

Konstruksi Pohon Filogenetik Spesies dalam Famili Orchidaceae Berdasarkan Marka Gen matK Kloroplas: Studi in Silico

M. L. Sahadeva^{1*}, N. P. D. Pertiwi¹

¹Program Studi Biologi, Jurusan Biologi dan Perikanan Kelautan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Ganesha,

*Corresponding author: luhur@student.undiksha.ac.id

Abstrak

Konstruksi pohon filogenetik pada berbagai spesies dalam famili Orchidaceae, khususnya dalam genus anggrek yang umum dikenal penting dilakukan guna memberikan informasi mengenai hubungan kekerabatan antar spesies anggrek tersebut. Tujuan dari riset ini adalah mengkonstruksi pohon filogenetik pada berbagai spesies anggrek dalam suku Orchidaceae dengan studi in silico menggunakan data-data urutan sekuens yang terdapat pada database. Sumber data sekuens nukleotida diperoleh dari GenBank Nuclotide NCBI, dimana sekuens yang digunakan berasal dari genom matK. Metode konstruksi pohon filogenetik yang digunakan adalah metode *Neighbor Joining Tree* serta dilakukan pula penghitungan jarak genetik dengan 1000 bootstrap menggunakan MEGA 11. Hasil pensejajaran dan pemotongan sekuens menghasilkan sepanjang 512 bp sekuens yang sejajar dan sama panjangnya. Hasil konstruksi pohon filogenetik menghasilkan sebanyak 19 clade yang dapat terbentuk dengan tingkat akurasi atau kepercayaan terhadap pohon filogenetik yang tinggi. Setiap clade umumnya terdiri atas beberapa spesies anggrek dalam satu genus yang sama, tetapi terdapat pula beberapa clade yang terdiri atas beberapa spesies dengan genus yang berbeda-beda, dimana hal ini dapat terjadi akibat homologi yang tinggi pada gen matK. Hasil penghitungan jarak gen menunjukkan jarak genetik tertinggi bernilai sebesar 0,21106 dalam kelompok *ingroup* pada spesies anggrek *Ophrys apifera* dengan *Vanilla planifolia*, sementara jarak genetik terendah bernilai sebesar 0,0000.

Kata Kunci: Anggrek, Orchidaceae, matK, Filogenetik.

Abstract

Phylogenetic tree construction of various species in the Orchidaceae family, especially in the commonly known orchid genus, is important to provide information on the kinship relationships between orchid species. The purpose of this research is to construct a phylogenetic tree of various orchid species in the Orchidaceae family with an in silico study using sequence data contained in the database. The source of nucleotide sequence data was obtained from the NCBI GenBank Nuclotide, where the sequence used came from the matK genome. The phylogenetic tree construction method used was the Neighbor Joining Tree method and genetic distance calculations were also carried out with 1000 bootstraps using MEGA 11. The results of the sequence alignment and trimming produced 512 bp of parallel and equal-length sequences. The results of the phylogenetic tree construction produced 19 clades that could be formed with a high level of accuracy or confidence in the phylogenetic tree. Each clade generally consists of several orchid species in the same genus, but there are also some clades that consist of several species with different genera, which can occur due to high homology in the

*matK gene. The results of the gene distance calculation show that the highest genetic distance is 0.21106 in the ingroup group in the orchid species *Ophrys apifera* with *Vanilla planifolia*, while the lowest genetic distance is 0.0000.*

Keywords: *Orchid, Orchidaceae, matK, Phylogenetic.*

1. PENDAHULUAN

Orchidaceae atau suku anggrek-anggrekan merupakan sebuah famili atau suku tumbuhan yang dikenal karena keberagaman spesies yang tinggi dan terdistribusi pada wilayah tropis dan subtropis. Famili Orchidaceae memiliki sekitar 200.000 spesies dan 700 genus di seluruh dunia, dimana sebanyak 1.247 spesies dan subspecies anggrek tersebar pada berbagai wilayah di Tiongkok (Liu et al, 2023). Indonesia diperkirakan memiliki sekitar 4.000 – 5.000 jenis anggrek, dimana pulau Jawa tercatat memiliki keanekaragaman hayati anggrek hingga 971 jenis dan 139 marga (Rina et al, 2023). Anggrek memiliki nilai estetika dan nilai komersial yang tinggi sehingga eksploitasi spesies-spesies anggrek di alam banyak dilakukan demi kepentingan ekonomi. Eksploitasi secara berlebihan mampu mengancam keanekaragaman hayati anggrek, sehingga diperlukan adanya upaya konservasi untuk melestarikan berbagai jenis anggrek di alam. Upaya konservasi dapat dimulai dengan melakukan identifikasi kekerabatan antar spesies melalui studi keragaman genetik guna menentukan rencana dan strategi konservasi yang tepat. Identifikasi melalui karkaterisasi filogenetik penting untuk dilakukan terhadap beberapa spesies dalam famili Orchidaceae, terutama dalam spesies dari genus yang banyak beredar di masyarakat agar dapat memberikan informasi secara ilmiah mengenai hasil analisis hubungan filogenetik yang bermanfaat dalam penentuan hubungan kekerabatan antar jenis anggrek.

