

Kajian Biologi Sistematika Molekuler untuk Masa Depan yang Lebih Baik

Topik Hidayat¹

¹Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung, Indonesia.

*Corresponding author: topikhidayat@upi.edu

ABSTRAK

Salah satu isu terkait status atau posisi keanekaragaman hayati Indonesia adalah hilangnya keanekaragaman spesies. Faktor utama penyebabnya adalah eksploitasi yang dilakukan secara besar-besaran oleh manusia yang menimbulkan rusaknya habitat dan berubahnya fungsi lahan. Isu ini telah membuat para ilmuwan biologi terkejut dan ingin segera memperbaikinya untuk menyelamatkan keanekaragaman di bumi. Salah satu cara yang paling mendasar yaitu mempelajari Biologi Sistematika (Biosistematika). Keberhasilan konservasi dan pemanfaatan keanekaragaman hayati secara berkesinambungan tidak akan terlepas dari peran serta biosistematika. Seiring dengan kemajuan pesat biologi molekuler, data DNA (DNA barcode) saat ini telah digunakan dalam banyak penelitian biosistematika untuk menghasilkan informasi yang lebih akurat. Hasil kegiatan analisis filogenetika molekuler di laboratorium (in vitro dan in silico) juga ternyata dapat "dibawa" ke dalam pembelajaran di kelas. Penerapan klasifikasi numerik (fenetika dan kladistika/filogenetika) dalam pembelajaran dan penugasan dapat menggairahkan belajar mereka tentang keanekaragaman, biosistematika, dan evolusi di kelas. Kita mendidik para generasi penerus bangsa yang kelak akan menjaga dan mengelola keanekaragaman hayati secara berkelanjutan.

Kata Kunci: filogenetika molekuler, keanekaragaman hayati, kode batang DNA, taksonomi numerik.

Pendahuluan

Walaupun hanya menempati 1,3% dari permukaan tanah dunia, Indonesia adalah salah satu negara terkaya di dunia dalam hal keanekaragaman hayati. Indonesia memiliki sekitar 17.000 pulau di mana terdapat ekosistem unik yang mengandung sejumlah besar spesies yang beragam. Menurut *Conservation International* (2018), Indonesia adalah salah satu dari 17 negara yang berjudulan "Megabiodiversity", 2 dari 25 hotspot keanekaragaman hayati dunia, salah satu dari 18 ekoregion "Global 200" World Wildlife Fund, dan salah satu dari 24 area burung endemik dunia.

Selanjutnya *Conservation International* (2018) melaporkan bahwa Indonesia memiliki sekitar 12% mamalia dunia (515 spesies), menempatkannya di urutan kedua setelah Brasil. Sekitar 16% dari reptil dunia (781 spesies) dan 35 spesies primata menjadikan Indonesia berada di peringkat keempat dunia. Selain itu, 17% dari total spesies burung (1.592 spesies) dan 270 spesies amfibi menempatkan Indonesia masing-masing di peringkat kelima dan keenam dunia.

Untuk keanekaragaman tumbuhan, Indonesia memiliki 10% spesies tumbuhan berbunga dunia (kurang lebih 35.000 spesies tumbuhan) dan berperingkat sebagai salah satu pusat keanekaragaman hayati agro dunia yang berupa kultivar tanaman. Terlepas dari tingkat kekayaan spesies tumbuhan yang tinggi ini, nilai penting lain dari keanekaragaman hayati Indonesia adalah bahwa banyak spesies yang ada bersifat endemik. Spesies endemik

adalah spesies yang hanya ditemukan di wilayah itu dan tidak di tempat lain di dunia (*Conservation International*, 2018).

Salah satu isu terkait status atau posisi keanekaragaman hayati Indonesia yang besar itu adalah hilangnya keanekaragaman spesies. Diperkirakan rata-rata sekitar 100.000 spesies telah punah setiap tahunnya, bahkan dalam kurun waktu dua setengah abad yang akan datang sebanyak 25% kehidupan akan hilang dari permukaan bumi ini (Claridge, 1995). Faktor utama penyebabnya adalah eksploitasi yang dilakukan secara besar-besaran oleh manusia yang menimbulkan rusaknya habitat dan berubahnya fungsi lahan.

Isu di atas telah membuat para ilmuwan biologi terkejut dan ingin segera memperbaikinya untuk menyelamatkan keanekaragaman di bumi. Salah satu cara yang paling mendasar yaitu mempelajari Biologi Sistematika (Biosistematika). Dengan melakukan kajian biosistematika kita akan memahami bagaimana mengenal, menggolongkan maupun memahami kekerabatan suatu spesies. Dengan biosistematika kita akan paham tentang keanekaragaman hayati terutama dalam hal identifikasi dan monitoring ragam hayati yang masih tersisa di bumi ini. Keberhasilan konservasi dan pemanfaatan keanekaragaman hayati secara berkesinambungan tidak akan terlepas dari peran serta biosistematika.

Seiring dengan kemajuan pesat biologi molekuler, data DNA saat ini telah digunakan dalam banyak penelitian biosistematika untuk menghasilkan informasi yang lebih akurat. Beberapa aplikasi dari kajian biosistematika molekuler ini diantaranya adalah berkembangnya sistem klasifikasi modern (klasifikasi filogenetika) yang akan mendampingi sistem klasifikasi tradisional, penyedia informasi dasar untuk perbaikan mutu sumber genetika tumbuhan dan penemuan tumbuhan obat baru, serta pengembangan teknik-teknik untuk mengidentifikasi kelompok tumbuhan dengan cepat menggunakan kode batang DNA (*DNA Barcode*). Lebih jauh, identifikasi cepat ini dibutuhkan untuk memberi nama dalam rangka menginventarisasi data kekayaan spesies tumbuhan kita. Selain itu, kode batang DNA ini dapat digunakan untuk menjaga keberadaan spesies tumbuhan asli di muka bumi Indonesia.

