

## Multilocus Analysis of *matK*, *atpB-rbcL* Intergenic Spacer, and *trnL-trnF* Intergenic Spacer in Pandanaceae

Fatma Jumaita Putri<sup>1</sup>, Herman<sup>1</sup>, Dewi Indriyani Roslim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia;

### Article History

Received : April 02<sup>th</sup>, 2025

Revised : May 05<sup>th</sup>, 2025

Accepted : May 06<sup>th</sup>, 2025

\*Corresponding Author: Dewi Indriyani Roslim, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia;  
Email: [dewiindriyaniroslim@gmail.com](mailto:dewiindriyaniroslim@gmail.com)

**Abstract:** Species within the Pandanaceae family, particularly those in the *Pandanus* genus, exhibit substantial morphological variation, often leading to challenges in accurate species identification. This study conducted a multilocus DNA barcode analysis using sequences of *matK*, *atpB-rbcL* Intergenic Spacer (IGS), and *trnL-trnF* Intergenic Spacer (IGS) obtained from GenBank. Sequence alignment was performed using MAFFT v.7, and the aligned sequences were concatenated into multilocus datasets. Further analyses included frequency data evaluation and phylogenetic tree construction using the Neighbor Joining method in MEGA11. Results revealed that *matK* had the highest number of conserved sites and the greatest genetic stability, making it particularly effective for identifying broader taxonomic groups. In contrast, *atpB-rbcL* IGS and *trnL-trnF* IGS showed greater genetic variation, useful for distinguishing species with similar morphological features. Phylogenetic trees based on single- or two-locus data often failed to group species accurately, while multilocus combinations yielded well-resolved and more reliable tree structures. Therefore, the combined use of *atpB-rbcL* IGS + *matK* + *trnL-trnF* IGS significantly improves species resolution and reduces taxonomic misidentification within Pandanaceae. This study underscores the importance of multilocus barcoding in addressing limitations of morphological classification and enhancing molecular taxonomy in morphologically complex plant groups.

**Keywords:** *atpB-rbcL* Intergenic Spacer, DNA barcode, *matK*, multilocus analysis, pandanaceae family, *trnL-trnF* Intergenic Spacer.

### Pendahuluan

Tanaman memiliki peran penting dalam keberlangsungan ekosistem serta kehidupan manusia, baik sebagai sumber pangan, obat-obatan, maupun bahan baku industri. Keanekaragaman hayati tumbuhan tropis yang tinggi menyimpan potensi besar bagi eksplorasi ilmiah, namun juga menghadirkan tantangan dalam proses identifikasi spesies, khususnya pada famili tumbuhan yang memiliki banyak anggota dengan karakteristik morfologis yang mirip. Salah satu famili tumbuhan yang menunjukkan keragaman tinggi tersebut adalah Pandanaceae, yang terdiri dari pohon, semak, hingga liana berkayu. Tanaman dari famili ini

memiliki ciri khas berupa batang yang bisa bercabang atau tidak, dengan bekas daun melingkar yang tetap terlihat. Terdapat lima genus utama dalam famili ini, yaitu *Pandanus*, *Freycinetia*, *Benstonea*, *Martellidendron*, dan *Sararanga* (Puspita *et al.* 2024).

Namun, proses identifikasi spesies dalam famili Pandanaceae sering kali menemui hambatan akibat kemiripan ciri morfologis antarspesies terutama dari genus *Pandanus*. Karakteristik yang tumpang tindih menyebabkan spesies yang berbeda tampak serupa, seperti yang terjadi pada *Pandanus odorifer* yang dilaporkan memiliki sinonim berbeda seperti *P. tectorius*, *P. odoratissimus*, dan *P. fascicularis* (Aluri *et al.* 2020). Ketidakakuratan dalam mengidentifikasi

spesies tidak hanya berdampak pada kesalahan taksonomi, tetapi juga dapat mengaburkan rekonstruksi pohon filogenetik dan pemahaman mengenai hubungan evolusi antarspesies (*Monalisa et al.* 2019). Padahal pengetahuan tentang kekerabatan evolusioner sangat penting sebagai dasar konservasi, pemuliaan, dan pemanfaatan berkelanjutan terhadap kekayaan hayati serta menghindari kesalahan dalam pemanfaatan suatu spesies tumbuhan tertentu secara internasional (*Simbolon et al.* 2021).

Upaya untuk mengatasi keterbatasan identifikasi berbasis morfologi, yaitu dengan teknik molekuler seperti barkoding DNA telah digunakan sebagai solusi alternatif yang lebih akurat. Teknik ini memanfaatkan urutan pendek DNA yang disebut barkode DNA untuk membedakan spesies secara cepat dan tepat (*Rohimah et al.* 2018). Barkode DNA dapat diperoleh dari genom inti (nDNA), kloroplas (cpDNA), atau mitokondria (mtDNA) (*Rahayu & Jannah*, 2019). Beberapa marker dari kloroplas yang sering digunakan untuk tumbuhan antara lain adalah gen penyandi protein seperti *matK* dan wilayah non-penyandi seperti intergenic spacer *atpB-rbcL IGS* dan *trnL-trnF IGS* (*Roslim et al.* 2023). Identifikasi berbasis multilokus, yang melibatkan lebih dari satu marker, terbukti mampu meningkatkan ketepatan analisis karena memperhitungkan keragaman genetik yang lebih luas. Pendekatan multilokus, memungkinkan studi taksonomi yang lebih mendalam terhadap spesies atau genus yang secara filogenetik berkerabat dekat (*Liu et al.* 2017).

Penelitian ini dilakukan sebagai upaya untuk mengidentifikasi spesies dalam famili *Pandanaceae* secara molekuler dengan pendekatan multilokus menggunakan sekuens DNA *matK*, *atpB-rbcL IGS*, dan *trnL-trnF IGS* yang dikoleksi dari database GenBank. Identifikasi spesies secara akurat sangat krusial dalam konservasi tumbuhan, analisis filogeni, dan pelestarian biodiversitas tropis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji efektivitas analisis multilokus dalam meningkatkan ketepatan klasifikasi dan mengurangi kesalahan identifikasi spesies dalam famili *Pandanaceae*, sehingga hasilnya dapat memberikan kontribusi terhadap pengembangan taksonomi molekuler yang lebih baik pada kelompok tumbuhan tropis.

## Bahan dan Metode

### Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai dengan Desember 2024, bertempat di Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Riau.

### Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental deskriptif dengan pendekatan barkoding DNA, yang bertujuan untuk mengidentifikasi spesies dalam famili *Pandanaceae* berdasarkan variasi genetik dari sekuens DNA *matK*, *atpB-rbcL IGS* dan *trnL-trnF IGS*. Analisis filogenetik dilakukan untuk menyusun pohon filogenetik guna membedakan spesies berdasarkan data sekuens genetik.

### Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah sekuens DNA dari spesies dalam famili *Pandanaceae* yang tersedia dalam basis data GenBank. Sampel penelitian terdiri atas 34 sekuens DNA dari tiga lokus yaitu *matK*, *atpB-rbcL IGS*, dan *trnL-trnF IGS* yang mewakili beberapa spesies dari famili *Pandanaceae*, serta satu spesies *outgroup* yaitu *Cyclanthus bipartitus*. Teknik sampling dilakukan secara *purposive*, yaitu dengan memilih sekuens DNA yang tersedia pada masing-masing lokus yang dibutuhkan, sebagaimana digunakan dalam penelitian sejenis (*Hebert et al.* 2003). Variabel yang diteliti meliputi keberadaan situs konservatif, variasi genetik, dan struktur filogenetik yang dihasilkan dari masing-masing sekuens. Data dikumpulkan melalui pengunduhan sekuens DNA dari GenBank dalam format FASTA, yang kemudian disimpan dan dikelompokkan sesuai dengan jenis barkode DNA. Analisis dilakukan menggunakan perangkat lunak MAFFT v.7 untuk multiple sequence alignment, BioEdit v.7.2 untuk pengeditan dan penggabungan sekuens, serta MEGA11 untuk analisis statistik dan konstruksi pohon filogenetik.

### Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dimulai dengan mengunduh sekuens DNA *matK*, *atpB-rbcL IGS*, dan *trnL-trnF IGS* dari GenBank dalam format

FASTA. Sekuens yang diunduh kemudian diselaraskan menggunakan perangkat lunak MAFFT v.7 yang mengadopsi metode FFT (*Fast Fourier Transform*) dengan prinsip kerja mencari segmen homolog dan menggunakannya sebagai jangkar untuk membagi sekuens, kemudian membuat penyelarasan hanya pada segmen-segmen tersebut (Wei *et al.* 2022). Setelah proses penyelarasan, dilakukan pemeriksaan arah sekuens menggunakan plot hasil MSA.

Sekuens yang arahnya telah sesuai atau yang arahnya dimulai dari *forward* akan ditandai dengan warna plots merah, sedangkan sekuens yang terbalik atau yang arahnya dimulai dari *reverse* akan ditandai dengan warna plots biru. Sekuens yang tidak sesuai arah dibalik menggunakan Bioedit v.7.2. Sekuens yang telah diselaraskan dan dirapikan kemudian digabungkan menjadi sekuens multilokus dengan Bioedit v.7.2. Data kemudian dianalisis untuk menghitung frekuensi nukleotida, pasangan basa, dan keanekaragaman nukleotida. Pohon filogenetik dibangun menggunakan metode Neighbor Joining dengan 1000 ulangan bootstrap.

### Analisis data penelitian

Analisis data sebelum membuat pohon filogenetik dapat dilakukan dengan menggunakan software MEGA11. Analisis frekuensi nukleotida dapat dilakukan dengan menggunakan menu "*nucleotide composition*". Perhitungan pasangan basa nukleotida dilakukan melalui "*nucleotide pair frequencies*". Analisis situs nukleotida dilakukan dengan memilih menu C (*conserved site*), V (*variable site*), Pi (*parsimony informative site*), dan S (*singleton*

*site*) untuk menghitung total serta persentase dari masing-masing situs baik situs yang bersifat konservatif maupun yang bervariasi. Keanekaragaman nukleotida dihitung menggunakan "*Neutrality Tajima's Test*".

Sekuens FASTA pada lokus tunggal maupun multilokus, selanjutnya dianalisis menggunakan aplikasi MEGA11 untuk memilih model substitusi berdasarkan kriteria statistik AIC (*Akaike Information Criterion*) dan BIC (*Bayesian Information Criterion*), setelah model substitusi didapatkan maka kontruksi pohon filogenetik dilakukan dengan metode '*neighbor joining*' menggunakan bootstrap 1000 ulangan dan model substitusi tertentu (Mursyidin & Makruf 2020). Konstruksi dilakukan dengan menggunakan perangkat MEGA11. Pohon filogenetik yang dihasilkan, diunduh dalam format PNG untuk melakukan analisis dan interpretasi data lebih lanjut.

### Hasil dan Pembahasan

Sekuens *atpB-rbcL Intergenic Spacer (IGS)*, *matK*, dan *trnL-trnF IGS* dari famili Pandanaceae telah diperoleh dari basis data NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabel 1.). Panjang konsensus masing-masing sekuens yang telah diperoleh yaitu 950 pb untuk *atpB-rbcL IGS*, 1540 pb untuk *matK*, dan 1057 pb untuk *trnL-trnF IGS*. Sementara itu, panjang konsensus dari kombinasi sekuens yaitu *atpB-rbcL IGS + matK*, *atpB-rbcL IGS + trnL-trnF IGS*, *matK + trnL-trnF IGS*, dan *atpB-rbcL IGS + matK + trnL-trnF IGS* masing-masing secara berurutan yaitu 2495 pb, 2014 pb, 2590 pb, dan 3515 pb.

**Tabel 1.** Nomor aksesori spesies pada famili Pandanaceae yang diteliti

No	Genus	Spesies	Nomor Aksesori		
			<i>matK</i>	<i>atpB-rbcL IGS</i>	<i>trnL-trnF IGS</i>
1.	<i>Freycinetia</i>	<i>Freycinetia cumingiana</i>	OL689995.1	AY337633	AY337677.1
		<i>Freycinetia formosana</i>	AB040209.2	AB679397.1	AB679448.1
		<i>Freycinetia scandens</i>	MH332565.1	KX544894	KJ681592.1
		<i>Freycinetia excelsa</i>	KU564576.1	-	JX286938.1
		<i>Freycinetia banksii</i>	KT205118.1	-	KJ681531
		<i>Freycinetia urvilleana</i>	JX286869	KX544895	JX287004
		<i>Freycinetia monticola</i>	JX286753	KX544893	KX545069
		<i>Freycinetia marginata</i>	JX286800	KX544892	JX286956
		<i>Freycinetia angustissima</i>	-	AY337635	AY337679
		<i>Freycinetia javanica</i>	-	AY337634	KU853244.1
2.	<i>Pandanus</i>	<i>Pandanus tectorius</i>	JN407171.1	-	KJ681556.1

	<i>Pandanus odorifer</i>	KU127468.1	JQ220373	JQ220388.1
	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	JX286802.1	JQ220362	KJ681507.1
	<i>Pandanus boninensis</i>	LC680642.1	-	KJ681530.1
	<i>Pandanus odoratissimus</i>	JX286717.1	AY337627	KJ681553.1
	<i>Pandanus utilis</i>	JX286875.1	KX544903	KJ681520.1
	<i>Pandanus palustris</i>	JX286734	AY337631	JX286901
	<i>Pandanus unguifer</i>	-	JQ220376	JQ220391
	<i>Pandanus furcatus</i>	KR531334	JQ220368	KJ681502.1
	<i>Pandanus maximus</i>	JX286726	KX544900	KX545079
3.	<i>Martellidendron hornei</i>	MT046147.1	AY337632.1	KJ681504.1
	<i>Martellidendron karaka</i>	JX286739.1	KX544896	JX286904.1
	<i>Martellidendron gallinarum</i>	-	AY337625	AY337669
4.	<i>Sararanga sinosa</i>	KT204605.1	AY337638	KJ681519.1
	<i>Sararanga philippinensis</i>	JX286873	KX544904	KJ681513.1
5.	<i>Benstonea copelandii</i>	OL690098.1	KX544868	KX545034.1
	<i>Benstonea lauterbachii</i>	JX286796	KX544855	KJ681568.1
	<i>Benstonea sp. 'Kajuik Lake' isolate DIR013</i>	KY503024	-	-
	<i>Benstonea Herbacea</i>	KX544914	KX544872	KX545039
	<i>Benstonea sp. voucher DIR127</i>	OQ942622	-	-
	<i>Benstonea sp. voucher DIR121</i>	OQ325045	-	-
	<i>Benstonea brevistylis</i>	-	KX544861	KX545021
	<i>Benstonea gibbsiana</i>	-	KX544871	KX545037
	<i>Benstonea ornata</i>	-	KX544879	KX545048

