

DNA BARCODING ANGGREK OBAT *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar MENGUNAKAN GEN *rbcL* DAN ITS

DNA Barcoding of Medicinal Orchid *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar Using *rbcL* and ITS genes

Dian Al Ghifari Perwitasari, Siti Rohimah, Tri Ratnasari, Bambang Sugiharto,
dan Mukhamad Su'udi*

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember
Jalan Kalimantan No. 37 Sumbersari, Jember 68121

INFO ARTIKEL

Article history:

Diterima: 11 September 2019

Direvisi: 13 November 2019

Disetujui: 23 Maret 2020

Kata kunci:

Dendrobium bigibbum;
Dendrobium discolor
Merauke; bioinformatik;
identifikasi molekuler

Keywords:

Dendrobium bigibbum;
Dendrobium discolor
Merauke; bioinformatics;
molecular identification

ABSTRAK/ABSTRACT

Dendrobium discolor Lindl., Tanimbar adalah salah satu anggrek obat yang telah digunakan untuk mengobati penyakit kulit. Secara morfologi *D. discolor* Tanimbar menunjukkan kesamaan dengan *D. discolor* Merauke dan *D. bigibbum* sehingga menyulitkan dalam identifikasi. DNA barcoding menggunakan penanda gen spesifik *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large (rbcL)* dan *Internal Transcribed Spacer (ITS)* diharapkan dapat digunakan untuk mengidentifikasi *D. discolor* secara akurat. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi sekuen DNA yang berpotensi sebagai *barcode* untuk identifikasi anggrek obat *D. discolor* Tanimbar menggunakan penanda molekuler *rbcL* dan *ITS*. DNA genom *D. discolor* Tanimbar diisolasi dan digunakan sebagai *template* dalam reaksi PCR. Amplikon yang dihasilkan kemudian diurutkan (*sequencing*). Hasil penelitian menunjukkan urutan gen *rbcL* dari *D. discolor* memiliki homologi tinggi dengan *D. salaccense* (*Accession*: LC193510.1, *Prect. Ident*: 99,45 %), sedangkan *ITS* memiliki homologi tinggi dengan *D. nindii* (*Accession*: AY239985.1, *Prect. Ident*: 98,67 %). Analisis bioinformatika menunjukkan bahwa urutan gen *rbcL* dari *D. discolor* memiliki urutan homologi yang lebih tinggi daripada *ITS*. Namun, urutan *ITS* lebih spesifik dan mampu membedakan hingga tingkat spesies. Berdasarkan hasil penelitian ini maka sekuen *ITS* dapat direkomendasikan sebagai penanda molekuler untuk identifikasi anggrek obat *D. discolor* Tanimbar.

Dendrobium discolor Lindl., Tanimbar is one of the medicinal orchids that has been used to treat skin diseases. Morphologically, *D. discolor* Tanimbar shows similarities with *D. discolor* Merauke and *D. bigibbum*, making it challenging to identify. DNA barcoding using *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large (rbcL)* and *Internal Transcribed Spacer (ITS)* markers expected to be used to identify *D. discolor* accurately. This study aimed to identify potential DNA sequences as barcodes for the identification of medicinal orchid *D. discolor* Tanimbar using molecular markers *rbcL* and *ITS*. The DNA genome of *D. discolor* Tanimbar was isolated and used as a template in the PCR reaction. The resulting amplicons were then sequenced. The results showed that the *rbcL* gene sequence of *D. discolor* had high homology with *D. salaccense* (*Accession*: LC193510.1, *Prect. Ident* : 99.45 %), whereas the *ITS* had high homology with *D. nindii*

* Alamat Korespondensi : msuudi.rda@gmail.com

(Accession: AY239985.1 Identification: 98.67 %). Bioinformatics analysis showed that the *rbcL* gene sequence from *D. discolor* had more homology sequence than the ITS. However, the ITS sequence was more specific and could differentiate to species level. Based on the results of this study, the ITS sequence can be recommended as a molecular marker for the identification of the medicinal orchid *D. discolor* Tanimbar.

PENDAHULUAN

Orchidaceae memiliki sekitar 20.000 spesies yang terdistribusi dalam 899 genera dan mewakili 7 % dari total spesies tanaman berbunga yang ada di dunia (Erzurumlu *et al.* 2018). Orchidaceae memiliki nilai penting tidak hanya dari segi estetika, fitoterapi, dan ekologis tetapi juga dalam bidang terapeutik yaitu pemanfaatannya sebagai obat (Joshi *et al.* 2009; Hossain 2011; Wang *et al.* 2017). Terdapat 482 spesies anggrek obat tersebar di seluruh Asia dan tercatat 95 spesies ditemukan di Indonesia (Teoh 2016). Salah satu jenis anggrek obat berasal dari Kepulauan Tanimbar, Maluku yaitu *Dendrobium discolor* Lindl. Tumbuhan ini telah dimanfaatkan untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti disentri, menghilangkan rasa sakit, mengobati kurap, dan bisul (Pant 2013; Teoh 2016). Suku Aborigin di Australia menggunakan batang muda *D. discolor* untuk tapal dan batang tua untuk obat kurap (Bulpitt 2005).

Identifikasi spesies *D. discolor* Lindl. menggunakan penanda morfologi memiliki keterbatasan. Hal ini dikarenakan adanya kemiripan morfologi organ vegetatif dalam genus *Dendrobium*, sedangkan organ generatif seperti bunga tidak mudah diperoleh (Han *et al.* 2018; Liu *et al.* 2019). Terlebih lagi, apabila bagian yang dimanfaatkan sebagai obat adalah batang semu (*canes*), hampir semua jenis anggrek *Dendrobium* memiliki morfologi batang yang sama sehingga kesalahan dalam pemilihan dapat berakibat fatal. Oleh karena itu, perlu ada metode yang akurat sebagai alat pembeda. *D. discolor* Tanimbar secara morfologi memiliki organ vegetatif yang mirip dengan *D. discolor* Merauke (spesies intraspesifik) dan *D. bigibbum* Lindl. (spesies interspesifik) (Adams 2015). Selain itu, adanya inkonsistensi

antara nama lokal spesies (*vernacular names*) maupun sinonim ilmiah menjadi tantangan dalam identifikasi spesies secara konvensional (Ghorbani *et al.* 2017; Raclariu *et al.* 2018). Hal tersebut menjadi permasalahan dan kelemahan dalam identifikasi berdasarkan karakter morfologi sehingga mendorong penggunaan metode baru yang jauh lebih efektif dalam menentukan identitas spesies tanaman, misalnya penanda molekuler/DNA (Subedi *et al.* 2013; Kim *et al.* 2014; Xu *et al.* 2015; Parveen *et al.* 2017).

