



**DNA BARCODING ANGGREK *Vanda tricolor* Hook. ASAL
DARI KAWASAN GUNUNG GUMITIR MENGGUNAKAN
PENANDA MOLEKULER *matK*, *rbcL* DAN ITS2**

SKRIPSI

oleh

Waki'atil Rosida

181810401015

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2022**



**DNA BARCODING ANGGREK *Vanda tricolor* Hook. ASAL
DARI KAWASAN GUNUNG GUMITIR MENGGUNAKAN
PENANDA MOLEKULER *matK*, *rbcL* DAN ITS2**

SKRIPSI

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

oleh

Waki'atil Rosida

181810401015

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2022**

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini penulis persembahkan kepada:

1. Kedua orang tua tercinta Ibunda Sunarmi dan Ayahanda Alm. Nasir, terimakasih atas do'a tulus, kasih sayang, dan pengorbanan yang telah diberikan serta kesabaran dalam mendidik sejak kecil;
2. Kakak tercinta Almh. Nur Hamida dan Keponakan tercinta Rabih Fid Dharain yang selalu memberi semangat dan menghibur dalam menyelesaikan tugas akhir ini;
3. Dosen-dosen Program Studi Sarjana Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember;
4. Guru-guru TK Nurul Huda, SDN 3 Paowan, SMPN 1 Situbondo, dan MAN 2 Situbondo yang telah mendidik dan membimbing dengan penuh kesabaran.

MOTTO

"I think the biggest innovations of the 21st century will be at the intersection of biology and technology. A new era is beginning."

(Steve Jobs)*

* Dying Realization About Biology and Technology (2011) oleh Steve Jobs

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Waki'atil Rosida

NIM : 181810401015

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “DNA Barcoding Anggrek *Vanda tricolor* Asal dari Kawasan Gunung Gunitir Menggunakan Penanda Molekuler *matK*, *rbcL* dan ITS2” adalah benar-benar karya sendiri dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah. Karya Ilmiah ini didanai sepenuhnya oleh Proyek KERIS SYMPLAST 2021.

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

Jember, 18 Juli 2022

Yang menyatakan,

Waki'atil Rosida

NIM. 181810401015



**DNA BARCODING ANGGREK *Vanda tricolor* Hook. ASAL
DARI KAWASAN GUNUNG GUMITIR MENGGUNAKAN
PENANDA MOLEKULER *matK*, *rbcL* DAN ITS2**

SKRIPSI

Oleh

**Waki'atil Rosida
NIM 181810401015**

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Mukhamad Su'udi, Ph.D.
Dosen Pembimbing Anggota : Dra. Dwi Setyati, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “DNA Barcoding Anggrek *Vanda tricolor* Asal dari Kawasan Gunung Gumitir Menggunakan Penanda Molekuler *matK*, *rbcL* dan ITS2” telah diuji dan disahkan oleh Program Studi Sarjana Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember pada:

Hari : **SELASA**
Tanggal : **19 JUL 2022**
Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji:

Ketua

Anggota I



Mukhamad Su'udi, Ph.D.
NRP. 760016788



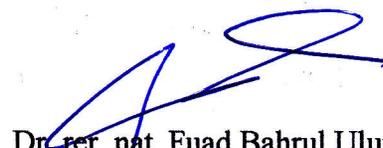
Dra. Dwi Setyati, M.Si.
NIP. 196404171991032001

Anggota II

Anggota III



Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.
NIP. 199009062019031014



Dr. rer. nat. Fuad Bahrul Ulum, S.Si., M.Sc.
NIP. 198409262008121002



Mengesahkan
Dekan F.MIPA Universitas Jember,

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

RINGKASAN

DNA Barcoding Anggrek *Vanda tricolor* yang Asal Dari Kawasan Gunung Gunitir Menggunakan Penanda Molekuler *matK*, *rbcL*, ITS2; Waki'atil Rosida, 181810401015; 2022; 36 Halaman; Program Studi Sarjana Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Anggrek (*Orchidaceae*) merupakan tumbuhan berbunga yang memiliki estetika dan ekonomi yang tinggi. Anggrek *Vanda tricolor* Hook. merupakan salah satu spesies anggrek obat yang banyak diminati karena dapat digunakan sebagai aroma terapi dan akarnya mengandung metabolit sebagai obat anti kanker. Umumnya anggrek *V. tricolor* diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi seperti bentuk daun, perbedaan warna bunga, tekstur dan kelopak bunganya. Genus *Vanda* terdiri atas banyak jenis antara lain adalah *V. tricolor* dan *Vanda limbata*. Kedua spesies tersebut memiliki persamaan bentuk daun yang linear dengan tepi daun rata (*entire*). Waktu berbunga anggrek *V. tricolor* relatif lama yaitu lima tahun sehingga sulit menemukan tanaman anggrek tersebut dalam keadaan berbunga oleh karena itu diperlukan metode identifikasi alternatif melalui DNA *barcoding*.

DNA *barcode* dapat diperoleh dari inti, kloroplas dan mitokondria. Penanda molekuler *matK* dan *rbcL* merupakan penanda yang berasal dari kloroplas dan telah disarankan oleh CBOL sebagai *barcode* untuk DNA tanaman. Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) merupakan *barcode* potensial yang berasal dari inti. Sekuen DNA *barcode* standar *rbcL* untuk spesies *Vanda tricolor* belum tersedia dalam NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan identifikasi *barcode* potensial melalui penanda molekuler spesifik yaitu *matK*, *rbcL* dan ITS2 untuk anggrek *V. tricolor*. Penelitian DNA *barcoding* *V. tricolor* dilakukan dengan identifikasi anggrek *V. tricolor*, isolasi DNA dilakukan menggunakan KIT GenEx,

amplifikasi DNA, analisis PCR, sekuensing DNA menggunakan jasa 1st Base, Singapura dan analisis data.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *V. tricolor* berhasil diamplifikasi menggunakan tiga set primer *matK*, *rbcL* dan ITS2 dengan *Query length* berturut-turut yaitu 408 bp, 317 bp dan 461 bp. Hasil analisis BLAST *matK* menunjukkan bahwa sampel angrek *V. tricolor* memiliki homologi sebesar 64% dengan spesies spesies homolognya yaitu *V. tricolor* (MT518856.1). Hasil analisis BLAST sekuen *rbcL* *V. tricolor* menunjukkan kesamaan dengan *Vanda coerulea* (KX344633.1) asal India dengan nilai *Per. Ident* 98.91%. Hasil analisis BLAST sekuen ITS2 dari *V. tricolor* menunjukkan homologi tertinggi dengan *V. tricolor* (EF670373.1) yang berasal dari Switzerland dengan nilai *Per. Ident* 98.91%. Reonstruksi filogenetik *V. tricolor* ITS2 membentuk satu cabang dengan spesies homolog yaitu *V. tricolor* pada NCBI. Sekuen *matK* dan ITS2 yang digunakan pada angrek *V. tricolor* bersifat spesifik dan dapat membedakan sampai ke tingkat spesies.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “DNA Barcoding Anggrek *Vanda tricolor* Hook. Asal Dari Kawasan Gunung Gunitir Menggunakan Penanda Molekuler *matK*, *rbcL* dan ITS2”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata Satu (SI) pada Program Studi Sarjana Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan do'a berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua tercinta Ibunda Sunarmi dan Ayahanda Alm. Nasir, terimakasih atas do'a tulus, kasih sayang, dan pengorbanan yang telah diberikan serta kesabaran dalam mendidik sejak kecil;
2. Mukhamad Su'udi, Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan nasihat dan membimbing dengan penuh perhatian dan kesabaran selama penulis menjadi mahasiswa hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini;
3. Dra. Dwi Setyati, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing, serta memberikan saran demi terselesaikannya penulisan skripsi ini;
4. Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si. dan Dr. rer. Nat. Fuad Bahrul Ulum, S.Si., M.Sc. selaku Dosen Penguji yang telah banyak memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini,
5. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan S1.
6. Dosen-dosen Program Studi Sarjana Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah memberikan ilmu, nasihat, dan bimbingan selama menjadi mahasiswa;

7. Alumni DNAR (Zakiah, Veren, Lailiyah, dan Sindhi) yang telah memberikan waktu, pikiran, dan tenaganya dalam keadaan suka dan duka untuk membantu penulis dalam penyelesaian skripsi ini;
8. Tim riset DNAR (El Shania, M. Ardiyansah, Assyifa, Silvy, Kurnia, Kiki, Afni, Dinda, Agil, Eka, Qummil) yang telah memberikan waktu, pikiran, dan tenaganya dalam keadaan suka dan duka untuk membantu penulis dalam penyelesaian skripsi ini;
9. Sahabat saya (El Shania, Devi Astika, Diah dan Rosa);
10. Teman-teman mahasiswa angkatan 2018 “ORCA” dan seluruh anggota demisioner pengurus Himabio ”Bakteriophage” periode 2020 yang telah memberikan banyak pengalaman dan kenangan selama menempuh studi ini;
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan, dan semangat demi terselesaikannya penulisan skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari berbagai pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi peneliti selanjutnya untuk dijadikan sebagai referensi tambahan.

Jember, 18 Juli 2022

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN.....	v
PEMBIMBINGAN	vi
PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Batasan Masalah.....	3
1.5 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Klasifikasi dan Karakteristik Anggrek <i>Vanda tricolor</i>	4
2.2 DNA Barcoding.....	5
2.3 Gen <i>maturase-K (matK)</i>	6
2.4 Gen <i>riboluse-1.5-biphospate carboxylase (rbcL)</i>	7
2.5 <i>Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)</i>	8
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	10
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	10
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	10
3.3 Rancangan Penelitian.....	10
3.4 Prosedur Penelitian	11

3.4.1 Koleksi Sampel.....	11
3.4.2 Isolasi DNA Genom.....	12
3.4.3 Elektroforesis Genom	12
3.4.4 Amplifikasi DNA.....	13
3.4.5 Analisis Hasil Amplifikasi DNA	14
3.4.6 Sekuensing DNA	14
3.5 Analisis Data	14
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	16
4.1 Karakteristik Morfologi <i>Vanda tricolor</i>	16
4.2 Hasil Amplifikasi DNA Target	17
4.3 Hasil Analisis BLAST	18
4.4 Hasil Analisis Alignment dan Pohon Filogenetik	20
BAB 5. PENUTUP.....	26
5.1 Kesimpulan	26
5.2 Saran.....	26
DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN.....	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Morfologi anggrek <i>Vanda tricolor</i>	5
2.2 Representasi struktur gen maturase-K (<i>matK</i>).....	7
2.3 Representasi struktur gen ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase (<i>rbcL</i>).....	8
2.4 Representasi struktur Internal Transcribed Spacer (ITS).....	9
3.1 Skema Alur Penelitian.....	11
4.1 Morfologi Anggrek <i>Vanda tricolor</i> Hook.....	16
4.2 Elektroforesis hasil analisis PCR menggunakan primer set <i>matK</i> , <i>rbcL</i> dan ITS2 pada anggrek <i>Vanda tricolor</i>	18
4.3 Hasil alignment DNA sampel <i>Vanda tricolor matK</i>	20
4.4 Hasil alignment DNA sampel <i>Vanda tricolor rbcL</i>	21
4.5 Hasil alignment DNA sampel <i>Vanda tricolor ITS2</i>	21
4.6 Rekonstruksi filogenetik sekuen <i>matK</i>	23
4.7 Rekonstruksi filogenetik sekuen <i>rbcL</i>	24
4.8 Rekonstruksi filogenetik sekuen ITS2.....	25

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Sekuen Primer maturase-K (<i>matK</i>), riboluse-1.5-biphosphate carboxylase (<i>rbcL</i>) dan Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2).....	13
3.2 Pengaturan Kondisi Proses Amplifikasi DNA.....	13
4.1 Hasil BLAST <i>Vanda tricolor</i> sekuen <i>matK</i>	18
4.2 Hasil BLAST <i>Vanda tricolor</i> sekuen <i>rbcL</i>	19
4.3 Hasil Blast <i>Vanda tricolor</i> sekuen ITS2	20

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia diperkirakan memiliki sebesar 25% spesies tumbuhan berbunga di dunia. Anggrek (*Orchidaceae*) merupakan suku tumbuhan berbunga yang memiliki anggota spesies paling banyak sampai mencapai 4.000 spesies (Kusmana dan Hikmat, 2015). Bunga anggrek memiliki ciri khas yang membedakan dari anggota suku lainnya yaitu tangkai bunga yang berlekuk serta memiliki tiga sepal dan satu diantaranya adalah sepal dorsal yang terletak di bagian belakang dan menhadap keatas. Anggrek juga memiliki petal yang letaknya berselang-seling dengan sepal dengan satu petal terletak dibagian bawah yang berbentuk mirip dengan lidah sehingga disebut bibir bunga (*labellum*) (Agustin & Widowati, 2015). Anggrek memiliki nilai ekonomi sebagai tanaman hias yang memiliki estetika tinggi (Wahyudiningsih dkk., 2017). Salah satu anggrek yang banyak digemari karena keindahan bunganya adalah anggrek jenis *Vanda* (Rupawan dkk., 2014).

