



In Silico Phylogenetic Analysis of the Genus Oryza Based on Chloroplast ndhF Gene Sequences

Analisis Filogenetik Genus *Oryza* Berdasarkan Sekuens Gen ndhF Kloroplas Secara *in Silico*

Annisa Mardhatillah¹, Violita², Afifatul Achyar³

^{1,2,3} Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang

***e-mail:** annisamardhatillah766@gmail.com

Article History	Received: 07 02 2026	Revised: 13 04 2026	Accepted: 06 08 2028
------------------------	----------------------	---------------------	----------------------

Abstract: The genus *Oryza* exhibits high genetic diversity; however, morphological similarities among species often make it difficult to accurately determine phylogenetic relationships. Chloroplast DNA-based molecular approaches offer an objective alternative, one of which involves the use of the *ndhF* gene, which is both conserved and variable. This study aims to analyze phylogenetic relationships among species within the genus *Oryza* based on the *ndhF* gene sequences derived from chloroplast DNA. The *ndhF* gene sequence data were obtained from the NCBI GenBank database in FASTA format and analyzed *in silico* using MEGA 11 software. Sequence alignment was performed using the ClustalW method, followed by phylogenetic analysis using the Neighbor-Joining method with 10,000 bootstrap repetitions and the Maximum Likelihood method with 1,000 bootstrap repetitions. The analysis results showed that the *ndhF* gene was able to group *Oryza* species into several clusters reflecting genetic proximity, with high bootstrap support for several groups, such as the *O. glaberrima* and *O. barthii* pair and the *O. sativa* group. However, some branches showed moderate to low bootstrap values, particularly in wild species, indicating the limited resolution of the *ndhF* gene as a single marker. Sequence alignment results showed that the *ndhF* gene is relatively conserved but still exhibits nucleotide variations that are informative for distinguishing species within the genus *Oryza*. Overall, the *ndhF* gene can be used as a sufficiently informative molecular marker in genetic relationship analyses of *Oryza* at the genus and species levels. However, to improve the resolution and reliability of the analysis, the use of additional molecular markers or a multigene-based approach is highly recommended.

Keywords: *Oryza*; phylogenetics; *ndhF* gene; chloroplast DNA.

Abstrak: Genus *Oryza* memiliki keragaman genetik yang tinggi, namun kemiripan morfologi antarspesies sering menyulitkan penentuan hubungan kekerabatan secara akurat. Pendekatan molekuler berbasis DNA kloroplas menjadi alternatif yang objektif, salah satunya melalui pemanfaatan gen *ndhF* yang memiliki sifat konservatif dan variabel. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hubungan kekerabatan antarspesies dalam genus *Oryza* berdasarkan sekuens gen *ndhF* yang berasal dari DNA kloroplas. Data sekuens gen *ndhF* diperoleh dari database NCBI GenBank dalam format FASTA dan dianalisis secara *in silico* menggunakan perangkat lunak MEGA 11. Penyelarasan sekuens dilakukan dengan metode ClustalW, dilanjutkan dengan analisis filogenetik menggunakan metode Neighbor-Joining dengan uji bootstrap sebanyak 10.000 ulangan dan Maximum Likelihood dengan uji bootstrap sebanyak 1.000 ulangan. Hasil analisis menunjukkan bahwa gen *ndhF* mampu mengelompokkan spesies *Oryza* ke dalam beberapa klaster yang mencerminkan kedekatan genetik, dengan dukungan bootstrap tinggi pada beberapa kelompok seperti pasangan *O. glaberrima*, *O. barthii* dan



Licensees may copy, distribute, display and perform the work and make derivative and remixes based on it only if they give the author or licensor the credits (attribution) in the manner specified by these. Licensees may copy, distribute, display, and perform the work and make derivative works and remixes based on it only for non-commercial purposes

kelompok *O. sativa*. Namun demikian, beberapa percabangan menunjukkan nilai bootstrap sedang hingga rendah, terutama pada spesies liar, yang mengindikasikan keterbatasan resolusi gen *ndhF* sebagai marker tunggal. Hasil penyelarasan sekuens menunjukkan bahwa gen *ndhF* bersifat konservatif, tetapi tetap memiliki variasi nukleotida yang informatif untuk membedakan spesies dalam genus *Oryza*. Secara keseluruhan, gen *ndhF* dapat digunakan sebagai penanda molekuler yang memiliki resolusi filogenetik yang memadai dalam analisis kekerabatan genetik *Oryza* pada tingkat genus dan spesies. Namun, untuk meningkatkan resolusi dan keandalan analisis, penggunaan penanda molekuler tambahan atau pendekatan berbasis multigen sangat direkomendasikan.

Kata Kunci: *Oryza*; filogenetik; gen *ndhF*; DNA kloroplas.

A. Pendahuluan

Tanaman padi (*Oryza* spp.) merupakan salah satu komoditas budidaya yang berperan penting dalam menjaga ketahanan pangan global. Tanaman ini tersebar luas di wilayah Asia dan Afrika Barat, baik di daerah tropis maupun subtropis (Purnama *et al.*, 2024). Seiring dengan meningkatnya kebutuhan produksi pangan, padi yang termasuk ke dalam genus *Oryza* menjadi fokus penting dalam kajian botani, genetika, dan pemuliaan tanaman. Genus *Oryza* mencakup lebih dari 20 spesies dan terdiri atas spesies padi budidaya dan padi liar. Dua spesies padi yang dibudidayakan secara luas hingga saat ini adalah *Oryza sativa* L. yang berasal dari Asia dan *Oryza glaberrima* Steud., yang berasal dari Afrika Barat (Purwansyah *et al.*, 2021). Padi budidaya merupakan sumber pangan pokok bagi sebagian besar wilayah Asia dan Afrika Barat, sehingga ketersediaan dan peningkatan produksi padi harus mampu memenuhi kebutuhan konsumsi nasional secara berkelanjutan (Meliawati, 2023). Selain itu, keberadaan spesies liar dalam genus *Oryza* memiliki nilai strategis sebagai sumber keragaman genetik yang penting dalam upaya konservasi plasma nutfah dan pengembangan varietas padi unggul.

