

Analisis Filogenetik *Tetrastigma* spp. in Silico

Phylogenetic Analysis of Tetrastigma spp. in Silico

Elpina Sari¹, Miftahul Jannah¹, Muhammad Rifqi Hariri²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam As Syafi'iyah, Kota Bekasi, Jawa Barat, Indonesia 17411

²Pusat Riset Biosistemika dan Evolusi - Badan Riset dan Inovasi Nasional, Cibinong, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16911

Article Info

Received : 25 Januari 2023
Accepted : 5 Agustus 2023
Available online : 9 September 2023

Keywords:

cpDNA; DNA barcoding; *nrDNA*;
Tetrastigma; Vitaceae

Abstrak (Bahasa Indonesia)

Tetrastigma is a liana from the Vitaceae family distinguished by the presence of tendrils that grow opposite the leaves. *Rafflesia*, a holoparasitic plant, can only be found in *Tetrastigma*. This study aims to investigate and analyze the phylogenetic relationship of *Tetrastigma* spp. using the *atp B-rbcL*, *rbcL*, and ITS sequences. The results revealed that the three trees were divided into two main clades: an ingroup clade of 12 *Tetrastigma* species and an outgroup clade with a high bootstrap value. Compared to the *atpB-rbcL* sequences, the *rbcL* and ITS trees produce trees with a wide range of bootstrap values among species. It is recommended that *rbcL*, ITS, or a combination of these sequences be used in species identification.

Abstract (Bahasa Inggris)

Tetrastigma is a liana from the Vitaceae family distinguished by the presence of tendrils that grow opposite the leaves. *Rafflesia*, a holoparasitic plant, can only be found in *Tetrastigma*. This study aims to investigate and analyze the phylogenetic relationship of *Tetrastigma* spp. using the *atpB-rbcL*, *rbcL*, and ITS sequences. The results revealed that the three trees were divided into two main clades: an ingroup clade of 12 *Tetrastigma* species and an outgroup clade with a high bootstrap value. Compared to the *atpB-rbcL* sequences, the *rbcL* and ITS trees produce trees with a wide range of bootstrap values among species. It is recommended that *rbcL*, ITS, or a combination of these sequences be used in species identification.

*Corresponding author:

Email address:

muhammadrifqihariri@gmail.com

How to cite: Sari, E., Jannah, M & Hariri, M.R. (2023). Analisis Filogenetik *Tetrastigma* spp. in Silico. *Indonesian Genetic and Biodiversity Journal*, 1(1): 1-6

PENDAHULUAN

Tetrastigma merupakan tumbuhan berperawakan liana dari suku Vitaceae yang dicirikan oleh adanya sulur yang tumbuh berhadapan dengan daun (Cahnyanto et al. 2019). Jenis-jenis *Tetrastigma* bermanfaat menjadi obat tradisional di Indonesia, Malaysia, Vietnam, Filipina, dan Cina. Selain itu, *Tetrastigma* juga dikenal sebagai satu-satunya inang bagi *Rafflesia*, yaitu tumbuhan holoparasit yang sangat tergantung pada inangnya (Chen et al. 2011). *Tetrastigma* sebagai tumbuhan inang dari *Rafflesia* sering kali tidak ikut dikoleksi sehingga keberadaan inang sering kali terabaikan. Sebagai tumbuhan holoparasit, kelestariannya sangat dipengaruhi oleh keberadaan inang sehingga usaha konservasi *Rafflesia* tanpa melibatkan *Tetrastigma* menjadi kurang optimal.

Penelitian mengenai *Tetrastigma* sebagai salah satu usaha konservasi agar potensinya dapat dimanfaatkan lebih optimal oleh masyarakat dengan cara pengelolaan yang lebih bijak dan berkelanjutan penting untuk dilakukan. Sebagai langkah awal program konservasi, kegiatan eksplorasi dan identifikasi merupakan ujung tombak utama. Eksplorasi adalah suatu kegiatan yang bertujuan mengumpulkan dan mengoleksi sumber keragaman genetik yang tersedia (Suryani & Owbel 2019). Identifikasi merupakan suatu kegiatan karakterisasi morfologi semua sifat yang dimiliki atau yang terdapat pada sumber keragaman gen sebagai data base sebelum memulai rencana pemuliaan tanaman (Ferita et al. 2015). Identifikasi berdasarkan karakter morfologi memiliki beberapa kelemahan misalnya dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Padahal identifikasi sangat penting dalam penentuan suatu jenis, terutama pada jenis yang memiliki peranan penting seperti berfungsi sebagai obat, ekowisata, atau yang lainnya (Song et al. 2009; Rohimah et al. 2018).

