



EVALUASI LOKUS POTENSIAL *matK* DAN ITS2 UNTUK DNA BARCODING ANGGREK *Bulbophyllum lobbii* Lindl.

EVALUATION OF POTENTIAL LOCUS *matK* AND ITS2 FOR DNA BARCODING OF ORCHIDS *Bulbophyllum lobbii* Lindl.

Mukhamad Su'udi*, Fuad Bahrul Ulum, Muhammad Ardiyansah, Nurfajri Eka Fitri

Universitas Jember, Jalan Kalimantan No. 37 Sumbersari, Jember 68121

*Corresponding author: msuudi.fmipa@unej.ac.id

Naskah Diterima: 20 Juli 2023; Direvisi: 28 September 2023; Disetujui: 2 Februari 2024

Abstrak

Bulbophyllum lobbii Lindl. merupakan anggrek dari famili *Orchidaceae* yang berpotensi sebagai bahan baku obat herbal. Identifikasi morfologi anggrek *B. lobbii* memiliki keterbatasan karena kemiripan spesies dengan anggrek lain. Alternatif identifikasi secara molekuler menggunakan sekuen *matK* dan ITS2 sebagai *barcode* dalam DNA *barcoding* diharapkan menjadi salah satu lokus pembeda spesies anggrek *B. lobbii* secara akurat dan efisien. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi sekuen *matK* dan ITS2 sebagai penanda molekuler yang efektif untuk anggrek *B. lobbii*. DNA genom *B. lobbii* diisolasi dengan metode *Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) dan amplifikasi DNA dengan PCR. Hasil penelitian menunjukkan sekuen *matK* dari *B. lobbii* memiliki tingkat homologi tinggi dengan dua spesies *B. lobbii* (KY966747.1 dan KY966691.1) dari China dengan nilai *Per. Ident* sebesar 99,20%, sedangkan sekuen ITS2 memiliki homologi tertinggi dengan nilai *Per. Ident* sebesar 99,76% pada spesies *B. lobbii* (MG253848.1) dari Polandia. Hasil analisis menunjukkan sekuen ITS2 dapat mengidentifikasi spesies dari tingkatan subspecies atau di atasnya (ordo atau genus) dan juga meningkatkan resolusi filogenetik yang baik pada hasil BLAST, sedangkan sekuen *matK* memberikan sedikit kontribusi dalam pengelompokan hubungan kekerabatan antara spesies *B. lobbii* dengan spesies pembanding lainnya. Sekuen ITS2 dapat direkomendasikan sebagai penanda molekuler yang paling baik untuk identifikasi sampel anggrek *Bulbophyllum*, khususnya *Bulbophyllum lobbii*.

Kata Kunci: *Bulbophyllum lobbii* Lindl.; DNA *barcoding*; Obat herbal

Abstract

Bulbophyllum lobbii Lindl. is an orchid from the *Orchidaceae* family which has potential as a raw material for herbal medicine. Morphological identification of the *B. lobbii* orchid has limitations due to the species' similarity to other orchids. The alternative molecular identification using *matK* and ITS2 sequences as barcodes in DNA *barcoding* is expected to be one of the loci for distinguishing the *B. lobbii* orchid species accurately and efficiently. This study aims to identify *matK* and ITS2 sequences as effective molecular markers for the orchid *B. lobbii*. *Bulbophyllum lobbii* genomic DNA was isolated using the *Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) method and DNA amplification by PCR. The results showed that the *matK* sequence from *B. lobbii* has a high level of homology with two *B. lobbii* species (KY966747.1 and KY966691.1) from China with a value of *Per. Ident* is 99.20%, while the ITS2 sequence has the highest homology with a *Per. Ident* value of 99.76% with the species *B. lobbii* (MG253848.1) from Poland. The results of the analysis show that the ITS2 sequence can identify species from the subspecies level or above (ordo or genus) and also improves good phylogenetic resolution in BLAST results, while the *matK* sequence makes little contribution in grouping the relationship between the *B. lobbii* species and other comparison species. The ITS2 sequence can be recommended as the best molecular marker for identifying *Bulbophyllum* orchid samples, especially *Bulbophyllum lobbii*.

Keywords: *Bulbophyllum lobbii* Lindl.; DNA *barcoding*; Herbal medicine

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v17i2.33861>

PENDAHULUAN

Anggrek merupakan tumbuhan berbunga dari famili *Orchidaceae* yang memiliki nilai ekonomi yaitu nilai keindahan (estetika), nilai ekologi dan fitoterapi. Anggrek di Indonesia memiliki keanekaragaman sekitar lebih dari 5.000 jenis dari 40 genus (Febriandito & Soetopo, 2019). Jenis tumbuhan anggrek dari family *Orchidaceae* berpotensi sebagai bahan baku obat seperti penurun demam, tuberkulosis (TBC), rematik, sakit perut, dan pemulih stamina (Hossain, 2011; Wahyudiningsih et al., 2017).

Salah satu spesies anggrek dari famili *Orchidaceae* adalah *Bulbophyllum lobbii* yang tumbuh di Indonesia khususnya di Jawa, Sumatra, dan Kalimantan yang dikenal sebagai anggrek lidah bergoyang (Baishnab et al., 2017; Rinaldi & Rita, 2020). Anggrek *Bulbophyllum* dimanfaatkan sebagai obat dari kandungan metabolit sekunder atau senyawa fenolik yang memiliki konsentrasi tinggi, seperti fenantrena, bibenzil, dan fenilpropanoid (Bhinija et al., 2021). Anggrek *B. lobbii* digunakan oleh masyarakat Thailand sebagai obat luka bakar dari organ daunnya (Teoh, 2016). Penelitian anggrek *B. lobbii* di Indonesia belum banyak dilakukan, baik pemanfaatannya sebagai obat, metabolit sekunder, maupun molekuler.

Identifikasi karakteristik morfologi secara langsung pada spesies anggrek masih terdapat keterbatasan, yaitu adanya kemiripan spesies yang cenderung pada organ vegetatif seperti akar, batang, dan daun. Selain itu organ generatif, yaitu bunga anggrek di alam sulit didapatkan sehingga menjadi permasalahan saat identifikasi morfologi (Liu et al., 2019). Oleh karena itu, perlu adanya alternatif identifikasi lain untuk mengatasi keterbatasan identifikasi morfologi secara langsung melalui pendekatan secara molekuler yang cepat dan efisien. Salah satu alternatif yang digunakan untuk identifikasi anggrek *B. lobbii* adalah menggunakan DNA *barcoding*. DNA *barcoding* merupakan *tools* taksonomi molekuler yang kuat untuk mengidentifikasi spesies secara cepat dan akurat berdasarkan urutan DNA menggunakan penanda molekuler (Srivastava & Manjunath, 2020; Su'udi et al., 2022; Rohimah et al., 2020). Prinsip DNA *barcoding* didasarkan pada urutan sekuen pendek yang digunakan sebagai pembeda antar spesies karena banyaknya keragaman genetik dalam spesies (Zamani & Chiu, 2010).

Berdasarkan *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) penanda molekuler yang direkomendasikan untuk tumbuhan yaitu gen *maturase K* (*matK*) dan *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2). Gen *matK* berasal dari kloroplas yang mengkode *maturase* pada tanaman, dapat memberikan resolusi yang tinggi pada spesies yang berbeda dan efektif digunakan pada rekonstruksi pohon filogenetik dalam berbagai tingkat taksonomi (Ince et al., 2005). Primer ITS2 berasal dari DNA *nuclear* yang populer dalam studi filogenetik dan taksonomi (Kumar et al., 2016). ITS terbagi menjadi 2 macam, yaitu ITS1 dan ITS2. Kedua *barcode* tersebut telah terbukti menjadi sumber karakter molekuler yang digunakan dalam rekonstruksi filogenik tumbuhan dari tingkat gen ke famili (Douzery et al., 1999). Menurut China Plant BOL Group et al. (2011), ITS2 dianggap sebagai alternatif penanda molekuler (*barcode*) yang digunakan untuk ITS karena lebih mudah diurutkan dan diamplifikasi.

