



**DESAIN PRIMER *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS)
SEBAGAI DASAR IDENTIFIKASI MOLEKULER
ANGGREK OBAT *Dendrobium discolor* Lindl.**

SKRIPSI

Oleh:

Zakiyah Ramadany

NIM 161810401062

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

2020



**DESAIN PRIMER *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS)
SEBAGAI DASAR IDENTIFIKASI MOLEKULER
ANGGREK OBAT *Dendrobium discolor* Lindl.**

SKRIPSI

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

Oleh:

Zakiyah Ramadany

NIM 161810401062

**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. Ibu tercinta Isrowiyah, Bapak Muhammad Edy Susanto, Adik Muhammad Fahrur Rohman, dan Syafiqul Anwar, serta keluarga besar Anwar Bustomi yang telah memberikan do'a, dukungan moril, materi, kasih sayang, dan ilmunya selama ini.
2. Guru-guru TK Muslimat NU, SDN 2 Kendit, SDN 3 Patokan, SMPN 1 Situbondo, dan SMAN 1 Situbondo.
3. Dosen-dosen dan almamaterku Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

Bacalah dengan (menyebut) nama Tuhanmu yang menciptakan. Dia telah menciptakan manusia dari segumpal darah. Bacalah, dan Tuhanmulah Yang Maha-mulia. Yang mengajar (manusia) dengan pena. Dia mengajarkan manusia apa yang tidak diketahuinya.

(Terjemahan Surah *Al-Alaq*: 96 ayat 1-5)¹

Wahai orang-orang yang beriman! Apabila dikatakan kepadamu, “Berilah kelapangan di dalam majelis-majelis,” maka lapangkanlah, niscaya Allah akan memberi kelapangan untukmu. Dan apabila dikatakan, “Berdirilah kamu,” maka berdirilah, niscaya Allah akan mengangkat (derajat) orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu beberapa derajat. Dan Allah Maha-teliti apa yang kamu kerjakan.

(Terjemahan Surah *Al-Mujaadilah*: 58 ayat 11)¹

Apa yang diberikan Rasul kepadamu maka terimalah. Dan apa yang dilarangnya bagimu maka tinggalkanlah. Dan bertakwalah kepada Allah. Sungguh, Allah sangat keras hukuman-Nya.

(Terjemahan Surah *Al-Hasyr*: 59 ayat 7)¹

¹Departemen Agama Republik Indonesia. 2009. *Mushaf Al-Qur'an dan Terjemah*. Jakarta: Pustaka Al-Kautsar.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Zakiyah Ramadany

NIM : 161810401062

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Desain Primer *Internal Transcribed Spacer* (ITS) sebagai Dasar Identifikasi Molekuler Anggrek Obat *Dendrobium discolor* Lindl.” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek kelompok riset (KeRis) DNA SAKTI penelitian Prof. Bambang Sugiharto, M. Agr. Sc., Mukhamad Su’udi, Ph.D, dan Tri Ratnasari, S.Si., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian 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, 27 Juli 2020

Yang menyatakan,

Zakiyah Ramadany

NIM 161810401062

SKRIPSI

**DESAIN PRIMER *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS)
SEBAGAI DASAR IDENTIFIKASI MOLEKULER
ANGGREK OBAT *Dendrobium discolor* Lindl.**

Oleh:

Zakiyah Ramadany

NIM 161810401062

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Desain Primer *Internal Transcribed Spacer (ITS)* sebagai Dasar Identifikasi Molekuler Anggrek Obat *Dendrobium discolor* Lindl.” karya Zakiyah Ramadany 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.

Tri Ratnasari, S.Si., M.Si.

NRP. 760016788

NIP. 198509182019032011

Anggota II,

Anggota III,

Syubbanul Wathon, S.Si., M.Si.

Dra. Dwi Setyati, M.Si.

NIP. 199009062019031014

NIP. 196404171991032001

Mengesahkan,

Dekan,

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

NIP. 195910091986021001

RINGKASAN

Desain Primer *Internal Transcribed Spacer* (ITS) sebagai Dasar Identifikasi Molekuler Anggrek Obat *Dendrobium discolor* Lindl.; Zakiyah Ramadany, 161810401062; 2020: 54 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Perdagangan ilegal serta pemalsuan spesies anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. yang belum berbunga tidak dapat diidentifikasi secara autentik melalui identifikasi secara morfologi karena tumbuhan tidak memiliki organ yang lengkap. Identifikasi molekuler yaitu DNA *barcoding* ITS mulai diterapkan sebagai metode alternatif untuk identifikasi spesies anggrek. Namun, primer universal ITS yaitu 17SE dan 26SE yang mengkode keseluruhan wilayah ITS (ITS1-5.8S-ITS2) pada *Dendrobium discolor* Lindl. menghasilkan *amplicon* yang cukup panjang yaitu ± 900 bp. Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan menggunakan sebagian sekuen *barcode* ITS yaitu *mini barcode* berdasarkan sekuen ITS1 atau ITS2 saja. Oleh karena itu, primer ITS yang dapat menghasilkan fragmen pendek namun tetap memiliki fungsi *barcode* (*mini-barcode*) perlu didesain untuk identifikasi molekuler anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl.

Metode penelitian yang dilakukan melalui tahapan: koleksi sekuen, desain primer ITS1 dan ITS2, isolasi DNA genom anggrek *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke, amplifikasi DNA, analisis hasil elektroforesis, purifikasi DNA, DNA *sequencing*, dan analisis data. Analisis data dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan beberapa *software* meliputi: BLAST-NCBI, Primer-BLAST, BioEdit, Bioinformatics, NEB Tm *calculator*, ClustalX, Oligo Analyzer, dan Mega6. Identifikasi spesies dilakukan menggunakan BLAST-NCBI. Sepuluh spesies hasil BLAST pada NCBI dikoleksi kemudian sekuennya disejajarkan menggunakan ClustalX. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan metode *neighbour joining* dengan *bootstrap* 1000. Berdasarkan hubungan kekerabatan yang dianggap *plesiomorfik* dengan anggrek *Dendrobium*, spesies yang dipilih sebagai *outgroup* berasal dari genus *Calanthe*.

Primer desain untuk ITS1 diberi nama ITS_58F dan ITS_455R, sedangkan untuk ITS2 adalah ITS_344F dan ITS_836R. Panjang keempat primer ITS: 58F, 455R, 344F, dan 836R secara berturut-turut adalah 21, 20, 23, dan 21 basa. Kandungan GC pada sekuen primer secara berturut-turut adalah 47,6%; 45%; 47,8%; dan 50%. Suhu leleh dari keempat primer desain secara berturut-turut yaitu 55,1°C; 55,5°C; 57°C; dan 56,8°C. Hasil PCR menunjukkan bahwa Sekuen ITS1 dan ITS2 dari anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke dapat diamplifikasi secara optimal menggunakan pasangan primer ITS1 (58F-455R) dan ITS2 (344F-836R). Ukuran *amplicon* DNA yang dihasilkan sesuai dengan target yaitu ± 397 bp untuk ITS1 dan ± 492 bp untuk ITS2. Hasil *blast* sekuen ITS1 *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke menunjukkan homologi tertinggi dengan spesies *Dendrobium nindii* (AY239985.1) asal Australia (*per. ident* 96,58%), sedangkan hasil *blast* dari sekuen ITS2 menunjukkan homologi tertinggi dengan spesies *Dendrobium taurinum* (AB894142.1) asal Jepang (*per. ident* 98,57%). Hasil *blast* dan rekonstruksi pohon filogenetik dari sekuen ITS1 dan ITS2 *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke dengan spesies anggrek pada *genbank* NCBI menunjukkan kesesuaian satu sama lain. Sekuen ITS1 maupun ITS2 terbukti dapat digunakan dalam identifikasi molekuler anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke.

PRAKATA

Alhamdulillah, segala puji ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Desain Primer *Internal Transcribed Spacer* (ITS) sebagai Dasar Identifikasi Molekuler Anggrek Obat *Dendrobium discolor* Lindl.” 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 terima kasih kepada:

1. Ibu tercinta Isrowiyah, Bapak Muhammad Edy Susanto, Tante Anisatul Badriyah, Paman Imam Hariyoko, dan keluarga besar Anwar Bustomi yang telah memberikan dukungan moril maupun materi serta do'a yang tiada henti untuk kebaikan penulis;
2. Mukhamad Su'udi, Ph.D selaku dosen pembimbing utama dan Tri Ratnasari, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing anggota yang tulus dan ikhlas meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan berupa ilmu, kritik, saran, dan masukan dalam penulisan skripsi ini;
3. Syubbanul Wathon, 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. Purwatiningsih, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan S1;
5. Seluruh dosen pengajar biologi yang dengan sabar mengajarkan ilmu yang bermanfaat dan berguna dalam kehidupan dan pendidikan penulis;
6. Alumni DNAR: Siti Rohimah, S.Si., Dian Al Ghifari Perwitasari, S.Si., dan Vita Sindiya, S.Si. yang membantu dan memberikan bimbingan dalam penelitian ini;
7. Rekan-rekan kerja di laboratorium: Gita Ayu Khoirunnisa, Dyah Wulan Budiartini, Nada Nisrina Maulidya, dan Veren Yuliana S. yang senantiasa

memberikan motivasi, masukan, dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi;

8. Sahabat seperjuangan, Naomi Berthi Younindi yang selalu memberikan dukungan, motivasi, dan do'a, serta menemani penulis dalam suka duka empat tahun perjuangan meraih S.Si. Semoga penelitiannya lancar dan dapat segera menyelesaikan skripsinya;
9. Teman-teman seperjuangan Biologi 2016 "Banana" yang memberikan dukungan, motivasi, dan do'a untuk kebaikan penulis;
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Jember, 27 Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
MOTO.....	iv
PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING.....	vi
PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Keragaman <i>Dendrobium discolor</i> Lindl.....	4
2.2 DNA <i>Barcoding</i>.....	7
2.3 <i>Internal Transcribed Spacer (ITS)</i>.....	8
2.4 Desain Primer.....	10
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	14
3.2 Alat dan Bahan.....	14
3.3 Rancangan Penelitian.....	14
3.4 Prosedur Penelitian.....	15
3.4.1 Koleksi Sekuen dan Sampel.....	15
3.4.2 Desain Primer ITS.....	16

3.4.3	Isolasi DNA Genom <i>Dendrobium discolor</i> Lindl.....	17
3.4.4	Amplifikasi DNA Sekuen ITS.....	18
3.4.5	Visualisasi DNA Target Produk PCR.....	19
3.4.6	Purifikasi dan <i>Sequencing</i> DNA.....	19
3.5	Analisis Data	20
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1	Morfologi <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke	21
4.2	Uji Efektivitas Primer ITS <i>Dendrobium discolor</i> Lindl.	22
4.2.1	Karakteristik Primer ITS1 dan ITS2.....	22
4.2.2	Analisis Spesifikasi dan Efektivitas Primer ITS.....	29
4.2.3	Analisis Hasil <i>Sequencing</i> DNA.....	32
4.2.4	Analisis Molekuler <i>Mini Barcode</i> ITS1 dan ITS2.....	35
4.2.5	Analisis Pohon Filogenetik Molekuler.....	37
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	42
5.1	Kesimpulan	42
5.2	Saran	42
	DAFTAR PUSTAKA	43
	LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Koleksi data primer ITS untuk DNA <i>barcoding</i> anggrek.....	11
2.2 Parameter desain primer ITS.....	12
3.1 Kondisi PCR untuk amplifikasi DNA target dengan menggunakan primer ITS1 (58F-455R) dan ITS2 (344F-836R).....	18
4.1 Karakteristik primer ITS1 (58F-455R) dan ITS2 (344F-836R dan DR2-26SE).....	24
4.2 Prediksi struktur sekunder <i>loops</i> pada primer ITS1 (455R) dan ITS2 (836R).....	26
4.3 Prediksi struktur sekunder <i>self annealing</i> pada primer ITS1 (455R) dan ITS2 (344F dan 836R).....	27
4.4 Prediksi struktur <i>cross annealing</i> primer ITS1 (58F-455R).....	28
4.5 Prediksi struktur <i>cross annealing</i> primer ITS2 (344F-836R).....	29
4.6 Hasil <i>blast</i> sekuen ITS1 (58F-455R) <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke.....	32
4.7 Hasil <i>blast</i> sekuen ITS2 (DR2-26SE) <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke.....	34
4.8 Hasil <i>blast</i> sekuen ITS2 (344F-836R) <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke.....	34

