



**IDENTIFIKASI ANGGREK OBAT *Dendrobium discolor* Lindl.
MENGUNAKAN DNA *BARCODING***

SKRIPSI

Oleh:

Dian Al Ghifari Perwitasari

NIM 151810401042

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2019



**IDENTIFIKASI ANGGREK OBAT *Dendrobium discolor* Lindl.
MENGUNAKAN DNA *BARCODING***

SKRIPSI

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

Oleh:

Dian Al Ghifari Perwitasari

NIM 151810401042

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

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

1. Ibunda Nurul Mudmainnah, Ayahanda Krisno Nugroho tercinta, Muhammad Daviq Afferoy, Catherine Nadia Pramesti, Aqilah, dan Alwaly yang telah memberikan doa tiada henti, segala kasih sayang, motivasi, dukungan, dan semangatnya selama ini.
2. Eyang putri Siti Masfufah dan Kamsiyah, Eyang kakung Alm. Abdul Kahar Muzakir yang telah memberikan kenangan indah dan nasehat yang berharga.
3. Seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, dukungan dan semangat untuk menuntut ilmu.
4. Guru-guru TK Al-Mu'minin Ngrambe-Ngawi, SDN Ngrambe 1-Ngawi, SMPN 3 Ngrambe-Ngawi, dan SMA Ambulu-Jember.
6. Dosen-dosen Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

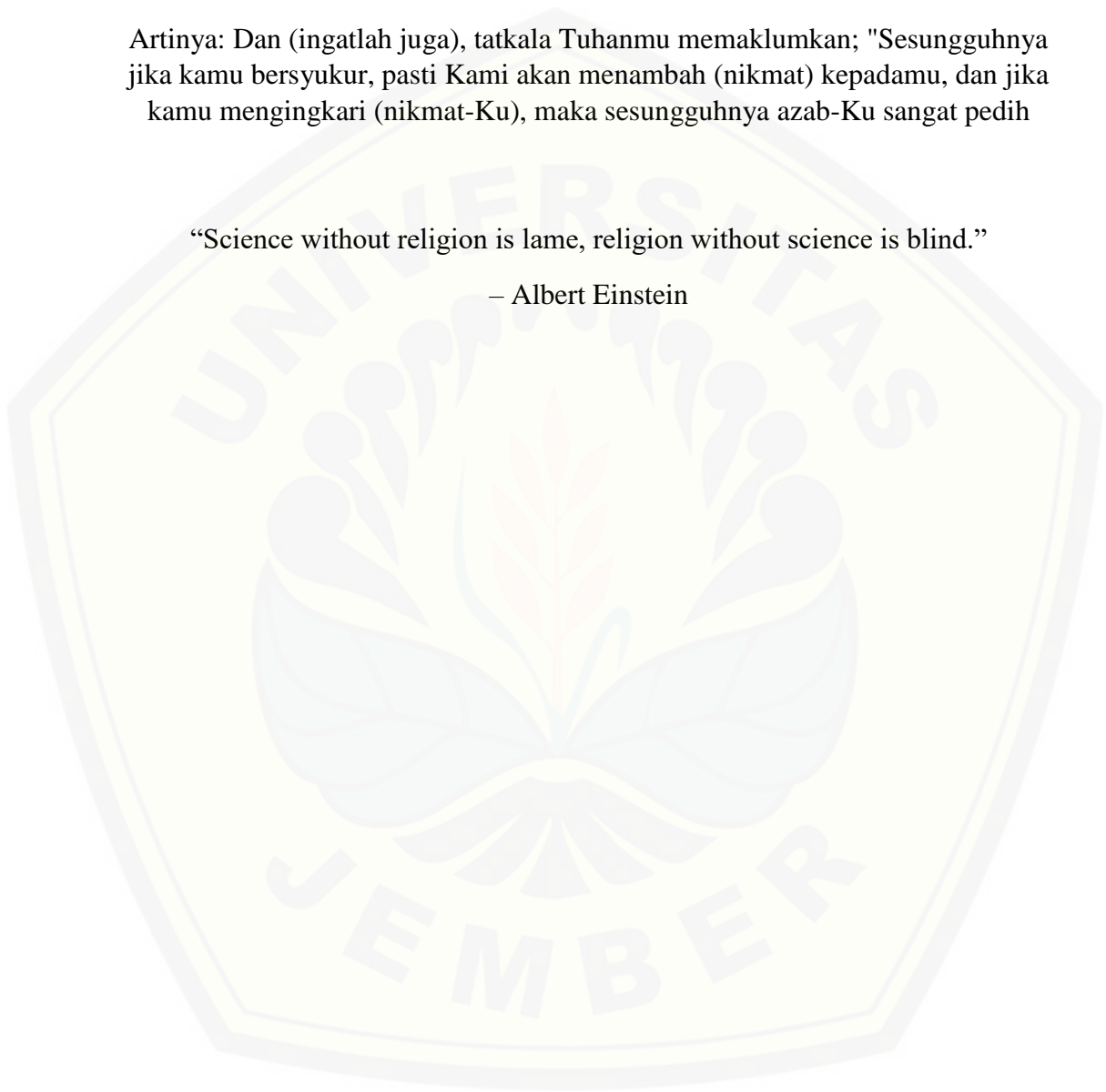
“QS. Ibrahim: 7”

وَإِذْ تَأْتِيَنَّكُمْ رِزْقًا لَّيِّنًا أَزِيدَنَّ لَكُمْ شُكْرًا ثُمَّ إِذَا دُرِيَ عَلَيْكُمْ رِزْقًا لَّيِّنًا مِّنْ بَيْنِ أَيْدِيكُمْ أَتَىٰ لَكُمُ الْعَذَابُ لَمَّا كَفَرْتُمْ إِنَّ عَذَابِي لَشَدِيدٌ

Artinya: Dan (ingatlah juga), tatkala Tuhanmu memaklumkan; "Sesungguhnya jika kamu bersyukur, pasti Kami akan menambah (nikmat) kepadamu, dan jika kamu mengingkari (nikmat-Ku), maka sesungguhnya azab-Ku sangat pedih

“Science without religion is lame, religion without science is blind.”

– Albert Einstein



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dian Al Ghifari Perwitasari

NIM : 1518104010242

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: “Identifikasi Anggrek Obat *Dendrobium discolor* Lindl. Menggunakan DNA *Barcoding*” adalah benar-benar karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, serta belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian Prof. Dr. 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, 15 Juli 2019

Yang menyatakan,

Dian Al Ghifari Perwitasari

NIM 151810401042

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI ANGGREK OBAT *Dendrobium discolor* Lindl.
MENGUNAKAN DNA *BARCODING***

Oleh

Dian Al Ghifari Perwitasari

NIM 151810401042

Pembimbing:

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

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

PENGESAHAN

Karya tulis ilmiah berjudul “**Identifikasi Anggrek Obat *Dendrobium discolor* Lindl. Menggunakan DNA *Barcoding***” 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,

Dr. Rike Oktarianti, M.Si.

Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc

NIP. 196310261990022001

NIP. 195510221982121001

Mengesahkan,

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Identifikasi Anggrek Obat *Dendrobium discolor* Lindl. Menggunakan DNA Barcoding;

Dian Al Ghifari Perwitasari, 151810401042; 2019; 41 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Orchidaceae memiliki nilai penting tidak hanya dari segi estetika, fitoterapi, dan ekologi tetapi juga dalam bidang terapeutik yaitu penggunaan sebagai obat. Salah satu anggrek obat yang ada di Indonesia adalah *Dendrobium discolor* Tanimbar, Maluku. Anggrek ini telah dimanfaatkan untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti disentri, menghilangkan rasa sakit, dan mengobati penyakit kulit. Identifikasi *D. discolor* Tanimbar menggunakan morfologi organ vegetatif tidak mudah karena adanya kemiripan dengan *D. discolor* Merauke dan *D. bigibbum* sehingga memerlukan organ generatif seperti bunga untuk identifikasi lebih lanjut. Namun, karakter tersebut tidak mudah didapatkan. Adanya inkonsistensi nama lokal dan sinonim ilmiah menimbulkan kesulitan dalam identifikasi konvensional. Adanya peningkatan kerusakan hutan dan perdagangan ilegal juga mengancam keberadaan spesies anggrek anggrek di alam. Hal ini menyebabkan perlunya identifikasi secara molekuler menggunakan penanda molekuler spesifik *rbcL* dan *ITS* di samping identifikasi secara morfologi.

Ekstraksi DNA genom dilakukan menggunakan metode CTAB dan NEXprep™ Plant DNA Mini Kit (NEX™ Diagnostics, Korea). Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR sebanyak 35x siklus. Penentuan urutan DNA produk PCR yang telah dipurifikasi menggunakan *purification Kit* (Jena Bioscience, Jerman) dilakukan dengan mesin DNA sekuenser ke 1st BASE, Singapura. Data sekuen DNA hasil sekuensing dianalisis secara bioinformatik melalui NCBI, MEGAX dan Clustal X 2.1. Hasil PCR menunjukkan pita DNA tebal dan spesifik pada ukuran yang ditargetkan (*rbcL* sebesar 600 bp sedangkan *ITS* sebesar 900 bp). Hasil rekonstruksi pohon filogenetik sekuen *rbcL* *D. discolor* (*section* *Spatulata*) menunjukkan adanya kemiripan dengan spesies *D. salaccense*

(Accession: LC193510.1) dari *section* Grastidium, dengan persentase identifikasi mencapai 99,45%. Pohon filogenetik sekuen *ITS D. discolor* (*section* Spatulata) menunjukkan adanya kemiripan dengan *D. nindii* (Accession: AY239985.1) dari *section* Spatulata. Persentase identifikasi ke dua spesies ini mencapai 98,67%. Sekuen *rbcL D. discolor* menunjukkan homologi sekuen yang tinggi dibandingkan sekuen *ITS*. Penggunaan sekuen *ITS* pada *Dendrobium discolor* Tanimbar, Maluku menunjukkan hasil yang lebih spesifik karena mampu mendeskrimisasi hingga tingkat spesies dengan beberapa perbedaan basa nuklotida yang berpotensi sebagai *barcode* spesifik spesies *D. discolor*. Berdasarkan hasil tersebut *ITS* dapat direkomendasikan sebagai penanda molekuler untuk menentukan *barcode* dari spesies *Dendrobium discolor* Tanimbar, Maluku.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Identifikasi Anggrek Obat *Dendrobium discolor* Lindl. Menggunakan DNA *Barcoding***” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Ibunda Nurul Mudmainnah, Ayahanda Krisno Nugroho serta Muhammad Daviq Afferoy, Cathrine Nadia Pramesti, Aqila, dan Alwaly atas do'a, dukungan, motivasi, perhatian dan kasih sayang tiada henti sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S1;
2. M. Su'udi, Ph.D selaku dosen pembimbing utama dan Tri Ratnasari, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. Dr. Rike Oktarianti, M.Si dan Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Rendy Setiawan, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan S1;
5. Teknisi laboratorium Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Dina Fitriah S.Si., M. Si. yang telah meluangkan waktu untuk membantu penelitian ini;
6. Rekan-rekan kerja di DNARG: Siti Rohimah, Vita Sindiya, Rosyadi Adnan, S. Si, Luluk Mukarramah, S. Pd., adek-adek DNARG 2016 dan 2017;

7. Teman-teman seperjuangan Biologi 2015 “Biogenesis” yang sudah luar biasa menemani dalam suka duka 4 tahun lebih perjuangan meraih S.Si. dan sahabat IPA1 yang senantiasa memberikan dukungan dan bantuan dalam penyusunan skripsi ini;
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Jember, Juli 2019

