

Kajian Filogenetik Kupu-Kupu *Papilio* Spp Berdasarkan Sekuen Gen ND5 secara Insiliko

Phylogenetik Study of Papilio Spp Butterfly Based on ND5 Genetik Sequence in In Silico

Abdu Mas'ud, Abubakar Abdullah, Chumidach Roini
Prodi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Khairun Ternate
Email: masudabdu.unk05@gmail.com

Abstrak

Genus *Papilio* spp merupakan salah satu anggota family Papilionidae. Karakter khas kupu-kupu ini memiliki ukuran tubuh yang besar (makro lepidoptera) dan memiliki warna tubuh yang menarik. Penyebaran Papilionidae ditemukan di Indo-Australia. Kupu-kupu ini ditemukan di wilayah Maluku Utara dan kepulauan Sula. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hubungan filogenetik kupu kupu *Papilio* spp berdasarkan penanda molekuler gen ND5 yang terdapat pada mitokondria secara insiliko. Analisis Filogenetik tersebut dapat dilihat dari pohon filogeni yang dikonstruksi berdasarkan *sequence* nukleotida pada gen ND5. *Sequence gen ND5* diperoleh dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dan alignment *sequence* untuk konstruksi pohon filogenetik menggunakan program Clustal W yang diakses dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) secara *online*. Pohon filogenetik menunjukkan bahwa *Papilio ulyes* asal pulau Obi dan Morotai dari Maluku Utara memiliki nenek moyang yang sama (monophiletik) dengan *Papilio ulyes telegonus* dari Timika.

Kata kunci: *Papilio* spp, filogenetik, ND5 gen

Abstract

Papilio spp is one of the members Papilionidae family. The specific character is macro lepidoptera butterflies and has beautiful colour. The distribution of butterflies is found in Indo_Australia. *Papilio* spp can found on Northen Maluku and Sula archipelago region. The objectif of the research is to know genetik relationship of *Papilio* spp based on moleculer marker of the ND5 gene mitokondrial using insilico analysis. The genetik relationship can be knowed from the phylogenetik tree construction by sequence ND5 gene mitocondial. The Sequence ND5 gene is obstained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and alignment sequence for the construction phylogenetik tree using Clustal W program acces from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) online. The phylogenetik tree showed that *Papilio ulyes* from Obi island and Morotai island have one ancestor (monophyletic) with *Papilio ulyes telegous* from Timika.

Keywords: *Papilio* spp, phylogenetik, ND5 genes

Pendahuluan

Kupu kupu family Papilionidae pada umumnya memiliki ukuran tubuh yang besar (makrolepidoptera) dan berwarna menarik (Mastrigt dan Rosariyanto 2005). Distribusi geografis kupu-kupu *Papilio* spp antara lain di wilayah Maluku, Kepulauan Maluku Utara, dan Papua Irian Jaya. Selanjutnya Vane-Wright (2003) melaporkan bahwa tiga kelompok Papilionidae (Swallowtail) dapat ditemukan di wilayah Indo Australia. Noted Entomologis melaporkan bahwa salah satu hotspot kupu kupu *Papilio* spp adalah kepulauan Maluku dan daratan Papua (Hermawanto *et al*, 2015). Lebih lanjut dijelaskan lokasi penyebaran *Papilio* spp di Maluku Utara adalah pulau Bacan, pulau Obi, pulau Halmaera, Morotai dan kepulauan Sula (Wallace, 1865; Mallet, 2003).