Data sekuen DNA *barcode* untuk spesies *B. lobbii* menggunakan penanda molekuler *matK* dan ITS2 masih terbatas berdasarkan pencarian *database GeneBank National Center for Biotechnology Information* (NCBI), yaitu gen *matK* 8 sekuen dan ITS2 8 sekuen. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi lokus potensial secara molekuler *matK* dan ITS2 sebagai penanda molekuler yang efektif untuk anggrek *B. lobbii* menggunakan teknik DNA *barcoding*.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan bulan Oktober 2021 sampai dengan bulan Januari 2022. Penelitian dilakukan di Kebun Botani dan Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi neraca digital, gunting, mortar, pistil, mikropipet volume 10 μ L; 20 μ L; 200 μ L; dan 1000 μ L, *yellow tip*, *blue tip*, *beaker glass*, *microtube* 1,5 mL, vortex, *thermoshaker*, alat *centrifuge*, desikator, PCR *microtube*, mesin PCR, lemari pembeku -20 °C, gelas ukur, tabung erlenmeyer, *hot plate*, dan satu set alat elektroforesis, serta *UV-Transilluminator*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel daun anggrek *B. lobbii* yang diperoleh dari kawasan Gunung Gumitir, Jember. Bahan-bahan lain yang digunakan yaitu *buffer Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), kloroform, RNase, isopropanol dingin, etanol 70%, *buffer TE*, *master mix* untuk PCR, ddH₂O, primer *matK* dan ITS2 (*forward*, *reverse*), DNA *template*, *agarose*, *buffer Tris Acetic-EDTA* (TAE), akuades, *Ethidium Bromide* (EtBr), dan DNA *marker* 100 bp.

Sampel anggrek yang digunakan dalam penelitian ini adalah dua sampel *B. lobbii* yang didapatkan dari kawasan Gunung Gumitir, Jember (titik koordinat 8°15'19,36"S, 113°55'44,88"E). Sampel anggrek yang telah didapatkan kemudian dipelihara di Kebun Botani Universitas Jember sampai berbunga. Buku *Die Orchideen von Java* (Smith, 1905) dan *Medicinal Orchids of Asia* (Teoh, 2016) digunakan sebagai acuan proses identifikasi morfologi anggrek *B. lobbii*. Selanjutnya secara *in silico*, sekuen DNA anggrek *B. lobbii* dikoleksi berdasarkan *database* yang tersedia pada *GenBank* (NCBI) dengan cara menulis nama spesies dan marka molekuler yang digunakan pada penelitian yaitu *matK* dan ITS2.

Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom sampel anggrek menggunakan metode *Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB). Prosedur isolasi diawali dengan sebanyak 0,5 g sampel daun anggrek *B. lobbii*. Digerus menggunakan mortar dan alu, kemudian di homogenisasi menggunakan *buffer* CTAB sebanyak 3 mL. Larutan sampel diinkubasi dengan suhu 65 °C pada *thermoshaker* selama 1 jam, kemudian ditambahkan 500 µL kloroform dan diinkubasi kembali pada suhu ruang 27 °C selama 5 menit. Larutan sampel disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 25 °C selama 15 menit yang kemudian akan terbentuk *pellet* dan supernatan.

Supernatan sebanyak 600 µL dipindahkan ke *microtube* baru, lalu ditambahkan 5 µL RNase dan diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 30 menit. Isopropanol dingin ditambahkan ke supernatan sebanyak 600 µL bertujuan untuk memunculkan untaian DNA berwarna putih seperti benang dan diinversi, kemudian supernatan disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 11 menit dengan pengulangan dua kali. Supernatan hasil sentrifus dibuang, kemudian *pellet* ditambahkan etanol 70% sebanyak 500 µL untuk proses pencucian dan diinversi, kemudian di sentrifus kembali dengan kecepatan 10.000 rpm, 4 °C selama 20 menit. Kemudian *pellet* DNA dikeringkan menggunakan desikator selama 20 menit agar sisa etanol hilang. Langkah terakhir adalah resuspensi DNA genom dari *B. lobbii* menggunakan *buffer TE* sebanyak 44 µL dan diinkubasi dengan suhu 55 °C pada *thermoshaker* selama 10 menit.

Amplifikasi DNA menggunakan PCR dan Elektroforesis

Amplifikasi DNA target diawali dari pembuatan *cocktail* dengan proses mereaksikan beberapa bahan antara lain PCR *master mix*, 16 µL ddH₂O, 1 µL primer *forward*, 1 µL primer *reverse* dan 2 µL ekstrak DNA genom (*template*) *B. lobbii*. Volume *cocktail* yang dibutuhkan dalam setiap 1 sampel (satu reaksi) adalah 20 µL dalam kondisi dingin (*on ice*). Primer *matK_743F*, 5-CTTCTGGAGTCTTTCTTGAGC-3 (Besse et al., 2021) dan primer *matK_R2*, 5-CCCAATACAGTACAAAATTGAGC-3 (Batista et al., 2013). Sedangkan primer ITS2_DR2F, 5-GGCTCTCGCATCGATGAAGA-3 (Martins et al., 2014) dan ITS2_26SE, 5-TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3 (Douzery et al., 1999). *Cocktail* dimasukkan ke dalam mesin PCR untuk proses amplifikasi DNA sebanyak 35 siklus dengan kondisi mesin antara lain, pre-denaturasi 95 °C selama 5 menit, denaturasi 95 °C selama 30 detik, *annealing* 55 °C selama 30 detik, *extension* 72 °C selama 1 menit 15 detik, *final extension* 72 °C selama 5 menit dan hold 16 °C (Handoyo & Rudiretna, 2001).

Produk PCR yang telah terbentuk dimuat pada gel agarosa 1,25% yang telah tercampur dengan *ethidium bromide* (EtBr). *Ethidium bromide* (EtBr) bertujuan untuk membantu deteksi keberadaan pita DNA. Langkah selanjutnya proses *running* pada alat elektroforesis dengan waktu yang dibutuhkan selama 30 menit pada 100 V, kemudian produk PCR di visualisasi menggunakan UV-Transiluminator untuk melihat pita DNA. Pita DNA yang terbentuk kemudian dianalisis

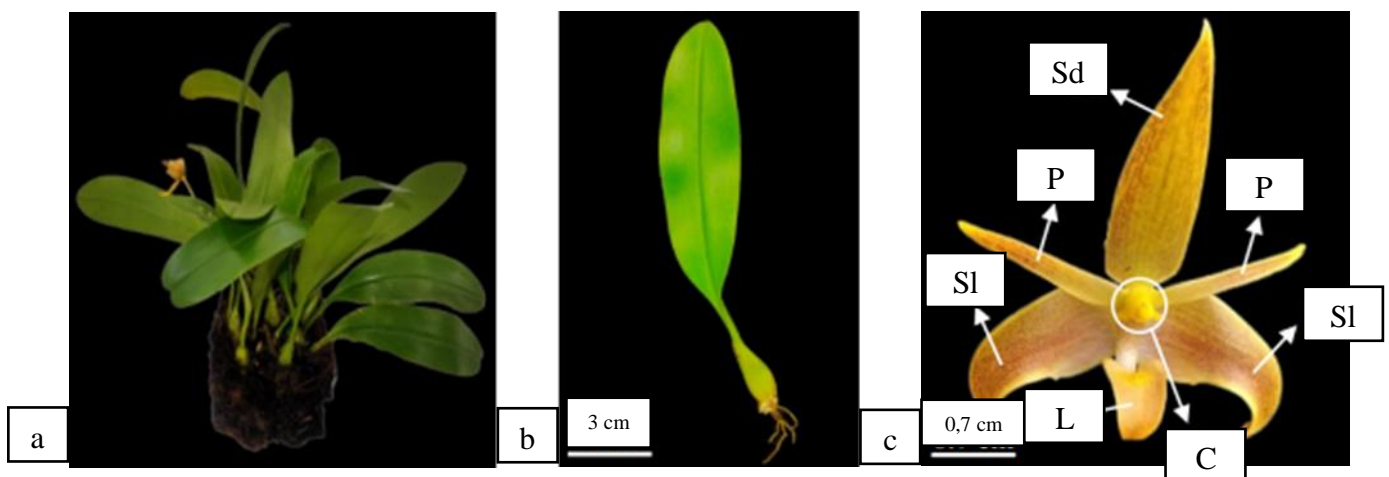
ukurannya dan disesuaikan ukuran panjangnya pada *marker*. Produk PCR disekuensing menggunakan layanan sekuensing yang disediakan oleh 1st BASE, Singapura untuk penentuan dan pembacaan urutan basa nitrogen DNA *B. lobbii*. Data hasil sekuen berupa kromatogram yang dianalisis menggunakan *software* BioEdit.

