



**KARAKTERISTIK DNA *BARCODE* ANGGREK**

***Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f.**

**SKRIPSI**

Oleh :

**Nada Nisrina Maulidya**

**161810401036**

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**



**KARAKTERISTIK DNA *BARCODE* ANGGREK**

***Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f.**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

**Oleh :**

**Nada Nisrina Maulidya  
161810401036**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**

## PERSEMBAHAN

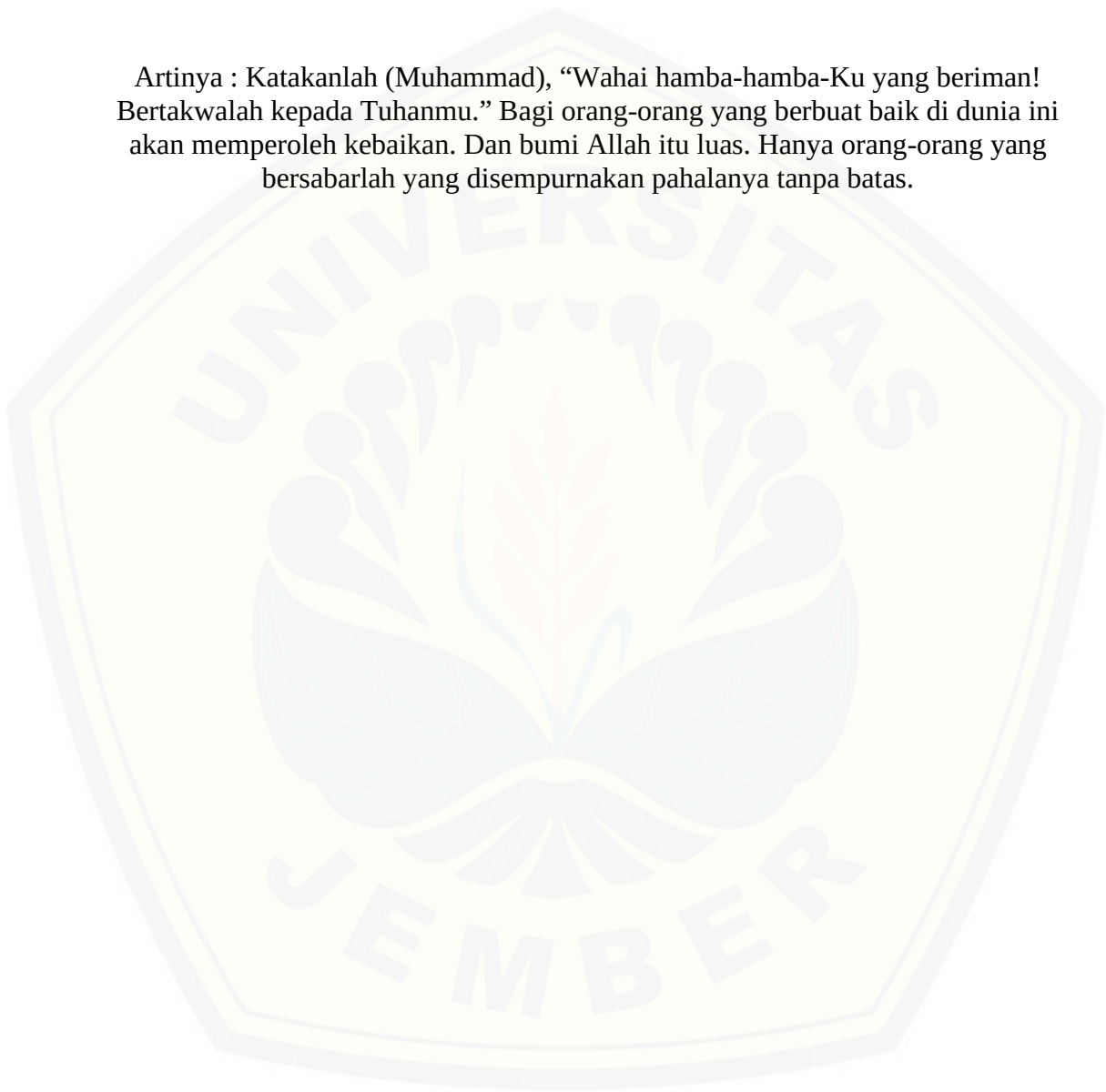
Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, karya tulis ilmiah ini saya persembahkan untuk :

1. Ibunda Erni Yuniarti, S.E., Ayahanda Rene Donantha, S.E., dan Adik Ishaq Na'im Maulana yang telah memberikan do'a tiada henti, kasih sayang, motivasi, dukungan, dan semangat selama ini.
2. Alm. Kakek H. Achmad Rizkun, Alm. Kakek H. Wakidi, Almh. Nenek Hj. Bahriatus Sa'adah, dan Nenek Hj. Rodjichatin yang telah memberi kenangan indah, nasehat berharga, kasih sayang, dukungan, dan semangat selama ini.
3. Seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, dukungan, dan semangat untuk menuntut ilmu.
4. Guru-guru TK Al-Furqan Jember, SD Al-Furqan Jember, SMPN 2 Jember, dan SMAN 1 Jember.
5. Dosen-dosen pengajar, pembimbing, penguji dan almamaterku Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTO**

“QS. Az-Zumar: 10”

Artinya : Katakanlah (Muhammad), “Wahai hamba-hamba-Ku yang beriman! Bertakwalah kepada Tuhanmu.” Bagi orang-orang yang berbuat baik di dunia ini akan memperoleh kebaikan. Dan bumi Allah itu luas. Hanya orang-orang yang bersabarlah yang disempurnakan pahalanya tanpa batas.



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nada Nisrina Maulidya

NIM : 161810401036

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul : “Karakteristik DNA *Barcode* Anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f.” adalah benar-benar karya sendiri dan merupakan sub tema dari proyek penelitian Keris DNA Sakti oleh Mukhamad Su’udi, Ph.D, Prof. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc, dan Tri Ratnasari, S.Si., M.Si yang berjudul “Identifikasi Lokus Potensial Sebagai DNA *Barcode* Pada Anggrek *Thrixspermum*”, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Juli 2020

Yang menyatakan,

Nada Nisrina Maulidya

NIM 161810401036

**SKRIPSI**

**KARAKTERISTIK DNA *BARCODE* ANGGREK**

***Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f.**

**Oleh**

**Nada Nisrina Maulidya**

**NIM 161810401036**

**Pembimbing:**

Dosen Pembimbing Utama : Mukhamad Su'udi, Ph.D

Dosen Pembimbing Anggota : Tri Ratnasari, S. Si., M.Si

**PENGESAHAN**

Karya tulis ilmiah yang berjudul “**Karakteristik DNA Barcode Anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f.**” telah diuji dan disahkan oleh Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

Hari :  
Tanggal :  
Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember

**Tim Penguji:**

Ketua,

Anggota I,

Mukhamad Su’udi, Ph.D  
NRP. 760016788

Tri Ratnasari, S.Si., M.Si  
NIP. 198509182019032011

Anggota II,

Anggota III,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si  
NIP. 19759132000032001

Dra. Dwi Setyati, M.Si  
NIP. 196404171991032001

Mengesahkan,  
Dekan

Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D  
NIP. 195910091986021001

## RINGKASAN

### **Karakteristik DNA Barcode Anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f.**

Nada Nisrina Maulidya, 161810401036; 2020; 48 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

*Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. merupakan salah satu spesies anggota Orchidaceae yang digolongkan dalam genus *Phalaenopsis*. Spesies ini memiliki persebaran yang paling luas dibandingkan dengan spesies lain dalam genus yang sama. Penggolongan anggota dari genus *Phalaenopsis* oleh para ahli taksonomi sebelumnya berdasarkan karakteristik morfologi. Namun, para ahli taksonomi tersebut mengalami perbedaan dalam menggolongkan *Phalaenopsis* karena menggunakan dasar penggolongan berupa karakteristik morfologi yang berbeda-beda. Hal tersebut menjadi kendala khususnya dalam proses identifikasi. Oleh karena itu diperlukan konfirmasi dengan karakteristik atau pendekatan secara molekuler. Salah satu teknik pendekatan secara morfologi yaitu DNA *barcoding* yang menggunakan fragmen pendek berupa urutan sekuen DNA sebagai penanda molekuler. Penanda molekuler yang digunakan dalam penelitian ini sesuai dengan rekomendasi *CBOL Plant Working Group*, yaitu *matK*, *rbcL*, dan ITS2.

DNA sampel anggrek *P. deliciosa* diisolasi menggunakan Kit GenEx<sup>TM</sup> Plant Sx, kemudian hasil isolasi DNA diamplifikasi menggunakan mesin PCR. Reaksi PCR menghasilkan amplicon ( $\pm 500$  bp) yang kemudian dimurnikan dan dibaca urutan sekuen DNA (sekuensing). Hasil *alignment* selanjutnya dianalisis menggunakan *software* BioEdit. Sekuen *P. deliciosa* kemudian dianalisis menggunakan *tools* pada NCBI yaitu BLAST untuk mengetahui kekerabatan dengan sekuen spesies yang ada di NCBI. Sekuen *P. deliciosa* dengan spesies homolog yang ada di NCBI direkonstruksi pohon filogenetik untuk mengetahui kekerabatan berdasarkan hubungan evolusi.

Hasil menunjukkan bahwa *P. deliciosa* sekuen *matK* memiliki tingkat homologi tertinggi dengan 3 spesies *P. deliciosa* yang diteliti di China dan USA (*Per. Ident* 99.28%) dan 1 spesies *P. deliciosa* asal Jepang (*Per. Ident* 99.03%). *P.*



*deliciosa* sekuen *rbcL* memiliki tingkat homologi tertinggi dengan *Bletia purpurea* asal USA (*Per. Ident* 98.41%) dan *P. deliciosa* sekuen ITS2 memiliki tingkat homologi tertinggi dengan *P. japonica* (*Per. Ident* 96.27%) dan *Sedirea japonica* (*Per. Ident* 96.27%) yang diteliti di Korea Selatan dan Switzerland. Hasil tersebut didukung dengan pohon filogenetik yang terbentuk, kecuali pada sekuen *rbcL*, hasil pohon filogenetik *P. deliciosa* monofiletik dengan *Dendrobium aggregatum*.

Hasil *alignment* (pensejajaran urutan sekuen DNA) pada ketiga *barcode* menunjukkan adanya beberapa perbedaan basa antara *P. deliciosa* dan spesies homolognya. Anggrek *P. deliciosa* sekuen *matK* memiliki perbedaan basa Timin (T) pada basa ke 150 dan 410. Hasil *alignment* *P. deliciosa* sekuen *rbcL* menunjukkan empat perbedaan basa Guanin (G) pada basa ke 270, 276, 323, dan 338. Anggrek *P. deliciosa* sekuen ITS2 menunjukkan adanya tujuh perbedaan basa yang mana perbedaan basa sekuen ini memiliki jumlah terbanyak dibandingkan dua sekuen lain. Perbedaan pada sekuen ITS2 yaitu basa Adenin (A) pada basa ke 195, basa Sitosin (C) pada basa ke 242 dan 381, dan basa Guanin (G) pada basa ke 295, 315, 331, dan 334. Penggunaan sekuen ITS2 menunjukkan hasil spesifik dan mampu membedakan tanaman sampai tingkatan spesies. Berdasarkan hal tersebut, sekuen ITS2 dapat direkomendasikan sebagai penanda molekuler untuk proses identifikasi *P. deliciosa*.