Salah satu alternatif identifikasi yang dapat digunakan adalah menggunakan marka molekuler dengan *DNA barcoding*. Identifikasi jenis berbasis DNA merupakan metode yang cepat dan konsisten sehingga dapat dipertanggungjawabkan (Irawan et al. 2016). Hal tersebut dikarenakan karakter DNA yang relatif lebih konstan dibandingkan karakter morfologi (Hidayat et al. 2008). Sekuen DNA yang diperoleh dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan dari suatu jenis dengan cara mengkonstruksi pohon filogenetik. Karakterisasi dan hubungan kekerabatan adalah bagian dari konservasi genetik sehingga dapat dijadikan dasar bagi penetapan kebijakan pengelolaan dan konservasi genetik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi beberapa sekuen jenis *Tetrastigma* dan menganalisis hubungan filogenetik *Tetrastigma* spp. menggunakan sekuen *atpB-rbcL*, *rbcL*, dan ITS yang tersedia di GeneBank NCBI.

METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas As-Syafi'iyah pada 8-31 Agustus 2022.

Ekstraksi Data Sekuen NCBI

Sekuen DNA dikoleksi dari GenBank NCBI (Sayers et al. 2019; Schoch et al. 2020) dengan cara menulis nama jenis disertai sekuen yang diinginkan (Contoh: *Tetrastigma beauvisii atpB-rbcL*/ITS/*rbcL*). Kemudian susunan sampel nukleotida disimpan ke dalam Notepad dalam bentuk atau format FASTA. Sekuen yang digunakan dalam penelitian ini adalah perwakilan dari DNA plastida dan inti, baik area koding maupun nonkoding yang terdiri dari *atpB-rbcL*, *rbcL*, dan ITS yang ditampilkan pada Tabel 1 (Kress et al. 2005; Cowan et al. 2006; Ali et al. 2014). Outgroup yang digunakan adalah *Vitis vinifera* dan *Vitis labrusca* yang merupakan anggota dari suku Vitaceae dan salah satu kerabat dekat *Tetrastigma* (Chen et al 2011).

Penyejajaran Sekuen DNA

Semua sekuen DNA yang telah dikoleksi dari NCBI disejajarkan. Penyejajaran sekuen DNA dilakukan dengan menggunakan ClustalW (Challa & Neelapu 2019) yang tersedia di aplikasi MEGA11. Hal ini bertujuan untuk mengetahui tingkat homologi antar jenis.

Analisis Data

Data sekuen DNA hasil penyejajaran digunakan untuk membuat pohon filogenetik menggunakan software MEGA 11 (Tamura et al. 2021). Pohon filogenetik dikonstruksi dengan metode *Neighbor-Joining* menggunakan parameter Kimura 2 dan *bootstrap* 1000 kali (Saitou & Nei 1987; Park et al. 2019; Mahadani et al. 2022; Supakitthanakorn et al. 2022).

Tabel 1. Data jenis dan nomor aksesori NCBI *Tetrastigma* spp. dan *Vitis* spp. untuk konstruksi pohon filogenetik

