

A DNA Barcoding Multilocus Analysis in the Cucurbitaceae Family

Nurbaiti^{1*}, Dewi Indriyani Roslim¹, Herman¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia;

Article History

Received : March 06th, 2025

Revised : March 20th, 2025

Accepted : April 13th, 2025

*Corresponding Author: Dewi

Indriyani Roslim, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia;

Email:

dewiindriyaniroslim@gmail.com

Abstract: The Cucurbitaceae family is a very diverse family of angiosperms and is often used as a traditional medicine because it produces secondary metabolites in the form of *Cucurbitacin B, D, E, and I*. The identification and determination of filogeny between species in the Cucurbitaceae family using a single DNA barcode locus is still inefficient. The purpose of this study is to analyze the appropriate and effective combination of DNA barcode multiloci for species identification from the Cucurbitaceae family. The materials used in this study are the database of *matK, rbcL, ITS* and *trnL-F IGS* from the Cucurbitaceae Family and *the outgroup*, namely *Tetrameles nudiflora* which was explored from *Genbank* through the NCBI website, and then performed MSA (*Multiple Sequence Alignment*) using MAFFT v.7 software. and sequence editing using Bioedit v.7.2. then DNA sequence analysis and phylogenetic tree construction using MEGA 11. The results show that the *ITS* locus is the most efficient barcode to identify and distinguish species in the Cucurbitaceae family. The combination of multiloci of the *ITS, matk,* and *trnL-trnF IGS* also has the potential to identify and differentiate species in the Cucurbitaceae family on the condition that *ITS* must be included (be the main locus) and not include *rbcL* because of its low variability.

Keywords: Cucurbitaceae, *matK, rbcL, ITS, trnL-F IGS.*

Pendahuluan

Famili Cucurbitaceae merupakan famili yang sangat besar dan beragam dalam tumbuhan berbiji tertutup. Famili Cucurbitaceae memiliki 130 genus dengan sekitar 1000 spesies. Genus tersebut diantaranya adalah *Trichosanthes, Lagenaria, Luffa, Sechium, Cucumis, Cucurbita, Benincasa, Citrullus, Momordica, Corallocarpus, Gymnopetalum* dan *Brynopsis* (Mulyawan *et al.*, 2023). Cucurbitaceae menghasilkan metabolit sekunder berupa *Cucurbitacin B, D, E,* dan *I* yang memiliki aktivitas biologis dan farmakologis yang penting. Spesies di dalam genus *Trichosanthes* seperti *T. kirilowii* dan *T. rosthornii* digunakan dalam pengobatan herbal tradisional Korea (Park *et al.*, 2021). Selain itu dari spesies *Gymnopetalum* yaitu *Gymnopetalum coccinchenenses* memiliki bioaktifitas yang

penting seperti antikanker, antiinflamasi dan antidiabetes (Almeida *et al.*, 2022).

Identifikasi dan penentuan hubungan kekerabatan antar spesies dalam famili Cucurbitaceae melalui karakter morfologi masih belum efektif karena tingginya kemiripan morfologi di antara spesies yang berkerabat dekat. Oleh karena itu diperlukan pengaplikasian dari teknik barkoding DNA dengan prinsip mengenali spesies pada tingkat molekuler menggunakan penanda molekuler terstandar pada sekuens DNA (Jannah *et al.*, 2021). Terdapat 3 lokasi barkode DNA yaitu: di genom inti (nDNA), kloroplas (cpDNA) dan mitokondria (mtDNA). Karakteristik dari sekuens barkode DNA berbeda-beda. Barkode DNA inti antara lain *Internal Transcribed Spacer (ITS)* (18S-26S) sedangkan barkode DNA kloroplas terdiri dari gen penyandi protein seperti *matK, rbcL, rpoC1,* dan *rpoB* dan daerah non-koding seperti *trnL-trnF Intergenic Spacer*

(*IGS*), *psbK-psbI IGS*, *trnH-psbA IGS*, dan *rpl16 intron* (Filix *et al.*, 2024). Menurut Letsiou *et al.*, (2023) untuk mengidentifikasi sampel yang tidak diketahui, lokus yang paling umum digunakan ialah *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI* dan *trnH-psbA*.

Ramesh *et al.*, (2022) melalui penelitiannya membuktikan bahwa lokus *matK* efisien untuk membedakan spesies *Momordica* dan mengungkap hubungan kekerabatannya. Namun, penggunaan lokus *ITS* untuk analisis filogenetik timun apel dengan spesies dalam famili Cucurbitaceae oleh Hidayat *et al.*, (2021) memberikan hasil yang kurang efektif. Penggunaan lokus *psbA-trnH IGS* pada genus *Momordica* oleh Sumarlina & Napitupulu (2023) menggambarkan variasi genetik yang baik pada level interspesies maupun intraspesies, tetapi masih belum cukup efektif untuk menggambarkan kekerabatan antar taksa.

Hal ini sejalan dengan pernyataan Slipiko *et al.*, (2022) bahwa lokus tunggal dan universal barkode DNA untuk tanaman hingga saat ini masih diperdebatkan karena beberapa lokus hanya efisien untuk beberapa kelompok taksonomi tertentu karena adanya proses hibridisasi dan introgresi yang sering terjadi pada tanaman. Oleh karena itu, untuk mengidentifikasi spesies diperlukan dua atau lebih lokus. Lokus pertama berfungsi membantu klasifikasi organisme ke tingkat famili atau genus dan yang kedua atau lebih akan memungkinkan identifikasi spesies dalam urutan takson yang lebih spesifik (Letsiou *et al.*, 2023).