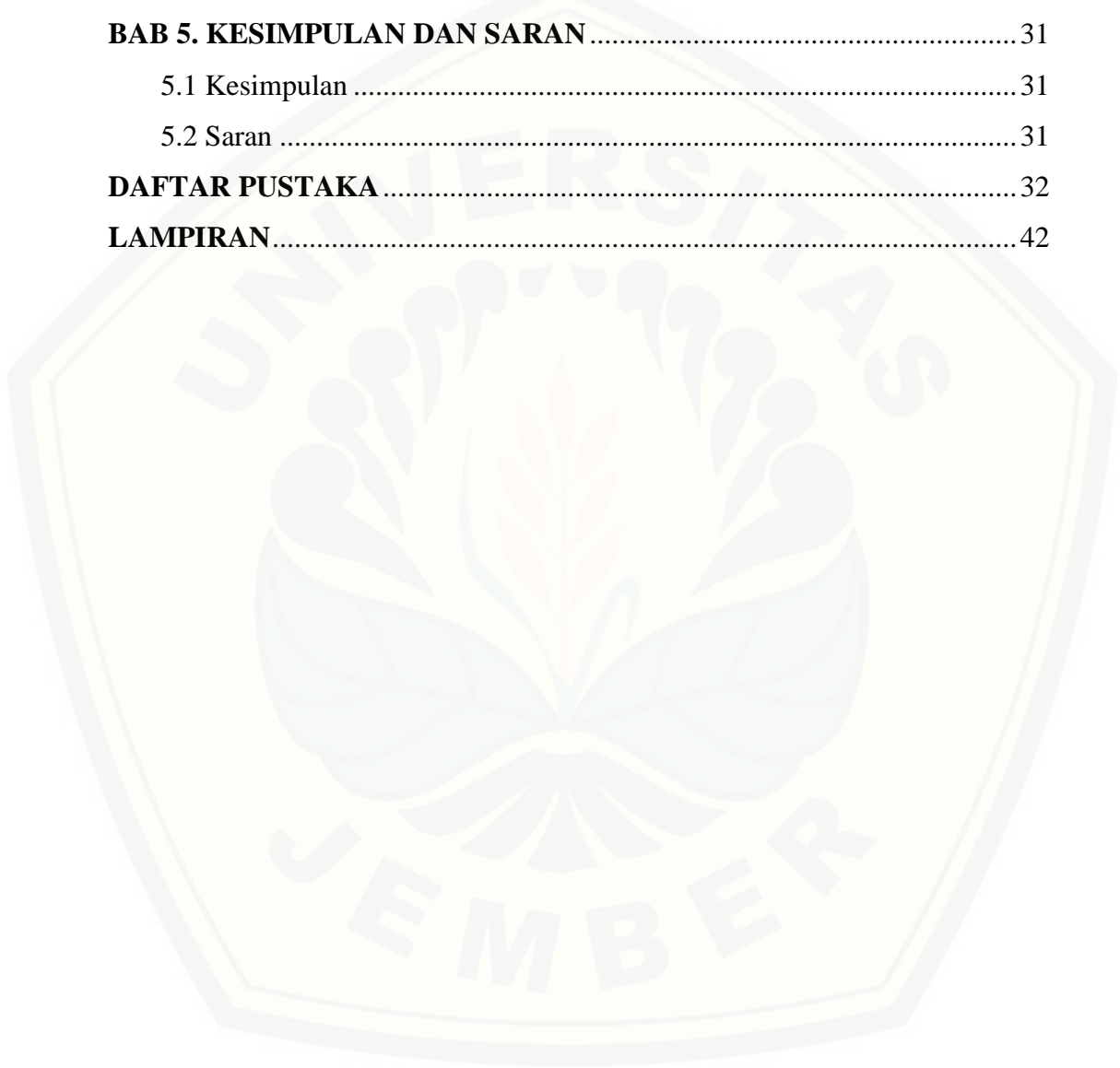
Penulis



DAFTAR ISI

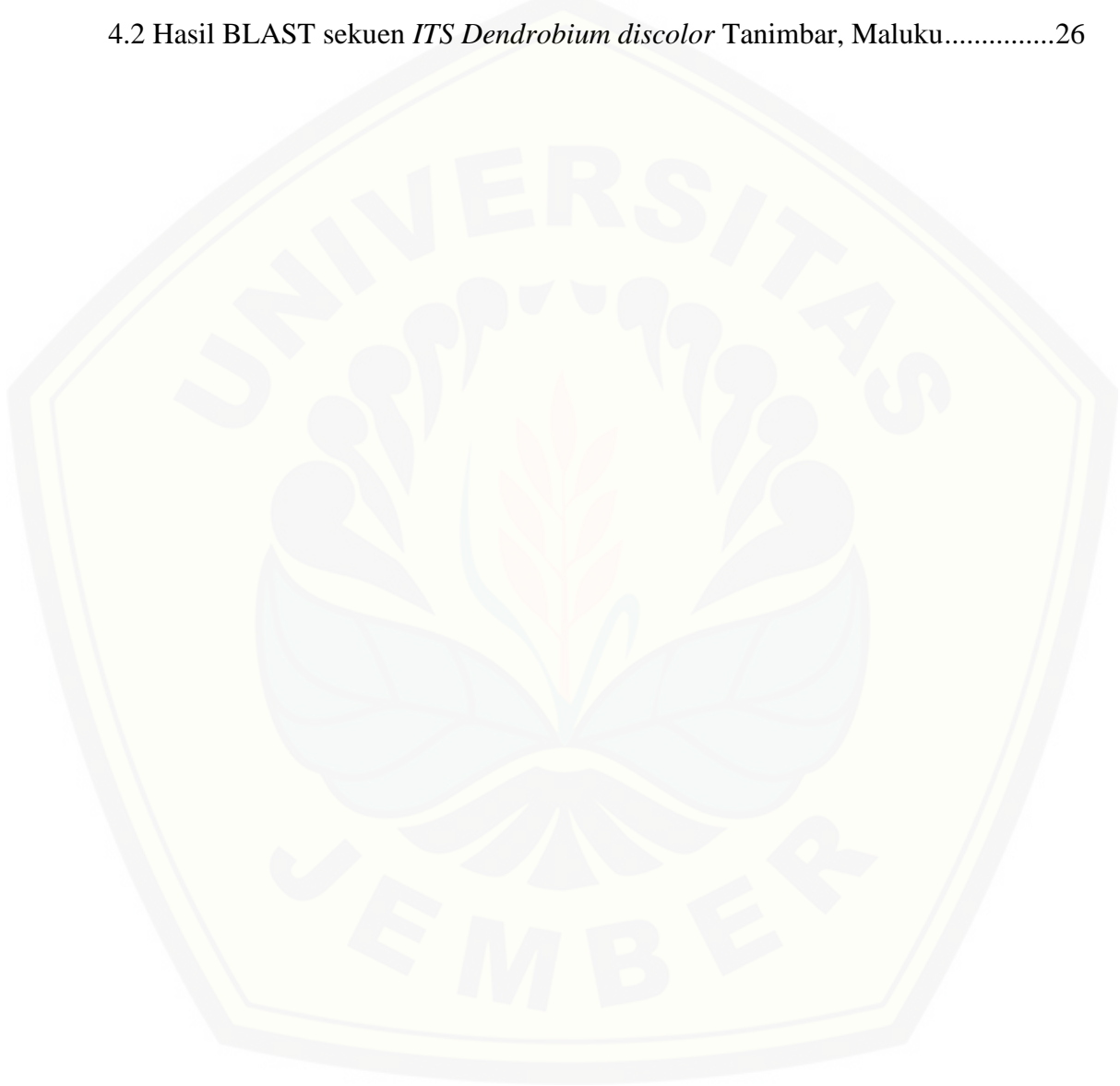
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Batasan Masalah	3
1.5 Manfaat	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Potensi Anggrek <i>Dendrobium</i> Sebagai Obat	5
2.2 Klasifikasi dan Deskripsi Anggrek <i>Dendrobium discolor</i> Lindl	7
2.3 DNA <i>Barcoding</i>	9
BAB 3. METODE PENELITIAN	14
3.1 Waktu dan Tempat	14
3.2 Alat dan Bahan.....	14
3.3 Rancangan Penelitian	15

3.4	Prosedur Penelitian	15
3.5	Analisis Data	19
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1	Karakteristik Morfologi <i>Dendrobium discolor</i> Lindl. Tanimbar	20
4.2	Analisis Molekuler Menggunakan DNA <i>Barcoding</i>	21
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1	Kesimpulan	31
5.2	Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	42



DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Data <i>in Silico</i> Spesies Anggrek Obat Dendrobium di Indonesia dari NCBI....	16
4.1 Hasil BLAST sekuen <i>rbcL Dendrobium discolor</i> Tanimbar, Maluku.....	25
4.2 Hasil BLAST sekuen <i>ITS Dendrobium discolor</i> Tanimbar, Maluku.....	26

