Hasil *alignment* didapatkan dari proses pensejajaran sekuen *Paphiopedilum* menggunakan CLUSTALX.



Gambar 2. (a) Proses pensejajaran menggunakan *matK* (b) Proses pensejajaran menggunakan *ITS*. Tanda (*) menunjukkan tingkat homologi, gap menunjukkan insersi dan delesi.

Berdasarkan hasil *alignment* (pensejajaran), gen *matK* bukan primer spesifik untuk menandai spesies dari genus *Paphiopedilum* kecuali *P. sangii*. *P. sangii* memiliki sekuen yang unik

dibandingkan dengan *Paphiopedilum* jenis lainnya. Pada sekuen 801 sampai 809 bp pada lokus *matK*, terdapat penambahan (insersi) sekuen TCTTATAGT yang merupakan duplikasi dari

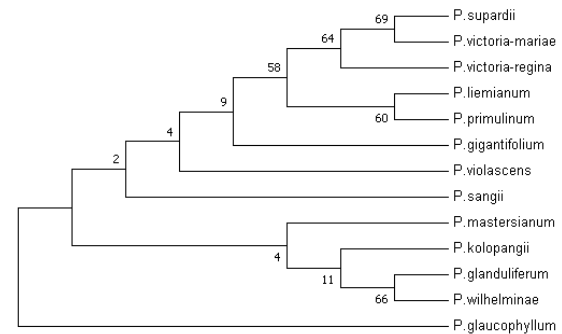
sekuen sebelumnya (gambar 2a). Perbedaan tersebut dapat digunakan sebagai penanda (*barcode*) untuk spesies *P. sangii* berdasarkan sekuen gen *matK* karena tidak dimiliki oleh spesies lainnya. Hasil pensejajaran menggunakan *ITS* lebih menunjukkan banyak variasi genetik dari tiap spesies *Paphiopedilum* dibandingkan lokus *matK* dan *rbcL* (gambar 2b). Hal ini karena *ITS* merupakan *nuclear locus* (lokus inti). Berbeda dengan daerah DNA mitokondria ataupun kloroplas, pada lokus inti sering terjadi pindah silang yang menghasilkan rekombinan yang memiliki banyak variasi genetik.

Sementara untuk lokus *rbcL* tidak dapat digunakan untuk menentukan *barcode Paphiopedilum* tingkat spesies karena memiliki tingkat homologi tinggi. DNA *matK* dan *rbcL* merupakan DNA kloroplas yang berasal dari keturunan maternal. DNA kloroplas memiliki tingkat rekombinasi genetik yang rendah (Manurung, *et al.*, 2018). sehingga sesuai dengan hasil *alignment*, *matK* dan *rbcL* memiliki tingkat homologi yang tinggi.

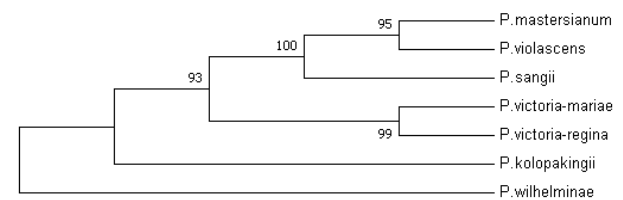
Pohon filogenetik dapat menggambarkan kekerabatan antara spesies dengan moyang terakhir yang paling dekat dengan spesies yang dibandingkan sehingga dapat diketahui kedekatan suatu spesies dengan spesies lainnya. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik *Paphiopedilum* dengan lokus *matK* menggunakan metode *Neighbour-joining tree* MEGA7 menunjukkan bahwa *P. sangii* berkerabat dekat dengan *P. violascens* membentuk satu percabangan (gambar 3a). Sedangkan pada lokus *ITS* menunjukkan bahwa *P. kolopakingii* dan *P. wilhelminae* merupakan nenek moyang dari spesies yang lain. Kemudian, membentuk suatu percabangan yang mana *P. victoria-marinae* dan *P. victoria-regina* membentuk suatu kelompok tersendiri, dan *P. sangii*, *P. violascens*, dan *P. masterianum* membentuk kelompok yang lain (gambar 3b). Hal ini kemungkinan karena adanya delesi dari sekuen TCCTTGGGAGCTTTCTTGCTGGC pada urutan sekuen ke 176-199 milik *P. victoria-marinae*

dan *P. victoria-regina* dan insersi pada *P. sangii*, *P. violascens*, dan *P. masterianum* pada sekuen 200-201.