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Morfologi anggrek <i>Dendrobium discolor</i> Lindl.....	5
2.2 Lokasi <i>internal transcribed spacer</i> (ITS).....	8
2.3 Lokasi primer pada nrDNA.....	12
3.1 Skema alur penelitian.....	15
4.1 Morfologi anggrek <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke, Papua...	22
4.2 Lokasi penempelan primer ITS pada lokus ITS.....	23
4.3 Visualisasi elektroforesis hasil PCR <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke.....	30
4.4 Visualisasi elektroforesis hasil PCR <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Tanimbar.....	31
4.5 Hasil <i>alignment</i> sekuen ITS1 (58F-455R) <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke.....	36
4.6 Hasil <i>alignment</i> sekuen ITS2 (DR2-26SE) <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke.....	36
4.7 Hasil <i>alignment</i> sekuen ITS2 (344F-836R) <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke.....	37
4.8 Pohon filogenetik molekuler dari sekuen ITS1 <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke.....	38
4.9 Pohon filogenetik molekuler dari sekuen ITS2 <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Merauke.....	39

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl atau lebih dikenal sebagai anggrek keriting, merupakan anggrek epifit yang tersebar di Maluku, Papua, Papua Nugini, Queensland, dan Sulawesi (Cribb, 1986). Pemanfaatan *Dendrobium discolor* Lindl. dalam pengobatan herbal telah dilakukan oleh suku Aborigin di Australia sebagai obat gosok untuk mengobati penyakit kurap (Teoh, 2016), pereda nyeri, dan disentri (Lawler dan Slaytor, 1970). Namun, studi lebih lanjut mengenai senyawa metabolit maupun molekuler dari *Dendrobium discolor* Lindl. belum banyak dilakukan. Selain itu, data DNA dari *Dendrobium discolor* Lindl. juga belum tersedia dalam *Genbank National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Perdagangan anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. sebagai tanaman hias maupun obat herbal di pasaran banyak yang berupa tanaman yang belum berbunga, batang kering, maupun batang segar (Teoh, 2016). Perdagangan ilegal serta pemalsuan spesies anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. varietas Merauke dengan Tanimbar sering ditemukan karena kedua spesies ini memiliki karakteristik morfologi vegetatif yang identik (Agustini dkk., 2013). Pemalsuan dan perdagangan ilegal spesies anggrek yang belum berbunga tersebut tidak dapat dibuktikan secara autentik melalui identifikasi secara morfologi dikarenakan tanaman umumnya tidak memiliki organ vegetatif dan generatif yang lengkap. Oleh karena itu, identifikasi molekuler secara cepat dan efisien perlu dilakukan sebagai solusi dari keterbatasan identifikasi secara morfologi.

Salah satu metode analisis molekuler yang banyak digunakan untuk identifikasi spesies anggrek obat adalah DNA *barcoding* (Yip dkk., 2007). DNA *barcoding* merupakan teknik identifikasi molekuler menggunakan sekuen DNA sebagai *barcode* untuk menunjukkan adanya karakteristik khas sekuen DNA suatu spesies anggrek (Gao dkk., 2019). *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) menjelaskan bahwa beberapa sekuen DNA kloroplas (*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, dan *atpF-atpH spacer*) dan *internal transcribed spacer* (ITS) dapat digunakan sebagai

barcode potensial dalam identifikasi molekuler tanaman menggunakan DNA *barcoding* (Feng dkk., 2015).

Penanda molekuler pada ITS secara luas telah diterapkan dalam otentikasi dan analisis filogenetik tanaman anggrek obat yang digunakan dalam pengobatan Cina (Fu dkk., 1999). Lokus ITS dimanfaatkan sebagai penanda molekuler dikarenakan sekuennya bersifat konservatif, universal, spesifik pada setiap spesies, dan dapat dengan mudah diamplifikasi menggunakan metode PCR yang kemudian dilakukan pengurutan nukleotida (*sequencing*) menggunakan primer (Baldwin dkk., 1995). Namun, DNA *barcoding* menggunakan keseluruhan lokus ITS (ITS1, 5.8S, ITS2) dalam identifikasi anggrek obat *Dendrobium* dianggap kurang efektif dan efisien dalam proses amplifikasi PCR dan *sequencing* (Chen dkk., 2010; Feng dkk., 2015). Hasil dari penelitian sebelumnya menggunakan primer universal untuk DNA *barcoding* tanaman darat yaitu 17SE dan 26SE (Sun dkk., 1994) yang mengkode keseluruhan wilayah ITS anggrek *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar menghasilkan panjang *amplicon* sebesar ± 900 bp (Perwitasari, 2019). Ukuran tersebut dianggap kurang efektif dan efisien serta menimbulkan beberapa permasalahan dalam proses *sequencing*.

DNA *mini-barcoding* menggunakan sekuen ITS1 atau ITS2 mulai dikembangkan sebagai metode turunan dari DNA *barcoding* yang dapat mengatasi permasalahan dalam menggunakan *full-length* ITS *barcode* (Hossain dkk., 2013; Shneyer dan Rodionov, 2019). Namun, identifikasi molekuler DNA *mini-barcoding* menggunakan sekuen pada ITS1 atau ITS2 memerlukan primer spesifik yang dirancang khusus agar dapat menghasilkan fragmen pendek. Desain primer ITS yang didesain ulang juga tetap memiliki fungsi *barcode* (*mini-barcode*) untuk mengidentifikasi spesies *Dendrobium discolor* Lindl. secara akurat dan efektif. Oleh karena itu, desain primer ITS1 dan ITS2 perlu dilakukan dalam penelitian ini sebagai dasar identifikasi molekuler anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. menggunakan metode DNA *barcoding*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah berdasarkan latar belakang tersebut yaitu apakah primer ITS yang didesain menghasilkan *amplicon* berukuran 300-500 bp dan dapat mengidentifikasi anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl.?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendesain primer ITS yang dapat menghasilkan *amplicon* berukuran 300-500 bp, namun tetap memiliki fungsi *barcode* untuk identifikasi anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl.

1.4 Manfaat

Manfaat dari hasil penelitian ini antara lain:

1. Primer ITS yang didesain dapat digunakan untuk identifikasi molekuler anggrek obat *Dendrobium*.
2. Hasil desain primer ITS dapat meningkatkan efisiensi dan spesifikasi dalam proses identifikasi molekuler *DNA barcoding* anggrek obat *Dendrobium*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Keragaman *Dendrobium discolor* Lindl.

Dendrobium discolor Lindl. lebih dikenal dengan nama *Golden Orchid* di Australia, *Moresby gold* di Papua Nugini, dan anggrek keriting di Indonesia (Kamemoto dkk., 1999). Distribusi anggrek *Dendrobium discolor* Lindl. meliputi wilayah Queensland di Australia, Papua Nugini, dan Indonesia (Sulawesi, Maluku dan Papua) (Ormerod, 2017). Spesies-spesies *Dendrobium discolor* Lindl. dapat digolongkan pada tingkat taksonomi di bawah tingkat spesies menjadi dua subspecies yaitu *Dendrobium discolor* subsp. *discolor* dan *Dendrobium discolor* subsp. *incurvata* Liddle & P.I.Forst. *Dendrobium discolor* subsp. *discolor* tersebar dari Sulawesi sampai Queensland, sedangkan subspecies *incurvata* hanya tersebar di Papua, Papua Nugini, dan Queensland.

Spesies *Dendrobium discolor* Lindl. di Queensland, Australia dapat digolongkan menjadi tiga varietas yaitu: *Dendrobium discolor* var. *fimbrilabium* (Rchb.f.) Dockrill, *Dendrobium discolor* var. *fuscum* (Fitzg.) Dockrill, dan *Dendrobium discolor broomfieldii* (Fitzg.) A.D.Hawkes (Govaerts, 2003). Spesies *Dendrobium discolor* Lindl. di Indonesia belum banyak diteliti dan hanya dikelompokkan berdasarkan habitatnya, yaitu *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke (Papua) dan *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar (Maluku). Klasifikasi *Dendrobium discolor* Lindl. menurut Dressler dan Dodson, (2000) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Orchidales
Famili	: Orchidaceae
Genus	: <i>Dendrobium</i>
Spesies	: <i>Dendrobium discolor</i> Lindl.

Dendrobium discolor Lindl. termasuk ke dalam *section Spatulata* dan memiliki enam nama sinonim yaitu: *Dendrobium undulatum* R.Br, *Dendrobium undulata* (R.Br) Kuntze, *Dendrobium undulans* Bakh.f., *Dendrobium arachnanthe* Kraenzl, *Dendrobium elobatum* Rupp, dan *Dendrobium fuscum* Fitzg (Agustini dkk., 2013). *Section* merupakan tingkatan klasifikasi pada anggrek setelah genus. *Section Spatulata* terdiri dari 50 spesies yang terdistribusi di Indonesia (Jawa, Sulawesi, Maluku, Papua), Filipina, Papua Nugini, Australia (Queensland), dan Kepulauan Pasifik. Spesies *Dendrobium* pada *section Spatulata* terdiri dari anggrek terestrial maupun epifit yang sering ditemukan tumbuh di bebatuan atau pepohonan tepi pantai (Cribb, 1986).

Dendrobium discolor Lindl. dapat tumbuh di dataran rendah, hutan bakau, tebing dan batu karang pada ketinggian 550 meter di atas permukaan laut dengan intensitas cahaya tinggi. Tinggi *Dendrobium discolor* Lindl. dapat mencapai 1,5 m. Panjang *pseudobulb* (umbi semu pada batang simpodial anggrek) *Dendrobium discolor* Lindl. bervariasi dari 0,5-5 cm dengan diameter 1-8 cm. Permukaan daunnya halus, berbentuk bulat telur dengan panjang 5-20 cm. Daun tersusun dalam dua jajaran sepanjang dua pertiga bagian distal batang. Bunga *Dendrobium discolor* Lindl. memiliki variasi warna kuning, kuning-kecokelatan dan cokelat. Sepal dan petal membentuk spiral dengan tepi bergelombang (Gambar 2.1). Lamanya waktu mekar bunga ± 2 bulan (Lindley, 1840; Indraloka dkk., 2019; Teoh, 2019).