Biosistematika dan Filogenetika

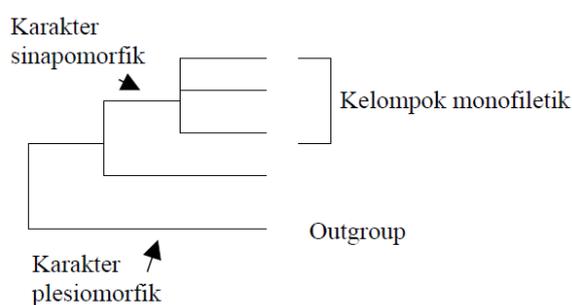
Biosistematika memiliki peran utama di dalam Biologi dalam menyediakan sebuah perangkat pengetahuan untuk mengkarakterisasi organisme dan sekaligus merekognisinya dalam rangka memahami keanekaragaman. Secara fundamental, biosistematika bertujuan untuk memahami dan mendeskripsikan keanekaragaman suatu organisme dan merekonstruksi hubungan kekerabatannya terhadap organisme lainnya, dan juga mendokumentasikan perubahan-perubahan yang terjadi selama evolusinya dan mengubahnya ke dalam sebuah sistem klasifikasi yang mencerminkan evolusinya tersebut. Oleh karena itu, salah satu tugas yang penting dari biosistematika adalah merekonstruksi hubungan evolusi dari kelompok-kelompok organisme biologi (*natural history*). Sebuah hubungan evolusi yang direkonstruksi dengan baik dapat digunakan sebagai landasan untuk melakukan penelitian-penelitian komparatif (*comparative investigations*) misalnya dalam bidang ekologi dan biogeografi, dan penelitian terapan misalnya untuk mencari obat baru.

Terdapat dua pendekatan di dalam biosistematika, yaitu fenetika dan kladistika. Pendekatan yang pertama menaksir hubungan berdasarkan kepemilikan karakter atau ciri

yang sama (*overall similarity*) dari anggota-anggota suatu kelompok, sedangkan pendekatan kedua mendasari sebuah hubungan pada perjalanan evolusi karakter atau ciri dari setiap anggota suatu kelompok yang sedang dipelajari. Kladistika sering disebut atau ditulis di dalam literatur ilmiah sebagai filogenetika dan merupakan pendekatan yang umum digunakan dalam banyak penelitian biosistemika.

Dalam filogenetika, sebuah kelompok organisme yang anggota-anggotanya memiliki banyak kesamaan karakter atau ciri dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang. Nenek moyang dan semua turunannya akan membentuk sebuah kelompok monofiletik. Oleh karena itu, anggota-anggota dalam kelompok monofiletik ini diasumsikan membawa sifat, pola genetik dan biokimia yang sama (Hidayat, 2005; Hidayat dan Pancoro, 2008).

Dalam analisis filogenetika kelompok outgroup sangat dibutuhkan dan menyebabkan polarisasi karakter atau ciri, yaitu karakter apomorfik dan plesiomorfik. Karakter apomorfik adalah karakter yang berubah dan diturunkan yang terdapat pada ingroup, sedangkan karakter plesiomorfik merupakan karakter primitif yang terdapat pada outgroup. Karakter sinapomorfik adalah karakter yang diturunkan dan terdapat pada kelompok monofiletik (Gambar 1).



Gambar 1. Pohon kekerabatan dan polarisasi karakter dalam analisis filogenetika

Mengapa DNA?

Karakter morfologi telah lama digunakan dalam banyak penelitian filogenetika. Dengan pesatnya perkembangan teknik-teknik di dalam biologi molekuler, seperti PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan sekuensing DNA, penggunaan sekuens DNA dalam penelitian filogenetika telah meningkat pesat dan telah dilakukan pada semua tingkatan taksonomi, misalnya famili, marga, dan species. Filogenetika molekuler mengkombinasikan teknik biologi molekuler dengan statistik untuk merekonstruksi hubungan filogenetika.

Pemikiran dasar penggunaan sekuens DNA dalam studi filogenetika adalah bahwa terjadi perubahan basa nukleotida menurut waktu, sehingga akan dapat diperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi dan akan dapat direkonstruksi hubungan evolusi antara satu kelompok organisme dengan yang lainnya. Beberapa alasan mengapa digunakan sekuens DNA (Hillis *et al.*, 1996): (1) DNA merupakan unit dasar informasi yang mengkode organisme; (2) relatif lebih mudah untuk mengekstrak dan menggabungkan informasi mengenai proses evolusi suatu kelompok organisme, sehingga mudah untuk dianalisis; (3) peristiwa evolusi secara komparatif mudah untuk dibuat model; dan (4) menghasilkan informasi yang banyak

dan beragam, dengan demikian akan ada banyak bukti tentang kebenaran suatu hubungan filogenetika.

Sikuen DNA telah menarik perhatian para praktisi taksonomi dunia untuk dijadikan karakter dalam penelitian filogenetika karena beberapa fakta. Pertama, sikuen DNA menawarkan data yang akurat melalui pengujian homologi yang lebih baik terhadap karakter-karakter yang ada (Baldwin *et al.*, 1995). Kedua, sikuen DNA menyediakan banyak character states karena perbedaan laju perubahan basa-basa nukleotida di dalam lokus yang berbeda adalah besar (Moritz & Hillis, 1996). Dan ketiga, sikuen DNA telah terbukti menghasilkan sebuah hubungan kekerabatan yang lebih alami (natural) (misalnya, Chase *et al.*, 1993; Hidayat, 2005).

Sumber karakter DNA dapat diperoleh dari inti (nDNA), kloroplas (cpDNA), dan mitokondria (mtDNA). **Tabel 1** memuat beberapa sistem gen dan/atau genom yang telah digunakan dalam penelitian filogenetika molekuler.

Tabel 1. Beberapa sistem gen dan/atau genom dalam studi filogenetik molekuler

Gen dan/atau genom	Metode
DNA kloroplas	Analisis restriksi
Gen <i>rbcL</i> dari DNA kloroplas	Analisis sikuen DNA
Gen <i>matK</i> dari DNA kloroplas	Analisis sikuen DNA
DNA mitokondria	Analisis sikuen DNA
Gen RNA inti	Analisis sikuen DNA
Daerah ITS dari nrDNA	Analisis sikuen DNA
Kelompok gen repetitive:	
- Knob heterokromatin	Analisis sikuen DNA Analisis sikuen DNA
- Gen CAB	Analisis sikuen DNA
- Gen <i>rbcS</i>	
Gen kopi tunggal	Analisis sikuen DNA

Analisis filogenetika molekuler merupakan proses bertahap untuk mengolah data sikuen DNA atau protein sehingga diperoleh suatu hasil yang menggambarkan estimasi mengenai hubungan evolusi suatu kelompok organisme. Menurut Hershkovitz & Leipe (1998) ada sejumlah asumsi yang harus diperhatikan sebelum menggunakan data sikuen DNA atau protein dalam analisis filogenetika, diantaranya yaitu (1) sikuen berasal dari sumber yang spesifik, apakah dari inti, kloroplas atau mitokondria; (2) sikuen bersifat homolog (diturunkan dari satu nenek moyang); (3) sikuen memiliki sejarah evolusi yang sama (misalnya bukan dari campuran DNA inti dan mitokondria); dan (4) setiap sikuen berkembang secara bebas.

