



## ANALISIS FILOGENETIK PADA SPESIES JERUK (*Citrus* spp.) BERDASARKAN SEKUENS ITS SECARA IN SILICO

### In Silico Phylogenetic Analysis of Orange Species (*Citrus* spp.) Based on ITS Sequences

Sari Niswatul Muthi'ah\*, Miftahul Jannah

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam As-Syafi'iyah,  
Jl. Raya Jatiwaringin No.12, Jaticempaka, Kec. Pondokgede, Kota Bekasi, Jawa Barat, 17411

\*Corresponding author: [muthisari01@gmail.com](mailto:muthisari01@gmail.com)

#### Abstrak

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keanekaragaman yang tinggi untuk produk pertanian. Salah satu tanaman tahunan yang berasal dari Asia, khususnya Indonesia, adalah jeruk. Manfaat dari buah jeruk digunakan untuk industri produk buah kalengan, minuman, pektin, asam sitrat, *seed oil*, *peel oil*, *essential distilled oil* dan lain sebagainya, selain itu kulitnya juga dimanfaatkan sebagai penenang, penghalus kulit hingga obat anti nyamuk. Identifikasi hasil pemuliaan tanaman jeruk dapat dilakukan secara molekuler. Maka pada penelitian ini dilakukan studi *in silico* molekuler dengan memanfaatkan data sekuen tanaman jeruk di basis data NCBI. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat kekerabatan dari beberapa spesies *Citrus* berdasarkan sekuens ITS menggunakan analisis pohon filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pohon filogenetik terbagi menjadi 2 kelompok. Kelompok *in group* terbagi dalam dua klad besar yaitu klad 1 dan klad 2. Klad 1 terdiri dari 5 spesies yaitu *Citrus hystrix* 1, *Citrus aurantiifolia* 1, *Citrus hystrix* 2, *Citrus limon* 1 dan *Citrus aurantiifolia* 2. Klad 2 terdiri dari 9 spesies yaitu *Citrus maxima* 1, *Citrus aurantium* 2, *Citrus aurantium* 1, *Citrus maxima* 2, *Citrus sinensis* 1, *Citrus limon* 2, *Citrus reticulata* 2, *Citrus sinensis* 2 dan *Citrus reticulata* 1. Kemudian kelompok *out group* terdiri dari 1 spesies yaitu *Actinidia deliciosa*.

**Kata kunci:** Indonesia; *in silico*; ITS; Jeruk (*Citrus* spp.); Analisis Pohon Filogenetik

#### Abstract

Indonesia is a tropical country that has a high diversity of agricultural products. One of the annual plants originating from Asia, especially Indonesia, is citrus. The benefits of citrus fruits are used for the canned fruit industry, beverages, pectin, citric acid, seed oil, peel oil, essential distilled oil and so on, besides that the skin is also used as a sedative, skin softener and mosquito repellent. Identification of citrus plant breeding results can be done molecularly. So in this study, the identification of citrus plants was carried out molecularly by means of analysis using a phylogenetic tree. The purpose of this study was to examine the kinship of several types of *Citrus* species based on ITS sequences molecularly using phylogenetic tree analysis. The results showed that the phylogenetic tree was divided into 2 groups. The *in group* group is divided into two major clades, namely clade 1 and clade 2. Class 1 consists of 5 species, namely *Citrus hystrix* 1, *Citrus aurantiifolia* 1, *Citrus hystrix* 2, *Citrus limon* 1 and *Citrus aurantiifolia* 2. Clad 2 consists of

9 species, namely *Citrus maxima* 1, *Citrus aurantium* 2, *Citrus aurantium* 1, *Citrus maxima* 2, *Citrus sinensis* 1, *Citrus limon* 2, *Citrus reticulata* 2, *Citrus sinensis* 2 and *Citrus reticulata* 1. Then the out group consisted of 1 species, namely *Actinidia deliciosa*.

**Keywords:** Indonesia; *in silico*; ITS; Orange (*Citrus*); Phylogenetic Tree Analysis

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keanekaragaman yang tinggi untuk produk pertanian. Salah satu tanaman tahunan yang berasal dari Asia, khususnya Indonesia, adalah jeruk (Hanifa *et al.*, 2021). Tanaman ini dapat tumbuh baik di daerah tropis dan subtropis (Adelina *et al.*, 2017). Buah jeruk menjadi peringkat pertama dalam pasar buah internasional. Jeruk merupakan salah satu komoditas hortikultura yang berfungsi sebagai sumber gizi, sumber pendapatan, dan sumber devisa negara (Triani, 2020).