Identifikasi spesies menggunakan penanda molekuler memiliki keunggulan karena keakuratannya yang tinggi, cepat, dan spesifik (Kim *et al.* 2014; Miftakhurohmah *et al.* 2016; Raclariu *et al.* 2018). Penanda molekuler spesifik pada hewan telah disepakati menggunakan gen *COI* (Hebert *et al.* 2003). Namun, gen *COI* kurang efektif apabila digunakan pada spesies tumbuhan. Hal ini dikarenakan rendahnya tingkat substitusi nukleotida pada genom mitokondria tanaman yang menyebabkan homologi antar sekuen tinggi (Hollingsworth *et al.* 2011; Kim *et al.* 2014). Oleh karena itu, dalam penelitian ini dicari penanda molekuler spesifik yang melibatkan sekuen dari kloroplas dan nukleus untuk membedakan spesies. Sekuen tersebut adalah *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)* dan *Internal Transcribed Spacer (ITS)* yang telah direkomendasikan oleh *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) sebagai salah satu kandidat *barcode* universal pada tanaman (Hollingsworth *et al.* 2011). *rbcL* merupakan gen yang berasal dari genom plastid, sedangkan *ITS* berasal dari genom nukleus. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi sekuen berpotensi sebagai *barcode* pada anggrek obat *D. discolor* Lindl. Tanimbar menggunakan penanda molekuler *rbcL* dan *ITS*.

BAHAN DAN METODE

Koleksi sampel dan pengamatan morfologi

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Oktober 2018 sampai Mei 2019. Anggrek obat *D. discolor* Lindl. Tanimbar dipilih berdasarkan data *in silico* sekuen DNA anggrek obat *Dendrobium* dari Indonesia (Teoh 2016) yang tersedia di *GenBank* NCBI. Sampel diperoleh dari DD Orchid Nursery, Batu, Malang. Karakterisasi morfologi dilakukan dengan cara mengamati morfologi anggrek *D. discolor* Lindl. Tanimbar, yang meliputi habitus, organ batang, daun, dan bunga dan didukung dengan studi literatur.

Isolasi, amplifikasi PCR, purifikasi, dan sekuensing DNA barcode *Dendrobium discolor* Tanimbar

Isolasi DNA genom, analisis PCR, dan purifikasi produk hasil PCR dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Isolasi DNA genom menggunakan 0,5 g sampel daun dilakukan menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (Doyle dan Doyle 1990) dan NEXprepTM *Plant DNA Mini Kit* (NEXTM Diagnostics, Korea).

Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR bertujuan untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro* dan mendeteksi pita DNA spesifik pada tanaman (Wang *et al.* 1993). Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan dua set jenis primer spesifik yaitu *rbcL* dan *ITS*. Sekuen kloroplas DNA (*ITS*) dapat digunakan untuk mengidentifikasi hubungan interspesifik pada Angiospermae dan jenis tanaman lainnya. Daerah *coding* (*rbcL*) lebih mudah disejajarkan (*alignment*) dibandingkan daerah *non-coding* seperti *ITS* (Taberlet *et al.* 1991; Hollingsworth *et al.* 2009). Sekuen primer forward *rbcL* (5'-ATGTCACCACAAACAGA GACTAAAGC-3'), dan sekuen primer *rbcL* reverse (5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3') (Kress dan Erickson 2007). Sekuen primer *ITS* forward (5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCC

-3') dan sekuen primer *ITS* reverse (5'-TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3') (Williams dan Whitten 1999).

Kondisi PCR berdasarkan hasil optimasi terdiri atas pre-denaturasi pada suhu 95 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 53 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit 15 detik sebanyak 35 x siklus. Visualisasi hasil PCR dilakukan menggunakan elektroforesis gel *agarose* 1,25 % yang ditambah 1 µl EtBr dan pengamatan pola pita DNA dilakukan menggunakan *UV-transilluminator*. Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan *PCR purification Kit* (Jena Bioscience, Jerman). Penentuan urutan/sekuen DNA hasil PCR yang telah dipurifikasi dilakukan dengan mesin DNA *sequencer* ke 1st BASE di Singapura.

Analisis pensejajaran (*alignment*) dan filogenetik *D. discolor* Lindl. Tanimbar

Analisis data dilakukan dengan metode komputasi, yaitu menggunakan beberapa software seperti *GenBank* NCBI, ClustalX 2.1, dan MEGAX. Sekuen hasil sekuensing yang telah didapat selanjutnya dianalisis menggunakan *Bioedit*, dan dikonfirmasi dengan sekuen yang terdapat pada *GenBank database* NCBI menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Spesies pada NCBI dengan urutan sepuluh teratas kemudian dipilih dan dikoleksi sekuennya untuk dianalisis lebih lanjut. Analisis pensejajaran (*alignment*) dilakukan dengan menggunakan software ClustalX 2.1 (Jeanmougin *et al.* 1998), dan rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan software MEGAX (Kumar *et al.* 2008). Analisis filogenetik dilakukan menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) yang bertujuan untuk merekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan data jarak evolusi minimum atau berdasarkan nenek moyang terdekat (Saitou dan Nei 1987). Dalam rekonstruksi filogenetik, *outgroup* dipilih di luar genus *Dendrobium* dan didasarkan pada perbedaan morfologi yang signifikan dengan struktur vegetatif yang relatif sederhana yang dianggap plesiomorfik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

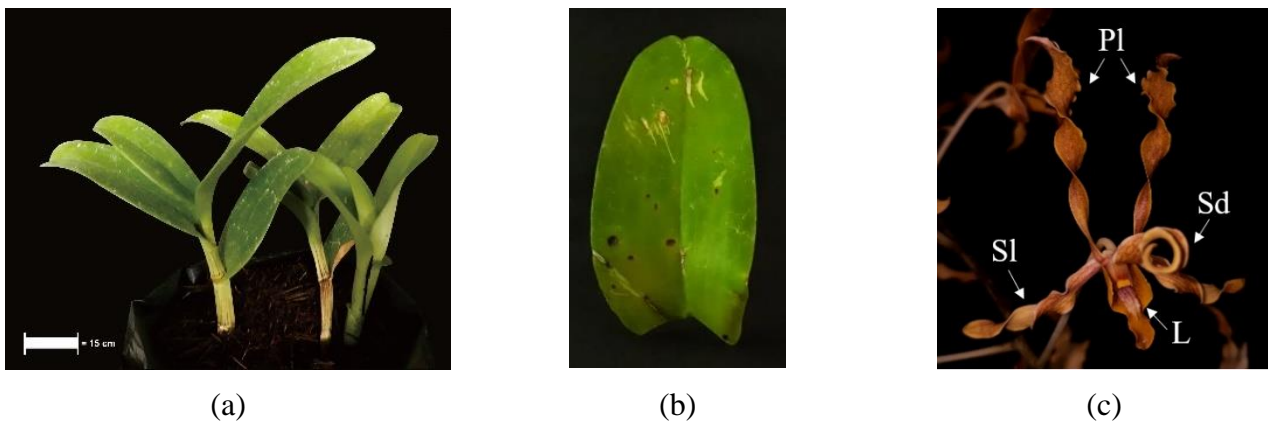
Morfologi dan karakteristik DNA *barcode* anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar

Anggrek obat *D. discolor* Tanimbar termasuk anggrek epifit *section spatulate* dengan percabangan simpodial. Batang herbaceous berbentuk silinder, tegak, bagian bawah tertutup selaput tipis (*pseudobulb*). Daun berbentuk bulat telur sungsang (*ovate-lanceolate*) dengan selubung di pangkal, duduk daun berseling, tepi rata (Gambar 1a, b) (Cribb 1986). Bunga terdiri atas satu sepal dorsal dan dua sepal lateral. Petal pertama dan ke dua berseling dengan sepal. Petal ke tiga mengalami modifikasi menjadi *labellum* (bibir) (Gambar 1c). Tipe bunga *D. discolor* majemuk dan terresupinasi (memutarnya sepal dan petal bunga), *labellum* melebar (*obtus*) dengan lobus lateral yang meninggi dan bunga berwarna kecokelatan (Kartikaningrum *et al.* 2004; Liddle dan Forster 1990; Millar 1978; Teoh 2016). Anggrek ini terdistribusi mulai dari selatan pantai Papua, Papua Nugini sampai dengan Australia (Schuiteman 2013).

