



DNA BARCODING ANGGREK *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn. BERDASARKAN PENANDA MOLEKULER ITS2

DNA BARCODING OF *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn. BASED ON ITS2 MOLECULAR MARKER

Mukhamad Su'udi*, Dyah Wulan Budyartini, Zakiyah Ramadany
Universitas Jember, Jalan Kalimantan No. 37 Sumbersari, Jember 68121
*Corresponding author: msuudi52@gmail.com

Naskah Diterima: 28 Juli 2020; Direvisi: 17 Februari 2021; Disetujui: 30 April 2021

Abstrak

Dendrobium linearifolium Teijsm. & Binn. merupakan salah satu spesies anggrek yang telah dimanfaatkan sebagai obat herbal tradisional di Bali. Bagian *pseudobulb* dari *D. linearifolium* dimanfaatkan oleh masyarakat Bali untuk mengobati sakit telinga. Jenis anggrek ini menunjukkan kemiripan morfologi dengan anggrek *Dendrobium faciferum* J.J. Sm. dan *Dendrobium crumenatum* Sw. sehingga menyulitkan dalam proses identifikasi menggunakan karakter morfologi. Penggunaan DNA *barcoding* dengan penanda molekuler *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2) diharapkan dapat digunakan untuk membedakan *D. linearifolium* secara akurat dan tepat. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *D. linearifolium* menggunakan DNA *barcoding* ITS2 sebagai penanda molekuler DNA inti. DNA genom *D. linearifolium* Teijsm. & Binn. diisolasi dan digunakan sebagai DNA *template* dalam reaksi PCR. Amplikon yang dihasilkan kemudian diurutkan dengan cara *sequencing*. Hasil penelitian menunjukkan urutan sekuen ITS2 dari *D. linearifolium* Teijsm. & Binn. memiliki homologi tinggi dengan *D. junceum* (Accession: AB593590; Per. Ident: 92,57%). Hasil analisis bioinformatika menunjukkan urutan sekuen ITS memiliki variasi basa nitrogen yang tinggi dan spesifik yang menunjukkan ciri khas suatu spesies. Dengan demikian, urutan ini dapat dijadikan sebagai penanda molekuler dalam identifikasi spesies anggrek. Sebagai kesimpulan, sekuen ITS2 dapat direkomendasikan sebagai penanda molekuler untuk identifikasi anggrek *D. linearifolium* Teijsm. & Binn.

Kata kunci: Anggrek *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn; Bioinformatika; DNA *barcoding*

Abstract

Dendrobium linearifolium Teijsm. & Binn is a species of orchid that has been used as traditional herbal medicine in Bali. Balinese uses the *pseudobulb* of *D. linearifolium* to treat earaches. This type of orchid shows morphological similarities to *D. faciferum* J.J. Sm. and *D. crumenatum* Sw. which raised arduous to identify using morphological characters. DNA *barcoding* with the *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2) as molecular marker is expected to distinguish *D. linearifolium* accurately and precisely. This study aims to identify *D. linearifolium* using ITS2 as a molecular marker. The Genomic DNA of *D. linearifolium* was extracted and used as template DNA in PCR reactions. DNA amplicons are then sequenced. The results showed that ITS2 sequence of *D. linearifolium* Teijsm. & Binn. has high homology with *D. junceum* (Accession: AB593590; Per. Ident: 92.57%). The results of the bioinformatics analysis showed that the ITS sequence had a high variation and specificity of nitrogen base to indicate the characteristics of a species. Therefore, this sequence can be used as a molecular marker to identify an orchid to species. In conclusion, the ITS2 sequence can be recommended as a molecular marker for species identification of *D. linearifolium*.

Keywords: Bioinformatics; *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn. orchid; DNA *barcoding*

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v15i1.16710>

PENDAHULUAN

Anggrek termasuk ke dalam famili *Orchidaceae* (Lawrence, 1955). Famili *Orchidaceae* memiliki nilai estetika yang tinggi dan beberapa di antaranya berpotensi sebagai bahan baku obat (Hani et al., 2014). Salah satu genus *Orchidaceae* yang telah dimanfaatkan sebagai obat herbal tradisional adalah *Dendrobium* (Hossain, 2009). Beberapa jenis obat herbal dari *Dendrobium* dijual dan didistribusikan di Asia dengan nama-nama lokal dan memiliki banyak nama sinonim (Teoh, 2016). Morfologi vegetatif beberapa spesies *Dendrobium* sangat identik satu sama lain sehingga menyulitkan dalam identifikasi (Asahina et al., 2010). Identifikasi morfologi juga tidak dapat digunakan dalam identifikasi produk obat herbal *Dendrobium* yang telah dikeringkan (Takamiya et al., 2011). Oleh karena itu, identifikasi molekuler penting dilakukan untuk mengidentifikasi anggrek berpotensi obat yang digunakan dalam olahan herbal agar masyarakat terhindar dari kesalahan pemakaian dan pemalsuan produk herbal (Perwitasari et al., 2020; Teoh, 2019).