Pada umumnya buah jeruk merupakan sumber vitamin C yang berguna untuk kesehatan manusia. Vitamin C pada buah jeruk terdapat dalam sari buah, daging dan kulit, terutama pada lapisan terluar kulit buah (Adelina *et al.*, 2017). Buah jeruk selain digunakan untuk konsumsi buah segar dan minuman sari buah segar, buah jeruk juga banyak digunakan untuk industri produk buah kalengan, minuman, pektin, asam sitrat, seed oil, peel oil, essential distilated oil, citrus alcohol, citrus wines dan brandies, citrus jams, jelly dan gel yang dapat digunakan sebagai campuran dalam industri makanan dan farmasi (Kosmiatin & Ali, 2018). Selain itu pada kulit jeruk juga banyak memiliki manfaat diantaranya dapat dijadikan sebagai penenang, penghalus kulit hingga obat anti nyamuk (Adelina *et al.*, 2017).

Identifikasi hasil pemuliaan tanaman jeruk dapat dilakukan secara morfologi, anatomi, sitogenetika dan molekuler (Triani, 2020). Sejak akhir abad ke-20, perkembangan biologi molekuler mendukung penelitian di bidang biodiversitas dan sistematika tumbuhan. Salah satunya adalah untuk identifikasi spesies tumbuhan secara molekuler (*barcoding*) (Sindiya *et al.*, 2018). Salah satu cara identifikasi secara molekuler yang dilakukan adalah dengan membuat pohon filogenetik menggunakan data sekunder. Data sekunder yang digunakan berupa DNA atau protein yang berasal dari *website* NCBI. Kemudian pada buah jeruk (*Citrus*) analisis kekerabatan perlu dilakukan untuk mengetahui kekerabatan antar *Citrus* spp. mengikuti Anafarida dan Badruzsauhari (2020).

Pada penelitian ini yang digunakan adalah sekuen ITS (*Internal Transcribed Spacer*). ITS merupakan salah satu penanda molekuler DNA yang sering digunakan oleh para ahli untuk menganalisis kekerabatan pada tumbuhan, baik tumbuhan tingkat tinggi maupun tumbuhan rendah (Ramdhini & Jannah, 2021). Sekuen ITS dapat membedakan inter dan intra spesies serta penelusuran hubungan kekerabatan dengan melihat perbedaan daerah *conserved* dan melihat similaritas daerah variabel (Rahayu & Jannah, 2019). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat kekerabatan dari beberapa spesies *Citrus* spp. berdasarkan sekuens ITS secara molekuler menggunakan analisis pohon filogenetik.

## MATERIAL DAN METODE

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah aplikasi software MEGA X. Kemudian untuk bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah data sekuens nukleotida yang diambil dari GenBank melalui *website* NCBI. Data sekuens nukleotida yang diambil adalah dari spesies *Citrus* yang sama yang digunakan sebagai perbandingan, hal ini bertujuan untuk melihat kekerabatan pada spesies yang satu dengan yang lainnya.

### Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan data sekuens nukleotida sebanyak 14 spesies genus *Citrus* dan 1 spesies dari genus yang berbeda. Data sekuens ini berasal dari GenBank melalui *website* NCBI (*National Center for Biology Information*). Satu spesies dari genus yang berbeda

tersebut adalah spesies out group. Spesies out group tersebut adalah *Actinidia deliciosa*. Berikut adalah daftar spesies yang diperoleh dari data GenBank (Tabel 1).