## PRAKATA

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Karakteristik DNA Barcode Anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f.**” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Ibunda Erni Yuniarti, S.E., Ayahanda Rene Donantha, S.E., dan Adik Ishaq Na'im Maulana atas do'a, dukungan, motivasi, perhatian dan kasih sayang tiada henti sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S1;
2. Mukhamad Su'udi, Ph.D selaku dosen pembimbing utama dan Tri Ratnasari, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si, M.Si dan Dra. Dwi Setyati, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan S1;
5. Beasiswa Bupati Jember yang telah memberikan beasiswa studi S1, sehingga penulis dapat meraih gelar sarjana dan DNA Research Group yang telah mendanai penelitian ini;
6. Rekan-rekan kerja di laboratorium: Dyah Wulan Budyartini, Zakiyah Ramadany, Veren Yuliana Saputri, dan Gita Ayu Khoirunnisa, terima kasih atas segala waktu, bantuan, dukungan, motivasi, dan kebersamaannya;
7. Kakak-kakak DNA Research Group: Siti Rohimah, Dian Al Ghifari Perwitasari, dan Vita Sindiya, terima kasih atas segala waktu, bantuan, dukungan, dan kebersamaannya;

8. Rekan-rekan Biologi Angkatan 2016 (BANANA) dan HIMABIO Bakteriophage 2017-2018 terima kasih atas motivasi, keceriaan, kekompakan, dukungan, dan pengalamannya;
9. Sahabat-sahabatku: Intan Fitri Indrasari, Riana Agatha Listiani, Dinasty Purnamasari, Nabilah Ilmalah Sunarto, Atiqotul Irsyadah, Fitri Azhari, Farah Salma Elida, Fenny Indriani, Dwi Wardatul Rizkiah, Nadya Rismana Fitriani, dan Nuril Azizah terima kasih atas segala waktu, bantuan, dukungan, dan kebersamaannya;
10. serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Juli 2020

Penulis

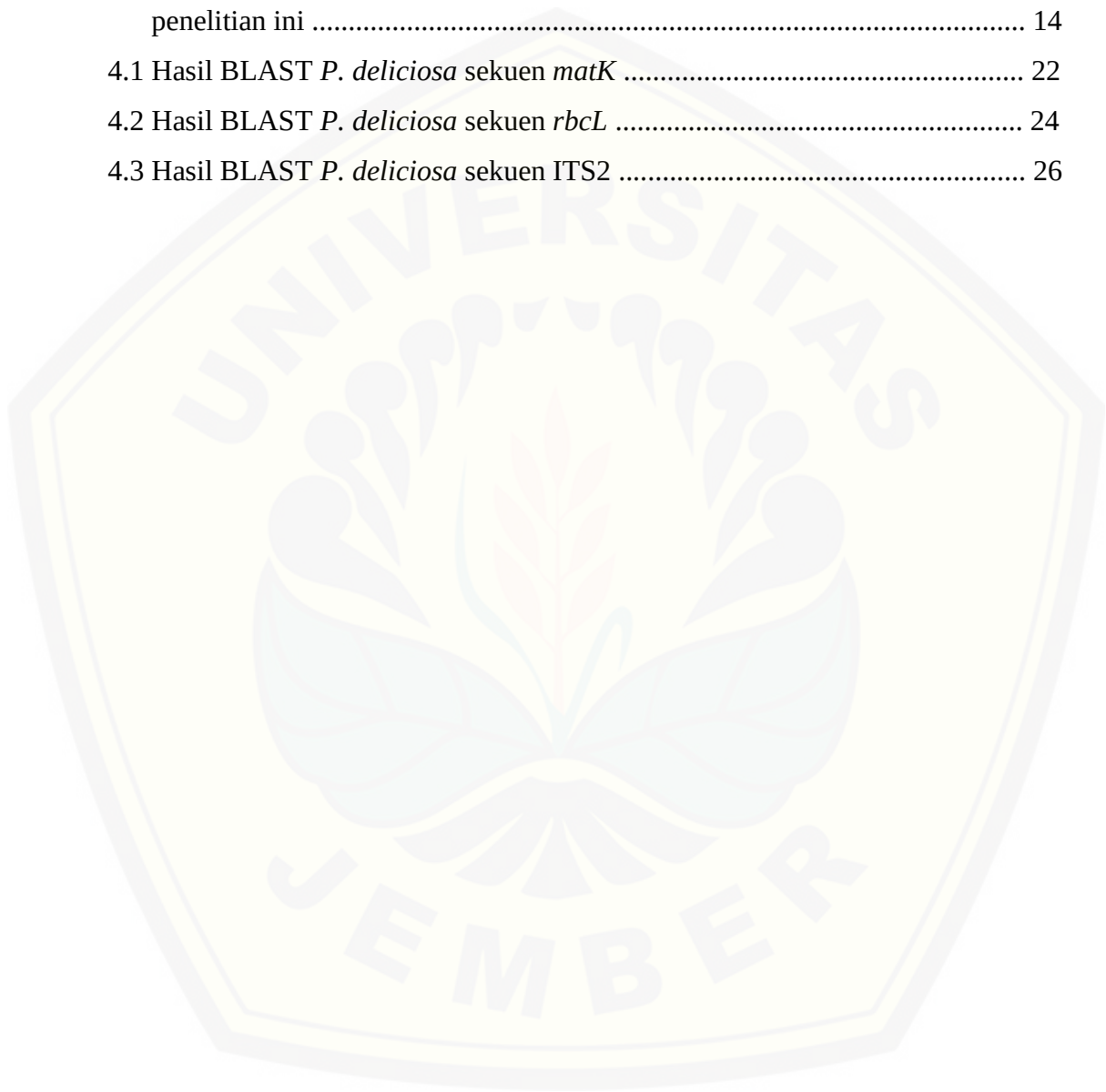
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL .....	i
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN .....	v
HALAMAN PEMBIMBING .....	vi
HALAMAN PENGESAHAN .....	vii
RINGKASAN .....	viii
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Klasifikasi dan Deskripsi Anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i></b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Fitokimia Anggrek <i>Phalaenopsis</i></b> .....	<b>6</b>
<b>2.3 DNA <i>Barcoding</i></b> .....	<b>7</b>
<b>2.4 Penanda Molekuler Spesifik</b> .....	<b>8</b>
2.4.1 Gen <i>maturase K (matK)</i> .....	8
2.4.2 Gen <i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase</i> <i>large subunit (rbcL)</i> .....	9
2.4.3 Gen Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) .....	10
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>11</b>

<b>3.1 Waktu dan Tempat Penelitian</b> .....	11
<b>3.2 Alat dan Bahan</b> .....	11
<b>3.3 Rancangan Penelitian</b> .....	11
<b>3.4 Prosedur Penelitian</b> .....	12
3.4.1 Koleksi Sampel .....	12
3.4.2 Isolasi DNA Genom .....	13
3.4.3 Amplifikasi DNA Target dengan PCR .....	14
3.4.4 Analisis Hasil PCR .....	15
3.4.5 Purifikasi Hasil DNA dan Sekuensing .....	15
<b>3.5 Analisis Data</b> .....	16
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	17
<b>4.1 Karakteristik Morfologi Anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> Rchb.f.</b> .....	17
<b>4.2 Analisis Molekuler Menggunakan <i>DNA Barcoding</i></b> .....	19
4.2.1 Isolasi DNA Genom .....	19
4.2.2 Hasil Amplifikasi DNA Target dengan PCR .....	20
4.2.3 Hasil Purifikasi Produk PCR dan Sekuensing .....	21
4.2.4 Hasil <i>Alignment</i> Sekuen dan Pohon Filogenetik .....	26
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	33
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	33
<b>5.2 Saran</b> .....	33
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	34
<b>LAMPIRAN</b> .....	42

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
3.1 Daftar primer <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , dan ITS2 yang digunakan dalam penelitian ini .....	14
4.1 Hasil BLAST <i>P. deliciosa</i> sekuen <i>matK</i> .....	22
4.2 Hasil BLAST <i>P. deliciosa</i> sekuen <i>rbcL</i> .....	24
4.3 Hasil BLAST <i>P. deliciosa</i> sekuen ITS2 .....	26



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Morfologi anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> Rchb.f. ....	6
2.2 Diagram sekuen <i>matK</i> .....	8
2.3 Diagram sekuen <i>rbcL</i> .....	9
2.4 Diagram sekuen ITS2 .....	10
3.1 Skema alur penelitian .....	12
4.1 Morfologi Anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> Rchb.f a) Habitus, b) Daun, c) Bunga .....	18
4.2 Amplifikasi produk PCR menggunakan sekuen <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , dan ITS2 pada anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> .....	19
4.3 Hasil pensejajaran DNA sampel anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> sekuen <i>matK</i> .....	27
4.4 Hasil pensejajaran DNA sampel anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> sekuen <i>rbcL</i> .....	27
4.5 Hasil pensejajaran DNA sampel anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> sekuen ITS2 .....	28
4.6 Pohon filogenetik sekuen <i>matK</i> anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> dengan kerabat terdekat di NCBI .....	30
4.7 Pohon filogenetik sekuen <i>rbcL</i> anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> dengan kerabat terdekat di NCBI .....	31
4.8 Pohon filogenetik sekuen ITS2 anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> dengan kerabat terdekat di NCBI .....	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1.1 Hasil kromatogram dari anggrek <i>P. deliciosa</i> menggunakan primer 743F.....	42
Lampiran 1.2 Hasil kromatogram dari anggrek <i>P. deliciosa</i> menggunakan primer R2.....	42
Lampiran 1.3 Hasil kromatogram dari anggrek <i>P. deliciosa</i> menggunakan primer <i>rbcLa_F</i> .....	43
Lampiran 1.4 Hasil kromatogram dari anggrek <i>P. deliciosa</i> menggunakan primer <i>rbcLa_R</i> .....	44
Lampiran 1.5 Hasil kromatogram dari anggrek <i>P. deliciosa</i> menggunakan primer DR2F .....	45
Lampiran 1.6 Hasil kromatogram dari anggrek <i>P. deliciosa</i> menggunakan primer 26SE .....	46
Lampiran 2.1 Sekuen <i>matK</i> dari Anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> .....	47
Lampiran 2.2 Sekuen <i>rbcL</i> dari Anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> .....	48
Lampiran 2.3 Sekuen ITS2 dari Anggrek <i>Phalaenopsis deliciosa</i> .....	48



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Anggrek merupakan anggota dari Orchidaceae, famili tumbuhan berbunga dengan jenis terbanyak. Orchidaceae dapat ditemukan di semua daerah, dengan keragaman jenis paling besar terdapat di daerah tropis dan subtropis. Keragaman anggrek yang terdapat di hutan Indonesia berjumlah sekitar 6.000 jenis dari jumlah jenis keseluruhan yang ada di dunia (Wahyudiningsih *et al.*, 2017). Salah satu genus anggrek yang dijumpai di Indonesia adalah *Phalaenopsis*. *Phalaenopsis* di Indonesia tersebar khususnya di Sulawesi dan Kalimantan (Teoh, 2016; Tsai, 2011). Jenis dari genus *Phalaenopsis* dengan jumlah persebaran terbesar yaitu *Phalaenopsis deliciosa* (Holtum, 1964).

Pemanfaatan *Phalaenopsis* telah digunakan sebagai tumbuhan obat dan banyak diminati dengan tujuan komersial (Teoh, 2016). Penggunaan anggrek selain sebagai tanaman hias, juga bermanfaat untuk fitoterapi. Fitoterapi didapatkan dari bunga anggrek yang indah dan aroma yang dapat memberikan efek relaksasi (Wahyudiningsih *et al.*, 2017).

Jenis anggrek *Phalaenopsis* yang begitu banyak jumlahnya di hutan Indonesia dan berbagai pemanfaatan anggrek alam, menjadi alasan penting dilakukan karakterisasi anggrek secara morfologi. Karakterisasi melalui morfologi dilakukan untuk pelestarian plasma nutfah anggrek di Indonesia serta menyeleksi anggrek alam yang memiliki sifat-sifat unggul untuk tujuan hibridisasi/persilangan (Hartati dan Darsana, 2015). Menurut Susantidiana *et al.*, (2009), identifikasi morfologi suatu tanaman dilakukan dengan mengamati daun, batang, bunga, buah, akar dan bagian lain yang mencakup seluruh morfologi tanaman. Purwantoro *et al.* (2005) menyatakan bahwa identifikasi morfologi juga merupakan salah satu cara untuk mengetahui hubungan kekerabatan suatu spesies (Hartati dan Darsana, 2015).

Beberapa ahli taksonomi telah menggolongkan *Phalaenopsis* berdasarkan karakteristik morfologi. *Phalaenopsis* oleh Shim (1982), dikelompokkan atau digolongkan berdasarkan morfologi bunga. Penggolongan selanjutnya dilakukan

oleh Seidenfaden (1986) dan Dressler (1993), yang menggolongkan *Phalaenopsis* menjadi dua genus yang berbeda yakni *Doritis* Lindl. dan *Kingidium* P. F. Hunt. Namun, menurut Christenson (2001), *Doritis* Lindl. dan *Kingidium* P. F. Hunt tidak dibedakan sebagai genus tersendiri dan menyatu dengan *Phalaenopsis* berdasarkan klasifikasi infragenerik (Yukawa *et al.*, 2005).

Klasifikasi yang dilakukan oleh para ahli taksonomi diatas mengalami perbedaan dasar dalam menggolongkan *Phalaenopsis*. Salah satu hal yang menyebabkan perbedaan tersebut yaitu perbedaan jumlah pollinium. Jumlah pollinia pada *Phalaenopsis* dominan sebanyak 2 pollinia, sedangkan pada subgenus seperti *Proboscidioides*, *Aphyllae*, dan *Parishianae* dan pada golongan *Deliciosae* dan *Esmeralda* yang termasuk dalam subgenus *Phalaenopsis* memiliki 4 pollinia. Struktur organ reproduksi khususnya *labellum* dan *stipe* yang memiliki keanekaragaman yang tinggi juga membuat inkonsistensi ketetapan dalam membedakan anggota anggrek *Phalaenopsis* (Yukawa *et al.*, 2005). Karakterisasi anggrek untuk tujuan identifikasi membutuhkan konfirmasi dengan pendekatan molekuler. Pendekatan melalui analisis DNA yang dapat digunakan yakni dengan teknik DNA *barcoding*. DNA *barcoding* adalah teknik dalam menggunakan fragmen pendek urutan sekuen DNA untuk mengidentifikasi spesies. Berdasarkan beberapa penelitian terdahulu, disebutkan bahwa DNA *barcoding* telah berhasil digunakan sebagai alat untuk mengidentifikasi spesies dan klarifikasi filogenetik melalui pendekatan taksonomi (Tripathi *et al.*, 2013).