Kombinasi *matK* dan *rbcL* merupakan barkode DNA terbaik untuk tanaman karena *rbcL* memiliki universalitas yang tinggi tetapi variasi nukleotida antar spesies yang lebih rendah, sedangkan *matK* memiliki variasi nukleotida antar spesies yang lebih tinggi tetapi universalitas yang lebih rendah. Kombinasi lokus gen ini menjadi pemisah terbaik antar spesies (Letsiou *et al.*, 2023). Penelitian Ho & Nguyen (2020) memberikan informasi bahwa kombinasi *matK+rbcL* efektif untuk pemisahan di antara spesies yang berbeda dari famili Cucurbitaceae. Namun, menurut Slipiko *et al.*, (2022), kombinasi 2 lokus (*matK* dan *rbcL*) hanya memiliki tingkat keberhasilan 75%. Oleh karena itu, timbul usulan untuk menggunakan lokus barkode lainnya seperti *trnH-psbA IGS*,

ITS, *ycf*, *ndhF*, *ndhB*, *ndhH*, *trnT-trnL IGS*, *trnL-trnF IGS*, dan kombinasinya.

Kombinasi lokus *atpB-rbcL IGS +trnL-F IGS* dan *atpB-rbcL IGS +atpF-H IGS* telah digunakan untuk identifikasi spesies buah *Prunus L.* (Yu *et al.*, 2021). Kombinasi lokus *matK+rbcL*, *matK+ITS*, *rbcL+ITS*, dan *matK+rbcL+ITS* telah digunakan untuk identifikasi spesies dalam genus *Terminalia* pada penelitian Mishra *et al.*, (2017) dengan hasil deliniasi terbaik yaitu penggunaan lokus *matK+ITS*. Oleh karena itu dilakukan penelitian ini untuk menentukan kombinasi multilokus barkode DNA yang tepat dan efektif untuk identifikasi spesies dari famili Cucurbitaceae, yang berguna untuk pemuliaan, konservasi, dan penelitian keanekaragaman tanaman.

Bahan dan Metode

Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan pada Oktober 2024 sampai dengan Desember 2024 di Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah database sekuens *matK*, *rbcL*, *ITS* dan *trnL-F IGS* dari Famili Cucurbitaceae dan outgroup yaitu *Tetrameles nudiflora* yang diunduh dari Genbank melalui *website* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format FASTA yang kemudian diolah dan dianalisis dengan perangkat lunak Notepad, MAFFT v.7, Bioedit v.7.2, dan MEGA 11.

Eksplorasi sekuens

Eksplorasi sekuens *matK*, *rbcL*, *ITS* dan *trnL-F IGS* dari famili Cucurbitaceae dan outgroup yaitu *Tetrameles nudiflora* di Genbank pada *website* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekuens dipilih berdasarkan ukuran, disimpan dalam format FASTA, dan dikumpulkan berdasarkan jenis lokus dalam format TXT.

Multiple Sequence Alignment dan Pengeditan Sekuens

Sekuens yang telah dikumpulkan kemudian disejajarkan (*Multiple Sequence*

Alignment) dengan menggunakan perangkat lunak MAFFT v.7. (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) dengan pengaturan *default* dan disesuaikan secara manual bila diperlukan. Hasil pensejajaran disimpan dalam format FASTA kemudian dilakukan pengeditan sekuens menggunakan Bioedit v.7.2.

Analisis Sekuens DNA

Frekuensi basa nukleotida, frekuensi pasangan nukleotida, situs polimorfisme, dan keragaman genetik dikalkulasi menggunakan MEGA 11. Hasil kalkulasi ini digunakan untuk menentukan kombinasi multilokus barkode DNA terbaik untuk konstruksi pohon filogenetik multilokus.

Analisis Filogenetik

Konstruksi pohon filogenetik selanjutnya dilakukan berdasarkan lokus tunggal dan multilokus. Konstruksi pohon filogenetik multilokus diawali dengan penggabungan sekuens menggunakan Bioedit v.7.2 berdasarkan kombinasi lokus yang telah ditentukan dan diekspor dalam format FASTA. Konstruksi pohon filogenetik lokus tunggal dan

multilokus dilakukan menggunakan kriteria *Neighbor Joining* (NJ) menggunakan MEGA 11 dengan model evolusi *p-distance*. Analisis *rapid bootstrap* dilakukan dengan 1000 replikasi.

Hasil dan Pembahasan

Eksplorasi sekuens

Barkode DNA dapat memberikan pemahaman yang lebih mendalam tentang keanekaragaman hayati, membantu dalam menentukan batas-batas spesies, dan menetapkan prioritas untuk konservasi habitat di banyak kelompok tumbuhan yang terancam. Barkode DNA yang sempurna harus memiliki daerah pengapit yang cukup terkonservasi untuk desain primer universal, efisiensi amplifikasi PCR yang tinggi, dan variabilitas yang memadai untuk identifikasi spesies (Furan, 2023). Penelitian ini menggunakan *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF IGS*, *ITS* dan kombinasinya sebagai barkode DNA.

Sebanyak 27 dari masing-masing sekuens DNA *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF IGS*, *ITS* dari famili Cucurbitaceae dan 1 sekuens *outgroup* (*Tetrameles nudiflora*) telah dikumpulkan pada penelitian ini (Tabel 1).

Tabel 1. Nama spesies dan nomor aksesori tumbuhan dari famili Cucurbitaceae dan *outgroup* yang digunakan dalam penelitian ini