Genus *Oryza* memiliki tingkat keragaman genetik yang tinggi, yang tercermin dari banyaknya spesies dengan karakter morfologi relatif mirip yang mencakup padi budidaya dan padi liar. Tingginya kemiripan karakter morfologi antarspesies dalam genus ini sering kali menyulitkan penentuan hubungan kekerabatan apabila hanya didasarkan pada karakter fenotipik (Stein *et al.*, 2018). Karakter morfologi bersifat plastis dan sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan variasi fenotip, sehingga kurang merepresentasikan hubungan antar kekerabatan yang sebenarnya (Fadhilah & Achyar, 2023; Fang, 2024). Hal ini sejalan dengan temuan Ghorbani *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa pengelompokan yang hanya didasarkan pada persamaan morfologi berpotensi menimbulkan kesalahan identifikasi dalam memilih spesies yang diinginkan, karena kebanyakan spesies memiliki morfologi yang hampir sama. Oleh karena itu, pendekatan morfologi saja dinilai belum memadai untuk menggambarkan hubungan kekerabatan genetik secara akurat. Dalam konteks ini, pendekatan molekuler melalui analisis filogenetik menjadi metode yang lebih andal karena mampu mengungkapkan variasi genetik yang bersifat stabil dan objektif (Lu *et al.*, 2025).

Dalam konteks keragaman genetik yang tinggi pada genus *Oryza*, pemahaman mengenai hubungan kekerabatan menjadi aspek penting dalam kajian genetika

tumbuhan (Martinez *et al.*, 2018). Informasi ini sangat diperlukan untuk memahami pola hubungan genetik antara padi liar dan padi budidaya, serta potensi pemanfaatan sumber daya genetik dalam program pemuliaan tanaman (Sahadeva *et al.*, 2023). Oleh karena itu, diperlukan penggunaan penanda genetik yang informatif dan stabil untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan secara akurat.

Sejalan dengan kebutuhan akan penggunaan penanda genetik yang informatif dan stabil, DNA barcode menjadi salah satu pendekatan yang banyak digunakan dalam identifikasi dan analisis filogenetik tumbuhan (Rahayu *et al.*, 2019). Penanda genetik berbasis DNA kloroplas seperti *matK*, *rbcL*, dan *ycf1* merupakan marker yang umum digunakan karena stabil dan informatif (Huo *et al.*, 2019). Namun, masing-masing marker memiliki keterbatasan; *rbcL* cenderung terlalu konservatif sehingga kurang mampu membedakan spesies yang berkerabat dekat, sedangkan *matK* memiliki tingkat variasi tinggi namun sering mengalami kesulitan dalam proses alignment (Kassem, 2025).

Salah satu alternatif marker yang digunakan adalah gen NADH dehydrogenase subunit F (*ndhF*) yang memiliki kombinasi sifat konservatif dan variabel lebih seimbang, sehingga mampu memberikan resolusi filogenetik yang lebih optimal pada tingkat genus hingga spesies (Amar, 2020). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa gen *ndhF* memiliki variasi nukleotida yang cukup informatif untuk membedakan spesies yang berkerabat dekat dan tetap stabil dalam analisis komparatif (Cai *et al.*, 2025; Zou *et al.*, 2025). Oleh karena itu, penggunaan gen *ndhF* menjadi relevan untuk mengevaluasi hubungan kekerabatan dalam genus *Oryza* secara spesifik dibandingkan dengan marker kloroplas yang lain. Gen *ndhF* memiliki keunggulan dalam memberikan keseimbangan antara konservasi dan variasi nukleotida, sehingga potensial digunakan sebagai marker tunggal dalam analisis filogenetik.

Perkembangan bioinformatika memungkinkan analisis filogenetik dilakukan secara *in silico* dengan memanfaatkan data sekuens DNA yang tersedia pada database publik seperti National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank (Achyar *et al.*, 2021). Berbagai penelitian filogenetik pada genus *Oryza* telah banyak dilakukan terutama menggunakan pendekatan genom lengkap atau multi-gen untuk meningkatkan resolusi hubungan kekerabatan yang lebih tinggi (Li *et al.*, 2025; Stein *et al.*, 2018). Namun demikian, pendekatan tersebut belum secara eksplisit mengevaluasi sejauh mana gen kloroplas tunggal seperti *ndhF* mampu secara independen menganalisis hubungan kekerabatan dalam genus *Oryza*. Selain itu, studi yang secara khusus mengevaluasi kekuatan dukungan statistik (bootstrap) dengan jumlah ulangan tinggi pada gen *ndhF* masih terbatas. Kondisi ini menyebabkan belum jelasnya tingkat reliabilitas hasil filogenetik berbasis gen tunggal dalam konteks genus *Oryza*.