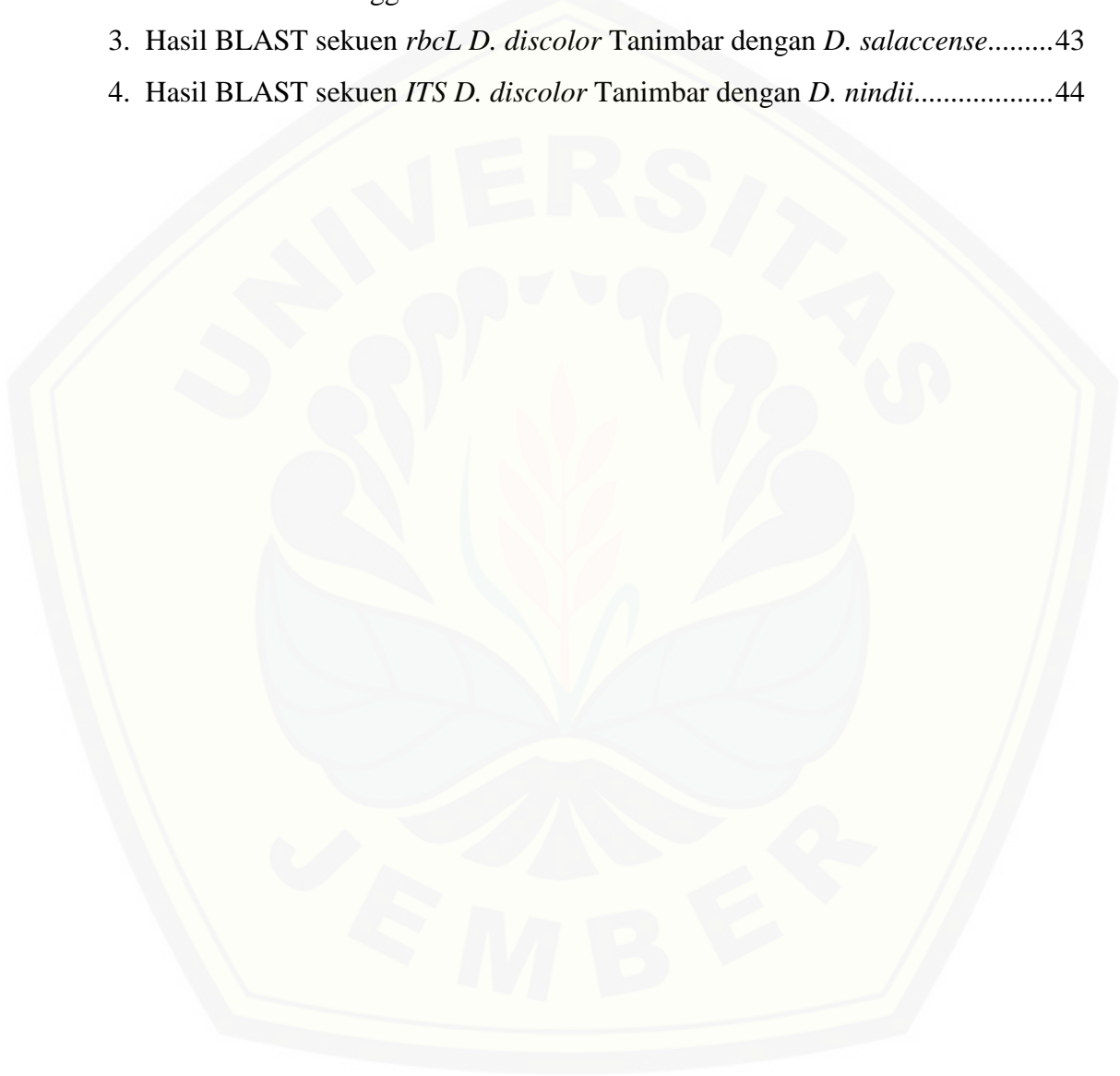


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Grafik Spesies Anggrek Obat di Indonesia.....	7
2.2 Bunga <i>Dendrobium discolor</i>	8
2.3 Diagram Genom Kloroplas (<i>rbcL</i>) dari <i>Dendrobium</i>	12
2.4 Diagram sekuen dari rDNA <i>ITS</i> dari <i>Dendrobium</i>	13
3.1 Skema Alur Penelitian.....	15
4.1 Morfologi <i>Dendrobium discolor</i> Tanimbar, Maluku	20
4.2 Hasil Isolasi DNA Genom <i>Dendrobium discolor</i> Tanimbar	21
4.3 Visualisasi Produk PCR <i>Dendrobium discolor</i> Tanimbar	23
4.4 Visualisasi Hasil Purifikasi <i>Dendrobium discolor</i> Tanimbar	24
4.5 Hasil <i>Alignment</i> <i>Dendrobium discolor</i> Tanimbar	28
4.6 Pohon Filogenetik sekuen <i>rbcL</i> <i>Dendrobium discolor</i> Tanimbar.....	30
4.7 Pohon Filogenetik sekuen <i>ITS</i> <i>Dendrobium discolor</i> Tanimbar.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Sekuen <i>rbcL</i> dari Anggek Obat <i>Dendrobium discolor</i> Tanimbar.....	42
2. Sekuen <i>ITS</i> dari Anggek Obat <i>Dendrobium discolor</i> Tanimbar.....	42
3. Hasil BLAST sekuen <i>rbcL</i> <i>D. discolor</i> Tanimbar dengan <i>D. salaccense</i>	43
4. Hasil BLAST sekuen <i>ITS</i> <i>D. discolor</i> Tanimbar dengan <i>D. nindii</i>	44



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Orchidaceae memiliki sekitar 20.000 spesies yang terdistribusi dalam 899 genera dan mewakili 7% dari total spesies tanaman berbunga yang ada di dunia (Erzurumlu *et al.*, 2018). Orchidaceae memiliki nilai penting tidak hanya dari segi estetika, fitoterapi, dan ekologis tetapi juga dalam bidang terapeutik yaitu penggunaan sebagai obat (Hossain, 2011). Asia memiliki 482 spesies anggrek dengan jumlah spesies terbanyak berasal dari genus *Dendrobium*. Indonesia menjadi salah satu kawasan di Asia yang memiliki distribusi *Dendrobium* terbesar yaitu mencapai 95 spesies. Berdasarkan jumlah tersebut 19 spesies diantaranya termasuk dalam jenis anggrek obat (Soon Teoh, 2016). Salah satu jenis anggrek obat berasal dari Kepulauan Tanimbar, Maluku yaitu *Dendrobium discolor*. Tumbuhan ini telah dimanfaatkan untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti disentri, menghilangkan rasa sakit, mengobati kurap, dan bisul (Pant, 2013; Soon Teoh, 2016).

Identifikasi spesies menggunakan karakter morfologi memiliki beberapa keterbatasan karena beberapa spesies memiliki kecenderungan kemiripan organ vegetatif seperti pada genus *Dendrobium*. Hal ini menyebabkan perlunya identifikasi tambahan menggunakan organ generatif seperti bunga yang tidak mudah didapatkan (Liu *et al.*, 2019). *Dendrobium discolor* Tanimbar secara morfologi organ vegetatif memiliki kemiripan dengan *D. discolor* Merauke (spesies intraspesifik) dan *D. bigibbum* (spesies interspesifik) (Adams, 2015) sehingga dalam identifikasi morfologi tidak mudah dilakukan. Adanya inkonsistensi antara nama lokal spesies (*vernacular names*) maupun sinonim ilmiah menjadi tantangan dalam identifikasi spesies secara konvensional (Ghorbani *et al.*, 2017; Raclariu *et al.*, 2018). Hal ini ditambah dengan adanya kerusakan hutan, perdagangan ilegal spesies yang dapat mengancam keberadaan spesies anggrek di alam sehingga diperlukan identifikasi secara molekuler dengan analisis DNA (Subedi *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015; Parveen *et al.*, 2017).

Pendekatan molekuler digunakan untuk menghasilkan sidik jari DNA (DNA *fingerprint*). Segmen potongan DNA pendek berfungsi sebagai penanda molekuler untuk mempercepat identifikasi spesies secara cepat dan spesifik, terutama dalam verifikasi suatu spesies karena keakuratannya yang tinggi dan tidak dipengaruhi oleh perubahan kondisi lingkungan. Selain itu, analisis molekuler pada tanaman juga dapat digunakan untuk identifikasi spesies langka yang terancam punah, identifikasi bahan herbal yang diperdagangkan, dan mengevaluasi keragaman genetik suatu spesies yang terindeks melalui sekuen DNA (Kim *et al.*, 2014; Raclariu *et al.*, 2018). Penanda molekuler spesifik pada hewan telah disepakati menggunakan gen *COI*. Namun, *COI* kurang efektif digunakan untuk identifikasi spesies tumbuhan secara universal. Hal ini dikarenakan rendahnya tingkat substitusi nukleotida pada genom mitokondria tanaman yang menyebabkan homologi antar sekuen tinggi (Hollingsworth *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014). Sebagai gantinya, penelitian dilakukan untuk memperoleh penanda molekuler spesifik yang melibatkan gen dari kloroplas dan nukleus untuk mendiskriminasi spesies.

Beberapa penelitian identifikasi *Dendrobium* secara molekuler telah dilakukan untuk mendapatkan penanda molekuler spesifik. Penggunaan gen *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase large subunit (rbcL)* telah direkomendasikan oleh *The Consortium for the Barcode of Life (CBOL)* sebagai salah satu kandidat *barcode* universal pada tanaman (Hollingsworth *et al.*, 2011). Tingkat kesuksesan amplifikasi menggunakan sekuen *rbcL* berdasarkan penelitian Singh *et al.*, (2012) mencapai 96,91 % pada 36 spesies *Dendrobium*. Hal ini didukung oleh penelitian Xu *et al.*, (2015) pada 18 spesies *Dendrobium* dari daratan Asia dengan menggunakan sekuen *rbcL* menunjukkan hasil amplifikasi dan sekuensing mencapai 100%. Hal ini menjadikan *rbcL* sebagai salah satu kandidat *barcode* yang digunakan untuk mengevaluasi spesies pada genus *Dendrobium*.

Sekuen *internal transcribed spacer (ITS)* menjadi salah satu sekuen yang paling umum digunakan untuk analisis genetik dan *barcode* pada tanaman (Cheng *et al.*, 2016). *ITS* telah direkomendasikan oleh CBOL sebagai salah

satu kandidat *barcode* pada tanaman (CBOL Plant Working Group, 2009). Amplifikasi 37 anggrek *Dendrobium* dari daratan Asia menggunakan sekuen *ITS* mencapai 100% sedangkan tingkat sekuensing mencapai 96,77% (Xu *et al.*, 2015). Hasil penelitian Parveen *et al.*, (2017) menunjukkan persentase *ITS* dalam mendeskriminasi spesies anggrek obat di India mencapai 94,9% lebih tinggi daripada menggunakan *matK*. Penelitian terbaru pada 13 anggrek obat *Dendrobium* yang telah digunakan sebagai obat tradisional China (TCM) menunjukkan bahwa sekuen *ITS* mampu mengidentifikasi secara cepat dan kuat untuk menganalisis hubungan filogenetik antar spesies. Hasil studi menunjukkan bahwa *ITS* mampu mengidentifikasi secara cepat dan dapat digunakan sebagai segmen yang efektif untuk klasifikasi dan identifikasi secara molekuler pada tingkat genus maupun spesies *Dendrobium* (Liu *et al.*, 2019).

Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi *barcode* potensial melalui penanda molekuler spesifik yang paling efisien untuk anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar, Maluku.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah berdasarkan latar belakang tersebut yaitu bagaimana identifikasi anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. menggunakan DNA *barcoding*?

1.3 Tujuan

Tujuan berdasarkan rumusan masalah tersebut yaitu untuk mengidentifikasi anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. menggunakan DNA *barcoding*.

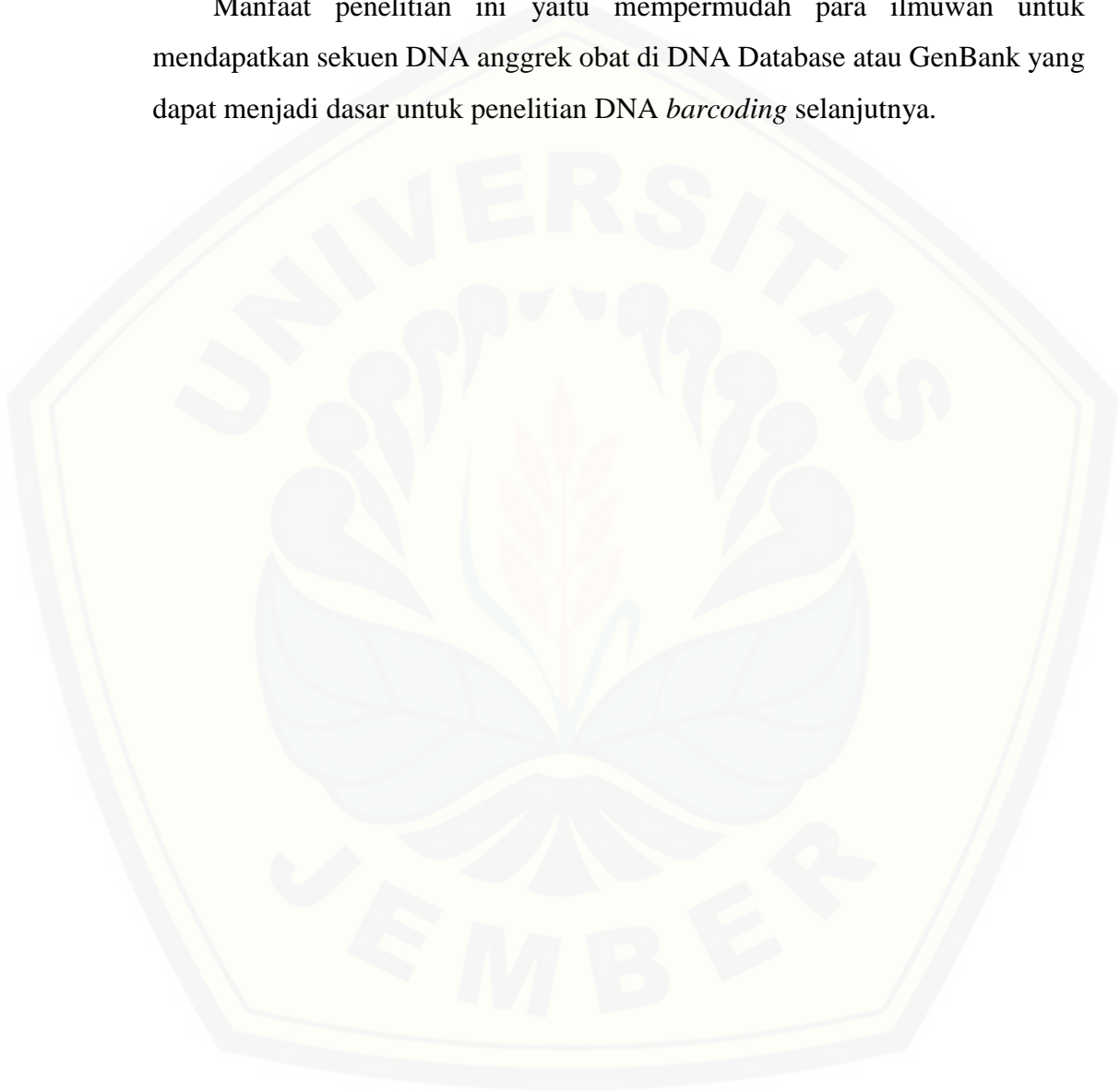
1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah anggrek obat yang digunakan adalah *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar, Maluku. Jenis penanda molekuler spesifik yang digunakan adalah *ribulose-1,5-bisphosphate*

carboxylase - oxygenase Large subunit (rbcL) dan *Internal Transcribed Spacer (ITS)*.