Spesies	Barkode DNA			
	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	<i>trnL-trnF IGS</i>	<i>ITS</i>
<i>Gymnopetalum chinense</i>	EU155601.1	EU155606.1	EU155621.1	HQ201978.1
<i>Gymnopetalum integrifolium</i>	DQ535754.1	DQ536683.1	DQ536824.1	MG870090.1
<i>Trichosanthes villosa</i>	EU037005.1	EU037007.1	EU037009.1	OP872736.1
<i>Trichosanthes schlechteri</i>	EU155605.1	EU155610.1	EU155628.1	OP872721.1
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	OP626257.1	EU155609.1	EU155623.1	OP547892.1
<i>Trichosanthes bracteata</i>	EU155602.1	EU155608.1	EU155622.1	HE661317.1
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	MH658517.1	MH659988.1	DQ536874.1	KC733407.1
<i>Trichosanthes wallichiana</i>	KT779319.1	KT727072.1	KT779371.1	KT347516.1
<i>Cucumis melo subsp. melo</i>	KY434429.1	KY458114.1	KY434474.1	KY434611.1
<i>Cucumis melo subsp. agrestis</i>	KY434427.1	KY458108.1	KY434490.1	KY434589.1
<i>Cucumis zeyherii</i>	DQ535803.1	KY458122.1	KY434503.1	EF595901.1
<i>Cucumis sativus</i>	L21937.1	AB735564.1	DQ536765.1	OR717487.1
<i>Cucumis hystrix</i>	DQ785832.1	DQ785846.1	HM597017.1	EF595879.1
<i>Cucumis melo subsp. meloides</i>	KY434419.1	KY458082.1	KY434452.1	KY434623.1
<i>Cucumis meeusei</i>	KY434406.1	KY458072.1	KY434449.1	EF595882.1
<i>Cucumis maderaspatanus</i>	KY434405.1	KY458071.1	KY434447.1	KY434572.1
<i>Cucurbita pepo</i>	L21938.1	DQ536666.1	DQ536808.1	KT347507.1
<i>Cucurbita palmata</i>	HQ438634.1	HQ438606.1	MN481397.1	HQ201971.1
<i>Cucurbita moschata</i>	HQ438614.1	HQ438603.1	EU262301.1	FJ915111.3
<i>Cucurbita ficifolia</i>	DQ535804.1	DQ536665.1	HQ438677.1	FJ915115.2
<i>Luffa aegyptiaca</i>	DQ535827.1	DQ536696.1	KF487460.1	KX786100.1
<i>Luffa quinquefida</i>	L21941.1	KF487358.1	KF487440.1	KF487328.1

<i>Luffa echinata</i>	KC292510.1	EU436408.1	KF487463.1	KF487350.1
<i>Luffa graveolens</i>	EU436385.1	EU436409.1	KF487466.1	KF487353.1
<i>Luffa acutangula</i>	DQ535826.1	DQ536695.1	KF487443.1	KX786113.1
<i>Momordica balsamina</i>	PP706113.1	GQ163352.1	GQ163230.1	PP701432.1
<i>Momordica cochinchinensis</i>	EF487554.1	EF487561.1	EF487577.1	AY606266.1
<i>Tetrameles nudiflora</i>	L21943.1	AY968458.1	AY091831.1	KR532666.1

Analisis Sekuens DNA

Setelah proses pemotongan sekuens, panjang sekuens *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF IGS*, dan *ITS* secara berturut-turut adalah 1.437 pb, 1.306 pb, 328 pb dan 757 pb. Selain itu, panjang gabungan sekuens *ITS+matk*, *ITS+ trnL-trnF IGS*, *matk+ trnL-trnF IGS*, dan *ITS+matk+ trnL-trnF IGS* secara berturut-turut sebesar 2.067 pb, 1.089 pb, 1.638 pb dan 2.399 pb.

Sekuens *rbcL*, *matK*, *trnL-trnF IGS*, dan *ITS* dari famili Cucurbitaceae dan 1 sekuens *outgroup* yang dikalkulasi dalam penelitian ini menunjukkan komposisi nukleotida yang berbeda. Kalkulasi menunjukkan bahwa frekuensi basa nukleotida AT lebih tinggi dibanding GC pada sekuens barcode DNA yang digunakan, kecuali *ITS* dan gabungan *ITS+ trnL-trnF IGS* (Tabel 2).

Tabel 2. Frekuensi (%) basa nukleotida dari kandidat barcode DNA pada famili Cucurbitaceae

Sekuens	T	A	C	G	AT	GC
<i>rbcL</i>	29,5	27,3	18,9	24,2	56,8	43,1
<i>matK</i>	37,5	30,2	16,9	15,3	67,7	22,2
<i>trnL-trnF IGS</i>	35,3	29,8	21,6	13,2	65,1	34,8
<i>ITS</i>	19,4	19,2	33,9	27,5	38,6	61,4
<i>ITS+matk</i>	31,0	26,2	23,0	19,7	57,2	42,7
<i>ITS+trnL-trnF IGS</i>	24,2	22,4	30,2	23,2	46,6	53,4
<i>matk+trnL-trnF IGS</i>	37,1	30,1	17,9	14,9	67,2	32,8
<i>ITS+matk+trnL-trnF IGS</i>	31,6	26,7	22,8	18,8	58,3	41,6

Hasil analisis sekuens pada rata-rata kandungan GC menunjukkan bahwa kandungan GC dari kandidat barcode DNA famili Cucurbitaceae jauh lebih rendah dari pada kandungan AT. Hasil yang diperoleh sama dengan hasil yang dilaporkan dalam penelitian Li et al., (2021) pada anggrek, dan Hernández & Coronado (2023) pada *Chenopodium quinoa*.

Polimorfisme dan frekuensi pasangan basa nukleotida dari kandidat barcode DNA pada famili Cucurbitaceae dikalkulasi. Sekuens *rbcL* memiliki jumlah situs variasi terendah (8,5%) di antara semua sekuens tunggal dan gabungan. Sebaliknya, sekuens *ITS* menunjukkan tingkat situs konservatif terendah (45%) (Tabel 3).