Paling sedikit ada tiga tahap penting dalam analisis filogenetika molekuler, yaitu sequence alignment, rekonstruksi pohon filogenetika, dan evaluasi pohon filogenetika dengan uji statistik. Untuk merekonstruksi pohon filogenetika, saat ini telah tersedia beraneka ragam program komputer, sebut saja misalnya MEGA, Phyllip, PAUP dan MrBayes.

Klasifikasi Modern (Klasifikasi Filogenetika)

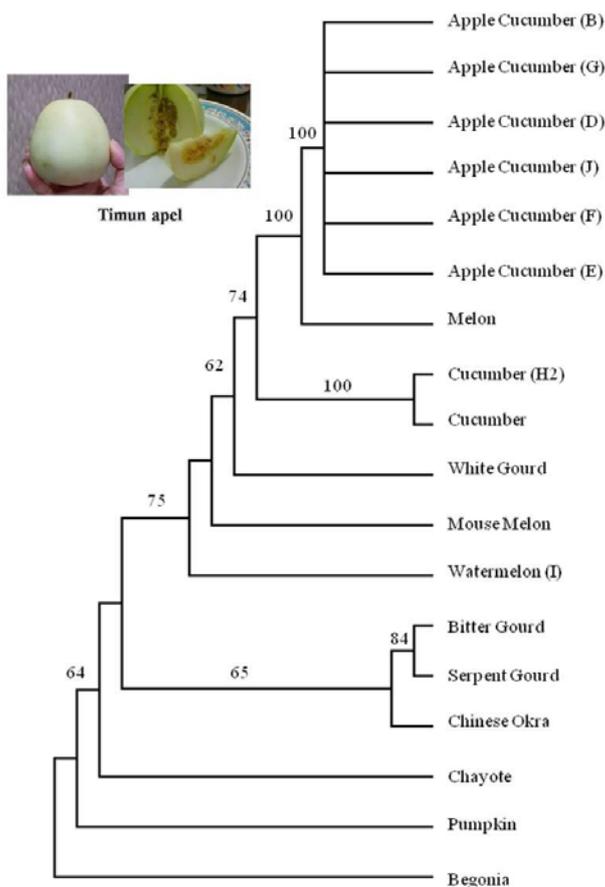
Salah satu aplikasi dari analisis filogenetika molekuler adalah berkembangnya sistem klasifikasi filogenetika. Sistem klasifikasi tradisional semata-mata menitikberatkan hanya pada karakter morfologi. Anggota-anggota yang memiliki kesamaan morfologi (analisis

fenetika) akan dikelompokkan ke dalam kelompok yang sama, tanpa melihat jalur evolusinya (hubungan filogenetiknya). Akibatnya berkembanglah berbagai macam sistem klasifikasi untuk satu kelompok tumbuhan. Peneliti yang berbeda akan menghasilkan sistem klasifikasi yang berbeda (pada masa yang berbeda), karena dasar yang digunakan berbeda.

Dengan menggunakan pendekatan filogenetika molekuler, "perbedaan" ini dapat diminimalkan (Stevens, 2001; Hidayat dan Pancoro, 2001; Hidayat *et al.*, 2005; Hidayat *et al.*, 2008; Hidayat *et al.*, 2012; Hidayat *et al.*, 2013; Hidayat *et al.*, 2016). Untuk itu, proses kerja taksonominya harus diubah. Kalau biasanya kegiatan diawali dengan identifikasi karakter morfologi, maka kini kegiatan harus diawali dengan analisis filogenetika molekuler, setelah itu baru dilakukan konfirmasi morfologinya. Seperti yang sudah disampaikan sebelumnya bahwa hanya kelompok yang monofiletik yang diakui dalam sistem klasifikasi modern (klasifikasi filogenetika).

Sebagai contoh, kelompok anggrek monopodial subtribe Aeriinae merupakan kelompok anggrek yang sangat kompleks taksonominya karena karakter morfologi dari anggota-anggotanya yang sangat beranekaragam. Sudah barang tentu merupakan pekerjaan yang sangat sulit untuk mengembangkan sebuah sistem klasifikasi berdasarkan karakter morfologi. Pernah ada sistem klasifikasi tradisional subtribe Aeriinae menggunakan data morfologi (Dressler, 1993), tetapi belum memuaskan semua pihak terutama bagi mereka para ahli sistematika yang bekerja dengan anggrek. Analisis filogenetika molekuler terhadap kelompok anggrek ini menggunakan data DNA yang berasal dari inti sel dan kloroplas (Hidayat *et al.*, 2005, 2012) membawa angin segar bagi sistem klasifikasi subtribe Aeriinae.

Contoh lainnya yaitu ketika analisis filogenetika molekuler dapat memberikan jawaban terhadap identitas atau status taksonomi tanaman timun apel (familia Cucurbitaceae) (Hidayat *et al.*, 2020; *In Press*). Cucurbitaceae adalah salah satu keluarga terbesar di tanaman berbunga (Magnoliophyta) di mana kebanyakan anggotanya adalah tanaman buah-buahan penting di Indonesia seperti Mentimun, Melon, Semangka, dan Timun apel. Secara khusus, timun apel, yang merupakan hibrida alami antara mentimun dan melon, saat ini menarik perhatian banyak peneliti karena masalah filogenetika dan taksonomi. Penampilan buahnya terlihat seperti apel tetapi rasanya melon. Dan ini membuat banyak orang bingung. Analisis filogenetika menggunakan urutan DNA daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) mengungkapkan bahwa timun apel berkerabat dekat dengan melon (*Cucumis melo*) (**Gambar 2**). Hasil ini menunjukkan bahwa timun apel berada dalam spesies yang sama dengan melon. Namun, karena berdasarkan karakter morfologi buah, timun apel berbeda dengan melon, maka kemungkinan timun apel merupakan subspecies Melon.