Dalam analisis filogenetik, metode Neighbor-Joining (NJ) digunakan karena merupakan metode berbasis jarak yang efisien dan mampu menghasilkan topologi pohon yang representatif, terutama pada dataset dengan panjang sekuens relatif seragam. Metode ini banyak digunakan dalam studi filogenetik berbasis kloroplas karena memungkinkan evaluasi cepat terhadap pola hubungan kekerabatan awal

antarspesies berdasarkan kesamaan genetik (Lemoine & Gascuel, 2024). Selain itu, untuk meningkatkan keandalan inferensi filogenetik, hasil analisis juga dapat divalidasi menggunakan metode berbasis model seperti Maximum Likelihood (ML), yang mempertimbangkan proses molekuler lebih komprehensif. Dengan demikian, kebaruan penelitian ini terletak pada evaluasi gen *ndhF* sebagai marker tunggal dalam analisis filogenetik genus *Oryza*, pengujian stabilitas hasil filogenetik melalui analisis bootstrap dengan jumlah ulangan yang tinggi, serta penilaian kemampuan gen *ndhF* dalam membedakan hubungan kekerabatan antarspesies padi budidaya dan padi liar. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hubungan kekerabatan genetik antarspesies dalam genus *Oryza* berdasarkan sekuens gen *ndhF* secara *in silico* dan mengevaluasi konsistensi hasil analisis menggunakan dua pendekatan filogenetik. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan gambaran pola kekerabatan filogenetik dan kontribusi dalam mengevaluasi efektivitas gen *ndhF* sebagai penanda molekuler dalam studi filogenetik tanaman padi.

B. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan *in silico* dengan memanfaatkan data sekuens DNA yang tersedia pada basis data publik. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2025 di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Secara umum, penelitian ini terdiri atas tiga tahapan utama, yaitu: (1) pengumpulan data sekuens gen *ndhF*, (2) penyelarasan sekuens, dan (3) analisis filogenetik. Data sekuens DNA gen *ndhF* dari spesies-spesies dalam genus *Oryza* diperoleh dari database NCBI GenBank dalam format FASTA. Sekuens yang dipilih berdasarkan ketersediaan sekuens lengkap, kualitas data yang baik, dan keseragaman panjang sekuens. Pada penelitian ini digunakan 13 spesies *Oryza*, sebagaimana tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Data sekuens gen *ndhF* yang diperoleh dari database NCBI

No.	Nama Spesies	Accession Number	Country	Panjang Sekuens (bp)
1	<i>Oryza sativa</i> cultivar TN1	NC_031333.1	Amerika Serikat	2205
2.	<i>Oryza punctata</i> voucher GEN1233_2	NC_027676.1	Amerika Serikat	2205
3.	<i>Oryza sativa</i> f. <i>spontanea</i>	MT712789.1	China	2205
4.	<i>Oryza sativa</i> cultivar N22	MG252500.1	Korea Selatan	2205
5.	<i>Oryza meyeriana</i>	MF401453.1	China	2205
6.	<i>Oryza rhizomatis</i>	MF401452.1	China	2205
7.	<i>Oryza latifolia</i>	MF401451.1	China	2205
8.	<i>Oryza eichingeri</i>	MF401450.1	China	2205
9.	<i>Oryza glumipatula</i> cultivar W2201	KR364803.1	Korea	2205
10.	<i>Oryza glumipatula</i> cultivar W1187	KR364802.1	Korea	2205
11.	<i>Oryza longistaminata</i>	KM088024.1	Korea Selatan	2205
12.	<i>Oryza barthii</i>	KM088023.1	Korea Selatan	2205
13.	<i>Oryza glaberrima</i>	KM088021.1	Korea Selatan	2205

Penyelarasan sekuens dilakukan menggunakan perangkat lunak MEGA versi 11 dengan algoritma ClustalW untuk menyamakan posisi nukleotida antarsekuens secara homolog antarspesies. ClustalW dipilih karena mampu menghasilkan penyelarasan yang stabil pada sekuens dengan tingkat kemiripan yang tinggi. Sekuens yang mengandung nukleotida ambigu (N) dalam jumlah tinggi atau memiliki panjang yang tidak seragam dieliminasi untuk menjaga kualitas alignment.

Analisis filogenetik dilakukan menggunakan dua pendekatan, yaitu metode Neighbor-Joining dan Maximum Likelihood (ML). Metode NJ digunakan untuk memperoleh gambaran awal hubungan kekerabatan berdasarkan matriks jarak genetik, sedangkan metode ML digunakan untuk memvalidasi konsistensi topologi pohon yang dihasilkan. Jarak evolusi antarsekuens dihitung menggunakan metode Maximum Composite Likelihood dan dinyatakan dalam satuan jumlah substitusi basa per situs.

Pada analisis ML, model substitusi nukleotida terbaik ditentukan berdasarkan nilai Bayesian Information Criterion (BIC) yang tersedia dalam perangkat lunak MEGA versi 11. Keandalan topologi pohon filogenetik diuji menggunakan metode bootstrap sebanyak 10.000 ulangan untuk NJ, karena metode Maximum Likelihood memiliki kompleksitas yang lebih tinggi, sehingga penggunaan 1.000 ulangan bootstrap telah umum digunakan dalam analisis filogenetik. Nilai bootstrap $\geq 70\%$ diinterpretasikan sebagai dukungan yang kuat terhadap klaster yang terbentuk.