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan metode komputasi yang meliputi identifikasi sekuen dari spesies menggunakan program BLAST pada *database GeneBank National Center for Biotechnology Information* (NCBI) yang dapat diakses secara online <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> untuk mengonfirmasi tingkat kesamaan sekuen DNA target yaitu *matK* dan ITS2 pada anggrek *B. lobbii* yang telah dipublikasikan. Koleksi masing-masing sekuen *matK* dan ITS2 dari 10 spesies teratas yang memiliki tingkat kesamaan tertinggi pada sampel dalam format FASTA. Analisis filogenetik dilakukan dengan pensejajaran urutan basa hasil pembacaan menggunakan *software* ClustalX 2.1 untuk mengetahui kesamaan basa nukleotida (Chenna et al., 2003). Konstruksi pohon filogenetik dianalisis menggunakan *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis X* (Mega X) untuk mengetahui hubungan kekerabatan sampel yang digunakan (Kumar et al., 2018).

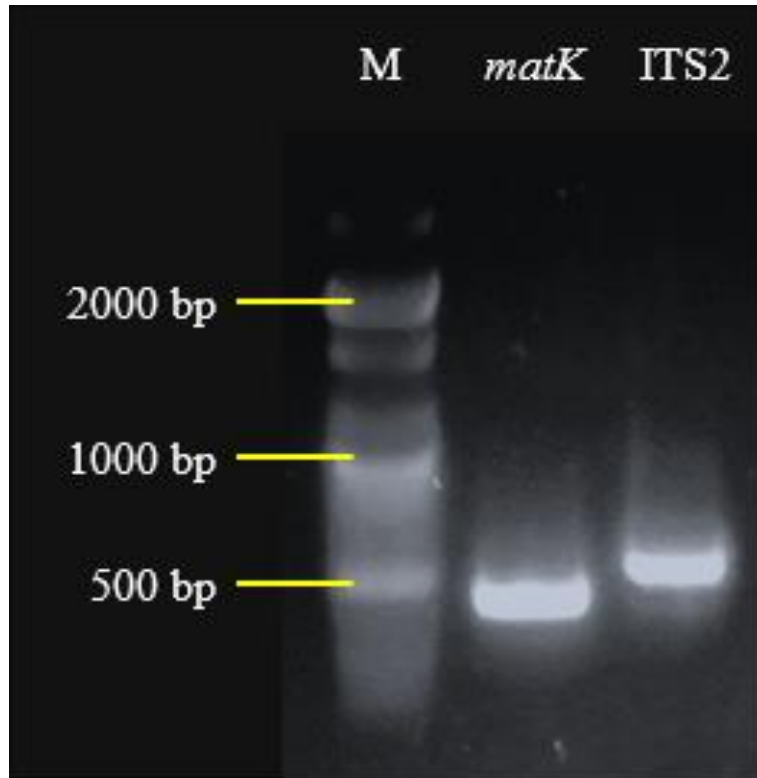
HASIL

Hasil pengamatan karakteristik morfologi menunjukkan anggrek *B. lobbii* termasuk anggrek simpodial dan epifit berukuran ± 32 cm (Gambar 1a). Bentuk batang beruas dengan ukuran diameter $\pm 1,4$ – $1,8$ cm, pada bagian pangkal terdapat pseudobulb yang berwarna hijau. Karakteristik daun *B. lobbii* yaitu berdaging (*herbaceous*), warna daun hijau tua dengan panjang daun ± 17 cm dan lebar daun ± 4 cm. Bentuk daun secara keseluruhan yaitu bulat memanjang (*oblong*) dan tepi daun rata (*integer*). Ujung daun terbelah (*retusus*) dan memiliki struktur permukaan daun halus (*laevis*) pada bagian atas dan bawah (Gambar 1b). Bunga anggrek *B. lobbii* secara keseluruhan adalah berbunga tunggal berwarna kuning dengan corak garis cokelat. Bunga anggrek *B. lobbii* berukuran panjang lebar ± 5 cm dan terdiri dari sepal dorsal, sepal lateral, petal, *labellum*, dan columna. Bagian bunga anggrek *B. lobbii* pada bagian sepal dorsal dan petal memiliki bentuk memanjang, bagian sepal lateral memiliki bentuk melengkung, bagian *labellum* melengkung dan kolumna berwarna kuning (Gambar 1c).