1.5 Manfaat

Manfaat penelitian ini yaitu mempermudah para ilmuwan untuk mendapatkan sekuen DNA angrek obat di DNA Database atau GenBank yang dapat menjadi dasar untuk penelitian DNA *barcoding* selanjutnya.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Potensi Anggrek *Dendrobium* Sebagai Obat

Banyak spesies anggrek telah digunakan sebagai sumber pengobatan tradisional. Tercatat penggunaan anggrek sebagai pengobatan tradisional China (TCM) telah ada sejak 2800 SM. Masyarakat di India telah menggunakan beberapa anggrek untuk penyembuhan dan pengobatan (sifat kuratif) sampai dengan sifat afrodisiak yang dimiliki tumbuhan sejak periode Veda (2000 SM-600 SM). Mayoritas spesies anggrek telah digunakan secara empiris untuk pengobatan penyakit yang berbeda sesuai kultur dan budaya pada tiap daerah (Gutiérrez, 2010; Hossain, 2011; Soon Teoh, 2016).

Salah satu genus anggrek obat yang paling banyak ditemukan di Indonesia adalah *Dendrobium*. Terdapat beberapa komponen bioaktif dari *Dendrobium* seperti alkaloid, bibenzil, fenantrena, fenantrenaquinon, seskiterpenoid, dan polisakarida (Chen *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015; Soon Teoh, 2016) yang menunjukkan berbagai aktivitas biologis dan farmakologi. Hal ini termasuk aktivitas neuroprotektif, aktivitas diuretik, antikanker, anti-inflamasi, anti-rematik, anti-karsinogenik, antimikroba, dan antivirus (Gutiérrez, 2010; Hossain, 2011; Soon Teoh, 2016). Selain itu beberapa spesies *Dendrobium* juga memiliki aktivitas anti-angiogenesis, aktivitas imunomodulator, antioksidan, aktivitas anti-penuaan, aktivitas agregasi antiplatelet, efek pada hipertiroidisme, penghambatan katarakogenesis dan aktivitas hepatoprotektif (Lam *et al.*, 2015; Da Silva dan Ng, 2017).

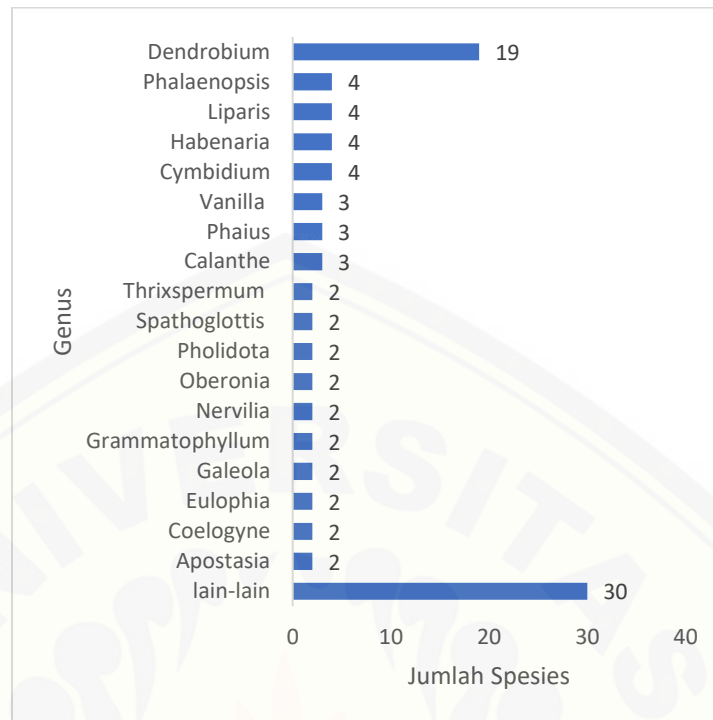
Beberapa jenis anggrek obat *Dendrobium* secara etnobotani telah dimanfaatkan di Indonesia seperti penggunaan *Dendrobium linearifolium* untuk mengobati sakit telinga di Bali (Sujarwo dan Lestari, 2018). Daun *Dendrobium crumenatum* Sw. untuk mengobati tapal pada bisul dan jerawat di Kalimantan Tengah serta sebagai obat sakit telinga di Semenanjung Malaya dan Jakarta (Sadili, 2011; Wahyudiningsih *et al.*, 2017). Penggunaan daun *Dendrobium salaccense* Lindl. oleh suku Batak, Sumatera Utara sebagai obat sakit perut (Silalahi dan Nisyawati, 2015). Sedangkan *D. discolor* telah

dimanfaatkan oleh suku aborigin untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti disentri, menghilangkan rasa sakit, mengobati kurap, dan bisul (Pant, 2013; Soon Teoh, 2016).

Sejumlah penelitian telah dilakukan untuk mengetahui aktivitas antidiabetes dari ekstrak *Dendrobium candidum* yang terbukti menurunkan konsentrasi glukosa darah pada hiperglikemia yang diinduksi epinefrin dan diabetes yang diinduksi streptozotocin pada tikus uji dengan menghambat sekresi glukagon, merangsang sekresi insulin dari sel β , sintesis glikogen, dan glikogenolisis (Jiang *et al.*, 2014). Senyawa denbinobin dari *Dendrobium nobile* memiliki aktivitas antikanker karena dapat menurunkan tingkat ekspresi decoy reseptor-3 (*DcR3*) dan adanya sinergisme dengan Fas ligand (FasL) yang dapat menyebabkan apoptosis sel adenokarsinoma pada pankreas (Yang *et al.*, 2009; Soon Teoh, 2016).

Penelitian lain juga telah dilakukan adalah peranan senyawa moscatilin yang berasal dari batang *Dendrobium*. Studi lebih lanjut menunjukkan senyawa moscatilin memiliki potensi sebagai anti-tumor dan anti-kanker terhadap berbagai jenis kanker terutama kanker paru-paru dengan menghambat resistensi anoikis dalam sel kanker dengan menekan kelangsungan hidup sel Akt dan menurunkan regulasi *cavelolin-1* (Cav-1) serta dapat menghambat *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT). Senyawa moscatilin juga memiliki efek antiproliferatif yang kuat terhadap berbagai jenis sel kanker, tetapi tidak efektif untuk karsinoma hepatoseluler atau kanker hati (Ho dan Chen, 2003; Busaranon *et al.*, 2016).

Berdasarkan beberapa kajian etnobotani yang ada di Indonesia dan penelitian mengenai anggrek obat *Dendrobium*. Genus ini menempati urutan teratas sebagai anggrek obat yang telah dimanfaatkan di Indonesia yaitu sebanyak 19 spesies dari total 97 spesies dari berbagai genus yang disajikan dalam Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Spesies anggrek obat di Indonesia (Sumber: Soon Teoh, 2016)

2.2 Klasifikasi dan Deskripsi Anggrek *Dendrobium discolor* Lindl.

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

Dendrobium discolor Lindl. dikenal sebagai anggrek keriting memiliki cara hidup epifit pada batang pohon. Anggrek ini dikenal sebagai spesies endemik Papua dan Papua Nugini. Schlechter (1912) mengklasifikasikan *Dendrobium* dalam 4 sub genera dan 41 *section* (Adams *et al.*, 2006), *D. discolor* termasuk *section spatulata*. *Section* pada anggrek terletak diantara genus dan spesies. *Section Spatulata* memiliki kemiripan pada struktur morfologi tanaman dan habitat. Anggota *section Spatulata* dapat ditemukan di

dataran rendah pada ketinggian 0-550 mdpl. Terdapat tiga tipe utama daun pada *section* Spatulata yaitu *linear-lanceolate* (lanset atau bagian terlebar sekitar 1/3 dari pangkal dan menyempit di bagian ujung daun dan linear), memiliki lebih banyak daun yang menyebar di sepanjang bagian atas batang, dan *ovate-lanceolate* (Lanset bulat telur) dengan ujung lancip (*acute*) dan *subacute*. Semua spesies dalam *section* ini memiliki pseudobulb atau penebalan bagian batang antara simpul daun membentuk selubung daun (Cribb, 1986).

D. discolor memiliki pseudobulb dengan panjang bervariasi. Pertulangan daun sejajar dengan permukaan daun halus, tepi rata dengan bentuk bulat telur (*ovatus*) sepanjang 5-20 cm. Tipe pembungaan majemuk, racemus, posisi pembungaan diantara dua ketiak daun, memiliki aroma bunga, bentuk bunga keriting dan petal bunga berbentuk linear bulat telur sungsang (*ovate-lanceolate*). Bunga berwarna kuning, kuning kecokelatan sampai dengan cokelat (Tjitrosoepomo, 1985; Liddle, 1990; Millar, 1999; Kartikaningrum *et al.*, 2004; Soon Teoh, 2016). Anggrek ini terdistribusi mulai dari selatan pantai Papua, Papua Nugini sampai dengan Australia (Schuiteman, 2013).



Gambar 2.2. Bunga *Dendrobium discolor* (IOSPE, 2019)

Beberapa sinonim yang dimiliki anggrek *Dendrobium discolor* Lindl. antara lain *Callista undulata* Kuntze., *D. arachnanthe* Kraenzl., *D. discolor* subsp. *discolor*, *D. elobatum* Rupp., *D. undulans* Bakh.f., *D. undulatum* var. *albertisianum* F.Muell., *D. undulatum* var. *carterae* F. M. Bailey, *Durabaculum albertisiana* (F.Muell.) M.A. Clem. & D.L. Jones, *D.*

arachnanthe (Kraenzl.) M.A. Clem. & D.L. Jones, dan *D. undulatum* M.A. Clem. & D.L. Jones (The Plant List, 2019).

2.3 DNA *Barcoding*

Analisis DNA *barcoding* menjadi alternatif dalam identifikasi spesies secara molekuler karena keakuratan, kecepatan, dan spesifikasi yang dimiliki berdasarkan sekuen DNA. DNA *barcoding* bahkan dapat digunakan untuk mengetahui asal DNA yang diekstraksi, seperti bahan yang ditemukan dalam kotoran, serbuk sari, herbarium yang terdegradasi, dan *sub-fossil* yang terawetkan dalam lapisan es *permafrost* (lapisan es yang tetap membeku di bawah tanah di daerah kutub). DNA *barcode* tanaman telah diimplementasikan di berbagai bidang, misalnya dalam sistematika molekuler, inventarisasi keanekaragaman hayati, forensik satwa liar, deteksi pemalsuan bahan, serta untuk verifikasi produk herbal (Xu *et al.*, 2015; Ghorbani *et al.*, 2016; Ghorbani *et al.*, 2017; Parveen *et al.*, 2017).

Keunggulan analisis molekuler berbasis DNA *barcoding* adalah dapat mengidentifikasi suatu keanekaragaman hayati sampai dengan tingkat spesies walaupun hanya menggunakan sedikit fragmen atau bagian dari organisme (sampel). Selain itu, analisis dapat dilakukan menggunakan sampel yang berasal jaringan, sel, dan turunan lainnya yang tidak memiliki fitur diagnostik secara morfologis. Aplikasi penggunaan DNA *barcoding* mampu mengidentifikasi variasi dan spesies, meningkatkan pengetahuan taksonomi, dan ekologis tentang spesies yang terancam punah, memantau eksploitasi yang berlebihan dan perdagangan ilegal melalui peningkatan pendekatan molekuler, serta pengawasan dan otentikasi produk herbal (Davis dan Borisenko, 2017; Ghorbani *et al.*, 2017; Raclariu *et al.*, 2018).