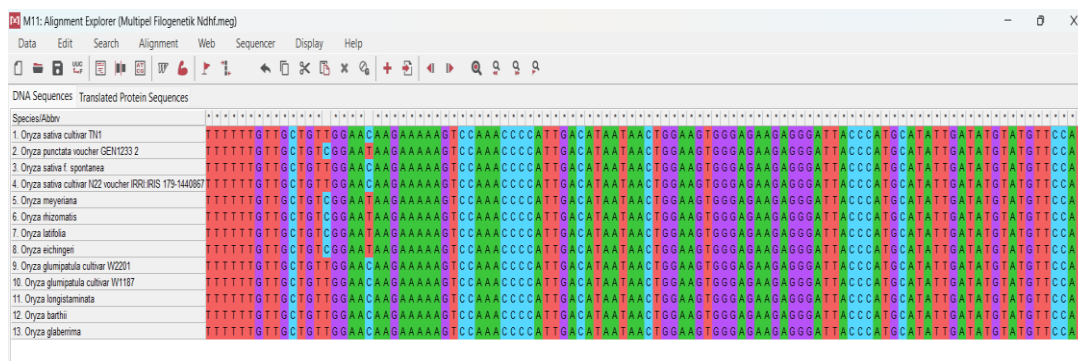
Seluruh takson yang dianalisis berada dalam genus *Oryza* dan tidak digunakan spesies luar kelompok (*outgroup*), maka pohon filogenetik yang dihasilkan bersifat unrooted. Pendekatan ini tetap valid untuk analisis kedekatan genetik, meskipun tidak digunakan untuk inferensi arah evolusi, dan pendekatan ini umum digunakan dalam analisis filogenetik berbasis gen tunggal untuk menghindari bias dalam pemilihan *outgroup*. Oleh karena itu, interpretasi hubungan kekerabatan difokuskan pada tingkat kedekatan genetik antarspesies, bukan pada arah evolusi atau penentuan posisi basal secara absolut.

C. Hasil dan Pembahasan

Variasi nukleotida yang teramati pada hasil penyelarasan sekuens gen *ndhF* mencerminkan adanya perubahan materi genetik yang terjadi selama proses evolusi spesies dalam genus *Oryza*. Perubahan pada tingkat gen, atau mutasi titik, merupakan salah satu mekanisme utama mendasari munculnya variasi genetik dan pembentukan alel baru pada suatu populasi (Warmadewi, 2017). Variasi genetik tersebut berperan penting dalam proses adaptasi spesies terhadap perubahan lingkungan, yang pada akhirnya memengaruhi keberlangsungan hidup dan diversifikasi spesies.

Sekuens gen *ndhF* yang dianalisis pada penelitian ini berasal dari berbagai spesies *Oryza*, mencakup padi budidaya dan padi liar, sehingga merepresentasikan keragaman genetik dalam genus tersebut. Analisis awal difokuskan pada identifikasi tingkat konservasi dan variasi nukleotida antarspesies sebagai dasar dalam merekonstruksi hubungan kekerabatan antarspesies. Pola kesamaan dan perbedaan

nukleotida antarsekuens menjadi indikator penting dalam menilai potensi gen *ndhF* sebagai penanda filogenetik pada tingkat genus. Hasil penyelarasan sekuens gen *ndhF* ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil penyelarasan sekuens DNA gen *ndhF* dari spesies *Oryza*

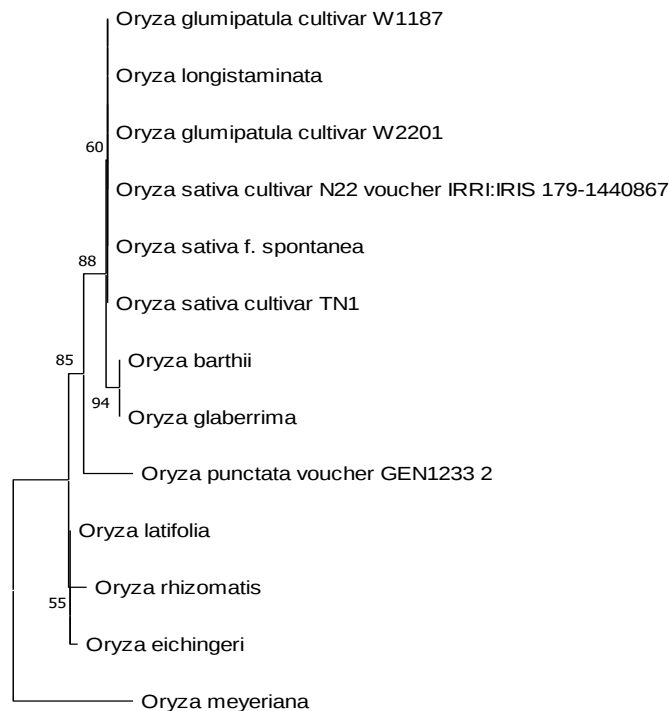
Hasil penyelarasan sekuens gen *ndhF* (Gambar 1) menunjukkan bahwa sebagian besar posisi nukleotida bersifat konservatif di antara spesies *Oryza* yang dianalisis. Tingginya tingkat kesamaan nukleotida mengindikasikan bahwa gen *ndhF* merupakan gen kloroplas yang relatif stabil dan mengalami tekanan seleksi yang kuat, sehingga perubahan nukleotida pada gen ini cenderung terbatas. Karakter ini sesuai dengan sifat umum genom kloroplas yang memiliki laju kekerabatan yang lebih rendah dibandingkan dengan genom nukleus.

Meskipun tingkat konservasi relatif tinggi, pada beberapa posisi tertentu terlihat adanya variasi nukleotida berupa perbedaan basa antarspesies. Variasi tersebut mencerminkan terjadinya mutasi titik (substitusi nukleotida) yang berkontribusi terhadap diferensiasi genetik dalam genus *Oryza*. Perbedaan nukleotida ini menjadi sumber utama variasi genetik yang dapat dimanfaatkan untuk membedakan kelompok spesies, baik antarpadi budidaya maupun padi liar, serta berperan dalam pembentukan jarak genetik pada analisis filogenetik.