Vanda merupakan salah satu genus anggrek yang diperkirakan memiliki ± 40 spesies (Rupawan dkk., 2014). *Vanda tricolor* Hook. merupakan salah satu spesies anggrek obat yang banyak diminati karena dapat digunakan sebagai aroma terapi dan akarnya mengandung metabolit sebagai obat anti kanker (Semiarti dkk., 2020). Anggrek tersebut banyak diambil dari hutan dan diperdagangkan dengan nama lokal (anggrek pandan) (Kasutjjaningati dan Firgiyanto, 2018). Umumnya *V. tricolor* dapat diidentifikasi berdasarkan karakteristik seperti bentuk daun, perbedaan warna bunga, tekstur dan kelopak bunganya (Putra, 2021). Daun *V. tricolor* memiliki persamaan dengan *Vanda limbata* pada bentuk daun yang linear dengan tepi daun rata (*entire*) (Hartati dkk., 2014). Waktu berbunga *V. tricolor* relatif lama yaitu 5 tahun sehingga sulit menemukan tanaman anggrek tersebut dalam keadaan berbunga (Dwiyani dkk., 2016) untuk itu diperlukan metode identifikasi alternatif selain

berdasarkan karakter morfologi yaitu dengan DNA *barcoding* (Bangol dkk., 2014).

DNA *barcoding* adalah urutan sekuen pendek DNA yang telah terstandarisasi sehingga dapat digunakan untuk mempercepat dan mempermudah identifikasi spesies. DNA *barcode* dapat diperoleh dari inti, kloroplas dan mitokondria (Rahayu dan Jannah, 2019). *The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) Plant Working Group* (2009) menyarankan penggunaan gen *matK* dan *rbcL* yang berasal dari kloroplas sebagai *barcode* untuk DNA tanaman. Gen *matK* dapat memberikan resolusi tinggi dalam membandingkan spesies tumbuhan namun gen tersebut sulit diamplifikasi, sedangkan gen *rbcL* mudah diamplifikasi namun memiliki resolusi rendah sehingga sulit membedakan spesies yang memiliki kerabat dekat (Bangol dkk., 2014). Daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)* merupakan *barcode* potensial yang berasal dari inti. Daerah tersebut memiliki ukuran yang kecil yaitu ± 700 bp dan memiliki banyak salinan dalam genom inti sehingga mudah diisolasi, diamplifikasi dan dianalisis (Ekasari dkk., 2012).

Sekuen DNA *barcode* standar *rbcL* untuk spesies *V. tricolor* belum tersedia dalam NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan identifikasi *barcode* potensial melalui penanda molekuler spesifik yaitu *matK*, *rbcL* dan ITS2 untuk anggrek *V. tricolor*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah *barcode matK*, *rbcL* dan ITS2 dapat digunakan untuk identifikasi molekuler anggrek *V. tricolor* sehingga mampu membedakan tingkat spesies?

1.3 Tujuan

Menentukan *barcode* potensial yang dapat digunakan untuk identifikasi molekuler anggrek *V. tricolor* yang mampu membedakan sampai tingkat spesies.

1.4 Batasan Masalah

Penelitian ini dilakukan menggunakan sampel anggrek *V. tricolor* yang berasal dari gunung gunitir dengan menggunakan tiga set primer *matK*, *rbcL* dan ITS2

1.5 Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah menambah informasi mengenai penanda molekuler spesifik yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi anggrek *V. tricolor* sampai pada tingkat spesies. Penggunaan DNA *barcode* merupakan salah satu solusi untuk mengidentifikasi spesies tanaman anggrek secara molekuler apabila terdapat kendala pada identifikasi anggrek secara morfologi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi dan Karakteristik Anggrek *Vanda tricolor*

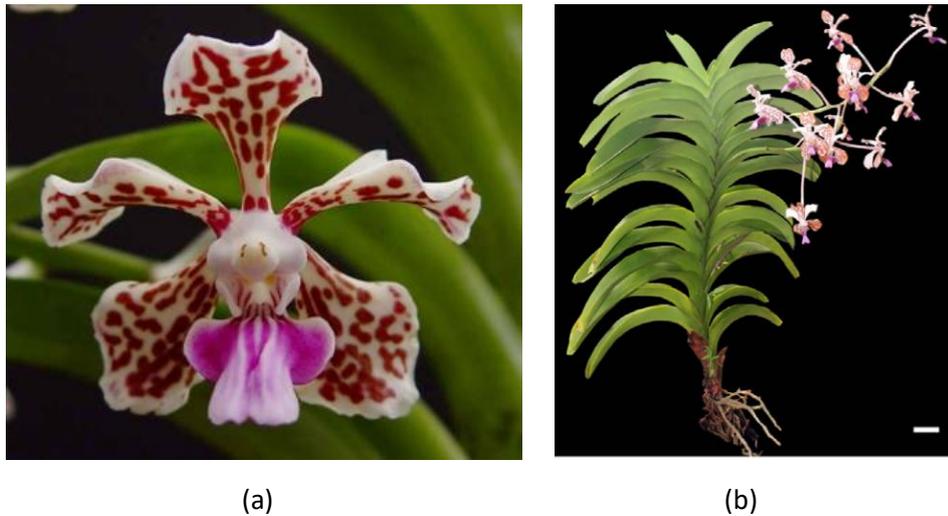
Anggrek *Vanda tricolor* merupakan genus anggrek yang termasuk dalam kelompok *vandaceous* dan merupakan anggrek endemik lereng Gunung Merapi yang terletak diantara Daerah Istimewa Yogyakarta dan Jawa Tengah (Semiarti, 2018). *Vanda* memiliki penyebaran dari Asia sampai ke selatan Australia. Genus *Vanda* memiliki kurang lebih 40 spesies yang tersebar luas mulai dari daerah pegunungan sampai pantai (Widyastoety dkk., 2012).

Klasifikasi anggrek *Vanda tricolor* sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Division : Magnoliophyta
Class : Liliopsida
Order : Liliidae
Family : Orchidaceae
Genus : *Vanda*
Spesies : *Vanda tricolor* Hook.

(Cornquist, 1981).

Percabangan batang anggrek *Vanda* adalah monopodial yang mempunyai batang utama dengan pertumbuhan ke atas (Widyastoety dkk., 2012). Karakteristik *V. tricolor* adalah memiliki tipe akar lekat, bentuk batang lurus, ramping dan tidak berbentuk tabung (Kasutjianingati dan Firgiyanto, 2018). Daun *V. tricolor* berbentuk pita, ujung daunnya romping dan bertepi rata dengan lebar 3-4 cm dengan panjang daun mencapai 20-30 cm. Bunga anggrek *V. tricolor* berwarna putih dengan bintik berwarna merah kecoklatan, beraroma harum, berukuran kurang lebih 7 cm dan muncul di antara dua ketiak daun (Sukmawati, 2019).



Keterangan: (a) Bunga dan (b) Habitus

Gambar 2.1 Morfologi anggrek *Vanda tricolor* (Sumber: Orchidweb, 2021; Semiarti, 2015)

Anggrek *Vanda* memiliki beberapa jenis senyawa fitokimia seperti turunan bibenzil (gigantol), turunan fenantrena, senyawa fenolik, antosianin, alkaloid, steroid dan triterpenoid (Semiarti dkk., 2020). Salah satu spesies anggrek *Vanda* yang memiliki potensi sebagai bahan obat ialah *V. tricolor*, anggrek tersebut diketahui memiliki aroma yang berpotensi sebagai aroma terapi dan akarnya mengandung metabolit yang dapat digunakan sebagai obat antikanker (Semiarti dkk., 2020). Menurut Assagaf (2011) Anggrek *V. tricolor* mempunyai nama sinonim yaitu *Limodorum suaveolens* Reinw. ex Blume; *Vanda suaveolens* Blume; *Vanda tricolor* Hook; *Vanda tricolor* var *suavis* (Lindley) Rchb.f.

2.2 DNA Barcoding

Penggunaan sekuen DNA dapat menjadi alternatif dalam identifikasi spesies secara morfologi yang diketahui memiliki keterbatasan karakter dan cenderung dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Suparman, 2012). DNA *barcoding* adalah metode identifikasi spesies menggunakan potongan gen tertentu, metode tersebut bertujuan untuk mempercepat dan mempermudah proses identifikasi spesies. Penggunaan sekuen DNA sebagai penanda dalam identifikasi spesies telah banyak dilakukan oleh ahli taksonomi. Kelebihan penggunaan sekuen DNA

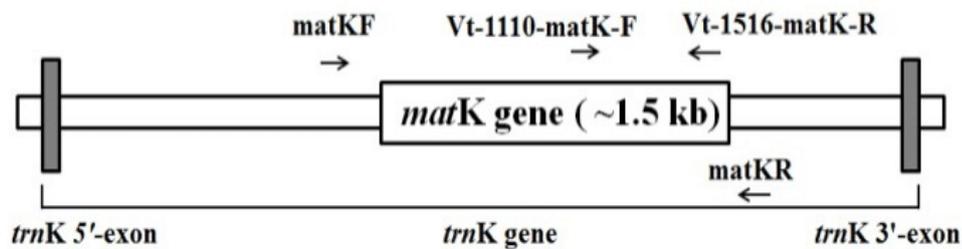
dalam identifikasi yaitu dapat memberikan data yang lebih akurat dan menghasilkan kekerabatan yang lebih alami. Sekuen DNA pada tumbuhan dapat diambil dari inti, kloroplas dan mitokondria (Suparman, 2012). Prinsip DNA barcoding adalah mengidentifikasi sekuen DNA pendek atau *barcode* DNA untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies melalui kontruksi pohon filogenetik (Sindiya dkk., 2018).