### Frekuensi Nukleotida Kandidat Barkode DNA

Analisis awal dilakukan untuk melihat komposisi nukleotida dari tiga kandidat sekuens barkode DNA, yaitu *atpB-rbcL IGS*, *matK*, dan *trnL-trnF IGS* pada famili Pandanaceae. Komposisi ini memberikan gambaran mengenai kecenderungan struktur kimia dan kestabilan

DNA yang dapat mempengaruhi keandalan setiap sekuens sebagai penanda molekuler. Masing-masing sekuens menunjukkan komposisi basa yang berbeda, namun secara umum memperlihatkan dominasi pada basa Adenin dan Timin. Hasil analisis ini disajikan dalam bentuk Tabel 2.

**Tabel 2.** Frekuensi rata-rata nukleotida kandidat barkode DNA pada famili Pandanaceae

Sekuens	Frekuensi Nukleotida Rata-Rata (%)					
	A	G	C	T	(A+T)	(G+C)
<i>atpB-rbcL IGS</i>	32,5	15,4	14,3	37,7	70,2	29,7
<i>matK</i>	30,1	15,2	17,7	37,0	67,1	32,9
<i>trnL-trnF IGS</i>	33,1	18,0	15,1	33,8	66,9	33,1
<i>atpB-rbcL IGS + matK</i>	31,1	15,4	16,2	37,3	68,4	31,6
<i>atpB-rbcL IGS + trnL-trnF IGS</i>	35,9	16,7	14,6	35,9	71,8	31,3
<i>matK + trnL-trnF IGS</i>	31,1	16,4	16,7	35,9	67,0	33,1
<i>atpB-rbcL IGS + matK, + trnL-trnF IGS</i>	31,6	16,1	15,9	36,4	68,0	32,0

Komposisi nukleotida dari ketiga sekuens barkode menunjukkan proporsi A+T yang lebih tinggi dibandingkan G+C. Hal ini konsisten dengan karakter umum DNA kloroplas tanaman yang cenderung kaya basa AT (Wang & Obbard, 2023). Sekuens *atpB-rbcL IGS* memiliki

frekuensi AT tertinggi (70,2%), mengindikasikan bahwa daerah ini relatif lebih labil dan mudah mengalami mutasi dibandingkan dengan *matK* (67,1%) dan *trnL-trnF IGS* (66,9%). Adapun kombinasi dari ketiga konsensus masing-masing sekuens juga memperlihatkan persentase basa AT

yang tetap lebih tinggi dibandingkan dengan persentase basa GC. Hal ini mengindikasikan bahwa wilayah tersebut rentan mengalami mutasi karena lemahnya energi ikatan antar basa.

Komposisi nukleotida dapat mempengaruhi efektivitas barcode DNA dalam mengidentifikasi spesies. Menurut Gu *et al.* (2024), wilayah yang kaya AT cenderung lebih bervariasi, sehingga lebih efektif dalam membedakan spesies yang memiliki kemiripan morfologi. Dengan demikian, meskipun *matK* lebih stabil, kombinasi dengan *IGS* yang bervariasi memberikan informasi taksonomi yang lebih kuat. Kelebihan dari analisis multilokus seperti pada kombinasi ketiga marker (68% AT) terletak pada keseimbangan antara stabilitas dan variabilitas genetik. Ini sejalan dengan temuan Liu *et al.* (2017) bahwa multilokus dapat meningkatkan akurasi

klasifikasi spesies. Komposisi ini memiliki implikasi penting dalam pemilihan marker optimal untuk identifikasi taksonomi tumbuhan tropis yang kompleks.

### Jumlah Pasangan Nukleotida dan Frekuensi Situs Nukleotida Kandidat Barcode DNA

Analisis selanjutnya dilakukan untuk mengevaluasi jumlah pasangan basa identik, transisi, dan transversi pada masing-masing sekuens. Selain itu, dihitung juga frekuensi situs konservatif, variabel, informatif secara parsimonis, dan *singleton* untuk mengetahui tingkat variasi genetik dalam dan antar spesies (Tabel 3.). Parameter-parameter ini digunakan untuk mengkaji tingkat kestabilan dan laju evolusi dari masing-masing sekuens, yang penting dalam studi filogenetik dan diferensiasi taksonomi.

**Tabel 3.** Jumlah total pasangan nukleotida dan frekuensi situs nukleotida kandidat barcode DNA pada famili Pandanaceae

Sekuens	Jumlah pasangan nukleotida				Frekuensi situs nukleotida							
	ii	si	sv	R	CS		VS		PIS		SS	
					Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
<i>atpB-rbcL IGS</i>	630	10	15	0,6	640	63,3	172	18,1	73	7,7	99	10,4
<i>matK</i>	751	10	4	2,7	1405	91,0	125	8,1	56	0,4	69	4,5
<i>trnL-trnF IGS</i>	441	10	12	0,8	658	62,3	342	32,4	47	4,4	277	26,2
<i>atpB-rbcL IGS + matK</i>	1397	22	20	1,1	2062	82,6	277	11,1	119	4,7	157	6,3
<i>atpB-rbcL IGS + trnL-trnF IGS</i>	1047	21	29	0,7	1302	64,7	492	24,4	115	5,7	369	18,3
<i>matK + trnL-trnF IGS</i>	1271	17	9	1,9	2299	88,7	200	7,7	82	3,2	118	4,6
<i>atpB-rbcL IGS + matK + trnL-trnF IGS</i>	1885	28	25	1,1	2952	83,9	354	10,1	146	4,2	207	5,9

**Keterangan:** *ii* = Pasangan identik, *si* = Pasangan transisi, *sv* = Pasangan transversi,  $R = si/sv$  (Rasio pasangan transisi dan pasangan transversi), *CS* = *Conserved Site*, *VS* = *Variable Site*, *PIS* = *Parsimony Informative Site*, dan *SS* = *Singleton Site*

Jumlah pasangan identik mengacu kepada jumlah posisi pada dua atau lebih sekuens yang dibandingkan memiliki nukleotida yang identik. Hasil menunjukkan bahwa jumlah pasangan identik (*ii*) tertinggi pada ketiga sekuens unilokus barcode DNA yang digunakan terdapat pada sekuens *matK* dibandingkan dengan daerah *IGS*. Hal ini dikarenakan daerah *IGS* memiliki tingkat mutasi lebih tinggi karena non-kodingnya dibandingkan dengan gen pengkode protein *matK* (Gu *et al.* 2024).