Tabel 3. Polimorfisme basa dan frekuensi pasangan basa nukleotida dari kandidat barcode DNA pada famili Cucurbitaceae

Sekuens	Polimorfisme				Frekuensi Pasangan Nukleotida		
	CS pb (%)	VS pb (%)	Pi	S	ii	si	sv
<i>matK</i>	1023 (78)	232 (17)	88	144	974	13	19
<i>rbcL</i>	1294 (90)	123 (8,5)	51	72	1176	11	8
<i>trnL-trnF IGS</i>	202 (61,6)	89 (27)	39	49	244	5	9
<i>ITS</i>	348 (45)	386 (50)	232	150	486	46	33
<i>ITS+matk</i>	1371 (66)	618 (30)	320	294	1460	59	52
<i>ITS+trnL-trnF IGS</i>	550 (50,5)	475 (43,6)	271	199	730	51	42
<i>matk+trnL-trnF IGS</i>	1225 (68,6)	321 (19,6)	127	193	1218	19	28
<i>ITS+matk+trnL-trnF IGS</i>	1573 (65,6)	707 (29,5)	359	343	1704	64	61

Keterangan: CS: Conserved site, VS: Variable site, Pi: Parsimony informative site, S: Singleton site, ii: identical pairs, si: transition pairs, sv: transversal pairs

Analisis polimorfisme basa dan frekuensi pasangan basa nukleotida dari kandidat barcode DNA pada famili Cucurbitaceae menunjukkan bahwa *rbcL* ialah sekuens paling konservatif pada penelitian ini seperti yang terlihat dari rendahnya *variable site* pada analisis nukleotida polimorfik. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian Lone *et al.*, (2019) yang mengungkapkan bahwa *rbcL* terkenal dengan evolusinya yang lambat dan divergensi minimum. Oleh karena itu, *rbcL* hanya baik untuk diskriminasi tanaman pada tingkat famili dan genus. Sehingga, dalam penelitian ini *rbcL* tidak diikutsertakan dalam analisis multilokus. Sekuens *ITS* menunjukkan situs variabel atau polimorfik dan substitusi nukleotida yang paling tinggi (Tabel 3) dibandingkan tiga sekuens lainnya. Variasi pada basa nukleotida terjadi karena adanya substitusi basa nukleotida yang dapat berupa substitusi transisi dan transversi. Transisi adalah perubahan antar purin yaitu basa A (Adenin) dan G (Guanin) atau antar pirimidin yaitu basa C (Sitosin) dan T (Timin). Sedangkan transversi adalah perubahan antara suatu basa purin dengan suatu basa pirimidin. Berdasarkan *alignment* yang diperoleh substitusi nukleotida pada famili Cucurbitaceae sebagian besar adalah transisi. Hal ini sesuai pernyataan Hieu *et al.*, (2024) yang menyatakan bahwa kecepatan transisi akan lebih tinggi dari pada transversi.

Variasi genetik yang tinggi pada *ITS* dapat terjadi karena merupakan daerah *non-coding* yang memiliki tingkat mutasi lebih tinggi dibandingkan dengan daerah *coding*. Pada daerah *ITS*, perubahan genetik seperti mutasi sering terjadi, sehingga menyebabkan variasi genetik yang berbeda antar spesies (Wathon *et al.*, 2023). Daerah *ITS* juga menunjukkan variasi tinggi jika dibandingkan dengan *trnL-trnF IGS* yang sama-sama merupakan daerah *noncoding*. Hal ini karena *ITS* terdapat di *nuclear DNA* dan pewarisannya diturunkan secara biparental (mengalami rekombinasi dari tetua betina dan jantan) sedangkan *trnL-trnF IGS* terdapat di cpDNA dan diwariskan secara maternal (hanya diturunkan dari tetua betina) (Balladona *et al.*, 2020). Rekombinasi pada *ITS* menyebabkan variasinya lebih tinggi dibanding *trnL-trnF IGS*, karena rekombinasi merupakan sumber penting variasi genetik yang fundamental (Schwarzkopf *et al.*, 2020).

Nilai keragaman genetik sekuens yang disajikan dalam Tabel 4. diperoleh melalui perhitungan perbedaan nukleotida berpasangan dan keragaman nukleotida. Uji Netralitas Tajima digunakan untuk validitas nilai yang didapatkan. sekuens *ITS* memiliki nilai keragaman genetik (π) tertinggi yaitu 0.103804 dengan nilai Tajima (D) yaitu -0.817923.

Tabel 4. Nilai keragaman genetik sekuens barcode DNA pada famili Cucurbitaceae

Sekuens	Tajima's Neutrality Test					
	<i>m</i>	<i>S</i>	<i>Ps</i>	Θ	π	<i>D</i>
<i>rbcL</i>	28	123	0,085595	0,021996	0,013459	-1,506367
<i>matK</i>	28	232	0,177642	0,045649	0,024472	-1,818024
<i>trnL-trnF IGS</i>	28	89	0,271341	0,069727	0,044449	-1,396447
<i>ITS</i>	28	386	0,509908	0,131033	0,103804	-0,817923
<i>ITS+matK</i>	28	618	0,298984	0,076831	0,053478	-1,199336
<i>ITS+trnL-trnF IGS</i>	28	475	0,436180	0,112087	0,085545	-0,933189
<i>matK+trnL-trnF IGS</i>	28	321	0,195971	0,050359	0,028413	-1,713054
<i>ITS+ matK+trnL-trnF IGS</i>	28	707	0,294706	0,075732	0,052155	-1,229077

Keterangan: *m*: jumlah sekuens sampel, *n*: total situs basa nukleotida, *S*: jumlah situs yang mengalami segregasi, *ps*: *S/n*, Θ : *ps/a1*, π : keragaman genetik, dan *D*: Nilai uji Tajima

Keragaman nukleotida (π) sekuens barcode DNA pada famili Cucurbitaceae memiliki nilai antara 0.013459-0,103804. Keragaman nukleotida (π) merupakan cerminan keragaman genetik sekuens yang dapat digunakan untuk memantau keragaman dan variasi genetik pada tanaman. Biasanya, nilai π berkisar antara 0–1, yang kecenderungannya ke

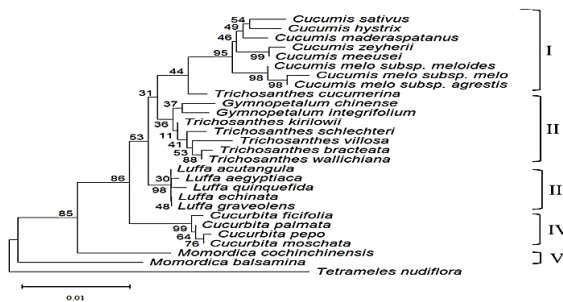
arah 0 mengindikasikan adanya keragaman yang lebih sedikit (Kumar *et al.*, 2022). Keragaman yang lebih sedikit dapat dijelaskan karena penelitian ini hanya didasarkan pada 27 spesies dari famili Cucurbitaceae dan 1 *outgroup*.