Berdasarkan hasil alignment, perbedaan panjang sekuens antarspesies *Oryza* relatif kecil dan hampir seluruh sekuens terselaraskan secara homogen. Kesenjangan (gap) hanya ditemukan dalam jumlah yang sangat terbatas, menunjukkan bahwa peristiwa insersi dan delesi (indel) bukan merupakan sumber utama variasi genetik pada data gen *ndhF* yang dianalisis (Tnah *et al.*, 2018). Variasi genetik pada penelitian ini lebih didominasi oleh substitusi nukleotida dibandingkan dengan indel, sebagaimana yang terlihat dari keseragaman panjang dan pola sekuens pada Gambar 1.

Variasi nukleotida yang teramati relatif rendah, namun tetap memberikan resolusi filogenetik yang memadai. Keberadaan situs-situs variabel tersebut tetap memberikan informasi yang cukup untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan antarspesies *Oryza*. Hal ini menunjukkan bahwa gen *ndhF* memiliki tingkat konservasi yang memadai sekaligus mengandung variasi nukleotida yang informatif, sehingga layak digunakan sebagai penanda molekuler dalam analisis filogenetik pada tingkat genus (Amar, 2020; Li *et al.*, 2021). Oleh karena itu, variasi nukleotida yang

teridentifikasi pada hasil penyelarasan sekuens selanjutnya digunakan sebagai dasar dalam perhitungan jarak genetik dan konstruksi pohon filogenetik untuk menganalisis hubungan kekerabatan antarspesies *Oryza*.



Gambar 2. Pohon filogenetik Neighbor-Joining (original tree) genus *Oryza* berdasarkan gen *ndhF*

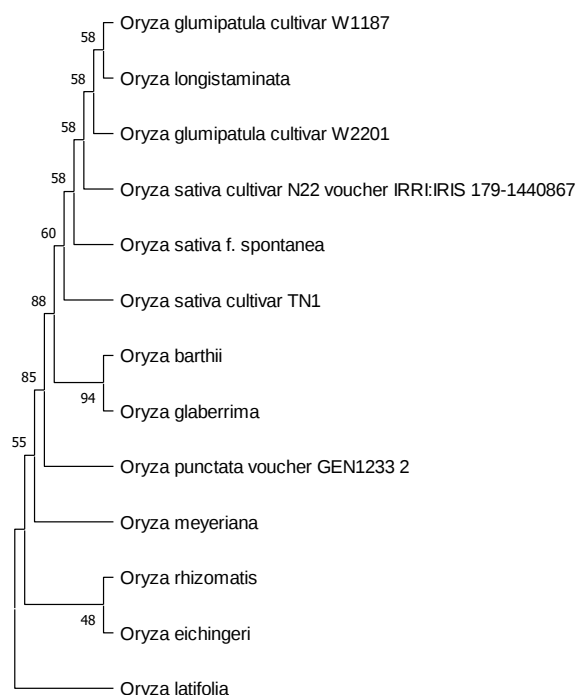
Pohon filogenetik utama genus *Oryza* yang dikonstruksi berdasarkan sekuens gen *ndhF* kloroplas (Gambar 2) menunjukkan pola pengelompokan spesies yang jelas ke dalam beberapa kluster utama berdasarkan tingkat kesamaan sekuens nukleotida. Pohon ini merepresentasikan hubungan kekerabatan genetik antarspesies *Oryza* tanpa mempertimbangkan tingkat keandalan percabangan secara statistik. Struktur percabangan yang terbentuk memperlihatkan kedekatan hubungan genetik antarspesies yang dianalisis.

Pada pohon filogenetik utama yang dibangun menggunakan metode Neighbor-Joining, terlihat pola pengelompokan spesies padi budidaya *Oryza sativa* beserta varietasnya, yaitu *O. sativa* TN1, *O. sativa* N22, dan *O. sativa* f. *spontanea*, yang menunjukkan tingkat kedekatan genetik yang tinggi antarvarietas padi budidaya dan kerabat dekatnya. Selain itu, *O. glaberrima* dan *O. barthii* juga membentuk kelompok tersendiri yang terpisah dari kluster padi budidaya Asia, yang mencerminkan kedekatan genetik yang kuat antara padi budidaya Afrika dan spesies liar yang berasosiasi dengannya.

Beberapa spesies padi liar lainnya, seperti *O. glumipatula* W1187, *O. glumipatula* W2201 dan *O. longistaminata*, membentuk kluster terpisah dari padi budidaya. Pengelompokan ini menunjukkan adanya perbedaan genetik yang lebih besar dibandingkan dengan kluster padi budidaya, yang mencerminkan keragaman genetik dalam genus *Oryza*.

Pohon filogenetik menunjukkan bahwa *O. latifolia*, *O. rhizomatis*, dan *O. eichingeri* menempati posisi cabang yang terpisah dari kelompok klaster utama. Posisi ini menunjukkan bahwa spesies-spesies tersebut memiliki tingkat perbedaan genetik yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pola ini mengindikasikan bahwa gen *ndhF* mampu menangkap variasi genetik antarspesies liar dengan karakteristik yang berbeda.

Spesies seperti *O. meyeriana* dan *O. punctata* juga menempati cabang yang terpisah dari kelompok lainnya, yang menunjukkan tingkat perbedaan genetik yang cukup besar dalam analisis ini. Namun demikian, karena pohon filogenetik yang dihasilkan tidak menggunakan spesies luar kelompok (outgroup), interpretasi difokuskan pada kedekatan genetik antarspesies, bukan pada arah evolusi atau penentuan basal secara absolut.