Marka gen yang digunakan sebagai *barcode* standar untuk tumbuhan, yaitu *matK* dan *rbcL* berdasarkan rekomendasi *The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) Plant Working Group*. *matK* dan *rbcL* merupakan daerah pengkodean gen yang terletak pada plastid (*plastid DNA/ptDNA*) (Hollingsworth *et al.*, 2009). Gen *matK* memiliki tingkat akurasi tertinggi, yakni sebanyak 97,42%. Tingkat akurasi marka didasarkan atas jumlah kesesuaian sekuen dengan sekuen pada basis data di *GenBank* (Xu *et al.*, 2015). Gen *rbcL* memiliki kelebihan yakni, tingkat keberhasilan amplifikasi yang tinggi dan mudah dalam proses sekuensing pada tumbuhan (Hollingsworth *et al.*, 2011).

Marka ITS (Internal Transcribed Spacer) merupakan daerah pengkodean gen rRNA yang terletak pada nukleus ribosom (*nuclear ribosomal DNA*) (Yang *et al.*, 2018). Internal Transcribed Spacer merupakan wilayah nuklear yang sejauh ini, dianggap sebagai lokus *barcode* yang efisien. ITS terdiri dari ITS1 dan ITS2. ITS2 dianggap sebagai lokus *barcode* terbaik karena spesifik terhadap spesies dan bersifat universal sehingga dapat digunakan sebagai *barcode* untuk seluruh kelompok tanaman yang berbeda (Chen *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2016; Tripathi *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2010). Penggunaan lokus penanda ITS2 terbukti menjadi penanda *barcode* spesifik dengan persentase keberhasilan identifikasi sebesar 92,7% (Chen *et al.*, 2010).

Berdasarkan penelusuran dalam NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), data sekuen DNA *barcode* standar untuk spesies *Phalaenopsis deliciosa* belum tersedia atau belum lengkap, khususnya untuk gen *barcode rbcL* dan ITS2. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi DNA *barcode* melalui penanda molekuler spesifik yang efektif untuk anggrek *Phalaenopsis deliciosa*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka permasalahan dari penelitian ini yaitu bagaimana karakteristik dan spesifitas DNA *barcoding* menggunakan penanda molekuler spesifik *matK*, *rbcL*, dan ITS2 pada anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f.

## 1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah menentukan karakteristik DNA *barcoding* dan mendapatkan penanda molekuler spesifik (diantara *matK*, *rbcL*, dan ITS2) pada anggrek *Phalaenopsis deliciosa*.

#### 1.4 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang DNA *barcoding* khususnya pada anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. Selain itu, dengan didapatkannya sekuen DNA anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. selanjutnya sekuen DNA anggrek tersebut dapat didaftarkan di *GenBank* atau DNA *database*. Berdasarkan hasil penelitian ini, diharapkan dapat memberikan rekomendasi penanda molekuler yang sesuai untuk proses identifikasi anggrek *Phalaenopsis deliciosa*.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Klasifikasi dan Deskripsi Anggrek *Phalaenopsis deliciosa*

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Asparagales
Famili	: Orchidaceae
Genus	: <i>Phalaenopsis</i>
Spesies	: <i>Phalaenopsis deliciosa</i> Rchb.f. (ITIS, 2010)

*Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. memiliki bunga dengan ukuran yang kecil. Tanaman pendek dan membentuk rumpun dengan tunas basal dan pada bagian pangkal batang tumbuh akar. Bentuk daun bulat memanjang (*oblong*), berwarna hijau tua, memiliki panjang sekitar 3,5 cm, duduk daun berseling, dan daun tidak memiliki tangkai daun. Bunga berdaging, berukuran kecil dengan diameter 1-1,5 cm, sepal dan petal yang memanjang, berwarna putih, dengan dibalut warna merah muda atau keunguan. Sepal dan petal bebas, menyebar, dan sepal lateral *oblique* dan umumnya lebih besar dibandingkan dengan sepal dorsal. Bibir bunga berwarna putih dengan garis merah muda ke ungu di sisi lobus dan bibir (Gambar 2.1) (Pridgeon *et al.*, 2014; Teoh, 2016).

Genus *Phalaenopsis* memiliki sekitar 45–50 spesies yang tersebar dari India sampai ke bagian selatan dari China, Korea, Jepang, Thailand, Indochina, Malaysia, Indonesia, Filipina, Australia dan Papua Nugini. Sebagian besar spesies berada di Indonesia dan Filipina (Pridgeon *et al.*, 2014). *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. merupakan jenis yang memiliki persebaran paling luas. *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. dapat hidup sampai pada ketinggian 300 mdpl. Tanaman ini membutuhkan cahaya dan kelembaban tetapi tidak genangan air. Masa pembungaan di Indonesia, khususnya di Kalimantan (Borneo) yakni pada bulan April dan November (Teoh, 2016).

a) Bunga *Phalaenopsis deliciosa*b) Habitus *Phalaenopsis deliciosa*

**Gambar 2.1** Morfologi anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. (Sumber : IOSPE, 2020 ; Teoh, 2016).

## 2.2 Fitokimia Anggrek *Phalaenopsis*

*Phalaenopsis* diketahui dapat menghasilkan metabolit sekunder dengan menghasilkan beberapa senyawa fenolik, seperti flavonoid, fenol, alkaloid. Senyawa fenolik tersebut seperti yang telah diketahui dapat bermanfaat sebagai antioksidan. Antioksidan memainkan peran penting dalam perawatan kesehatan dan untuk mencegah radikal bebas. Manfaat lain dari senyawa antioksidan adalah meringankan penyakit kronis dan degeneratif penyakit seperti kanker, gangguan autoimun, hipertensi, aterosklerosis dan dapat memperlambat atau menunda proses penuaan (Minh *et al.*, 2016).

Menurut Srivirojana *et al.* (2005) bagian akar diketahui memiliki kandungan antioksidan tinggi. Flavonoid, fenol, alkaloid, dan sejumlah asam fenolik terdeteksi sehingga menunjukkan relevansi untuk aktivitas antioksidan yang merupakan bukti untuk menguji potensi menggunakan spesies anggrek ini sebagai obat-obatan herbal. Kandungan senyawa asam ferulic, asam *p-coumaric*, dan asam sinapik sebagian besar terkonsentrasi di akar dibandingkan dengan daun. Akar anggrek *Phalaenopsis* dapat diekstrak sebagai sumber antioksidan alami yang potensial dengan biaya yang terjangkau (Minh *et al.*, 2016).

### 2.3 DNA *Barcoding*

DNA *barcoding* melibatkan pengurutan satu atau lebih wilayah genom standar sebagai alat untuk identifikasi spesies (Kim *et al.*, 2014). Proses identifikasi dalam teknik DNA *barcoding*, dilakukan dengan membandingkan informasi genetik berupa sekuen DNA antar spesies terkait untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA (Glick *et al.*, 2010 ; Rogers, 2011). *Barcode* DNA merupakan hal yang penting, karena sekuen tersebut digunakan sebagai alat yang dinilai efektif untuk mengidentifikasi spesies dan dapat diaplikasikan dalam berbagai hal. Identifikasi spesies penting untuk tujuan konservasi termasuk upaya konservasi anggrek, kontrol perdagangan oleh bea cukai khususnya dalam mendeteksi perdagangan ilegal spesies-spesies yang terancam punah, industri lokal anggrek, dan mendeteksi adanya potensi obat pada tanaman (Kim *et al.*, 2014; Parveen *et al.*, 2017).

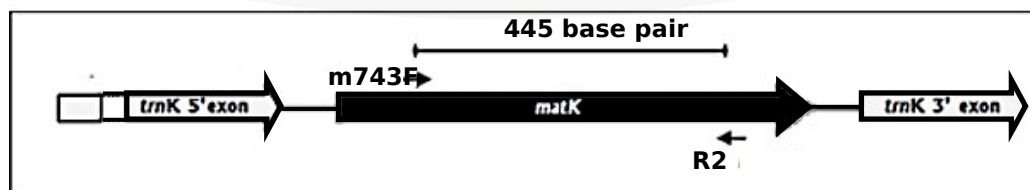
*Barcode* DNA dapat digunakan sebagai alat identifikasi bahan obat herbal untuk keamanan penggunaan herbal, mengontrol kualitas obat herbal, dan penyelidikan forensik dalam mendeteksi bahan herbal beracun dalam kasus yang mengancam jiwa (Li *et al.*, 2011). *Barcode* DNA yang sesuai harus memenuhi beberapa kriteria diantaranya adalah memiliki sifat universalitas yang tinggi sehingga dapat diaplikasikan di seluruh spesies tanaman, dan dapat membedakan antar spesies dengan lebih spesifik (Li *et al.*, 2011). Kelebihan DNA *barcoding* yaitu proses identifikasi dalam kegiatan taksonomi menjadi lebih cepat dan akurat (Kang *et al.*, 2017). Hal ini dikarenakan *barcode* DNA dari sampel dapat mengidentifikasi suatu organisme walaupun hanya tersedia sebagian kecil dari *barcode* DNA sampel tersebut (Hebert *et al.*, 2003). Perkembangan DNA *barcoding* pada masa ini telah berkembang pesat. Teknik ini sangat mendukung dalam proses pemantauan dan penyelidikan keanekaragaman hayati, filogeni molekuler, dan evolusi (Kang *et al.*, 2017).

## 2.4 Penanda Molekuler Spesifik

### 2.4.1 Gen *maturase K* (*matK*)

Gen *maturase K* termasuk marka yang direkomendasikan oleh *The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) Plant Working Group* sebagai lokus untuk *DNA Barcoding* (Heckenhauer *et al.*, 2016). Ukuran gen kloroplas *matK* yaitu 1.500 bp dan gen ini berfungsi sebagai pengkode maturase K. Gen *matK* terletak diantara exon *trnK* DNA kloroplas (Gambar 2.2). *matK* digunakan sebagai *barcode* DNA yang universal untuk anggrek berdasarkan *barcoding gap* yaitu perbandingan jarak antara intra dan interspesifik genetik pada suatu tingkatan takson, proses amplifikasi dan proses pensejajaran yang mudah (Kumar *et al.*, 2016). Gen *matK* mengandung tingkat substitusi yang tinggi dalam spesies dan potensial untuk mempelajari sistematika tanaman (molekuler) dan evolusi tanaman pada berbagai tingkatan taksonomi (Selvaraj *et al.*, 2008).

Gen *matK* memiliki beberapa keunggulan yaitu ukuran gen yang ideal, laju substitusi yang tinggi, dan variasi yang besar dalam tingkatan asam nukleat sehingga dapat digunakan untuk identifikasi tanaman pada tingkat famili sampai spesies (Selvaraj *et al.*, 2008). Penelitian terkait proses identifikasi tanaman oleh gen *matK* sampai tingkat spesies telah dilakukan salah satu contohnya terhadap spesies anggrek langka, yaitu pada genus *Paphiopedilum*. Berdasarkan penelitian tersebut, gen *matK* sebagai *barcode* yang digunakan untuk proses identifikasi, juga dapat menganalisis kekerabatan interspesifik jenis-jenis hibrid dari *Paphiopedilum* (Kumar *et al.*, 2016). Penggunaan gen *matK* sebagai *barcode* yang digunakan dalam proses identifikasi spesies menunjukkan hasil amplifikasi yang tinggi yakni sebesar 85% dan sekuensing sebesar 69% sehingga disarankan untuk dapat digunakan dalam amplifikasi berbagai jenis tanaman (Kress *et al.*, 2009).



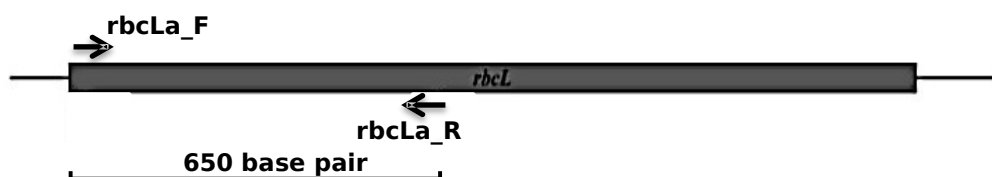
**Gambar 2.2** Diagram sekuen *matK* (Batista *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2016).