Salah satu jenis anggrek yang telah dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional berasal dari genus *Dendrobium*, adalah *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn. Menurut Astuti (2000), bagian *pseudobulb* dari anggrek *D. linearifolium* dimanfaatkan oleh komunitas yang berada di Sepang, Bali untuk dijadikan ekstrak yang dimasukkan ke dalam telinga sebagai obat sakit telinga.

Identifikasi *D. linearifolium* melalui karakteristik morfologi memiliki kelemahan karena anggrek harus memiliki organ lengkap (vegetatif dan generatif). Perdagangan *D. linearifolium* di pasaran pada umumnya tidak dalam keadaan berbunga. *Dendrobium linearifolium* juga memiliki *pseudobulb* yang mirip dengan anggrek *D. faciferum* J.J. Sm (Global Orchids, 2020) dan bunga berwarna putih seperti *D. crumenatum* Sw. (Holstein, 2001a). Anggrek *D. linearifolium* juga memiliki banyak sinonim ilmiah, yaitu *Ceraia linearifolia* Teijsm. & Binn. dan *D. gracile* Kranzl. (Holstein, 2001b). Hal tersebut menambah permasalahan dalam identifikasi berdasarkan karakteristik morfologi, sehingga diperlukan metode alternatif yang efektif untuk mengetahui identitas suatu spesies tanaman.

Pengamatan secara molekuler melalui DNA *barcoding* dapat dijadikan metode alternatif untuk mengidentifikasi suatu spesies tanaman (Hebert et al., 2003). DNA *barcoding* merupakan metode identifikasi spesies menggunakan potongan DNA pendek yang disebut dengan *barcode*. Keunggulan metode DNA *barcoding* adalah dapat mengidentifikasi suatu organisme meskipun spesimen tidak dalam bentuk utuh hasil pengamatan diperoleh lebih cepat, akurat, dan tidak ambigu (Hajibabaei et al., 2007).

Prinsip DNA *barcoding* adalah identifikasi menggunakan sekuen DNA pendek atau *barcode* DNA. Sekuen DNA yang diperoleh dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies dengan melihat konstruksi pohon filogenetiknya (Rohimah et al., 2018). Karakteristik sekuen DNA yang dapat dijadikan sebagai DNA *barcode* antara lain memiliki ukuran sekuen yang pendek (mudah diamplifikasi), mempunyai variabilitas genetik yang tinggi pada tingkat spesies, dan menggunakan primer universal untuk amplifikasi PCR (Kress & Erickson, 2007).

Penanda molekuler untuk DNA tanaman adalah gen yang berasal dari genom kloroplas, yaitu *maturase-K* (*matK*) dan *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase* (*rbcL*) (CBOL plant working group, 2009). *Barcode* potensial juga dapat berasal dari genom nukleus/inti, yaitu daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS). *Internal Transcribed Spacer* yang digunakan adalah ITS2, yaitu penanda molekuler untuk mengidentifikasi beberapa spesies *Dendrobium*, selain itu berpotensi untuk menganalisis hubungan kekerabatan dari genus *Dendrobium* (Feng et al., 2015). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *barcode* potensial dan konstruksi filogenetik dari anggrek *D. linearifolium* yang berasal dari Magelang, Jawa Tengah menggunakan penanda molekuler ITS2.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada Januari sampai April 2020. Penelitian berlokasi di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Alat yang digunakan antara lain mortar dan pistil, *hot plate*, mikropipet, *yellow tip*, *blue tip*, neraca analitik, spatula, pH meter, mesin PCR, *vortex*, *thermoshaker*, *beaker glass*, gelas ukur,

Erlenmeyer, desikator, UV-Transilluminator, *tube* 1,5 mL, PCR *microtube*, *centrifuge*, desikator, *magnetic strirrer*, gunting, aluminium foil, mesin elektroforesis, tabung *falcon*, dan parafilm.