Family Papilionidae tersebar secara kosmopolit dengan foodplant yang terdiri dari family Annonaceae, Aristolochiaceae, Lauraceae, Magnoliceae, Rutaceae. Famili papilionidae terdiri dari 550 spesies dalam tiga sub family, hanya satu sub family yang terdapat di Maluku (Hauser *et al*, 2001). *Troides hellena* merupakan salah satu spesies dari Papilionidae yang dilindungi (CITES Appendix II) dan dalam list status konservasi terancam punah (vulnerable). Family Papilionidae terdiri dari 5 genus, 38 spesies dan 84 subspecies dengan sinonim Swallowtail, Swordtail dan Birdwing butterflies terdapat di Maluku dan Maluku Utara termasuk kepulauan Sula. Jenis kupu-kupu yang endemik dari family Papilionidae ada 9 yang terdiri dari 2 *Grapium*, 2 *Troides*, 2 *Ornithoptera* dan 3 *Papilio* (Peggie *et al*, 2005).

Sumber daya genetik kupu-kupu merupakan keanekaragaman hayati yang harus dijaga kelestariannya dari kepunahan jenisnya. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah konservasi genetik terhadap kupu-kupu endemik dan kajian sistematika kupu. Informasi kemiripan (similaritas) dari *Papilio* Spp dengan kupu-kupu lain dapat diketahui melalui studi taksonomi numerik dengan memanfaatkan data morfologi sebagai karakter. Sedangkan kekerabatannya dapat diketahui melalui konstruksi pohon filogenetik dengan memanfaatkan data molekuler.

Data molekuler suatu organisme termasuk kupu kupu dari semua divisi yang berupa *sequence* DNA dapat diakses dengan relatif mudah dari bank data misalnya NCBI. Salah satu data molekuler yang dapat digunakan adalah *sequence* DNA untuk gen mitokondria ND5. Gen tersebut dapat dipergunakan sebagai penanda molekuler dalam penyusunan klasifikasi filogenetik karena gen tersebut terdapat pada mitokondria semua organisme termasuk kupu-kupu *Papilio* spp. Ekspresi dari gen ND5 adalah protein fungsional NADH sub unit 5 yang berfungsi mengkatalisis respirasi sel secara aerob (Tabita *et al.*, 2008).

Dalam klasifikasi filogenetik ini data *sequence gen ND5* pada mitokondria kupu-kupu *Papilio* spp yang disimpan di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) akan digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik yang menggambarkan kekerabatan evolusioner kupu-kupu *Papilio* spp dari Maluku dan Papua. Pohon filogenetik adalah ilustrasi evolusi yang terjadi pada sekelompok organisme yang berasal dari nenek moyang yang sama, yang disusun berdasarkan kesamaan dalam beberapa hal, misalnya gen, protein dan organ (Ochieng *et al*, 2007).

Metode Penelitian

Bahan

Sekuens gen ND5 yang diunduh dari bank data internasional *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Prosedur

Klasifikasi filogenetik kupu-kupu *Papilio* spp ini dibuat dengan memanfaatkan data *sequence* DNA yang disimpan di bank data internasional NCBI dan program untuk konstruksi pohon filogenetik secara *online* yang disediakan oleh *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Identifikasi spesies secara online menggunakan data genbank pada NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.ncbi>) dengan berbagai nomer akses dengan metode BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) Selanjutnya dilakukan *alligment* dengan menggunakan Clustal W vers. 1.4 (Thompson *et al.*, 1994). Hasil alignment digunakan untuk

mengkonstruksi pohon filogenetik yang visualisasinya dilakukan menggunakan program MEGA 6 (Tamura *et al.* 2011). Jarak genetik dianalisis menggunakan metode Kimura parameter2 (Kimura, 1980) dan pohon filogenetik menggunakan metode *Maximum Likelihood* berdasarkan model Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993).