Laju transisi merujuk kepada istilah perubahan nukleotida yang terjadi karena adanya

pertukaran purin (A ↔ G) atau pirimidin (C ↔ T) dalam DNA, sedangkan untuk laju transversi merujuk kepada istilah perubahan basa nukleotida purin dengan pirimidin ataupun sebaliknya. Adapun laju transisi pada *matK* dan kombinasinya dengan sekuens lain lebih tinggi dibandingkan dengan laju transversinya, hal ini didukung oleh data rasio laju transisi dan transversi (*R*) yang melebihi satu. Hal sebaliknya terjadi pada konsensus daerah *atpB-rbcL IGS* dan *trnL-trnF IGS* beserta kombinasi antar keduanya yang menunjukkan bahwa laju transversi lebih tinggi dibandingkan dengan laju transisinya, hal

ini didukung oleh data rasio laju transisi dan transversi (R) yang kurang dari satu. Menurut Li *et al.* (2021), pola transisi dan transversi basa dalam sekuens ini terkait dengan perbedaan antar spesies.

Pola transisi dan transversi dalam genom mengungkap sejarah evolusi melalui perbandingan mutasi DNA. Transisi lebih umum terjadi karena memiliki dampak minimal pada protein, sehingga lebih diterima oleh seleksi alam. Sebaliknya, transversi sering menyebabkan perubahan signifikan pada fungsi gen dan lebih cenderung dieliminasi. Dominasi laju transisi menunjukkan evolusi konservatif, seperti pada gen vital yang dipertahankan fungsinya oleh seleksi alam, sedangkan dominasi transversi sering terjadi pada wilayah non-penyandi dengan evolusi cepat. Dalam analisis filogenetik, pola mutasi ini membantu memahami hubungan evolusi dan tingkat perubahan antar spesies sepanjang waktu (Stoltzfus & Norris 2015).

Adapun analisis situs nukleotida pada kandidat sekuens barkode pada daerah *matK* menunjukkan stabilitas genetik tertinggi yang mengindikasikan bahwa daerah ini memiliki nilai situs konservasi dengan persentase tertinggi antara ketiga barkode tunggal yang digunakan, yaitu sebesar 91%. Hal yang sama juga terdapat pada kombinasi antara sekuens *matK* dengan sekuens lainnya. Berbeda halnya dengan daerah *Intergenic Spacer* tepatnya pada daerah *trnL-trnF IGS* yang memiliki nilai situs variabilitas tertinggi dibandingkan dengan situs lainnya sebesar 32,4%, hal ini menunjukkan bahwa daerah tersebut memiliki variasi genetik tertinggi. Daerah yang memiliki variasi genetik

tertinggi dapat digunakan untuk membedakan spesies secara taksonomi (Rahayu & Jannah 2019).

Adapun nilai *Parsimony Informative Site* menunjukkan bahwa daerah *atpB-rbcL IGS* memiliki persentase paling tinggi sebesar 7,7%, sedangkan untuk persentase *Singleton Site* (SS) tertinggi terdapat pada daerah *trnL-trnF IGS* sebesar 26,2%. Menurut Kress & Erikson (2007), situs PIS merupakan situs yang dapat memberikan informasi tentang hubungan evolusioner antar takson. Hal ini dikarenakan situs ini mengandung setidaknya dua jenis nukleotida yang masing-masing muncul lebih dari satu kali dalam sekuens DNA di beberapa spesies. Berbeda halnya dengan situs PIS, situs SS hanya muncul pada satu sekuens tertentu, sehingga kurang informatif dalam menggambarkan hubungan kekerabatan antar takson karena keberadaannya terbatas pada satu sekuens saja.

#### Keanekaragaman Nukleotida

Penilaian terhadap tingkat variasi genetik yang lebih dalam, dapat dilakukan analisis terhadap keanekaragaman nukleotida ( $\pi$ ), laju substitusi nukleotida ( $\Theta$ ), dan statistik uji Tajima's D. Parameter ini mencerminkan sejauh mana variasi genetik menyebar dalam populasi spesies yang diuji, serta mendeteksi tekanan seleksi atau sejarah populasi. Nilai-nilai ini dianalisis pada masing-masing sekuens tunggal maupun kombinasi multilokus guna memperoleh gambaran yang lebih komprehensif. Analisis keanekaragaman nukleotida pada masing-masing spesies dalam famili Pandanaceae dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Analisis keanekaragaman nukleotida sekuens barkode DNA pada famili Pandanaceae

Sekuens	m	S	Ps	$\Theta$	$\pi$	D
<i>atpB-rbcL IGS</i>	28	172	0,181	0,047	0,026	-1,724
<i>matK</i>	28	125	0,081	0,021	0,009	-2,152
<i>trnL-trnF IGS</i>	32	84	0,196	0,049	0,026	-1,739
<i>AtpB-rbcL IGS + matK</i>	21	277	0,111	0,031	0,017	-1,905
<i>atpB-rbcL IGS + trnL-trnF IGS</i>	28	492	0,244	0,063	0,024	-2,411
<i>matK + trnL-trnF IGS</i>	25	200	0,077	0,020	0,009	-2,036
<i>atpB-rbcL IGS + matK + trnL-trnF IGS</i>	21	354	0,101	0,028	0,015	-1,925

**Keterangan:** m = jumlah sekuens, S = jumlah situs yang bersegregasi (*segregating sites*),  $p_s = S/n$  (Proporsi situs segregasi), n = panjang sekuens DNA,  $\Theta$  = laju substitusi nukleotida,  $\pi$  = keanekaragaman nukleotida, dan D = statistik uji Tajima

Sekuens *trnL-trnF IGS* memiliki jumlah situs segregasi paling rendah antara ketiga

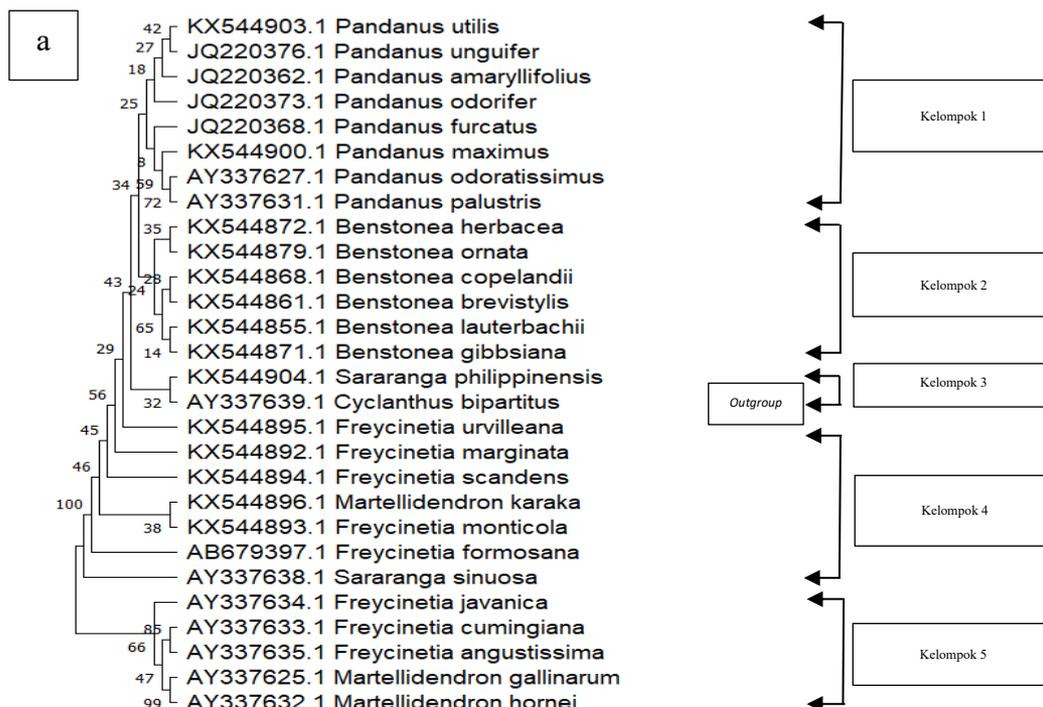
sekuens barkode lainnya yaitu sekitar 84. Adapun kombinasi dari beberapa sekuens *atpB-*