Jenis	Nomor Aksesori NCBI		
	<i>rbcL</i>	<i>atpB-rbcL</i>	ITS
<i>T. annamense</i>	-	-	MN852313.1
<i>T. beauvaisii</i>	KY766538.1	KY766313.1	-
<i>T. campylocarpum</i>	-	-	KF544880.1
<i>T. delavayi</i>	-	-	KX951354.1
<i>T. lanyuense</i>	-	-	KT344625.1
<i>T. muricatum</i>	-	-	KF544881.1
<i>T. obtectum</i>	-	-	KT344626.1
<i>T. pachyphyllum</i>	-	-	KR264877.1
<i>T. papillosum</i>	-	-	KT597184.1
<i>T. planicaule</i>	KY766576.1	KY766350.1	
<i>T. planicaule</i>	-	-	MW408528.1
<i>T. pseudocruciatum</i>	KY766577.1	KY766351.1	-
<i>T. pyriforme</i>	KY766578.1	KY766352.1	-
<i>T. rumicispermum</i>	KY766579.1	KY766353.1	-
<i>T. serrulatum</i>	KY766580.1	KY766354.1	-
<i>T. stenophyllum</i>	-	-	MT522959.1
<i>T. subtetragonum</i>	KY766584.1	KY766358.1	
<i>T. sulcatum</i>	-	-	KF544880.1
<i>T. thorsborneorum</i>	KY766585.1	KY766359.1	-
<i>T. tonkinense</i>	KY766586.1	KY766360.1	-
<i>T. triphyllum</i>	KY766587.1	KY766361.1	-
<i>T. tsaiianum</i>	KY766588.1	KY766362.1	-
<i>T. voinierianum</i>	KY766589.1	KY766363.1	KT597215.1
<i>V. labrusca</i> (outgroup)	KT006340.1	JX507360.1	KT344648.1
<i>V. vinifera</i> (outgroup)	KY593930.1	KT344208.1	KF544886.1

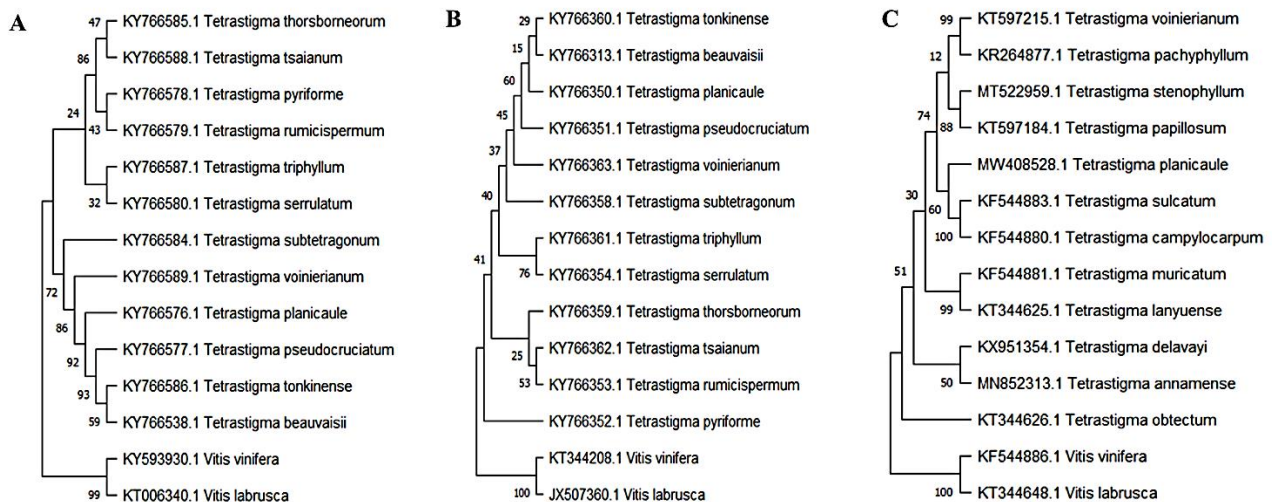
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelusuran jenis *Tetrastigma* secara acak pada GeneBank NCBI menunjukkan bahwa masih banyak sekuen DNA dengan lokus tertentu yang belum tersedia. Berdasarkan hasil penelusuran 12 jenis *Tetrastigma* yang dipilih secara acak, keseluruhan sekuen 12 jenis tersebut dengan menggunakan lokus ITS tidak ditemukan database-nya di GeneBank. Sehingga dalam penelitian ini jenis yang dianalisis dengan lokus ITS berbeda dengan jenis menggunakan lokus *rbcL* dan *atpB-rbcL*. Hal tersebut menunjukkan bahwa masih minimnya penelitian mengenai *Tetrastigma* karena masih banyak yang belum dilakukan sekuensing maupun pemberian akses terbuka jenis-jenis *Tetrastigma* tertentu. Hal ini dapat menjadi peluang bagi para peneliti untuk mencari sekuen dari jenis *Tetrastigma* untuk kemudian dapat digunakan sebagai data dalam analisis bioinformatika.