Tajima's *D* dalam penelitian ini bernilai antara -0.817923 sampai -1,818024. Uji netralitas statistik Tajima's *D* (Tajima, 1989)

dilakukan untuk memperkirakan penyimpangan dari netralitas, yang didasarkan pada ekspektasi ukuran populasi yang konstan pada keseimbangan pergeseran mutasi. Nilai negatif mengindikasikan bahwa keragaman genetik pada sekuens yang digunakan rendah. Keragaman genetik yang rendah dapat terjadi melalui proses domestikasi, seleksi dan *breeding* yang telah dilakukan sejak lama, dengan demikian dapat dikatakan bahwa keragaman genetik yang rendah menandakan kecilnya tingkat evolusi (Adimaka *et al.*, 2019).

Analisis Filogenetik

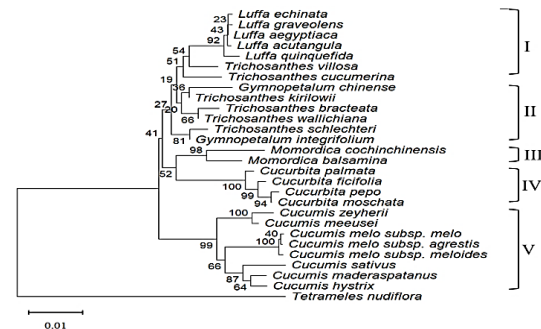
Analisis filogenetik dipresentasikan dalam bentuk pohon filogenetik menunjukkan bahwa sekuens *rbcL* tidak mampu memisahkan *Trichosanthes cucumerina* dari kelompok genus *Cucumis* dan memisahkan genus *Momordica* ke dalam dua kelompok (Gambar 1). Sementara itu, Sekuens *matK* mengelompokkan spesies dari genus *Trichosanthes* dan *Gymnopetalum* ke dalam satu kelompok. Sekuens ini juga tidak mampu memisahkan *Luffa* dengan *Trichosanthes* (Gambar 2). Sekuens *trnL-trnF IGS* tidak mampu memisahkan spesies dari genus *Luffa*, *Trichosanthes*, dan *Gymnopetalum* (Gambar 3).



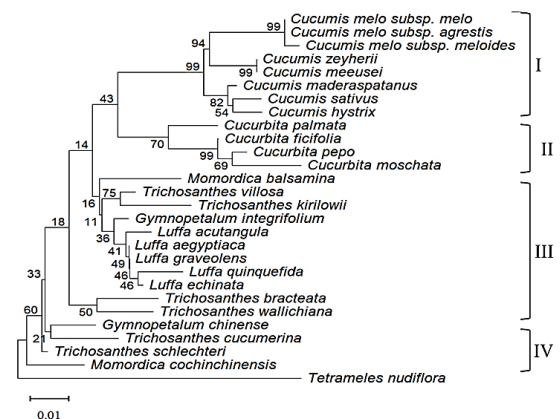
Gambar 1. Pohon filogenetik dari sekuens *rbcL* famili Cucurbitaceae menggunakan metode NJ dengan *bootstrap* 1000x

Sekuens *ITS* mampu mengelompokkan spesies yang berkerabat dekat dan memisahkan spesies yang berkerabat jauh pada famili Cucurbitaceae sehingga memisahkan berbagai genus dari famili Cucurbitaceae pada kelompoknya masing-masing secara terpisah (Gambar 4). Kombinasi *ITS+matK* (Gambar 5), *ITS+trnL-trnF IGS* (Gambar 6), sekuens *ITS+matK+trnL-trnF IGS* (Gambar 8) menghasilkan topologi pohon yang

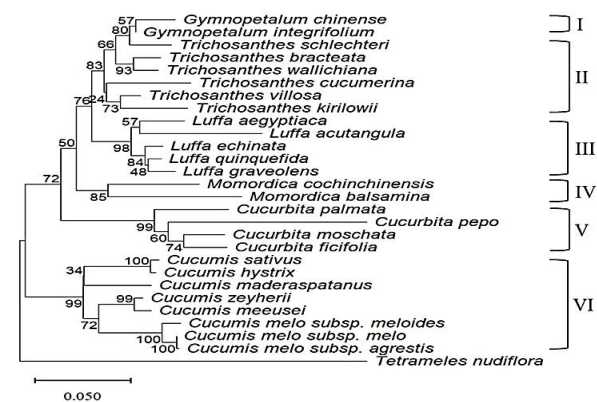
mengelompokkan spesies dari genus *Trichosanthes* dan *Gymnopetalum* ke dalam satu kelompok. Sementara kombinasi *matK+trnL-trnF IGS* (Gambar 7) tidak mampu memisahkan spesies dari genus *Luffa* dan *Trichosanthes* serta mengelompokkan genus *Trichosanthes* dan *Gymnopetalum* ke dalam satu kelompok.