#### 2.4.2 Gen *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)*

Gen *rbcL* adalah wilayah pengkodean gen kloroplas yang memiliki tingkat keberhasilan amplifikasi tinggi di berbagai spesies tanaman berbunga, gymnosperma, dan spesies kriptogam (CBOL Plant Working Group, 2009). Keunggulan dari *rbcL*, menurut Newmaster *et al.* (2006), gen *rbcL* sebagai *barcode* memiliki variasi yang cukup tinggi untuk membedakan jenis-jenis tanaman (Dong *et al.*, 2013). Keunggulan lain dari gen *rbcL* yaitu gen mudah diamplifikasi dan diurutkan pada sebagian besar tanaman dan dianggap sebagai lokus acuan dalam penyelidikan filogenetik tanaman untuk mengidentifikasi taksa di tingkat genus dan famili (Kress dan Erickson, 2007). Penggunaan *rbcL* dengan tujuan studi filogenetik telah dilakukan penelitian sebelumnya oleh Chase *et al.* (1993) untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan dari beberapa jenis tanaman dan semenjak itu, *rbcL* menjadi populer digunakan untuk memperdalam tentang studi tersebut. Keunggulan lain *rbcL* menurut Clegg (1993) yakni bersifat universal, dan memiliki kualitas pengurutan basa DNA yang baik (Dong *et al.*, 2013).

Panjang gen *rbcL* yaitu 1.428 bp dan mengkodekan subunit besar Rubisco. Fragmen-fragmen yang digunakan sebagai *barcode* dibatasi panjang sekuen berdasarkan metode sekuensing Sanger. CBOL Plant Working Group (2009), telah mengusulkan penggunaan fragmen di ujung 5' dari gen *rbcL* dengan panjang sekuen sekitar 650 bp (disebut *rbcLa*) (Gambar 2.3) (Dong *et al.*, 2013). Analisis lebih dari 10.000 urutan *rbcL* dari GenBank menunjukkan bahwa lokus ini dapat berfungsi dengan baik dan terdapat variasi yang cukup untuk membedakan antara spesies (85% perbandingan) yang berpasangan secara kongenerik. (Newmaster *et al.*, 2006).

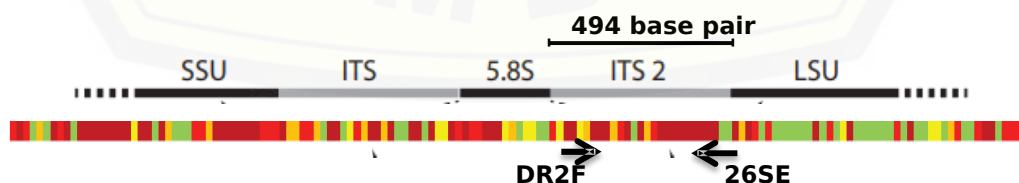


**Gambar 2.3** Diagram sekuen *rbcL* (Dong *et al.*, 2013 dan Khew dan Chia, 2011).

### 2.4.3 Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

Marka ITS2 (Internal Transcribed Spacer2) merupakan daerah yang terletak diantara pengkodean gen rRNA yang terletak pada ribosom (*nuclear ribosomal DNA*). ITS pada eukariotik terdiri dari 2 macam, yakni ITS1 dan ITS2. ITS1 terletak antara gen 5.8S dan 18S, sementara ITS2 terletak antara 5.8S and 26S (Gambar 2.4), khususnya pada tanaman (Cheng *et al.*, 2016). Wilayah tersebut bersifat sangat fleksibel dan kuat bahkan untuk DNA *template* yang terdegradasi sekalipun (Young dan Coleman, 2004). Berdasarkan rekomendasi oleh *The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) Plant Working Group*, ITS2 ditetapkan penggunaannya sebagai salah satu lokus untuk proses identifikasi tanaman pada *The Third International Barcoding Conference (CBOL Plant Working Group, 2009)*.

ITS2 merupakan fragmen DNA yang paling banyak digunakan untuk tanaman dan diaplikasikan pada sistematika molekuler tanaman di tingkat generik dan spesies. ITS2 memiliki hasil analisis tinggi dalam kekerabatan interspesifik dan intraspesifik spesies (Cheng *et al.*, 2016). Panjang sekuen ITS2 pada tanaman berkisar antara 215 - 494 bp (Michel *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Chen *et al.* (2010), ITS2 diujikan pada 6.600 sampel tanaman yang terdiri dari 4.800 spesies dan 753 genus berbeda. Penelitian ini menunjukkan hasil bahwa ITS2 mampu membedakan spesies tanaman dengan tingkat keberhasilan identifikasi sebesar 92,7% pada tingkat spesies. ITS2 dapat berfungsi dengan baik sebagai *barcode* universal baru yang dapat digunakan dalam proses identifikasi tanaman.



**Gambar 2.4** Diagram sekuen ITS2 (Ihrmark *et al.*, 2012).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai April 2020. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

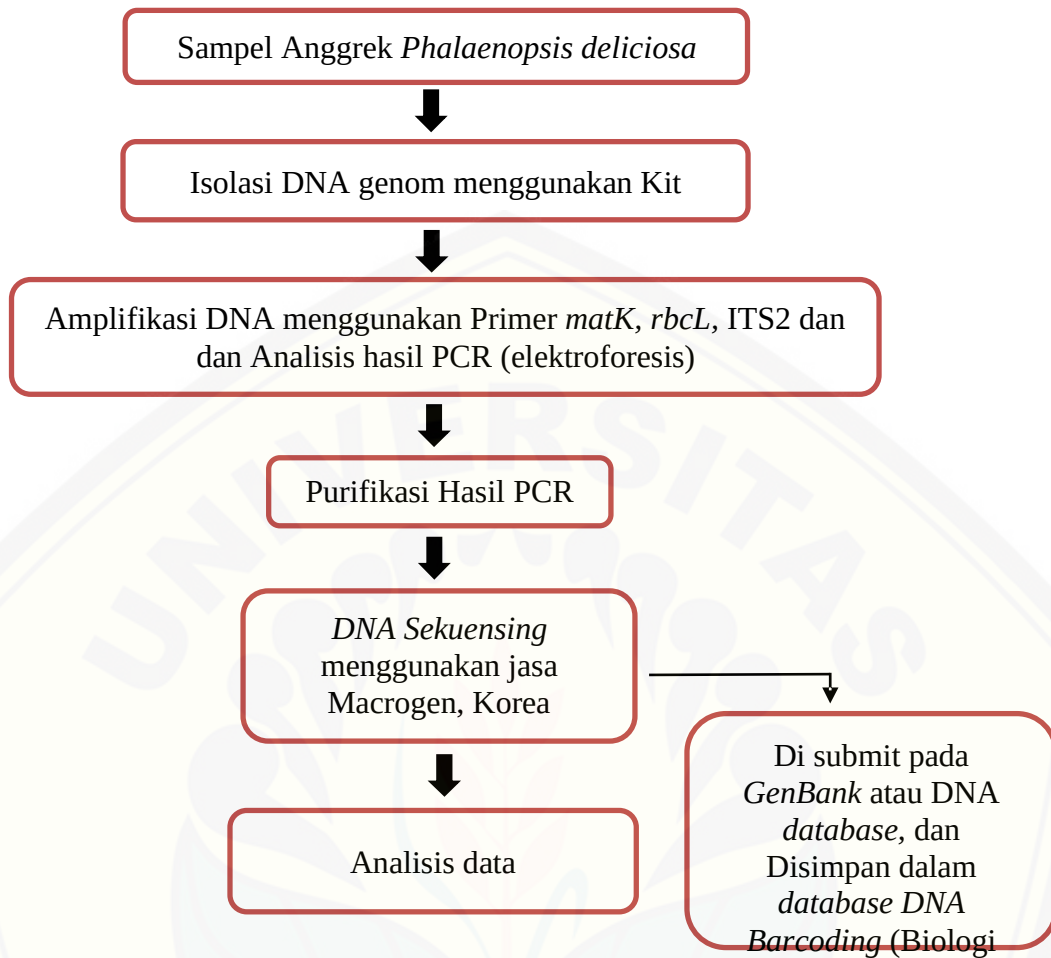
### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah mortal, pistil, mikropipet volume 10 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl, *yellow tip*, *blue tip*, *UV Transilluminator*, neraca digital, spatula, pH meter, mesin PCR, vortek, *thermo shaker*, *beaker glass*, gelas ukur, *stacker microtube* 1,5 ml, tabung Erlenmeyer, *microtube* 1,5 ml, *PCR microtube*, alat *centrifuge*, desikator, *hot plate*, dan satu set alat elektroforesis.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel daun anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. yang diperoleh dari *nursery* Kebon Agung Orchid, Gebang Waru, Jember. Bahan-bahan lain yang digunakan yaitu larutan isopropanol, Kit GenEx™ Plant Sx, kloroform, PCR master mix, ddH<sub>2</sub>O, primer *matK*, *rbcl*, ITS2 (forward, reverse), agarosa, *Ethidium Bromide* (EtBr), RNase, *buffer* TE, *buffer* Tris Acetic-EDTA, etanol, DNA *marker* 100 bp, serta PCR *purification Kit* (Jena Bioscience, Jerman).

### 3.3 Rancangan Penelitian

Metode penelitian dilakukan melalui tahapan koleksi sampel, isolasi DNA, amplifikasi DNA target dengan PCR, analisis hasil PCR, purifikasi hasil PCR, dan sekuensing DNA. Analisis hasil PCR secara dilakukan dengan visualisasi hasil elektroforesis menggunakan *UV Transilluminator*. Adapun alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Koleksi Sampel

Sampel anggrek yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. Sampel anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. didapatkan dari nursery Kebon Agung Orchid, Gebang Waru, Jember. Sekuen DNA anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. secara *in silico* dikoleksi berdasarkan database yang tersedia di GenBank (NCBI) dengan cara menulis nama spesies dan marka molekuler yang dimaksud, yaitu *matK*, *rbcL*, dan ITS2. Koleksi sekuen secara *in silico* tidak ditemukan hasil dikarenakan belum tersedia sekuen DNA anggrek *Phalaenopsis deliciosa* Rchb.f. dengan marka molekuler *rbcL* dan ITS2.

### 3.4.2 Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom sampel anggrek *Phalaenopsis deliciosa* dilakukan dengan menggunakan GenEx™ Plant Sx Kit (GeneAll Biotechnology, Korea). Isolasi DNA genom dimulai dengan menggerus 0,1 gram sampel daun anggrek menggunakan mortar dan pistil steril sampai halus dengan ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  *buffer* PL dan 3  $\mu\text{L}$  RNase. Sampel yang telah halus selanjutnya diambil sebanyak 400  $\mu\text{L}$  supernatan dan dipindahkan ke *microtube* baru selanjutnya divortex untuk memastikan sampel homogen. Sampel yang telah homogen kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 1,5 jam pada *thermoshaker* dan selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu ruang (27°C) selama 30 detik. Sampel hasil sentrifus kemudian diambil supernatan sebanyak 400  $\mu\text{L}$  dan dipindahkan ke *microtube* baru (apabila volume supernatan yang didapatkan kurang dari 400  $\mu\text{L}$ , tambahkan *buffer* PP sebanyak satu pertiga volume supernatan).

Supernatan yang telah dipindahkan ke *microtube* baru ditambahkan 140  $\mu\text{L}$  *buffer* PP dan divortex sekitar 15 detik supaya homogen. Sampel yang telah homogen diinkubasi *on ice* selama 5 menit untuk mendapatkan kualitas DNA yang lebih baik. Sampel disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm pada suhu ruang (27°C) selama 5 menit. Hasil sentrifus sampel tersebut adalah dua fase pada sampel, yaitu supernatan dan *pellet*. Supernatan diambil sebanyak 400  $\mu\text{L}$  dan dipindahkan ke *microtube* baru yang telah berisi 300  $\mu\text{L}$  isopropanol yang telah ditambahkan sebelumnya. Penambahan isopropanol pada supernatan dan *invert tube* mengakibatkan terbentuknya struktur seperti benang putih melayang dalam *tube*. *Tube* berisi sampel disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm pada suhu ruang (27°C) selama 1 menit.

Supernatan hasil sentrifus dibuang sedangkan pada *pellet* ditambahkan 300  $\mu\text{L}$  Etanol 70% dan *invert tube*. Sampel yang homogen kemudian disentrifus kembali pada kecepatan 10.000 rpm pada suhu ruang (27°C) selama 1 menit. Supernatan lapisan paling atas (etanol 70%) dibuang dan *invert tube* pada kertas absorban yang bersih. Pellet dikeringanginkan selama 5-10 menit. Pellet ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  *buffer* RE dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit

pada *thermoshaker*. *Tube* secara periodik di-*tapping* selama proses inkubasi berjalan.