Gambar 2.1 Morfologi anggrek *Dendrobium discolor* Lindl. (Sumber: Teoh, 2019)

Pemanfaatan *Dendrobium discolor* Lindl. dalam pengobatan telah diterapkan oleh suku Aborigin dari Australia untuk meredakan rasa nyeri, obat disentri, dan penyakit kurap (Lawler dan Slaytor, 1970). Suku Aborigin mengolah batang muda *Dendrobium discolor* Lindl. menjadi obat gosok untuk mengobati penyakit kurap dengan air rebusannya (Bulpitt, 2005; Teoh, 2016). Selain itu, *pulp* yang diekstraksi dari *pseudobulb* *Dendrobium discolor* Lindl. menggunakan palu dapat dijadikan obat gosok untuk mengobati bisul (Teoh, 2019). Penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa *pulp* dari spesies anggrek obat *Dendrobium* memiliki kandungan flavonoid yang memberikan efek antibakteri ringan, sehingga dapat digunakan untuk mengobati luka bakar ringan (Pearn, 2005). Salah satu contoh senyawa flavonoid pada anggrek obat *Dendrobium* adalah flavonoid C-glikosida. Senyawa flavonoid C-glikosida banyak ditemukan pada daun dan batang anggrek obat *Dendrobium* serta berperan sebagai antioksidan, antikanker, antitumor, hepatoprotektif, antivirus, antibakteri, antijamur, dll (Kong dkk., 2003).

Keanekaragaman warna bunga pada anggrek dipengaruhi oleh adanya interaksi antara gen yang berbeda. Masing-masing gen menentukan aktivitas enzim dalam suatu metabolisme. Senyawa antosianin dan pigmen warna akan terbentuk apabila masing-masing gen memiliki minimal satu alel dominan. Kandungan senyawa antosianin pada bunga juga dipengaruhi oleh adanya pigmen lain, ion logam, pH getah, serta posisi glikosilasi dan asilasi. Hal tersebut yang menyebabkan munculnya variasi warna bunga yang khas dari setiap spesies anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl yang dapat dijadikan acuan dalam identifikasi anggrek secara morfologi (Henuhili, 2009).

Catatan sejarah nomenklatur menunjukkan bahwa nama *Dendrobium discolor* telah diterapkan untuk spesies yang berbeda yang disebabkan karena adanya kesalahan dalam identifikasi spesies menggunakan metode konvensional. Kesalahan identifikasi spesies-spesies tersebut disebabkan oleh beberapa hal yaitu: banyaknya sinonim yang telah diusulkan oleh ahli botani yang bekerja pada flora regional yang tidak memiliki akses ke semua jenis anggrek dan yang memiliki pemahaman yang tidak lengkap tentang spesies terkait di wilayah geografis lainnya, penggunaan warna bunga tanpa mengacu pada morfologi bunga, serta

morfologi vegetatif taksa yang sangat mirip antar spesies (Dauncey dan Cribb, 1993). Identifikasi secara molekuler diharapkan dapat memberikan hasil yang akurat dan meminimalisir kesalahan identifikasi spesies *Dendrobium discolor* Lindl. Data sekuen DNA yang diperoleh dapat digunakan untuk melengkapi data genetik *Dendrobium discolor* Lindl. yang masih belum terdaftar dalam *genbank*.

2.2 DNA *Barcoding*

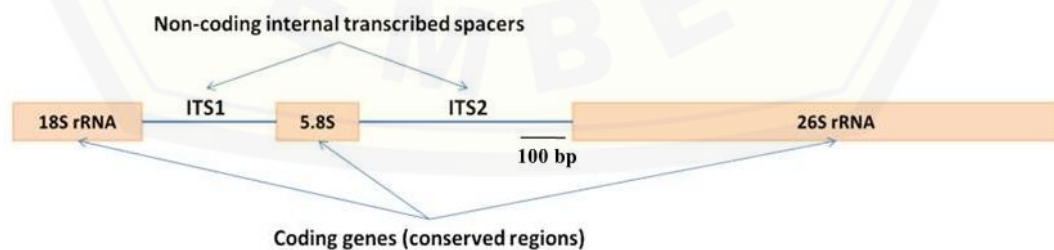
DNA *barcoding* adalah teknik identifikasi molekuler yang menggunakan sekuen DNA standar untuk memfasilitasi identifikasi spesies. Penelitian oleh Yao dkk., (2009) menunjukkan bahwa teknologi *barcode* DNA dapat memberikan identifikasi spesies yang cepat dan akurat menggunakan sekuen DNA standar. DNA *barcoding* juga dapat digunakan sebagai metode identifikasi molekuler yang dapat dimanfaatkan untuk mengidentifikasi bahan obat herbal untuk penggunaan herbal yang aman, kontrol kualitas, dan penyelidikan forensik. DNA *barcoding* telah diterapkan oleh banyak peneliti untuk identifikasi spesies obat herbal. Identifikasi bahan obat menggunakan pendekatan *barcode* DNA dapat melindungi konsumen dari keracunan tidak disengaja atau penipuan oleh pemasok yang tidak jujur. DNA *barcoding* juga dapat berfungsi sebagai metode forensik untuk membantu mendeteksi bahan herbal beracun dalam kasus yang mengancam jiwa (Li dkk., 2011).

Prinsip dasar DNA *barcoding* adalah identifikasi menggunakan *barcode* dan membandingkan urutan *barcode* yang tidak diketahui dengan pustaka sekuen *barcode* yang telah diketahui identitasnya. Apabila hasil perbandingan antara sekuen yang diteliti sesuai dengan pustaka, maka spesimen tersebut diidentifikasi sebagai spesimen dari pustaka. Jika tidak sesuai, maka dapat mengarah kepada sekuen baru untuk spesies baru (Hajibabaei dkk., 2007). Sekuen DNA yang diperoleh dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies yang kemudian dilakukan konstruksi pohon filogenetiknya (Rohimah dkk., 2018). *Barcode* DNA yang cocok harus memenuhi beberapa kriteria yaitu: bersifat universal (dapat diamplifikasi dan dilakukan *sequencing* pada seluruh spesies tanaman), tidak memiliki rantai sekuen berulang yang panjang (tidak rentan

mengalami mutasi), dan bersifat diskriminatif (dapat membedakan antar spesies secara spesifik) (Li dkk., 2011). Identifikasi molekuler anggrek menggunakan *barcode* DNA *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, ITS, *trnL-F*, *5S-rRNA*, dan *18S-rRNA* telah diteliti dan berhasil dalam mengidentifikasi tanaman anggrek obat (Mishra dkk., 2015). *Barcode* DNA berdasarkan lokus ITS (ITS1-5.8S-ITS2) yang lengkap dapat memberikan informasi diskriminatif yang memadai, tetapi meningkatkan ukuran fragmen DNA dapat secara signifikan mengurangi keberhasilan PCR. Ukuran *amplicon* berkorelasi negatif dengan keberhasilan PCR karena semakin panjang ukuran *amplicon*, maka semakin tinggi pula tingkat kesalahan yang akan terjadi selama proses amplifikasi DNA (Broquet dkk., 2006).

2.3 Internal Transcribed Spacer (ITS)

Internal transcribed spacer (ITS) merupakan DNA *non-coding* yang terletak di antara gen ribosom subunit kecil (18S rRNA) dan subunit besar (26S rRNA) dalam DNA ribosom inti (nrDNA). Lokus ITS1 dan ITS2 merupakan DNA *spacer* atau DNA *non coding* yang terletak di antara DNA *coding* (18S rRNA, 5.8S, dan 26S rRNA) (Gambar 2.2). Sebagian sekuen ITS1 dan ITS2 dari transkrip nrDNA diduga berfungsi dalam pematangan nrRNAs. Analisis mutasi *in vivo* yang dilakukan dalam penelitian Nues dkk., (1994) menunjukkan bahwa penghapusan sekuen tertentu dalam ITS1 dapat menghambat produksi rRNA subunit kecil. Penghapusan tertentu atau titik mutasi pada ITS2 dapat memperlambat pemrosesan rRNA subunit besar (Sande dkk., 1992).



Gambar 2.2 Lokasi *Internal Transcribed Spacer* (ITS) (Sumber: Vu dkk., 2017)

Kelebihan dari lokus ITS sebagai penanda molekuler yaitu mewarisi DNA maternal dan paternal (pewarisan biparental), bersifat universal, *low functional*

constraint (frekuensi terjadinya *mistranslation*, *misfolding*, atau *misinteractions* rendah), keseragaman intragenomik, dan variabilitas intergenomik (Álvarez dan Wendel, 2003). Lokus DNA ribosom inti (nrDNA) yang berbeda dapat digunakan untuk meneliti garis keturunan dengan berbagai tingkat divergensi (Campbell dkk., 2005), identifikasi spesies atau varietas (Lau dkk., 2001), hubungan filogenetik (Clements dkk., 2002), serta konservasi dan pengelolaan sumber daya genetik (Adams dkk., 2006). Sekuen ITS dari nrDNA telah terbukti bersifat konservatif dalam evolusinya. Hasil *sequencing* wilayah ITS pada tanaman dari beberapa literatur menunjukkan wilayah ITS sangat potensial sebagai sumber karakter DNA inti dalam rekonstruksi filogenetik antar spesies anggrek (Baldwin, 1992). Penanda molekuler ITS pada anggrek telah diterapkan untuk mengidentifikasi tanaman atau kultivar, pemilihan induk untuk pembibitan hibridisasi, konservasi sumber daya genetik dan analisis keanekaragaman genetik berbagai spesies anggrek (Huang dkk., 2010). Pembacaan sekuen pada lokus ITS1 dan ITS2, mengandung variasi yang cukup untuk membedakan *Dendrobium* pada tingkat interspesies (Xu dkk., 2006).

Baldwin dkk., (1995) menerbitkan artikel mengenai kegunaan data urutan ITS pada filogeni tanaman angiosperma. Soltis dkk., (1998) merangkum sebagian besar studi ITS beberapa tahun setelahnya. DNA *barcode* ITS telah diterapkan secara luas dalam otentikasi dan analisis filogenetik tanaman obat yang umum dimanfaatkan dalam pengobatan Cina (Ngan dkk., 1999). *Barcode* DNA ITS juga dapat digunakan dalam identifikasi bahan obat herbal, kontrol kualitas, dan penyelidikan forensik. (Li dkk., 2011; Takamiya dkk., 2011). Keragaman genetik pada sekuen ITS juga terbukti dapat mengidentifikasi hubungan filogenetik dari 12 spesies *Dendrobium* dengan varietas yang berbeda (Liu dkk., 2014). Berbagai penelitian mengenai sekuen ITS lainnya telah banyak dipublikasikan dan diaplikasikan dalam beberapa penelitian mengenai anggrek, termasuk anggrek obat. Penggunaan ITS sebagai penanda molekuler dalam teknik DNA *barcoding* terbukti dapat mengidentifikasi anggrek obat yang berada di dunia baik dalam sampel segar, herbarium, maupun yang terkandung pada produk herbal dalam pengobatan Cina.