Gambar 2. Pohon filogenetik timun apel (*Apple Cucumber*)

Perbaikan mutu sumber genetica tanaman

Khusus bagi negara berkembang seperti Indonesia sektor pertanian merupakan tulang punggung yang menyokong kehidupan bangsa dengan segala aspek-aspeknya. Salah satu bidang pertanian yang saat ini sedang mengalami pertumbuhan dan perkembangan yang sangat pesat adalah hortikultura terutama budidaya tanaman hias (*ornamental plant*). Tidak diragukan lagi, tanaman anggrek merupakan salah satu primadona dalam bidang ini. Pembudidayaan tanaman anggrek biasanya dilakukan oleh para pelaku hortikultura melalui kawin silang antar jenis anggrek (hibridisasi) dalam rangka meningkatkan kualitas anggrek yang baru dihasilkan untuk memenuhi kebutuhan dan selera pasar (*market pull*). Namun demikian, seringkali para pelaku hortikultura menemui kendala bahwa anggrek baru yang dihasilkan sangat sensitif terhadap perubahan lingkungan dan tidak berumur panjang meskipun memiliki sifat-sifat vegetatif lain yang unggul (Frowine, 2005). Bahkan pada beberapa kasus, dua jenis anggrek tidak bisa dihibridisasi. Para petani atau pelaku hortikultura yang lain tidak menyadari bahwa hal ini mungkin karena adanya ketidakcocokan dalam hal genetik (*genetic incompatibility*) dan evolusi dari kedua tanaman anggrek tersebut. Untuk itu perlu diupayakan adanya informasi awal mengenai hubungan genetik dan/atau evolusi dari tanaman-tanaman yang akan dihibridisasi.

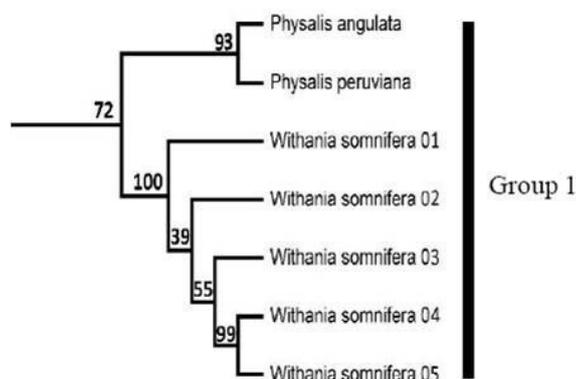
Karena dalam hibridisasi terjadi penggabungan dua atau lebih sifat dari jenis tanaman yang berbeda, maka prasyaratnya adalah tanaman-tanaman tersebut harus memiliki pola

genetik yang sama, sehingga memiliki kecenderungan untuk menjalani jalur evolusi yang sama. Dengan kata lain bahwa tanaman-tanaman yang akan dihibridisasi harus memiliki hubungan evolusi atau kekerabatan (filogenetika) yang satu sama lain dekat. Dalam konteks filogenetika, tanaman-tanaman ini harus memiliki hubungan monofiletik, yaitu berasal dari satu nenek moyang yang sama. Sebaliknya, jika hubungan kekerabatan tanaman-tanaman yang akan dihibridisasi adalah non-monofiletik maka yang timbul adalah, salah satunya, reaksi penolakan karena tidak ada kecocokan genetik seperti yang sering terjadi dalam banyak kegiatan hibridisasi.

Analisis filogenetika molekuler terhadap anggrek subtribe Aeridinae dengan menggunakan sikuen DNA dari inti dan kloroplast menghasilkan beberapa kelompok monofiletik, yang disebut dengan istilah klad (Hidayat et al., 2005). Hasil riset ini merekomendasi hibridisasi dapat dilakukan antar jenis di dalam klad yang sama, misalnya pada klad *Aerides* (Tabel 2). Pada klad ini terdapat beberapa spesies dari genus *Aerides*, *Vanda*, *Ascocentrum*, *Trudelia*, *Christensonia*, *Paraphalaenopsis*, *Rhyncostilis*, *Seidenfadenia*, *Holcoglossum*, dan *Neofinetia*, yang satu sama lain dapat dihibridisasi. Di pasar tanaman anggrek hias, banyak sekali hibrid-hibrid yang diperoleh dari hibridisasi antar genus (intergeneric) atau antar jenis dalam satu genus (infrageneric) dalam klad ini, misalnya yang paling populer adalah *Aerides*, *Vanda*, dan *Rhyncostilis*. Persilangan dengan anggrek liar dalam klad ini seperti *Christensonia*, *Seidenfadenia*, dan *Paraphalaenopsis* telah menambah sekaligus khasanah plasma nutfah anggrek Aeridinae (Hidayat, 2005).

Pencarian tanaman obat (kanker) baru

Ashwaganda (*Withania somnifera*), yang termasuk ke dalam suku Solanaceae, merupakan tanaman obat yang hanya dapat tumbuh subur di Asia Selatan seperti di India, Bangladesh, dan Pakistan. Penelitian terakhir melaporkan bahwa senyawa Ashwaganda, dengan Withanone-nya, mampu membunuh sel-sel kanker. Dengan menggunakan pendekatan filogenetika molekuler, telah diuji hubungan kekerabatan antara Ashwaganda dengan tumbuhan kerabatnya yang ada di Indonesia (Hidayat et al., 2016; **Gambar 3**). Pohon filogenetika menunjukkan bahwa Ciplukan (*Physalis angulata*) berkerabat dekat dengan *W. somnifera*. Dengan demikian Ciplukan memiliki potensi antikanker. Hasil uji *in vitro* menggunakan sel kanker (Hidayat et al., draft paper) dan *in silico* (*molecular docking*) (Hidayat et al., draft paper) menunjukkan ekstrak daun Ciplukan memiliki sifat anti kanker seperti yang dimiliki Ashwaganda.