### 3.4.3 Amplifikasi DNA Target dengan PCR

Amplifikasi DNA target dilakukan dengan mereaksikan 2x PCR Master mix, *forward primer*, *reverse primer* dan ekstrak DNA genom *Phalaenopsis*. Tahapan pertama yang dilakukan adalah pembuatan *cocktail*. Volume *cocktail* yang dibutuhkan setiap 1 sampel adalah 20  $\mu\text{L}$ . PCR Master mix sebanyak 10  $\mu\text{L}$  dimasukkan dalam mikro tube 1,5  $\mu\text{L}$ , ditambah primer F dan primer R masing-masing sebanyak 1  $\mu\text{L}$ , *template* DNA genom yang dimasukkan adalah 1,5  $\mu\text{L}$ , dan 6,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA target tercantum dalam Tabel 3.1 berikut :

**Tabel 3.1** Daftar primer *matK*, *rbcL* dan *ITS2*, dan yang digunakan dalam penelitian ini

Primer <i>matK</i>	Sekuen	Referensi
<i>matK743F</i>	5'-CTTCTGGAGTCTTTCTTGAGC-3'	Azofeifa-Bolanos <i>et al.</i> , 2017
<i>matKR2</i>	5'- CCAATACAGTACAAAATTGAGC-3'	Batista <i>et al.</i> , 2013
<b>Primer <i>rbcL</i></b>		
<i>rbcLa_F</i>	5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'	Costion <i>et al.</i> , 2011
<i>rbcLa_R</i>	5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'	Costion <i>et al.</i> , 2011
<b>Primer <i>ITS2</i></b>		
DR2F	5'-GGCTCTCGCATCGATGAAGA-3'	Martins <i>et al.</i> , 2014
ITS_26SE	5'-TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'	Sun <i>et al.</i> , 1994

*Cocktail* dihomogenkan sebelum dimasukkan mesin PCR. Tahapan-tahapan di atas dilakukan pada kondisi dingin (di atas es). *Cocktail* dimasukkan dalam *tube* PCR dan mesin *polymerase chain reaction* (PCR). Tahapan-tahapan dalam mesin PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dan menurut Handoyo dan Rudiretna (2001) diatur kondisi mesin PCR dan diuraikan menurut beberapa tahapannya, yaitu pada tahapan pre-denaturasi dilakukan pada suhu 95°C selama 5 menit

kemudian tahapan denaturasi dilakukan pada suhu 95°C selama 30 detik. Beberapa tahapan yang dilakukan setelah tahapan denaturasi yaitu tahapan *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik. Tahapan *extension* dilakukan setelah tahapan *annealing* selesai pada suhu 72°C selama 1 menit 15 detik, kemudian tahapan *final extension* pada suhu 72°C selama 5 menit, dan tahapan terakhir yaitu *hold* pada suhu 16°C.

#### 3.4.4 Analisis Hasil PCR

Hasil PCR dilihat dengan elektroforesis yang meliputi beberapa tahapan yaitu membuat gel agarose 1,25% (0,625 gram agarose dalam 50 mL *buffer* TAE (Tris Acetic-EDTA). Selanjutnya, larutan gel agarose dididihkan diatas *hotplate*. EtBr sebanyak 1 µL ditambahkan dalam larutan gel agarose saat suhu mulai turun setelah larutan dididihkan. Alat elektroforesis diatur terlebih dahulu kemudian gel agarose dituang ke dalam cetakan dan ditunggu hingga padat.

Langkah selanjutnya, cetakan sumuran dilepas dan dituang 350 mL *buffer* TAE (*Tris Acetic* EDTA) 1x ke atas gel sebagai running buffer. Posisi sumuran dapat diatur sebagai berikut :



Keterangan :

- M : Marker 100 bp sebanyak 5 µL
- 1 : Sampel hasil PCR pada sumuran sebanyak 10 µL

Kondisi elektroforesis diatur waktu yang dibutuhkan selama 30 menit pada 100 volt. Setelah proses *running* pada elektroforesis selesai, divisualisasi dengan meletakkan gel di atas *UV Transilluminator* untuk melihat ada tidaknya pita DNA hasil PCR. *Band* DNA yang muncul dianalisis ukurannya dan disesuaikan ukuran panjang pada *marker*.

#### 3.4.5 Purifikasi Hasil PCR dan Sekuensing

Produk hasil PCR yang telah melalui proses *running* dengan elektroforesis dapat dipurifikasi untuk memaksimalkan hasil amplifikasi DNA target. Purifikasi

dilakukan agar DNA steril dari sisa-sisa buffer, *dNTP mix*, primer dan senyawa lainnya. Langkah pertama adalah produk hasil PCR dimasukan dalam *tube* dan diukur volumenya. Selanjutnya, ditambah 3x volume *solubilization buffer* (SB) dan dilakukan *centrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 25°C selama 30 detik pada tube yang berisi sampel. Pencucian DNA dilakukan dengan *washing buffer* (WB), kemudian dilakukan *centrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 25°C selama 30 detik. Selanjutnya *centrifuge* pada suhu 25°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik dan dilarutkan DNA menggunakan  $\text{H}_2\text{O}$  steril atau *elution buffer* (EB) sebanyak 20-50  $\mu\text{l}$ , kemudian dilakukan *centrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 25°C selama 30 detik. Hasilnya dipindah ke *tube* baru dan siap dikirim untuk sekuensing. Pembacaan urutan basa DNA hasil PCR dilakukan dengan menggunakan jasa Macrogen, Korea. Selanjutnya, hasil sekuen diolah menggunakan software BioEdit.

### 3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan software BLAST yang ada pada DNA database GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) untuk mengonfirmasi sekuen DNA target (*matK*, *rbcL*, dan ITS2) anggrek *Phalaenopsis deliciosa*. Urutan basa hasil pembacaan kemudian disejajarkan dengan Clustal X2. Konstruksi pohon filogenetik dianalisis menggunakan software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 5.2).



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 KESIMPULAN

Kesimpulan pada penelitian ini yaitu sampel anggrek *P. deliciosa* berhasil dikarakterisasi berdasarkan marka molekuler *matK* dan ITS2. Hasil karakterisasi sekuen *matK*, *rbcL*, dan ITS2 *P. deliciosa* didapatkan *Query length* secara berturut-turut yaitu 413 bp, 567 bp, dan 482 bp. Sekuen *matK*, *rbcL*, dan ITS2 *P. deliciosa* masing-masing memiliki perbedaan basa nukleotida dengan spesies homolog di NCBI. Sekuen ITS2 yang digunakan pada anggrek *P. deliciosa* bersifat spesifik dalam membedakan spesies. Hal ini didukung dengan hasil konstruksi pohon filogenetik sekuen ITS2 dengan spesies homolog dari NCBI. Berdasarkan hal tersebut, sekuen ITS2 dapat digunakan sebagai penanda molekuler dalam menentukan *barcode* untuk identifikasi anggrek *Phalaenopsis deliciosa*.

### 5.2 SARAN

Saran berdasarkan penelitian ini yaitu sekuen *P. deliciosa* dengan primer *matK* dan ITS2 dapat digunakan untuk penelitian yang lebih lanjut. Sekuen ITS2 sebagai *barcode* yang paling baik untuk identifikasi anggrek *Phalaenopsis deliciosa*.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Akkurt, M. 2012. Comparison Between Modified DNA Extraction Protocols And Commercial Isolation Kits In Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Genet. Mol. Res.* 11 (3): 2343-2351.
- Alrich, P dan Higgins, W. 2014. *Phalaenopsis japonica* (Reichenbach f.) Kocyan & Schuiteman. *Phytotaxa.* 161(25): 20-21.
- An, S. K., Y. J. Kim, dan K. S. Kim. 2013. Optimum Heating Hour to Maintain Vegetative Growth and Inhibit Premature Inflorescence Initiation of Six-month and One-year-old *Phalaenopsis* Hybrids. *Hort. Environ. Biotechnol.* 54(2) : 91-96.
- Anasari, N. R., N. Kendarini, dan S. L. Purnamaningsih. 2017. Interaksi Genotip × Lingkungan Pada Empat Genotip Pakchoy (*Brassica rapa* L.) Di Tiga Lokasi. *Jurnal Produksi Tanaman.* 5 (1) : 54 – 60.
- Anggraini, I., R. S. Ferniah, dan E. Kusdiyantini. 2019. Isolasi Khamir Fermentatif dari Batang Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*. L) dan Hasil Identifikasinya Berdasarkan Sekuens *Internal Transcribed Spacer*. *Berkala Bioteknologi.* 2 (2) : 12-22.
- Ardiana, D. W. 2009. Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Pepaya Dan Jeruk Dengan Menggunakan Modifikasi Bufer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian.* 14 (1) : 12-16.
- Ayu, B. P., R. S. Purwobatinigrum, dan A. I. N. Aminin. 2011. Purifikasi DNA Kromosom *Geobacillus* sp. dYTae-14 Menggunakan Kolom Silika dengan Denaturan Urea. *Jurnal Sains dan Matematika.* 19 (4) : 101-106.
- Azofeifa-Bolanos, J. B., L. R. Gigant, M. Nicolas-Garcia, M. Pignal, F. B. Tavares-Gonzalez, E. Hagsater, G. A. Salazar-Chavez, Delfino Reyes-Lopez, F. L. Archila-Morales, J. A. Garcia-Garcia, D. da Silva, A. Allibert, F. Solano-Campos, G. del C. Rodriguez-Jimenes, A. Paniagua-Vasquez, P. Besse, A. Perez-Silva dan M. Grisoni. 2017. A New Vanilla Species from Costa Rica Closely Related to *V. planifolia* (Orchidaceae). *European Journal of Taxonomy.* 284 : 1–26.
- Bangol, I., L. I. Momuata, dan M. Kumaunang. 2014. Barcode DNA Tumbuhan Pangi (*Pangium edule* R.) Berdasarkan Gen matK. *Jurnal Mipa Unsrat.* 3 (2): 113-119.
- Batista, J.A.N., K. S. Borges, M. W.F. de Faria, K. Proite, A. J. Ramalho, G. A. Salazar, C. van den Berg. 2013. Molecular Phylogenetics Of The Species-Rich Genus *Habenaria* (Orchidaceae) In The New World Based On Nuclear

- And Plastid DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 67 : 95–109.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA Barcode for Land Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 12 794–12 797.
- Chase, M.W, D.E Soltis, R.G Olmstead et al. 1993. Phylogenetics of seed plants - an analysis of nucleotide-sequences from the plastid gene Rbcl. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 80 : 528–580.
- Chen, S., H. Yao, J. Han, C. Liu, J. Song, L. Shi, Y. Zhu, X. Ma, T. Gao, X. Pang, K. Luo, Y. Li, X. Li, X. Jia, Y. Lin, dan C. Leon. 2010. Validation Of The ITS2 Region As A Novel DNA Barcode For Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE*. 5: e8613.
- Cheng, T., C. Xu, L. Lei, C. Li, Y. Zhang, dan S. Zhou. 2016. Barcoding The Kingdom Plantae: New PCR Primers for ITS regions of Plants with Improved Universality and Specificity. *Molecular Ecology Resources*. 16 : 138–149.
- Christenson, E. A. 2001. *Phalaenopsis*. A Monograph. Portland, Oregon, USA : Timber Press.
- Clegg, M. T. 1993. Chloroplast Gene-Sequences and The Study of Plant Evolution. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*. 90 : 363–367.
- Costion, C., A. Ford, H. Cross, D. Crayn, M. Harrington, A. Lowe. 2011. Plant DNA Barcodes Can Accurately Estimate Species Richness in Poorly Known Floras. *PloS ONE*. 6 (11).
- Dharmayanti, N.L.P.I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *WARTAZOA*. 21 (1) : 1-10.
- Dong, W, T. Cheng, C. Li, C. Xu, P. Long, C. Chen dan S. Zhou. 2013. Discriminating Plants using the DNA barcode rbcLb: An Appraisal Based on a Large Data Set. *Molecular Ecology Resources*.
- Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and Classification the Orchid Family*. Portland, Oregon, USA Dioscorides Press.
- Fardilla, F. P., H. P. Kusumaningrum, danWijanarka. 2017. Identifikasi Molekuler Tanaman Pisang Rajalawe Berdasarkan Gen *Internal Transcribed Spacer (ITS)*. *Jurnal Biologi*. 6 (1) : 21-28.