Segmen penanda molekuler spesifik DNA dari genom tumbuhan yang berfungsi sebagai pola *barcode* telah diusulkan sebagai salah satu teknologi untuk mempercepat identifikasi spesies yang akurat. Karakterisasi DNA genom dilakukan menggunakan penanda molekuler yang disebut primer. Sebuah *barcode* khusus berasal dari potongan sekuen DNA yang telah

terstandarisasi dan komplemen terhadap sekuen yang akan diamplifikasi dalam mesin PCR. Hal ini dikarenakan *barcode* spesifik berasal dari urutan pasangan genom dari famili target atau genera (Li *et al.*, 2014).

Terdapat beberapa genom yang dapat digunakan untuk analisis filogenetik pada tanaman yaitu genom kloroplas, genom mitokondria, dan genom nukleus (CBOL Plant Working Group, 2009; Patwardhan *et al.*, 2014). Identifikasi lokus dalam genom kloroplas akan sangat berguna untuk sistematika molekuler dan *barcode* DNA. *Internal Transcribed Spacer* dari DNA *nucleus ribosomal (nrITS)* adalah genom nukleus yang digunakan sebagai salah satu kandidat penanda molekuler spesifik (Hollingsworth *et al.*, 2011). Sedangkan pada genom kloroplas seperti gen *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase Large subunit (rbcL)* telah digunakan sebagai salah satu kandidat penanda untuk DNA *barcode* tanaman (CBOL Plant Working Group, 2009); Dong *et al.*, 2012).

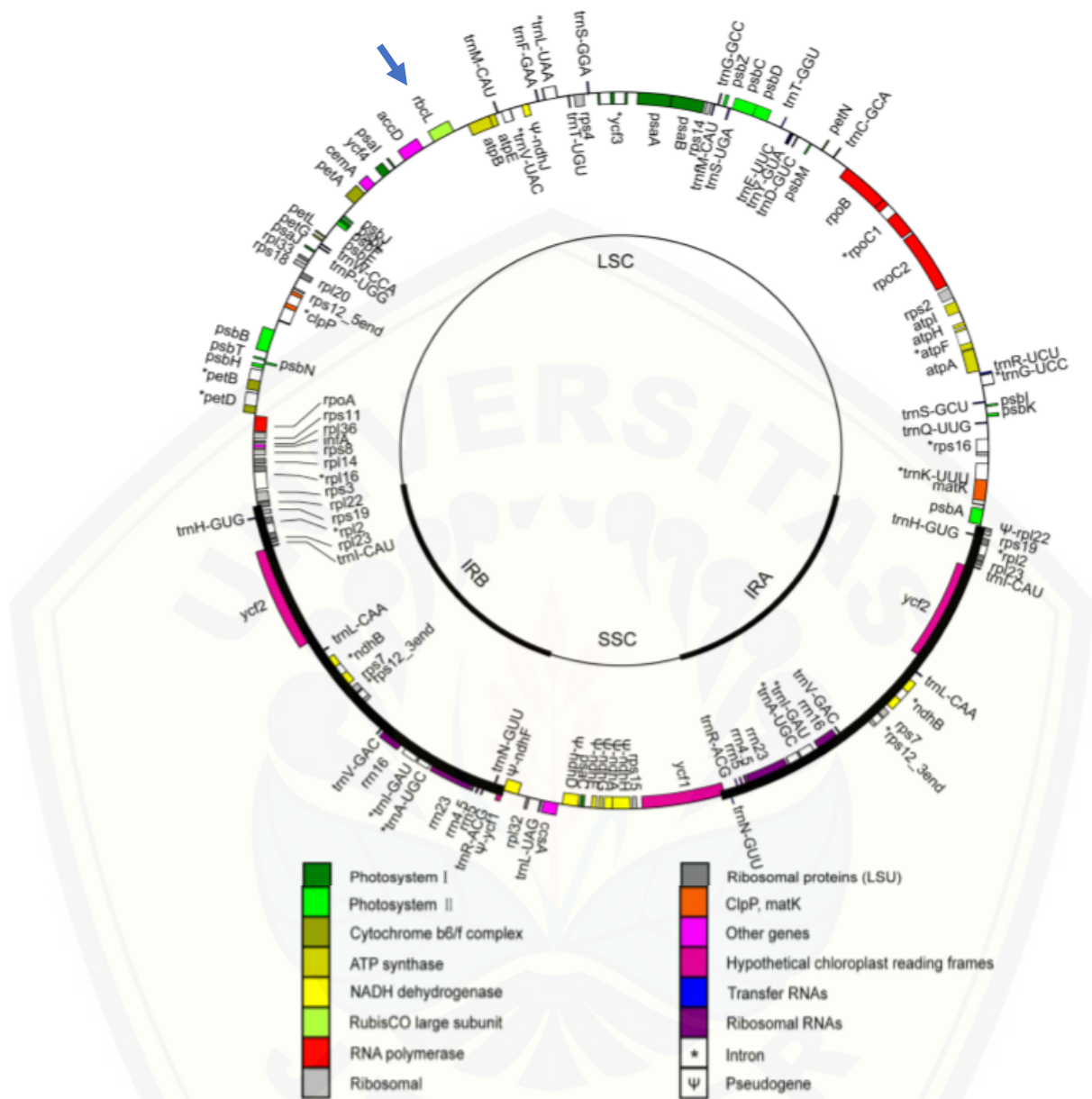
Primer adalah oligonukleotida yang terdiri atas 18 sampai dengan 24 basa, yang berfungsi sebagai prekursor sintesis DNA dari cetakan DNA. *Melting temperature* (T_m) pada primer adalah temperatur ketika 50% primer telah dapat menempel pada utas pasangannya. T_m dipengaruhi oleh rasio GC/AT primer, makin besar rasio maka makin tinggi T_m primer. Oligonukleotida dengan panjang 20 basa dengan 50% rasio G+C konten memiliki nilai T_m pada kisaran 56-62°C. Satu set primer diperlukan pada PCR yang terletak pada masing-masing ujung fragmen DNA target, yaitu primer *forward* dan primer *reverse* yang dikatalisis oleh DNA *polymerase*. Pasangan primer yang tidak tepat dapat menjadi penyebab kegagalan amplifikasi. Temperatur yang terlalu rendah menghasilkan amplikon non-spesifik (non-target) dan mengurangi efisiensi amplifikasi karena primer yang telah menempel (*annealing*) terlepas bila suhu dinaikkan pada saat sintesis (*elongation*) DNA (Dieffenbach *et al.*, 1993).

Syarat sekuen pendek DNA dapat dijadikan sebagai penanda molekuler yaitu sifat yang universal atau terdistribusi merata dalam semua genom DNA tanaman, memiliki ukuran yang pendek (300-600 bp) sehingga mudah

diampifikasi dan disekuensing. Selain itu, memiliki kekuatan diskriminasi yang tinggi sehingga dapat menggambarkan keragaman karakter hingga tingkat spesies. Penanda molekuler secara teknik dirancang sederhana, cepat dan murah serta butuh sampel yang sedikit, sekuen DNA bersifat netral dan stabil atau tidak terpengaruh kondisi lingkungan, serta tidak dipengaruhi oleh regulasi perkembangan tanaman (Dieffenbach *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 2009; Hollingsworth *et al.*, 2011; Patwardhan *et al.*, 2014). Berdasarkan hal tersebut, terdapat beberapa penanda molekuler yang digunakan antara lain gen *rbcL* dan *ITS*.

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

Gen *rbcL* terletak pada genom kloroplas dapat digunakan untuk mengetahui hubungan filogenetik pada tingkat taksonomi yang lebih tinggi. Gen *rbcL* terdiri dari ~1428 pasang basa (bp) dan bersifat universal untuk semua tanaman kecuali pada beberapa parasit (Patwardhan, *et al.*, 2014). *The Consortium for the Barcode of Life (CBOL)* merekomendasikan gen plastid *rbcL* dan *matK* sebagai primer standar untuk identifikasi spesies tumbuhan (Hollingsworth *et al.*, 2011). Gen *rbcL* mengkode subunit besar Rubisco yang berperan dalam fotosistem II, sedangkan subunit kecil dikodekan oleh gen *rbcS*. Gen ini telah digunakan secara luas dalam studi sistematika tanaman darat, khususnya Angiospermae (Patwardhan *et al.*, 2014). Gen *rbcL* lebih sedikit mengalami delesi dan insersi dengan tingkat rekombinasi genetik yang lebih rendah dibandingkan dengan gen yang berasal dari nukleus sehingga memiliki tingkat divergensi rendah (Hasebe *et al.*, 1994). Keuntungan menggunakan gen *rbcL* adalah mudah untuk diampifikasi menggunakan mesin PCR, disekuensing, dan disejajarkan (*alignment*) tetapi kekuatan diskriminasinya sederhana (Li *et al.*, 2014; Patwardhan *et al.*, 2014). Berikut ini merupakan diagram dari genom kloroplas sekuen *rbcL* yang ditunjukkan oleh Gambar 2.3.

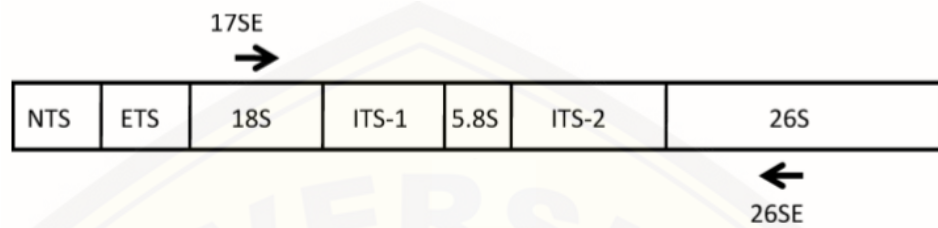


Gambar 2.3. Diagram genom kloroplas (*rbcL*) dari *Dendrobium* (Lou *et al.*, 2014)

b. Internal Transcribed Spacer (*ITS*)

Internal Transcribed Spacer dari DNA *nucleus ribosomal (nrITS)* adalah genom nukleus yang digunakan sebagai salah satu kandidat primer spesifik. *ITS* memiliki kemampuan sebagai penanda filogenetik yang kuat pada tingkat spesies. Hal ini ditunjukkan dari tingkat divergensi interspesifik yang tinggi dengan panjang 1500 pasang basa (bp) yang berlokasi di intron *trnK* nukleus (Hollingsworth *et al.*, 2011). Selain itu, *ITS* memiliki kekuatan diskriminatif

lebih tinggi daripada daerah plastid pada tingkat taksonomi spesies dalam sistematika molekuler tanaman (Li *et al.*, 2014). Diagram sekuen dari nrDNA *ITS* dengan lokasi primer yang digunakan dalam penelitian ini ditunjukkan oleh Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Diagram sekuen dari nrDNA *ITS* (Takamiya *et al.*, 2011)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari bulan Oktober 2018 sampai dengan bulan Mei 2019. Sampel daun anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar, Maluku diperoleh dari *nursery* DD Orchid Batu, Malang. Isolasi DNA genom, analisis PCR dan purifikasi produk hasil PCR dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

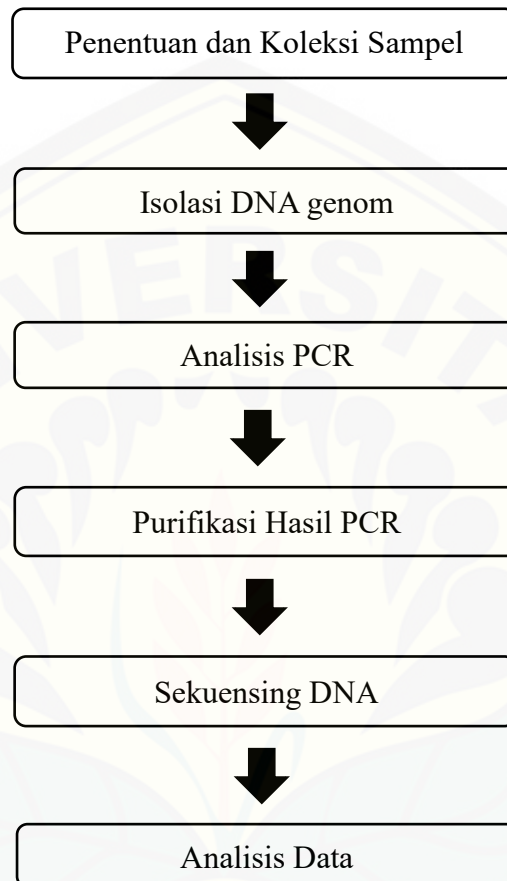
3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan untuk penelitian ini meliputi mortal, pistil, mikropipet volume 10 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl. *yellow tip*, *blue tip*, *UV-Transilluminator*, neraca digital, spatula, pH meter, mesin PCR, *magnetic stirrer*, vortek, thermo shaker, PCR tube, *beaker glass*, gelas ukur, *stacker microtube* 1,5 ml, tabung Erlenmeyer, *microtube* 1,5 ml, PCR *microtube*, alat *micro-centrifuge*, desikator, *hot plate*, satu set alat elektroforesis, dan lemari pembeku -20°C.