Terdapat 97 jenis *Tetrastigma* yang tersebar di daerah tropis maupun subtropis Asia dari dataran rendah sampai dengan pegunungan (Latiff 1983). Keterbatasan literatur mengenai *Tetrastigma* menunjukkan bahwa masih minimnya informasi ilmiah atau publikasi yang ada. Hal ini tentunya

perlu mendapatkan perhatian khusus sekaligus celah yang cukup luas bagi para peneliti untuk lebih giat dalam melakukan penelitian mengenai *Tetrastigma*.

Hasil konstruksi pohon filogenetik *Tetrastigma* berdasarkan sekuen ITS, *rbcL*, dan *atpB-rbcL* (Gambar 1) menunjukkan bahwa ketiga pohon terbagi menjadi 2 klad utama, yaitu klad 1 yang terdiri dari 12 jenis *Tetrastigma* dan klad 2 yang merupakan *outgroup* dengan nilai *bootstrap* berkisar antara 99-100. Pada konstruksi pohon filogenetik menggunakan sekuen ITS, jenis yang digunakan berbeda dengan jenis pada hasil konstruksi pohon filogeni dengan sekuen *rbcL* maupun *atpB-rbcL*, karena banyak data sekuen ITS *Tetrastigma* yang belum tersedia di Genbank. Chen et al. (2011) memaparkan analisis filogenetik pertama untuk *Tetrastigma* menggunakan area plastida yang terdiri dari *trnL-F*, *rps16*, *atpB-rbcL*, dan *psbA-trnH*. Hal ini semakin menguatkan bahwa penggunaan sekuen ITS masih belum banyak dimanfaatkan dalam analisis filogenetik pada *Tetrastigma*.



Gambar 1. Pohon filogeni *Tetrastigma* yang direkonstruksi berdasarkan sekuen *rbcL* (A), *atpB-rbcL* (B), dan ITS (C) dengan metode *Neighbor-Joining* dan parameter Kimura 2

Rentang nilai *bootstrap* pada ketiga pohon filogenetik yang telah dikonstruksi menunjukkan bahwa sekuen *atpB-rbcL* antar jenis *Tetrastigma* memiliki tingkat konservasi yang cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan sekuen koding *rbcL*. Rendahnya variasi genetik pada *Tetrastigma* berdasarkan sekuen *atpB-rbcL* juga terjadi pada populasi *Synedrella nodiflora* di Sumatra (Susanto et al. 2020). Sebaliknya, pada sekuen *rbcL*, terdapat rentang nilai *bootstrap* yang lebih tinggi meskipun sekuen ini dikenal dengan tingkat konservasi sekuennya. Namun, Ralte & Singh (2021) menunjukkan bahwa pada Solanaceae, sekuen *rbcL* dapat digunakan dalam determinasi jenis sehingga kecenderungan efektivitas setiap *region* DNA *barcode* bervariasi antar taksa (Kolter & Gemeinholzer 2021).