2.4 Desain Primer

Molekul primer nukleotida (oligonukleotida) merupakan potongan pendek dari DNA untai tunggal yang komplementer dengan sekuen DNA target yang diperlukan dalam amplifikasi DNA menggunakan PCR. Primer berfungsi sebagai pengenalan sekuen DNA target dan penyedia gugus hidroksil (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan dalam tahapan pemanjangan sekuen DNA, sehingga menghasilkan *amplicon* yang diinginkan. Posisi primer di sepanjang untai DNA tunggal menunjukkan panjang total produk amplifikasi DNA yang akan dihasilkan (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

Desain primer bertujuan untuk mendapatkan spesifikasi dan efisiensi pada proses amplifikasi DNA. Spesifikasi didefinisikan sebagai kemampuan primer dalam menempel pada DNA target secara spesifik. Primer harus memiliki dua atau lebih ketidaksesuaian dengan sekuen DNA yang tidak diinginkan dalam lima basa terakhir di ujung 3'. Selain itu, sekuen dari pasangan primer harus memiliki minimal 6 nukleotida yang berbeda (*mismatch*) pada ujung 3' agar tidak terjadi ikatan antar sesama primer (Dieffenbach dkk., 1993). Primer yang memiliki tingkat spesifikasi yang rendah akan menghasilkan produk PCR dengan ukuran *amplicon* yang tidak sesuai dengan DNA target. Efisiensi dijelaskan sebagai kemampuan pasangan primer dalam amplifikasi DNA target secara baik dan tepat (dengan tidak membuang waktu, energi, dan biaya). Sekuen primer yang optimal dan konsentrasi primer yang tepat sangat penting untuk memaksimalkan spesifikasi dan efisiensi proses PCR maupun *sequencing* DNA (Abd-Elsalam, 2003).

Internal transcribed spacer pada tanaman secara umum terbukti sulit untuk diamplifikasi secara efisien dengan menggunakan primer 17SE dan 26SE (Sun dkk., 1994) yang telah umum digunakan dalam *DNA barcoding* ITS karena ukuran *amplicon* yang masih tergolong panjang (± 900 bp) (Gardes dan Bruns, 1993). Beberapa peneliti telah merancang primer spesifik yang didesain khusus untuk beberapa tanaman, termasuk spesies anggrek *Dendrobium* (Tabel 2.1). Yuan dkk., (2009) telah menggunakan sekuen ITS1 dan ITS2 untuk identifikasi anggrek obat *Dendrobium*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa

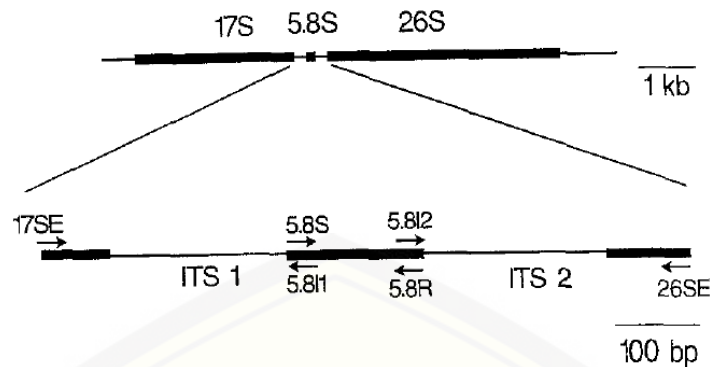
hubungan filogenetik yang diungkapkan oleh analisis DNA ITS parsial (ITS1 dan ITS2) mendukung data morfologi yang diterbitkan sebelumnya.

Tabel 2.1 Koleksi data primer ITS untuk DNA *barcoding* anggrek

No.	Sekuen	T _m (°C)	Kode Forward/ Reverse	Ukuran Produk	Referensi
1.	5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG-3'	65	17SE	800 bp	Williams dan Whitten, 1999
	5'-TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'	69	26SE		
2.	5'-CGTAACAAGGTTTCC-3'	45	IT1	730 bp	Tsai dkk., 2006
	5'-AGTTTCTTCTCCTCC-3'	45	IT2		
3.	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	54	ITS4	650 bp	Szalanski dkk., 2001
	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	53	ITS5		
4.	5'-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGT-3'	58	IT1	750 bp	Tsai dkk., 2004
	5'-GTAAGTTTCTTCTCCTCCGCT-3'	56	IT2		
5.	5'-ATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG-3'	62	P1	650 bp	Yuan dkk., 2009
	5'-AATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'	69	P2		
6.	5'-AGTCGTAACAAGGTTTCC-3'	51	IT1	750 bp	Trung dkk., 2013
	5'-GTAAGTTTCTTCTCCTCC-3'	48	IT2		

Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan sekuen DNA target yang telah diketahui maupun dari sekuen gen penghasil protein yang dituju. Data sekuen DNA atau protein bisa didapatkan melalui *genbank*. Perancangan primer berdasarkan hasil analisis homologi dari sekuen DNA atau protein yang mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat dengan sampel dilakukan apabila sekuen DNA maupun gen yang menyandi urutan protein yang dituju belum diketahui (Handoyo dan Rudiretna, 2000).

Desain primer ITS spesifik pada wilayah ITS1 dan ITS2 umumnya dirancang berdasarkan sekuen pada wilayah 18S, 5.8S, dan 26S. Wilayah *coding* rRNA 18S, 5.8S, dan 26S bersifat konservatif dan memiliki variasi sekuen yang lebih rendah dibandingkan sekuen pada ITS1 dan ITS2, sehingga dapat digunakan untuk pengembangan sekuen primer ITS (Gambar 2.3). Posisi sekuen 5.8S yang terletak di antara ITS1 dan ITS2 dapat dijadikan sebagai acuan untuk mendesain dan mengembangkan primer spesifik untuk ITS1 dan ITS2 dalam identifikasi molekuler menggunakan DNA *mini barcode* ITS1 maupun ITS2 (Shneyer, 2009).



Gambar 2. 3 Lokasi primer pada nrDNA (Sun dkk., 1994)

Desain primer yang tepat diperlukan untuk keberhasilan amplifikasi DNA sehingga perlu memenuhi parameter standar (Tabel 2.2) dari karakteristik umum suatu primer yang memiliki spesifikasi dan efisiensi yang tinggi. Komposisi dasar dan panjang primer merupakan karakteristik penting dalam proses amplifikasi DNA target secara spesifik karena sekuen primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA dapat memiliki efek besar pada spesifikasi dan efisiensi reaksi. Interaksi primer-primer (seperti *self-homology* dan *cross-homology*), kandungan G dan C, suhu leleh (T_m), *GC clamp*, stabilitas ujung 5', spesifikasi ujung 3', suhu anil, dan panjang *amplicon* yang dihasilkan juga merupakan parameter penting yang mempengaruhi desain primer PCR (Mitsuhashi, 1996).

Tabel 2.2 Parameter desain primer ITS

No.	Parameter	Standar	Referensi
1.	Panjang primer	18-30 bp	Handoyo dan Rudiretna, 2000
2.	Suhu leleh (T_m)	52-58°C	
3.	Suhu anil (T_a)	45-65°C	Mitsuhashi, 1996
4.	Kandungan G dan C	45-60%	Abd-Elsalam, 2003
6.	<i>Self homology</i>	≤ 3 pasang basa	
7.	Spesifikasi ujung 3'	≥ 6 nukleotida terakhir yang berbeda (<i>mismatch</i>) antar primer	Dieffenbach dkk., 1993

Spesifikasi umumnya dipengaruhi oleh panjang primer, suhu leleh, dan suhu anil yang digunakan pada proses PCR. Panjang optimal primer PCR yang baik yaitu 18-30 bp. Ukuran tersebut cukup panjang untuk spesifikasi yang memadai dan cukup pendek untuk menempel dan mengikat secara mudah ke

DNA *template* pada suhu anil. Primer dengan T_m di kisaran 52-58°C umumnya memberikan hasil PCR terbaik. Pemilihan T_m primer sangat penting karena T_m sangat mempengaruhi pemilihan suhu anil proses PCR yang menjadi poin penting dalam keberhasilan amplifikasi DNA. Handoyo dan Rudiretna, (2000) menjelaskan bahwa T_m primer dengan panjang berkisar 18-30 bp dapat dihitung menggunakan rumus:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Kandungan guanin (G) dan sitosin (C) sangat mempengaruhi T_m dari primer. Komposisi basa nitrogen G dan C pada primer sebaiknya berkisar 45-60% dari kandungan G dan C pada DNA target. Primer dengan kandungan G dan C yang rendah diperkirakan dapat menurunkan spesifikasi proses PCR karena primer tidak dapat menempel pada sekuen DNA *template* secara optimal pada proses anil. Primer harus dirancang dengan baik tanpa adanya homologi *intraprimer* melebihi 3 pasang basa karena akan menyebabkan terbentuknya *hairpin* yang dapat mengganggu proses PCR. Homologi antar primer juga harus dihindari. Apabila sekuen primer memiliki homologi pada ujung 3' dari kedua primer, pembentukan dimer primer akan terjadi (Abd-Elsalam, 2003).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai April 2020. Penelitian berlokasi di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. *Sequencing* DNA dilakukan dengan menggunakan jasa Macrogen, Republik Korea.

3.2 Alat dan Bahan

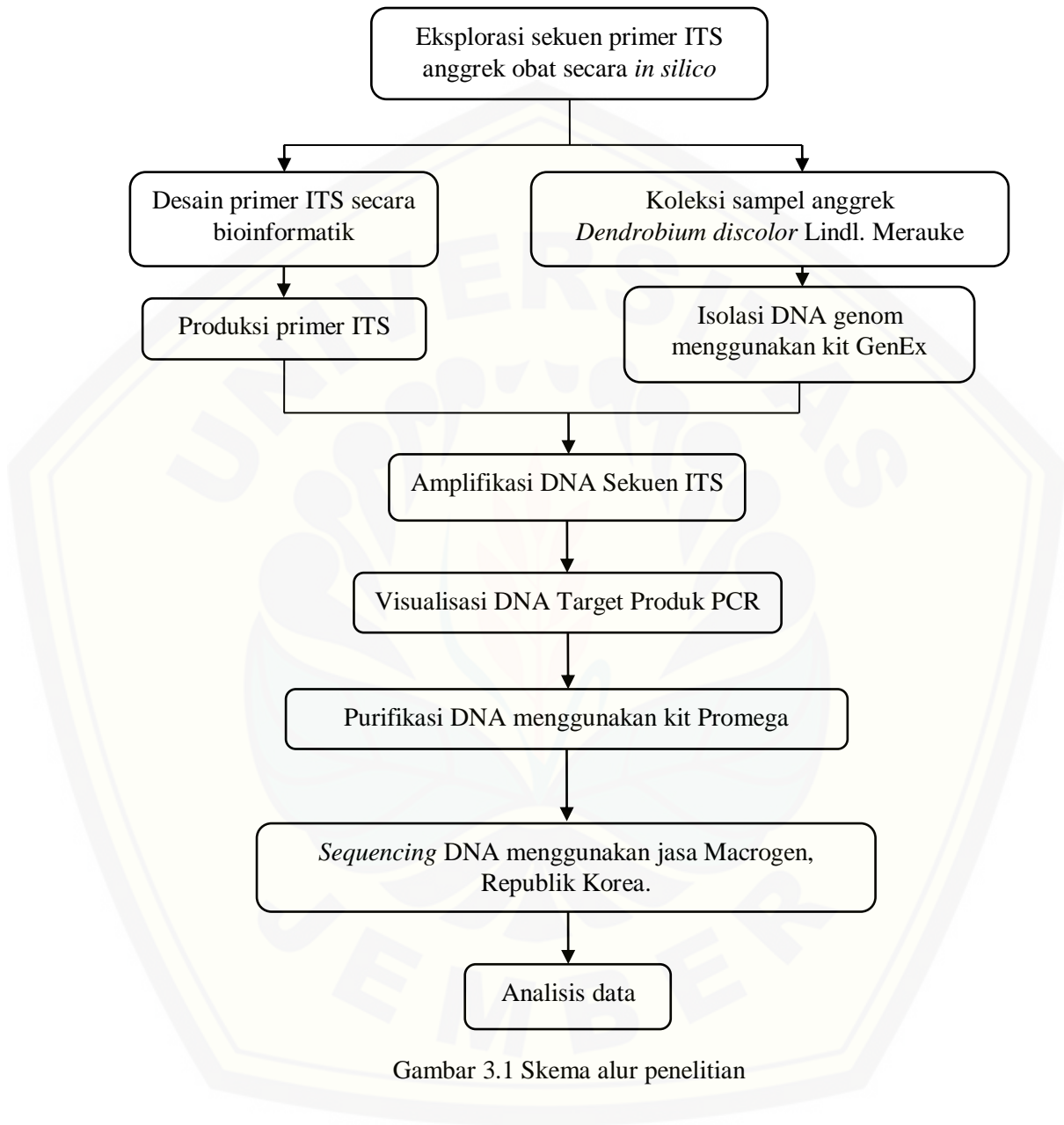
Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi mortar, alu, *hot plate*, mikropipet, tip mikropipet kuning (200 μ L), tip mikropipet biru (1 mL), *UV-transilluminator*, neraca analitik, mesin PCR, *vortex*, *thermoshaker*, gelas ukur, tabung erlenmeyer, eppendorf (1,5 mL), *microtube* PCR, sentrifuse, desikator, lemari pembeku -20°C , pengaduk magnetik, gunting, aluminium foil, elektroforesis, dan parafilm.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke, Papua (yang diperoleh dari nurseri Kebon Agung Orchid, Jember), primer ITS, *double distilled water* (ddH₂O), isopropanol, kit GenEx (*buffer* PL, *buffer* PP, *buffer* RE), PCR *master mix*, *buffer* tris acetic-EDTA (TAE 1x), ethidium bromide, agarosa, akuades, etanol 70% dingin, DNA marker 100 bp, dan RNase.