Bahan yang digunakan adalah sampel daun anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar, Maluku. NEXprep™ Plant DNA Mini Kit (NEX™ Diagnostics, Korea), isopropanol, *buffer* CTAB, kloroform, master mix untuk PCR, ddH₂O, primer *rbcL* forward (5'-ATGTCACCACAAACAGAG ACTAAAGC-3') dan primer *rbcL* reverse (5'-GTAAAATCAAGTCCA CCRCG-3'). Primer *ITS* forward (5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGA AGTGTTTCG-3') dan primer *ITS* reverse (5'-TAGAATTCCTCCGGTTCGCT CGCCGTTAC-3'), es gel, agarosa, *Ethidium Bromide* (EtBr), RNase, *buffer* TE, *buffer* Tris Acetic-EDTA (TAE 50x), etanol 70%, DNA marker 1 kb dan 100 bp, serta PCR *purification Kit* (Jena Bioscience, Jerman).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode deskriptif melalui beberapa tahapan. Adapun alur penelitian dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Penentuan Sampel

Sekuen DNA anggrek obat *Dendrobium* di Indonesia secara *in silico* dikoleksi berdasarkan *database* yang tersedia di GenBank (NCBI) dengan cara menulis nama spesies dan gen yang akan diteliti (*rbcL* dan *ITS*). Berdasarkan hasil pencarian apabila salah satu data spesies tidak ditemukan maka, spesies tersebut dimasukkan ke dalam daftar sampel yang akan dianalisis. Selanjutnya, kunjungan dilakukan ke *nursery* DD orchid Batu, Malang untuk memperoleh sampel spesies anggrek obat *Dendrobium* yang akan dianalisis.

Tabel 3.1 Data *in silico* spesies Anggrek Obat *Dendrobium* di Indonesia dari NCBI

Nama Spesies	<i>rbcL</i>			<i>ITS</i>		
	Aksesi	Length (bp)	Asal	Aksesi	Length (bp)	Asal
<i>Dendrobium acinaciforme</i>	FJ216578	703 ^P	CN	AB847640	825 ^P	JP
<i>Dendrobium appendiculatum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Dendrobium blumei</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Dendrobium crumenatum</i>	DQ449472	613 ^P	TW	AB972336	889 ^F	TH
<i>Dendrobium cumulatum</i>	KJ944595	669 ^P	TH	AB972356	892 ^F	TH
<i>Dendrobium discolor*</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Dendrobium eriiflorum</i>	-	-	-	AB593556	859 ^P	JP
<i>Dendrobium heterocarpum</i>	KF177614	1265 ^P	CN	JN388593	663 ^P	CN
<i>Dendrobium hymenanthum</i>	KC660978	484 ^P	MY	KC507768	447 ^P	MY
<i>Dendrobium indivisum</i>	-	-	-	AY239972	667 ^F	AU
<i>Dendrobium leonis</i>	KC559780	489 ^P	MY	AB593597	899 ^P	JP
<i>Dendrobium linearifolium</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Dendrobium macraei</i>	JN005432	604 ^P	IN	-	-	-
<i>Dendrobium pachyphyllum</i>	KC660979	484 ^P	MY	AB593624	900 ^P	JP
<i>Dendrobium planibulbe</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Dendrobium plicatile</i>	-	-	-	KY966573	642 ^P	CN
<i>Dendrobium purpureum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Dendrobium subulatum</i>	KC559781	495 ^P	MY	KC507766	385 ^P	MY
<i>Dendrobium umbellatum</i>	-	-	-	-	-	-

Keterangan: AU = Australia; CN = China; IN = India; JP = Jepang; MY=Malaysia; TW =Taiwan; TH = Thailand; F = Full; P = Parsial; Tanda bintang (*) merupakan spesies yang diteliti.

3.4.2 Isolasi DNA Genom

3.4.2.1 Isolasi Genom menggunakan metode *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB)

Sampel daun segar anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar, Maluku digerus sebanyak 0,5 gram dengan penambahan 3 ml *buffer* CTAB dalam mortal dan pistil steril sampai halus. Selanjutnya, 1 ml supernatan dan dipindahkan ke 1,5 ml *microtube* baru. Inkubasi dilakukan pada suhu 65°C selama 1 jam. Kloroform sebanyak 500 µl ditambahkan dan dihomogenkan. Inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. *Centrifuge* pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 650 µl supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 5 µl RNase. Inkubasi dilakukan

pada suhu ruang selama 15 menit. Kemudian, ditambahkan 600 µl isopropanol dingin dan dihomogenkan. *Centrifuge* dilakukan pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 21 menit. *Pellet* diambil dan ditambahkan 500 µl etanol 70%. lalu dihomogenkan. *Centrifuge* pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. *Pellet* DNA dikeringkan menggunakan alat desikator selama 30 menit setelah etanol 70% dibuang. Terakhir, *pellet* DNA diresuspensi dengan penambahan 50 µl *buffer* TE dan disimpan pada suhu -20°C (Doyle dan Doyle, 1990).

3.4.2.1 Isolasi Genom menggunakan Kit

Penggerusan sampel daun 0,8 gram dari *µl discolor* Lindl. Tanimbar, Maluku dilakukan menggunakan 400 µl GP1 *buffer* dari NEXprep™ Plant DNA Mini Kit (NEX™ Diagnostics, Korea). Selanjutnya 400 µl supernatan dipindah ke *microtube* 1,5 ml dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit (dihomogenkan setiap 5 menit sekali). GP2 *buffer* ditambahkan sebanyak 100 µl dan dihomogenkan. Inkubasi di es selama 3 menit. Supernatan sebanyak 500 µl dimasukkan dalam *Filter* kolom yang telah diletakkan di 2 ml *collection tube*. *Centrifuge* pada suhu 25°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit 30 detik. Lalu, sebanyak 400 µl supernatan dipindahkan ke *microtube* 1,5 ml. Kemudian, GP3 *buffer* ditambahkan sebanyak 600 µl dan dihomogenkan. Supernatan dipindahkan ke DNA *spin* kolom yang telah dipasang pada 2 ml *collection tube*. *Centrifuge* dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 25°C selama 2 menit 30 detik. Supernatan dibuang dan DNA *spin* kolom dan dipasang kembali ke 2 ml *collection tube*.

Sebanyak 400 µl PW1 *buffer* ditambah dan di-*centrifuge* pada suhu 25°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit 30 detik. Supernatan dibuang dan DNA *spin* kolom dipasang kembali ke 2 ml *collection tube*. Ditambah 400 µl PW2 *buffer* dan di-*centrifuge* pada suhu 25°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit 30 detik. Selanjutnya, supernatant dibuang dan DNA *spin* kolom dipasang kembali ke 2 ml *collection tube*. DNA *spin* kolom dipasangkan pada 1,5 ml *tube* baru. *Elution buffer* diitambahkan sebanyak 50 µl dan

diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. *Centrifuge* pada suhu 25°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit 30 detik. Supernatan dipindahkan ke 1,5 ml *tube* baru dan disimpan pada suhu -20°C.

3.4.3 Analisis PCR

Analisis PCR dilakukan dengan mereaksikan 2x PCR Master mix, forward primer, reverse primer, ddH₂O, dan *templete* DNA di atas es (*on ice*). Volume total 20 µl untuk setiap 1 sampel dalam PCR *tube* dengan rincian 2x PCR Master mix sebanyak 10 µl, primer F dan R masing-masing sebanyak 1 µl, *templete* DNA 1,5 µl dan 6,5 µl ddH₂O. Kondisi *polymerase chain reaction* (PCR) terdiri atas Pre-denaturasi dengan suhu 95°C selama 5 menit. Denaturasi dengan suhu 95°C selama 30 detik. Annealing dengan suhu 53°C selama 30 detik. Extension dengan suhu 72°C selama 1 menit, 15 detik. Final extension dengan suhu 72°C selama 5 menit dan hold dengan suhu 16°C. PCR dilakukan sebanyak 35x siklus.

3.4.4 Visualisasi Hasil PCR

Hasil PCR divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan 1,25% gel agarosa (0,625 gram agarose dalam 50 ml *buffer* TAE (*Tris Acetic-EDTA*) 1x dengan penambahan EtBr sebanyak 1 µl. Sebanyak 350 ml *buffer* TAE (*Tris Acetic-EDTA*) 1x digunakan sebagai *running buffer*. Volume marker yang dimasukkan sebanyak 3 µl sedangkan volume hasil produk PCR sampel yang dimasukkan pada tiap sumuran sebanyak 5 µl. Waktu yang dibutuhkan untuk elektroforesis selama 40 menit dengan tegangan 100 volt. Visualisasi dilakukan dengan meletakkan gel di atas *UV-transilluminator* untuk mengetahui ada tidaknya pita DNA hasil produk PCR.

3.4.5 Purifikasi Produk PCR

Produk hasil PCR yang telah *dirunning* dengan elektroforesis dapat dipurifikasi apabila pita DNA tebal. Purifikasi Produk PCR dilakukan menggunakan PCR *purification Kit* (Jena Bioscience, Jerman). Sebelum purifikasi dilakukan, produk hasil PCR ditambahkan aquades steril hingga

volumenya menjadi 100 µl. Tahap pertama yang dilakukan adalah meletakkan *spin* kolom ke *collection tube* 2ml. Selanjutnya ditambahkan 100 µl *Activation buffer* dan *centrifuge* pada suhu 25°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik. Tambahkan 3 volume *Binding buffer*, 2 volume isopropanol (3:2) dan sampel ke dalam *Activation spin* kolom kemudian dihomogenkan. *Centrifuge* pada suhu 25°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik. Kemudian, supernatan yang ada di dalam *collection tube* dibuang dan pasang kembali ke *spin* kolom. *Washing buffer* sebanyak 700 µl ditambahkan dan *centrifuge* pada suhu 25°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik. Supernatan yang ada di dalam *collection tube* dibuang dan pasang kembali ke *spin* kolom. *Centrifuge* pada suhu 25°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit untuk membuang residu dari *washing buffer*. *Spin* kolom dipindahkan ke 1,5 ml *microtube baru*. Tambahkan 50 µl *elution buffer* di tengah kolom membran. Inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit dan *centrifuge* pada suhu 25°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit.

3.4.6 Sekuensing

Penentuan urutan DNA hasil PCR yang telah dipurifikasi dilakukan dengan mesin DNA sekuenser ke 1st BASE di Singapura.