Bahan yang digunakan antara lain anggrek *D. linearifolium* (Anggrekku Nursery, Magelang), primer *forward* dan *reverse* ITS2 (DR2 + 26SE), *double distilled water* (ddH₂O), isopropanol, *buffer Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), *solubilization buffer*, *washing buffer*, *elution buffer*, PCR *master mix*, *buffer Tris Acetic-EDTA* (TAE 1x), *ethidium bromide* (EtBr), *agarose*, akuades, etanol, DNA *marker* 100 bp Plus RNase.

Karakterisasi Morfologi

Karakterisasi morfologi menggunakan beberapa buku-buku identifikasi seperti Orchids of Papua New Guinea (Millar, 1978), Lowland Orchids of Papua New Guinea (O'Byrne, 1994), Key to the genera of Orchidaceae of New Guinea (Schuiteman, 1995), dan Flora Malesiana: Orchids of New Guinea (Schuiteman et al., 2010). Observasi dilakukan terhadap seluruh bagian anggrek, yaitu akar, *pseudobulb*, batang, daun, dan bunga.

Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom tanaman anggrek berpotensi obat *D. linearifolium* menggunakan metode *cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB). Tahapan isolasi DNA genom yang pertama adalah menambahkan 5 mL buffer CTAB ke dalam mortar, lalu 0,5 g sampel daun anggrek *D. linearifolium* digerus dengan pistil steril sampai halus. Langkah selanjutnya adalah 1 mL supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru, diinkubasi pada suhu 65 °C selama 1,5 jam. Hasil inkubasi ditambahkan 500 µL kloroform, disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 15 menit.

Supernatan sebanyak 650 µL dipindahkan ke tabung baru lalu ditambahkan 5 µL RNase. Inkubasi pada suhu ruang (25 °C) selama 15 menit, ditambahkan 600 µL isopropanol, lalu dihomogenkan. Langkah selanjutnya adalah disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 20 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet dicuci dengan etanol kemudian dihomogenkan, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit, etanol dibuang, pelet dikeringkan dengan desikator selama 30 menit. Langkah terakhir adalah diresuspensi dengan 50 µL buffer TE. DNA genom kemudian dikonfirmasi melalui amplifikasi DNA menggunakan PCR.

Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Penentuan Urutan Nukleotida ITS2

Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 20 µL pada tabung PCR 50 µL. Setiap reaksi memiliki beberapa komponen, diantaranya 1,5 µL DNA *template*, 10 µL PCR *Master Mix* 2x, 6,5 µL ddH₂O, serta sepasang primer (F + R) sebanyak 1 µL (5'-TCTTCATCGATGCGAGAGCC-3'), (5'-TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3') (Takamiya et al., 2011). Pengaturan suhu mesin PCR yang digunakan, yaitu denaturasi dilakukan pada suhu 95 °C selama 30 detik, penempelan primer dilakukan pada suhu 53 °C selama 30 detik, dan DNA *extension* pada suhu 72 °C selama 1 menit 15 detik. Tahap pemantapan, yaitu *final extension* dilakukan pada suhu 72 °C selama 5 menit. Siklus amplifikasi dilakukan sebanyak 35 kali. Langkah selanjutnya adalah gel divisualisasi menggunakan alat UV-Transilluminator dengan meletakkan gel di atas alat tersebut, kemudian dilakukan observasi ada/tidaknya pita DNA yang terbentuk. Pita DNA yang terbentuk/muncul kemudian dianalisis ukurannya dengan menyesuaikan ukuran panjang pada *marker* 100 bp Plus DNA Ladder (Bioneer). Produk PCR selanjutnya disekuensing menggunakan jasa Macrogen, Korea.

Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik dilakukan dengan mengidentifikasi sekuen ITS2 pada anggrek *D. linearifolium*. Hasil sekuensing yang telah diperoleh diedit menggunakan *software* Bioedit untuk mendapatkan sekuens *consensus*, lalu sekuens *consensus* dimasukkan ke dalam *The Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada NCBI. Hasil yang diperoleh adalah beberapa sekuen nukleotida suatu spesies pada *database* yang memiliki kemiripan dengan sekuen nukleotida sampel.