3.3 Rancangan Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan melalui tahapan koleksi sekuen, desain primer, isolasi DNA genom, amplifikasi DNA, elektroforesis DNA, purifikasi DNA, *sequencing* DNA dan analisis data. Prosedur pertama yaitu koleksi sekuen primer ITS yang sudah digunakan dalam identifikasi anggrek obat secara *in silico*. Primer ITS anggrek obat kemudian didesain ulang berdasarkan urutan basa nitrogen primer pada sekuen anggrek *Dendrobium*. Prosedur kedua yaitu dilakukan ekstraksi dan analisis sekuen DNA melalui isolasi DNA, amplifikasi DNA, dan purifikasi DNA. Analisis secara kualitatif dilakukan dengan visualisasi

hasil elektroforesis menggunakan *UV-transilluminator*. Alur penelitian dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 3.1 Skema alur penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Koleksi Sekuen dan Sampel

Data sekuen primer ITS untuk identifikasi molekuler anggrek obat didapatkan melalui studi literatur dari jurnal, buku, dan artikel penelitian sebelumnya pada anggrek obat *Dendrobium*. Sekuen DNA anggrek obat dikoleksi

dari *genbank* sebagai data awal untuk memprediksi letak primer pada sekuen anggrek serta ukuran *amplicon* yang akan dihasilkan dari proses PCR. Sekuen DNA anggrek obat *Dendrobium* dikoleksi berdasarkan basis data yang tersedia di *genbank* NCBI dengan cara menulis nama spesies dan sekuen yang dimaksud (ITS). Sekuen DNA anggrek obat yang tidak terdaftar datanya pada *genbank* (NCBI) dijadikan sebagai sampel pada penelitian ini. Sampel anggrek yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke yang diperoleh dari nurseri Kebon Agung Orchid. Sampel kemudian dibawa ke laboratorium untuk isolasi DNA.

3.4.2 Desain primer ITS

Desain primer ITS dalam penelitian ini dirancang dengan mempertimbangkan: panjang *amplicon* dengan ukuran 300-500 bp (Hajibabaei dkk., 2007; Zhang dkk., 2016), daerah penempelan primer pada sekuen ITS DNA sampel (ITS1 dan ITS2), panjang primer, suhu leleh (T_m), Kandungan G dan C, suhu anil (T_a), dan *GC clamp*. Desain dilakukan secara *in silico* menggunakan beberapa *software* meliputi: BLAST-NCBI (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov), Primer-BLAST-NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), Oligo Analyzer untuk analisis struktur sekunder pada primer, Bioinformatics (www.bioinformatics.org) untuk menentukan komplemen sekuen dari primer yang didesain, dan NEB *Tm calculator* (www.tmcalculator.neb.com) untuk menghitung T_m primer dan menentukan suhu anil.

Data sekuen primer yang telah didesain kemudian dianalisis lokasi sekuennya pada sekuen ITS anggrek menggunakan BLAST-NCBI. Lokasi sekuen primer dari hasil *blast* pada sekuen anggrek dikoleksi untuk mengetahui dan memperkirakan panjang *amplicon* yang dihasilkan. Data sekuen rancangan primer selanjutnya dianalisis spesifikasi dan efisiensi berdasarkan kriteria yang telah ditentukan sebelumnya. Lokasi penempelan primer DR2 digunakan sebagai acuan dalam menentukan daerah konservatif 5.8S yang terletak di antara ITS1 dan ITS2 pada sekuen ITS anggrek *Dendrobium* (Takamiya dkk., 2011).

Rancangan sekuen primer *forward* dan *reverse* yang telah didesain diseleksi dengan mempertimbangkan kandungan G dan C sebesar 45-60% (Abd-El salam, 2003), T_m primer 52-58°C (Handoyo dan Rudiretna, 2000), suhu anil kedua pasang primer, lokasi penempelan sepasang primer pada ITS (ITS1 dan ITS2), dan panjang *amplicon* yang akan dihasilkan dari pasangan primer ITS berkisar antara 300-500 bp (Hajibabaei dkk., 2007; Zhang dkk., 2016). Pasangan primer ITS yang telah dipilih kemudian dibuat dan diujikan pada sampel *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke, Papua. Pembuatan primer dilakukan di Jakarta menggunakan jasa Biosensor Indonesia.

3.4.3 Isolasi DNA Genom *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke

Isolasi DNA genom *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke dilakukan dengan menggunakan kit GenEx. Daun sampel anggrek ditimbang 0,1 gram kemudian digerus dengan mortar dan alu steril sampai halus setelah ditambahkan 500 µL *buffer* PL dan 3 µL RNase. Supernatan diambil dengan mikropipet dan dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL kemudian divortex sampai larutan homogen. Supernatan diinkubasi (65°C) pada *thermoshaker* selama 15 menit. Proses berikutnya yaitu sentrifugasi sampel dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit sehingga terbentuk supernatan dan pelet. Supernatan diambil 400 µL dan dipindahkan ke *microtube* baru. *Buffer* PP ditambahkan pada sampel sebanyak 140 µL kemudian divortex dan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 4°C selama 5 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5,5 menit. Supernatan dipindahkan sebanyak 400 µL ke *microtube* 1,5 mL yang berisi 300 µL isopropanol dingin kemudian dilakukan inversi sampai terlihat untaian DNA seperti benang putih pada larutan. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1,5 menit. Hasil sentrifugasi berupa supernatan dibuang, sedangkan peletnya ditambahkan dengan etanol 70% kemudian diinversi. Sampel disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet dikeringkan selama 5-10 menit menggunakan desikator. Pelet DNA genom murni yang terbentuk berwarna bening. DNA genom *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke dilarutkan dengan 100 µL *buffer* RE

kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit atau suhu ruang selama 1 jam.

3.4.4 Amplifikasi DNA Sekuen ITS

Analisis PCR dilakukan dengan mereaksikan ddH₂O steril, 2x PCR *master mix*, 2 pasang primer ITS yang telah didesain, dan ekstrak DNA genom *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke. Tahapan pertama yang dilakukan adalah pembuatan *cocktail*. Volume *cocktail* yang dibutuhkan setiap satu sampel adalah 20 µL. PCR *master mix* 10 µL dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 µL, kemudian ditambah primer *forward* dan primer *reverse* masing-masing 1 µL, *template* DNA genom yang dimasukkan adalah 1,5 µL, dan 6,5 µL ddH₂O. Primer ITS2 (DR2-26SE) yang dirancang oleh Takamiya dkk., (2011) dalam identifikasi molekuler anggrek *Dendrobium* juga digunakan dalam penelitian ini sebagai pembanding. Sekuen primer *forward* (DR2): 5'-GGCTCTCGCATCGATGAAGA-3' dan primer *reverse* (26SE): 5'-TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'.

Prosedur dilakukan pada kondisi dingin (di atas es). *Cocktail* kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR untuk proses amplifikasi DNA target dengan 35x siklus (denaturasi, *annealing*, dan pemanjangan). Mesin PCR diatur kondisinya berdasarkan prosedur dalam buku *PCR Applications Manual* (Hans-Joachim dkk., 2006) dan uji pendahuluan. Penentuan temperatur untuk proses *annealing* didasarkan pada hasil perhitungan suhu anil (T_a) dengan NEB T_m *calculator* berdasarkan suhu leleh (T_m) dari desain primer yang digunakan (Tabel 3.1). Kondisi PCR yang digunakan pada primer ITS (DR2-26SE) memiliki pengaturan yang berbeda hanya pada suhu anil yang digunakan, yaitu 55°C.

Tabel 3.1 Kondisi PCR untuk amplifikasi DNA target dengan menggunakan primer ITS1 (58F-455R) dan ITS2 (344F-836R)

Tahapan	Temperatur	Durasi
Pra-denaturasi	95°C	5 menit
Denaturasi	95°C	30 detik
<i>Annealing</i>	53°C	30 detik
Elongasi	72°C	1 menit, 15 detik
Elongasi akhir	72°C	5 menit

3.4.5 Visualisasi DNA Target Produk PCR

Hasil PCR dilihat dengan elektroforesis pada gel agarosa 1,25%. Larutan gel agarosa 1,25% (Lampiran 1) dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dipanaskan pada *hot plate* sampai mendidih. Larutan EtBr 1 μL ditambahkan dalam larutan gel agarosa saat suhu mulai turun. Alat elektroforesis diatur kemudian dituang gel agarosa ke dalam cetakan. Cetakan sumuran diletakkan pada gel kemudian ditunggu sampai padat. Langkah selanjutnya, 350 mL *buffer Tris Acetic* EDTA (TAE) 1x dituang di atas gel sebagai *running buffer*. Sumuran pertama dimasukkan DNA marker 100 bp sebanyak 5 μL . Produk hasil PCR diambil 10 μL kemudian dimasukkan ke sumuran selanjutnya. Waktu yang dibutuhkan 30 menit pada 100 volt diatur pada alat elektroforesis. Gel agarosa hasil elektroforesis divisualisasi dengan *UV-transilluminator* untuk melihat ada tidaknya pita DNA hasil PCR. Pita DNA akan muncul apabila elektroforesis DNA berhasil. Pita DNA yang muncul dianalisis ukurannya dengan menyesuaikan ukuran panjang pada marker dan dibandingkan dengan literatur.