Data karakter molekular yang diunduh dari NCBI adalah *sequence* gen ND5 mitokondria pada 10 spesies kupu-kupu *Papilio* spp dengan berbagai kode akses seperti pada Tabel 1. Data *sequence* gen ND5 yang tersimpan di NCBI memiliki panjang nukleotida kurang lebih 900bp. Jarak genetik dianalisis menggunakan metode Kimura parameter2 (Kimura, 1980) seperti pada Tabel 2

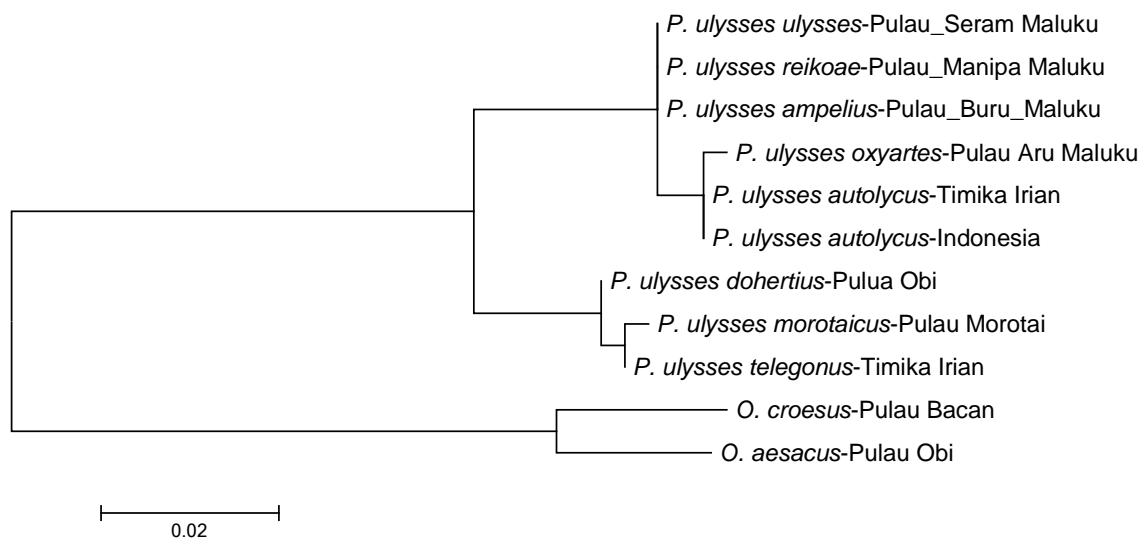
Hasil dan Pembahasan

Tabel 1. Data Acession Number 10 Spesies *Papilio* spp.

No	Kode Acession Number		Nama spesies
1	JQ982360.1	GI: 443419622	<i>P. ulysses morotaicus</i> -Pulau Morotai
2	JQ982359.1	GI: 443419620	<i>P. ulysses dohertius</i> -Pulau Obi
3	JQ982352.1	GI: 443419606	<i>P. ulysses Ulysses</i> -Pulau Seram Maluku
4	JQ982362.	GI: 443419626	<i>P. ulysses reikoeae</i> -Pulau Manipa Maluku
5	JQ982361.1	GI: 443419624	<i>P. ulysses oxyartes</i> -Pulau Aru Maluku
6	JQ982358.1	GI: 443419618	<i>P. ulysses ampelius</i> -Pulau Buru Maluku
7	JQ982351.1	GI:443419604	<i>P ulysses telegonus</i> -Timika Irian Jaya
8	JQ982350.1	GI:443419602	<i>P. ulysses autolyucus</i> -Indonesia
9	AB 04055554	G.I 11990922	<i>O. croesus</i> -Pulau Bacan
10	AB 04055551	G.I 11990924	<i>O. aesacus</i> -Pulau Obi

Tabel 2. Data Jarak Genetik *Papilio* spp. Berdasarkan gen ND5 mitokondria dianalisis dengan metode Kimura 2 parameter