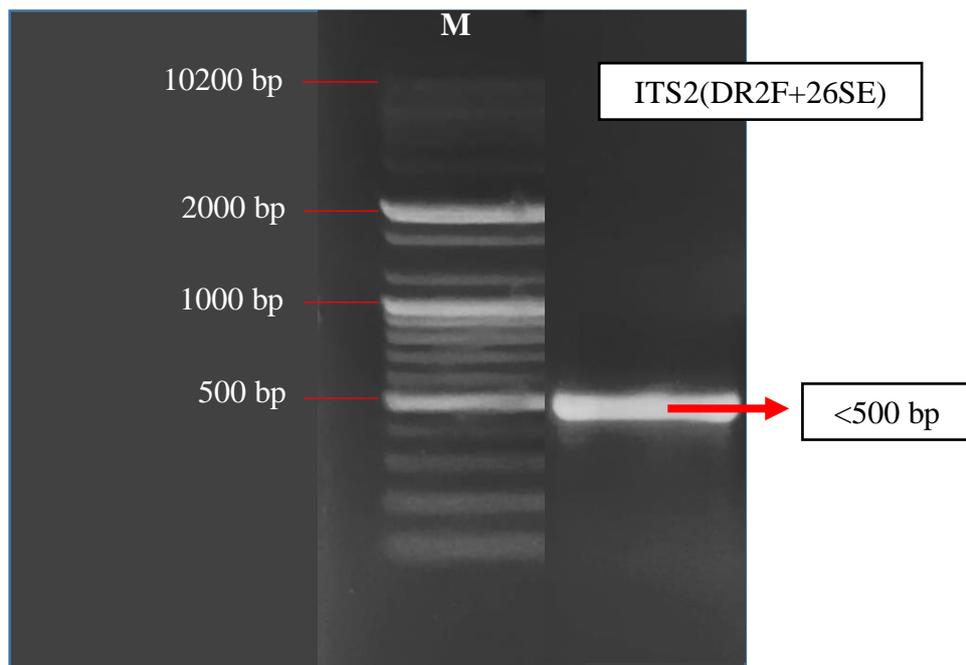
Langkah selanjutnya adalah mengoleksi 10 sekuen nukleotida spesies teratas. Sekuen yang telah dikoleksi dalam bentuk FASTA kemudian dianalisis dengan penyejajaran (*alignment*) menggunakan *software* ClustalX 2.1 (Jeanmougin et al., 1998) dan dilakukan rekonstruksi pohon filogenetiknya dengan *software* MEGA X (Kumar et al., 2008). Pohon filogenetik direkonstruksi dengan metode *Neighbor-Joining* (NJ) dan *bootstrap method* dengan *number of replications* 1000. Untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara DNA sampel *D. linearifolium* dengan sampel anggrek hasil BLAST di NCBI berdasarkan jarak evolusi (Mailund et al., 2006). Spesies *out group* yang digunakan berasal dari genus *Bulbophyllum* karena memiliki perbedaan yang signifikan secara morfologi dengan genus *Dendrobium*.

HASIL

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini antara lain karakteristik morfologi anggrek *D. linearifolium* (Gambar 1), hasil visualisasi DNA menggunakan PCR (Gambar 2), hasil BLAST sekuen ITS2 anggrek *D. linearifolium* (Tabel 1), dan hasil analisis filogenetik berupa alignment (Gambar 3) dan pohon filogenetik yang telah direkonstruksi (Gambar 4).



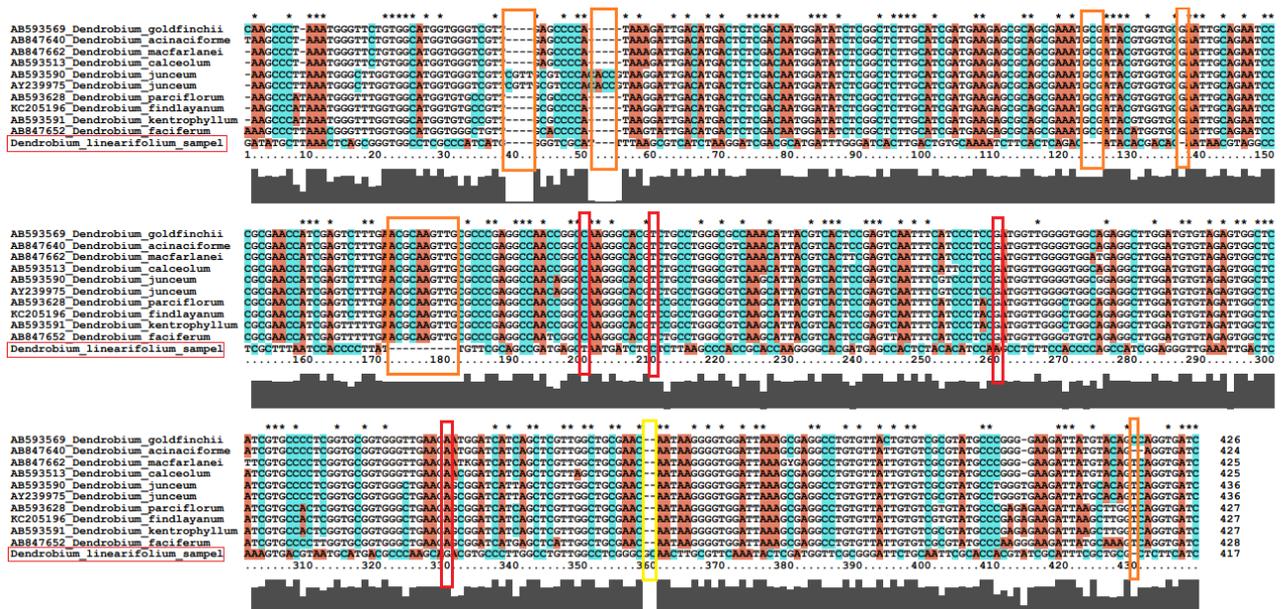
Gambar 1. Morfologi anggrek *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn., yaitu batang (a), pseudobulb (b), daun (c), bunga (d). Keterangan: sepal dorsal (Sd), sepal lateral (Sl), petal (P), dan labellum (L). Foto diambil menggunakan kamera *handphone* Iphone XR dan diedit dengan *software* Adobe Photoshop CS2