Berdasarkan hasil amplifikasi PCR *D. discolor* Tanimbar menunjukkan bahwa fragmen target teramplifikasi dengan baik yaitu spesifik satu pita pada ukuran target yang tepat. DNA yang berhasil diamplifikasi sebagai produk PCR atau amplicon terdapat pada posisi 600 bp untuk primer *rbcL* (Gambar 2a). Hal ini relevan dengan literatur

hasil penelitian Baker (2018) yang menyebutkan bahwa umumnya *rbcL* menghasilkan pita DNA dengan ukuran 654 bp dan didukung penelitian lain yang mengemukakan ukuran amplicon *rbcL* pada tanaman darat dan tanaman obat berkisar antara 550-650 bp (Kress dan Erickson 2007; Malik *et al.* 2019). Hasil amplicon menggunakan primer *ITS* spesifik dan sesuai pada ukuran 900 bp (Gambar 2b) mewakili seluruh wilayah nr*ITS* yang terdiri dari *ITS1*, 5.8S rDNA dan *ITS2*. Hal ini didukung oleh penelitian Kishor dan Devi (2009) yang menyebutkan bahwa ukuran produk hasil amplifikasi PCR sekuen *ITS* pada anggrek *Aerides candarum* Reichb.f x *Vanda stangeana* Reichb.f menggunakan primer 17SE dan 26SE sekitar 930 bp.

Beberapa faktor yang memengaruhi keberhasilan amplifikasi PCR adalah kemurnian DNA hasil ekstraksi, primer spesifik yang digunakan, efisiensi dan optimasi kondisi PCR yang tepat, terutama pada proses *annealing* (penempelan primer) (Ekman 1999). Pita yang jelas dan tebal menunjukkan tercapainya kondisi PCR yang optimal sehingga proses PCR dapat berlangsung dengan baik dan dapat diproses pada tahap selanjutnya yaitu purifikasi. Purifikasi bertujuan untuk memurnikan DNA hasil produk PCR dari komponen lainnya. Metode purifikasi tidak berasal dari purifikasi gel tetapi langsung dari produk hasil PCR karena pita DNA yang dihasilkan telah spesifik (satu *band*) dan sesuai dengan ukuran yang ditargetkan.

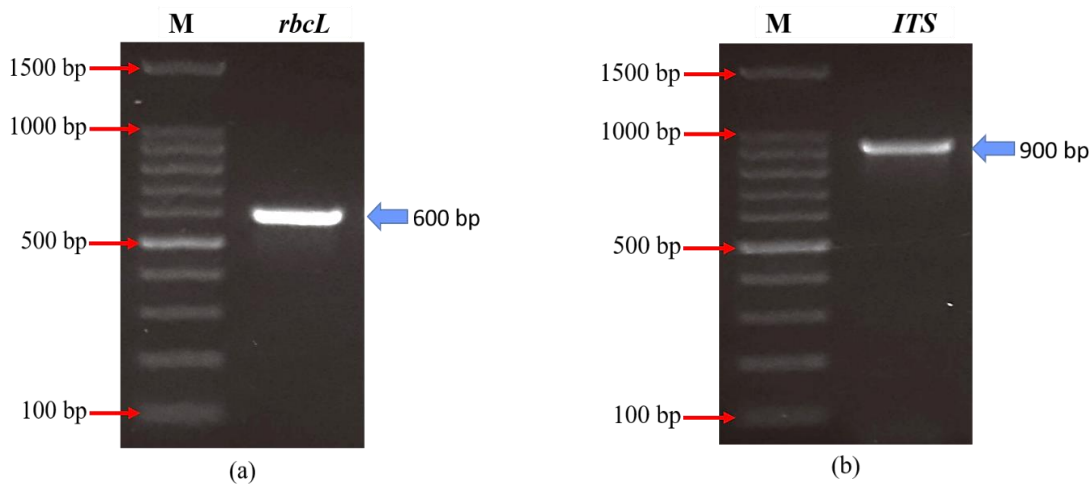


Gambar 1. Morfologi anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar; (a) batang dan daun; (b) daun; (c) bunga, Sd = sepal dorsal, Sl = sepal lateral, L = labellum, dan Pl = petal.

Figure 1. Morphology of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar (a) stem and leaf; (b) leaf; (c) flower, Sd = sepal dorsal, Sl = sepal lateral, L = labellum, dan Pl = petal.

Sekuensing DNA merupakan proses pembacaan urutan basa nukleotida (adenin, guanin, sitosin, dan timin) pada suatu sampel DNA. Hasil sekuensing produk PCR DNA *D. discolor* Tanimbar menggunakan primer *rbcL* memiliki panjang fragmen 550 bp (Gambar 2). Hasil analisis BLAST menggunakan sekuen gen *rbcL* menunjukkan tingkat homologi dengan genus yang lebih bervariasi. Hal tersebut menunjukkan sekuen gen *rbcL* mampu membedakan intra- dan inter-spesies sampai tingkat genus (Tabel 1). Sepuluh spesies teratas hasil analisis BLAST menggunakan sekuen gen *rbcL* menunjukkan terdapat empat sekuen dari genus *Dendrobium*, dan tujuh sekuen dari genus lain yang memiliki kemiripan secara genetik.

Hasil analisis BLAST sekuen *rbcL* dari *D. discolor* Tanimbar menunjukkan tingkat homologi yang tinggi dengan *rbcL* dari spesies *D. salaccense* yang memiliki nomor aksesori LC193510.1. Persentase tingkat kemiripan secara genetik (*Perc. Ident*) mencapai 99,45 % (Tabel 1). Semakin tinggi tingkat kemiripan yang diperoleh maka semakin tinggi tingkat homologi kedua sekuen. Homologi yang tinggi mengindikasikan rendahnya variasi genetik antar spesies tersebut. Nilai dugaan (*E-value*) bernilai nol (0) menunjukkan pensejajaran seluruh sekuen signifikan. Hal ini sesuai dengan pendapat Frederick *et al.* (2003) bahwa nilai *E-value* <0,05 bernilai signifikan.



Gambar 2. Visualisasi produk PCR angrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar pada gel agarosa 1,25 % dengan penambahan 1 µl EtBr menggunakan Marker (M) DNA 1 kb; (a) primer *rbcL*; (b) primer *ITS*.