(a)



(b)



Variasi spesies tidak hanya ditentukan oleh keanekaragaman gen namun juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Sifat yang muncul pada setiap spesies merupakan interaksi antara gen dengan lingkungan. Dua individu yang memiliki struktur gen sama belum tentu memiliki fenotip yang sama. Faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi fenotip (morfologi) adalah iklim, suhu, ketinggian tempat, dan kelembaban (Wahab, *et al.*, 2014).

IV. KESIMPULAN

Barcode P. sangii dihasilkan dari lokus *matK*. Sedangkan pada lokus *rbcL*, semua spesies memiliki tingkat homologi yang tinggi, sehingga tidak mendapatkan sekuen yang berpotensi sebagai *barcode*. Variasi genetik yang tinggi dapat dipelajari pada lokus *ITS*, namun tidak ditemukan sekuen yang berpotensi sebagai *barcode*.

DAFTAR PUSTAKA

- Suhadiyah, S., Tambaru, E., Sjahri, R., & Umar, M.R. (2014). Keanekaragaman Anggrek di Hutan Sulawesi Selatan. *Prosiding Semnas Biodiversitas*, 3(2), 127-129.
- Wulanesa, W.O.S., Soegianto, A., & Basuki, N. (2017). Eksplorasi dan Karakterisasi Anggrek Epifit di Hutan Coban Trisula Kawasan Taman Nasional Bromo Tengger Semeru. *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(1), 125-131.
- Lee, Y.I., Chung, M.C., Sydara, K., Souliya, O., & Aphay, S.L. (2017). Taxonomic Placement of *Paphiopedilum rungsuriyanum* (Cypripedioideae; Orchidaceae) Based on Morphological, Cytological And Molecular Analyses. *Springer Open*, 58(16), 1-10.
- Chochai, A., Ilija, J., Leitch, F.L.S., Martin, J., Ingrouille, J., & Michael, F.F. (2012). Molecular Phylogenetics of *Paphiopedilum* (Cypripedioideae; Orchidaceae) Based on Nuclear Ribosomal ITS and Plastid Sequences. *Botanical Journal of The Linnean Society*, 170, 176-196.
- Nurkamila US, Pharmawati M. (2014). Ekstraksi DNA dari Herbarium Anggrek. *Jurnal Symbiosis II*, 2(1), 135-146
- Kumar, R., Pamarti, R.K., Mahadani, P., & Meitei, A.L. (2016). DNA Barcoding of Indian Orchids. *Technical Bulletin*, 48.
- Dharmayanti, I. (2011). Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *WARTAZOA*, 21(1), 1-10
- Missener, S., & Krawetz, S.A. (2000). *Bioinformatics Methods and Protocols*. USA: Humana Press.
- Barman, D., Devadas, R. (2013). Climate Change on Orchid Population and Conservation Strategies: A Review. *Journal of Crop and Weed*, 9(2), 1-12
- Herlina, D. (2012). Konservasi Anggrek Phalaenopsis dengan Perbanyakan Biji secara In Vitro. *Iptek Holtikultura*, 8, 29-35.
- Parveen, I., Singh, H.K., Raghuvanshi., Udai, C., Pradhani & Babbar, S.B. (2012). DNA Barcoding of Endangered Indian *Paphiopedilum* Species. *Molecular Ecology Resource*, 12, 82-90
- Khan, N.T. (2017). MEGA - Core of Phylogenetic Analysis in Molecular Evolutionary Genetics. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 5(2).
- Yulia, N.D. (2007). Kajian Fenologi Fase Pembungaan dan Pematangan *Paphiopedilum glaucophyllum* J.J.Sm. var. *glaucophyllum*. *Biodiversitas*, 8(1), 58-62.
- Hidayat, T., & Pancoro, A. (2008). Kajian Filogenetik Molekuler dan Perannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen*, 4(1), 35-40
- Manurung, J., Prakasa, H., Tanjung, U.J., & Harsono, T. (2018). Hubungan Kekerabatan Spesies Dalam Genus *Zanthoxylum* menggunakan Sekuen Gen Maturase K (*matK*) DNA Kloroplas. *Jurnal Biosains*, 4(2), 69-77.
- Wahab, M.A., Sundari., & Suparman. (2014). Kajian Kekerabatan Filogenetik Durian (*Durio zibethinus*) Varietas Lokal Ternate Berdasarkan Karakter Morfologi, 2(1), 230-237.