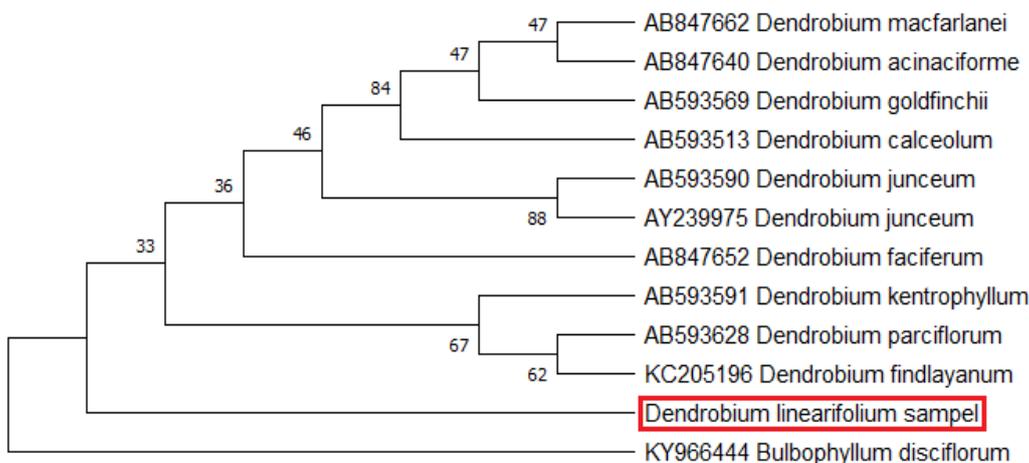
Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi DNA *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn. Keterangan: (M) *marker* 100 bp Plus DNA Ladder (Bioneer); PCR produk menggunakan primer *forward* dan primer *reverse* ITS2 (DR2 + 26SE)

Tabel 1. Hasil Analisis BLAST Sekuen ITS2 *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn.

Nama	Nomor akses	Per. ident. (%)	Query cover (%)	E-value	Asal
<i>Dendrobium junceum</i>	AB593590	92,57	100	4E-167	Jepang
<i>Dendrobium macfarlanei</i>	AB847662	91,37	100	1E-171	Jepang
<i>Dendrobium calceolum</i>	AB593513	91,37	100	6E-170	Jepang
<i>Dendrobium faciferum</i>	AB847652	91,13	100	1E-166	India
<i>Dendrobium goldfinchii</i>	AB593569	91,13	100	1E-167	Jepang
<i>Dendrobium acinaciforme</i>	AB847640	91,13	100	4E-167	Jepang
<i>Dendrobium junceum</i>	AY239975	92,54	93	6E-155	Australia
<i>Dendrobium parciflorum</i>	AB593628	90,41	100	4E-152	Jepang
<i>Dendrobium kentrophyllum</i>	AB593591	90,41	100	4E-152	Jepang
<i>Dendrobium findlayanum</i>	KC205196	90,41	100	4E-152	China



Gambar 3. Hasil penyejajaran sekuen ITS2 anggrek *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn.



Gambar 4. Pohon filogenetik sekuen ITS2 anggrek *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn.