**Tabel 1.** Sekuen *Citrus* spp. dan nomor aksesori dari NCBI

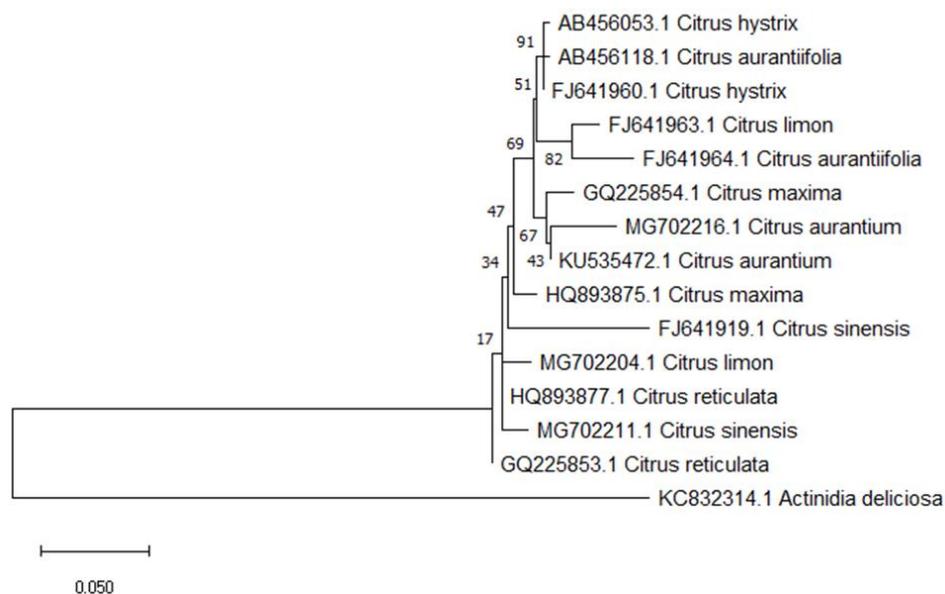
No.	Spesies	Genus	Nomor Aksesori
1	<i>Citrus maxima</i> 1	<i>Citrus</i>	GQ225854.1
2	<i>Citrus maxima</i> 2	<i>Citrus</i>	HQ893875.1
3	<i>Citrus reticulata</i> 1	<i>Citrus</i>	GQ225853.1
4	<i>Citrus reticulata</i> 2	<i>Citrus</i>	HQ893877.1
5	<i>Citrus sinensis</i> 1	<i>Citrus</i>	FJ641919.1
6	<i>Citrus sinensis</i> 2	<i>Citrus</i>	MG702211.1
7	<i>Citrus aurantiifolia</i> 1	<i>Citrus</i>	AB456118.1
8	<i>Citrus aurantiifolia</i> 2	<i>Citrus</i>	FJ641964.1
9	<i>Citrus hystrix</i> 1	<i>Citrus</i>	AB456053.1
10	<i>Citrus hystrix</i> 2	<i>Citrus</i>	FJ641960.1
11	<i>Citrus limon</i> 1	<i>Citrus</i>	FJ641963.1
12	<i>Citrus limon</i> 2	<i>Citrus</i>	MG702204.1
13	<i>Citrus aurantium</i> 1	<i>Citrus</i>	KU535472.1
14	<i>Citrus aurantium</i> 2	<i>Citrus</i>	MG702216.1
15	<i>Actinidia deliciosa</i>	<i>Actinidia</i>	KC832314.1

### Analisis Filogenetik

Sekuens nukleotida dianalisis pensejajaran sekuens (*edit/alignment build*) dengan Clustal-W menggunakan software MEGA X. Analisis filogenetika menggunakan metode *maximum likelihood* dengan *bootstrap* sebanyak 1000 menggunakan model Kimura 2-parameter.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelusuran mencari data sekuens nukleotida bahwa 15 data sekuens yang dicari semuanya tersedia pada GenBank di website NCBI. Data sekuens tersebut terdiri dari 14 data sekuens yang termasuk dalam genus *Citrus* dan 1 data sekuens adalah out group dari genus *Actinidia*. out group sangat dibutuhkan dalam pembuatan pohon filogenetik. Out group bertujuan untuk mengetahui karakter primitif (*plesiomorf*) dan karakter derivat (*apomorf*) dari kelompok in group serta untuk menentukan titik awal pembentukan sebuah pohon filogenetik (Subari *et al.*, 2021). Rekonstruksi pohon filogenetik dengan metode *maximum likelihood* didapatkan pohon filogenetik yang membentuk 2 kelompok in group dan 1 *outgroup* (Gambar 1).