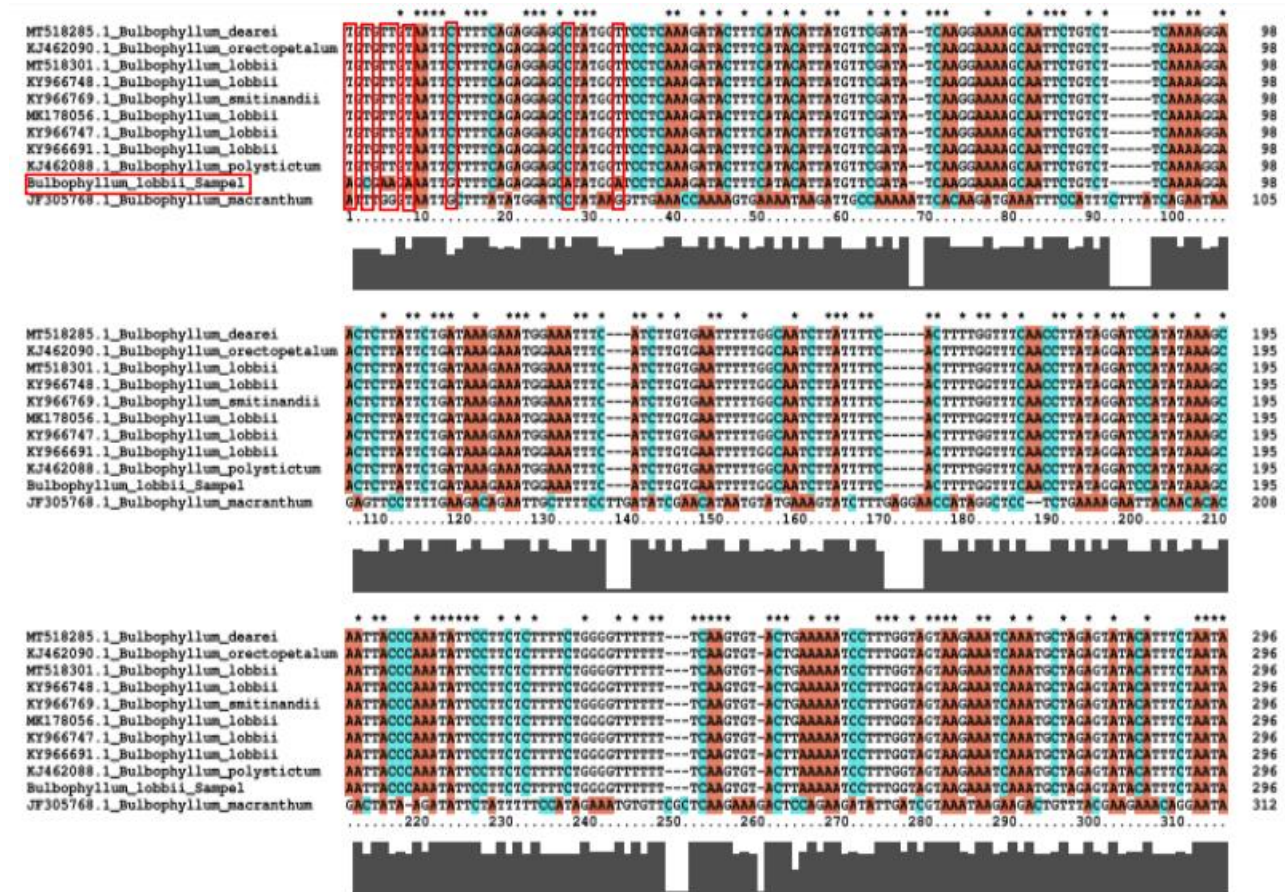


Gambar 1. Morfologi anggrek *B. lobbii*, yakni habitus (a), *pseudobulb* dan daun (b), serta bunga (c). Keterangan: sepal dorsal (Sd), petal (P), sepal lateral (Sl), columna (C), dan *labellum* (L). Foto diambil menggunakan kamera *handphone* Realme 5 Pro dan diedit menggunakan *software* CorelDRAW X7

Hasil visualisasi dari amplifikasi PCR sampel anggrek *B. lobbii* menggunakan dua jenis set penanda molekuler spesifik yaitu *matK* dan ITS2 menunjukkan pita DNA yang dihasilkan tebal (Gambar 2). Pita DNA pada sekuen *matK* menunjukkan ukuran sebesar ± 500 bp, sedangkan ukuran pita DNA pada sekuen ITS2 yaitu ± 500 – 600 bp.



Gambar 2. Hasil visualisasi proses amplifikasi DNA *B. Lobbii*. Keterangan: (M) marker 100 bp Plus DNA Ladder (Bioneer); Produk PCR menggunakan primer *forward* dan primer *reverse matK* (743F + R2), ITS2 (DR2F + 26SE)



Gambar 3. Hasil pensejajaran (*alignment*) DNA sampel anggrek *Bulbophyllum lobbii* Lindl. untuk sekuen *matK*

Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sampel anggrek *B. lobbii* sekuen *matK* (Tabel 1) memiliki tingkat homologi tertinggi pada spesies yang sama yaitu *B. lobbii* yang tercantum dan terdaftar di NCBI. Homologi tertinggi yang didapatkan dari program BLAST pada sampel *B. lobbii* dengan dua spesies yang sama *B. lobbii* (KY966747.1 dan KY966691.1) yang berasal dari China.

Tabel 1. Hasil analisis BLAST sekuen *matK* dari anggrek *B. Lobbii*

Nomor aksesori	Nama spesies	% Ident	Query cover (%)	E-value	Asal
KY966747.1	<i>Bulbophyllum lobbii</i>	99,20%	97%	0.0	China
KY966691.1	<i>B. lobbii</i>	99,20%	97%	0.0	China
KJ462088.1	<i>Bulbophyllum polystictum</i>	99,20%	97%	0.0	Thailand
JF305768.1	<i>Bulbophyllum macranthum</i>	99,20%	97%	0.0	Malaysia
MK178056.1	<i>B. lobbii</i>	98,93%	97%	0.0	Taiwan

Hasil pensejajaran (*alignment*) DNA *B. lobbii* sekuen *matK* dengan spesies homolog lainnya dari *GeneBank* NCBI menunjukkan adanya tujuh perbedaan basa nukleotida, yaitu Adenin (A) pada urutan basa ke-1, basa ke-5, basa ke-6, basa ke- 8, basa ke-27, dan pada urutan basa ke-33. Perbedaan basa nukleotida juga terdapat pada bada urutan basa ke-3 yaitu Sitosin (C) dan urutan basa ke-13 yaitu Guanin (G) (Gambar 3).

Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sampel anggrek *B. lobbii* sekuen ITS2 (Tabel 2) memiliki tingkat homologi tertinggi pada spesies yang sama yaitu *B. lobbii* yang tercantum dan terdaftar di NCBI. Homologi tertinggi yang didapatkan dari program BLAST pada sampel *B. lobbii* dengan spesies yang sama *B. lobbii* (MG253848.1) yang berasal dari China.

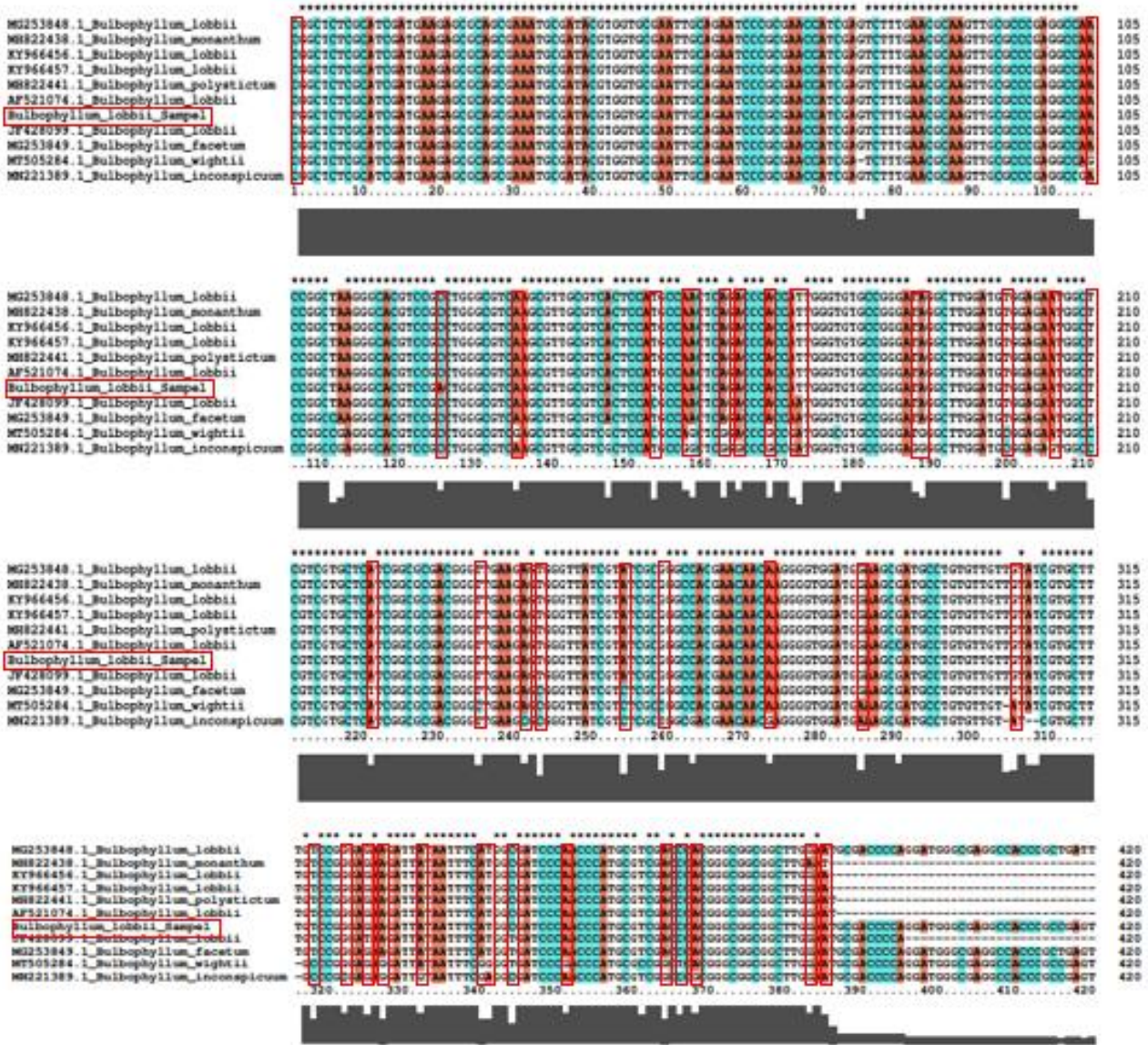
Tabel 2. Hasil analisis BLAST sekuen ITS2 dari anggek *B. lobbii*.