<i>P. ulysses morotaicus</i> -Pulau Morotai										
<i>P. ulysses dohertius</i> -Pulau Obi	0,005									
<i>P. ulysses ulysses</i> -Pulau Seram Maluku	0,040	0,035								
<i>P. ulysses reikoeae</i> -Pulau Manipa Maluku	0,040	0,035	0,000							
<i>P. ulysses oxyartes</i> -Pulau Aru Maluku	0,049	0,043	0,008	0,008						
<i>P. ulysses ampelius</i> -Pulau Buru Maluku	0,040	0,035	0,000	0,000	0,008					
<i>P. ulysses telegonus</i> -Timika Irian Jaya	0,003	0,003	0,037	0,037	0,046	0,037				
<i>P. ulysses autolyucus</i> -Timika Irian Jaya	0,046	0,040	0,005	0,005	0,003	0,005	0,003			
<i>P. ulysses autolyucus</i> -Indonesia	0,046	0,040	0,005	0,005	0,003	0,005	0,043	0,000		
<i>O. croesus</i> -Pulau Bacan	0,127	0,134	0,152	0,152	0,159	0,152	0,131	0,159	0,159	
<i>O. aesacus</i> -Pulau Obi	0,144	0,144	0,149	0,149	0,156	0,149	0,148	0,156	0,156	0,037



Gambar 1. Pohon Filogenetik *Papilio* spp Berdasarkan gen Mitokondria ND5

Nilai jarak genetik pada kupu-kupu *Papilio* spp diketahui bahwa *Pulyses telegonus*_Timika memiliki nilai jarak genetik terkecil, selanjutnya *P ulyses autolyucus*_Indonesia dan *P ulyses ampelius*_Pulau Aru sedangkan *P. oxyartes* dari Pulau Aru memiliki nilai jarak genetik terbesar. Selanjutnya data hasil *alignment* menggunakan program Clustal W ver 1.43 yang dilakukan pada *sequence ND5 Papilio spp* dapat digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan evolusioner, Pohon filogenetik yang dikonstruksi berdasarkan gen mitokondria ND5 *Ornithoptera* spp seperti Gambar 1.

Pada pohon filogenetik tersebut diketahui bahwa terbentuk dari 2 klaster utama dengan outgroup *Ornithoptera* spp. Pohon filogenetik selain menunjukkan kekerabatan antar spesies yang diperbandingkan, juga menggambarkan perubahan yang terjadi pada gen penanda untuk masing-masing spesies. Semakin panjang suatu cabang artinya semakin banyak perubahan yang terjadi pada gen penanda selama proses evolusi, akibatnya spesies yang berada pada cabang tersebut dapat dikatakan lebih maju. Berdasarkan hasil analisis menggunakan pohon filogenetik di atas diketahui bahwa *Papilio ulyses dohertius*_dari Obi, *Papilio ulyses morotaicus* dari Morotai dan *Papilio ulyses telegoneus* dari Timika merupakan kerabat dekat dalam satu kluster. Selanjutnya Kupu-kupu *Papilio ulyses*

oxyartes dari Aru, *Papilio ulyses autolysus* dari Timika dan *Papilio ulyses autolyucus* dari Indonesia merupakan kerabat dekat dalam satu subkluster. Untuk *Papilio ulyses ulyses* dari Seram, *Papilio ulyses reikoeae* dari Manipa dan *Papilio ulyses ampillus* dari Buru merupakan kupu-kupu *Papilio* spp kluster termuda dan paling modern. Menurut Ochieng *et al.* (2007) pohon filogenetik tersusun atas nodus-nodus dan percabangan. Masing-masing nodus menggambarkan proses spesiasi selama terjadinya evolusi. Nodus-nodus ujung mewakili data yang dibandingkan (*operational taxonomic units*), sedangkan nodus internal melambangkan unit nenek moyang (*hypothetical taxonomic unit*). Panjang masing-masing cabang mewakili jumlah perubahan yang terjadi pada karakter yang digunakan sebelum terjadinya separasi berikutnya. Karakter yang sangat mirip akan berdekatan di dalam percabangan. Salah satu tahap penting dalam mengkonstruksi pohon filogenetik adalah *alignment*, yaitu membandingkan sisi yang homolog-homolog dan variable-variabel antar *sequence* sehingga diperoleh nilai similaritas.