Marka molekuler berupa DNA dinilai lebih stabil sebagai penanda dalam identifikasi dan analisis taksonomi. DNA dapat menyediakan karakter yang lebih banyak dibandingkan karakter morfologi dan fisiologi. MakhluK hidup mempunyai banyak gen sehingga menyebabkan kesulitan untuk menganalisis kekerabatan dari satu atau lebih pada tingkat takson makhluK hidup. Gen spesifik dapat mencirikan jenis dan membedakan antara jenis satu dengan lainnya. Gen tersebut berfungsi sebagai kode sehingga dapat mengidentifikasi jenis tumbuhan dan menganalisis kekerabatan dari suatu genus (Suparman, 2012). Sekuen yang akan dijadikan DNA *barcoding* harus memenuhi beberapa kriteria yaitu memiliki sekuen DNA pendek sehingga dapat diekstraksi dan diamplifikasi dengan mudah, perbedaan dan variabilitas genetik pada tingkat spesies tinggi, dan dapat menggunakan primer universal dalam amplifikasi PCR (Zulfahmi, 2013). Beberapa gen yang dapat digunakan dalam DNA *barcoding* tanaman antara lain: *accD*, *matK*, *ndhJ*, *rpoB2*, *rpoC1*, *ycf5*, *rbcL*, *trnL intron*, *trnH-psbA* dan *internal transcribed spacer* (ITS) (Chase dkk., 2007; Kress dan Erickson, 2007).

2.3 Gen *maturase-K* (*matK*)

Gen *maturase-K* adalah salah satu penanda molekuler yang direkomendasikan oleh CBOL sebagai *Barcode* untuk DNA tanaman (Luke dkk., 2010). Gen *maturase-K* memiliki ukuran 1,5 kb dan merupakan gen kloroplas yang ditemukan di dalam intron *trnK* DNA kloroplas yang terletak diantara exon *trnK* (Gambar 2.2) (Kumar dkk., 2016). Gen *matK* mengkodekan maturase yang diperlukan untuk aktivitas kloroplas seperti fotosintesis. Wilayah gen *matK* diketahui memiliki tingkat substitusi yang cepat (Khew dan Chia, 2011). Gen

matK telah diusulkan sebagai *barcode* universal untuk tanaman berbunga (Mathew dan Ramesh, 2020).



Gambar 2.2 Representasi struktur gen *maturase-K* (*matK*)

(Sumber: Phoolcharoen dan Sukrong, 2013)

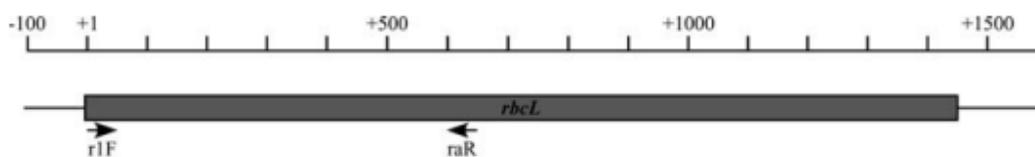
Gen *matK* berfungsi sebagai *splicing* pada intron tipe II. Kelebihan penggunaan gen *maturase-k* (*matK*) sebagai penanda DNA *barcode* ialah memiliki ukuran yang ideal yaitu sekitar 1500 bp, laju substitusi tinggi, memiliki proporsi yang besar pada tingkat asam nukleat dan memiliki rasio transisi atau transversasi yang rendah. Gen *matK* dapat menyelesaikan hubungan kekerabatan antar spesies dan mengidentifikasi sampai ke tingkat spesies (Kumar dkk., 2016)

2.4 Gen *riboluse-1.5-biphospate carboxylase* (*rbcL*)

Data keanekaragaman genetik yang banyak dipakai sebagai objek penelitian tanaman berasal dari DNA kloroplas (cpDNA), cpDNA memiliki rentang ukuran 85-2000 kb. Karakteristik cpDNA antara lain adalah memiliki genom berukuran kecil, laju substitusi rendah, tidak mengalami rekombinasi dan bersifat uniparental (Rahayu dan Jannah, 2019). Gen *rbcL* tersebar luas pada berbagai spesies tanaman sehingga dapat direkomendasikan sebagai DNA *barcode* (Basith, 2015). Informasi dari wilayah gen *rbcL* telah banyak tersedia di GenBank yakni lebih dari 10.000 urutan (Kumar dkk., 2016).

Gen *rbcL* memiliki ukuran ± 1400 bp dan mengkodekan ribulosa-1,5-bifosfat karboksilase oksigenase. Primer *rbcL* yang dapat digunakan untuk amplifikasi yaitu primer r1F dan raR (Gambar 2.3). Gen *rbcL* berperan dalam

mengkode protein RuBisCo sehingga sekuen gen tersebut memiliki tingkat mutasi yang rendah (Basith, 2015). Kelebihan penggunaan gen *rbcL* sebagai barcode adalah Mudah diamplifikasi dengan tingkat keberhasilan yang tinggi menggunakan satu atau 2 macam primer universal (CBOL, 2009). Penggunaan *barcode* standar *rbcL* dan *matK* pada tumbuhan mampu membedakan antar spesies sampai 92% (Bell dkk., 2017).

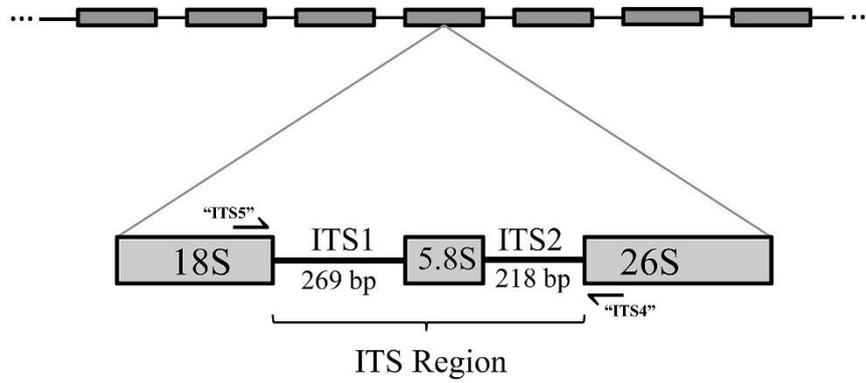


Gambar 2.3 Representasi struktur gen *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rbcL)*

(Sumber: Khew dan Chia, 2011).

2.5 Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

Internal transcribed spacer (ITS) adalah sekuen DNA inti sel yang telah banyak digunakan dalam ilmu sistematika dan filogenetik. Sekuen ITS dapat membedakan inter dan intra spesies serta hubungan kekerabatan dengan melihat perbedaan daerah *conserved* dan similaritas daerah variabel (Rahayu dan Jannah, 2019). Sekuen ITS memiliki ukuran sekitar 400 – 800 bp (Kumar dkk., 2016). ITS memiliki banyak salinan dalam genom inti dan memiliki derajat konservasi tinggi (Ekasari dkk., 2012). Daerah ITS pada tanaman eukariotik terdiri dari ITS1 dan ITS2 (Cheng dkk., 2016). ITS1 terletak diantara gen 5.8S dan 18S, sedangkan ITS2 terletak antara 5.8S dan 26S (Gambar 2.4) (Takamiya dkk., 2011). ITS2 merupakan lokus tunggal dan dapat menjadi penanda yang cocok untuk identifikasi dan klasifikasi taksonomi. ITS2 telah disarankan sebagai *barcode* yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi tanaman obat sebagai *barcode* universal (Han dkk., 2013). Keberhasilan ITS2 dalam mengidentifikasi sebesar 92,7% pada tingkat spesies dan 99,9% pada tingkat genus (Chen dkk., 2010).



Gambar 2.4 Representasi struktur Internal Transcribed Spacer (ITS)

(Sumber: Zhang dkk., 2015)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2021 sampai Februari 2022. Penelitian berlokasi di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Bologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

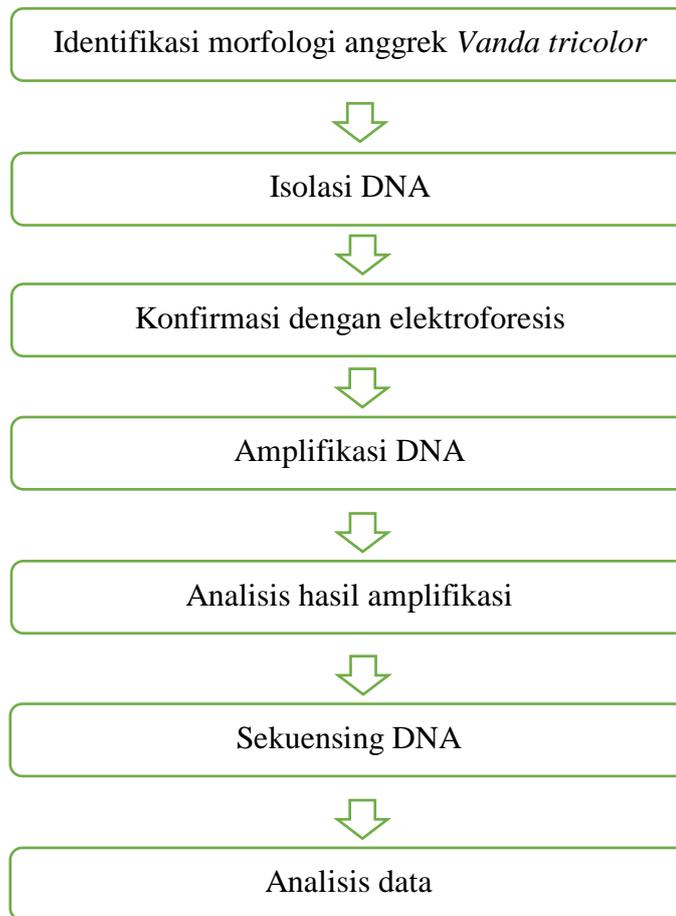
3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain gunting, neraca analitik, mortar, pistil, mikropipet, *yellow tip*, *blue tip*, *tube* 1.5 ml, vortex, *thermoshaker*, *centrifuge*, *PCR microtube*, mesin PCR, *beaker glass*, gelas ukur, tabung erlenmeyer, mesin elektroforesis, *UV-Transilluminator*, *stacker microtube*, dan desikator.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain daun anggrek *Vanda tricolor*, KIT GenEx™ Plant Sx (*buffer PL*, *buffer PP*, *buffer RE*), RNase, isopropanol, etanol 70%, PCR master mix, primer *maturase-K (matK)*, primer *ribulose-1,5-bisphospahte carboxylase (rbcL)*, primer *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*, *double distilled water (ddH₂O)*, *Ethidium Bromide*, *agarose*, akuades, *buffer* Tris Acetic-EDTA (TAE) dan DNA *marker* 100 bp plus.

3.3 Rancangan Penelitian

Alur penelitian yang dilakukan meliputi beberapa tahap, diantaranya adalah isolasi DNA dari sampel daun anggrek *Vanda tricolor* menggunakan metode KIT GenEx, amplifikasi DNA menggunakan PCR dengan primer *matK* (743F+R2), *rbcL* (R+F) dan ITS2 (DR2F+26SE), analisis DNA melalui visualisasi hasil elektroforesis menggunakan *UV-Transilluminator*, dan sekuensing DNA menggunakan jasa 1st BASE, Singapura 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 *Vanda tricolor* yang digunakan pada penelitian ini berasal dari kawasan Gunung Gunitir, Kabupaten Jember, Jawa Timur. Sampel yang diambil merupakan anggrek *V. tricolor* dewasa yang berukuran ± 45 cm dan telah memiliki kuncup bunga, selanjutnya diidentifikasi secara morfologi dengan beberapa sumber. Hasil penelusuran DNA barcode standar *V. tricolor* pada NCBI menunjukkan adanya *matK*, dan ITS2 sedangkan *barcode* standar *rbcL* belum tersedia.