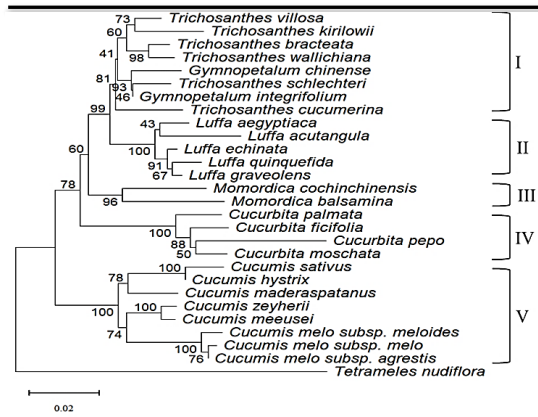
Gambar 2. Pohon filogenetik dari sekuens *matK* famili Cucurbitaceae menggunakan metode NJ dengan *bootstrap* 1000x



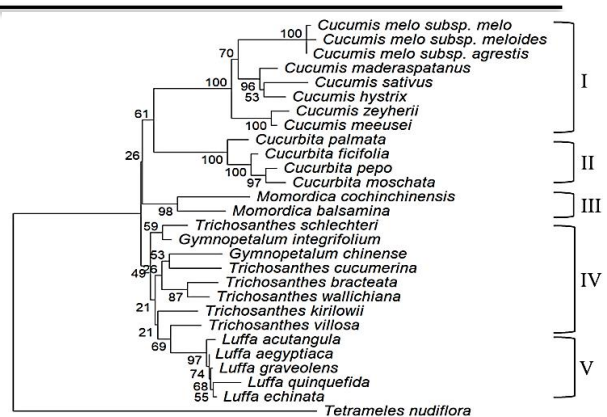
Gambar 3. Pohon filogenetik dari sekuens *trnL-trnF IGS* famili Cucurbitaceae menggunakan metode NJ dengan *bootstrap* 1000x



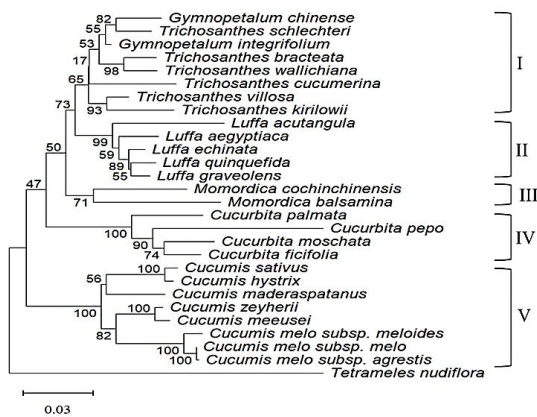
Gambar 4. Pohon filogenetik dari sekuens *ITS* famili Cucurbitaceae menggunakan metode NJ dengan *bootstrap* 1000x



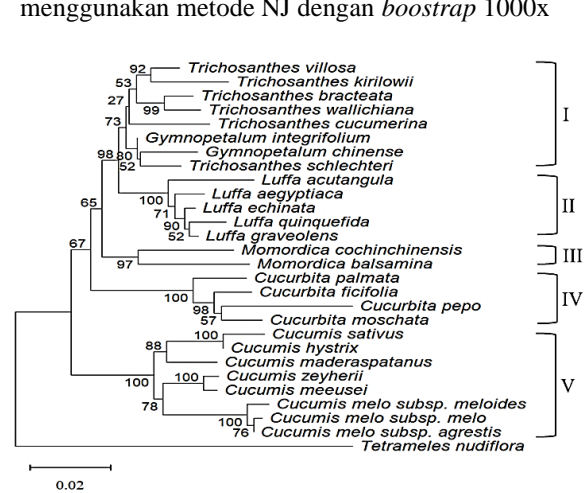
Gambar 5. Pohon filogenetik dari sekuens *ITS+matK* famili Cucurbitaceae menggunakan metode NJ dengan *bootstrap* 1000x



Gambar 7. Pohon filogenetik dari sekuens *matK+trnL-trnF IGS* famili Cucurbitaceae menggunakan metode NJ dengan *bootstrap* 1000x



Gambar 6. Pohon filogenetik dari sekuens *ITS+trnL-trnF IGS* famili Cucurbitaceae menggunakan metode NJ dengan *bootstrap* 1000x



Gambar 8. Pohon filogenetik dari sekuens *ITS+matK+trnL-trnF IGS* famili Cucurbitaceae menggunakan metode NJ dengan *bootstrap* 1000x

Fokus penelitian ini adalah untuk melihat sekuens barkode DNA yang efektif untuk membedakan spesies dalam famili Cucurbitaceae melalui konstruksi pohon filogenetik. Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode NJ karena mampu dilakukan pada komputer pribadi, dan uji *bootstrap* dapat dilakukan dengan mudah. Selain itu, topologi optimal mudah dihasilkan ketika pohon evolusi dibangun dengan menggunakan metode NJ (Kang *et al.*, 2017). Pohon filogenetik diuji secara statistik menggunakan metode *bootstrap* sebanyak 1000 ulangan. Semakin besar nilai *bootstrap* yang digunakan maka semakin tinggi kepercayaan topologi pohon hasil rekonstruksi yang didasarkan atas distribusi karakter dalam data sangat dipengaruhi oleh efek acak (Priyadi *et al.*, 2022).

Konstruksi pohon filogenetik pada famili Cucurbitaceae menggunakan *Tetrameles nudiflora* sebagai *outgroup*. *Outgroup* sangat dibutuhkan dalam konstruksi pohon filogenetik, sesuai dengan pernyataan Muthi'ah & Jannah (2023) bahwa kelompok *outgroup* sangat dibutuhkan untuk menjelaskan karakter apomorfik dan plesiomorfik. Karakter apomorfik adalah karakter yang berubah dan diturunkan pada *ingroup*, sedangkan karakter plesiomorfik merupakan karakter primitif yang terdapat pada *outgroup*.