Jika dibandingkan dengan kedua region sebelumnya, ITS menunjukkan rentang nilai *bootstrap* lebih tinggi. Sekuen ITS dikenal memiliki kemampuan lebih baik dalam mendeterminasi jenis tumbuhan, seperti pada *Anoectochilus*, tebu, *Euphorbia*, maupun *Homalomena* (Rukmana et al. 2020; Тхинь et al. 2020; Alqahtani et al. 2021; Aprilianingsih et al. 2022). Oleh sebab itu, sekuen ITS cenderung lebih sering digunakan dalam identifikasi maupun determinasi jenis tumbuhan karena akurasi yang cukup tinggi (Devi et al. 2022). Pada *Tetrastigma*, penggunaan sekuen *rbcL* maupun ITS cukup baik dalam determinasi jenis, bahkan kombinasi keduanya juga dimungkinkan dapat menunjukkan hasil yang lebih maksimal. Namun, *universality* DNA *barcode* pada tumbuhan masih perlu dikembangkan dan dikaji lebih lanjut karena determinasi jenis berbasis lokus tunggal belum dapat dilakukan pada setiap taksa sehingga pada taksa tertentu (Shneyer & Rodionov 2019; Yu et al. 2021), kombinasi sekuen DNA barcoding perlu dilakukan agar hasil yang diperoleh lebih maksimal.

SIMPULAN

Tiga pohon filogenetik *Tetrastigma* berdasarkan sekuen ITS, *rbcL*, dan *atpB-rbcL*, menunjukkan bahwa setiap pohon terbagi menjadi klad *ingroup* dan *outgroup* dengan nilai *bootstrap* tinggi. Namun, nilai *bootstrap* antar jenis *Tetrastigma* pada pohon yang dikonstruksi dari sekuen *atpB-rbcL* cenderung lebih rendah dibandingkan sekuen ITS maupun *rbcL* sehingga disarankan untuk keperluan identifikasi jenis untuk menggunakan sekuen ITS atau *rbcL* maupun kombinasi kedua sekuen tersebut.

REFERENSI

- Ali, M.A., Gyulai, G., Hidvegi, N., Kerti, B., Al Hemaidd, F.M., Pandey, A.K. and Lee, J. 2014. The changing epitome of species identification-DNA barcoding. *Saudi journal of biological sciences*, 21(3), pp.204-231.
- Alqahtani, M.M., Ali, M.A., Rahman, M.O., Al Hemaidd, F.M., Kambhar, S.V. and Lee, J. 2021. Molecular authentication of *Euphorbia schimperiana* Scheele using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 28(1), pp.125-130.
- Aprilianingsih, R., Wahidah, B. F., & Hariri, M. R. 2022. DNA Barcode of *Homalomena pexa* inferred from Internal Transcribed Spacer Region. *Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya*, 4(2), 69-74.
- Cahyanto, T., Yuliawati, A., Adawiyah, N.F. and Fajar, D., 2019, December. Lianas diversity in Gambung area Gunung Tilu Nature Reserve. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1402, No. 3, p. 033056). IOP Publishing.
- Challa, S. and Neelapu, N.R.R. 2019. Phylogenetic trees: applications, construction, and assessment. *Essentials of Bioinformatics, Volume III: In Silico Life Sciences: Agriculture*, pp.167-192.
- Chen, P., Chen, L. and Wen, J., 2011. The first phylogenetic analysis of *Tetrastigma* (Miq.) Planch., the host of Rafflesiaceae. *Taxon*, 60(2), pp.499-512.
- Cowan, R.S., Chase, M.W., Kress, W.J. and Savolainen, V. 2006. 300,000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants. *Taxon*, 55(3), pp.611-616.
- Devi, M.L., Thorat, S.S., Devi, K.K., Sharma, K.C., Singh, Y.D., Mishra, A. and Das, S. 2022. Internal Transcribed Spacer (ITS) Region of Nuclear Ribosomal DNA as a Suitable DNA Barcode for Identification of *Zanthoxylum armatum* DC. from Manipur. *Molecular Biotechnology*, 64(12), pp.1454-1467.
- Ferita, I., Tawarati, T. and Syarif, Z. 2015, March. Identification and characterization of enau plant (*Arenga pinnata*) in Gayo Lues. In *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* (Vol. 1, No. 1, pp. 31-37).
- Hidayat, T., Kusumawaty, D., Yati, K.D.D., Muchtar, A.A. and Mariana, D. 2008. Analisis filogenetik molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) menggunakan urutan basa DNA daerah Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Matematika dan Sains*, 13(1).
- Irawan, P.D., Tallei, T.E. and Kolondam, B.J. 2016. Analisis sekuens dan filogenetik beberapa tumbuhan *Syzygium* (Myrtaceae) di Sulawesi Utara berdasarkan gen *matK*. *Jurnal Ilmiah Sains*, pp.43-50.
- Kolter, A. and Gemeinholzer, B. 2021. Plant DNA barcoding necessitates marker-specific efforts to establish more comprehensive reference databases. *Genome*, 64(3), pp.265-298.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. and Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), pp.8369-8374.
- Latiff, A. 1983. *Studies in Malesian Vitaceae VII: The Genus Tetrastigma in the Malay Peninsula*. US Government Printing Office.
- Mahadani, A.K., Awasthi, S., Sanyal, G., Bhattacharjee, P. and Pippal, S. 2022. Indel-K2P: a modified Kimura 2 Parameters (K2P) model to incorporate insertion and deletion (Indel) information in phylogenetic analysis. *Cyber-Physical Systems*, 8(1), pp.32-44.