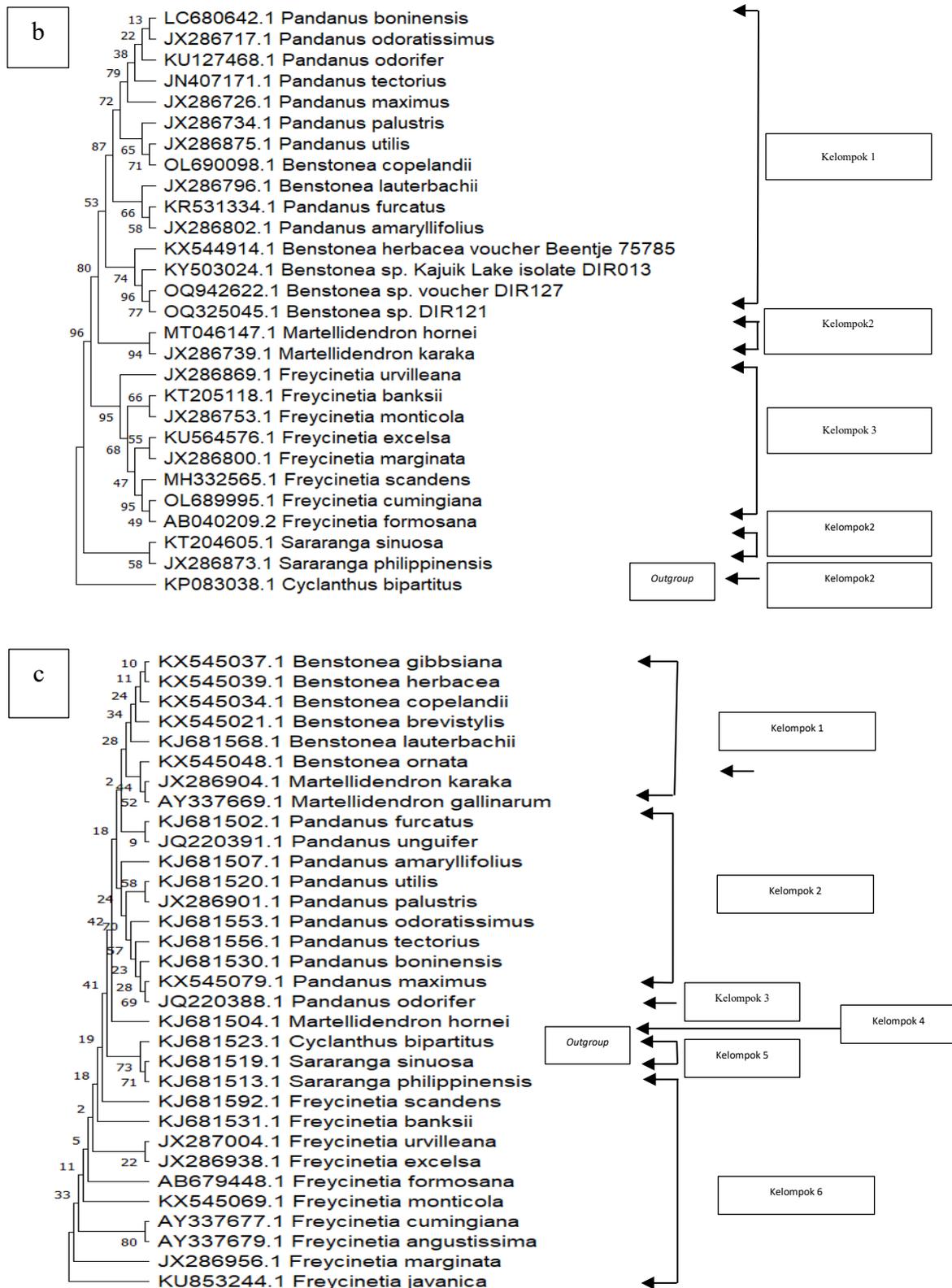
*rbcL* IGS, *matK*, dan *trnL-trnF* IGS memiliki jumlah situs segregasi yang lebih tinggi dari 200. Situs segregasi menunjukkan posisi dalam sekuens DNA yang bervariasi. Sekuens *trnL-trnF* IGS dan kombinasinya juga menunjukkan nilai keanekaragaman genetik ( $\theta$ ) tertinggi, yang mengindikasikan bahwa tingkat variasi genetik yang signifikan dalam wilayah tersebut.

Adapun istilah keanekaragaman nukleotida ( $\pi$ ) merujuk kepada rata-rata jumlah perbedaan nukleotida persitus antara setiap pasangan individu dalam suatu populasi. Masing-masing sekuens menunjukkan nilai keanekaragaman nukleotida yang bervariasi. Nilai keanekaragaman nukleotida ( $\pi$ ) akan memberikan pengaruh pada berbagai aspek diantaranya ketahanan terhadap penyakit, respon terhadap perilaku, lingkungan, dan juga produktivitas (Kusuma *et al.* 2021). Nilai  $\pi$  tertinggi ditemukan pada sekuens *atpB-rbcL* IGS dan *trnL-trnF* IGS (0,026), yang mengindikasikan tingkat keragaman genetik yang tinggi. Sebaliknya, *matK* menunjukkan nilai  $\pi$  rendah (0,009) dengan nilai D paling