Gambar 3. Pohon filogenetik konsensus bootstrap genus *Oryza* berdasarkan gen *ndhF*

Pohon filogenetik dengan nilai bootstrap (Gambar 3) digunakan untuk mengevaluasi tingkat keandalan dan stabilitas percabangan yang terbentuk pada pohon filogenetik utama. Nilai bootstrap pada setiap percabangan menunjukkan tingkat dukungan statistik terhadap kluster yang terbentuk berdasarkan hasil pengulangan analisis sebanyak 10.000 kali. Nilai bootstrap merepresentasikan konsistensi kemunculan suatu kluster pada hasil pengulangan analisis, sehingga digunakan secara luas sebagai indikator kekuatan dukungan statistik terhadap topologi pohon filogenetik (Lemoine & Gascuel, 2024; Wiegert *et al.*, 2024). Dukungan bootstrap yang tinggi menunjukkan bahwa pengelompokan spesies bersifat stabil dan pengelompokan yang dihasilkan dapat diandalkan.

Pada bagian atas pohon, *Oryza glumipatula* W1187, *O. longistaminata* dan *O. glumipatula* W2201 membentuk suatu kelompok dengan nilai bootstrap sebesar 58%. Nilai ini menunjukkan dukungan sedang, yang mengindikasikan bahwa ketiga spesies tersebut memiliki kedekatan genetik, namun dengan tingkat kepercayaan yang belum sepenuhnya kuat. Posisi *Oryza glumipatula* W1187 yang berdekatan dengan *O. longistaminata* menunjukkan adanya kesamaan genetik yang relatif tinggi di antara spesies padi liar tersebut.

Oryza sativa kultivar N22 terhubung dengan kelompok *Oryza glumipatula* W1187, *O. longistaminata* dan *O. glumipatula* W2201 dengan nilai bootstrap sebesar 58%, yang menunjukkan bahwa meskipun masih berada dalam satu kelompok besar, hubungan genetiknya dengan spesies liar relatif lebih lemah, sehingga hubungan tersebut belum sepenuhnya stabil dibandingkan dengan hubungan antarspesies dalam klaster spesies budidaya *O. sativa* N22, dan *O. sativa f. spontanea* dalam kelompok ini dengan nilai bootstrap sebesar 60% yang menunjukkan peningkatan dukungan terhadap kedekatan genetik yang lebih jelas dalam kelompok budidaya sehingga posisinya dalam klaster budidaya lebih stabil.

Oryza sativa TN1 menunjukkan hubungan yang lebih kuat dengan *O. sativa f. spontanea*, dengan nilai bootstrap sebesar 88%, yang mengindikasikan bahwa kedua takson tersebut memiliki kedekatan genetik yang tinggi. Hal ini konsisten dengan statusnya sebagai bagian dari kelompok padi budidaya dan bentuk liar yang berasosiasi erat.

Kelompok pohon filogenetik berikutnya menunjukkan bahwa klaster memiliki dukungan statistik yang sangat kuat. Pasangan *O. glaberrima* dan *O. barthii* menunjukkan nilai bootstrap sebesar 94% yang merupakan nilai tertinggi dalam pohon. Hal ini menegaskan kedekatan genetik antara padi budidaya Afrika dan spesies liar yang berasosiasi dengannya. Klaster ini kemudian terhubung dengan kelompok *O. sativa* melalui cabang dengan nilai bootstrap sebesar 85%, yang menunjukkan adanya keterkaitan genetik yang cukup kuat antara padi budidaya di Asia dan Afrika.

Oryza punctata menempati posisi terpisah dari kedua kelompok *O. glaberrima* dan *O. barthii*, dengan nilai bootstrap sebesar 55% pada cabang yang menghubungkannya. Hal ini menunjukkan bahwa spesies ini memiliki tingkat perbedaan genetik yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok padi budidaya, namun masih berada dalam struktur kekerabatan yang sama. *Oryza meyeriana* berada pada cabang berikutnya yang terpisah dari *O. punctata*, yang menunjukkan bahwa spesies ini memiliki jarak genetik yang lebih jauh dibandingkan dengan kelompok *O. glaberrima* dan *O. barthii*. Posisi ini mengindikasikan bahwa variasi genetik pada *Oryza meyeriana* berbeda dibandingkan dengan sebagian besar spesies lain dalam analisis filogenetik.

Pada bagian bawah pohon, *O. eichingeri* dan *O. rhizomatis* membentuk pasangan dengan nilai bootstrap sebesar 48%, yang menunjukkan dukungan statistik yang rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa hubungan kekerabatan antara kedua spesies tersebut masih memiliki tingkat ketidakpastian yang cukup tinggi, kemungkinan akibat

keterbatasan variasi nukleotida pada gen *ndhF* dalam membedakan hubungan genetik yang lebih kompleks.

Terakhir, *Oryza latifolia* menempati posisi paling terpisah dalam pohon filogenetik, yang menunjukkan bahwa spesies ini memiliki tingkat perbedaan genetik yang paling tinggi dibandingkan dengan spesies lainnya dalam dataset tersebut.