**Gambar 1.** Pohon Filogenetik Spesies *Citrus*

Kelompok in group terbagi dalam dua klad besar yaitu klad 1 dan klad 2. Klad 1 terdiri dari 5 spesies yaitu *Citrus hystrix 1*, *Citrus aurantiifolia 1*, *Citrus hystrix 2*, *Citrus limon 1* dan *Citrus aurantiifolia 2*. Klad 2 terdiri dari 9 spesies yaitu *Citrus maxima 1*, *Citrus aurantium 2*, *Citrus aurantium 1*, *Citrus maxima 2*, *Citrus sinensis 1*, *Citrus limon 2*, *Citrus reticulata 2*, *Citrus sinensis 2* dan *Citrus reticulata 1*. Kemudian kelompok out group terdiri dari 1 spesies yaitu *Actinidia deliciosa*.

Berdasarkan letak cabang dan nilai bootstrap, kekerabatan terdekat dimiliki oleh *Citrus hystrix 1* dengan no. GenBank AB456053.1 dan *Citrus hystrix 2* dengan no. GenBank FJ641960.1. Nilai bootstrap pada kedua spesies tersebut yaitu 91. Nilai bootstrap merupakan nilai yang digunakan untuk menguji seberapa baik set data model yang digunakan, jika nilai bootstrap rendah maka sekuen dari analisis untuk mendapatkan sebuah pohon filogenetik menjadi tidak dapat dipercaya. Pohon filogenetik yang tinggi dan baik adalah pohon filogenetik dengan nilai bootstrap di atas 70 (Subari *et al.*, 2021).

Pada kladogram gambar pohon filogenetik terlihat bahwa ada beberapa spesies yang sama dan mengelompok, ada pula spesies yang sama tetapi tidak mengelompok. *Citrus hystrix 1* dengan no. GenBank AB456053.1 dan *Citrus hystrix 2* dengan no. GenBank FJ641960.1 adalah spesies yang sama dan mengelompok kemudian spesies lain juga terdapat pada *Citrus aurantium 2* dengan no. GenBank MG702216.1 dan *Citrus aurantium 1* dengan no. GenBank KU535472.1. Penyebab spesies yang sama tetapi tidak mengelompok yaitu disebabkan karena terjadinya evolusi divergen, dimana spesies tersebut berasal dari garis keturunan yang sama serta bentuk morfologi yang sama, akan tetapi keduanya tidak mengelompok, hal ini dikarenakan letak geografis spesies tersebut berbeda, misalnya pada *Citrus reticulata 2* dengan no. GenBank HQ893877.1 dan *Citrus reticulata 1* dengan no. GenBank GQ225853.1.

Kladogram pada gambar tersebut memberi petunjuk bahwa 14 spesies dalam kelompok in group mengelompok dalam masing-masing klad berdasarkan kemiripan sekuens nukleotida. Persamaan serta perbedaan karakter yang dimiliki antar spesies tersebut digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatannya (Anafarida & Badruzsaufari, 2020).

Analisis filogenetik diperkuat dengan adanya nilai jarak genetik. Adapun jarak genetik spesies *Citrus* dapat dilihat pada Gambar 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. GQ225854.1 Citrus maxima															
2. MG702204.1 Citrus limon	0.0338														
3. FJ641963.1 Citrus limon	0.0479	0.0460													
4. FJ641960.1 Citrus hystrix	0.0210	0.0320	0.0332												
5. AB456053.1 Citrus hystrix	0.0242	0.0352	0.0372	0.0031											
6. MG702216.1 Citrus aurantium	0.0208	0.0438	0.0458	0.0368	0.0399										
7. KU535472.1 Citrus aurantium	0.0129	0.0338	0.0351	0.0110	0.0143	0.0256									
8. FJ641964.1 Citrus aurantiifolia	0.0506	0.0751	0.0412	0.0477	0.0499	0.0748	0.0496								
9. AB456118.1 Citrus aurantiifolia	0.0240	0.0348	0.0367	0.0031	0.0047	0.0395	0.0141	0.0511							
10. KC832314.1 Actinidia deliciosa	0.4746	0.4618	0.5015	0.4462	0.4460	0.4885	0.4464	0.4614	0.4452						
11. FJ641919.1 Citrus sinensis	0.0887	0.0676	0.0954	0.0751	0.0795	0.0731	0.0771	0.1207	0.0787	0.5210					
12. HQ893877.1 Citrus reticulata	0.0294	0.0142	0.0405	0.0174	0.0208	0.0352	0.0190	0.0604	0.0206	0.4364	0.0639				
13. GQ225853.1 Citrus reticulata	0.0324	0.0110	0.0460	0.0208	0.0240	0.0225	0.0630	0.0238	0.4425	0.0693	0.0047				
14. HQ893875.1 Citrus maxima	0.0360	0.0303	0.0513	0.0237	0.0272	0.0417	0.0254	0.0638	0.0269	0.4428	0.0765	0.0157	0.0191		
15. MG702211.1 Citrus sinensis	0.0306	0.0030	0.0423	0.0303	0.0335	0.0405	0.0321	0.0731	0.0332	0.4625	0.0639	0.0126	0.0094	0.0286	