3.4.2 Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom tanaman anggrek *V. tricolor* dilakukan dengan metode KIT GenEx. Tahapan isolasi DNA genom diawali dengan membersihkan daun anggrek *V. tricolor* dengan alkohol 70%. Daun ditimbang 0,1 gram kemudian ditambahkan 500 µl *buffer* PL dan 3 µl RNase, sampel digerus dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit dalam *thermoshaker*. Hasil inkubasi di vortex kemudian disentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu 27°C selama 1 menit. Dipindahkan 400 µl supernatan ke *tube* baru kemudian ditambahkan 140 µl *buffer* PP dan divortex selama 15 detik. Sampel diinkubasi pada suhu 4°C selama 5 menit kemudian di sentrifugasi kembali 10.000 rpm, suhu 27°C selama 5 menit 30 detik. Supernatan yang dihasilkan diambil sebanyak 400 µl dan ditambahkan 300 µl isopropanol. Sampel disentrifuge kembali pada 10.000 rpm, suhu 27°C selama 1 menit 30 detik. Supernatan dibuang dan pelet ditambahkan 300 µl etanol 70%, disentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu 27°C selama 1 menit 30 detik kemudian etanol dibuang dan sampel dikeringkan dengan *vaccum dry* selama 20 -30 menit. Tahapan terakhir adalah pelet ditambahkan 50 µl *buffer* RE dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 65°C. DNA genom dikonfirmasi melalui elektroforesis.

3.4.3 Elektroforesis Genom

Pelet genom yang berisi DNA dikonfirmasi melalui elektroforesis. Tahapan yang dilakukan adalah dengan membuat gel *agarose* 1.25%, sebanyak 0,625 gram agarose dilarutkan dalam 50 ml buffer TAE (*Tris Acetic-EDTA*) dan ditambahkan 1 µl *Ethidium Bromide*. Proses running Genom dilakukan dengan menuangkan 350 ml buffer diatas gel yang telah memadat. Sumuran pertama pada gel diisi dengan marker 1 Kb Plus DNA Ladder (Bioneer) sebanyak 5 µl, kemudian sumuran berikutnya diisi 5 µl genom dan 2 µl loading dye. Kondisi elektroforesis diatur dengan waktu 30 menit dan tegangan 100 volt. Tahap berikutnya adalah visualisasi gel menggunakan *UV-Transilluminator* dengan meletakkan gel di atas alat tersebut dan dilakukan observasi mengenai ada/tidaknya pita genom yang terbentuk.

3.4.4 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA diawali dengan pembuatan *cocktail* yang mereaksikan beberapa bahan yaitu 16 µl ddH₂O, 1 µl primer *forward*, 1 µl primer *reverse* dan 2 µl template DNA *V. tricolor*. Volume *cocktail* untuk satu reaksi adalah 20 µl. Sekuen primer *maturase-k (matK)*, *riboluse-1.5-biphosphate carboxylase (rbcL)* dan *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)* dapat dilihat pada Tabel 3.1. Proses amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR dengan pengaturan kondisi pada Tabel 3.2

Tabel 3.1 Sekuen Primer *maturase-K (matK)*, *riboluse-1.5-biphosphate carboxylase (rbcL)* dan *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*

Primer	Sekuen 5'-3'	Kode Forward /Reverse	Ukuran Produk (bp)
<i>matK</i>	CTTCTGGAGTCTTTCTTGAGC	743F	± 500
	CCCAATACAGTACAAAATTGAGC	R2	
<i>rbcL</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	F	± 600
	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	R	
ITS2	GGCTCTCGCATCGATGAAGA	DR2F	± 500
	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGTTAC	26SE	

Proses amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 35 siklus dengan kondisi sebagai berikut:

Tabel 3.2 Pengaturan Kondisi Proses Amplifikasi DNA

Kondisi	Suhu	Waktu	Siklus
<i>Pre Denaturation</i>	95°C	5 menit	1
<i>Denaturation</i>	95°C	30 detik	35
<i>Annealing</i>	55°C	30 detik	35
<i>Extension</i>	72°C	1 menit 30 detik	35
<i>Final Extension</i>	72°C	5 menit	1

3.4.5 Analisis Hasil Amplifikasi DNA

Hasil amplifikasi DNA dianalisis menggunakan mesin elektroforesis. Tahap pertama adalah membuat gel *agarose* 1.25%, sebanyak 0,625 gram *agarose* dilarutkan dalam 50 ml buffer TAE (*Tris Acetic-EDTA*) dan ditambahkan 1 μ l *Ethidium Bromide*. Alat elektroforesis disiapkan dengan memasang sumuran kemudian dituang gel *agarose* ke dalam cetakan dan ditunggu sampai memadat. Tahap selanjutnya adalah proses *running* elektroforesis DNA, sebanyak 350 ml *buffer* TAE dituang di atas gel. Sumuran pertama pada gel diisi dengan marker 100 bp Plus DNA Ladder (Bioneer) sebanyak 5 μ l, kemudian sumuran berikutnya ditambahkan larutan sampel hasil amplifikasi DNA sebanyak 10 μ l. Kondisi elektroforesis diatur dengan waktu 30 menit dan tegangan 100 volt. Tahap berikutnya adalah visualisasi gel menggunakan *UV-Transilluminator* dengan meletakkan gel di atas alat tersebut dan dilakukan observasi mengenai ada/tidaknya pita DNA yang terbentuk. Pita DNA yang terbentuk kemudian dianalisis dengan membandingkan ukuran panjang pita DNA yang terbentuk dengan panjang pada marker 100 bp Plus DNA Ladder (Bioneer).

3.4.6 Sekuensing DNA

Sampel DNA *V. tricolor* dilakukan amplifikasi ulang dengan mesin PCR menggunakan primer *matK*, *rbcL* dan ITS2 untuk mendapatkan total volume sebanyak 25 μ l. Hasil PCR yang telah didapatkan dipindahkan ke tube baru untuk sekuensing. Sampel dilakukan sekuensing melalui jasa 1st BASE, Singapura. Data hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan *software Bioedit*.

3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan aplikasi Bioedit, ClustalX 2.1 dan MEGA. Hasil sekuensing diedit menggunakan *software* Bioedit (Hall, 2011), kemudian sekuen tersebut dimasukkan ke dalam *The Basic Local Alignment Search Information* (www.ncbi.nlm.gov). Analisis filogenetik spesies *V. tricolor*

dilakukan dengan mensejajarkan urutan sekuen pada setiap wilayah dengan aplikasi ClustalX 2.1 (Jeanmougin dkk., 1998) dan selanjutnya dilakukan konstruksi pohon filogenetik menggunakan *software* MEGA X (Kumar dkk., 2018).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Morfologi *Vanda tricolor*

Identifikasi morfologi *Vanda tricolor* dalam penelitian ini menggunakan beberapa sumber referensi. Berdasarkan hasil pengamatan, anggrek *V. tricolor* merupakan anggrek epifit dan monopodial (Gambar 4.1a). *V. tricolor* memiliki akar tunggang dan berwarna coklat. Batang *V. tricolor* berkayu, berbentuk bulat, lurus, ramping dengan panjang batang ± 30 cm dan diameter batang $\pm 2,2$ cm. Tangkai bunga keluar dari sisi batang (Gambar 4.1b). Daun anggrek *V. tricolor* berwarna hijau, memiliki panjang ± 20 cm dan lebar ± 3 cm, berbentuk pita (*ligulate*), tepi daun rata (*integer*) dengan ujung romping (Gambar 4.1c).



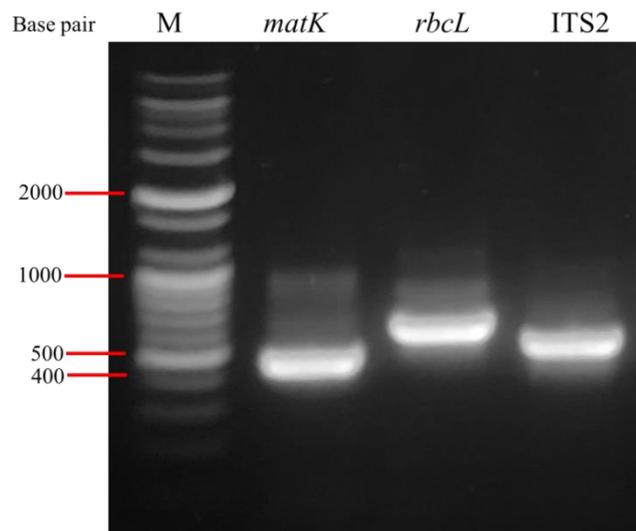
Keterangan: (a) Habitus, (b) Batang, (c) Daun, (d) Bunga, keterangan: sepal (S), P (petal), SI (*side lobe*), MI (*middle lobe*), G (gynostesium)

Gambar 4.1 Morfologi Anggrek *Vanda tricolor* Hook.

Bunga *V. tricolor* adalah bunga majemuk berukuran ± 7 cm, berwarna dasar putih dengan bintik berwarna merah kecoklatan. Bunga tersebut memiliki aroma yang harum, susunan bunganya terdiri dari 3 sepal dan 2 petal yang memiliki bentuk seperti sendok. Sepal dan petal memiliki panjang ± 2 cm. Bunga *V. tricolor* memiliki gynostesium, keping samping (*side lobe*) dan keping tengah (*middle lobe*) (Gambar 4.1d). Labellum *V. tricolor* berwarna putih dan terdapat keping samping (*side lobe*) yang berukuran $\pm 6 \times 6$ mm. Keping tengah memiliki ukuran yang besar dengan tiga tonjolan (*ridge*) di tengah. Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa susunan bunga *V. tricolor* terdiri dari sepal, petal, gynostesium, keping samping (*side lobe*) dan keping tengah (*middle lobe*) (Sukmawati dkk., 2019).

4.2 Hasil Amplifikasi DNA Target

Amplifikasi DNA target dilakukan menggunakan tiga primer spesifik untuk gen *matK*, *rbcL*, dan ITS2. Pita DNA yang terbentuk dapat terlihat dengan baik dan jelas (Gambar 4.2). Pita yang terbentuk menggunakan primer *matK* terlihat jelas dan ukuran yang terbentuk (± 400 bp) telah sesuai dengan prediksi. Pita DNA yang terbentuk sesuai dengan pernyataan Kumar dkk. (2016) bahwa ukuran sekuen *matK* ± 500 bp. Pita DNA yang ditunjukkan pada hasil amplifikasi menggunakan primer *rbcL* terlihat jelas dan berukuran ± 600 bp, hal tersebut sesuai dengan pernyataan Kress dan Erickson (2007) bahwa sekuen *rbcL* berkisar antara 550-600 bp. Sekuen ITS2 yang dihasilkan terlihat jelas dan berukuran ± 500 bp, hal itu sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa penggunaan primer ITS2 dalam analisis PCR menghasilkan panjang ampikon $\pm 400 - 500$ bp (Takamiya dkk., 2011).



Keterangan: M (Marker 100 bp)

Gambar 4.2 Elektroforesis hasil analisis PCR menggunakan primer set *matK*, *rbcL* dan ITS2 pada angrek *Vanda tricolor*

4.3 Hasil Analisis BLAST

Hasil analisis BLAST *matK* menunjukkan bahwa sampel angrek *V. tricolor* memiliki homologi tertinggi dengan spesies homolognya yaitu *V. tricolor* (MT518856.1) asal USA. Nilai homologi didapatkan dari melihat nilai *Per. Ident* yang tertera pada tabel analisis BLAST (Tabel 4.1). Kemiripan sekuen yang dianalisis dengan data sekuen di NCBI dapat dilihat dari nilai *Per. Ident*, *Query Cover*, dan *E-value* (Tindi dkk., 2017). Nilai *Query cover* menunjukkan presentase kesamaan panjang nukleotida antara sekuen sampel *V. tricolor* dengan sekuen spesies lainnya pada *database Gen Bank* (Gaffar dan Sumarlin, 2020). Nilai *Query Cover* pada hasil BLAST *matK* sebesar 100% dengan nilai *Per. Ident* 100% dan *E-Value* 0.0.