3.4.6 Purifikasi dan *Sequencing* DNA

Produk hasil PCR yang sudah melalui proses *running* dengan elektroforesis dapat dipurifikasi apabila pita DNA muncul dan ukurannya sesuai. Purifikasi dilakukan agar DNA steril dari sisa-sisa *buffer*, *dNTP mix*, primer dan senyawa lainnya. Purifikasi DNA menggunakan kit Promega. Kolom mini SV dimasukkan ke dalam tabung koleksi (*collection tube*). Volume produk PCR dimasukkan dan diukur, kemudian ditambahkan *buffer* pelarut dengan volume yang sama. Larutan diinkubasi selama 1 menit sebelum disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang. Larutan pada tabung koleksi hasil sentrifugasi dibuang. *Buffer* pencuci 700 μL ditambahkan pada kolom mini SV. Larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit dalam suhu ruang. *Buffer* pencuci 400 μL ditambahkan kembali kemudian larutan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu ruang selama 5 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet DNA dikeringkan. Pelet DNA dilarutkan kembali menggunakan H_2O steril atau *buffer* elusi 50 μL ,

kemudian diinkubasi selama 1 menit. Larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Hasil DNA murni diperoleh dan dipindah ke eppendorf baru. Penentuan urutan basa nitrogen DNA *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke hasil PCR dilakukan dengan menggunakan jasa Macrogen, Republik Korea. Metode *sequencing* DNA yang digunakan adalah metode *sequencing* Sanger.

3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara *in silico* dengan melakukan analisis karakteristik primer menggunakan *software* Oligo Analyzer dan identifikasi spesies menggunakan *software* BLAST-NCBI untuk konfirmasi sekuen ITS *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke hasil *sequencing* yang telah diedit menggunakan *software* BioEdit *sequence alignment editor*. Hasil *blast* yang tidak memiliki nama spesifik (seperti kata sp., spp., dan aff., dalam spesies) tidak diambil. Urutan analisis data untuk setiap sekuen disejajarkan dengan Clustal X v1.8.7. Konstruksi pohon filogenetik dianalisis menggunakan MEGA6.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Primer desain ITS1 (58F-455R) dan ITS2 (344F-836R) menghasilkan *amplicon* berukuran 300-500 bp. DNA *barcoding* ITS secara parsial (*mini barcode* ITS1 dan ITS2) dapat digunakan untuk identifikasi molekuler anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. dengan hasil yang sama dengan menggunakan metode DNA *barcoding full-length* ITS.

5.2 Saran

Meskipun primer ITS1 dan ITS2 yang telah dirancang dapat digunakan untuk DNA *barcoding* anggrek *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke, kedua primer tersebut sangat perlu diuji efektivitasnya untuk identifikasi anggrek jenis lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elsalam, K. A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for pcr primer design. *African Journal of Biotechnology*. 2(5):91–100.
- Adams, P. B., J. M. Burke, dan S. D. Lawson. 2006. Systematic analysis of *Dendrobium* swartz section *Dendrocoryne* in the Australian region. *Plant Systematics and Evolution*. 260(1):65–80.
- Agustini, V., S. Suharyanto, L. Dimara, dan C. D. Sembay. 2013. The diversity of tropical orchids of South Papua. *Jurnal Biologi Papua*. 5(1):1–9.
- Álvarez, I. dan J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29(3):417–434.
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal dna in plants: an example from the compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1(1):3–16.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, dan M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal dna: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82(2):247–277.
- Borah, P. 2011. Primer designing for pcr. *Sci Vis*. 11(3):134–136.
- Broquet, T., N. Ménard, dan E. Petit. 2006. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics*. 8(1):249–260.
- Bulpitt, C. J. 2005. The uses and misuses of orchids in medicine. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*. 98(9):625–631.
- Burke, J. M., M. J. Bayly, P. B. Adams, dan P. Y. Ladiges. 2008. Molecular phylogenetic analysis of *Dendrobium* (orchidaceae), with emphasis on the Australian section *Dendrocoryne*, and implications for generic classification. *Australian Systematic Botany*. 21(1):1.
- Campbell, C. S., W. A. Wright, M. Cox, T. F. Vining, C. S. Major, dan M. P. Arsenault. 2005. Nuclear ribosomal dna internal transcribed spacer 1 (ITS1) in *picea* (pinaceae): sequence divergence and structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 35(1):165–185.

- 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. *Journals.Plos.Org.* 5(1)
- Cheng. 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.
- Clements, M. A., D. L. Jones, I. K. Sharma, M. E. Nightingale, M. J. Garratt, K. J. Fitzgerald, dan A. M. Mackenzie. 2002. Phylogenetic systematics of the *diurideae* (orchidaceae) based on the ITS and 5.8S coding region of nuclear ribosomal dna. *Lindleyana.* 17:135–171.
- Cribb, P. J. 1983. A revision of *Dendrobium* sect. *latouria* (orchidaceae). *Kew Bulletin.* 38(2):229.
- Cribb, P. J. 1986. A revision of *Dendrobium* sect. *spatulata* (orchidaceae). *Kew Bulletin.* 41(3):615–692.
- Dauncey, E. A. dan P. J. Cribb. 1993. *Dendrobium* (sect. *pedilonum*) *purpureum roxb.* (orchidaceae) and its allies. *Kew Bulletin.* 48(3):545.
- Dieffenbach, C. W., T. M. J. Lowe, dan G. S. Dveksler. 1993. General concepts for pcr primer design. *Genome Research.* 3(3):30–37.
- Dorak, M. T. 2006. *Real-Time PCR*. UK: Taylor & Francis Group.
- Dressler, R. dan C. Dodson. 2000. Classification and phylogeny in orchidaceae. *Annals of the Missouri Botanic Garden.* 47:25–67.
- Feng, S., Y. Jiang, S. Wang, M. Jiang, Z. Chen, Q. Ying, dan H. Wang. 2015. Molecular identification of *Dendrobium* species (orchidaceae) based on the dna barcode ITS2 region and its application for phylogenetic study. *International Journal of Molecular Sciences.* 16:21975–21988.
- Fu, R.-Z., J. Wang, Y.-B. Zhang, Z.-T. Wang, P. P.-H. But, N. Li, dan P.-C. Shaw. 1999. Differentiation of medicinal *codonopsis* species from adulterants by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Planta Medica.* 65(7):648–650.
- Gao, Z., Y. Liu, X. Wang, X. Wei, dan J. Han. 2019. DNA mini-barcoding: a derived barcoding method for herbal molecular identification. *Frontiers in Plant Science.* 10:1–11.
- Gardes, M. dan T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology.* 2(2):113–118.

- Govaerts, R. 2003. World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS: 1-71827. <http://powo.science.kew.org/> [Diakses pada July 18, 2020].
- Hajibabaei, M., G. A. C. Singer, P. D. N. Hebert, dan D. A. Hickey. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*. 23(4):167–172.
- Handoyo, D. dan A. Rudiretna. 2000. Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (pcr). *Unitas*. 9(1):17–29.
- Hans-Joachim, D., D. Annette, E. Doris, G. Stefanie, dan K. Joe. 2006. *PCR Applications Manual*. Edisi 3rd Editio. German: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.
- Henuhili, V. 2009. Potensi Anggrek Spesies *Dendrobium* Asal Indonesia Sebagai Tanaman Induk Bunga Potong. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian*. 2009. Universitas Negeri Yogyakarta: B267–B272.
- Holmes, S. 2013. Bootstrapping phylogenetic trees:theory and methods. *Statistical Science*. 18(2):241–255.
- Hossain, M. M., R. Kant, P. T. Van, B. Winarto, S. Zeng, dan J. A. Teixeira da Silva. 2013. The Application of Biotechnology to Orchids. *Critical Reviews in Plant Sciences*. March 2013.
- Huang, Y., F. Li, dan K. Chen. 2010. Analysis of diversity and relationships among chinese orchid cultivars using est-ssr markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 38(1):93–102.
- Indraloka, A. B., P. Dewanti, dan D. P. Restanto. 2019. Morphological characteristics and pollinia observation of 10 indonesia native *Dendrobium* orchids. *Biovalentia: Biological Research Journal*. 5(2):2477–1392.
- Kamemoto, H., T. D. Amore, dan A. R. Kuehnle. 1999. *Breeding Dendrobium Orchids in Hawai'i*. Canada: Friesens Corporation.
- Kong, J. M., N. K. Goh, L. S. Chia, dan T. F. Chia. 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologica Sinica*. 24(1):7–21.
- Korf, I., M. Yandell, dan J. Bedell. 2003. *BLAST*. Edisi First. USA: O'reilly & Associates, Inc.
- Lau, D. T.-W., P.-C. Shaw, J. Wang, dan P. P.-H. But. 2001. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal dna. *Planta Med*. 67:456–460.

- Lawler, L. J. dan M. Slaytor. 1970. Uses of Australian orchids by aborigines and early settlers. *The Medical Journal of Australia*. 2(26):1259–1261.
- Li, M., H. Cao, P. P. H. But, dan P. C. Shaw. 2011. Identification of herbal medicinal materials using dna barcodes. *Journal of Systematics and Evolution*. 49(3):271–283.
- Liddle, D. J. dan P. I. Forster. 1990. The recognition of subspecies in *Dendrobium discolor lindley* (Orchidaceae). *Austrobaileya*. 3(2):319–321.
- Lindley, J. 1840. *Edwards' Botanical Register, or, Ornamental Flower-Garden and Shrubbery*. London: James Ridgway, Piccadilly.
- Liu, Y. T., R. K. Chen, S. J. Lin, Y. C. Chen, S. W. Chin, F. C. Chen, dan C. Y. Lee. 2014. Analysis of sequence diversity through internal transcribed spacers and simple sequence repeats to identify *Dendrobium* species. *Genetics and Molecular Research*. 13(2):2709–2717.
- Millar, A. 1978. *Orchids of Papua New Guinea*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Mishra, P., A. Kumar, A. Nagireddy, D. N. Mani, A. K. Shukla, R. Tiwari, dan V. Sundaresan. 2015. DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnology Journal*. 14(1):8–21.
- Mitsuhashi, M. 1996. Technical report: part 2. basic requirements for designing optimal pcr primers. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 10(5):285–293.
- Ngan, F., P. Shaw, P. But, dan J. Wang. 1999. Molecular authentication of *panax* species. *Phytochemistry*. 50(5):787–791.
- Nues, R. W. van, J. M. J. Rientjes, C. A. F. M. van der Sande, S. F. Zerp, C. Sluiter, J. Venema, R. J. Planta, dan H. A. Raué. 1994. Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal rna direct the formation of 17s and 26s rna. *Nucleic Acids Research*. 22(6):912–919.
- Ormerod, P. 2017. *Checklist of Papuanian Orchids*. Australia: Nature & Travel Books.
- Pavlopoulos, G. A., T. G. Soldatos, A. Barbosa-Silva, dan R. Schneider. 2010. A Reference Guide for Tree Analysis and Visualization. *BioData Mining*. 2010.
- Pearn, J. 2005. The world's longest surviving paediatric practices: some themes of aboriginal medical ethnobotany in australia. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 41(5–6):284–290.