Figure 2 Visualization of PCR product of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar on agarose gel 1.25% with 1 µl EtBr using Marker (M) DNA 1 kb; (a) *rbcL* primer; (b) *ITS* primer.

Tabel 1. Hasil BLAST urutan gen *rbcL* angrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar.

Table 1. BLAST result of *rbcL* sequence of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar.

Nomor aksesori	Spesies	Nilai dugaan	Tingkat kemiripan secara genetik (%)
LC193510.1	<i>Dendrobium salaccense</i>	0,0	99,45
JF713180.1	<i>Dendrobium haemoglossum</i> (1)	0,0	99,45
JF713179.1	<i>Dendrobium haemoglossum</i> (2)	0,0	99,45
KT626800.1	<i>Dendrobium cunninghamii</i>	0,0	99,27
MH116090.1	<i>Calanthe tricarinata</i> (1)	0,0	99,27
MH116089.1	<i>Calanthe tricarinata</i> (2)	0,0	99,27
KF852748.1	<i>Calanthe tricarinata</i> (3)	0,0	99,27
KF852736.1	<i>Calanthe alpine</i>	0,0	99,27
AF264158.1	<i>Bothriochilus bellus</i>	0,0	99,27
KX527547.1	<i>Monomeria barbata</i>	0,0	99,27

Panjang produk PCR *D. discolor* Tanimbar menggunakan primer *ITS* yang berhasil disekuensing adalah 803 bp. Hasil analisis BLAST berdasarkan sekuen *ITS* menunjukkan bahwa spesies dengan tingkat kemiripan dengan sampel berasal dari genus yang sama dengan sampel, yaitu *Dendrobium*. Namun, dalam penelitian ini hanya diambil sepuluh spesies teratas saja. Hasil ini menunjukkan bahwa sekuen *ITS* secara genetik mampu mendiskriminasi sampel sampai tingkat spesies/intra-spesies. (Tabel 2). Berdasarkan hasil analisis BLAST, *D. discolor* Lindl. Tanimbar secara genetik memiliki kesamaan/homologi dengan spesies *Dendrobium nindii* (AY239985.1). Persentase tingkat kemiripan (*Perc. Ident*) kedua spesies ini sebesar 98,67 % (Tabel 2). Nilai dugaan (*E-value*) bernilai nol (0) yang berarti pensejajaran seluruh sekuen bernilai signifikan pada tingkat spesies. *ITS* mampu membedakan hubungan interspesifik dan intraspesifik spesies tumbuhan. Hal tersebut dikarenakan, DNA nukleus seperti *ITS* sering mengalami pindah silang pada saat pembelahan sel sehingga menghasilkan rekombinan yang memiliki banyak variasi genetik. Semakin tinggi variasi genetik, menyebabkan tingkat homologi antar inter-spesies semakin rendah (Cheng *et al.* 2016).

Sekuen DNA *D. discolor* Lindl. baik Tanimbar maupun Merauke belum tersedia di *GenBank*. Oleh karena itu, ketika dilakukan analisis BLAST *D. discolor* Lindl. Tanimbar tidak menunjukkan tingkat homologi yang tinggi dengan *D. discolor* Lindl. Merauke. Walaupun secara morfologi, organ vegetatif *D. discolor* Lindl. Tanimbar menunjukkan adanya kemiripan dengan *D. bigibbum* Lindl. (Adams

2015), tetapi secara molekuler keduanya memiliki tingkat homologi yang rendah. Hal ini ditunjukkan dengan hasil BLAST yang didapatkan. Sekuen *D. bigibbum* gen *rbcL* belum tersedia di *GenBank*, sedangkan sekuen *ITS* telah tersedia di *GenBank*. Meskipun sekuen *ITS* *D. bigibbum* telah tersedia di *GenBank*, tetapi hasil BLAST tidak menunjukkan hal yang sama seperti karakter morfologi.

Pensejajaran (*alignment*) bertujuan untuk mengetahui kemiripan antar sekuen baik inter- maupun intra-spesies dengan membandingkan homologi sekuen dan variasi genetik yang dimiliki (Misener dan Krawetz 2000; Meshoul *et al.* 2005). *rbcL* merupakan salah satu gen yang berada dalam genom kloroplas yang terkonservasi (karakteristik struktur yang dipertahankan). Hal ini menyebabkan *rbcL* memiliki tingkat rekombinasi genetik cenderung lebih rendah dibandingkan dengan DNA nucleus (Cheng *et al.* 2016; Taberlet *et al.* 1991). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat rekombinasi genetik *rbcL* lebih rendah dibanding sekuen *ITS* (Gambar 3a, b) sehingga sesuai dengan hasil *alignment*, bahwa *rbcL* memiliki homologi tinggi yang menyebabkan tingkat divergensi rendah atau sedikit variasi genetik (Hasebe *et al.* 1994). Hasil pensejajaran sekuen *rbcL* spesies *D. discolor* Tanimbar menunjukkan adanya dua perbedaan basa nukleotida dari sampel lainnya yang terletak pada urutan ke 519 yaitu basa sitosin (C) sedangkan pada sekuen spesies lain adalah basa guanin (G). Perbedaan lainnya terletak pada urutan pensejajaran basa ke 539 yaitu basa timin (T) milik *D. discolor* Tanimbar menunjukkan perbedaan