- Fazekas, A.J., P. R. Kesanakurti, K. S. Burgess, D. M. Percy, S. W. Graham, S. C. H. Barrett, S. G. Newmaster, M. Hajibabaei Dan B. C. Husband. 2009. Are Plant Species Inherently Harder To Discriminate Than Animal Species Using DNA Barcoding Markers?. *Molecular Ecology Resources*. 9 : 130–139.
- Glick, B.R, J.J Pasternak, C. L Patten. 2010. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. (4 ed.). Washington, DC: ASM Press. 117– 118.
- Handoyo, D dan A. Rudiretna. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR) [*General Principles and Implementation of Polymerase Chain Reaction*]. *Unitas*. Vol. 9 (1) : 17-29.
- Hartati, S dan L. Darsana. 2015. Karakterisasi Anggrek Alam secara Morfologi dalam Rangka Pelestarian Plasma Nutfah. *J. Agron Indonesia*. 43 (2) : 133 – 139.
- Heckenhauer, J. M. H. J. Barfuss, dan R. Samuel. 2016. Universal Multiplexable *matK* Primers for DNA Barcoding of Angiosperms. *Applications in Plant Sciences*. 4 (6): 1-7.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., dan deWaard, J. R. 2003. Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270 : 313–321.
- Hidayat, T., D. Kusumawaty, Kusdianti, D. D. Yati, A. A. Muchtar, dan D. Mariana. 2008. Analisis Filogenetik Molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) Menggunakan Urutan Basa DNA Daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)*. *Jurnal Matematika dan Sains*. 13 (1): 16-21.
- Hidayat, T., T. Yukawa, dan M. Ito. 2006. Evolutionary Analysis Of Pollinaria Morphology of Subtribe Aeridinae (Orchidaceae). *REINWARDTIA*. 12 (3) : 223 – 235.
- Hollingsworth, P.M, L.L Forrest, J.L Spouge, M. Hajibabaei, R. Ratnasingham. 2009. A DNA Barcode for Land Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106: 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.
- Holtum, R.E. 1964. *Orchids of Malaya, 3rd Ed*. Singapore : Government Printers.

- Ihrmark, K., I. T.M. Bodeker, K. C. Martinez, H. Friberg, A. Kubartova, J. Schenck, Y. Strid, J. Stenlid, M. B. Durling, K. E. Clemmensen dan B. D. Lindahl. 2012. New Primers To Amplify The Fungal ITS2 Region – Evaluation By 454-Sequencing Of Artificial And Natural Communities. *FEMS Microbiol Ecol.* 82 : 666–677.
- IOSPE, 2020. Plant and Flower of *Phalaenopsis deliciosa*. <http://www.orchidspecies.com/orphotdir/phaldeliciosa.jpg>. [Diakses pada 11 Januari 2020].
- Irawan, P. D., T. E. Tallei, B. J. Kolondam. 2016. Analisis Sekuens Dan Filogenetik Beberapa Tumbuhan *Syzygium* (Myrtaceae) Di Sulawesi Utara Berdasarkan Gen *matK*. *Jurnal Ilmiah Sains.* 16 (2) : 43-50.
- ITIS. 2010. Taxonomy Hierarchy of *Phalaenopsis deliciosa*. [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=894606#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=894606#null). [Diakses pada 6 Oktober 2019].
- Julianti, E., A. Pinaria, E. Lengkong, B. J. Kolondam. 2015. *DNA Barcoding* Tanaman Daluga (*Cystosperma* spp) dari Kepulauan Sangihe Berdasarkan Gen *matK*. *Jurnal Bioslogos.* 5(2) : 46-54.
- Kang, Y., Z. Deng, R. Zang dan W. Long. 2017. DNA Barcoding Analysis and Phylogenetic Relationships of Tree Species in Tropical Cloud Forests. *Scientific Reports.* 7 : 1-9.
- Khew, G. S. W dan T. F. Chia. 2011. Parentage Determination of *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae) Through Two Chloroplast Genes *matK* and *rbcl*. *AoB PLANTS.*
- Kim, D. G., K. K. Kim, and C. G. Been. 2015. Development of Intergeneric Hybrids between Wind Orchids (*Sedirea japonica* and *Neofinetia falcata*) and Moth Orchids (*Phalaenopsis* alliances). *Hort. Environ. Biotechnol.* 56(1) : 67-78.
- Kim, H. M., S. Oh, G. S. Bhandari, C. Kim dan C. Park. 2014. DNA Barcoding of Orchidaceae in Korea. *Molecular Ecology Resources.* 14 : 499–507.
- Kolondam, B. J., E. Lengkong, J. Polii-Mandang, A. Pinaria, dan S. Runtuuwu. 2012. Barcode DNA berdasarkan Gen *rbcl* dan *matK* Anggrek Payus Limondok (*Phaius tancarvilleae*) (DNA Barcode of Payus Limondok Orchid (*Phaius tancarvilleae*) Based on the *rbcl* and *matK* genes). *Jurnal BIOSLOGOS.* 2(2) : 55-62.

- Kress, W. J. dan D. L. Erickson. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcl* Gene Complements the Non-Coding *trnHpsbA* Spacer Region. *Plos One*. 6: 1-10.
- Kress, W. J, D. L. Erickson, F. A. Jones, N. G. Swenson, R. Perez, O. Sanjurb, dan E. Bermingham. 2009. Plant DNA Barcodes And A Community Phylogeny Of A Tropical Forest Dynamics Plot In Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 106: 18621–18626.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. & Janzen, D. H. 2005. Use Of DNA Barcodes To Identify Flowering Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102. 8369–8374.
- Kumar, R., P. Mahadani, R. Kishore, A. L. Meitei dan D. R. Singh. 2016. DNA Barcoding of Indian Orchids. *Technical Bulletin*. No. 48.
- Lestari, D. A., R. Azrianingsih, dan Hendrian. 2018. Filogenetik Jenis-jenis Annonaceae dari Jawa Timur Koleksi Kebun Raya Purwodadi Berdasarkan *Coding* dan *Non-coding* sekuen DNA. *J. Trop. Biodiv. Biotech*. Vol. 3 : 1–7.
- Li, M., H. Cao, P. P. But, dan P. Shaw. 2011. Identification Of Herbal Medicinal Materials Using DNA Barcodes. *Journal of Systematics and Evolution*. 49 (3): 271-283.
- Li, M. H., G. Q. Zhang, Z. J. Liu dan S. R. Lan. 2014. Revision of *Hygrochilus* (Orchidaceae: Epidendroideae: Aeridinae) and A Molecular Phylogenetic Analysis. *Phytotaxa*. 159 (4): 256–268.
- Li, M. H., O. Gruss dan Z. J. Liu. 2016. Nomenclature Changes in *Phalaenopsis* subgen. *Hygrochilus* (Orchidaceae; Epidendroideae; Vandae) Based on DNA Evidence. *Phytotaxa*. 275 (1): 55 - 61.
- Li, X., Y. Yang, R. J. Henry, M. Rossetto, Y. Wang, dan S. Chen. 2014. Plant DNA Barcoding: From Gene To Genome. *Biol. Rev*. 1-10.
- Li, Y., Y. Tong, dan F. Xing. 2016. DNA Barcoding Evaluation and Its Taxonomic Implications in the Recently Evolved Genus *Oberonia* Lindl. (Orchidaceae) in China. *Frontiers in Plant Science*. 7 : 1-9.
- Liao, M. S., S. F. Chen, C. Y. Chou, H. Y. Chen, S. H. Yeh, Y. C. Chang, J. A. Jiang. 2017. On Precisely Relating The Growth Of *Phalaenopsis* Leaves To Greenhouse Environmental Factors By Using An Iot-Based Monitoring System. *Computers and Electronics in Agriculture*. 136 : 125–139.

- Malendes, M. A dan H. Bunyamin. 2017. Perbandingan Needleman-Wunsch dan Lempel-Ziv dalam Teknik Global Sequence Alignment: Keunggulan Faktorisasi Sempurna. *Jurnal Teknik Informatika dan Sistem Informasi*. 3 (1) : 57-68.
- Martins, A. C., M. D. Scherz, dan S. S. Renner. 2014. Several Origins of Floral Oil In The Angelonieae, A Sothern Hemisphere Disjunct Clade of Plantaginaceae. *American Journal of Botany*. 101 ( 12 ): 2113 – 2120.
- Minh, T. N., D. T. Khang, P. T. Tuyen, L. T. Minh, L. H. Anh, N. V. Quan, P. T. T. Ha, N. T. Quan, N. P. Toan, A. A. Elzaawely, dan T. D. Xuan. 2016. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Phalaenopsis Orchid Hybrids. *Antioxidants*. 5 : 1-12.
- Newmaster, S.G., A. J. Fazekas, dan S. Ragupathy. 2006. DNA *barcoding* in Land Plants: Evaluation of *rbcL* in a Multigene Tiered Approach. *Can. J. Bot.* 84: 335-341.
- Pandin, D. S. 2010. Penanda DNA Untuk Pemuliaan Tanaman Kelapa (*Cocos nucifera* L.). *Perspektif*. 9 (1) : 21- 35.
- Pangestika, Y., A. Budiharjo, H. P. Kusumaningrum. 2015. Analisis Filogenetik *Curcuma sedoaria* (Temu Putih) Berdasarkan Gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS). *Jurnal Biologi*. 4 (4) : 8-13.
- Parveen, I, H. K. Singh, S. Malik, S. Raghuvanshi dan S. B. Babbar. 2017. Evaluating Five Different Loci (*rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK* and ITS) for DNA Barcoding of Indian Orchids. *Genome*. 60 (8) : 665-671.
- Pridgeon, A. M., P. J. Cribb, M. W. Chase, dan F. N. Rasmussen. 2014. *Genera Orchidacearum, Volume 6 Epidendroidea (Part Three)*. USA : Oxford University Press.
- Purohit, H. J., A. Kapley, A. A. Moharikar, G. Narde. 2003. A Novel Approach For Extraction Of PCR-Compatible DNA From Activated Sludge Samples Collected From Different Biological Effluent Treatment Plants. *Journal of Microbiological Methods*. 52 : 315 – 323.
- Purwanto, A. Erlina, dan S. Fitria. 2005. Kekerabatan Antar Anggrek Spesies Berdasarkan Sifat Morfologi Tanaman dan Bunga. *Ilmu Pertanian*. 12:1-11.
- Rinanda, T. 2011. Analisis Sekuensing 16s rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. 11 (3) : 172-177.
- Rogers, K. 2011. *New Thinking about Genetics*. New York: Britannica Educational Publishing.

- Sari, S. K., M. N. Mazieda, D. Listyorini, dan E. S. Sulasmi. 2014. Optimization Of DNA Isolation And Purification Technique From Chili Pepper (*Capsicum frutescens* Cv. Cakra Hijau) Using Genomic DNA Mini Kit (Plant) Geneaid. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang.
- Seidenfaden, G. 1986 .Orchid Genera in Thailand XIII. Thirty-three epidendroid genera. *Opera Botanica*. 89: 1-216.
- Selvaraj, D., R. K. Sarma dan R. Sathishkumar. 2008. Phylogenetic Analysis of Chloroplast *matK* Gene from Zingiberaceae for Plant DNA Barcoding. *Bioinformation*. 3(1): 24-27.
- Serdani, A.D., L. Q. Aini, A. L. Abadi. 2018. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Endofit Dari Tanaman Padi (*Oryza sativa*) Sebagai Pengendali Penyakit Hawar Daun Bakteri Akibat *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Jurnal Viabel Pertanian*. 12 (1) : 18-26.
- Shim, P. S. 1982. A New Generic Classification in the *Phalaenopsis* complex (Orchidaceae). *Malayan Nature Journal*. 36 : 1-28.
- Simbolon, A. C., M. K. Bangun , dan L. A. P. Putri. 2017. Analisis Keragaman Genetik Klon Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Berdasarkan 4 Marka RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*). *Jurnal Agroekoteknologi FP USU*. 5 (3) : 564- 592.
- Sinaga, A., L. A. P. Putri, dan M. K. Bangun. 2017. Analisis Pola Pita Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* D.C) Berdasarkan Primer OPD 03, OPD 20, OPC 07, OPM 20, OPN 09. *Jurnal Agroekoteknologi FP USU*. 5 (1) : 55-64.
- Srivirojana, N.; Theptepa, T.; Punpuing, S.; Guest, P.; Tun, K.; Chankham, O.; Suvansrual, A. 2005. Population pressure, utilization of chemicals in agriculture, health outcomes and solid waste management. *In Proceedings of the International Conference on Integrated Solid Waste Management in Southeast Asian Cities, Siem Reap, Cambodia*.
- Sudarsono, M.D. Haristianita, A.S. Handini dan D. Sukma. 2017. Molecular Marker Development Based On Diversity Of Genes Associated With Pigment Biosynthetic Pathways To Support Breeding For Novel Colors In *Phalaenopsis*. *Proc. I International Symposium on Tropical and Subtropical Ornamentals*. 1167 : 305-312.