- Perwitasari, D. A. G. 2019. Identifikasi Anggrek Obat *Dendrobium Discolor* Lindl. Menggunakan DNA Barcoding. Universitas Jember.
- Rohimah, S., L. Mukarramah, V. Sindiya, V. Y. S., G. A. K., dan M. Su'udi. 2018. Eksplorasi jenis dan potensi dna barcode thrixspermum secara in silico. *Jurnal Biodjati*. 3(2):148–156.
- Saitou, N. dan M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4):406–425.
- Sande, C. A. F. M. van der, M. Kwa, R. W. van Nues, H. van Heerikhuizen, H. A. Raué, dan R. J. Planta. 1992. Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *saccharomyces cerevisiae* ribosomal dna. *Journal of Molecular Biology*. 223(4):899–910.
- Sasmito, E. K. D., R. Kurniawan, dan I. Muhimmah. 2014. Karakteristik Primer Pada Polymerase Chain Reaction (PCR) Untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Nasional Informatika Medis*. December 6, 2014. SNIMed V: 93–102.
- Shneyer, V. S. 2009. DNA Barcoding Is a New Approach in Comparative Genomics of Plants. *Russian Journal of Genetics*. November 12, 2009.
- Shneyer, V. S. dan A. V. Rodionov. 2019. Plant dna barcodes. *Biology Bulletin Reviews*. 9(4):295–300.
- Soltis, D. E., P. S. Soltis, dan J. J. Doyle. 1998. *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Boston: Kluwer Academic Publisher.
- Sun, Y., D. Z. Skinner, G. H. Liang, dan S. H. Hulbert. 1994. Phylogenetic analysis of sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal dna. *Theoretical and Applied Genetics*. 89(1):26–32.
- Szalanski, A. L., G. Steinauer, R. Bischof, dan J. Petersen. 2001. Origin and conservation genetics of the threatened ute ladies'-tresses, *spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*. 88(1):177–180.
- 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.
- Teoh, E. S. 2016. *Medicinal Orchids of Asia*. Singapore: Springer Nature.

- Teoh, E. S. 2019. *Orchids as Aphrodisiac, Medicine or Food*. Singapore: Springer Nature. *Orchids as Aphrodisiac, Medicine or Food*.
- Trung, K. H., T. D. Khanh, L. H. Ham, T. D. Duong, dan N. T. Khoa. 2013. Molecular phylogeny of the endangered vietnamese paphiopedilum species based on the internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal dna. *Advanced Studies in Biology*. 5(7):337–346.
- Tsai, C. C., S. C. Huang, dan C. H. Chou. 2006. Molecular phylogeny of phalaenopsis blume (Orchidaceae) based on the internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal dna. *Plant Systematics and Evolution*. 256:1–16.
- Tsai, C. C., C. I. Peng, S. C. Huang, P. L. Huang, dan C. H. Chou. 2004. Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal dna. *Scientia Horticulturae*. 101:315–325.
- Vu, T. H. T., T. L. Le, T. K. Nguyen, D. D. Tran, dan H. D. Tran. 2017. Review on molecular markers for identification of orchids. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*. 59(2):62–75.
- Williams, N. H. dan W. M. Whitten. 1999. Molecular phylogeny and floral fragrances of male euglossine bee-pollinated orchids: a study of stanhoepa (Orchidaceae). *Plant Species Biology*. 14:129–136.
- Xu, H., Z. Wang, X. Ding, K. Zhou, dan L. Xu. 2006. Differentiation of *Dendrobium* species used as “huangcao shihu” by rdna its sequence analysis. *Planta Medica*. 72(1):89–92.
- Yao, H., J.-Y. Song, X.-Y. Ma, C. Liu, Y. Li, H.-X. Xu, J.-P. Han, L.-S. Duan, dan S.-L. Chen. 2009. Identification of *Dendrobium* species by a candidate dna barcode sequence: the chloroplast *psba-trnh* intergenic region. *Planta Medica*. 75(06):667–669.
- Yip, P., C. Chau, C. Mak, dan H. Kwan. 2007. DNA methods for identification of chinese medicinal materials. *Chinese Medicine*. 2(1):9.
- Yuan, Z. Q., J. Y. Zhang, dan T. Liu. 2009. Phylogenetic relationship of china *Dendrobium* species based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal dna. *Biologia Plantarum*. 53(1):155–158.
- Yukawa, T., T. Ando, K. Karasawa, dan K. Hashimoto. 1992. Existence of two stomatal shapes in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae) and its systematic significance. *American Journal of Botany*. 79(8):946–952.
- Zhang, W., S. Yang, H. Zhao, dan L. Huang. 2016. Using the ITS2 sequence-structure as a dna mini-barcode: a case study in authenticating the traditional medicine “fang feng”. *Biochemical Systematics and Ecology*. 69:188–194.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Formula Larutan

1. Formula stock *buffer* TAE dalam H₂O 100 mL

Bahan	Takaran
Tris-Cl	0,625 gram
Asam Asetat Glasial (AAG)	1,142 mL
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,744 gram

2. Formula gel agarosa 1,25% untuk elektroforesis:

1,25% gel agarosa = 0,625 gram agarose + 1 mL TAE + 49 mL H₂O

Bahan	Takaran
Agarosa	0,625 gram
<i>Buffer</i> TAE	50 mL

Lampiran 2. Data Hasil BioEdit dan pensejajaran sekuen ITS dengan Clustal X

1. Sekuen ITS1 dari anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke, Papua dengan panjang 332 bp menggunakan primer 58F dan 455R

CTGCGGAAGGATCATTGTCGAGACCGTAATGTATCGAGCGATTTCGGTG
 AACCCGTCATATACACGGTGGTAATCGCTGCCGTAAGATAAAAAGCCA
 TCCCATCCCAGCTGCTGCGTCATCCCCTTCGGGGGGCGGGGCACGATG
 AARGATGGACGAACACCCAAACCGGCGCAGCATCGCGCCMAGGGAAT
 ATCGAAACACGGGCCCTTCATCAGGGTTGGKGGCACGGGGGTGCTGTT
 GCACGCCSCGTGAATTGAAACGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTC
 TCGCATCGATGAARARCGCARCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT

2. Sekuen ITS2 dari anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke, Papua dengan panjang 420 bp menggunakan primer DR2_F dan 26SE_R

AATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCC
 TTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAGCCGGCCGAGGGCACGTCCGC
 CTGGGCGTCAAGCGTTGCATCGCTCCGTACCAACTCCGTCCCATCGAT
 GGGTGGGCCGCGGAGGCTYGGATGTGGAGAGTGGCTCGTCGTGCTCT
 ATCGGTGCGGCGGGCTGAAGGGCGGGTTATCATCTCGTTGGCCGCGAA
 CAACAAGAGGTGGATGGGAGCAAGGCCTACGTTGTTGTATCGTGCTTG
 CCAGAGGGAGGATTACACCCCTCGGGTGATCCCGAACCATGCGTCGGT
 CCACGAGACGACGGCTTGAATGCGACCCAGGATGGGCGAGGCCAC
 CCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAG

3. Sekuen ITS2 dari anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke, Papua dengan panjang 431 bp menggunakan primer 344F dan 836R

GATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATC
 CCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAGCCG
 GCCGAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCGTTGCATCGCTCCGTACC
 AACTCCGTCCCATCGATGGGTGGGCCGCGGAGGCTCGGATGTGGAG
 AGTGGCTCGTCGTGCTCTATCGGTGCGGCGGGCTGAAGGGCGGGTTAT
 CATCTCGTTGGCCGCGAACAACAAGAGGTGGATGGGAGCAAGGCCTA

CGTTGTTGTATCGTGCTTGCCAGAGGGAGGATTACACCCCTCGGGTGA
TCCCGAACCATGCGTCGGTCCACGAGACGACGGCTTGGAATGCGACCC
CAGGATGGGCGAGGCCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGG
AGG

4. Sekuen ITS (ITS1-5.8S-ITS2) anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar,

Maluku dengan panjang 803 bp menggunakan primer 17SE_F dan 26SE_R
GTGACTCTGCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGA
AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCG
AGACCGTAATGTATCGAGCGATTCCGGTGAACCCGTCATATACACGGCG
GTAATCGCTGCCGTAAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAGCTGCTGCGT
CATCCCCCTCGGGGGGCGGGGCACGATGAAGGATGGACGAACACCCA
AACCGGCGCAGCATCGCGCCAAGGGAATATCGAAACACGGGCCCCTTC
ATCAGGGTTGGTGGCACGGGGGTGCTGTTGCACGCCGCGTGAATTGAA
ACGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGC
AGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATC
GAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAGCCGGCCGAGGGCAC
GTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGCATCGCTCCGTACCAACTCCGTCCC
ATCGATGGGTGGGCCGGCGGAGGCTCGGATGTGGAGAGTGGCTCGTC
GTGCTCTATCGGTGCGGCGGGCTGAAGGGCGGGTTATCATCTCGTTGG
CCGCGAACAACAAGAGGTGGATGGGAGCAAGGCCTACGTTGTTGTAT
CGTGCTTGCCAGAGGGAGGATTACACCCCTCGGGTGATCCCGAATCAT
GCGTCGGTCCACGAGACGACGGCTTGGAATGCGACCCCAGGATGGGC
GAGGCCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAG

5. Hasil alignment sekuen ITS1 anggrek *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke menggunakan primer ITS1 (58F-455R)

```

D. discolor Tanimbar          CTGCGGAAGG-ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
D. discolor Merauke*        CTGCGGAAGG-ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
D. nindii AY239985.1        -----ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
D. taurinum AB894142.1      CTGCGGAAGG-ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
D. canaliculatum EU430375.1 CTGCGGAAGG-ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
D. macrophyllum AB894131.1 CTGCGGAAGG-ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
D. shiraishii AB894132.1    CTGCGGAAGG-ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
D. salaccense KF143506.1    CTGCGGAAGG-ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
D. salaccense HQ114260.1    CTGCGGAAGG-ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
D. salaccense KJ210493.1    CTGCGGAAGG-ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
D. salaccense KJ210494.1    CTGCGGAAGG-ATCATTGTGGAGACCGTAATGTATCGAGGGATTGGTGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
Calanthe discolor_KT338660.1 -----TTCTGAGAACCCCGTCA-TATACACGGCGGTAAT
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....