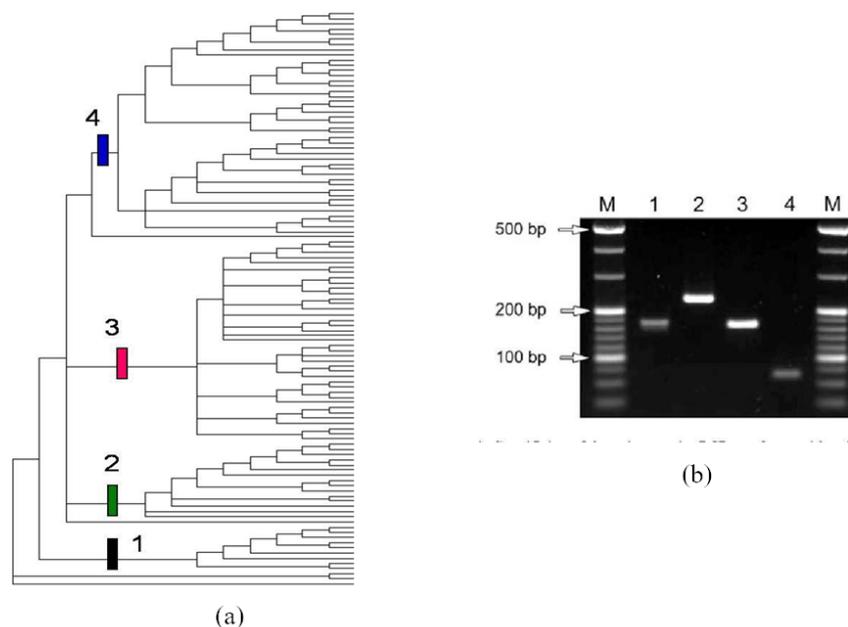
Gambar 3. Hubungan evolusi antara Ciplukan dengan Ashwaganda.

Tabel 2 Contoh anggrek hibrid intergenerik dan infragenerik dalam klad *Aerides*

Nama Hibrid	Simbol	Genus yang dihibridisasi
Aeridovanda	Aerdv	<i>Aerides</i> x <i>Vanda</i>
Ascocenda	Asco	<i>Ascocentrum</i> x <i>Vanda</i>
Christieara	Chtra	<i>Aerides</i> x <i>Ascocentrum</i> x <i>Vanda</i>
Darwinara	Dar	<i>Ascocentrum</i> x <i>Neofinetia</i> x <i>Rhyncostylis</i> x <i>Vanda</i>
Micholitzara	Mchza	<i>Aerides</i> x <i>Ascocentrum</i> x <i>Neofinetia</i> x <i>Vanda</i>
Nakamotoara	Nak	<i>Ascocentrum</i> x <i>Neofinetia</i> x <i>Vanda</i>
Perreiraara	Prra	<i>Aerides</i> x <i>Rhyncostylis</i> x <i>Vanda</i>
Rhynchovanda	Rhv	<i>Rhyncostylis</i> x <i>Vanda</i>
Ronnyara	Rnya	<i>Aerides</i> x <i>Ascocentrum</i> x <i>Rhyncostylis</i> x <i>Vanda</i>
Sanjumeara	Sjma	<i>Aerides</i> x <i>Neofinetia</i> x <i>Rhyncostylis</i> x <i>Vanda</i>
Vanda	V	<i>Vanda</i> x <i>Vanda</i>
Vandaerantes	Vths	<i>Aerides</i> x <i>Vanda</i>
Vandofinetia	Vf	<i>Neofinetia</i> x <i>Vanda</i>
Vandofinides	Vfds	<i>Aerides</i> x <i>Neofinetia</i> x <i>Vanda</i>
Vascostylis	Vasco	<i>Ascocentrum</i> x <i>Rhyncostylis</i> x <i>Vanda</i>
Viraphandhuara	Vpda	<i>Aerides</i> x <i>Ascocentrum</i> x <i>Neofinetia</i> x <i>Vanda</i>
Yonezawaara	Yzwr	<i>Neofinetia</i> x <i>Rhyncostylis</i> x <i>Vanda</i>

Mini Kode batang DNA (Mini DNA barcode)

Mini kode batang DNA adalah urutan DNA pendek (kurang dari 500 pb) yang unik untuk identifikasi cepat nama jenis suatu organisme. Berbeda dari hewan, kode batang DNA untuk tumbuhan masih dalam pencarian. Tumbuhan memiliki tiga genom di dalam selnya yaitu inti, mitokondria dan kloroplas. Suatu daerah di dalam genom inti yang dikenal sebagai *Internal Transcribed Spacer (ITS)* merupakan salah satu kandidat kode batang DNA yang baik untuk tumbuhan, seperti anggrek (Hidayat, 2005; **Gambar 4**). Selain itu, gen maturase-K (dalam DNA kloroplas) merupakan kandidat kode batang DNA lain pada tumbuhan, misalnya pada tanaman mangga (Hidayat *et al.*, 2011; **Gambar 6**).



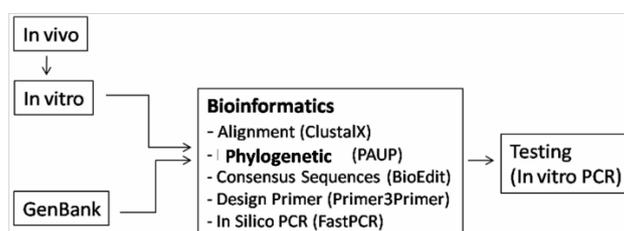
Gambar 4. Identifikasi berbasis mini kode batang DNA melalui teknik amplifikasi. (a) pohon filogenetika dan (b) hasil amplifikasi barcode (Hidayat *et al.* 2018, *Unpublished manuscript*).

Berdasarkan **gambar 4** di atas, klad (1 sd 4) yang dihasilkan dari analisis filogenetika molekuler dibuat konsensus sikuens nya sehingga dengan mudah dapat dirancang sepasang primer untuk setiap klad. Melalui proses amplifikasi (PCR) sepasang primer ini akan bertindak sebagai "pendiagnosis" tumbuhan yang belum diketahui identitasnya melalui kemunculan pita DNA selama proses elektroforesis.