Tabel 4.1 Hasil BLAST *Vanda tricolor* sekuen *matK*

Name	Accession Number	Per. Ident (%)	Query Cover (%)	E-value	Source
<i>Vanda tricolor</i>	MT518856.1	100	100	0.0	USA
<i>Vanda tricolor</i>	MT518855.1	100	100	0.0	USA
<i>Vanda ustii</i>	KC823026.1	100	100	0.0	Philippines

Hasil analisis BLAST sekuen *rbcL* *V. tricolor* menunjukkan kesamaan dengan *Vanda coerulea* (KX344633.1) asal India dengan nilai *Per. Ident* 98.91% (Tabel 4.2). Nilai tersebut menunjukkan bahwa sekuen *V. tricolor* dan sekuen yang berada pada NCBI memiliki kemiripan yang tinggi namun tidak identik. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa sekuen *rbcL* *V. tricolor* belum tersedia di database NCBI, sehingga hasil penelitian ini merupakan yang pertama dilakukan. Nilai *Query Cover* pada hasil BLAST sebesar 100% (Tabel 4.2) yang menunjukkan sekuen *V. tricolor* memiliki presentase kesamaan yang cukup tinggi dengan beberapa spesies homolog yang terdapat pada NCBI. *E-Value* bernilai 0 menunjukkan hasil pensejajaran yang signifikan. Semakin rendah *E-value* menandakan hasil pensejajaran semakin baik dan signifikan (Gaffar dan Sumarlin, 2020).

Tabel 4.2 Hasil BLAST *Vanda tricolor* sekuen *rbcL*

Name	Accession Number	Per. Ident (%)	Query Cover (%)	E-value	Source
<i>Vanda coerulea</i>	KX344633.1	98.91	100	0.0	India
<i>Vanda coerulea</i>	KX344587.1	98.91	100	0.0	India
<i>Vanda coerulea</i>	KX344582.1	98.90	100	0.0	India

Hasil analisis BLAST sekuen ITS2 dari *V. tricolor* menunjukkan homologi tertinggi dengan *V. tricolor* (EF670373.1) yang berasal dari Switzerland dengan nilai *Per. Ident* 98.91% (Tabel 4.3). Nilai tersebut menunjukkan kecocokan sekuen *V. tricolor* dengan sekuen yang berada di database, tingginya nilai *Per. Ident* mengindikasikan bahwa kedua spesies memiliki kekerabatan yang dekat atau berasal dari nenek moyang yang sama (Kasi dkk., 2019). Nilai *E-value* pada hasil BLAST adalah 0.0 yang menunjukkan bahwa kedua sekuen memiliki kemiripan yang tinggi (Gaffar dan Sumarlin, 2020). *E-value* bernilai 0 menunjukkan hasil pensejajaran signifikan (Gaffar dan Sumarlin, 2020). Nilai *E-value* pada hasil BLAST sekuen ITS2 menunjukkan nilai 0.0 yang bersifat signifikan.

Tabel 4.3 Hasil BLAST *Vanda tricolor* sekuen ITS2

Name	Accession Number	Per. Ident (%)	Query Cover (%)	E-Value	Source
<i>Vanda tricolor</i>	EF670373.1	93.71	100	0.0	Switzerland
<i>Vanda tricolor</i>	EF670375.1	93.49	100	0.0	Switzerland
<i>Vanda tricolor</i>	EF670374.1	93.49	100	0.0	Switzerland

4.4 Hasil Analisis Alignment dan Pohon Filogenetik

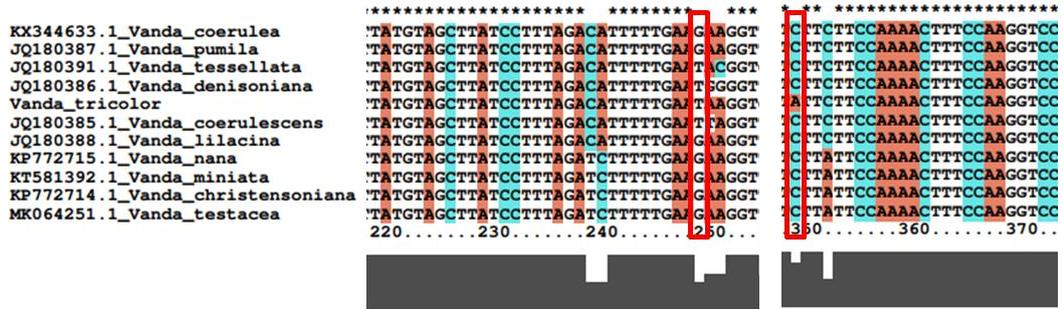
Proses *alignment* bertujuan untuk menyelaraskan dan menentukan tingkat homologi antar sekuen sehingga dapat dibandingkan (Wangiyana, 2016). Hasil *alignment* sekuen *matK* spesies *V. tricolor* menunjukkan adanya perbedaan basa nukleotida pada urutan basa ke-298 (Gambar 4.3). Hasil tersebut menunjukkan bahwa *matK* memiliki variasi intraspesifik yang rendah (Rembet dkk., 2016). Hasil *alignment* sekuen *rbcL* *V. tricolor* menunjukkan adanya beberapa perbedaan basa nukleotida yang tidak dimiliki oleh spesies lain (Gambar 4.4). Perbedaan tersebut terletak pada urutan basa ke-250 yaitu Timin (T) sedangkan sekuen lainnya adalah basa Guanin (G) dan urutan basa ke-350 yaitu Adenin (A) sedangkan sekuen lainnya Sitosin (C). Hasil tersebut menunjukkan sekuen *rbcL* dapat disejajarkan dengan mudah dan merupakan *barcode* yang baik untuk tanaman. Hasil pensejajaran ITS2 menunjukkan banyak perbedaan basa nukleotida pada beberapa urutan diantaranya yaitu basa Guanin (G) pada urutan ke-11, 58, 109, 166, 210, 314 basa Timin (T) pada urutan ke-25, 37, 71, 75, 167, 189, 291, 321, basa Adenin (A) pada urutan ke-49, 84 (Gambar 4.5). ITS2 merupakan sekuen yang memiliki laju evolusi tinggi sehingga dapat menimbulkan banyak perbedaan basa akibat proses evolusi (Cheng dkk., 2016).

```

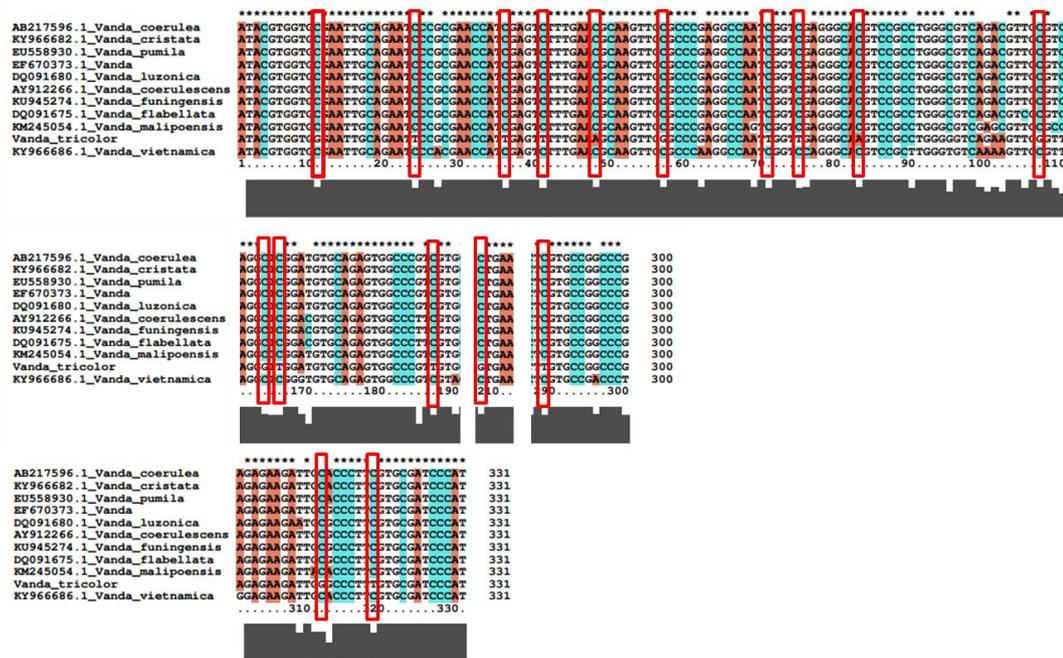
*****
KC822995.1_Vanda_limbata      TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
KC823004.1_Vanda_metusalae   TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
KC823005.1_Vanda_parviflora  TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
KC823011.1_Vanda_sanderiana  TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
KC822996.1_Vanda_lindenii    TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
KC823033.1_Vanda_curvifolia  TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
KC823013.1_Vanda_sumatrana   TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
KC823020.1_Vanda_testacea    TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
MT518856.1_Vanda_tricolor    TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
KC823026.1_Vanda_ustii      TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
Vanda_tricolor                TCTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACCTTTGG 300
260.....270.....280.....290.....300

```

Gambar 4.3 Hasil alignment DNA sampel *Vanda tricolor matK*



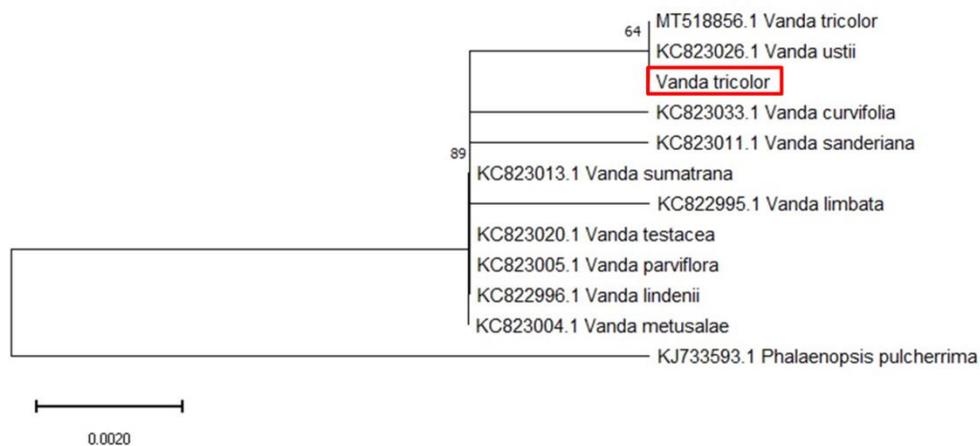
Gambar 4.4 Hasil alignment DNA sampel *Vanda tricolor* rbcL