Gambar 2. Nilai Jarak Genetik

Berdasarkan hasil analisis jarak genetik dapat diketahui bahwa jarak genetik terdekat adalah pada spesies *Citrus hystrix 1* dengan no. GenBank AB456053.1 dan *Citrus hystrix 2* dengan no. GenBank FJ641960.1. Nilai jarak kedua spesies tersebut yaitu 0,003 (0,3%). Sedangkan jarak genetik terjauh yaitu pada spesies *Citrus sinensis 1* dengan no. GenBank FJ641919.1 dan *Actinidia deliciosa* dengan no. GenBank KC832314.1. Nilai jarak kedua spesies tersebut yaitu 0,521 (52,1%).

## SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pohon filogenetik terbagi menjadi 2 kelompok. Kelompok in group terbagi dalam dua klad besar yaitu klad 1 dan klad 2. Klad 1 terdiri dari 5 spesies. Kemudian kelompok out group terdiri dari 1 spesies yaitu *Actinidia deliciosa*. Kekerbatan terdekat dimiliki oleh *Citrus hystrix 1* dan *Citrus hystrix 2*. Nilai bootstrap pada kedua spesies tersebut yaitu 91. Selanjutnya untuk nilai jarak genetik terdekat analisis filogenetik yaitu pada spesies *Citrus hystrix 1* dan *Citrus hystrix 2* sebesar 0,003 (0,3%). Sedangkan jarak genetik terjauh yaitu pada spesies *Citrus sinensis 1* dan *Actinidia deliciosa* sebesar 0,521 (5,21%).

## REFERENSI

- Adelina, S.O., Adelina, E., & Hasriyanty, H. 2017. Identifikasi Morfologi dan Anatomi Jeruk Lokal (*Citrus sp*) di Desa Doda dan Desa Lempe kecamatan Lore Tengah kabupaten Poso. *Agrotekbis*, 5(1), 58–65.
- Anafarida, O., & Badruzsaufari, B. 2020. Analisis Filogenetik Mangga (*Mangifera Spp.*) Berdasarkan Gen 5,8S rRNA. *Ziraa'ah*, 45(2), 120–126.
- Hanifa, Y. R., Pujiyanto, S., Ferniah, R.S., & Kusumaningrum, H.P. 2021. Identifikasi Molekuler Jeruk Nipis Tegal Berdasarkan Fragmen Gen 18s Ribosomal RNA. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 8(2), 244–254.
- Kosmiatin, M., & Ali, H. 2018. *Mikropropagasi Jeruk*.
- Rahayu, D.A., & Jannah, M. 2019. *Dna Barcode Hewan dan Tumbuhan Indonesia* (E. D. Nugroho (ed.)). Yayasan Inspirasi Ide Berdaya.
- Ramdhini, D.W., & Jannah, M. 2021. Analisis Filogenetik Anggrek *Dendrobium* Berdasarkan Sekuen ITS rDNA. *Bio-Sains: Jurnal Ilmiah Biologi*, 1(1), 8–12.
- Sindiya, V., Mukarramah, L., Rohimah, S., & Perwitasari, D.A.G. 2018. Studi In Silico Potensi DNA Barcode pada Anggrek Langka Paphiopedilum. *BIOSFER: Jurnal Biologi Dan Pendidikan Biologi*, 3(1), 20–26.
- Subari, A., Razak, A., & Sumarmin, R. 2021. Phylogenetic Analysis of *Rasbora* spp. Based on the Mitochondrial DNA COI gene in Harapan Forest. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(1), 89–94. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.29303/jbt.v21i1.2351>
- Triani, N. (2020). Isolasi DNA Tanaman Jeruk dengan Menggunakan Metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). *Jurnal Teknologi Terapan*, 3(2), 221–226.