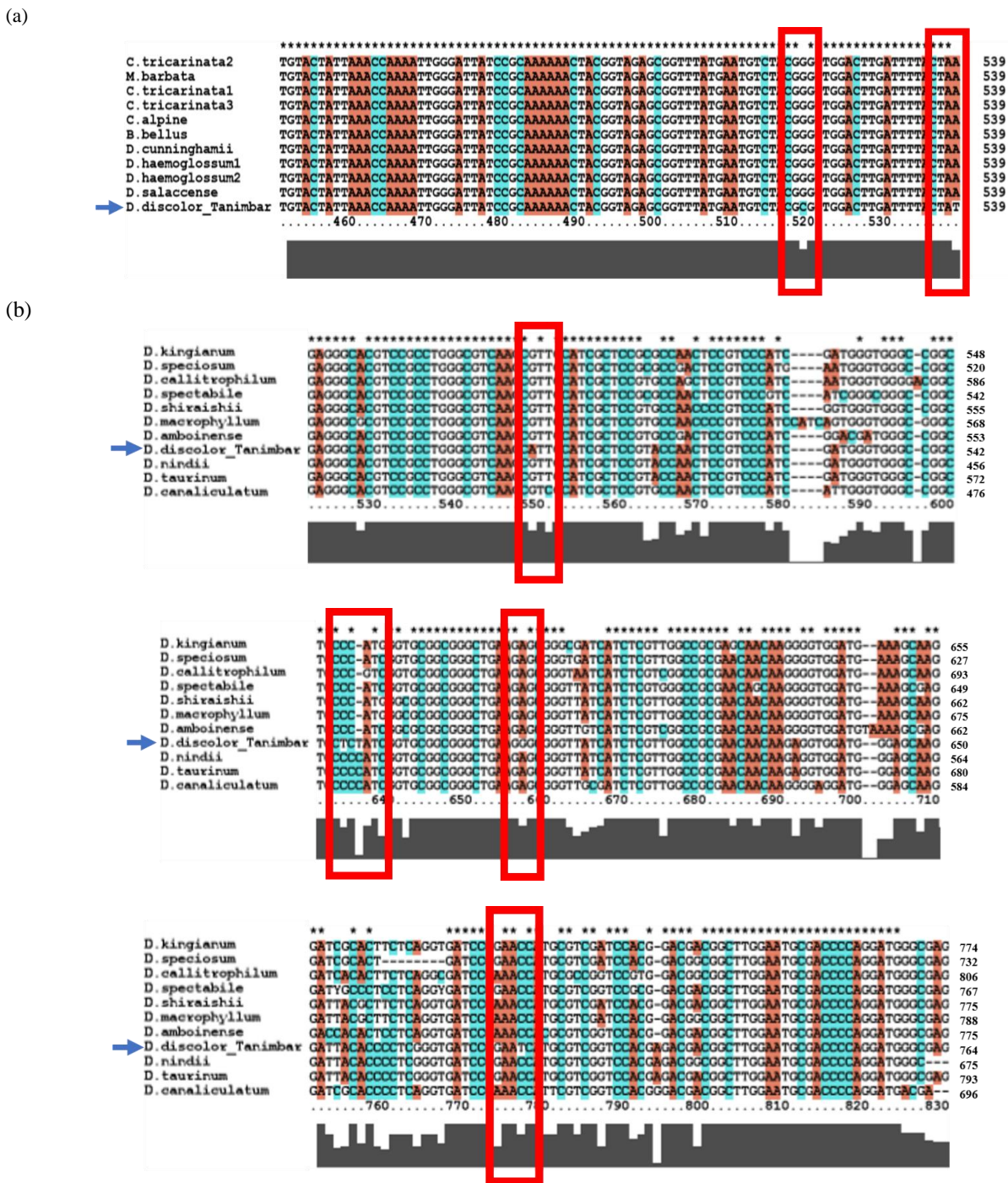
Tabel 2. Hasil BLAST urutan ITS anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar.

Table 2. BLAST result of ITS sequence of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar.

Nomor aksesori	Spesies	Nilai dugaan	Tingkat kemiripan secara genetik (%)
AY239985.1	<i>Dendrobium nindii</i>	0,0	98,67
AB894142.1	<i>Dendrobium taurinum</i>	0,0	97,89
AB894132.1	<i>Dendrobium shiraishii</i>	0,0	92,65
AB894131.1	<i>Dendrobium macrophyllum</i>	0,0	91,82
AB894133.1	<i>Dendrobium amboinense</i>	0,0	90,93
AB894138.1	<i>Dendrobium kingianum</i>	0,0	90,74
AB894141.1	<i>Dendrobium spectabile</i>	0,0	89,94
AB894143.1	<i>Dendrobium speciosum</i>	0,0	90,51
EU430374.1	<i>Dendrobium callitrophilum</i>	0,0	89,19
EU430375.1	<i>Dendrobium canaliculatum</i>	0,0	92,41

dengan sekuen spesies lainnya (Gambar 3a). Hasil ini mengindikasikan bahwa rendahnya variasi genetik pada sekuen *rbcl* menyebabkan *rbcl* kurang efektif digunakan sebagai penanda molekuler pada spesies *D. discolor* Tanimbar. Munculnya dua basa nitrogen pada *D. discolor*

Tanimbar yang berbeda dengan spesies yang lain dikarenakan tingginya nilai *Percent Identity (Perc. Ident)* merupakan angka yang menggambarkan tingkat kemiripan *query sequence* dengan sekuen target. Meskipun pada hasil analisis BLAST sekuen *rbcl* (Tabel 1) menunjukkan adanya dua



Gambar 3. Hasil penjajaran urutan basa angrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar menggunakan gen *rbcl* (a) dan *ITS* (b).
 Figure 3. Alignment result of base sequence of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar using *rbcl* gene (a) and *ITS* (b).

kelompok nilai dengan *Perc. Ident* 99,45 % dan 99,27 %. Namun, setelah disejajarkan *D. discolor* Tanimbar menunjukkan adanya dua perbedaan basa nitrogen. Hal tersebut dikarenakan besarnya nilai *Perc. Ident* berkaitan dengan besarnya nilai *query cover* dan sekuen yang disejajarkan telah mengalami tahapan *trimming*.

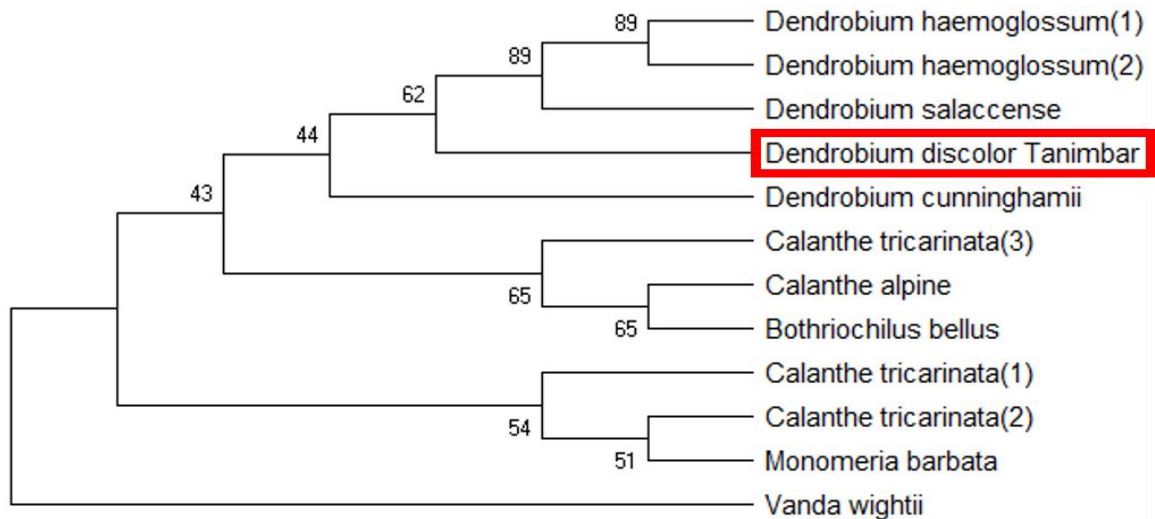
Hasil pensejajaran *D. discolor* Tanimbar menggunakan sekuen *ITS* menunjukkan beberapa perbedaan dengan spesies lainnya. Terdapat empat perbedaan basa nitrogen, antara lain pada urutan ke 549 yaitu pada basa Adenin (A) *D. discolor* Tanimbar dengan basa Guanin (G) sekuen *Dendrobium* lainnya. Perbedaan pada urutan ke 634-636 yaitu sekuen TCT yang berbeda dari sekuen basa lainnya. Dua perbedaan basa nitrogen lainnya terletak pada urutan ke 657 antara G dengan A serta perbedaan basa nitrogen T pada urutan ke 777 milik *D. discolor* Tanimbar dengan sekuen spesies lainnya (Gambar 3b). Hal ini mengindikasikan bahwa sekuen *ITS* memiliki keragaman genetik yang lebih tinggi dibandingkan sekuen *rbcL*.