Teknik analisis mini kode batang DNA ini melibatkan tahap dimana kita harus menentukan lokasi sikuens konsensus DNA yang tepat untuk menjadi sebuah DNA *barcode*, melalui sebuah pencarian motif tertentu. Setelah lokasinya atau motifnya diketahui, maka langkah selanjutnya adalah merancang primer menggunakan program komputer Primer3primer dan FastPCR, dan akan dihasilkan banyak kandidat primer. Semua kandidat primer diuji kemampuannya melalui *in silico* PCR menggunakan program FastPCR. Langkah lengkap dapat dilihat pada **Gambar 5**.

Menggunakan cara yang sama, sepasang primer "pendiagnosis" dapat dirancang untuk membedakan asal geografi suatu tumbuhan (**Gambar 6**). Spesimen mangga yang berasal dari Thailand memisahkan diri dari spesimen mangga Indonesia, dan membentuk kelompok monofiletik. Sepasang primer telah disintesis untuk kedua negara tersebut. Sehingga, dengan menggunakan sepasang primer tersebut setiap negara bisa melindungi mangga nya masing-masing.

Contoh lainnya (yang terkini) adalah teknik analisis kode batang DNA ini juga telah diterapkan pada tanaman buah timun apel (Hidayat *et al.*, 2020) menghasilkan kandidat primer (**Tabel 3**). Hasil ujicoba kemampuan kandidat primer tersebut tersaji di **Tabel 4**.

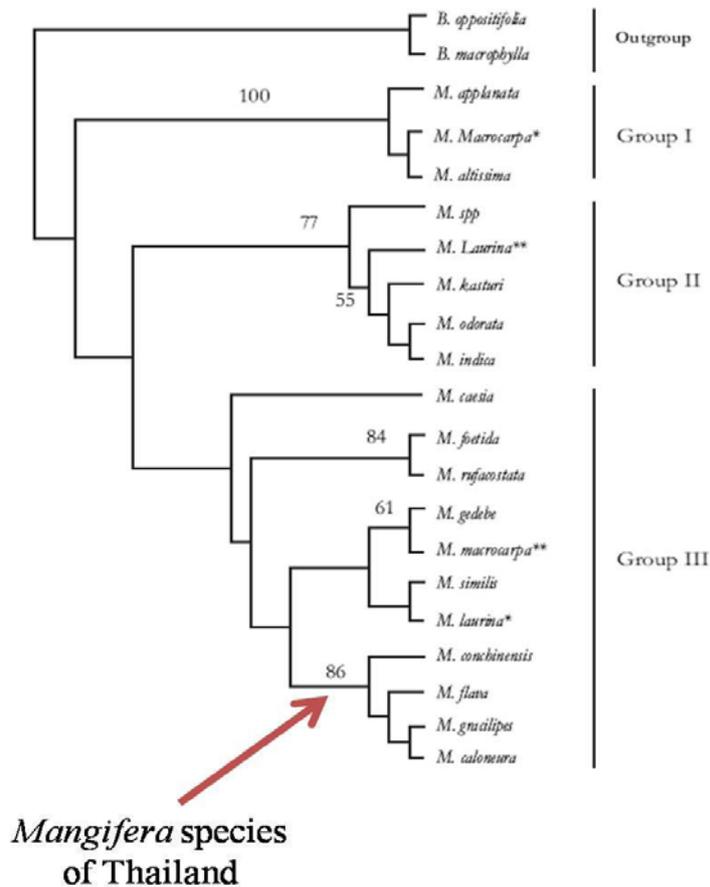


Gambar 5. Langkah-langkah untuk analisis mini kode batang DNA (identifikasi *in silico*)

Tabel 3. Kandidat primer untuk timun apel

No	Nama Primer	Sequence (5' ke 3')
1	DELTOP 1	Forward: CGTAGCCGAAATGCGATACTT Reverse: TTGAATCAACCACCGTAGTGTC
2	DELTOP 2	Forward: CATGGAGCATTCTAGTCGTATTACT Reverse: TTGAATCAACCACCGTAGTGTC
3	DELTOP 3	Forward: GGCATGGAGCATTCTAGTCGT Reverse: CTTGCGTTCAAAAGACTCGGT
4	DELTOP 4	Forward: ACTTGAAATGAATTTCGCCTGTCC Reverse: TTGAATCAACCACCGTAGTGTC
5	DELTOP 5	Forward: CCCTTCCAACGCGTTTAAACAA Reverse: ACCAAGTATCGCATTTCGGCTA
6	DELTOP 6	Forward: TACTAACAACGACTCTCGGCAA Reverse: CTTGCGTTCAAAAGACTCGGT
7	DELTOP 7	Forward: GACTCTCGGCAACGGATATCT Reverse: ACCAAGTATCGCATTTCGGCTA
8	DELTOP 8	Forward: TCGATGAAGAACGTAGCCGAA Reverse: GCAATTCACACCAAGTATCGCAT

9	DELTOP 9	Forward: CGAGGACTCGAATTTAAGCCA Reverse: AGTATCGCATTTCCGGCTACGT
10	DELTOP 10	Forward: TCGCATTTCCGGCTACGTTCTT Reverse: CGTAGCCGAAATGCGATACTT
11	DELTOP 11	Forward: GCATTTCCGGCTACGTTCTTCAT Reverse: AGCCGAAATGCGATACTTGGT
12	DELTOP 12	Forward: TTCGGCTACGTTCTTCATCGA Reverse: CGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT
13	DELTOP 13	Forward: GGCTACGTTCTTCATCGATGC Reverse: GCGATACTTGGTGTGAATTGCA
14	DELTOP 14	Forward: GTAATACGACTAGAATGCTCCATGC Reverse: GCATTTCCGGCTACGTTCTTCAT
15	DELTOP 15	Forward: AGGGGACAGGCGAATTCATTT Reverse: AGGCGAATTCATTTCAAGTTCCTT
16	DELTOP 16	Forward: AGGCGAATTCATTTCAAGTTCCTT Reverse: CGGTCGTTTGATGTTTAGGCAT
17	DELTOP 17	Forward: CCGAGTCTTTTGAACGCAAGTT Reverse: ACCAAGTATCGCATTTCCGGCTA
18	DELTOP 18	Forward: CCCTAACGCGAACAGTTTGTT Reverse: GTAATACGACTAGAATGCTCCATGC
19	DELTOP 19	Forward: GTCGTTTGATGTTTAGGCATCGA Reverse: TTCGGCTACGTTCTTCATCGA