```



```

D. discolor Tanimbar          TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
D. discolor Merauke*        TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
D. nindii AY239985.1        TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
D. taurinum AB894142.1      TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
D. canaliculatum EU430375.1 TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
D. macrophyllum AB894131.1 TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
D. shiraishii AB894132.1    TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
D. salaccense KF143506.1    TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
D. salaccense HQ114260.1    TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
D. salaccense KJ210493.1    TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
D. salaccense KJ210494.1    TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
Calanthe discolor_KT338660.1 TCGTGCCTGAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAAGCTGCTGCTCATCCCC-TTCGGGGGGCGGGGCAGATGAAG
...80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150

```



```

D. discolor Tanimbar          GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
D. discolor Merauke*        GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
D. nindii AY239985.1        GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
D. taurinum AB894142.1      GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
D. canaliculatum EU430375.1 GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
D. macrophyllum AB894131.1 GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
D. shiraishii AB894132.1    GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
D. salaccense KF143506.1    GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
D. salaccense HQ114260.1    GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
D. salaccense KJ210493.1    GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
D. salaccense KJ210494.1    GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
Calanthe discolor_KT338660.1 GATGGACGAACA--CCCAACCGGGGCGAGCATCGGCCAAGGGAATAT--CGAA--ACACGGGCCCTTCATCAGGG
...160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230

```



```

D. discolor Tanimbar          TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
D. discolor Merauke*        TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
D. nindii AY239985.1        TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
D. taurinum AB894142.1      TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
D. canaliculatum EU430375.1 TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
D. macrophyllum AB894131.1 TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
D. shiraishii AB894132.1    TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
D. salaccense KF143506.1    TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
D. salaccense HQ114260.1    TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
D. salaccense KJ210493.1    TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
D. salaccense KJ210494.1    TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
Calanthe discolor_KT338660.1 TTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTGTCACGCCCGCTGAATTGAAACGACTCTGGCCTTGGATATCTGGGCTCTGGC
...230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

```



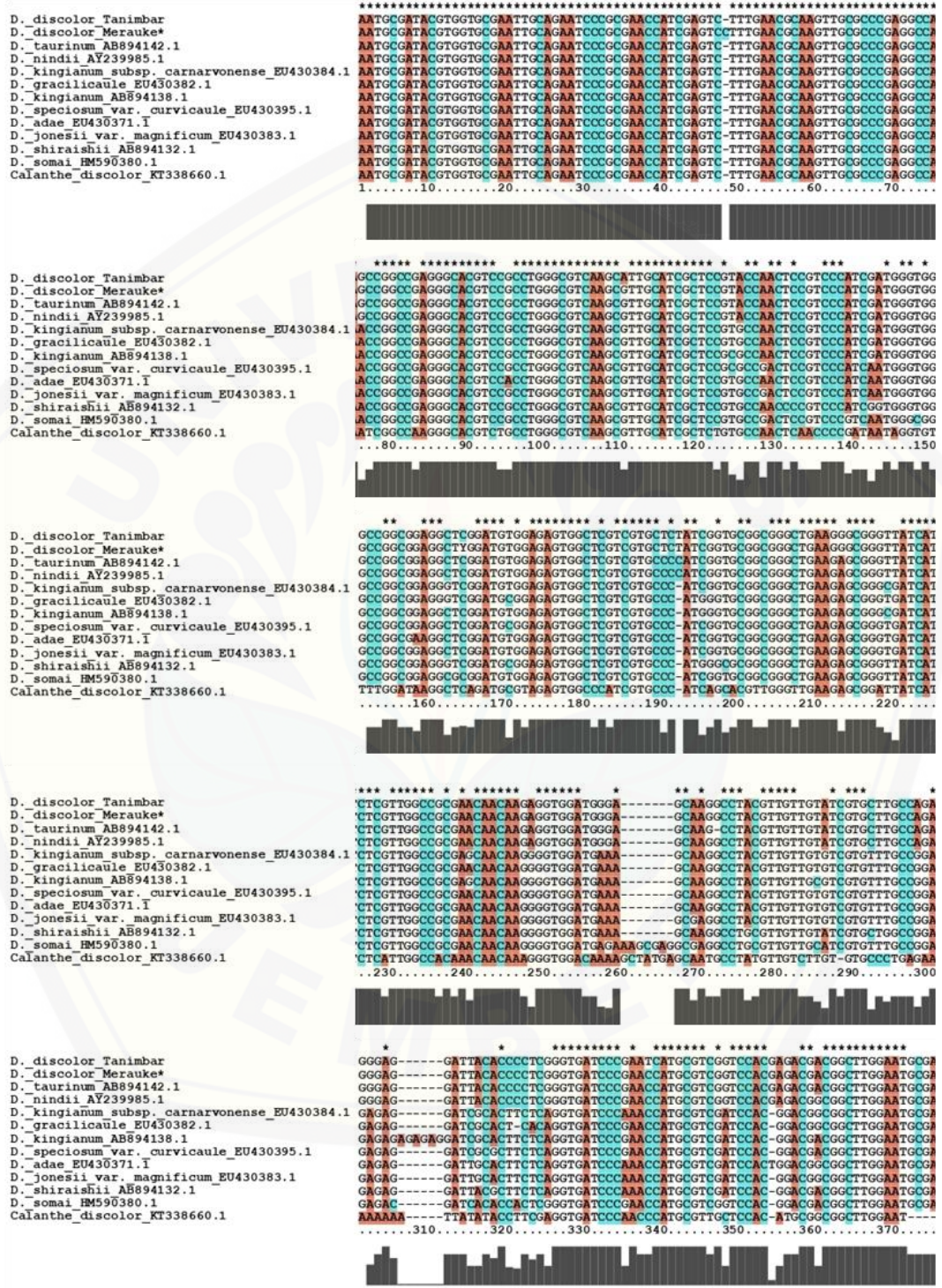
```

D. discolor Tanimbar          TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 332
D. discolor Merauke*        TCGATGAARARCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 332
D. nindii AY239985.1        TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 322
D. taurinum AB894142.1      TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 332
D. canaliculatum EU430375.1 TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 327
D. macrophyllum AB894131.1 TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 324
D. shiraishii AB894132.1    TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 314
D. salaccense KF143506.1    TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 323
D. salaccense HQ114260.1    TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 330
D. salaccense KJ210493.1    TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 330
D. salaccense KJ210494.1    TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 330
Calanthe discolor_KT338660.1 TCGATGAAGGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAAT 286
.....310.....320.....330.....340

```



6. Hasil alignment sekuen ITS2 anggrek *Dendrobium discolor* Lindl. Merauke menggunakan primer ITS2 (DR2-26SE)

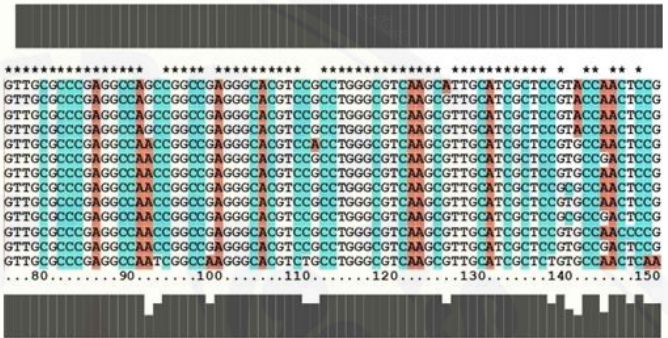


7. Hasil alignment sekuen ITS2 anggrek *Demdrobium discolor* Lindl. Merauke menggunakan primer ITS2 (344F-836R)

```

*****
D. discolor Tanimbar      GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. discolor Merauke*    GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. taurinum AB894142.1  GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. nindii AY239985.1    GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. adae EU430371.1     GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. jonesii var. magnificum EU430383.1 GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. kingianum subsp. carnarvonense EU430384.1 GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. kingianum AB894138.1 GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. gracilicaule EU430382.1 GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. speciosum var. curvicaule EU430395.1 GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. shiraishii AB894132.1 GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
D. somai HM590380.1    GATGAAAGCGCGAGCGAAATGCGATACTGGTGGCGAATTGCAAGATCCCGGAAACCATCGAGTCTTTGAACGCCAA
Calanthe discolor KT338660.1
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....

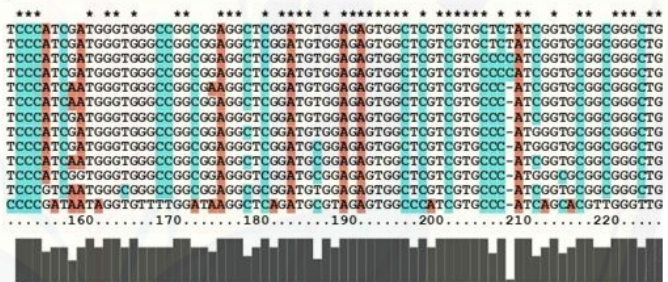
```



```

*****
D. discolor Tanimbar      GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. discolor Merauke*    GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. taurinum AB894142.1  GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. nindii AY239985.1    GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. adae EU430371.1     GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. jonesii var. magnificum EU430383.1 GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. kingianum subsp. carnarvonense EU430384.1 GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. kingianum AB894138.1 GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. gracilicaule EU430382.1 GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. speciosum var. curvicaule EU430395.1 GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. shiraishii AB894132.1 GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
D. somai HM590380.1    GTTGGCCCGAGGCCAGCCGCGGAGGGCAAGTCCCGCTGGCGCTCAGCATTGATCGTCCGTACCAACTCCG
Calanthe discolor KT338660.1
...80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150

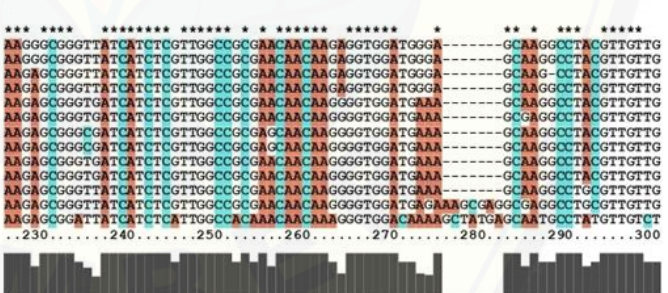
```



```

*****
D. discolor Tanimbar      TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. discolor Merauke*    TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. taurinum AB894142.1  TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. nindii AY239985.1    TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. adae EU430371.1     TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. jonesii var. magnificum EU430383.1 TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. kingianum subsp. carnarvonense EU430384.1 TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. kingianum AB894138.1 TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. gracilicaule EU430382.1 TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. speciosum var. curvicaule EU430395.1 TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. shiraishii AB894132.1 TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
D. somai HM590380.1    TCCCATCGATGGGTGGGCGCGCGGAGGGCTCGGATGTGGAGATGGCTCGTCTCGTCTCGTCCGTCGGTGGGCGGCTG
Calanthe discolor KT338660.1
...160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....

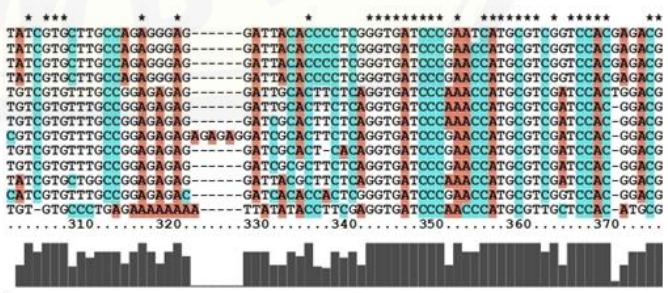
```



```

*****
D. discolor Tanimbar      AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. discolor Merauke*    AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. taurinum AB894142.1  AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. nindii AY239985.1    AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. adae EU430371.1     AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. jonesii var. magnificum EU430383.1 AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. kingianum subsp. carnarvonense EU430384.1 AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. kingianum AB894138.1 AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. gracilicaule EU430382.1 AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. speciosum var. curvicaule EU430395.1 AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. shiraishii AB894132.1 AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
D. somai HM590380.1    AAGGGCGGGTATCATCTCTGTTGGCCGCAACAAAGGGTGGATGGAA-----GCAAGGCTACGTTGTTG
Calanthe discolor KT338660.1
...230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

```



```

*****
D. discolor Tanimbar      TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. discolor Merauke*    TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. taurinum AB894142.1  TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. nindii AY239985.1    TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. adae EU430371.1     TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. jonesii var. magnificum EU430383.1 TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. kingianum subsp. carnarvonense EU430384.1 TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. kingianum AB894138.1 TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. gracilicaule EU430382.1 TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. speciosum var. curvicaule EU430395.1 TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. shiraishii AB894132.1 TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
D. somai HM590380.1    TATCGTCTTGCCAGAGGGG-----GATTACACCCCTGGGTGATCCCGAATCATCGCTCGTCCAGGAGCG
Calanthe discolor KT338660.1
TGT-GTCCCTGAGAAAAAAA-----TTATATACCTTCAGGTGATCCCAACCCATCGCTGCTCCAC-ATGGG
...310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....

```