Karakteristik pohon filogenetik anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar

Rekonstruksi pohon filogenetik menghasilkan empat kelompok utama yang terdiri atas kelompok genus *Dendrobium*, *Calanthe*,

Calanthe, dan *Vanda* (Gambar 4). Seluruh anggota genus *Dendrobium* berada pada satu kluster yang sama yang menandakan kedekatan hubungan kekerabatan karena beberapa karakter yang dimiliki seperti persamaan karakter morfologi yang dimiliki oleh genus *Dendrobium*. Pola pengklasteran yang didapat dari sekuen *rbcL* menunjukkan bahwa *D. discolor* Tanimbar memiliki kekerabatan genetik terdekat dengan *D. salaccense* sesuai dengan hasil BLAST dengan persentase identifikasi kesamaan sekuen mencapai 99,45 %. Anggrek *D. haemoglossum* terkait erat dengan *D. salaccense* (*section* *Grastidium*) dan mungkin terbukti merupakan varian darinya (Fernando dan Ormerod 2008). Namun, Govaerts (2003) menyatakan bahwa *D. haemoglossum* merupakan sinonim dari *D. salaccense* sehingga kedua spesies ini memiliki kekerabatan sangat dekat.

D. cunninghamii merupakan spesies yang berasal dari Selandia Baru (*Australasian clade*) dan termasuk dalam *section* *Winika*. Spesies ini teridentifikasi sebagai kelompok *sister group* yang mencakup genus *Cadetia*, *Diplocaulobium* dan *Flickingeria*, serta *section* *Dendrobium* yang terdiri atas *Grastidium*, *Latouria*, dan *Spatulata* (Burke *et al.* 2008). Hal ini sesuai dengan hasil konstruksi pohon filogenetik yang menunjukkan bahwa *D. cunninghamii* dari *section* *Winika* merupakan



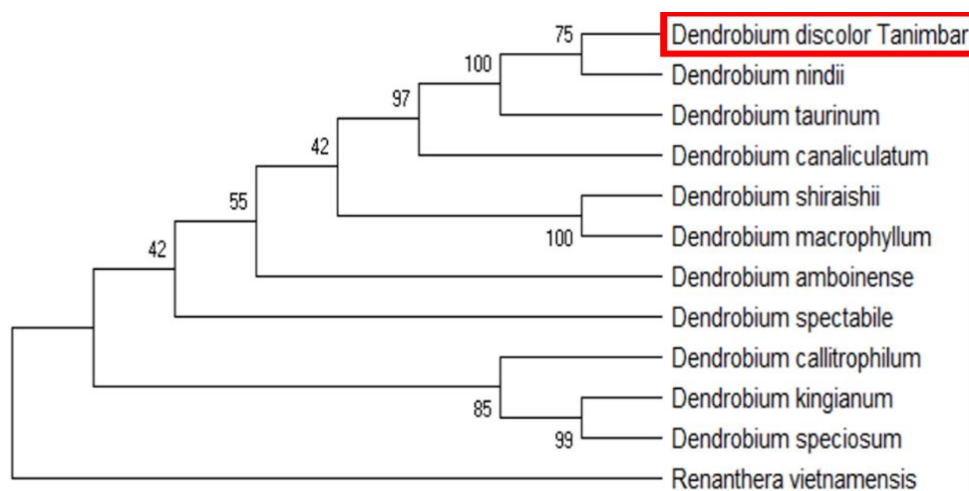
Gambar 4. Pohon filogenetik urutan gen *rbcL* anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar.
 Figure 4. Phylogenetic tree of *rbcL* sequence of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar.

sister group dari *D. salaccense*, *D. haemoglossum* dari *section Grastidium* (Lokho 2013) yang berasal dari kawasan Asia (Indonesia sampai dengan Semenanjung Malaysia) dan *D. discolor* dari *section Spatulata* yang terdistribusi mulai dari Selatan Pantai Papua, Papua Nugini sampai dengan Australia (Schuiteman 2013).

Hasil konstruksi pohon filogenetik menunjukkan pembagian grup tidak hanya didasarkan pada garis kekerabatan yang dekat secara genetik tetapi juga karena adanya kemiripan karakter organ vegetatif (daun) yang dimiliki seperti pada *section Calanthe*. *Section* ini memiliki *pseudobulb* dan *bractea* yang kecil (Seidenfaden *et al.* 1992). *Bothriochilus bellus* tergolong dalam *section* ini dikarenakan memiliki kemiripan pada organ vegetatif. *Vanda wightii* dipilih sebagai *outgroup* yang menunjukkan struktur vegetatif yang relatif sederhana yang dianggap plesiomorfik (Gambar 4). Pola pengklasteran menggunakan sekuen *ITS* menunjukkan bahwa angrek *D. discolor* Tanimbar menghasilkan tiga kelompok utama yang terdiri atas seluruh kelompok genus *Dendrobium* dan satu *outgroup*. *ITS* menunjukkan kemampuannya untuk mendiskriminasi sampai dengan tingkat spesies. Hasil pohon filogenetik *D. discolor* Tanimbar menggunakan primer *ITS* dibagi berdasarkan *section*. Anggota Genus *Dendrobium* dibagi menjadi empat *section* yang terdiri atas *section Spatulata*, *Latouria*, *Calypstrochilus*, dan *Dendrocoryne* (Gambar 5).

Section Spatulata terdiri atas *D. discolor* Tanimbar, *D. nindii*, *D. taurinum*, dan *D. canaliculatum* (Burke *et al.* 2008). *Section Spatulata* terdiri atas spesies yang tidak terpengaruh oleh musim. Sebagian besar tumbuh menjadi tanaman yang cukup besar dan kuat dengan bunga yang bertahan lama di musim panas, iklim hangat sepanjang tahun dengan intensitas cahaya sedang hingga tinggi. Wilayah penyebaran meliputi Indonesia, Filipina, Papua Nugini, Australia sampai dengan Kepulauan Pasifik seperti Solomon, Kaledonia, Fiji, dan Samoa (Cribb 1986). *Section Latouria* terdiri atas *D. shiraishii*, *D. macrophyllum*, *D. amboinensis*, dan *D. spectabile*. *Section Latouria* memiliki karakter morfologi *pseudobulb* besar dan kasar, bunga majemuk tak terbatas (*inflorescentia racemosa*) dengan tipe perbungaan terminal, tegak dan bunga yang umumnya berwarna kuning kehijauan. Distribusi geografis dari *section Latouria* antara lain Indonesia (Papua), Papua Nugini, Kepulauan Pasifik, dan Kepulauan Solomon (Cribb 1983).

Section Dendrocoryne terdiri atas *D. kingianum* dan *D. speciosum* mungkin bersifat polifiletik, dengan spesies *D. callitrophilum* yang berasal dari *section Calypstrochilus* yang menyebabkan spesies ini berada di *clade* yang sama. Distribusi spesies berdasarkan letak geografis dua *section* ini berada di Australia. *Section Dendrocoryne* berdasarkan karakter morfologi memiliki *pseudobulb* yang berbentuk



Gambar 5. Pohon filogenetik urutan gen *ITS* angrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar.