Pengelompokan menggunakan metode *Neighbor Joining* berdasarkan jarak genetik. Cabang-cabang yang terbentuk menunjukkan hubungan yang erat dimana spesies yang berkerabat dekat akan dikelompokkan ke dalam satu kelompok. Ketika membandingkan

efektivitas analisis unilokus (*rbcL*, *matK*, *trnL-trnF* IGS, dan *ITS*), dan kombinasi multilokus (*ITS+matK*, *ITS+trnL-trnF* IGS, *matK+trnL-trnF* IGS, *ITS+matK+trnL-trnF* IGS) sebagai barcode DNA, telah menunjukkan bahwa pohon filogenetik yang dikonstruksi berdasarkan sekuens *ITS* dalam penelitian ini mampu mengelompokkan spesies yang berkerabat dekat dan memisahkan spesies yang berkerabat jauh antara genus dalam famili Cucurbitaceae.

Penggunaan lokus *ITS* menunjukkan tingkat perbedaan yang lebih tinggi pada tingkat spesies dibandingkan unilokus lainnya (*rbcL*, *matK*, *trnL-trnF* IGS) maupun kombinasi multilokus. Hal ini karena sekuens *ITS* merupakan daerah *non-coding* yang memiliki tingkat mutasi lebih tinggi dibandingkan dengan daerah *coding*. Pada daerah *ITS*, perubahan genetik seperti mutasi sering terjadi, sehingga menyebabkan variasi genetik yang berbeda antar spesies (Wathon *et al.*, 2023).

Kombinasi *ITS+matK* (Gambar 5), *ITS+trnL-trnF* IGS (Gambar 6), *ITS+matK+trnL-trnF* IGS (Gambar 8) menghasilkan topologi pohon yang mengelompokkan spesies dari genus *Gymnopetalum* (*G.integrifolium* & *G.chinense*) dan spesies *Trichosanthes* ke dalam satu kelompok. Berdasarkan pengambilan sampel di seluruh dunia sekitar 60% spesies menggunakan 4.759 nukleotida DNA inti dan plastid menghasilkan analisis molekuler *Trichosanthes* yang komprehensif dan mengindikasikan bahwa *Trichosanthes* monofiletik dengan *Gymnopetalum* (Liu *et al.*, 2021). Hal ini mendukung adanya hubungan kekerabatan antara *Trichosantes* dengan *Gymnopetalum*, dimana *G.integrifolium* memiliki *synonym* yaitu *T.integrifolia* dan *T.scabra*. Selain itu *G.chinense* memiliki *synonym* yaitu *T.costata*. Jadi, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa lokus *ITS* dapat digunakan sebagai barcode yang efisien untuk mengidentifikasi dan membedakan spesies dalam famili Cucurbitaceae. Kombinasi multilokus dari lokus *ITS*, *matK*, dan *trnL-trnF* IGS juga berpotensi untuk mengidentifikasi dan membedakan spesies dalam famili Cucurbitaceae dengan syarat yaitu *ITS* harus diikutsertakan (menjadi lokus utama) dan tidak mengikutsertakan *rbcL* karena variabilitasnya yang rendah.

Kesimpulan

Barkode DNA dapat membantu dalam menentukan batas-batas spesies dalam famili Cucurbitaceae. Lokus *ITS* adalah barcode yang paling efisien untuk mengidentifikasi dan membedakan spesies dalam famili Cucurbitaceae. Kombinasi multilokus dari lokus *ITS*, *matK*, dan *trnL-trnF* IGS juga berpotensi untuk mengidentifikasi dan membedakan spesies dalam famili Cucurbitaceae dengan syarat yaitu *ITS* harus diikutsertakan (menjadi lokus utama) dan tidak mengikutsertakan *rbcL* karena variabilitasnya yang rendah.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kepada Prof. Dr. Dewi Indriyani Roslim, M.Si., Teknisi Laboratorium Genetika Jurusan Biologi FMIPA UNRI, rekan dan keluarga peneliti yang telah memberikan saran dan bantuan untuk penelitian ini.

Referensi

- Adimaka, N., Rifki, M., Dewanti, R., & Cahyadi, M. (2019). Keragaman genetik puyuh Jepang (*Coturnix japonica*) berdasarkan analisis sekuens DNA mitokondria gen *Cytochrome-b*. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 29(2), 143–151. <https://doi.org/10.21776/ub.jiip.2019.029.02.05>
- Almeida, A., Dong, L., Thorsen, T.H., Raadam, M.H., Khakimov, B., Quintero, C.N., Kampranis, S.C., & Bak, S. (2022). Metabolic engineering of cucurbitacins in *Cucurbita pepo* hairy roots. *Frontiers in Plant Science*, 13(1), 1-18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1021907>
- Balladona, F.K., Maskromo, I., Sukma, D., & Sudarson. (2020). Pengembangan penanda molekuler berdasarkan situs SNP dan indel genom kloroplas kelapa. *Jurnal Agronida*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.30997/jag.v6i1.2548>
- Filiz, E., Uras, M.E., Ozturk, N., Gungor, H., & Ozyigit, I.I. (2024). Genetic diversity and phylogenetic analyses of Turkish sweet corn ish sweet corn (*Zea mays* var.