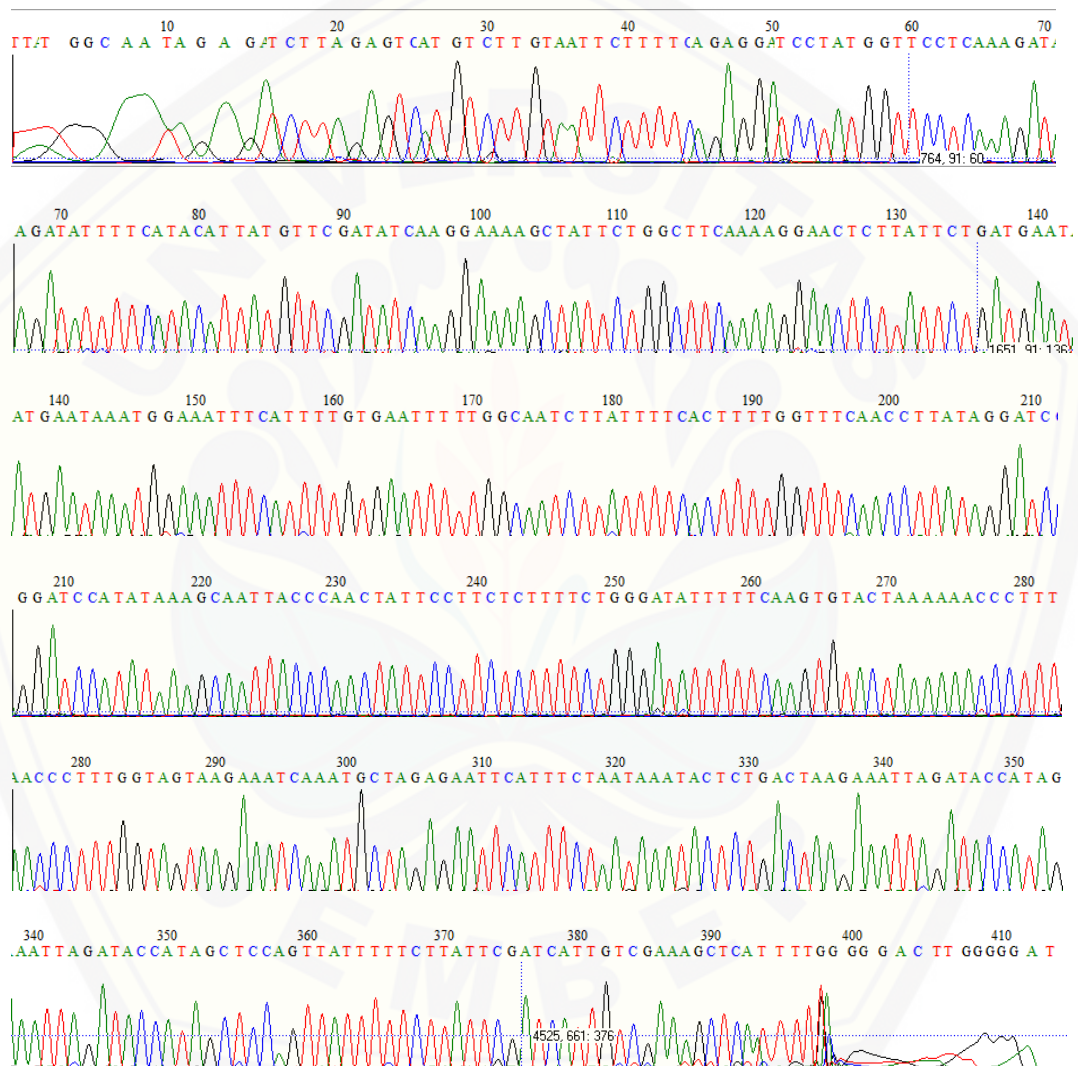


- Sun, Y., D.Z. Skinner, G.H Liang, S.H Hilbert. 1994. Phylogenetic Analysis of *Sorghum* and related taxa using Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA. *Theor Appl Genet.* 89 : 26-32.
- Susantidiana, A. Wijaya, B. Lakitan, M. Surahman. 2009. Identifikasi Beberapa Aksesori Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) melalui Analisis RAPD dan Morfologi. *J. Agron Indonesia.* 37 : 167-173.
- Teoh, S. E. 2016. *Medicinal Orchids of Asia*. Singapura: Elsevier.
- Tripathi, A. M., A. Tyagi, A. Kumar, A. Singh, S. Singh, L. B. Chaudhary, S. Roy. 2013. The Internal Transcribed Spacer (ITS) Region and trnhHpsbA Are Suitable Candidate Loci for DNA Barcoding of Tropical Tree Species of India. *PLoS ONE.* 8 (2) : 1-11.
- Tsai, C. 2011. Molecular Phylogeny and Biogeography of *Phalaenopsis* Species. Chapter 1. 1-24.
- Wahyudiningsih, T. S., Y. A. Nion, Pahawang. 2017. Pemanfaatan Anggrek Spesies Kalimantan Tengah Berbasis Kearifan Lokal yang Berpotensi Sebagai Bahan Obat Herbal. *Jurnal Biodjati.* 2(2) :150-158.
- Xu, S., D. Li, J. Li, X. Xiang, W. Jin, W. Huang, X. Jin, L. Huang. 2015. Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. *PloS ONE.* 10 (1) : 1-12.
- Yang, R. H., J. H. Su, J.J. Shang, Y.Y.Wu, Y. Li, D.P. Bao, Y.J. Yao. 2018. Evaluation of the Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS), Specifically ITS1 and ITS2, for The Analysis of Fungal Diversity by Deep Sequencing. *PloS ONE.* 13 (10) : 1-17.
- Yao, H., J. Song, C. Liu, K. Luo, J. Han, Y. Li, X. Pang, H. Xu, Y. Zhu, P. Xiao, S. Chen. 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PloS ONE.* 5 (10) : 1-9.
- Young, I., dan A.W. Coleman. 2004. The Advantages of the ITS2 Region of the Nuclear rDNA Cistron for Analysis of Phylogenetic Relationships of Insects: a *Drosophila* example. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 30 : 236–242.
- Yukawa, T., K. Kita, T. Handa, T. Hidayat, dan M. Ito. 2005. Molecular Phylogenetics of *Phalaenopsis* (Orchidaceae) Genera: Re-evaluation of Generic Concepts. *Acta Phytotax .GeoboL.* 56 (2) :141-161.

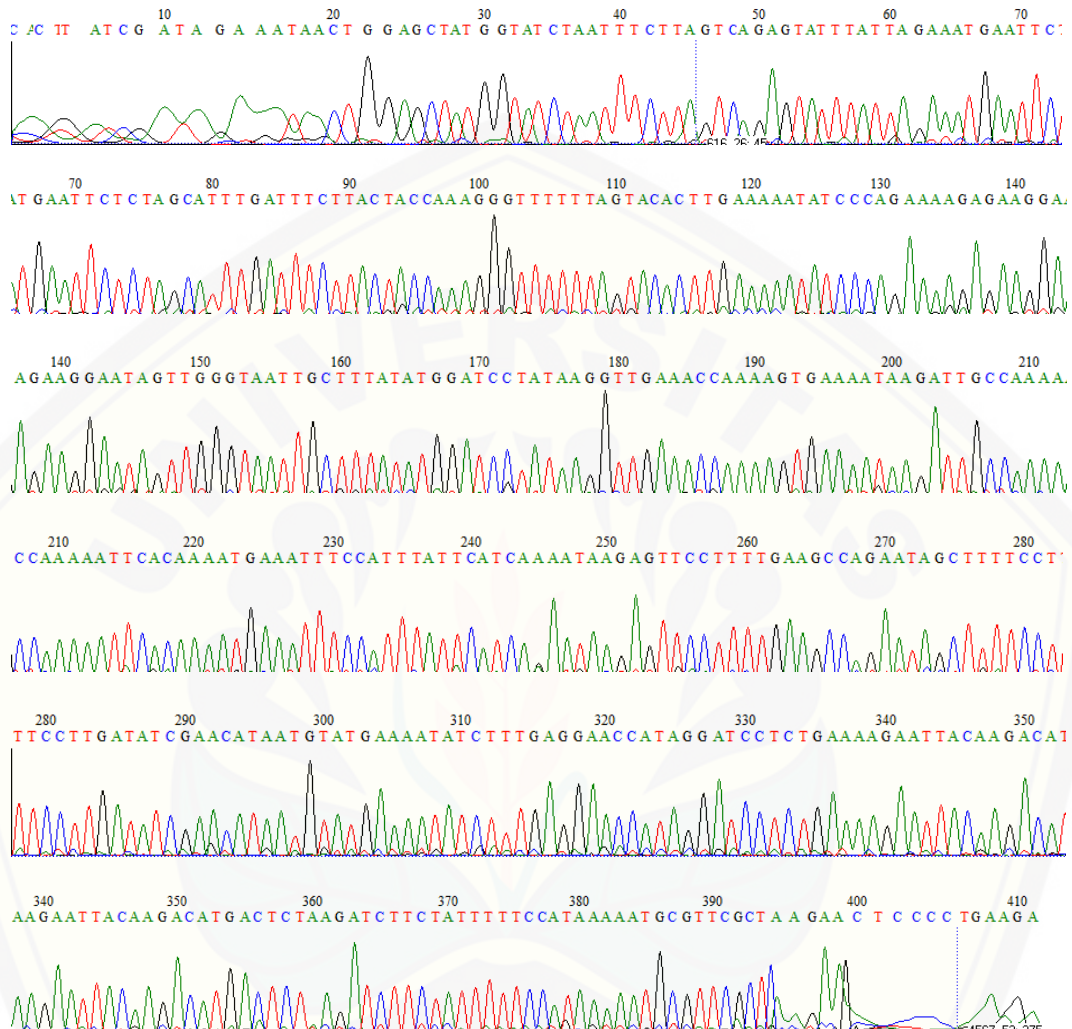
LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Kromatogram

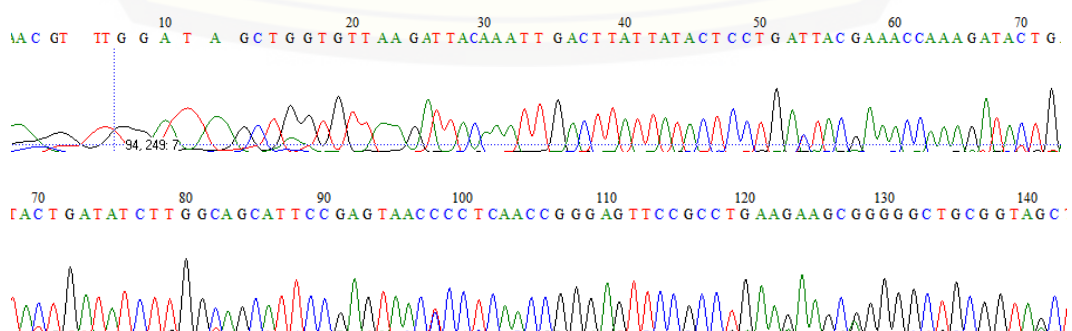
Lampiran 1.1 Hasil kromatogram dari anggrek *P. deliciosa* menggunakan primer 743F



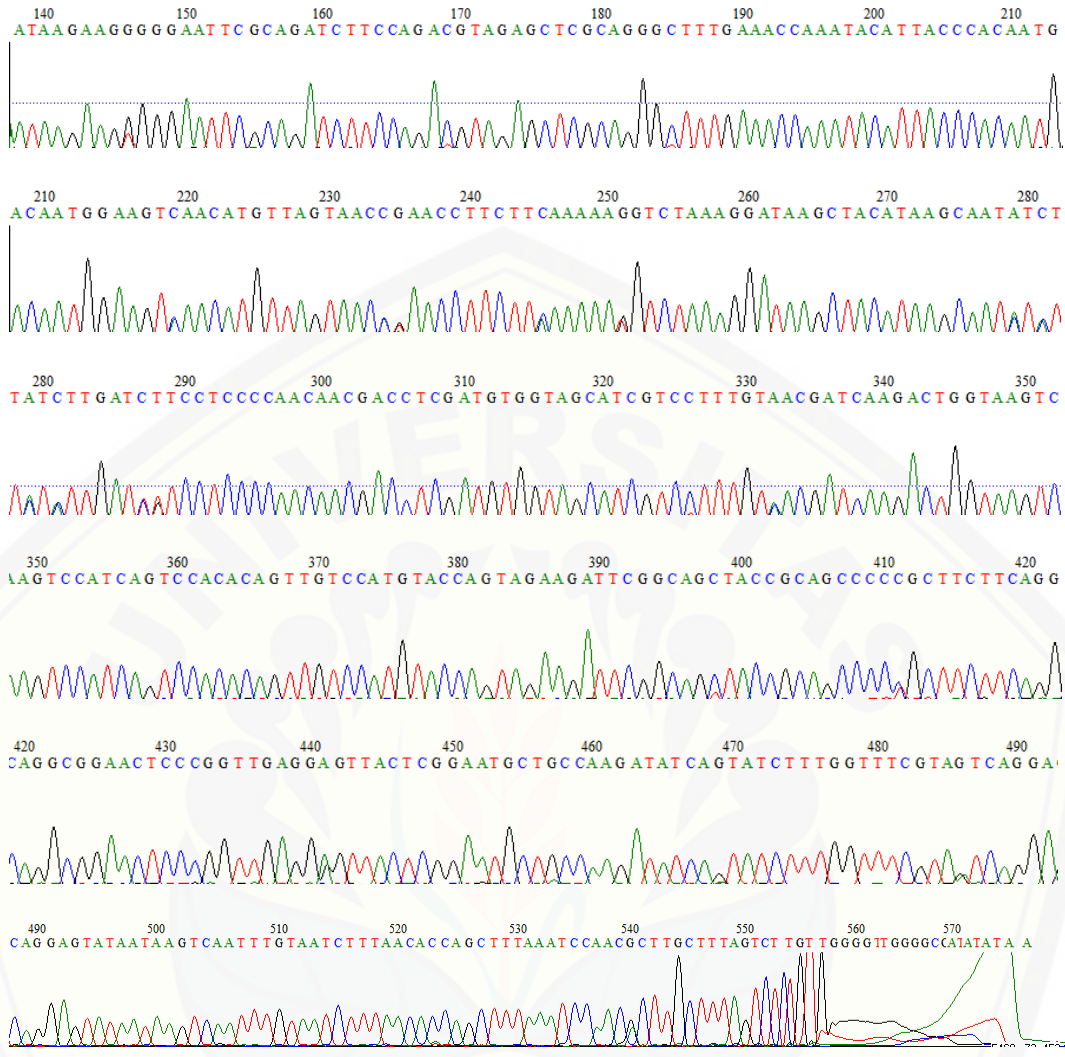
**Lampiran 1.2** Hasil kromatogram dari anggrek *P. deliciosa* menggunakan primer *R2*