Nomor aksesori	Nama spesies	% Ident	Query cover (%)	E-value	Asal
MG253848.1	<i>Bulbophyllum lobbii</i>	99,76%	83%	0.0	Polandia
MG253849.1	<i>Bulbophyllum facetum</i>	98,10%	84%	0.0	Polandia
MT505284.1	<i>Bulbophyllum wightii</i>	93,03%	98%	0.0	Sri Lanka
MH822441.1	<i>Bulbophyllum polystictum</i>	99,74%	77%	0.0	Austria
KY966457.1	<i>B. lobbii</i>	99,74%	77%	0.0	China

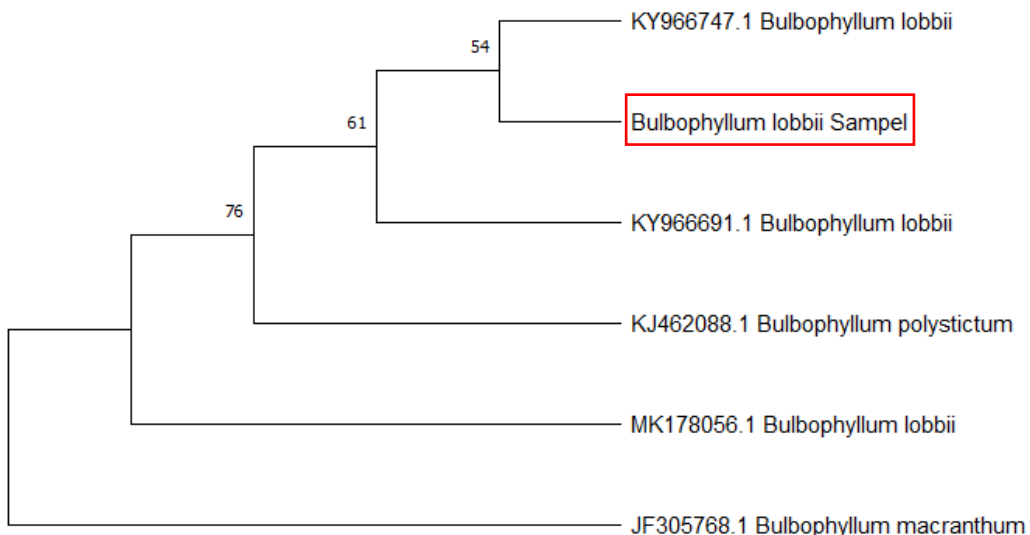
Hasil pensejajaran (*alignment*) DNA *B. lobbii* sekuen ITS2 dengan spesies homolog lainnya dari *GeneBank* NCBI juga menunjukkan banyak adanya perbedaan basa nukelotida pada beberapa urutan di antaranya yaitu basa Timin (T) pada urutan basa ke-1, basa Adenin (A), dan Guanin (G) terdapat pada urutan basa ke 105, ke-135, ke-157, ke-158, ke-163, ke-165, ke-171, ke-188, ke-205, ke-273, ke-285, ke-305, ke-327, ke-332, ke-340, ke-341, ke-351, ke-364, ke-366, ke-368, dan pada urutan basa ke-383. Basa Adenin (A) pada urutan basa ke-105, basa Sitosin (C) dan Timin (T) pada urutan basa ke-153, ke-177, ke-199, ke-210, ke-235, ke-243, ke-259, ke-318, dan ke-344. Basa Adenin (A) dan Timin (T) pada urutan basa ke-172, urutan basa ke-221, dan pada urutan basa ke-385, basa Timin (T) dan Guanin (G) pada urutan basa ke-187, basa Adenin (A) dan Sitosin (C) pada urutan basa ke-241 dan urutan basa ke-254, basa Guanin (G) dan Sitosin (C) pada urutan basa ke-322, basa Timin (T) dan Guanin (G) pada urutan basa ke-325 (Gambar 4).

Hasil konstruksi pohon filogenetik dari sampel *B. lobbii* sekuen *matK* menunjukkan bahwa spesies tersebut berkerabat dekat dengan *Bulbophyllum lobbii* (KY966747.1) yang berasal dari China dengan nilai *bootstrap* sebesar 54 dalam 1000 kali pengulangan (Gambar 5).

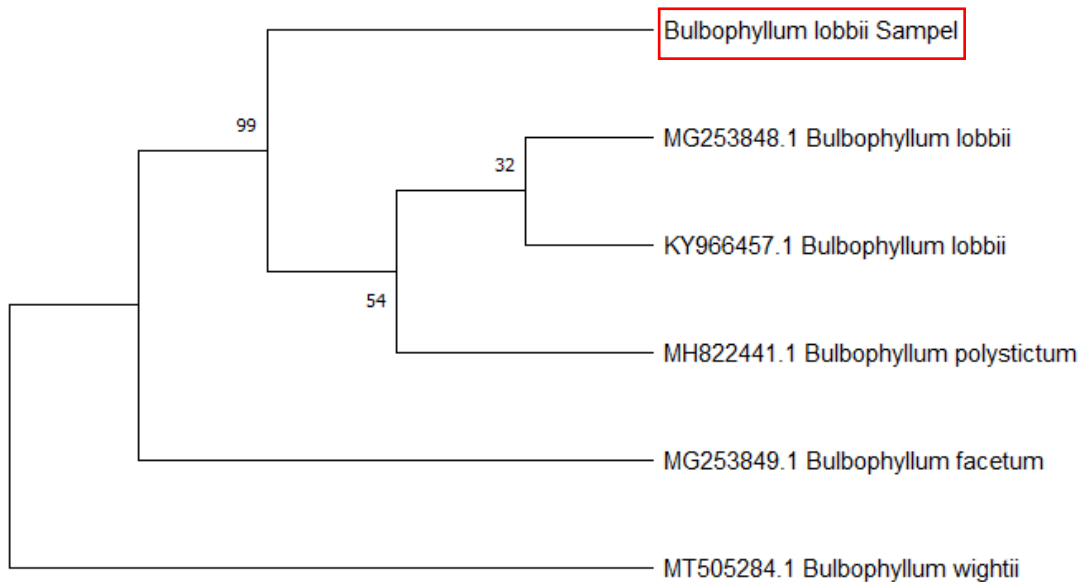
Hasil konstruksi pohon filogenetik dari sampel *B. lobbii* sekuen ITS2 menunjukkan bahwa spesies tersebut termasuk ke dalam kelompok monofiletik dengan spesies *B. lobbii* (MG253848.1), *B. lobbii* (KY966457.1) dan *B. polystictum* (MH822441.1). Nilai *bootstrap* dari *B. lobbii* (MG253848.1) dan *B. lobbii* (KY966457.1) sebesar 32. Sedangkan nilai *bootstrap* antara *B. polystictum* (MH822441.1) menunjukkan nilai sebesar 54 dalam 1000 kali pengulangan (Gambar 6).