Figure 5. Phylogenetic tree of *ITS* sequence of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Tanimbar

clavate (gada), daun sub-apikal, bunga berumbai dengan tipe perbungaan terminal yang menyerupai *section Latouria* (Blume) Schltr. Perbedaan nyata dari dua *section* terletak pada bunga yang lebih rapuh dan lebih halus, berdaging lebih sedikit. Anggota *section Dendrocoryne* sebagian besar terdistribusi di Australia Timur, Pulau Lord Howe, Kaledonia Baru, Fiji, dan Vanuatu (Burke *et al.* 2008). *Renanthera vietnamensis* dipilih sebagai *outgroup* karena memiliki karakter morfologi yang berbeda dengan genus *Dendrobium*. Perbedaan ini terletak pada percabangan batang dan diduga relatif parafiletik dengan spesies yang diuji (Gambar 5).

Ketika dilakukan analisis BLAST menggunakan sekuen *rbcL*, tidak semua spesies yang dianalisis menggunakan sekuen *ITS* muncul, seperti *D. nindii*. Hal ini dikarenakan sekuen DNA *D. nindii* yang tersedia di *GenBank database* adalah sekuen *ITS*, sedangkan sekuen gen *rbcL* belum tersedia di *GenBank*. Berdasarkan pemaparan tersebut identifikasi secara molekular pada *D. discolor* Tanimbar menggunakan metode “*barcoding DNA*” dapat menjadi salah satu alat yang efektif untuk mengkonfirmasi spesies anggrek obat *D. discolor* Tanimbar dalam keragaman urutan sekuen famili Orchidaceae. Namun, untuk identifikasi molekular akan lebih baik apabila menggunakan kombinasi dua penanda molekular, yaitu *rbcL* dan *ITS*. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Fazekas *et al.* (2009) bahwa analisis molekular dengan DNA *barcoding* akan lebih efektif apabila menggunakan kombinasi *barcode* dari genom nukleus kedua parental yang diwariskan dan genom plastid yang diwariskan secara *uniparent* sebagai identifikasi spesies yang kuat. *rbcL* merupakan gen berasal dari genom plastid, sedangkan *ITS* berasal dari genom nukleus.

KESIMPULAN

Identifikasi secara molekular menggunakan urutan gen *ITS* pada *D. discolor* Tanimbar lebih spesifik dibandingkan dengan gen *rbcL* karena adanya perbedaan basa nukleotida yang berpotensi sebagai *barcode* spesifik. Oleh karena itu, identifikasi berdasarkan urutan gen *ITS* dapat direkomendasikan sebagai penanda molekular

untuk spesies *D. discolor* Tanimbar. Cara mendeteksi anggrek obat *D. discolor* dengan menggunakan *barcoding DNA* lebih akurat sehingga dapat menjamin kebenaran dalam menentukan bahan baku anggrek obat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada LPPM Universitas Jember yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Hibah KeRis tahun 2018 dan 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, P.B. (2015) *Dendrobium bigibbum* (sect. Phalaenanthae) in Australia - Analysis of Diagnostic Characters, Review of Taxa and A New Classification. *Kew Bulletin*. 70 (2), Springer-Verlag London Ltd. doi:10.1007/s12225-015-9565-x.
- Baker, S.S. (2018) Using DNA Barcoding to Identify Duckweed Species as Part of An Undergraduate Ecology Course. *ACS Symposium Series*. 1276, 67-79. doi:10.1021/bk-2018-1276.ch005.
- Bulpitt, C.J. (2005) The Uses and Misuses of Orchids in Medicine. *Quarterly Journal of Medicine*. 98 (9), 625-631. doi:10.1093/qjmed/hci094.
- Burke, J.M., Bayly, M.J., Adams, P.B. & Ladiges, P.Y. (2008) Molecular Phylogenetic Analysis of *Dendrobium* (Orchidaceae), with Emphasis on the Australian Section *Dendrocoryne*, and Implications for Generic Classification. *Australian Systematic Botany*. 21 (1), 1-14. doi:10.1071/SB07038.
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y. & Shiliang, Z. (2016) Barcoding the Kingdom Plantae: New PCR Primers for ITS Regions of plants with Improved Universality and Specificity. *Molecular Ecology Resources*. 16 (1), 138-149. doi:10.1111/1755-0998.12438.
- Cribb, P.J. (1983) A Revision of *Dendrobium* sect. *Latouria* (Orchidaceae). *Kew Bulletin*. 38 (2), 229. doi:10.2307/4108109.
- Cribb, P.J. (1986) A Revision of *Dendrobium* sect. *Spatulata* (Orchidaceae). *Kew Bulletin*. 41 (3), 615-692. doi:10.2307/4108109.

- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990) Isolation of DNA from Small Amounts of Plant Tissues. *BRL Focus*. 12, 13-15.
- Ekman, S. (1999) PCR Optimization and Troubleshooting, with Special Reference to the Amplification of Ribosomal DNA in Lichenized Fungi. *Lichenologist*. 31 (5), 517-531. doi:10.1006/lich.1999.0226.
- Erzurumlu, G.S., Sultana, N., Vural, M. & Serce, S. (2018) Genetic and Phenotypic Variation among Turkish Terrestrial Orchid Species as Revealed by RAPD and Morphological Characteristics. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 42 (4), 227-236. doi:10.3906/tar-1711-37.
- Fazekas, A.J., Kesanakurti, P.R., Burgess, K.S., Percy, D.M., Graham, S.W., Barrett, S.C.H., Newmaster, S.G., Hajibabaei, M. & Husband, B.C. (2009) Are Plant Species Inherently Harder to Discriminate than Animal Species Using DNA Barcoding Markers? *Molecular Ecology Resources*. 9 (SUPPL. 1), John Wiley & Sons, Ltd, 130-139. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02652.x.
- Fernando, S.S. & Ormerod, P. (2008) An Annotated Checklist of the Orchids of Sri Lanka. *Rheedea*. 18 (1), 1-28.
- Frederick, M.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts, John Wiley & Sons, Inc.
- Ghorbani, A., Saeedi, Y. & de Boer, H.J. (2017) Unidentifiable by Morphology: DNA Barcoding of Plant Material in Local Markets in Iran. *PLoS ONE*. 12 (4). doi:10.1371/journal.pone.0175722.
- Govaerts, R. (2003) *World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS: 1-71827 (WCSP)*. London, The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Han, R., Xie, D., Tong, X., Zhang, W., Liu, G., Peng, D. & Yu, N. (2018) Transcriptomic Landscape of *Dendrobium huoshanense* and Its Genes Related to Polysaccharide Biosynthesis. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 87 (1), 1-11. doi:10.5586/asbp.3574.
- Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M. & Iwatsuki, K. (1994) rbcL Gene Sequences Provide Evidence for the Evolutionary Lineages of Leptosporangiate Ferns. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (12), pp. 5730-5734. doi:10.1073/pnas.91.12.5730.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & Dewaard, J.R. (2003) Biological Identifications Through DNA Barcodes. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 270 (1512), London, pp. 313-321. doi:10.1098/rspb.2002.2218.
- Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., & Fazekas, A. (2009) A DNA Barcode for Land Plants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106 (31), pp. 12794-12797.
- Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. & Little, D.P. (2011) Choosing and Using A Plant DNA Barcode. *PLoS ONE*. 6 (5), 1-13. doi:10.1371/journal.pone.0019254.
- Hossain, M.M. (2011) Therapeutic Orchids: Traditional Uses and Recent Advances - An Overview. *Fitoterapia*. 82 (2), Elsevier B.V., 102-140. doi:10.1016/j.fitote.2010.09.007.
- Jeanmougin, F., Thompson, J., Gouy, M. & Higgins, D. (1998) Multiple Sequence Alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*. 23 (10), 403-405. doi:https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01285-7.
- Joshi, G.C., Tewari, L.M., Lohani, N., Upreti, K., Jalal, J.S. & Tewari, G. (2009) Diversity Of Orchids In Uttarakhand and Their Conservation Strategy with Special Reference to Their Medicinal Importance. *Report and Opinion*. 1 (3), 47-52.
- Kartikaningrum, S., Widiastoety, D. & Effendie, K. (2004) *Karakterisasi Tanaman Hias: Anggrek & Anthurium*. Bogor, Sekretariat Komisi Nasional Plasma Nutfah.
- Kim, H.M., Oh, S., Bhandari, G.S., Kim, C. & Park, C. (2014) DNA Barcoding of Orchidaceae in Korea. *Molecular Ecology Resources*. 14 (3), 499-507. doi:10.1111/1755-0998.12207.
- Kishor, R. & Devi, H.S. (2009) Induction of Multiple Shoots in A Monopodial Orchid Hybrid (*Aerides vandarum* Reichb.f × *Vanda stangeana* Reichb.f) Using Thidiazuron and Analysis of Their Genetic Stability. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 97 (2), 121-129. doi:10.1007/s11240-009-9506-1.