Gambar 4.5 Hasil alignment DNA sampel *Vanda tricolor* ITS2

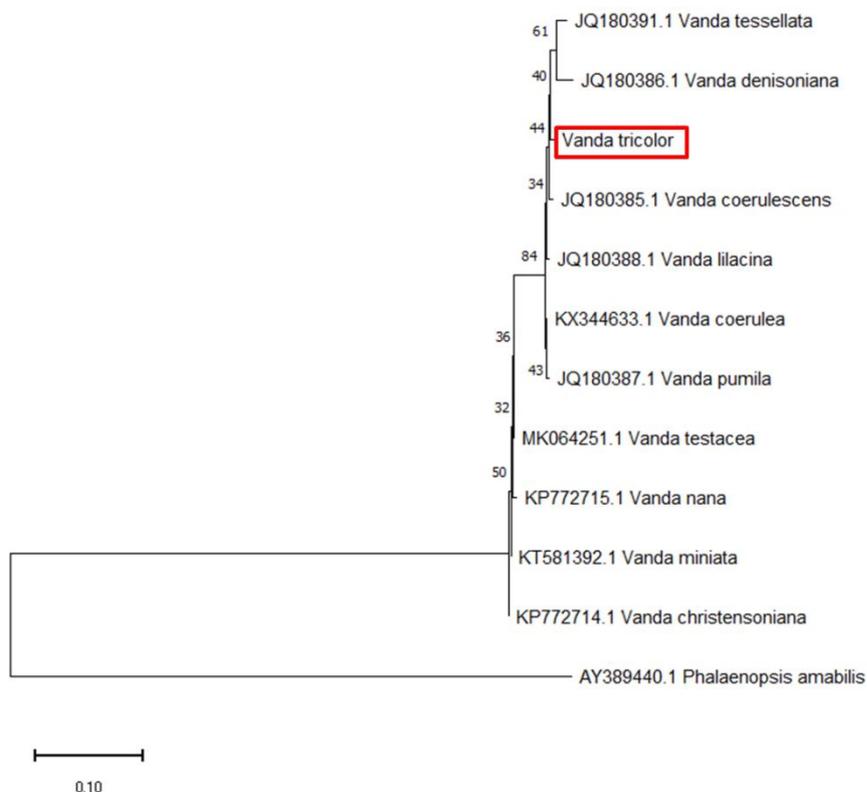
Analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) dan *bootstrap method* dengan *number of replication* 1000. Nilai bootstrap dapat dibagi menjadi beberapa kategori meliputi tinggi (>85%), moderat (70-85%), lemah (50-69%) atau sangat lemah (<50%) (Lestari dkk., 2018). Konstruksi filogenetik dilakukan dengan mengambil data sekuen pada *database* yang memiliki kemiripan paling tinggi dengan sampel. Hasil filogenetik akan menunjukkan letak sampel dan beberapa sekuen yang telah dikoleksi dari NCBI (Gaffar dkk., 2021). Analisis filogenetik dilakukan pada sampel *V. tricolor*, sepuluh spesies *in group* dan satu spesies *out group* menggunakan aplikasi MEGA11.

Hasil analisis filogenetik *matK* menunjukkan bahwa spesies *V. tricolor* berkerabat dengan *V. tricolor* asal USA dan *V. ustii* yang berasal dari Filipina dengan nilai *bootstrap* 64%, hal tersebut menunjukkan adanya rekonstruksi cabang dalam 1000 kali pengulangan (Gambar 4.6). Kesamaan pola genetik dan sifat biokimia yang dimiliki oleh suatu organisme mengartikan bahwa organisme tersebut berasal dari nenek moyang yang sama (monofiletik) (Hidayat dkk., 2008). Spesies *V. tricolor* dan *V. ustii* memiliki kekerabatan dekat karena berada dalam satu section yaitu *Deltoglossa* yang digolongkan berdasarkan persamaan bentuk column yang silindris dengan dasar yang tebal dan keduanya memiliki kemiripan pola genetik (Gardiner dkk., 2013). Kemiripan morfologi yang lain dari kedua spesies yaitu *V. tricolor* memiliki kemiripan dengan *V. ustii* yaitu daun yang berbentuk pita dan berdaging tebal, dan petal berbentuk seperti sendok. Perbedaan kedua spesies tersebut terletak pada corak bunganya, yang pada *V. tricolor* memiliki bunga berwarna dasar putih dengan bintik merah kecoklatan sedangkan *V. ustii* memiliki warna bunga krem muda kekuningan (Motes, 2016). *Phalenopsis pulcherrima* dipilih sebagai *out group* karena memiliki perbedaan morfologi dengan genus *Vanda* yang terletak pada bentuk daun dan bunga, pada *V. tricolor* daunnya berbentuk pita sedangkan *P. pulcherrima* berbentuk lanset. Perbedaan bunga terletak pada corak kedua spesies tersebut, *V. tricolor* memiliki corak bunga berwarna dasar putih dengan bintik merah kecoklatan sedangkan *P. pulcherrima* memiliki corak bunga berwarna ungu (Teoh, 2016). *Out group* yang dipilih membentuk percabangan yang berbeda dengan sampel.



Gambar 4.6 Konstruksi filogenetik sekuen *matK*

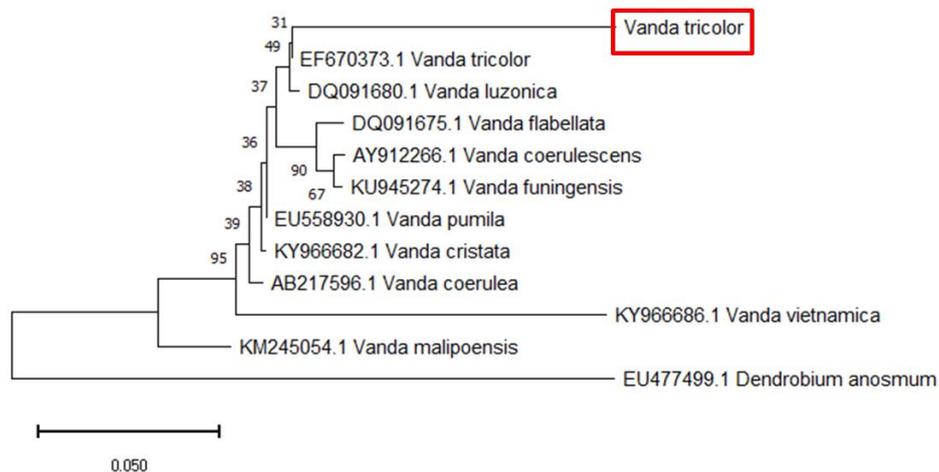
Hasil konstruksi filogenetik berdasarkan sekuen *rbcL* menunjukkan bahwa *V. tricolor* memiliki kekerabatan dengan *Vanda denisoniana* dengan nilai bootstrap sebesar 44% (Gambar 4.7). Karakteristik *V. denisoniana* diantaranya adalah batang tinggi mencapai ± 50 cm dengan diameter $\pm 1-1.5$ cm, daun berbentuk lonjong. Bunga berwarna putih gading atau merah kecoklatan berukuran 6-8 cm (Widyastoety, 2012). *Phalaenopsis amabilis* dipilih sebagai *outgroup* karena memiliki karakter morfologi yang berbeda dengan genus *Vanda*. Perbedaan tersebut terletak pada corak bunga dan daunnya. *P. amabilis* memiliki bunga berwarna putih dan memiliki ukuran besar dengan bentuk bunga yang lebar dan membulat pada bagian sepal dan dorsalnya, sedangkan *V. tricolor* memiliki bunga berwarna putih dengan bintik merah kecoklatan dan memiliki ukuran yang lebih kecil. Perbedaan lainnya terdapat pada bentuk daun kedua spesies tersebut, *V. tricolor* memiliki bentuk daun pita sedangkan *P. amabilis* memiliki bentuk daun lanset (Handini, 2016).



Gambar 4.7 Rekonstruksi filogenetik sekuen *rbcL*

Hasil rekonstruksi filogenetik berdasarkan sekuen ITS2 menunjukkan bahwa *V. tricolor* membentuk satu kluster dengan *V. tricolor* yang berasal dari Switzerland (Gambar 4.8) yang menunjukkan bahwa keduanya berkerabat dekat. Nilai bootstrap yang dihasilkan sebesar 31%, menunjukkan adanya rekonstruksi cabang dalam 1000 kali pengulangan. Nilai tersebut tergolong sangat lemah namun datanya dapat diterima karena nilai *bootstrap* >25%. Hal ini didasarkan pada nilai *bootstrap* menurut Pangestika dkk. (2015) bahwa nilai *bootstrap* yang tidak dapat dipercaya dan diterima adalah $\leq 25\%$. Pohon filogenetik yang terbentuk menunjukkan bahwa ITS2 dapat direkomendasikan sebagai penanda molekuler anggrek *V. tricolor*. *Outgroup* yang digunakan dalam analisis filogenetik adalah anggrek *Dendrobium anosmum* yang memiliki perbedaan ciri morfologi dengan anggrek *V. tricolor* sehingga dapat membentuk percabangan yang berbeda dengan sampel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa barcode ITS2

memiliki kemampuan pembeda yang lebih baik dalam mengidentifikasi sampel dalam penelitian ini. Kecepatan evolusi ITS2 berpengaruh pada variasi intraspesifik suatu spesies (Hidayat dkk., 2008).



Gambar 4.8 Rekonstruksi filogenetik sekuen ITS2

Analisis pohon filogenetik dapat dilakukan dengan melihat *bootstrap* dan jarak genetik pada setiap organisme. Jarak genetik menggunakan metode Kimura-2-Parameter pada MEGA 11. Jarak genetik dapat menunjukkan kekerabatan antar organisme, semakin kecil jarak genetik antar organisme, maka semakin dekat hubungan kekerabatannya (Irawan dkk., 2016). Nilai jarak genetik pada sekuen *matK* menunjukkan spesies *V. tricolor* sampel dan *V. tricolor* yang berasal dari *GenBank* memiliki jarak genetik 0.000 (Lampiran 5) yang menunjukkan bahwa keduanya merupakan spesies yang sama. Nilai jarak genetik pada sekuen *rbcL* menunjukkan spesies *V. tricolor* memiliki jarak genetik terkecil dengan spesies *V. coerulea* yaitu 0.0089, hal tersebut menunjukkan bahwa keduanya memiliki kekerabatan yang dekat dan kemungkinan merupakan subspecies. Jarak genetik pada sekuen ITS2 memiliki nilai 0.0891 pada spesies yang sama yaitu *V. tricolor* sampel dan *V. tricolor* yang berasal dari NCBI. Nilai tersebut menunjukkan bahwa kedua spesies memiliki kekerabatan yang dekat (Tallei dkk., 2016).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini yaitu sampel anggrek *Vanda tricolor* berhasil diamplifikasi menggunakan tiga set primer *matK*, *rbcL* dan ITS2. Hasil sekuen *matK*, *rbcL* dan ITS2 diperoleh *Query length* berturut-turut yaitu 408 bp, 317 bp dan 461 bp. Sekuen ITS2 yang digunakan pada anggrek *V. tricolor* bersifat spesifik dan dapat membedakan sampai ke tingkat spesies. Berdasarkan hal tersebut, sekuen *matK* dan ITS2 dapat digunakan sebagai penanda molekuler dalam menentukan *barcode* untuk identifikasi anggrek *V. tricolor*.

5.2 Saran

Saran berdasarkan penelitian ini adalah sekuen *V. tricolor* dengan primer *matK* dan ITS2 dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengkoleksi data sekuen *V. tricolor* yang tersebar di beberapa daerah. Sekuen *matK* dan ITS2 merupakan sekuen yang paling baik digunakan sebagai *barcode* untuk identifikasi anggrek *V. tricolor*. Informasi mengenai *barcode* potensial *rbcL* untuk identifikasi anggrek *V. tricolor* perlu dilakukan penelitian lebih lanjut supaya bisa disubmit ke dalam *database/GenBank*.