Gambar 4. Hasil pensejajaran (*alignment*) DNA sampel angrek *B. lobbii* untuk sekuen ITS2



Gambar 5. Rekonstruksi pohon filogenetik sampel angrek *B. lobbii* sekuen *matK*



Gambar 6. Rekonstruksi pohon filogenetik sampel anggrek *B. lobbii* sekuen ITS2

PEMBAHASAN

Karakteristik Morfologi Anggrek *Bulbophyllum lobbii* Lindl.

Karakteristik morfologi anggrek *B. lobbii* hasil pengamatan sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa terdapat pseudobulb berwarna hijau, daun berwarna hijau tua dengan tepi daun rata (Nursanti et al., 2020). Bunga anggrek *B. lobbii* berukuran lebar $\pm 5\text{--}6$ cm, berwarna kuning dengan garis-garis cokelat membujur di semua segmen bunga. Struktur bunga terdiri sepal dorsal dan petal yang memiliki bentuk seperti bilah memanjang dan runcing (Teoh, 2019).

Analisis Molekuler DNA *Barcoding* Anggrek *Bulbophyllum lobbii* Lindl.

Hasil amplifikasi PCR dari sampel anggrek *B. lobbii* menggunakan dua jenis set primer spesifik yaitu *matK* dan ITS2 menunjukkan pita DNA yang dihasilkan sesuai dengan ukuran yang ditargetkan (Gambar 2). Hasil amplifikasi DNA kedua sekuen *matK* dan ITS2 berhasil dilakukan dan sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya. Pita DNA pada sekuen *matK* menunjukkan ukuran berdasarkan penanda molekuler DNA *ladder* (100 bp) ± 500 bp. Hasil pita DNA tersebut sesuai dengan Batista et al. (2013) dan Besse et al. (2021) bahwa hasil produk dari ukuran sekuen *matK* yang telah teramplifikasi menggunakan primer *matK743F* dan *matKR2* sekitar ± 500 bp. Pita DNA pada sekuen *matK* yang jelas dan tebal menunjukkan bahwa sekuen *matK* teramplifikasi dengan baik. Ukuran pita DNA pada sekuen ITS2 yang dihasilkan berdasarkan ukuran penanda molekuler DNA *ladder* (100 bp) yaitu $\pm 500\text{--}600$ bp. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Yao et al. (2010) bahwa panjang sekuen ITS2 yang teridentifikasi pada tanaman monokotil, dikotil, dan *gymnospermae* sebesar 100–700 bp, sedangkan penelitian oleh Takamiya et al. (2014), menyatakan bahwa ukuran sekuen ITS2 yang teramplifikasi menggunakan primer DR2F dan ITS_26SE sekitar ± 500 bp pada tanaman *Dendrobium*.

Hasil sekuensing anggrek *B. lobbii* menggunakan sekuen *matK* memiliki *Query length* sebesar 383 bp setelah proses pemotongan (*trimming*) hasil kromatogram. Selanjutnya, hasil sekuensing berupa urutan basa nitrogen dianalisis menggunakan program BLAST yang bertujuan untuk mencari dan menganalisis homologi sekuen suatu organisme antar spesies yang diteliti (Wardani et al., 2017). Hasil analisis BLAST sekuen *matK* dari *B. lobbii* sampel (Tabel 1) menunjukkan homologi tertinggi dengan dua spesies yang sama *B. lobbii* (KY966747.1 dan KY966691.1) yang berasal dari China dengan tingkat presentase sebesar 99,20%. Nilai presentase tersebut menunjukkan ketiga spesies yang sama. Hal tersebut sesuai dengan Hofstetter et al. (2019) yang

menyebutkan bahwa nilai persentase sebesar 99% menunjukkan kesamaan spesies antara sampel yang dianalisis dengan sampel BLAST.

Hasil *Query cover* BLAST sekuen *matK* *B. lobbii* sampel menunjukkan angka 97% pada 5 spesies homolog tertinggi. Nilai *Query cover* sebesar 97% menunjukkan kesesuaian basa nitrogen antara sampel yang *B. lobbii* yang diteliti dengan sekuen homolognya (Wardani et al., 2017). Nilai *E-value* pada tabel hasil BLAST *B. lobbii* sekuen *matK* menunjukkan angka 0,0 pada kelima spesies homolognya. Menurut Isda dan Chaidamsari (2013), semakin rendah nilai *E-value* maka semakin baik tingkat homologinya. Hal tersebut menunjukkan sampel *B. lobbii* sekuen *matK* memiliki kemiripan yang tinggi dengan sekuen homolognya.

Sekuen anggrek *B. lobbii* hasil dari analisis dengan BLAST dengan spesies yang terdapat di *GeneBank*, selanjutnya dilakukan perbandingan dengan sekuen homolognya. Proses pensejajaran (*alignment*) dilakukan untuk mencocokkan karakter homolog antar sekuen DNA yang akan dibandingkan. Hasil pensejajaran (*alignment*) DNA *B. lobbii* sekuen *matK* dengan spesies lain dari menunjukkan banyak perbedaan basa nukleotida yang dihasilkan oleh sekuen *matK* (Gambar 3). Hal tersebut tidak sesuai dengan penelitian Kolondam et al. (2012) yang menyatakan bahwa perbedaan basa nukleotida yang dihasilkan sekuen *matK* menunjukkan tingkat variasi dalam spesies sama (intraspesifik) rendah. Sehingga sekuen *matK* tidak dapat digunakan sebagai pembeda yang baik untuk identifikasi sampel anggrek *B. lobbii*.

Hasil sekuensing anggrek *B. lobbii* sekuen ITS2 yang didapatkan memiliki *Query length* sebesar 497 bp setelah proses pemotongan hasil kromatogram. Hasil sekuensing tersebut kemudian dianalisis dengan BLAST. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sampel anggrek *B. lobbii* sekuen ITS2 (Tabel 2) memiliki homologi tertinggi dengan *B. lobbii* (MG253848.1) asal Polandia dengan nilai *Per. Ident* sebesar 99,76%. Spesies *B. lobbii* (MH822441.1) asal Austria dan *B. lobbii* (KY966457.1) asal China memiliki nilai *Per. Ident* yang sama yaitu sebesar 99,74%. Berdasarkan Hofstetter et al. (2019), nilai *Per. Ident* 99% menunjukkan kemungkinan adanya kemiripan dengan spesies *B. lobbii* sampel penelitian. Nilai *E-value* sampel anggrek *B. lobbii* sekuen ITS2 sebesar 0.0 menunjukkan pensejajaran seluruh sekuen signifikan antara *B. lobbii* dengan 5 sekuen homolognya (Perwitasari et al., 2020).

Hasil pensejajaran (*alignment*) DNA *B. lobbii* sekuen ITS2 dengan spesies homolog lainnya dari *GenBank* NCBI juga menunjukkan banyak adanya perbedaan basa nukleotida pada beberapa urutan (Gambar 4). Perbedaan basa sekuen ITS2 dibandingkan dengan basa sekuen *matK* memiliki jumlah yang lebih besar dan banyak. Hasil tersebut menunjukkan bahwa sekuen ITS2 memiliki tingkat variasi interspesifik yang tinggi dan variasi intraspesifik yang rendah dalam proses diferensiasi spesies yang berkerabat dekat. Selain itu, sekuen ITS2 tidak hanya mampu membedakan spesies dari tingkat famili melainkan hingga tingkat genus dan spesies (Chen et al., 2010; Liu et al., 2019). Adanya perubahan basa yang terdapat pada sekuen DNA menunjukkan terjadinya proses evolusi pada organisme tertentu. Hubungan evolusi antar spesies dapat direkonstruksi dengan filogenetik (Hidayat & Pancoro, 2008).