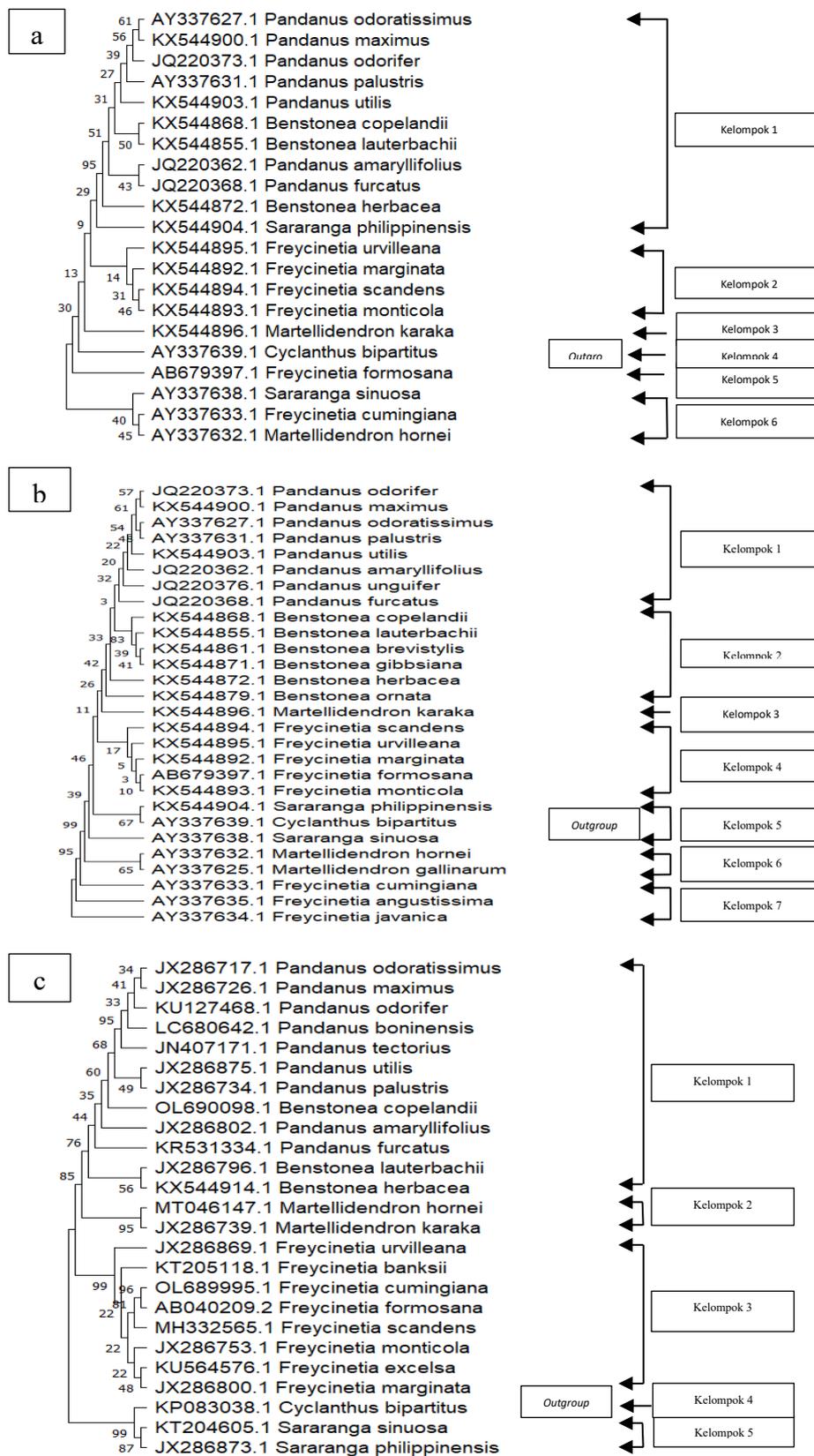
negatif (-2,152), mencerminkan kemungkinan adanya seleksi positif atau perluasan populasi (Triandiza *et al.* 2024). Proporsi situs segregasi ( $P_s$ ) juga bervariasi antar sekuens, mencerminkan pola variasi genetik berbeda yang dibandingkan dengan panjang sekuens DNA yang diamati dalam famili Pandanaceae.

Perbedaan nilai Tajima's D memberikan informasi penting tentang dinamika populasi. Nilai negatif mengindikasikan kelebihan mutasi langka, yang bisa menunjukkan seleksi arah atau peristiwa bottleneck. Hal ini menguatkan pemahaman bahwa *matK* sebagai gen konservatif kurang sensitif dalam mendeteksi variasi intraspesifik. Hasil ini menunjukkan bahwa kombinasi multilokus mampu menangkap keanekaragaman yang tidak tercermin dari satu marker saja, sejalan dengan pendekatan yang disarankan oleh Kress & Erikson (2007) dalam studi barkoding global. Implikasi dari analisis ini adalah perlunya pendekatan kombinasi multilokus untuk studi keanekaragaman hayati dan konservasi tumbuhan tropis secara lebih akurat.

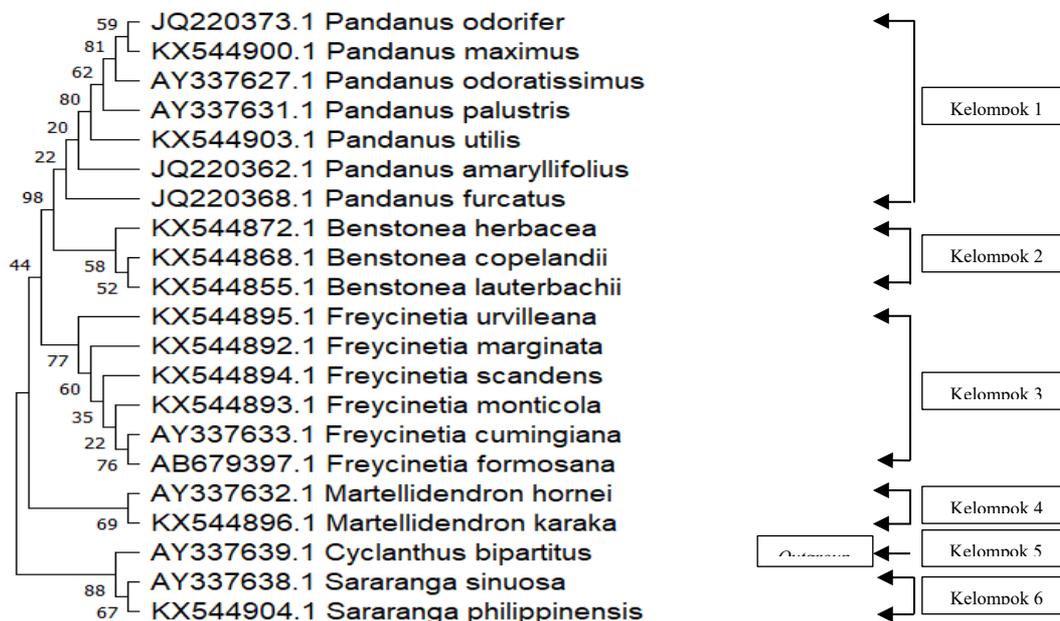




**Gambar 1.** Pohon filogenetik unilokus berdasarkan sekuens (a) *atpB-rbcL* IGS, (b) *matK*, (c) *trnL-trnF* IGS menggunakan metode neighbor- joining dengan uji bootstrap 1.000 ulangan



**Gambar 2.** Pohon filogenetik bilokus berdasarkan sekuens (a) *atpB-rbcL IGS + matK*, (b) *atpB-trnL IGS + trnL-trnF IGS*, (c) *matK + trnL-trnF IGS* menggunakan metode neighbor- joining dengan uji bootstrap 1.000 ulangan



**Gambar 3.** Pohon filogenetik berdasarkan sekuens *atpB-rbcL* IGS, *matK* dan *trnL-trnF* IGS (multilokus) menggunakan metode neighbor-joining dengan uji bootstrap 1.000 ulangan

### Analisis Filogenetik

Pohon filogenetik yang dihasilkan menunjukkan hubungan evolusi antar spesies yang dianalisis. Berdasarkan struktur pohon filogenetik yang terbentuk, beberapa spesies dalam famili Pandanaceae tidak dapat mengelompok dengan baik menggunakan sekuens *atpB-rbcL* IGS, *matK*, dan *trnL-trnF* IGS (Gambar 1) beserta kombinasi antar dua sekuens seperti *atpB-rbcL* IGS + *matK*, *atpB-rbcL* IGS + *trnL-trnF* IGS, dan *matK* + *trnL-trnF* IGS (Gambar 2). Sebaliknya, dengan menggunakan sekuens multilokus yang merupakan gabungan dari ketiga sekuens barcode yaitu *atpB-rbcL* IGS + *matK* + *trnL-trnF* IGS dapat menghasilkan pohon filogenetik yang dapat mengelompok dengan baik serta memiliki kemampuan identifikasi yang lebih baik pada tingkat genus (Gambar 3).