PEMBAHASAN

Karakteristik Morfologi dan DNA Barcode Anggrek *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn.

Berdasarkan hasil pengamatan, *D. linearifolium* termasuk tanaman herba (Gambar 1a). Batang berbentuk bulat dengan permukaan licin. Anggrek ini memiliki *pseudobulb* yang terdiri dari dua

tipe batang, yaitu lurus dan membengkak (*swollen stems*). Batang *pseudobulb* berbentuk oval yang terdapat pada bagian dasar (Gambar 1b). Daun anggrek *D. linearifolium* berwarna hijau, berbentuk lanset, duduk daun berseling, tepi rata dengan ujung daun runcing (Gambar 1c) (Lavarack et al., 2000).

Tipe bunga anggrek *D. linearifolium* majemuk. Bunga muncul dari ketiak daun, antara 1–3 kuntum per ruasnya. Bunganya berwarna putih dan terdapat corak berwarna ungu atau ungu kemerahan pada sisi dalam bunga dengan bagian tengah bibir berwarna kuning. Susunan bunganya terdiri atas satu sepal dorsal, dua petal. Petal ketiga mengalami modifikasi menjadi *labellum* (bibir) (Gambar 1d). Lebar bunga sekitar 2 cm dengan ukuran panjang mulai dari ujung sepal hingga pangkal bunga mencapai 3 cm (Comber, 1990). Anggrek *D. linearifolium* dapat berbunga kapan saja atau tidak mengenal musim, serta sering menumbuhkan keiki.

Hasil visualisasi produk PCR menggunakan primer ITS2 menghasilkan pita DNA tunggal, tebal, dan jelas sesuai dengan ukuran yang diprediksi (Gambar 2). Produk PCR kemudian disekuensing menggunakan jasa *Macrogen*, Korea. Hasil sekuensing menunjukkan *peak* basa nukleotida yang terbaca dengan baik dan jelas. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa *D. linearifolium* pada gen ITS2 memiliki *Query length* 417 bp. Sekuen ITS2 pada anggrek *D. linearifolium* yang diperoleh dari hasil sekuensing dimasukkan ke dalam bentuk format FASTA. Sekuen DNA dalam format FASTA dimasukkan sebagai *query* dalam BLAST pada *GenBank* NCBI yang bertujuan untuk mengetahui data spesies anggrek yang mempunyai kemiripan tertinggi dengan sampel anggrek *D. linearifolium*. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sekuen primer ITS2 dapat membedakan sampel pada penelitian ini secara spesifik hingga tingkat spesies. Seluruh spesies-spesies anggrek yang didapatkan dari hasil BLAST berasal dari negara selain Indonesia. Hal ini karena keterbatasan data pada *GenBank* terkait spesies-spesies anggrek yang ada di Indonesia. Analisis BLAST sekuen ITS2 dari *D. linearifolium* memiliki kesamaan homologi dengan ITS2 dari spesies *D. junceum* dengan nomor aksesinya AB593590 (Tabel 1). Persentase tingkat kemiripan kedua spesies bernilai 92,57% serta terdapat 31 perbedaan pada urutan sekuen antara *Query* dan *Subject*, yaitu basa A dengan basa G pada urutan ke-16, 62, 114, dan 120; basa T dan C pada urutan ke-27, 49, 50, dan 56 basa G dan A pada urutan ke-53, 133, 172, dan 255. Urutan sekuen ke-36 dan 194 antara basa A dan C, urutan ke-100 dan 295 yaitu basa A dengan T, pada urutan ke-246 dan 354 antara basa T dan G, serta basa A dan T pada urutan ke-295. Nilai dugaan (*E-value*) bernilai kurang dari 0,05, yaitu $4e-167$.

Penyejajaran digunakan untuk menentukan tingkat homologi dari urutan basa nukleotida pada DNA sampel yang dianalisis dan mengidentifikasi adanya variasi genetik pada beberapa spesies yang dibandingkan (Meshoul et al., 2005). Hasil penyejajaran (*alignment*) sekuen ITS2 anggrek *D. linearifolium* menunjukkan banyaknya perbedaan basa nukleotida yang tidak dimiliki oleh spesies lain pada urutan ke-1 sampai 417. Beberapa perbedaan di antaranya, yaitu basa Timin (T) pada urutan ke-200, Sitosin (C) pada urutan ke-210, Adenin pada urutan ke-260 dan Guanin (G) pada urutan ke-320, dan Adenin (A) pada urutan ke-91 (Gambar 3).