Gambar 6. Mini kode batang DNA yang bisa dibuat untuk memisahkan mangga Indonesia dari mangga Thailand (Hidayat *et al.*, 2011)

Tabel 4. Hasil *in silico* PCR menggunakan program komputer FastPCR

No	Nama Primer	Spesies						
		Timun Apel	Cucumis melo	Sechium edule	Citrullus lanatus	Coccinia trilobata	Benincasa hispida	Cucumis sativus
1	DELTOP 1	+	+	+	-	-	+	+
2	DELTOP 2	+	+	+	+	+	-	+
3	DELTOP 3	+	-	+	+	+	+	+
4	DELTOP 4	+	+	+	-	+	+	+
5	DELTOP 5	+	+	-	-	-	+	+
6	DELTOP 6	+	-	+	+	-	-	+
7	DELTOP 7	+	-	-	-	-	-	+
8	DELTOP 8	+	+	-	+	-	-	-
9	DELTOP 9	+	-	+	-	-	-	-
10	DELTOP 10	+	+	-	+	+	-	-
11	DELTOP 11	+	-	+	-	+	-	+
12	DELTOP 12	+	+	+	+	-	-	-
13	DELTOP 13	+	-	+	-	-	+	+
14	DELTOP 14	+	-	-	+	+	-	-
15	DELTOP 15	+	-	+	-	-	+	+
16	DELTOP 16	+	-	+	+	+	+	-
17	DELTOP 17	+	-	-	-	-	-	-
18	DELTOP 18	+	+	-	-	+	+	+
19	DELTOP 19	+	-	+	+	+	+	+

Keterangan: Tanda + artinya pita DNA muncul saat elektroforesis, dan sebaliknya.

Dari **Tabel 4** di atas, primer DELTOP17 dapat digunakan untuk identifikasi tanaman timun apel, karena hasil positif yang dihasilkan hanya terjadi pada timun apel dan tidak pada jenis lainnya (hasil negatif). Hasil ini dapat membantu praktisi untuk membedakan timun apel dari melon lebih dini. Kedua tanaman ini dapat hidup berdampingan dan sama produktifnya. Seperti sudah disampaikan di atas (**gambar 2**) bahwa keduanya berada di dalam spesies yang sama. Jadi di lapangan nampak sama karena memiliki sifat pertumbuhan morfologi yang serupa. Baru bisa dibedakan kalau sudah terbentuk buah. Lebih dari itu, hasil ini juga dapat menjadi bukti tambahan untuk status taksonomi tanaman timun apel sebagai subspecies.

Seperti disampaikan pada **gambar 5** di atas, setelah *in silico* PCR berhasil, maka bisa dilanjutkan dengan melakukan *in vitro* PCR, supaya lebih yakin. Dengan menggunakan sepasang primer DELTOP 17 kita melakukan *in vitro* PCR pada sampel target. Diharapkan pita DNA tunggal akan dihasilkan setelah proses PCR dan elektroforesis.

Dunia pembelajaran (untuk meningkatkan minat siswa)

Hasil kegiatan analisis filogenetika molekuler di laboratorium (*in vitro* dan *in silico*) ini ternyata dapat "dibawa" ke dalam pembelajaran di kelas. Sebagaimana dimaklumi bersama, dalam dunia pendidikan kita, biosistemika dan evolusi telah menjadi bagian terpenting dalam kurikulum dari mulai tingkat sekolah menengah sampai perguruan tinggi dengan berbagai modifikasi yang disesuaikan dengan perkembangan intelektual mereka. Namun demikian, perhatian siswa dan mahasiswa biologi terhadap materi kuliah tentang biosistemika dan evolusi cenderung rendah (Hidayat, tidak dipublikasi). Mereka memandang kedua materi kuliah ini penuh dengan hapalan. Kebanyakan mahasiswa berpendapat bahwa biosistemika dan evolusi hanya bersifat teoritis sehingga

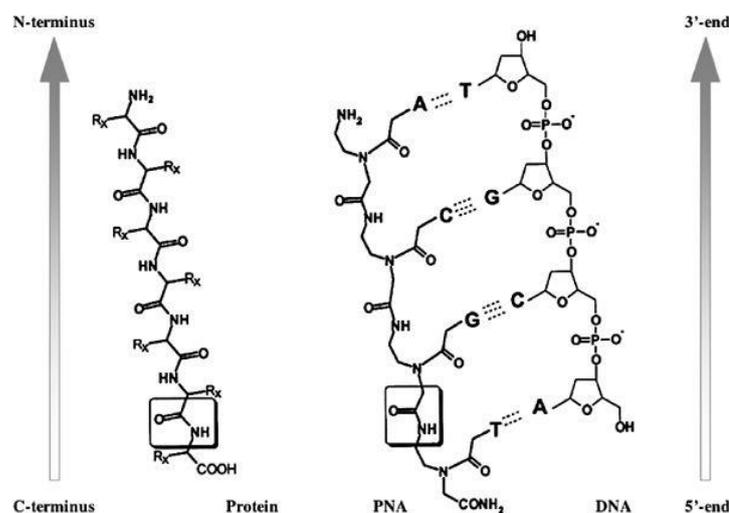
membosankan. Tidak salah kalau mereka melihat kedua subyek kuliah ini bersifat deskriptif dan spekulatif, sulit untuk dibuktikan.

Penerapan klasifikasi numerik (fenetika dan kladistika/filogenetika) dalam pembelajaran dan penugasan dapat menggairahkan belajar mereka tentang keanekaragaman, biosistematika, dan evolusi di kelas. Tree thinking sebagai cara atau kaidah untuk membaca kladogram yang terbentuk diharapkan dapat membekali siswa/mahasiswa untuk berpikir kritis dan kemampuan bernalar. Secara umum hasil menunjukkan bahwa siswa atau mahasiswa sangat senang, karena pembelajarannya aktif, hands on, dan berinkuiri. Klasifikasi numerik dan tree thinking ini semakin meningkat kebutuhannya di level sekolah menengah (SMA dan sederajat) ketika kurikulum terbaru (Kurikulum Merdeka) mendorong pembelajaran yang kontekstual dan otentik.