- Park, J., Kim, Y. and Kwon, M. 2019. The complete mitochondrial genome of tulip tree, *Liriodendron tulipifera* L. (Magnoliaceae): intra-species variations on mitochondrial genome. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(1), pp.1308-1309.
- Ralte, L. and Singh, Y.T. 2021. Use of *rbcL* and ITS2 for DNA barcoding and identification of Solanaceae plants in hilly state of Mizoram, India. *Research on Crops*, 22(3), pp.616-623.
- Rohimah, S., Mukarramah, L., Sindiya, V., Veren Yuliana, S., Gita Ayu, K. and Su'udi, M. 2018. Eksplorasi Jenis dan Potensi DNA Barcode Anggrek *Thrixspermum* Secara In Silico. *Jurnal Biodjati*, 3(2), pp.148-156.
- Rukmana, S., Ansori, A.N., Kusala, M.K., Utami, U., Wahyudi, D. and Mandasari, A.A. 2020. Molecular identification of trichoderma isolates from sugarcane bagasse based on internal transcribed spacer (ITS) rDNA. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(7), pp.3300-3304.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), pp.406-425.
- Sayers, E.W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K.D. and Karsch-Mizrachi, I. 2019. GenBank. *Nucleic acids research*, 47(Database issue), p.D94.
- Schoch, C.L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B. and Sharma, S. 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020.
- Shneyer, V.S. and Rodionov, A.V. 2019. Plant DNA barcodes. *Biology Bulletin Reviews*, 9(4), pp.295-300.
- Song, X.Q., Meng, Q.W., Wing, Y.T. and Luo, Y.B. 2009, December. *Thrixspermum odoratum* (Orchidaceae), a new species from Hainan Island, China. In *Annales Botanici Fennici* (Vol. 46, No. 6, pp. 595-598). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Supakitthanakorn, S., Vichitrangoontavorn, K., Kunasakdakul, K. and Ruangwong, O.U. 2022. Phylogenetic analysis and molecular characterization of chrysanthemum chlorotic mottle viroid and chrysanthemum stunt viroid from *Chrysanthemum* in Thailand. *Journal of Phytopathology*, 170(10), pp.700-710.
- Suryani, R. and Owbel, O. 2019. Pentingnya Eksplorasi dan Karakterisasi Tanaman Pisang sehingga Sumber Daya Genetik Tetap Terjaga. *Agro Bali: Agricultural Journal*, 2(2), pp.64-76.
- Susanto, A.H., Nuryanto, A. and Daryono, B.S. 2020, November. *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn Populations in Sumatra Island Showed Low Genetic Differences: A study based on the intergenic spacer *atpB-rbcL*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 593, No. 1, p. 012035). IOP Publishing.
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), pp.3022-3027.
- ТХИНЬ, Б.Б., Чак, Л.Д. and Тху, Л.Т.М. 2020. Application of internal transcribed spacer (ITS) sequences for identifying *Anoectochilus setaceus* Blume in Thanh Hoa, Vietnam. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*, 181(2), pp.108-116.
- Yu, J., Wu, X., Liu, C., Newmaster, S., Ragupathy, S. and Kress, W.J. 2021. Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, p.111691.