Secara umum, nilai bootstrap $\geq 70\%$ dianggap menunjukkan dukungan statistik yang moderat hingga kuat terhadap suatu kluster filogenetik, khususnya dalam studi filogenetik tumbuhan berbasis data molekuler sedangkan nilai di bawahnya mencerminkan dukungan sedang hingga rendah (Lemoine & Gascuel, 2024; Wiegert *et al.*, 2024). Oleh karena itu, tingginya nilai bootstrap pada kluster utama, seperti *O. glaberrima*, *O. barthii* dan kelompok *O. sativa*, menunjukkan bahwa gen *ndhF* memiliki kemampuan yang baik dalam mengungkap hubungan kekerabatan pada tingkat genus dan spesies. Namun demikian, nilai bootstrap yang relatif rendah pada beberapa cabang menunjukkan bahwa penggunaan satu gen kloroplas memiliki keterbatasan resolusi, sehingga interpretasi pada kluster tersebut perlu dilakukan secara hati-hati (Messeder *et al.*, 2024).

Pola pengelompokan yang diperoleh pada penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya oleh (Li *et al.*, 2025; Stein *et al.*, 2018) yang menunjukkan bahwa spesies *Oryza* cenderung mengelompok berdasarkan kedekatan genetik antara padi budidaya dan spesies liar yang berasosiasi dengannya. Pola pengelompokan yang dihasilkan juga konsisten antara metode Neighbor-Joining dan metode Maximum Likelihood, yang memperkuat validitas topologi pohon yang diperoleh. Meskipun demikian, beberapa perbedaan posisi cabang minor dapat muncul akibat perbedaan jumlah spesies, sumber data sekuens, dan penanda molekuler yang digunakan.

Hasil analisis filogenetik ini memiliki implikasi penting dalam bidang konservasi dan pemuliaan tanaman padi. Identifikasi hubungan kekerabatan genetik antarspesies *Oryza* memberikan dasar ilmiah dalam upaya konservasi plasma nutfah, khususnya spesies liar untuk pengembangan varietas unggul. Meskipun demikian, penggunaan satu gen kloroplas memiliki keterbatasan resolusi, sehingga penelitian lanjutan dengan penanda molekuler tambahan atau genom kloroplas lengkap direkomendasikan.

D. Simpulan

Penelitian ini berhasil menganalisis hubungan kekerabatan antarspesies dalam genus *Oryza* berdasarkan sekuens gen kloroplas *ndhF* menggunakan pendekatan *in silico*. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa gen *ndhF* mampu mengelompokkan spesies *Oryza* ke dalam beberapa kelompok yang mencerminkan kedekatan genetik, khususnya pada kelompok padi budidaya, *O. glaberrima*, dan *O. barthii* yang didukung oleh nilai bootstrap tinggi. Namun demikian, tidak semua percabangan menunjukkan dukungan statistik yang kuat. Beberapa hubungan antarspesies, terutama pada kelompok spesies liar, memiliki nilai bootstrap sedang

hingga rendah, yang mengindikasikan bahwa resolusi gen *ndhF* sebagai marker tunggal masih terbatas untuk mengungkap hubungan genetik yang lebih kompleks.

Hasil penyelarasan sekuens menunjukkan bahwa gen *ndhF* bersifat relatif konservatif, tetapi tetap memiliki variasi nukleotida yang informatif untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan antarspesies *Oryza*. Konsistensi pola pengelompokan yang diperoleh menunjukkan bahwa gen ini dapat digunakan sebagai penanda molekuler yang andal pada tingkat genus dan spesies, meskipun tidak sepenuhnya optimal untuk resolusi yang lebih mendalam.

Secara keseluruhan, penelitian ini menegaskan bahwa gen *ndhF* memiliki potensi sebagai marker tunggal dalam analisis filogenetik *Oryza*, terutama untuk mengidentifikasi pola kedekatan genetik utama. Namun, untuk meningkatkan keandalan dan resolusi analisis, penggunaan penanda molekuler tambahan atau pendekatan berbasis multigen dan genom kloroplas lengkap disarankan untuk memperoleh hasil lebih komprehensif. Temuan ini memberikan kontribusi awal dalam evaluasi penggunaan gen *ndhF* dan dapat mendukung kajian konservasi dan pemuliaan tanaman padi berbasis keragaman genetik.

Daftar Pustaka

- Achyar, A., Hindayageni, A., Humaira, F., Wijaya, N. N., Aqsha, N., & Padang, U. N. (2021). Analysis of Genetic Variations in POLY Gene Sequences in Dengue Virus 2 Using In-Silico RFLP. *Bioscience*, 5(1), 80–86. <https://doi.org/10.24036/tg.v3i2.44>.
- Amar, M. H. (2020). ycf 1- ndh F genes, the most promising plastid genomic barcode, sheds light on phylogeny at low taxonomic levels in *Prunus persica*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00057-3>.
- Cai, Y., Tian, M., Yang, Y., Shi, Z., Zhao, P., & Wang, J. (2025). Nine complete chloroplast genomes of the *Camellia* genus provide insights into evolutionary relationships and species differentiation. *Scientific Reports*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-87764-4>.
- Fadhilah, H., & Achyar, A. (2023). Original Research Analysis of the genetic variation of the *ndhF* gene sequence in *Antrophyum* sp. NCBI popset 2496377569 using in silico RFLP. *Tropical Genetics*, 3(2), 39–45. <https://doi.org/10.24036/tg.v3i2.44>
- Fang, X. (2024). Phylogenetic Patterns and Classification of *Oryza* Species: A Molecular Perspective. *Rice Genomics and Genetics*, 15(3), 94–105. <https://doi.org/10.5376/rgg.2024.15.0011>.
- Ghorbani, A., Saeedi, Y., & Boer, H. J. De. (2017). Unidentifiable by morphology : DNA barcoding of plant material in local markets in Iran. *PloS One*, 12(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175722>.
- Huo, Y., Gao, L., Liu, B., Yang, Y., Kong, S., & Sun, Y. (2019). Complete chloroplast genome sequences of four *Allium* species: comparative and phylogenetic analyses. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48708-x>.