Hasil pohon filogenetik unilokus yang menggunakan sekuens *atpB-rbcL* IGS, menghasilkan lima kelompok yang terpisah. Genus *Pandanus* membentuk klad monofiletik besar di bagian atas pohon sebagai kelompok pertama, sementara *Benstonea* membentuk klad tersendiri sebagai kelompok kedua namun tetap berhubungan dekat dengan *Pandanus*. Adapun untuk genus *Sararanga*, *Freycinetia*, dan *Martellidendron* membentuk kelompok-kelompok yang saling saling tumpang tindih,

sehingga penggunaan sekuens *atpB-rbcL* IGS masih belum bisa membedakan spesies dalam famili Pandanaceae secara jelas. Berbeda halnya dengan sekuens *atpB-rbcL* IGS yang bisa membedakan antara genus *Pandanus* dan *Benstonea*, sekuens *matK* belum bisa membedakan antara kedua genus tersebut, namun sekuens ini bisa membedakan kelompok genus lainnya secara jelas. Pohon filogenetik selanjutnya yang dihasilkan menggunakan sekuens unilokus *trnL-trnF* IGS menghasilkan enam kelompok yang terpisah, namun hanya kelompok genus *Pandanus* dan *Freycinetia* saja yang dapat terpisah dengan baik, sedangkan genus lainnya masih tergabung dan tidak jelas pengelompokannya (Gambar 1.).

Selanjutnya, pohon filogenetik bilokus yang dihasilkan dari kombinasi antara dua sekuens *atpB-rbcL* IGS + *matK* menghasilkan pohon dengan 6 kelompok yang terpisah, namun masing-masing genus tergabung satu sama lainnya sehingga pengelompokan spesies dengan menggunakan kombinasi ini masih kurang jelas. Adapun kombinasi antara sekuens *atpB-rbcL* IGS + *trnL-trnF* IGS menghasilkan pohon filogenetik yang kurang lebih sama dengan pohon yang dihasilkan dari sekuens unilokus *atpB-rbcL* IGS, dimana hanya kelompok *Pandanus* dan *Benstonea* saja yang dapat terpisah dengan baik. Kombinasi dua sekuens

selanjutnya yaitu dengan menggunakan *matK* + *trnL-trnF* IGS, menghasilkan pohon filogenetik yang kurang lebih sama dengan pohon yang dihasilkan dari sekuens unilokus *matK*, dimana hanya kelompok *Pandanus* dan *Benstonea* saja yang tidak dapat terpisah dengan baik, namun kelompok genus lainnya dapat terpisah menjadi kelompok yang jelas (Gambar 2.).

Pohon filogenetik yang diperoleh dengan menggunakan barkode unilokus IGS beserta kombinasi antar sekuens, dapat membangun hubungan antar spesies dalam famili Pandanaceae dengan cukup baik, namun kurang optimal untuk genus tertentu. Hal ini bisa disebabkan oleh beberapa hal, salah satunya adalah karena daerah *Intergenic Spacer* memiliki panjang sekuens yang lebih pendek dibandingkan dengan daerah *matK*. Meskipun wilayah IGS memiliki sekuens dengan tingkat variasi yang tinggi, perbedaan Panjang sekuens antar taksa dapat menghambat penyelarasan yang akurat (Pang *et al.* 2012).

Adapun pohon filogenetik yang dihasilkan menggunakan sekuens *matK* menunjukkan keunggulan dalam pengelompokan spesies antar genus dalam famili Pandanaceae secara jelas, namun terdapat kerancuan pengelompokan dalam membedakan antara spesies *Pandanus* dan *Benstonea*. Hal ini bisa disebabkan karena sekuens *matK* yang bersifat lebih konservatif dibandingkan sekuens lainnya, sehingga sekuens ini tidak memiliki cukup variasi nukleotida untuk membedakan spesies atau genus yang berkerabat dekat, seperti *Pandanus* dan *Benstonea* (Mursyidin & Makruf 2020).

Berbeda halnya dengan pohon filogenetik unilokus dan bilokus, hasil analisis dengan menggunakan sekuens multilokus yaitu *atpB-rbcL* IGS + *matK* + *trnL-trnF* IGS menunjukkan bahwa terdapat lima kelompok yang terbentuk dan terpisah dengan baik dalam famili Pandanaceae (Gambar 3.). Kelompok pertama terdiri dari genus *Pandanus* yang membentuk kelompok dengan nilai bootstrap dari 59 hingga 98. Kelompok kedua terdiri dari genus *Benstonea* yang membentuk clade dengan nilai bootstrap 52 hingga 58. Kelompok ketiga terdiri dari spesies *Freycinetia* yang memiliki klad yang lebih kompleks dengan nilai bootstrap 35 hingga 77. Kelompok keempat terdiri dari genus *Martellidendron* dan kelompok kelima terdiri dari genus *Sararanga* yang membentuk klad

terpisah yang menunjukkan bahwa kedua genus ini memiliki hubungan evolusi yang lebih jauh dengan genus *Pandanus*, *Benstonea*, dan *Freycinetia*.

Adapun spesies *outgroup* dalam penelitian ini adalah menggunakan spesies *Cyclanthus bipartius*. Rata-rata hasil pohon filogenetik pada semua barkode DNA, menunjukkan bahwa spesies ini masuk ke dalam spesies *ingroup* dan memiliki hubungan yang dekat dengan spesies *Sararanga*. Secara morfologi, *Cyclanthus bipartitus* dan *Sararanga* menunjukkan kesamaan morfologi yang mencolok, terutama dalam struktur daun dan perbungaan, meskipun berasal dari famili yang berbeda dalam ordo Pandanales.

Salah satu kesamaan morfologi antara *C. bipartius* dengan *Sararanga* berupa daun besar berbentuk pita, perbungaan majemuk menyerupai tongkol (spadix), serta akar serabut, yang mencerminkan adaptasi serupa terhadap habitat tropis meskipun berasal dari famili berbeda dalam ordo Pandanales. Studi perbandingan anatomi struktur reproduktif dalam Cyclanthaceae mengungkapkan bahwa *C. bipartitus* memiliki struktur bunga yang unik, yang menunjukkan beberapa fitur serupa dengan anggota Pandanaceae, seperti *Sararanga* (Sajo *et al.* 2014). Masuknya spesies *outgroup* dalam *ingroup* bisa disebabkan karena evolusi konvergen yang merupakan proses dimana spesies yang tidak terkait secara dekat mengembangkan karakteristik serupa karena adanya adaptasi terhadap lingkungan yang serupa, meskipun spesies-spesies tersebut tidak memiliki leluhur yang sama (Losos 2011).