Sekuen DNA yang telah dilakukan proses pensejajaran (*alignment*) selanjutnya dilakukan konstruksi pohon filogenetiknya menggunakan *software* MEGA X. Pohon filogenetik menggambarkan evolusi yang terjadi pada kelompok spesies yang berasal dari nenek moyang yang sama. Konstruksi pohon filogenetik memiliki tujuan untuk menginterpretasi evolusi karakter suatu organisme (Ochieng et al., 2007). Metode dalam pembentukan pohon filogenetik yang digunakan pada penelitian ini adalah metode *Neighbor-Joining* (NJ). Metode *Neighbor-Joining* (NJ) memiliki prinsip dasar yaitu memanfaatkan perbedaan antara dua sekuen yang dibandingkan untuk membuat pohon filogenetik. Selanjutnya, pohon filogenetik kemudian dianalisis menggunakan *bootstrap* sebanyak 1.000x ulangan untuk menguji seberapa baik *set* data model seperti penyusunan cabang dalam prediksi pohon filogenetik (Dharmayanti, 2011).

Analisis Pohon Filogenetik Sekuen *matK* dan ITS2 pada Anggrek *Bulbophyllum lobbii* Lindl.

Hasil konstruksi pohon filogenetik dari sampel *B. lobbii* sekuen *matK* menunjukkan bahwa spesies tersebut berkerabat dekat dengan *B. lobbii* (KY966747.1) yang berasal dari China (Gambar 5). Kedua spesies tersebut termasuk ke dalam kelompok monofiletik yang diasumsikan membawa

sifat (pola genetik) dan biokimia yang sama dari nenek moyang yang sama (Hidayat & Pancoro, 2008). Nilai *bootstrap* pada percabangan antara sampel *B. lobii* dengan *B. lobii* (KY966747.1) asal China memiliki nilai sebesar 54 dalam 1000 kali pengulangan. Hal tersebut menunjukkan percabangan yang lemah, namun masih dapat dipercaya. Berdasarkan penelitian Kress et al. (2002) nilai *bootstrap* sebesar 50–70% termasuk nilai yang lemah untuk setiap daerah gen yang dianalisis secara terpisah. Sehingga, sekuen *matK* memberikan sedikit kontribusi dalam pengelompokkan hubungan kekerabatan antara spesies *B. lobii* dengan spesies pembanding lainnya.

Hasil konstruksi pohon filogenetik dari sampel *B. lobii* sekuen ITS2 menunjukkan bahwa spesies tersebut termasuk kelompok monofiletik dengan spesies *B. lobii* (MG253848.1), *B. lobii* (KY966457.1), dan *B. polystictum* (MH822441.1). Ketiga spesies tersebut termasuk dalam kelompok monofiletik dengan *B. lobii* sampel yang menunjukkan bahwa anggota dalam kelompok tersebut memiliki kekerabatan dekat dan diperkirakan turunan dari satu nenek moyang yang sama (Hidayat & Pancoro, 2008). Nilai *bootstrap* dari *B. lobii* (MG253848.1) dan *B. lobii* (KY966457.1) sebesar 32. Sedangkan nilai *bootstrap* pada percabangan antara *B. polystictum* (MH822441.1) menunjukkan nilai sebesar 54 yang dianggap lemah dan masih dapat di percaya. Meskipun nilai *bootstrap* lemah, analisis dari pohon filogenetik memberikan kontribusi yang besar dibandingkan dengan *matK* dalam penggolongan spesies berdasarkan karakteristik khas secara morfologi pada masing-masing spesies.

Hasil konstruksi pohon filogenetik yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *B. lobii* dengan *Bulbophyllum polystictum* menunjukkan nilai sebesar 99% berarti percabangan tersebut dapat dipercaya. Hal tersebut sesuai dengan Hall (2001) bahwa analisis filogenetik dengan nilai lebih dari 90% menunjukkan percabangan (*clade*) yang dapat dipercaya. Spesies *B. polystictum* (MH822441.1) adalah sinonim dari *B. lobii* (Global Biodiversity Information Facility (GBIF) Secretariat, 2021). Kedua spesies tersebut dinyatakan sebagai sinonim berdasarkan pada kesamaan karakteristik morfologi, diantaranya bentuk sepal dan petalnya adalah *lanceolate acuminate*, bunga berwarna kuning dengan corak merah marun kecokelatan (Lindley, 1847; Ridley, 1909). Berdasarkan pohon filogenetik tersebut dapat diketahui bahwa sekuen ITS2 dapat memberikan gambaran informatif mengenai filogenetik secara molekuler dari spesies *B. lobii* pada tingkat spesies. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Yip et al. (2007) bahwa sekuen ITS2 dapat digunakan sebagai alternatif proses identifikasi hingga tingkat genus dan spesies.

SIMPULAN

Sampel anggrek *B. lobii* berhasil dievaluasi berdasarkan penanda molekuler (*barcode*) *matK* dan ITS2 dengan metode CTAB. Hasil sekuensing *B. lobii* dengan sekuen *matK* dan ITS2 diperoleh panjang sekuen (*Query length*) sebesar 383 bp dan 497 bp. Sekuen *matK* dan ITS2 memiliki perbedaan yang mencolok pada basa nukleotida dengan spesies homolog yang terdapat pada *GeneBank* NCBI. Sekuen ITS2 direkomendasikan sebagai penanda molekuler (*barcode*) yang paling baik untuk identifikasi sampel anggrek *Bulbophyllum*, khususnya *B. lobii* karena sekuen ITS2 dapat menunjukkan spesies *B. polystictum* sebagai nama sinonim yang didasarkan pada karakter morfologi yang mirip. Hasil tersebut didukung dengan hasil konstruksi pohon filogenetik sekuen ITS2 dengan spesies homolog lainnya dari *GeneBank* NCBI.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai melalui skema Hibah Reworking Skripsi/Tesis tahun 2023 dari Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Jember (Surat Keputusan Rektor Nomor: 7575/UN25/KP/2023 dan Surat Perjanjian Penerima Hibah Nomor: 3717/UN25.3.1/LT/2023).

REFERENSI

- Baishnab, B., Banik, B., Majundar, K., & Datta, B.K. (2017). Four new additions of orchid species for the flora of Tripura, North East India. *ENVIS Bulletin Himalayan Ecology*, 25, 111-115.
- Batista, J. A. N., Borges, K. S., Faria, M. W. F. D., Proite, K., Ramalho, A. J., Salazar, G. A. & Berg, C.V.D. (2013). Molecular phylogenetics of the species-rich genus *Habenaria*