Analisis selanjutnya adalah analisis hasil filogenetik dengan menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ). Tujuan dilakukannya analisis ini adalah untuk merekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak evolusi serta mengetahui hubungan kekerabatan antara DNA sampel *D. linearifolium* dengan sampel anggrek hasil BLAST di NCBI (Mailund et al., 2006). Analisis filogenetik dilakukan menggunakan software MEGA X yang terdiri atas sampel *D. linearifolium*, sepuluh spesies *in group* dan satu spesies *out group*. Hasil rekonstruksi filogenetik menunjukkan letak yang jelas antara sekuen sampel dengan beberapa sekuen anggrek yang telah dikoleksi dari NCBI (Wang et al., 2009). Metode *Neighbor-Joining* dilakukan dengan analisis *bootstrap* 1000. Nilai *bootstrap* dibedakan menjadi tiga kategori, di antaranya tinggi (>85%), moderat (70–85%), lemah (50–69%), atau sangat lemah (<50%) (Kress et al., 2002).

Analisis Pohon Filogenetik Sekuen ITS2 *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn.

Hasil analisis filogenetik yang terbentuk dari sekuen ITS2 menunjukkan sampel *D. Linearifolium* Teijsm. & Binn. merupakan nenek moyang dari kesepuluh spesies yang diperoleh

dari hasil BLAST (Gambar 4). Semua anggota genus *Dendrobium* berada pada satu klaster yang menunjukkan hubungan kekerabatan yang dekat karena beberapa karakter yang dimiliki seperti persamaan morfologi atau senyawa biokimia yang umum dimiliki oleh genus *Dendrobium*. Anggrek *Bulbophyllum disciflorum* digunakan sebagai *out group* dalam analisis filogenetik karena genus *Dendrobium* dan *Bulbophyllum* memiliki karakter yang berbeda secara morfologi dan genetik. ITS2 dapat dijadikan *barcode* pada tumbuhan anggrek karena dilihat dari hasil *alignment* memiliki variasi genetik yang tinggi berdasarkan banyaknya variasi basa nitrogen pada ITS2 yang bersifat spesifik dan dapat membedakan tanaman anggrek hingga tingkat spesies. Tingginya variasi genetik pada ITS2 menunjukkan kecepatan evolusi yang tinggi dikarenakan lokus ITS pada tumbuhan bersifat *biparental inheritance* sehingga meningkatkan variabilitas intergenomic. Nilai bootstrap yang tinggi menunjukkan bahwa tingkat kepercayaan rekonstruksi topologi pohon filogenetik ITS2 juga tinggi. Oleh karena itu, ITS2 dapat digunakan sebagai penanda molekuler dalam identifikasi molekuler spesies anggrek (Cheng et al., 2016). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Cheng et al. (2016) yang menyatakan bahwa ITS2 merupakan salah satu fragmen DNA nukleus yang sering digunakan dalam mengidentifikasi suatu organisme secara molekuler pada tingkatan genus dan spesies.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa DNA sampel anggrek *D. linearifolium* Teijsm. & Binn. berhasil diisolasi menggunakan metode CTAB. Hasil sekuensing dan penyejajaran DNA sampel anggrek *D. linearifolium* sekuen ITS2 diperoleh *Query length* sebesar 417 bp. Sekuen ITS2 dapat dijadikan sebagai *barcode* untuk identifikasi anggrek *D. linearifolium* karena memberikan hasil yang spesifik dalam membedakan sampai tingkat spesies. Informasi mengenai *barcode* potensial untuk identifikasi anggrek *Dendrobium* perlu diujikan lebih lanjut pada anggrek yang lain dalam satu genus atau di luar genus *Dendrobium* untuk memperkaya *database/GenBank barcode* anggrek.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Jember yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Hibah KeRis tahun 2019 dan 2020.

REFERENSI

- Asahina, H., Shinozaki, J., Masuda, K., Morimitsu, Y., & Satake, M. (2010). Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using matK and rbcL sequences. *Journal of Natural Medicines*, 64(2), 133-138. doi: 10.1007/S11418-009-0379-8/FIGURES/4.
- Astuti, I. (2000). *Traditional plant usage in four villages of Bali Aga Tenganan, Sepang, Tigawasa, and Sembiran, Bali, Indonesia*. Michigan: John D. and Catherine T. MacArthur Foundation.
- CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. *PNAS*, 106(31), 12794-12797. doi: 10.1111/1755-0998.12194.
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y., & Zhou, S. (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. doi: 10.1111/1755-0998.12438.
- Comber, J. B. (1990). *Anggrek Jawa*. London: Royal Botanic Gardens Kew.
- Feng, S., Jiang, Y., Wang, S., Jiang, M., Chen, Z., Ying, Q., & Wang, H. (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(9), 21975-21988. doi: 10.3390/ijms160921975.
- Global Orchids. (2020). *Dendrobium faciferum* J. J. Sm. (2020, December 29). Retrieved from <http://globalorchids.info/>
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23(4), 167-172. doi: 10.1016/j.tig.2007.02.001.
- Hani, A., Widyaningsih, T. S., & Damayanti, R. U. (2014). Potensi dan pengembangan jenis-jenis