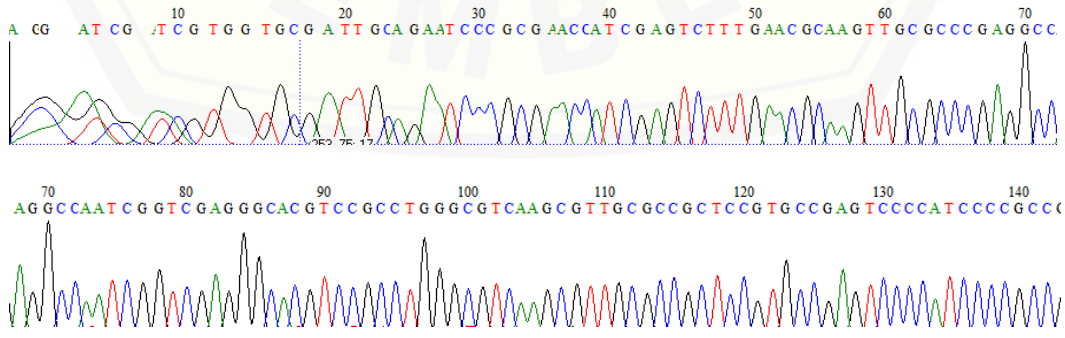
**Lampiran 1.3** Hasil kromatogram dari anggrek *P. deliciosa* menggunakan primer *rbcLa\_F*

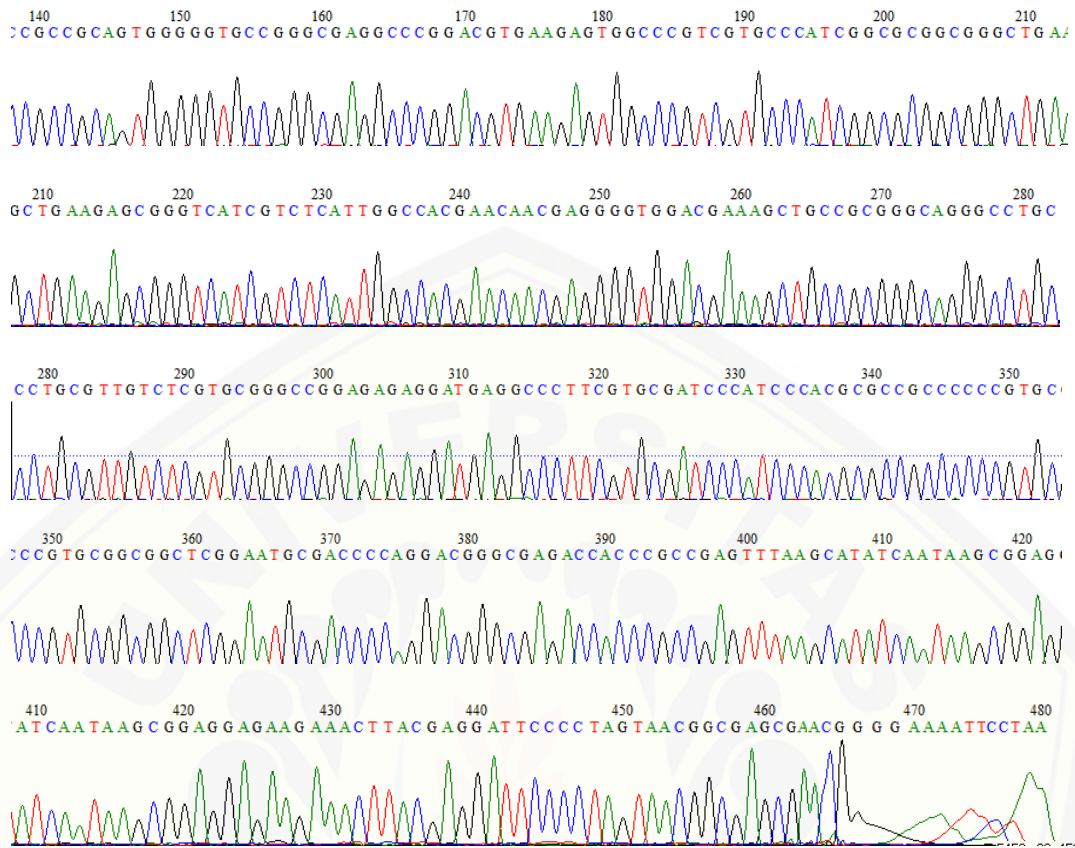




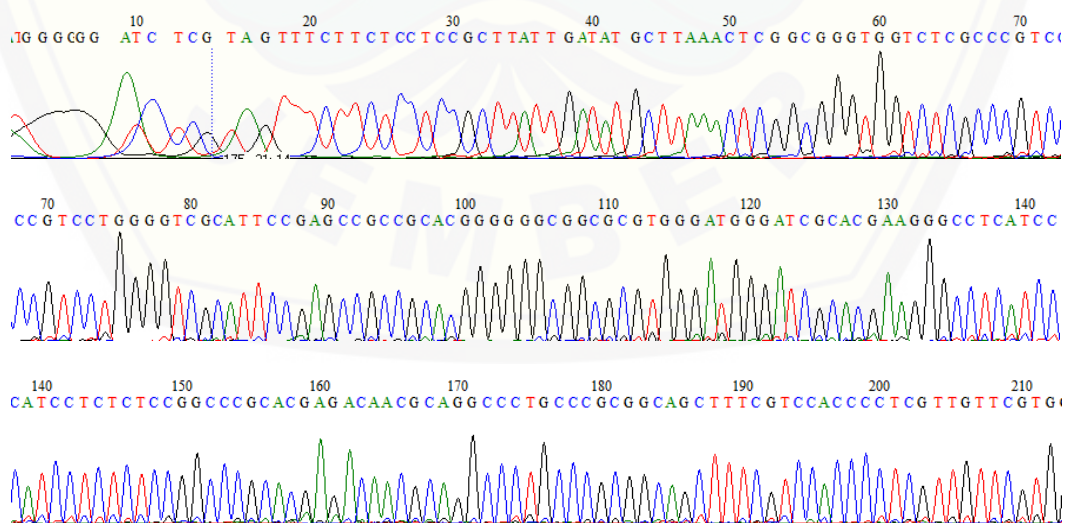


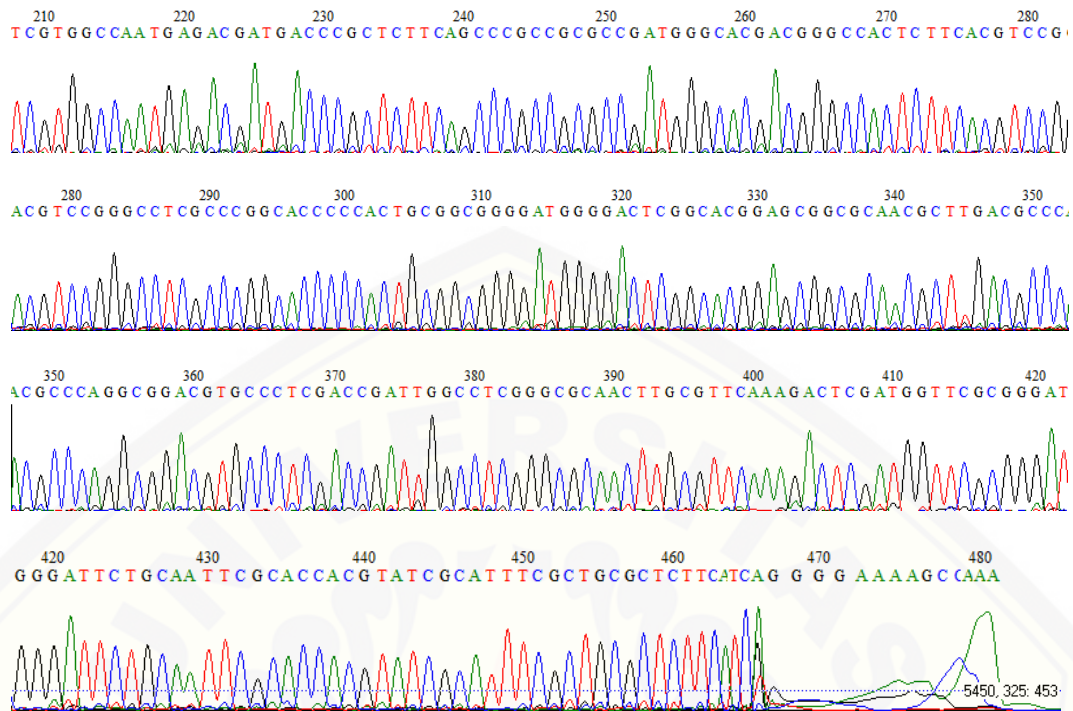
Lampiran 1.5 Hasil kromatogram dari anggrek *P. deliciosa* menggunakan primer DR2F





**Lampiran 1.6** Hasil kromatogram dari anggrek *P. deliciosa* menggunakan primer 26SE





## Lampiran 2 Sekuen tiga penanda molekuler dari angrek *P. deliciosa*

### Lampiran 2.1 Sekuen *matK* dari angrek *P. deliciosa* dengan panjang basa 413 bp

AGCGAACGCATTTTTATGGAAAAATAGAAGATCTTAGAGTCATGTCTT  
 GTAATTCCTTTCAGAGGATCCTATGGTTCCTCAAAGATATTTTCATACA  
 TTATGTTTCGATATCAAGGAAAAGCTATTCTGGCTTCAAAGGAACTCT  
 TATTTTGATGAATAAATGGAAATTTCATTTTGTGAATTTTGGCAATCT  
 TATTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCATATAAAGCAATTAC  
 CCAACTATTCCTTCTCTTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAA  
 CCCTTTGGTAGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAA  
 TACTCTGACTAAGAAATTAGATACCATAGCTCCAGTTATTTTTCTTATT  
 CGATCATTGTCGAAAGCTCATTTT

**Lampiran 2.2** Sekuen *rbcL* dari anggrek *P. deliciosa* dengan panjang basa 567 bp

```
ACAAGACTAAAGCAAGCGTTGGATTTAAAGCTGGTGTTAAAGATTACA
AATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAACCAAAGATACTGATATCTT
GGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCGGGAGTCCGCCTGAAGAAGC
GGGGGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGT
GTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTA
CCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAGATCAAGATATTGCTTATGT
AGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCCGTTACTAACATGTTG
ACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTAC
GTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCCCTTCTTATTCCAAAACCTTTCCAAGG
TCCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAAAGAGAGAAATTGAACAAGTATGG
TCGTCCCCTATTGGGATGTACTATGAAACCAAATTTGGGATTATCCGC
AAAAAACTACGGTAGAGCGTTTGATGAATGTCTAC
```

**Lampiran 2.3** Sekuen ITS2 dari anggrek *P. deliciosa* dengan panjang basa 482 bp

```
GATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATC
CCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAATCG
GTCGAGGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCGTTGCGCCGCTCCGTGCC
GAGTCCCCATCCCCGCCGAGTGGGGGTGCCGGGCGAGGCCCGGACG
TGAAGAGTGGCCCGTCGTGCCATCGGCGCGGCGGGCTGAAGAGCGG
GTCATCGTCTCATTGGCCACGAACAACGAGGGGTGGACGAAAGCTGCC
GCGGGCAGGGCCTGCGTTGTCTCGTGCGGGCCGGAGAGAGGATGAGG
CCCTTCGTGCGATCCCATCCCACGCGCCGCCCCCGTGCGGCGGCTCG
GAATGCGACCCCAGGACGGGCGAGACCACCCGCCGAGTTTAAGCATA
TCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGATTCCCCTAGTAACGG
CGAGCGAA
```