- Kress, W.J. & Erickson, 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), e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. & Tamura, K. (2008) MEGA: A Biologist-Centric Software for Evolutionary Analysis of DNA and Protein Sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 9 (4), 299-306. doi:https://doi.org/10.1093/bib/bbn017.
- Liddle, D.J. & Forster, P.I. (1990) The Recognition of Subspecies in *Dendrobium discolor* Lindley (Orchidaceae). *Austrobaileya*. 3 (2), Queensland Herbarium, 319-321. doi:10.2307/41738767.
- Liu, H., Fang, C., Zhang, T., Guo, L. & Ye, Q. (2019) Molecular Authentication and Differentiation of *Dendrobium* Species by rDNA ITS Region Sequence Analysis. *AMB Express*. 9 (1), Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1186/s13568-019-0767-8.
- Lokho, A. (2013) Diversity of *Dendrobium* Sw. Its Distributional Patterns and Present Status in the Northeast India. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 3 (5), 1-9.
- Malik, S., Priya, A. & Babbar, S.B. (2019) Employing Barcoding Markers to Authenticate Selected Endangered Medicinal Plants Traded in Indian Markets. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 25 (2), Springer India, 327-337. doi:10.1007/s12298-018-0610-8.
- Meshoul, S., Layeb, A. & Batouche, M. (2005) A Quantum Evolutionary Algorithm for Effective Multiple Sequence Alignment. In: Bento, C., Cardoso, A. & Dias, G. (eds.) *Progress in Artificial Intelligence*. 3808 LNCS, Berlin, Springer, pp. 260-271. doi:10.1007/11595014_26.
- Miftakhurohmah, Mariana, M. & Wahyuno, D. (2016) Deteksi Piper Yellow Mottle Virus (PYMoV) Penyebab Penyakit Kerdil pada Tanaman Lada secara Polymerase Chain Reaction (PCR). *Bul Littro*. 27 (1), 77. doi:10.21082/bullittro.v27n1.2016.77-83.
- Millar, A. (1978) *Orchids of Papua New Guinea*. Portland, Oregon, Timber Press.
- Misener, S. & Krawetz, S.A. (2000) *Bioinformatics Methods and Protocols*. Methods in. Totowa, New Jersey, Humana Press.
- Pant, B. (2013) Medicinal Orchids and Their Uses: Tissue Culture A Potential Alternative for Conservation. *African Journal of Plant Science*. 7 (10), 448-467. doi:10.5897/ajps2013.1031.
- Parveen, I., Singh, H.K., Malik, S., Raghuvanshi, S. & Babba, S.B. (2017) Evaluating Five Different Loci (rbcL, rpoB, rpoC1, matK and ITS) for DNA Barcoding of Indian Orchids. *Genome*. 60 (8), 665-671.
- Raclariu, A.C., Heinrich, M., Ichim, M.C. & de Boer, H. (2018) Benefits and Limitations of DNA Barcoding and Metabarcoding in Herbal Product Authentication. *Phytochemical Analysis*. 29 (2), 123-128. doi:10.1002/pca.2732.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4 (4), Oxford University Press (OUP), 406-425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Schuiteman, A. (2013) *A Guide to Dendrobium of New Guinea*. Kinabalu, Natural History Publications.
- Seidenfaden, G., Wood, J. & Holttum, R. (1992) *The Orchids of Peninsular Malaysia and Singapore*. Fredensborg, Olsen & Olsen.
- Subedi, A., Kunwar, B., Choi, Y., Dai, Y., van Andel, T., Chaudhary, R.P., de Boer, H.J. & Gravendeel, B. (2013) Collection and Trade of Wild-harvested Orchids in Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 9 (1), 1-10. doi:10.1186/1746-4269-9-64.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) Universal Primers for Amplification of Three Non-Coding Regions of Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17, pp. 1105-1109.
- Teoh, E.S. (2016) *Medicinal Orchids of Asia*. *Medicinal Orchids of Asia*. Singapore, Springer Nature. doi:10.1007/978-3-319-24274-3.
- Wang, H., Qi, M. & Cutler, A.J. (1993) A Simple Method of Preparing Plant Samples for PCR. *Nucleic Acids Research*. 21 (17), 4153-4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153.
- Wang, X., Chen, X., Yang, P., Wang, L. & Han, J. (2017) Barcoding the *Dendrobium*

- (Orchidaceae) Species and Analysis of the Intragenomic Variation Based on the Internal Transcribed Spacer 2. *BioMed Research International*. 2017, 2734960. doi:10.1155/2017/2734960.
- Williams, N.H. & Whitten, W.M. (1999) Molecular Phylogeny and Floral Fragrances of Male Euglossine Bee-Pollinated Orchids: A Study Of *Stanhopea* (Orchidaceae). *Plant Species Biology*. 14, 129-136. doi:10.1046/j.1442-1984.1999.00016.x.
- Xu, S., Li, D., Li, J., Xiang, X., Jin, W., Huang, W., Jin, X. & Huang, L. (2015) Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. *PLoS ONE*. 10 (1), 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0115168.