Analisis filogenetik secara insiliko dalam tulisan ini dapat digunakan sebagai informasi awal dalam kajian biosistematika dan taksonomi molekuler kupu-kupu yang berasal dari Maluku Utara. Hasil penelitian ini merupakan analisis awal dalam riset kajian diversitas genetik kupu

Papilio spp di Maluku Utara. Selanjutnya hasil penelitian berikutnya merupakan database yang dapat digunakan untuk menentukan strategi konservasi satwa endemik khususnya kupu-kupu di Maluku Utara.

Simpulan

Analisis filogenetik secara insiliko pada pada kupu-kupu *Papilio* spp menggunakan data molekuler sekuen dari gen mitokondria ND5 pada genbank NCBI menunjukkan bahwa terdapat hubungan kekerabatan antara kupu-kupu *Papilio* spp asal Timika Papua, dan asal Obi dan Morotai Maluku Utara. Kupu-kupu *Papilio ulyes* asal Obi dan Morotai memiliki nenek moyang yang sama dengan *Papilio ulyes telegonus* asal Timika berdasarkan analisis pohon filogenetik.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih tak terhingga kepada Dr Abdul Hamid A Toha, M.Si dan Dr Sundari M.Pd serta Didik Wahyudi M.Si atas tutorial dan asistensinya dalam Bioinformatika dan analisis data molekuler sehingga penulisan artikel ini bisa terlaksana.

Daftar Pustaka

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., & Stryer, L., 2012. The Calvin cycle and the pentose phosphate pathway. *Biochemistry*, 6, 565-591.
- Hermawanto, R., Panjaitan, R., & Fatem, S. 2015. Kupu-Kupu (Papilionoidea) di Pantai Utara Manokwari, Papua Barat: Jenis, keanekaragaman dan pola distribusi. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. Volume 1, Nomor 6, September 2015; ISSN: 2407-8050 Halaman: 1341-1347
- Hauzer, C.L.De Jong,R Lauris.G,Robbin,R.K Smith.C.R Van Wright,R.I (2011). Pappilionidae_Revised Globis/GART Speciest Chechlist. www.insect-online.de/frame/papilio.htm
- Mastriht, V.H., & Rosariyanto, E., 2005. Buku panduan lapangan: Kupu-kupu untuk wilayah Mamberamo sampai pegunungan Cyclops. *Conservation International Indonesia. Jakarta*.
- Mallet, J., 2003. Perspectives Poulton, Wallace and Jordan: how discoveries in *Papilio* butterflies led to a new species concept 100 years ago. *Systematics and Biodiversity*, 1(4), 441-452.
- Ochieng, J.W., Muigai, A.W., & Ude, G.N., 2007. Phylogenetics in plant biotechnology: principles, obstacles and opportunities for the resource poor. *African Journal of Biotechnology*, 6(6). 639-649.
- Peggie. D.J, Rawlins & R.I Van Wright. 2005. An illustrated checklist of the papilionidae butterflies (Lepidoptera: Papilionidae) of Northen and Central Maluku Indonesia. *Nachrichten Des Entomologischen Vereins Appolo N.F*, 26 (1/2) 41-60 (20015)
- Tabita, F.R., Hanson, T.E., Satagopan, S., Witte, B.H., & Kreel, N.E., 2008. Phylogenetik and evolutionary relationships of RubisCO and the RubisCO-like proteins and the functional lessons provided by diverse molecular forms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1504), 2629-2640.
- Tamura, K., Nei, M and Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A and Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetiks Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Van Wrght.R.I 2002. Endemic and Diversity in Butterfly Sistematic pp 477-513 in Bogg, C.L Watt. W.B & Ehlrich, P.R (eds) *Butterflies Ecology and Evolution Taking Thight,XYII +739 + [16] pp Chicago University of Chicago*
- Wallace, A.R., 1865. On the phenomena of variation and geographical distribution as illustrated by the Papilionidae of the Malayan region. *Transactions of the Linnean Society of London* 25:1-71.