DAFTAR PUSTAKA

- Assagaf, M., H. 2011. *1001 Spesies anggrek yang dapat berbunga di Indonesia*. Jakarta: Kataelha.
- Bangol, I., L. I. Momuat, dan M. Kumaunang. 2014. Barcode DNA tumbuhan pangi (*Pangium edule* r.) berdasarkan gen matk. *Jurnal MIPA*. 3(2):119.
- Basith, A. 2015. Peluang Gen *rbcl* sebagai DNA barcode berbasis DNA kloroplas untuk mengungkap keanekaragaman genetik padi beras hitam (*Oryza Sativa* L.) lokal Indonesia. *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Enviromental, and Learning*. 2015. 938–941.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(31):12794–12797.
- 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(1):1–8.
- 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(1):138–149.
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press.
- Dwiyani, R., H. Yuswanti, I. S. Mercuriani, dan E. Semiarti. 2016. Transformasi gen pembungaan melalui *Agrobacterium tumefaciens* secara in-vitro pada tanaman anggrek *Vanda tricolor* . *Agrotrop : Journal on Agriculture Science*. 6(1):83–89.
- Ekasari, T. W. D., A. Retnoningsih, dan T. Widiarti. 2012. Analisis eanekaragaman kultivar pisang menggunakan penanda pcr-rflp pada Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA ribosom. *Jurnal MIPA*. 35(1):22–30.

- Gaffar, S. dan S. Sumarlin. 2020. Analisis sekuen mtDNA COI pari totol biru yang didaratkan di tempat pendaratan ikan kota tarakan. *Jurnal Harpodon Borneo*. 13(2):80–89
- Gaffar, S., S. Sumarlin, M. G. Haryono, dan H. Pidar. 2021. Penentuan jenis dan status konservasi pari layang-layang yang didaratkan di TPI gunung lingkas kota tarakan dengan pendekatan molekuler. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*. 9(1):80–87.
- Gardiner, L. M., A. Kocyan, M. Motes, D. L. Roberts, dan B. C. Emerson. 2013. Molecular phylogenetics of *Vanda* and related genera (*Orchidaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 173(4):549–572.
- Hall, T. 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2(1):60–61.
- Han, J., Y. Zhu, X. Chen, B. Liao, H. Yao, J. Song, S. Chen, dan F. Meng. 2013. The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the full-length ITS. *BioMed Research International*. 1–7.
- Handini, A. S., & Sukma, D. 2016. Analisis Keragaman Morfologi dan Biokimia pada Anggrek *Phalaenopsis* (*Orchidaceae*). *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*. 44(1): 62-67.
- Hartati, S., A. Budiyo, dan O. Cahyono. 2014. Studi eksplorasi dan karakterisasi anggrek secara morfologi dalam rangka pelestarian plasma nutfah. *Jurnal Ilmiah Agrinca*. 14(1):1–16.
- 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.
- Irawan, P. D., Tallei, T. E., dan Kolondam, B. J. 2016. Analisis sekuens dan filogenetik beberapa tumbuhan *Syzygium* (*Myrtaceae*) di Sulawesi Utara berdasarkan gen matK. *Jurnal Ilmiah Sains*. 16(2): 43-50.

- Jeanmougin, F., J. D. Thompson, M. Gouy, D. G. Higgins, dan T. J. Gibson. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*. 23(10):403–405.
- Kasi, P. D., A. Ariandi, dan E. P. Tenriawaru. 2019. Identifikasi bakteri asam laktat dari limbah cair sagu dengan gen 16s rrna. *Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA: A Scientific Journal*. 36(1):35–40.
- Kasutjianingati, K. dan R. Firgiyanto. 2018. Characterization of morphology from orchid *Vanda* Sp. as a genetic information source for preservation and agribusiness of orchids in Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 207(1). IOP Publishing.
- Khew, G. S. W. dan T. F. Chia. 2011. Parentage determination of *Vanda miss joaquim* (*Orchidaceae*) through two chloroplast genes *rbcL* and *matK*. *AoB PLANTS*. 11(1):1–12.
- 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 *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*. 2(6):1–10.
- Kumar, R., P. Mahadani, R. Kishore, A. Loyanganba, dan M. D. R. Singh. 2016. *DNA Barcoding of Indian Orchids*. Technical Buletin.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, dan K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6):1547–1549.
- Kusmana, C. dan A. Hikmat. 2015. Keanekaragaman hayati flora di indonesia. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam Dan Lingkungan*. 5(2):187–198.
- 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. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*. 3(1):1–7.
- Mathew, D. dan G. A. Ramesh. 2020. A universal system for *matK* gene based diagnostic markers to identify the species in cucurbitaceae. *Indian Journal of*

Horticulture. 77(4):733–735.

Motes, M. 2016. The genus *Vanda* (orchidaceae: aeridinae) in the philipines: two new species and a key to the species in the archipelago. *Lankesteriana*. 16(3):335–343.

Pangestika, Y., A. Budiharjo, dan H. P. Kusumaningrum. 2015. Analisis filogenetik *Curcuma zedoaria* (temu putih) berdasarkan gen Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Biologi*. 4(4):8–13.

Phoolcharoen, W. dan S. Sukrong. 2013. Molecular analysis of vitex species using candidate DNA barcoding and pcr-rflp of the matK gene for authentication of vitex glabrata. *Natural Product Communications*. 8(1):125–128.

Putra, R. P. 2021. Identifikasi jenis tanaman anggrek melalui tekstur bunga dengan tapis gabor dan m-svm. *JOINTECS (Journal of Information Technology and Computer Science)*. 6(1):29-34.

Rahayu, D. A. dan M. Jannah. 2019. *DNA Barcode Hewan Dan Tumbuhan Indonesia*. Jakarta: OSF.

Rembet, R., J. J. Pelealu, B. J. Kolondam, T. E. Tallei, J. Biologi, F. Universitas, dan S. Ratulangi. 2016. Analisis sekuens gen matk sansevieria trifasciata var. laurentii dan var. hahnii. *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*. 5(2):99–106.

Rupawan, M. I., Z. Basri, dan M. Busatmi. 2014. Pertumbuhan anggrek *Vanda* (*Vanda* sp.) pada berbagai komposisi media secara in vitro. *Jurnal Agrotekbis* . 2(5):488–494.

Semiarti, E. 2015. Karakterisasi gen ketahanan terhadap suhu tinggi hsp70 pada anggrek vanda tricolor var. suavis forma merapi characterization of high temperature resistance gene (hsp70) of vanda tricolor var. suavis forma merapi orchids. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. 1(3):404–408.

Semiarti, E. 2018. Orchid Biotechnology for Indonesian Orchids Conservation and Industry . *AIP Conference Proceedings*. 1744. 2018. 1–5.

- Semiarti, E., A. Purwanto, dan I. Puspita Sari. 2020. *Biotechnology Approaches on Characterization, Mass Propagation, and Breeding of Indonesian Orchids Dendrobium Lineale (Rolfe.) and Vanda Tricolor (Lindl.) with Its Phytochemistry*. Dalam *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture*.
- Sindiya, V., L. Mukarramah, S. Rohimah, D. A. G. Perwitasari, dan M. Su'udi. 2018. Studi in silico potensi dna barcode pada anggrek langka paphiopedilum. *BIOSFER : Jurnal Biologi Dan Pendidikan Biologi*. 3(1):2549–0486.
- Suparman. 2012. Markah molekuler dalam identifikasi dan analisi kekerabatan tumbuhan serta implikasinya bagi mata kuliah. *Jurnal Bioedukasi*. 1(1):59–68.
- Takamiya, T., P. Wongsawad, N. Tajima, N. Shioda, J. F. Lu, C. L. Wen, J. Bin Wu, T. Handa, H. Iijima, S. Kitanaka, dan T. Yukawa. 2011. Identification of *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer sequence. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 34(5):779–782.
- Tallei, T.E., Rembet, R.E., Pelealu, J.J., dan Kolondam, B.J. 2016. Sequence Variation and Phylogenetic Analysis of *Sansevieria trifasciata* (Asparagaceae). *Bioscience Research*. 13(1): 01-07.
- Teoh, E. S. 2016. *Medicinal Orchids of Asia*. Switzerland: International Publishing AG.
- Tindi, M., Mamangkey, N. G. F., & Wullur, S. 2017. The DNA barcode and molecular phylogenetic analysis several Bivalve species from North Sulawesi Waters based on COI gene. *J. Pesisir dan Laut Trop*. 1(2): 32-38.
- Wahyudiningsih, T. S., Y. A. Nion, dan Pahawang. 2017. Pemanfaatan anggrek spesies kalimantan tengah berbasis kearifan lokal yang berpotensi sebagai bahan obat herbal . *Jurnal Biodjati*. 2(2):149–158.
- Wangiyana, I. G. A. S. 2016. Molecular phylogenetic analyze of fusarium from agarwood and others fusarium with different type of nutrition based on gen its 1. *Jurnal Sangkareang Mataram*. 2(1):1–5.

- Widyastoety, D., A. Santi, B. Penelitian, dan T. Hias. 2012. Keunggulan Kelompok Anggrek Vanda Dalam Meningkatkan Variasi Dan Kualitas Anggrek Bunga Potong. *Prosiding Seminar Nasional Anggrek*. 2012. 117–128.
- Zhang, W., Y. Yuan, S. Yang, J. Huang, dan L. Huang. 2015. ITS2 secondary structure improves discrimination between medicinal “mu tong” species when using dna barcoding. *PLOS ONE*. 10(7):1–13.
- Zulfahmi. 2013. Penanda DNA untuk analisis genetik tanaman. *Jurnal Agroteknologi*. 3(2):41–52.

LAMPIRAN

1. Sekuen consensus *matK*, *rbcL* dan ITS2 pada anggrek *V. tricolor* dalam bentuk FASTA

>matK (408 bp)

```
AGCGAACACATTTTTATGGAAAAATAGAATATATTAGAGTCGTGTCTTGTAATTCITTTTCAG
AGGATCCTATGGTTCCTCAAAGATATTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGGAAAAGCGAT
TCTGGCTTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAATAAATGGAAATTTTCATTTTGTGAATTTTTG
GCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCATATAAAGCAATTACCCAATTA
TTCCTTCTCTTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAACTCTTTGGTAGTAAGAAATCA
AATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAAATACTCTGACTAAGAAATTAGATACCATAGCTCCAG
TTATTTTCTTATTGGATCATTGTTCGAAAGCTC
```

>rbcL (548 bp)

```
CAGAGACTAAAGCAAGTGTTGGATTTCAAGCTGGTGTAAAGATTACAAATTGACTTATTA
GACTCCTGATTACGAAACCAAAGAGACTGAGATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCCCTCAA
CCGGGAGTCCGCCTGAAGAAGCGGGGGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACA
TGGACAACGTGTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTGACAAAGGACGATGCTACC
ACATCGAGGGCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAAGAGATTGCTTATGTAGCTTATCCTTTAGA
CATTTTTGAATAAGGTGAGGTTACTAACATGTTGACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT
TCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTTATTCTTCCAAAACCT
TCCAAGGTCCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCC
CCTATTGGGATGTACTIONTCAACCAAAAATTGCGATTATCCGCAAAAAACTACGGTAGA
```

>ITS2 (461 bp)

```
GATACGTGGTGGGAATTGCAGAATTCGCGAACCATTGAGTTTTTAAAAGCAAGTTGGGCC
CGAGGCCAATTGGTTGAGGGCAAGTCCGCCTGGGGGTCAGAAGTTGGGTTGGTCCGTGCC
AAGTTCCCGCCGCCCCCGTAGCGGGGGTGCCGGGGGAGGGTTGGATGTGCAGAGTGG
CCCGTTGTGCCCTCGGTGCGGCGGGGTGAAGAGCGGGTTGTCATTTTCATTGGCCACGAAC
AACGAGGGGTGGATGAAAGCTGCCGCGGGCAAGGCCCGCGTTGTTTTGTGCCGGCCCCGAG
AGAAGATTGGGCCCTTTGTGCGATCCCATCCCATGGGCCCGCCGCGCGGGCGGCTTGA
ACGCGACCCAGGATGGGCGAGACCCCGCCGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
GAAGAACTTACGAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAA
```