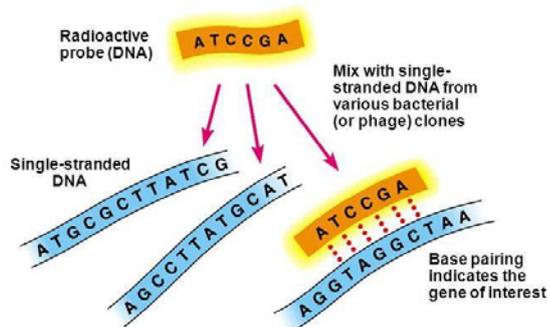
Penelitian ke Depan

Indonesia kaya akan keanekaragaman flora dan fauna, tetapi kekurangan sumber daya manusia untuk melakukan inventarisasi dan dokumentasi kekayaan yang kita miliki tersebut. Ahli biosistematika dan taksonomi Indonesia masih bisa dihitungkan oleh jari, tidak sebanding dengan kekayaan yang ada. Terkait hal ini, proyek penelitian kode batang DNA ke depan akan difokuskan pada pengembangan DNA Tools Kit berbasis PCR, dan mencoba teknik hibridisasi menggunakan probe berbahan dasar Peptide Nucleic Acid (PNA) (Gambar 7). Probe itu sendiri merupakan fragmen DNA/PNA pendek yang diberi label radioaktif, dan digunakan untuk mendeteksi target untaian DNA komplementer spesifik (Gambar 8).

PNA dapat disintesis, dan memiliki afinitas yang lebih kuat dibandingkan dengan DNA itu sendiri (Gupta et al., 2017). Sederhananya, ikatan dupleks DNA- PNA lebih kuat dibandingkan ikatan DNA-DNA. Karena sifatnya inilah, PNA saat ini sering digunakan dalam pengujian diagnostik berbagai penyakit misalnya kanker maupun penyakit yang disebabkan oleh bakteri maupun virus. Dengan mekanisme yang sama, probe berbahan dasar PNA akan digunakan untuk identifikasi tumbuhan.



Gambar 7. Hibridisasi PNA dan DNA



Gambar 8. Prinsip kerja sebuah probe untuk deteksi/identifikasi target (<https://slideplayer.com/slide/4790305/>; Diakses tanggal 4 April 2020)

Daftar Pustaka

- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annual Missouri Botanic Garden*; 82: 247-277.
- Chase MW, Soltis DE, & Olmstead RG, 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annual Missouri Botanic Garden*; 80: 528-580.
- Claridge MC, 1995. Introduction Systematic Agenda 2000. *Biodiversity and Conservation*; 4(5): 451-454.
- Conservation International, 2018. *Annual Report*. USA
- Dressler RL, 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press.
- Frowine SA, 2005. *Orchids for Dummies*. Wiley Publishing.
- Gupta A, Mishra A, Puri N, 2017. Peptide nucleic acid: Advanced tools for biomedical applications. *Journal of Biotechnology*; 259: 146-159.
- Hershkovits MA & Leipe DD, 1998. Phylogenetic Analysis. In A.D. Baxevanis & B.F. Oullette (Eds.), *Bioinformatics a Practical Guide to The Analysis of Genes and Proteins*. John Wiley & Sons.
- Hidayat T & Pancoro A, 2001. Molecular phylogenetics study of Anacardiaceae based on variation of internal transcribed spacer region sequences. *Hayati Journal of Biological Sciences*; 8: 98-101.
- Hidayat T, Yukawa T, Ito M, 2005. Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): insights from plastid *matK* and nuclear ribosomal ITS sequences. *Journal of Plant Research*; 18: 271-284.
- Hidayat T, 2005. *Systematic study of subtribe Aeridinae (Orchidaceae)* [Unpublished PhD thesis]. The University of Tokyo.
- Hidayat T & Pancoro A, 2008. Molecular phylogenetic studies provide a basic knowledge of improving genetic resources. *Agrobiogen*; 4: 35-40.
- Hidayat T, Muchtar AA, Yati DD, Dina M, Kusdianti K, Kusumawaty D, 2008. Phylogenetic analysis of *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae s.l.) based on ITS region. *Jurnal Matematika dan Sains ITB*; 13: 16-21.
- Hidayat T, Pancoro A, Kusuwamaty, D. 2011. Utility of *matK* gene to assess evolutionary relationships of genus *Mangifera* (Anacardiaceae). *Biotropia*; 18(2): 74-80.
- Hidayat T, Weston PH, Yukawa T, Ito M, Rice R, 2012. Phylogeny of subtribe Aeridinae (Orchidaceae) inferred from DNA sequences data: advanced analyses including Australasian genera. *Jurnal Teknologi*; 59(1): 87-95.
- Hidayat T, Arif SM, Samad AA, 2013. Molecular biodiversity of selected mango cultivars based on DNA sequences of internal transcribed spacer region. *Pakistan Journal of Biological sciences*; 16(19): 1072-1075.

- Hidayat T, Priyandoko D, Islami DK, Wardiny PY, 2016. Molecular phylogenetic screening of withania somnifera relative from indonesia based on internal transcribed spacer region. *Hayati Journal of Biosciences*; 23(2): 92-95.
- Hidayat T, Saputro NW, Khamid MBR, Bayfurqon FM, 2020 (in press). First phylogenetic treatment of apple cucumber (family Cucurbitaceae) from Indonesia utilizing DNA variation of Internal Transcribed Spacer region. *HAYATI Journal of Biosciences*; 28(1): 48.
- Hidayat T, Junior D, Kusdianti K, Saputro NW, 2020. Identifikasi tanaman buah timun apel secara in silico berbasis kode batang DNA. Dalam T. Hidayat & J.A. Utama (Penyunting), *Inovasi matematika, IPA, komputer, dan pembelajarannya*. UPI Press.
- Hillis DM, Mable BK, Moritz C, 1996. Applications of molecular systematics. In D.M. Hillis DM, C. Moritz C, & B.K. Mable (Eds.), *Molecular Systematics 2nd edition*. Sinauer Associate.
- Moritz C & Hillis DM, 1996. Molecular systematics: context and controversies. In D.M. Hillis DM, C. Moritz C, & B.K. Mable (Eds.), *Molecular Systematics 2nd edition*. Sinauer Associate.
- Stevens PF, 2001. *Angiosperm Phylogeny Groups*.
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>