- Kassem, M. A. (2025). Comparative Analysis of Chloroplast Genomes Across 20 Plant Species Reveals Evolutionary Patterns in Gene Content, Codon Usage, and Genome Structure. *International Journal of Plant Biology*, 16(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijpb16030105>.
- Lemoine, F., & Gascuel, O. (2024). The Bayesian Phylogenetic Bootstrap and its Application to Short Trees and Branches. *Molecular Biology and Evolution*, 41(11), 1–16. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae238>.
- Li, H., Xiao, W., Tong, T., Li, Y., Zhang, M., Lin, X., & Zou, X. (2021). The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of Orchidaceae plants. *Scientific Reports*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81087-w>.
- Li, R., Wang, B., Xiao, S., Chen, L., Yin, F., Li, J., Jiang, C., & Zhang, D. (2025). Characterization of the complete chloroplast genome and comparative analysis of the phylogeny and codon usage bias of three Yunnan wild rice species. *Frontiers in Plant Science*, 16(1555104), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1555104>.
- Lu, T., Yin, Y., Luo, J., Chen, J., & Wu, Y. (2025). Molecular phylogenetic relationships based on chloroplast genomes of Zingiberaceae species : Insights into evolution and adaptation to extreme environments. *Frontiers in Plant Science*, 16(September), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1670568>.
- Martinez, A. S., Willoughby, J. R., & Christie, M. R. (2018). Genetic diversity in fishes is influenced by habitat type and life-history variation. *Ecology and Evolution*, 8(3), 12022–12031. <https://doi.org/10.1002/ece3.4661>.
- Meliawati, S., Sutarno, S., & Budiyanto, S. (2023). Pertumbuhan dan hasil tanaman padi varietas Ciherang (*Oryza sativa* L.) akibat pemberian pembenah tanah pada tiga jenis tanah. *Agroeco Science Journal*, 2(2), 9–17. <https://doi.org/10.14710/aesj.v2i2.18210>.
- Messeder, V. S., Carlo, A., Zhang, G., Tovar, J. D., Huang, J., Huang, C., & Ma, H. (2024). A highly resolved nuclear phylogeny uncovers strong phylogenetic conservatism and correlated evolution of fruit color and size in *Solanum* L. *New Phytologist*, 243(2), 765–780. <https://doi.org/10.1111/nph.19849>.
- Purnama, G. W., Permana, A. A. J., Ananda, K. N., Purnami, N. L. I., Nugraha, G. N. A., & Yogi, I. B. S. M. (2024). Implementasi sistem pakar untuk klasifikasi tanaman padi (*Oryza sativa* L.). *Jurnal Pendidikan Teknik Elektro*, 13(2), 171–185. <https://doi.org/10.23887>.
- Purwansyah, T. S., Rosanti, D., & Kartika, T. (2021). Morfometri Beberapa Varietas Tanaman Padi (*Oryza Sativa* L.) Di Kecamatan Pulau Rimau, Banyuasin. *Indobiosains*, 3(2), 9–10. <https://doi.org/10.31851/indobiosains.v3i2.6162>.
- Rahayu, D. A., Si, S., Si, M., Jannah, M., Si, S., & Sc, M. (2019). *DNA barcode hewan dan tumbuhan Indonesia*. Jakarta: Yayasan Inspirasi Ide Berdaya.
- Sahadeva, M. L., Pertiwi, N. P. D., Biologi, P. S., Biologi, J., & Matematika, F. (2023). Konstruksi Pohon Filogenetik Spesies dalam Famili Berdasarkan Marka Gen *matK* Kloroplas : Studi in Silico Orchidaceae. *Matematika, Sains, Dan Pembelajarannya*, 17(3), 12–27.

- Stein, J. C., Yu, Y., Copetti, D., Zwickl, D. J., Zhang, L., Zhang, C., Chougule, K., Gao, D., Iwata, A., Goicoechea, J. L., Wei, S., Wang, J., Liao, Y., Wang, M., Jacquemin, J., Becker, C., Kudrna, D., Zhang, J., Londono, C. E. M., Wing, R. A. (2018). Genomes of 13 domesticated and wild rice relatives highlight genetic conservation, turnover, and innovation across the genus *Oryza*. *Nature Genetics*, 50(February), 285–296. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0040-0>.
- Tnah, L. H., Lee, S. L., Tan, A. L., Lee, C. T., Ng, C. H., Farhanah, Z. N., Lee, S. L., Tan, A. L., Lee, C. T., Ng, K. K. S., Ng, C. H., & Farhanah, N. (2018). DNA barcode database of common herbal plants in the tropics: a resource for herbal product authentication. *Food Control*, 95(1), 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.022>.
- Warmadewi, D. A. (2017). *Mutasi Genetik. Buku Ajar*. Universitas Udayana: Denpasar.
- Wiegert, J., Höhler, D., Haag, J., & Stamatakis, A. (2024). Predicting Phylogenetic Bootstrap Values via Machine Learning. *Molecular Biology and Evolution*, 41(10), 1–13. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae215>.
- Zou, T., Li, D., Zhao, C., & Chen, M. (2025). Chloroplast whole genome assembly and phylogenetic analysis of *Persicaria criopolitana* reveal its new taxonomic status. *Scientific Reports*, 15(1), 1–10.