2. Hasil BLAST sekuen *matK* *Vanda tricolor* dan *Vanda ustii*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
754 bits(408)	0.0	408/408(100%)	0/408(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGCGAACACATTTTTATGGAAAAATAGAATATATTAGAGTCGTGTCTTGTAAATCTTTTC	60		
Sbjct 336	AGCGAACACATTTTTATGGAAAAATAGAATATATTAGAGTCGTGTCTTGTAAATCTTTTC	395		
Query 61	AGAGGATCCTATGGTTCTCAAAGATATTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGGAAAAG	120		
Sbjct 396	AGAGGATCCTATGGTTCTCAAAGATATTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGGAAAAG	455		
Query 121	CGATTCTGGCTTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAATAAATGGAAATTTTCATTTTGTGA	180		
Sbjct 456	CGATTCTGGCTTCAAAGGAACTCTTATTCTGATGAATAAATGGAAATTTTCATTTTGTGA	515		
Query 181	ATTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCATATAAAGCAAT	240		
Sbjct 516	ATTTTTGGCAATCTTATTTTCACTTTTGGTTTCAACCTTATAGGATCCATATAAAGCAAT	575		
Query 241	TACCAATTATTCCTTCTTTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAATCTTTTGG	300		
Sbjct 576	TACCAATTATTCCTTCTTTTTCTGGGATATTTTCAAGTGTACTAAAAAATCTTTTGG	635		
Query 301	TAGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATACTCTGACTAAGAAATAG	360		
Sbjct 636	TAGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATACTCTGACTAAGAAATAG	695		
Query 361	ATACCATAGCTCCAGTTATTTTTCTATTGGATCATTGTCGAAAAGCTC	408		
Sbjct 696	ATACCATAGCTCCAGTTATTTTTCTATTGGATCATTGTCGAAAAGCTC	743		

3. Hasil BLAST sekuen *rbcL* *Vanda tricolor* dan *Vanda coerulea*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
979 bits(530)	0.0	542/548(99%)	0/548(0%)	Plus/Plus
Query 1	CAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTTCAAGCTGGTGTAAAGATTACAAATTGACTTATT	60		
Sbjct 1	CAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTTCAAGCTGGTGTAAAGATTACAAATTGACTTATT	60		
Query 61	AAGTCTCCGATTACGAAACCAAAGAGACTGAGATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCCCTC	120		
Sbjct 61	AAGTCTCCGATTACGAAACCAAAGAGACTGAGATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCCCTC	120		
Query 121	AACCGGGAGTTCGCCTGAAGAAGCGGGGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTA	180		
Sbjct 121	AACCGGGAGTTCGCCTGAAGAAGCGGGGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTA	180		
Query 181	CATGGACAACGTGTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTGACAAGGACGATGCT	240		
Sbjct 181	CATGGACAACGTGTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTGACAAGGACGATGCT	240		
Query 241	ACCACATCGAGGGCGTGTGGGGAGGAAAATCAAGAGATTGCTTATGTAGCTTATCCTT	300		
Sbjct 241	ACCACATCGAGGGCGTGTGGGGAGGAAAATCAAGAGATTGCTTATGTAGCTTATCCTT	300		
Query 301	TAGACATTTTGAATTAAGGTGAGTGTACTAACATGTTGACTTCCATTGTGGTAATGTAT	360		
Sbjct 301	TAGACATTTTGAATTAAGGTGAGTGTACTAACATGTTGACTTCCATTGTGGTAATGTAT	360		
Query 361	TTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGCTGGAAGATCTGCGAATCCCCCTTATTCTT	420		
Sbjct 361	TTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGCTGGAAGATCTGCGAATCCCCCTTATTCTT	420		
Query 421	CCAAAACTTTCAAAGGTCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAAAAGAGATAAATTGAACAAGT	480		
Sbjct 421	CCAAAACTTTCAAAGGTCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAAAAGAGATAAATTGAACAAGT	480		
Query 481	ATGGTCGTCCCTATTGGGATGTACTATTCAACCAAATTCGATTATCCGCAAAAAACT	540		
Sbjct 481	ATGGTCGTCCCTATTGGGATGTACTATTCAACCAAATTCGATTATCCGCAAAAAACT	540		
Query 541	ACGGTAGA	548		
Sbjct 541	ACGGTAGA	548		

4. Hasil BLAST sekuen ITS2 *Vanda tricolor* sampel dan *Vanda tricolor*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
691 bits(374)	0.0	432/461(94%)	0/461(0%)	Plus/Plus
Query 1	GATACGTGGTGGGAATTGCAGAATTC	CCGCGAACCATTCGAGTCTTTGAAAGCAAGTTGGGC	60	
Sbjct 447	GATACGTGGTGGGAATTGCAGAATTC	CCGCGAACCATTCGAGTCTTTGAAAGCAAGTTGGGC	506	
Query 61	CCGAGGCCAATTCGGTGGAGGGCAAG	STCCGCCTGGGGSTCAGAAAGTTGGGTTCCGTC	120	
Sbjct 507	CCGAGGCCAATTCGGTGGAGGGCAAG	STCCGCCTGGGGSTCAGAAAGTTGGGTTCCGTC	566	
Query 121	CAAGTCCCGCCGCCCCCGTAGCGGGG	TGCCGGGAGAGCTGGATGTGCAGAGTGG	180	
Sbjct 567	CAAGTCCCGCCGCCCCCGTAGCGGGG	TGCCGGGAGAGCTGGATGTGCAGAGTGG	626	
Query 181	CCCGTGTGCCCTTCGGTGCGGCGGG	CTGAAGAGCGGGTTGTCAATTCATTGGCCACGAA	240	
Sbjct 627	CCCGTGTGCCCTTCGGTGCGGCGGG	CTGAAGAGCGGGTTGTCAATTCATTGGCCACGAA	686	
Query 241	CAACGAGGGGTGGATGAAAGCTGCC	CGGGCAAGGCCCGCGTTGTTGTGCCGGCCCGA	300	
Sbjct 687	CAACGAGGGGTGGATGAAAGCTGCC	CGGGCAAGGCCCGCGTTGTTGTGCCGGCCCGA	746	
Query 301	GAGAAGATTGGGCCCTTGTGCGAT	TCCCATCCCATGTCGCCGCCGCGCGGGCGGCTTGG	360	
Sbjct 747	GAGAAGATTGGGCCCTTGTGCGAT	TCCCATCCCATGTCGCCGCCGCGCGGGCGGCTTGG	806	
Query 361	AACGCGACCCAGGATGGGCGAGACC	CCCCCGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG	420	
Sbjct 807	AACGCGACCCAGGATGGGCGAGACC	CCCCCGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG	866	
Query 421	AGAAGAAACTTACGAGGATCCCCT	AGTAGTAACGGCGAGCGAA 461		
Sbjct 867	AGAAGAAACTTACGAGGATCCCCT	AGTAGTAACGGCGAGCGAA 907		

5. Data Jarak Genetik *Vanda tricolor* sekuen *matK*

No	Nama Anggrek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>Vanda tricolor</i>												
2	MT518856.1_ <i>Vanda tricolor</i>	0.0000											
3	KC823026.1_ <i>Vanda ustii</i>	0.0000	0.0000										
4	KC823033.1_ <i>Vanda curvifolia</i>	0.0049	0.0049	0.0049									
5	KC823020.1_ <i>Vanda testacea</i>	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025								
6	KC823013.1_ <i>Vanda sumatrana</i>	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0000							
7	KC823011.1_ <i>Vanda sanderiana</i>	0.0049	0.0049	0.0049	0.0049	0.0025	0.0025						
8	KC823005.1_ <i>Vanda parviflora</i>	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0000	0.0000	0.0025					
9	KC822995.1_ <i>Vanda limbata</i>	0.0049	0.0049	0.0049	0.0049	0.0025	0.0025	0.0049	0.0025				
10	KC822996.1_ <i>Vanda lindenii</i>	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0000	0.0000	0.0025	0.0000	0.0025			
11	KC823004.1_ <i>Vanda metusalae</i>	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0000	0.0000	0.0025	0.0000	0.0025	0.0000		
12	KJ733593.1_ <i>Phalaenopsis pulcherrima</i>	0.0175	0.0175	0.0175	0.0175	0.0150	0.0150	0.0175	0.0150	0.0175	0.0150	0.0150	

6. Data Jarak Genetik *Vanda tricolor* sekuen *rbcL*

No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Vanda_tricolor												
2	KX344633.1_Vanda_coerulea	0.0089											
3	KP772715.1_Vanda_nana	0.0435	0.0341										
4	KT581392.1_Vanda_miniata	0.0388	0.0294	0.0044									
5	KP772714.1_Vanda_christensoniana	0.0412	0.0317	0.0067	0.0022								
6	JQ180391.1_Vanda_tessellata	0.0179	0.0224	0.0578	0.0530	0.0553							
7	JQ180388.1_Vanda_lilacina	0.0112	0.0067	0.0364	0.0318	0.0341	0.0247						
8	JQ180387.1_Vanda_pumila	0.0111	0.0044	0.0387	0.0340	0.0363	0.0247	0.0089					
9	MK064251.1_Vanda_testacea	0.0411	0.0317	0.0067	0.0022	0.0044	0.0506	0.0341	0.0363				
10	JQ180385.1_Vanda_coerulescens	0.0111	0.0111	0.0411	0.0364	0.0387	0.0202	0.0089	0.0134	0.0387			
11	JQ180386.1_Vanda_denisoniana	0.0293	0.0270	0.0626	0.0577	0.0601	0.0270	0.0316	0.0293	0.0554	0.0293		
12	AY389440.1_Phalaenopsis_amabilis	0.7873	0.7757	0.8075	0.8088	0.8027	0.8025	0.7886	0.7704	0.8088	0.7904	0.7851	

7. Data Jarak Genetik *Vanda tricolor* sekuen ITS2

No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Vanda_tricolor												
2	EF670373.1_Vanda_tricolor	0.0891											
3	AB217596.1_Vanda_coerulea	0.1070	0.0154										
4	AY912266.1_Vanda_coerulescens	0.1142	0.0216	0.0312									
5	EU558930.1_Vanda_pumila	0.0961	0.0061	0.0092	0.0216								
6	KM245054.1_Vanda_malipoensis	0.1429	0.0569	0.0538	0.0737	0.0504							
7	DQ091680.1_Vanda_luzonica	0.0928	0.0031	0.0185	0.0248	0.0092	0.0603						
8	DQ091675.1_Vanda_flabellata	0.1143	0.0216	0.0312	0.0122	0.0217	0.0670	0.0248					
9	KU945274.1_Vanda_funingensis	0.1142	0.0216	0.0249	0.0061	0.0216	0.0671	0.0248	0.0184				
10	KY966686.1_Vanda_vietnamica	0.1917	0.1193	0.1090	0.1379	0.1122	0.1417	0.1232	0.1380	0.1307			
11	KY966682.1_Vanda_cristata	0.0999	0.0092	0.0061	0.0248	0.0031	0.0538	0.0123	0.0249	0.0248	0.1161		
12	EU477499.1_Dendrobium_anosmum	0.3458	0.2416	0.2327	0.2567	0.2327	0.2273	0.2469	0.2476	0.2611	0.3332	0.2327	