- tanaman anggrek dan obat-obatan di jalur wisata Loop-Trail Cikaniki-Citalahab Taman Nasional Gunung Halimun-Salak. *Jurnal Ilmu Kehutanan*, 8(1), 42-49.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Holstein, J. (2001a). *Dendrobium crumenatum* Sw. Ulm City: GBIF-Global Biodiversity Information Facility, University of Ulm.
- Holstein, J. (2001b). *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn. Ulm City: GBIF-Global Biodiversity Information Facility, University of Ulm.
- Hossain, M. M. (2009). Medicinal and aromatic plant science and biotechnology traditional therapeutic uses of some indigenous orchids of Bangladesh. *Medical and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 100-106.
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(10), 403-405. doi: 10.1016/S0968-0004(98)01285-7.
- Kress, W. J., Prince, L. M., & Williams, K. J. (2002). The phylogeny and a new classification of the gingers (*Zingiberaceae*): Evidence from molecular data. *American Journal of Botany*, 89(10), 1682-1696. doi: 10.3732/ajb.89.10.1682.
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. *PLoS ONE*, 2(6), e508. doi: 10.1371/journal.pone.0000508.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 299-306. doi: 10.1093/bib/bbn017.
- Lavarack, B., Harris, W., & Stocker, G. (2000). *Dendrobium and its relatives*. Portland: Timber Press.
- Lawrence, G. (1955). *Taxonomy of vascular plants*. New York: The Macmillan Company.
- Mailund, T., Brodal, G. S., Fagerberg, R., Pedersen, C. N. S., & Phillips, D. (2006). Recrafting the Mailund, T., Brodal, G. S., Fagerberg, R., Pedersen, C. N. S., & Phillips, D. (2006). Recrafting the neighbor-joining method. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 1-8. doi: 10.1186/1471-2105-7-29.
- Meshoul, S., Layeb, A., & Batouche, M. (2005). A quantum evolutionary algorithm for effective multiple sequence alignment. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 3808 LNCS, 260-271. doi: 10.1007/11595014_26.
- Millar, A. (1978). *Orchids of Papua New Guinea*. Canberra: ANU Press.
- O'Byrne, P. (1994). *Lowland orchids of Papua New Guinea*. Singapore: National Parks Board Singapore.
- Perwitasari, D. A. G., Rohimah, S., Ratnasari, T., Sugiharto, B., & Mukhamad, S. (2020). DNA barcoding of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar using rbcL and ITS genes. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, 31(1), 8-20.
- Rohimah, S., Mukarramah, L., Sindiya, V., S., V. Y., K., G. A., & Su'udi, M. (2018). Eksplorasi jenis dan potensi DNA barcode anggrek *Thrixspermum* secara in silico. *Jurnal Biodjati*, 3(2), 50-58. doi: 10.15575/biodjati.v3i2.3409.
- Schuiteman, A. (1995). *Key to the genera of Orchidaceae of New Guinea*. *Flora Malesiana Bulletin*, 11(6), 401-424.
- Schuiteman, A., Vermeulen, J. J., & de Vogel, E. F. (2010). *Flora Malesiana: Orchids of New Guinea vol. vi - genus Bulbophyllum*. Leiden: National Herbarium of the Netherlands.
- Takamiya, T., Wongsawad, P., Tajima, N., Shioda, N., Lu, J. F., Wen, C. L., ... Yukawa, T. (2011). Identification of *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34(5), 779-782. doi: 10.1248/bpb.34.779.

- Teoh, E. S. (2016). *Medicinal orchids of Asia*. Switzerland: Springer Nature.
- Teoh, E. S. (2019). *Orchids as aphrodisiac, medicine or food*. Switzerland: Springer Nature.
- Wang, H. Z., Feng, S. G., Lu, J. J., Shi, N. N., & Liu, J. J. (2009). Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*, 122(3), 440-447. doi: 10.1016/j.scienta.2009.06.005.