Variasi sekuens DNA sangat penting untuk membedakan spesies dalam ilmu taksonomi menggunakan metode DNA barkoding. Kombinasi multilokus seperti *atpB-rbcL* IGS + *matK* + *trnL-trnF* IGS digunakan karena memiliki keunggulan masing-masing. Sekuens *atpB-rbcL* IGS dan *trnL-trnF* IGS memiliki variasi tinggi yang dapat membantu membedakan organisme sampai tingkat spesies, sedangkan *matK* bersifat lebih konservatif sehingga berguna untuk mengidentifikasi organisme sampai tingkat genus. Dengan menggabungkan gen-gen tersebut, kemampuan untuk membedakan spesies dapat ditingkatkan secara signifikan dan dapat mengurangi kesalahan identifikasi taksonomi.

Sekuens barkode DNA yang ideal untuk identifikasi spesies harus memiliki perbedaan genetik yang signifikan antara spesies yang berbeda (interspecies) dan antar spesies yang sama (intraspecies) (Li *et al.* 2021). Hal ini berarti bahwa perbedaan genetik antara spesies yang berbeda harus jauh lebih besar dari pada variasi genetik dalam spesies tertentu. Hal ini penting agar barcoding DNA mampu membedakan satu spesies dari spesies lainnya secara jelas agar tidak menyebabkan kesalahan identifikasi. Adanya barkoding gap yang jelas, proses identifikasi spesies menjadi lebih akurat dan efektif. Oleh karena itu, barkoding DNA dapat digunakan sebagai alat yang andal dalam penelitian taksonomi, konservasi, dan pengelolaan keanekaragaman hayati.

## Kesimpulan

Beberapa spesies dalam famili Pandanaceae tidak dapat mengelompok dengan baik menggunakan sekuens unilokus dan bilokus, sebaliknya dengan menggunakan sekuens multilokus dapat menghasilkan pohon filogenetik yang dapat memisahkan masing-masing kelompok spesies dalam famili Pandanaceae dengan baik. Kombinasi multilokus *atpB-rbcL IGS + matK + trnL trnF IGS* dapat memberikan kemampuan dalam membedakan spesies dalam famili Pandanaceae secara signifikan. Hal ini dapat mengurangi kesalahan dalam proses identifikasi taksonomi dibandingkan dengan menggunakan sekuens unilokus dan bilokus.

## Referensi

- Aluri, J. S. R., Lakshminarayana, G., Chappidi, P. R., Baniseti, D. K., Kumari, S., Prasad, K. B. J., Divyasree, M., & Rani, T. S. (2020). Pollination and fruit dispersal in the fragrant screw pine, *Pandanus odorifer* (Forssk.) Kuntze (Pandanaceae). *Species*, 21(67), 113-119.
- Gu, X., Li, L., Zhong, X., Su, Y., Wang, T. (2024). The size diversity of the Pteridaceae family chloroplast genome is caused by overlong intergenic spacers. *BMC Genomics*, 25, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10296-0>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (1512), 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Kress, W. J., Erikson, D. L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *Plos One*, 2(6), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- Kusuma, R. O., Dadiono, M. S., Kusuma, B., Syakuri, H. (2021). Keragaman genetik ikan uceng (*Nemacheilus*) di Sungai wilayah Banyumas berdasarkan sekuens gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI). *Jurnal Perikanan*, 23(2), 89-94. <https://doi.org/10.22146/jfs.61167>
- Liu, J., Jiang, J., Song, S., Tornabene, L., Chabarría, R., Naylor, G. J. P., Li, C. (2017). Multilocus DNA barcoding – species identification with multilocus data. *Scientific Reports*, 7, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16920-2>
- Li, H., Xiao, W., Tong, T., 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, 14-24. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81087-w>
- Losos, J. B. (2011). Convergence, adaptation, and constraint. *Evolution*, 65(7), 1827-1840. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01289.x>
- Monalisa, E., Mantiri, F. R., Lengkoang, H. J. (2019). Kajian variasi sekuens interspecies dan filogeni kelelawar *Pteropus* sp. menggunakan gen COI. *Jurnal MIPA Unsrat Online*, 8(2), 71-77. <https://doi.org/10.35799/jmuo.8.2.2019.24277>
- Mursyidin, D. H., Makruf, M. I. (2020). Keanekaragaman dan kekerabatan genetik *Artocarpus* berdasarkan penanda DNA kloroplas *matK* & *rbcL*: kajian in silico. *Floribunda*, 6(5), 195-206.

- <https://doi.org/10.32556/floribunda.v6i5.2020.322>
- Pang, X., Liu, C., Shi, L., Liu, R., Liang, D., Li, H., Stacey, S., Cherny., Chen, S. (2012). Utility of the *trnH-psbA* Intergenic Spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis. *Plos One*, 7(11), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048833>
- Puspita, A., Hutasuhut, M. A., Rahmadina. (2024). Diversity of the family Pandanaceae in the Sibayak II forest are, North Sumatra. *Jurnal Imiah Biologi Unsoed*, 6(2), 59-64. <https://doi.org/10.20884/1.bioe.2024.6.2.11671>
- Rahayu, D. A., Jannah, M. (2019). *DNA Barkode Hewan dan Tumbuhan Indonesia*. Jakarta Selatan: Yayasan Inspirasi Ide Berdaya. <https://doi.org/10.31237/osf.io/2483a>
- Rohimah, S., Mukarramah, L., Sindiya, V., Yuliana, S. V., Ayu, K. G., Su'udi, M. (2018). Eksplorasi jenis dan potensi DNA barkode anggrek *Thrixspermum* secara in silico. *Jurnal Biodjati*, 3(2), 148-156. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v3i2.3409>
- Roslim, D. I., Herman., Adiwirman., Lestari, W. (2023). *Barkoding DNA (Jilid 1)*. Bantul: KBM Indonesia. <https://penerbitkbm.com/buku/barkoding-dna-jilid-1/>
- Sajo, M. G., Lombardi, J. A., Forzza, R. C., Rudall, J. (2014). Comparative anatomy of reproductive structures in Cyclanthaceae (Pandanales). *International Journal of Plant Sciences*, 175(7), 1-16. <https://doi.org/10.1086/676817>
- Simbolon, A. R., Putra, A. R., Wirawati, I. (2021). Identifikasi spesies menggunakan DNA barkoding dalam menunjang budidaya dan konservasi teripang di Perairan Lampung. *Jurnal Riset Akuakultur*, 16(1), 31-37. <https://doi.org/10.15578/jra.16.1.2021.31-37>
- Triandiza, T., Utami, R. T., Pesilette, R. N. (2024). Karakterisasi morfometri dan DNA barkoding keong lola merah (*Rochia nilotica* Linnaeus, 1767) dari Kepulauan Kei, Maluku. *Jurnal Kelautan Tropis*, 27(3), 451-465. <https://doi.org/10.14710/jkt.v27i3.24411>
- Wang, Y., Obbard, D. J. (2023). Experimental estimates of germline mutation rate in eukaryotes: a phylogenetic meta-analysis. *Evolution Letters*, 7(4), 216-226. <https://doi.org/10.1093/evlett/qrad027>
- Wei, Y., Quan, Z., Furong, T., Liang, Y. (2022). WMSA: a novel method for multiple sequence alignment of DNA sequences. *Bioinformatics*, 38(22), 5019-5025. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac658>