3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan metode komputasi, yaitu dengan melakukan analisis filogenetik dan identifikasi spesies menggunakan beberapa software seperti *GenBank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) untuk mengkonfirmasi sekuen DNA genomik anggrek obat. Urutan analisis data untuk setiap wilayah disejajarkan (*Alignment* sekuen) menggunakan software *clustalX 2.1* (Jeanmougin *et al.*, 1998). Konstruksi pohon filogenetik dianalisis menggunakan software *The Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGAX) (Kumar *et al.*, 2008).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

Simpulan berdasarkan hasil dan pembahasan menunjukkan bahwa identifikasi anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. menggunakan DNA *barcoding* dengan primer *rbcL* dan *ITS* dapat mengamplifikasi DNA *template* dengan baik. Ukuran produk PCR *rbcL* berkisar 600 bp sedangkan ampikon *ITS* berkisar 900 bp. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik sekuen *rbcL* *D. discolor* (*section* *Spatulata*) menunjukkan adanya kemiripan dengan spesies *D. salaccense* (Accession: LC193510.1) dari *section* *Grastidium*, dengan persentase identifikasi mencapai 99,45%. Pohon filogenetik sekuen *ITS* *D. discolor* (*section* *Spatulata*) menunjukkan adanya kemiripan dengan *D. nindii* (Accession: AY239985.1) dari *section* *Spatulata*. Persentase identifikasi ke dua spesies ini mencapai 98,67%. Sekuen *rbcL* *D. discolor* menunjukkan homologi sekuen yang tinggi dibandingkan sekuen *ITS*. Penggunaan sekuen *ITS* pada *Dendrobium discolor* Tanimbar menunjukkan hasil lebih spesifik yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan basa nuklotida yang berpotensi sebagai *barcode* spesifik spesies *D. discolor*. Sekuen *ITS* juga mampu mendiskriminasi sampai dengan tingkat spesies. Berdasarkan hasil tersebut maka *ITS* dapat direkomendasikan sebagai penanda molekuler untuk menentukan *barcode* dari spesies *Dendrobium discolor* Tanimbar, Maluku.

5.2 SARAN

Saran berdasarkan penelitian yang telah dilakukan yaitu perlu dilakukan optimasi metode CTAB untuk memperoleh DNA genom yang baik untuk proses amplifikasi dan sekuensing DNA anggrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar, Merauke Lindl.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, P. B., J. M. Burke, dan S. D. Lawson. 2006. Systematic analysis of *Dendrobium* Swartz section *Dendrocoryne* in the Australian region. *Pl. Syst. Evol.* 260: 65–80.
- Adams, P. B. 2015 *Dendrobium bigibbum* (sect. *Phalaenanthe*) in Australia- Analysis of Diagnostic Characters, Review of Taxa and A New Classification. *Kew Bulletin.* 70: 1-17.
- Ames, O., dan D. S. Correll. 1874. *Orchids of Guatemala and Belize*. New York: Dever Publications, Inc.
- 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: 1-14.
- Busaranon, K., P. Plaimee, B. Sritularak, dan P. Chanvorachote. 2016. Moscatilin Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Sensitizes Anoikis in Human Lung Cancer H460 Cells. *J Nat Med.* 70:18-27.
- 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, Y. G., H. Yu, dan Y. Liu. 2014. Chemical Constituents from *Dendrobium brymerianum* Rchb. F. *Biochemical Systematics and Ecology.* 57: 175-177.
- Cheng T., C. Xu, L. Lei, C. Li, Y. Zhang, dan S. Zhou. 2016. Barcoding the Kingdom Plantae: New PCR Primers for ITS Regions of Plants with Improved Universality and Specificity. *Molecular Ecology Resources.* 16: 138–149.
- Cribb P. J. 1986. A Revision of *Dendrobium* sect. *Spatulata* (Orchidaceae). *Kew Bulletin.* 41(3): 615-692.

- Cribb PJ. 1983. A Revision of *Dendrobium* sect. *Latouria* (Orchidaceae). *Kew Bulletin*. 38(2): 229-306.
- Csaik, U. M., H. Bastian, R. Brettschneider, S. Gauch, A. Meir, M. Schauerte, F. Scholz, C. Sperisen, B. Vornam, dan B. Ziegenhagen. 1998. Comparative Analysis of Different DNA Extraction Protocols: A Fast, Universal Maxi-Preparation of High-Quality Plant DNA for Genetic Evaluation and Phylogenetic Studies. *Plant Molecular Biology Reporter*. 16: 69–86.
- Da Silva J. A. T., dan T. B. Ng. 2017. The Medicinal and Pharmaceutical Importance of *Dendrobium* Species. *Appl Microbiol Biotechnol*. 101: 2227-2239.
- Davis, K dan A Borisenko. 2017. *Introduction to Access and Benefit-Sharing and the Nagoya Protocol: What DNA Barcoding Researchers Need to Know*. Sofia: Pensoft Publishers.
- Demeke, T., dan G. R Jenkins. 2010. Influence of DNA extraction Methods, PCR Inhibitors and Quantification Methods on Real-Time PCR Assay of Biotechnology-Derived Traits. *Anal. Bio Anal. Chem*. 396: 1977-1990.
- Dieffenbach, CW., T M Lowe, dan G S Dveksler. 1993. General Concepts for PCR Primer Design. *Genome Research*. 3: 30-37.
- Dong, W., J. Liu, J. Yul, L. Wang, dan S. Zhou. 2012. Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PLoS ONE*. 7(4): 1-9.
- Doyle J. J., dan J. L. Doyle. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*. 12(1): 12-13.
- Erzurumlu, G. S., N. Sultana, M. Vural, dan S. Serç. 2018. Genetic and Phenotypic Variation Among Turkish Terrestrial Orchid Species As Revealed by RAPD and Morphological Characteristics. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 42(1): 1-10.

- Fernando, S. S. dan P. Ormerod. An Annotated Checklist of the Orchids of Sri Lanka. *Rheedea*. 18(1): 1-28.
- Frederick M. A., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, dan K. Struhl. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts: John Wiley & Sons, Inc.
- Ghorbani, A., B. Gravendeel, S. Selliah, S. Zarré, dan H. D. Boe. 2016. DNA barcoding of tuberous Orchidaceae: A Resource for Identification of Orchids Used in Salep. *Molecular Ecology Resources*. 17(2): 342-352.
- Ghorbani, A., Y. Saeedi, dan H. D. Boe. 2017. Unidentifiable by Morphology: DNA Barcoding of Plant Material in Local Markets in Iran. 2017. *PLoS ONE*. 12(4): 1-16.
- Govaerts, R. 2003. World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS: 1-71827 (WCSP). The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kewscience. <https://wcsp.science.kew.org> [Diakses pada 9 Mei 2019]
- Gutiérrez, R. M. P. 2010. Orchids: A Review of Uses in Traditional medicine, its Phytochemistry and Pharmacology. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(8): 592-638.
- Hasebe, M., T. Omori, M. Nakazawa, T. Sano, M. Kato, dan K. Iwatsuki. 1994. *rbcL* Gene Sequences Provide Evidence for The Evolutionary Lineages of Leptosporangiate Ferns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90(1): 5730-5734.
- Ho, C. K., dan C. C. Chen. 2003. Moscatilin from the Orchid *Dendrobium loddigesii* Is a Potential Anticancer Agent. *Cancer Investigation*. 21(5): 729-736.
- Hollingsworth P. M., S. W. Graham, dan D. P. Little. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS One*. 6(5): 1-8.
- Hossain, M. M. 2011. Therapeutic Orchids: Traditional Uses and Recent Advances- An Overview. *Fitoterapia*. 82(1): 102-140.

- Innis, M., K. Myambo, D. Gelfand, dan M. Brow. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and Direct Sequencing of Polymerase Chain Reaction-Amplified DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 85: 9436-9440.
- 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.
- Jiang, W., B. Jiang, N. Mantri., L. Mao., H. Lu, dan Z. Tao. 2014. Comparative Eco physiological Analysis of Photosynthesis, Biomass Allocation, Polysaccharide, and Alkaloid Content in Three *Dendrobium candidum* Cultivars. *Plant Omics Journal*. 7(2): 117-122.
- Jones, W. E., A.R. Kuehnle, dan K. Arum. 1998. Nuclear DNA Content of 26 Orchid (Orchidaceae) Genera with Emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany*. 82: 189-194.
- Kartikaningrum, S., D. Widiastoety, dan K. Effendie, 2004. Panduan Karakterisasi Tanaman Hias: Anggrek dan Anthurium. Sekretariat Komisi Nasional Plasma Nutfah, Bogor.
- Kim, H. M., S. H. Oh, G. S. Bhandari, C. S. Kim, dan C. W. Park. 2014. DNA Barcoding of Orchidaceae In Korea. *Molecular Ecology Resources*. 14(1): 499-507.
- Kumar, S., M. Nei, J. Dudley, dan K. Tamura. 2008. MEGA: A Biologist-Centric Software for Evolutionary Analysis of DNA and Protein Sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 9(4): 299-306.
- Kumar, P., V. K. Gupta, A. K. Misra, D. R. Modi, dan B. K. Pandey. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal*. 2(4): 141-162.
- Kurnia, M. M. Pharmawati, dan D. S. Yusup. 2015. Jenis-Jenis Lamun Di Pantai Lembongan, Nusa Lembongan Dan Analisisnya dengan PCR Ruas *rbcL*. *Jurnal Simbiosis*. 3(1): 330- 333.

- Lam, Y., T. B. Ng, R. M. Yao, J. Shi, K. Xu, S. C. W. Sze, dan K. Y. Zhang. 2015. Evaluation of Chemical Constituents and Important Mechanism of Pharmacological Biology in *Dendrobium* Plants. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 1-25.
- Li, X., Y. Yang, R. J. Henry, M. Rossetto, Y. Wang, dan S. Chen. 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biol. Rev.* 1-10.
- Liddle, D.J. 1990. The Recognition of Subspecies in *Dendrobium discolor* Lindley (Orchidaceae). *Austrobaileya*. 3(2): 319-321.
- Liu H., C. Fang, T. Zhang, L. Guo, dan Q. Ye. 2019. Molecular authentication and differentiation of *Dendrobium* species by rDNA ITS region sequence analysis. *AMB Express*. 9(53): 1-9.
- Lokho, A. 2013. Diversity of *Dendrobium* Sw. Its Distributional Patterns and Present Status in the Northeast India. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 3(5): 1-9.
- Luo J., B. W. Hou, Z.T. Niu, W. Liu, Q.Y. Xue, dan X.Y. Ding. 2014. Comparative Chloroplast Genomes of Photosynthetic Orchids: Insights into Evolution of the Orchidaceae and Development of Molecular Markers for Phylogenetic Applications. *PLoS One*. 9(6): 1-15.
- Malik, S., A. Priya, dan S. B. Babbar. 2019. Employing barcoding markers to authenticate selected endangered medicinal plants traded in Indian markets. *Physiol Mol Biol Plants*. 25(2): 327-337.
- Meshoul, S. A. Layeb, dan M. Batouche. 2005. A Quantum Evolutionary Algorithm for Effective Multiple Sequence Alignment. *EPIA Progress in Artificial Intelligence*. 260-271.
- Millar, A. 1990. Orchids of Papua New Guinea. Bathurst: Crawford House Publishing.
- Misener, Stephen dan Stephen A. Krawetz. 2000. *Bioinformatics Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press Inc.

- Monro, A. K. 2006. The Revision of Species-Rich Genera: A Phylogenetic framework For the Strategic Revision of *Pilea* (Urticaceae) Based On cpDNA, nrDNA, and Morphology. *American Journal of Botany*. 93(3): 426-441.
- Pant, B. 2013. Medical Orchids and Their Uses: Tissue Culture A Potential Alternative for Conservation. *African Journal of Plant Science*. 7(10): 448-467.
- Parveen, I., H. K. Singh, S. Malik, S. Raghuranshi, dan S. B. Babbar. 2017. Evaluating Five Different Loci (*rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK*, and *ITS*) for DNA Barcoding of Indian Orchid. *Genome*. 60(8): 665-671.
- Patwardhan, A., S. Ray, dan A. Roy. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *J Phylogen Evolution Biol*. 2(2): 1-9.
- Raclariu, A. C., M. Heinrich, M. C. Ichim, dan H. de Boer. 2018. Benefits and Limitations of DNA Barcoding and Metabarcoding in Herbal Product Authentication. *Phytochem. Anal*. 29: 123-128.
- Sadili, A. 2011. Keanekaragaman, Persebaran dan Pemanfaatan Jenis-Jenis Anggrek (Orchidaceae) di Resort Citorek, Taman Nasional Gunung Halimun-Salak, Jawa Barat. *Biosfera*. 28(1): 15-22.
- Saitou, N, dan M Nei. 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol*. 4(4): 406-425.
- Schuiteman, A. 2013. *A Guide to Dendrobium of New Guinea*. Kinabalu: Natural History Publications (Borneo).
- Sharma P, N Joshi., dan A Sharma. 2010. Isolation of Genomic DNA from Medicinal Plants without Liquid Nitrogen. *Indian Journal of Experimental Biology*. 48: 610-614.