- (Orchidaceae) in the new worlds based on nuclear and plastid DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67(1), 1-14. doi: 10.1016/j.ympev.2013.01.008.
- Besse, P., Silva, D. D., & Grisoni, M. (2021). Plant dna *barcoding* principles and limits: A case study in the genus *Vanilla*. *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2222, 131-148. doi: 10.1007/978-1-0716-0997-2_8.
- Bhiniya, K., Huehne, P. S., Prawat, H., Ruchirawat, S., Saimanee, B., Mongkolsuk, S., & Satayavivad, J. (2021). The rhizome of *Bulbophyllum* orchid is the rich source of cytotoxic bioactive compounds, the potential anticancer agents. *South African Journal of Botany*, 141, 367-372.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... Leon, C. (2010). Validation of the its2 region as a novel dna *barcode* for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5(1), 1-8. doi: 10.1371/journal.pone.0008613.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., & Thompson J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic Acid Research*, 31(13), 3947-3500. doi: 10.1093/nar/gkg500.
- China Plant BOL Group., Li, D. Z., Gao, L. M., Li, H. T., Wang, H., Ge, X. J., ... Duan, G. W. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that *internal transcribed spacer* (its) should be incorporated into the core *barcode* for seed plants. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 108(49), 19641-19646. doi: 10.1073/pnas.1104551108.
- Dharmayanti, I. N. L. P. (2011). Filogenetika molekuler: Metode taksonomi organisme berdasarkan sejaran evolusi. *WARTAZOA*, 21(1), 1-10.
- Douzery, E. J. P., Pridgeon, A. M., Kores, P., Linder, H. P., Kurzweil, H., & Chase, M. W. (1999). Molecular phylogenetics of disease (*Orchidaceae*): A contribution from nuclear ribosomal its sequences. *American Journal of Botany*, 86(6), 887-899. doi: 10.2307/2656709.
- Febriandito, P. D., & Soetopo, L. (2019). Eksplorasi keanekaragaman anggrek epifit di kawasan konservasi wilayah ii Senduro, Blok Ireng-Ireng, Taman Nasional Bromo Tengger Semeru, Jawa Timur, *Plantropica Journal of Agricultural Science*, 4(1), 68-76. doi: 10.21776/ub.jpt.2019.004.1.8.
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF) Secretariat. (2021). GBIF backbone checklist dataset: Taxonomy of *Bulbophyllum polystictum* Ridl. (2022, June 19). Diakses dari <https://www.gbif.org/species/2843311>.
- Hall, B. G. (2001). *Phylogenetic trees made easy: A how - to manual for molecular*. USA: Biologists, Sinauer Associates, Inc.
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR). *Unitas*, 9(1), 17-29.
- Hidayat, T., & Pancoro, A. (2008). Kajian filogenetika molekuler dan peranannya dalam menyediakan informasi dasar untuk meningkatkan kualitas sumber genetik anggrek. *Jurnal AgroBiogen*, 4(1), 35-40. doi: 10.21082/jbio.v4n1.2008.p35-40.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Eyassartier, G., Schnee, S., & Gindro, K. (2019). The unbearable lightness of sequenced-based identification. *Fungal Diversity*, 96, 243-284. doi: 10.1007/s13225-019-00428-3.
- Hossain, M. M. (2011). Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances-an overview. *Fitoterapia*, 82, 102-140. doi:10.1016/j.fitote.2010.09.007.
- Ince, A. G., Karaca, M., Onus, A. N., & Bilgen, M. (2005). chloroplast *matk* gene phylogeny of some important species of plants. *Akdeniz Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi*, 28(2), 157-162.
- Isda, M. N., & Chaidamsari, T. (2013). Analisis sekuen gen proteinase inhibitor (*tcpin*) terkait dengan ketahanan terhadap penggerek buah kakao. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*, 97-101.
- Lindley, J. (1847). *Bulbophyllum lobbii* Lindl. *Edward's Botanical Register*, 33, 29.
- Kolondam, B. J., Lengkong, E., Polii, M. J., Pinaria, A., & Runtunuwu, S. (2012). Barcode dna berdasarkan gen *rbcl* dan *matk* anggrek payus limondok (*Phaius tancarvilleae*) (dna barcode

- of payus limondok orchid (*Phaius tancarvilleae*) based on the *rbcl* and *matk* genes). *Jurnal Bios Logos*, 2(2).
- Kress, W. J., Prince, L. M., & Williams, K. J. (2002). The phylogeny and a new classification of the ginger (Zingiberaceae): Evidence from molecular data. *American Journal of Botany*, 89(10), 1682-1696.
- Kumar, R., Mahadani, P., Kishore, R., Meitei, A. L., & Singh, D. R. (2016). *DNA barcoding of Indian orchids*. New Delhi: ICAR-National Research Centre for Orchids.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knayz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Liu, H., Fang, C., Zhang, T., Guo, L., & Ye, Q. (2019). Molecular authentication and differentiation of *Dendrobium* species by rdna its region sequence analysis. *AMB Express*, 9(53), 1-9. doi: 10.1186/s13568-019-0767-8.
- Martins, A. C., Scherz, M. D., & Renner, S. S. (2014). Several origins of floral oil in the Angelonieae, a southern hemisphere disjunct clade of Plantaginaceae. *American Journal of Botany*, 101(12), 2113-2120. doi:10.3732/ajb.1400470.
- Nursanti, N., Wulan, C., & Anggunday, E. (2020). Eksplorasi anggrek di Hutan Adat Gunung Batuah Kecamatan Gunung Raya Kabupaten Kerinci Jambi. *Jurnal Silva Tropika*, 4(1), 280-291.
- Ochieng, J. W., Muigai, A. W. T., & Ude, G. N. (2007). Phylogenetics in plant biotechnology: Principles, obstacles and opportunities for the resource poor. *African Journal of Biotechnology*, 6(6), 239-249.
- Perwitasari, D. A. G., Rohimah, S., Ratnasari, T., Sugiharto, B., & Su'udi, M. (2020). DNA barcoding anggrek obat *Dendrobium discolor* lindl. tanimbar menggunakan gen *rbcl* dan *its2*. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, 31(1), 8-20.
- Ridley, H. N. (1909). The flora of the telom and batang Padang Valleys. *Journal of the Federated Malay States Museums*, 4, 65-66.
- Rinaldi, M. J., & Rita, R. R. N. D. (2020). Identifikasi jenis anggrek (*Orchidaceae*) di Kebun Raya Lemor Desa Suela Kecamatan Suela Kabupaten Lombok Timur. *Jurnal Silva Samalas*. 3 (11), 50-60.
- Rohimah, S., Ratnasari, T., & Su'udi, M. (2020). characteristics of dna barcodes from three *Thrixspermum* orchids based on ITS2 region. *Biosaintifika*, 12(3), 446-452. doi: 10.15294/biosaintifika.v12i3.23737.
- Smith, J. J. (1905). *Die orchideen von Java (vol 1)*. Leiden: EJ Brill.
- Su'udi, M., Budyartini, D. W., & Ramadany, Z. (2022). DNA barcoding anggre *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn. berdasarkan penanda molekuler ITS2. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 15(1).
- Srivastava, D., & Manjunath, K. (2020). DNA barcoding of endemic and endangered orchids of India: A molecular method of species identification. *Pharmacognosy Magazine*, 16(70), 290-298. doi: 10.4103/pm.pm_574_19.
- Takamiya, T., Wongsawad, P., Sathapattayanon, A., Tajima, N., Suzuki, S., Kitamura, S., ... Yukawa, T. (2014). Molecular phylogenetics and character evolution of morphologically diverse groups, *Dendrobium* section *Dendrobium* and allies. *AoB Plants*, 6, 1-25. doi: 10.1093/aobpla/plu045.
- Teoh, S. E. (2016). *Medicinal orchids of Asia*. Singapura: Springer Nature.
- Teoh, S. E. (2019). *Orchids as aphrodisiac, medicine or food*. Singapura: Springer Nature.
- Wahyudiningsih, T. S., Nion, Y. A., & Pahawang. (2017). Pemanfaatan anggrek spesies Kalimantan Tengah berbasis kearifan lokal yang berpotensi sebagai bahan obat herbal. *Jurnal Biodjati*, 2(2), 149-158. doi: 10.15575/biodjati.v2i2.1570.
- Wardani, M. T., Kusdityantini, E., & Budiharjo, A. (2017). Identifikasi isolat *Monascus* sp. hasil isolasi angkak berdasarkan gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dan pengukuran kandungan pigmen. *Jurnal Biologi*, 6(2), 34-40.

- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., ... Chen, S. (2010). Use of its2 region as the universal dna *barcodes* for plants and animals. *PloS ONE*, 5(10), 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0013102.
- Yip, P. Y., Chau, C. F., Mak, C. Y., & Kwan, H. S. (2007). DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chinese Medicine*, 2(9), 1-19. doi:10.1186/1749-8546-2-9.
- Zamani, M., & Chiu, D. K. Y. (2010). An evaluation of dna *barcoding* using genetic programming-based process. *Lecture Notes in Computer Science*, 6330, 298-306. doi: 10.1007/978-3-642-15615-1_36.