- saccharata*) varieties using ISSR markers) varieties using ISSR markers and chloroplast *trnL-F* IGS region. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 52(2), 1-14. <https://doi.org/10.15835/nbha52213551>
- Furan, M.A. (2023). Elevating thyme species identification: exploiting key chloroplast genes (*matK*, *rbcL*, and *psbA-trnH*) through DNA barcoding and phylogenetic analysis. *Black Sea Journal of Engineering and Science*, 6(4), 572-582. <https://doi.org/10.34248/bsengineering.1352976>
- Hernández, E.H.M., & Coronado, A.C.M. (2023). Research article phylogenetic determination of *Chenopodium quinoa* based on the chloroplast genes *rbcL* and *matK* *International Journal of Agronomy*, 1(1), 1-9. <https://doi.org/10.1155/2023/6681851>
- Hieu, H.K., Minh, N.V., Loi, N.V., & Ha, H.T. (2024). Application of DNA barcode for the genetic analysis and identifying a *Maynuoc mo* species in Quang Nam Province, Central Vietnam. *Biodiversitas*, 25(8), 3299-3308. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d250801>
- Hidayat, T., Saputro, N.W., Khamid, N.B.R., & Bayfurqon, N.F. (2021). First phylogenetic treatment of apple cucumber (Family Cucurbitaceae) from Indonesia utilizing DNA variation of *Internal Transcribed Spacer* region. *Journal of Bioscience*, 28(1), 48-53. <https://doi.org/10.4308/hjb.28.1.48>
- Ho, V.T., & Nguyen, M.P. (2020). An in silico approach for evaluation of *rbcL* and *matK* loci for DNA barcoding of Cucurbitaceae family. *Biodiversity*, 21(8), 3879-3885. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210858>
- Jannah, M., Hariri, M.R., Kasiamdari, R.S., & Handayan, N.S.N. (2021). The use of DNA barcoding and phylogenetic analysis to improve identification of *Usnea* spp. based on *ITS rDNA*. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 6(1), 1-12. <https://doi.org/10.22146/jtbb.58635>
- Kang, Y., Deng, Z., Zang, R., & Long, W. (2017). DNA barcoding analysis and phylogenetic relationships of tree species in tropical cloud forests. *Scientific Reports*, 7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13057-0>
- Kumar, K., Anjoy, P., Sahu, S., Durgesh, K., Das, A., Tribhuvan, K.U., Sevanthi, A.M., Joshi, R., Jain, P.K., Singh, N.K., Rao, A.R., & Gaikwad, K. (2022). Single trait versus principal component based association analysis for flowering related traits in pigeonpea. *Scientific Reports*, 12(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14568-1>
- Letsiou, S., Madesis, P., Vasdekis, E., Montemurro, C., Rigoriou, M.E., Skavdis, G., Moussis, V., Koutelidakis, A.E., & Tzakos, A.G. (2023). DNA barcoding as a plant identification method. *Applied Sciences*, 14, 1-10. <https://doi.org/10.3390/app14041415>
- Li, H., Xiao, W., TieTong, Li, Y., Zhang, M., Lin, X., Zou, X., Wu, Q., & Guo, X. (2021). The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of Orchidaceae plants. *Scientific Reports*, 11, 1424. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81087>
- Liu, Q., Lin, N., Zhang, D.G., Huang, Z.H., Wang, H.C., Yang, J., Tojibaev, K., Deng, T., & Li, Z.M. (2021). *Trichosanthes sunhangii* (Cucurbitaceae), a new species from Hubei, China. *Phytotaxa*, 479(3), 287-294. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.479.3.5>
- Lone, S.A., Hassan, Q.P., & Gupta, S. (2019). Development of DNA barcode for rapid identification of *Epimedium elatum* (Morren & Decne) from Northwestern Himalayas in India. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 13(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2019.100205>
- Mishra, P., Kumar, A., Nagireddy, A., Shukla, A.K., & Sundaresan, V. (2017). Evaluation of single and multilocus DNA barcodes towards species delineation in complex tree genus *Terminalia*. *PLoS ONE*, 12(8), 1-18.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182836>
- Mulyawan, R.P., Nurhaidha, R.T., & Supriyatna, A. (2023). Identification and benefits of the Cucurbitaceae family at Negeri Labu Lembang Tourist Locatio. *International Journal of Engineering, Economic, Social Politic and Government*, 1(3), 44-53. <https://doi.org/10.26638/ijespg.v1i3.22>
- Muthi'ah, S.N., & Jannah, M. (2023). In silico phylogenetic analysis of orange species (*Citrus spp.*) based on ITS sequences. *Bio Sains: Jurnal Ilmiah Biologi*, 2 (2), 62-66. <https://doi.org/10.34005/bio-sains.v2i2.2106>
- Park, I., Song, J.H., Yang, S., Chae, S., & Moon, B.C. (2021). Plastid phylogenomic data offers novel insights into the taxonomic status of the *Trichosanthes kirilowii* complex (Cucurbitaceae) in South Korea. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.559511>
- Priyadi, A., Asih, N.P.S., & Erlinawati, I. (2022). Reconstructing phylogenies of *Alocasia* spp. (Araceae) distributed in Indonesia for conservation prioritization: Reconstructing phylogenies of *Alocasia* spp. (Araceae). *Journal of Tropical Life Science*, 12(3), 317–323. <https://doi.org/10.11594/jtls.12.03.04>
- Ramesh, G.A., Mathewa, D., Johnb, K.J., & Ravisankarc, V. (2022). Chloroplast gene *matK* holds the barcodes for identification of *Momordica* (Cucurbitaceae) species from Indian subcontinent. *Horticultural Plant Journal*, 8(1), 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.04.001>
- Schwarzkopf, E.J., Motamayor, J.C., & Cornejo, O.E. (2020). Genetic differentiation and intrinsic genomic features explain variation in recombination hotspots among cocoa tree populations. *BMC Genomics*, 21, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6746-2>
- Slipiko, M., Myszczyszki, K., Buczkowska, K., Bączkiewicz, A., Sawicki, J. (2022). Super-mitobarcoding in plant species identification? it can work! the case of leafy liverworts belonging to the genus *Calypogeia*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms232415570>
- Sumarlina, & Napitupulu, T.S. (2023). Evaluasi Aplikasi dna barcode lokus *psbA-trnH* pada Genus *Momordica*. *Jurnal Biotek*, 1(2), 182-195. <https://doi.org/10.24252/jb.v1i1i2.37914>
- Wathon, S., Astikaningrum, D., Ardyah, N.P.C., Oktarianti, R., & Senjarini, K. (2023). In silico exploration of the potential barcode DNA in *Anopheles* sp., a malarian vector from Indonesia. *Jurnal Biolokus: Jurnal Penelitian Pendidikan Biologi dan Biologi*, 6(1), 96-110. <https://doi.org/10.30821/biolokus.v6i1.1749>
- Yu, J., Wu, X., Liu, C., Newmaster, S., Ragupathy, B., & Kress, W.J. (2021). Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111691>