- Silalahi, M., dan Nisyawati. 2015. Pemanfaatan Anggrek Sebagai Bahan Obat Tradisional Pada Etnis Batak Sumatera Utara. *Berita Biologi*. 14(2): 187-193.
- Singh, H. K., I. Parveen, S. Raghuvanshi, dan S. B. Babbar. 2012. The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. *BMC Research Notes*. 5(42): 1-11.
- Soon Teoh, Eng. 2016. *Medicinal Orchids of Asia*. Singapura: Elsevier.
- Subedi, A., B. Kunwar, Y. Choi, Y. Dai, T. Andel, R. P. Chaudhary, H. J. D. Boer, dan B. Gravendeel. 2013. Collection and Trade of Wild-Harvested Orchids in Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 64(9): 1-10.
- Sujarwo, W dan S. G. Lestari. 2018. Studi Etnobotani Tumbuhan Obat dan Upacara Adat Hindu di Bali. *Buletin Kebun Raya*. 21(2): 117- 139.
- Taberlet, P., Ludovic gielly, guy patau, jean bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant molecular biology*. 17: 1105-1109.
- Takamiya, T., A. P. Wongsawad, B. N. Tajima, B. N. Shioda, A. J. F. Lu, A. C. L. Wen, C. J. B. Wu, D. T. Handa, E. H. Iijima, A. S. Kitanaka, dan T. Yukaw. 2011. Identification of *Dendrobium* Species Used for Herbal Medicines Based on Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequence. *Biol. Pharm. Bull.* 34(5): 779-782.
- The Plant List. 2019. A Working List of All Plant Species. <http://www.theplantlist.org>. [Diakses pada 9 Mei 2019]
- Tjitrosoepomo, G. 1985. *Morfologi Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Varma, Astha., H. Padh, dan N. Shrivastava. 2007. Plant genomic DNA Isolation: An art or a science. *Biotechnol. J.* 2: 386-392.

- 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.
- Wang, H., M. Qi, dan A. J. Cutler. 1993. A Simple Method of Preparing Plant Samples for PCR. *Nucleic Acids Research*. 21(17): 4153-4154.
- Xu S., D. Li., J. Li., X. Xiang, W. Jin, W. Huang., X. Jin, dan L. Huang. 2015. Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. *PLoS ONE*. 10(1): 1-12/
- Yang, C. R., J. H. Guh, C. M. Teng, C. C. Chen, dan P. H. Chen. 2009. Combined Treatment with Denbinobin and Fasligand has a Synergistic Cytotoxic Effect in Human Pancreatic Adenocarcinoma BxPC-3 Cells. *British Journal of Pharmacology*. 157: 1175-1185.
- Yang, M., L. Caia, Z. Taia, X. Zenga, dan Z. Ding. 2010. Four New Phenanthrenes from *Monomeria barbata* Lind. *Fitoterapia*. 81: 992-997.
- Ye, J., S. McGinnis, dan T. L. Madden. 2006. BLAST: Improvements for Better Sequence Analysis. *Nucleic Acids Research*. 34: 6-9.
- Zeinalzadehtabrizi, H., A. Hosseinpour, M. Aydin, dan K. Haliloglu. 2015. A modified genomic DNA extraction method from leaves of sunflower for PCR based analyses. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 7(6): 222-225.
- Zhang J, dan T. L. Madden. 1997. PowerBLAST: A New Network BLASTApplication for Interactive or AutomatedSequence Analysis and Annotation. *Genome Research*. 1: 649-656.
- Zhao, N., G. Yang, Y. Zhang, Y. Chen. 2015. A New 9,10- dihydrophenanthrene from *Dendrobium moniliforme*. *Natural Product Research*. 30(2): 174-179.

LAMPIRAN

1. Sekuen *rbcL* dari angrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar, Maluku dengan panjang basa 550 bp

```
AAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAACCAAAGATACTGAT
ATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCGGGAGTTCCGCCTGAAGAAG
CGGGGGCTGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTG
GACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATC
GAGGTCGTTGTTGGAGAGGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCTTT
AGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTA
ATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATT
CCCTCTTCTTATTCCAAAACCTTTCCAAGGTCCGCCTCATGGCATCCAAGTTGA
AAGAGATAAATTGAACAAGTACGGGCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTTAAA
CCAAAATTGGGATTATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTC
TACGCGGTGGACTTGATTTTACTAT
```

2. Sekuen *ITS* dari angrek obat *Dendrobium discolor* Tanimbar, Maluku dengan panjang basa 803 bp

```
GTGACTCTGCGAGAAGTCCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTC
GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAGACCGTA
ATGTATCGAGCGATTCCGGTGAACCCGTCATATACACGGCGGTAATCGCTGCC
GTAAGATAAAAAGCCATCCCATCCCAGCTGCTGCGTCATCCCCTTCGGGGGG
CGGGGCACGATGAAGGATGGACGAACACCCAAACCGGCGCAGCATCGCGCC
AAGGGAATATCGAAACACGGGCCCTTCATCAGGGTTGGTGGCACGGGGGTGC
TGTTGCACGCCGCGTGAATTGAAACGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCT
CGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAAT
CCCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAGCCGGCC
GAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGCATCGCTCCGTACCAACTCCG
TCCATCGATGGGTGGGCCGGCGGAGGCTCGGATGTGGAGAGTGGCTCGTCG
TGCTCTATCGGTGCGGCGGGCTGAAGGGCGGGTTATCATCTCGTTGGCCGCG
AAACAACAAGAGGTGGATGGGAGCAAGGCCTACGTTGTTGTATCGTGCTTGCC
AGAGGGAGGATTACACCCTCGGGTGATCCCGAATCATGCGTCGGTCCACGA
GACGACGGCTTGGAATGCGACCCAGGATGGGCGAGGCCACCCGCTGAGTTT
AAGCATATCAATAAGCGGAGGAG
```

3. Hasil BLAST sekuen *rbcL* *D. discolor* Tanimbar dengan *D. salaccense*

Dendrobium salaccense chloroplast DNA, complete genome
 Sequence ID: [LC193510.1](#) Length: 151104 Number of Matches: 1

Range 1: 54042 to 54590 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
998 bits(540)	0.0	546/549(99%)	0/549(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAACCAAAGATACTGATACTTTGG			60
Sbjct 54042	AAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAACCAAAGATACTGATACTTTGG			54101
Query 61	CAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCGGGAGTCCGCCTGAAGAAGCGGGGGTCCGGTAG			120
Sbjct 54102	CAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCGGGAGTCCGCCTGAAGAAGCGGGGGTCCGGTAG			54161
Query 121	CTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTG			180
Sbjct 54162	CTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTG			54221
Query 181	ATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGAGAGGAAAATCAATATA			240
Sbjct 54222	ATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGAGAGGAAAATCAATATA			54281
Query 241	TTGCTTAIGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAGGTTCTGTTACTAACATGTTTA			300
Sbjct 54282	TTGCTTAIGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAGGAGGTTCTGTTACTAACATGTTTA			54341
Query 301	CTTCCATTGTTGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGCTGGAAGATC			360
Sbjct 54342	CTTCCATTGTTGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTGCGAGCTCTACGCTGGAAGATC			54401
Query 361	TGCGAATTCCTCTTCTTATTCCAAAACCTTCCAAGGTCGCTCATGGCATCCAAGTTG			420
Sbjct 54402	TGCGAATTCCTCTTCTTATTCCAAAACCTTCCAAGGTCGCTCATGGCATCCAAGTTG			54461
Query 421	AAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGGCTCCCTATTGGGATGTACTATTAACCAAAT			480
Sbjct 54462	AAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGGCTCCCTATTGGGATGTACTATTAACCAAAT			54521
Query 481	TGGGATTATCCGCAAAAACCTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGICTATGGCGTGGACTTG			540
Sbjct 54522	TGGGATTATCCGCAAAAACCTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGICTATGGCGTGGACTTG			54581
Query 541	ATTTTACTA 549			
Sbjct 54582	ATTTTACTA 54590			

Query merupakan sekuen *rbcL* dari *Dendrobium discolor* Tanimbar sedangkan subject merupakan sekuen dari *Dendrobium salaccense*.

4. Hasil BLAST sekuen *ITS D. discolor* Tanimbar dengan *D. nindii*

Sequence ID: [AY239985.1](#) Length: 675 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 675 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1197 bits(648)	0.0	666/675(99%)	0/675(0%)	Plus/Plus
Query 87	ATCATTGTCGAGACCGTAATGTATCGAGCGATTCCGGTGAACCCGTCATATACACGGCGGT			146
Sbjct 1	ATCATTGTCGAGACCGTAATGTATCGAGCGATTCCGGTGAACCCGTCATATACACGGCGGT			60
Query 147	AATCGCTGCCGTAAGATAAAAAAGCATCCCATCCCAGCTGCTTCGTCATCCCCTTCGGGG			206
Sbjct 61	AATCGCTGCCGTAAGATAAAAAAGCCTCCCATCCCAGCTGTTTCGTCATCCCCTTCGGGG			120
Query 207	GGCGGGGCACGATGAAGGATGGACGAACACCCAAACCGGCGCAGCATCGCGCCAAGGGAA			266
Sbjct 121	GGCGGGGCACGATGAAGGATGGACGAACACCCAAACCGGCGCAGCATCGCGCCAAGGGAA			180
Query 267	TATCGAAACACGGGCCCTTCATCAGGTTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTTGCACGCCCGGT			326
Sbjct 181	TATCGAAACACGGGCCCTTCATCAGGTTGGTGGCAGGGGGTGTCTGTTGCACGCCCGGT			240
Query 327	GAATTGAAACGACTCTCGGCAATGGATAICTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCG			386
Sbjct 241	GAATTGAAACGACTCTCGGCAATGGATAICTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCG			300
Query 387	AAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAG			446
Sbjct 301	AAATGCGATACGTGGTGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAG			360
Query 447	TTGCGCCCGAGGCCAGCCGGCCGAGGGCAGCTCCGCCCTGGGCGTCAAACATTCGATCGCT			506
Sbjct 361	TTGCGCCCGAGGCCAGCCGGCCGAGGGCAGCTCCGCCCTGGGCGTCAAACATTCGATCGCT			420
Query 507	CCGTACCAACTCCGTCCCATCGATGGTGGGCCGGCGGAGGCTCGGATGTGGAGAGTGGC			566
Sbjct 421	CCGTACCAACTCCGTCCCATCGATGGTGGGCCGGCGGAGGCTCGGATGTGGAGAGTGGC			480
Query 567	TCGTCGTCTCTATCGGTGCGGCGGGCTGAGGGGGGTTATCATCTCGTTGGCCGCGAA			626
Sbjct 481	TCGTCGTCTCCCATCGGTGCGGCGGGCTGAGGGGGGTTATCATCTCGTTGGCCGCGAA			540
Query 627	CAACAAGAGGTGGATGGGAGCAAGGCCTACGTTGTTGTATCGTGCTTGCCAGAGGGAGGA			686
Sbjct 541	CAACAAGAGGTGGATGGGAGCAAGGCCTACGTTGTTGTATCGTGCTTGCCAGAGGGAGGA			600
Query 687	TTACACCCCTCGGGTGATCCCGAATCATGCGTCGGTCCACGAGAGGACGGCTTGGAAATGC			746
Sbjct 601	TTACACCCCTCGGGTGATCCCGAATCATGCGTCGGTCCACGAGAGGACGGCTTGGAAATGC			660
Query 747	GACCCAGGATGGGC 761			
Sbjct 661	GACCCAGGATGGGC 675			

Query merupakan sekuen *ITS* dari *Dendrobium discolor* Tanimbar sedangkan subject merupakan sekuen dari *Dendrobium nindii*.