Identifikasi kekerabatan suatu spesies dalam famili Orchidaceae masih banyak dilakukan dengan menggunakan pengamatan melalui pendekatan morfologis. Dimana metode identifikasi dengan karakterisasi melalui pendekatan morfologis memiliki kelemahan berupa penampilan beberapa karakter yang dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan sehingga hasil identifikasi menjadi tidak konsisten yang berdampak pada ketidakjelasan identitas suatu tumbuhan (Ekajaya et al., 2023). Identifikasi kekerabatan antar spesies dapat dilakukan dengan melakukan konstruksi pohon filogenetik menggunakan sekuens DNA antar spesies (Vertiana et al, 2023). Identifikasi kekerabatan antar spesies melalui pendekatan genetik berbasis DNA merupakan metode dengan hasil identifikasi yang lebih akurat dan konsisten. Hal ini disebabkan karena DNA merupakan materi genetik yang terwariskan dan terekspresikan menjadi ciri morfologi yang terkode dalam sekuens DNA.

Disamping itu, karakter yang terdapat dalam DNA relatif lebih konstan dibandingkan karakter morfologi suatu spesies.

Identifikasi kekerabatan antar spesies dengan pendekatan genetik menggunakan sekuens DNA dapat dilakukan dengan memanfaatkan marka DNA. Marka atau penanda DNA merupakan sekuens DNA pendek pada genom yang terstandarisasi untuk mengidentifikasi spesies berdasarkan susunan nukleotida pada sekuens yang terdapat di dalamnya. Gen maturase K atau matK merupakan komponen dari genom kloroplas yang mengkodekan protein maturase, serta banyak digunakan sebagai penanda signifikan dalam studi sistematika molekuler tumbuhan dan studi filogenetik yang berfungsi sebagai barcode DNA standar untuk tumbuhan (Barthet et al, 2020; Rani & Nandagopalan, 2023). Gen matK mampu secara efektif membedakan spesies yang tidak berkerabat dekat dan mampu mengungkapkan hubungan evolusioner antar spesies secara akurat (Abdelsalam et al, 2022). Penggunaan gen matK dalam identifikasi kekerabatan secara genetik mampu memberikan keakuratan hasil identifikasi yang baik berdasarkan sekuens pendek pada genom kloroplas tumbuhan.

Hasil identifikasi kekerabatan secara filogenetik akan sangat bermanfaat dalam menentukan upaya konservasi anggrek. Penting untuk melakukan konstruksi pohon filogenetik terhadap beberapa spesies dalam famili Orchidaceae, khususnya pada beberapa genus yang umum dikenal masyarakat guna memberikan informasi mengenai hubungan kekerabatan antar spesies anggrek tersebut. Analisis filogenetik dapat direpresentasikan melalui konstruksi pohon filogenetik dengan menggunakan sekuens DNA dari berbagai macam jenis anggrek. Laporan-laporan konstruksi pohon filogenetik yang telah diterbitkan umumnya hanya membahas mengenai hubungan kekerabatan antar spesies pada genus yang sama dan jarang melakukan konstruksi dengan banyak spesies dalam genus yang berbeda. Tujuan dari riset ini adalah untuk mengkonstruksi pohon filogenetik pada spesies dalam berbagai genus anggrek dari suku Orchidaceae melalui studi *in silico* dengan menggunakan data-data urutan sekuens yang terdapat pada database sekuens nukleotida.

2. METODE

Spesies-spesies anggrek yang digunakan sebagai bahan dalam konstruksi pohon filogenetik berasal dari beberapa genus anggrek yang populer digunakan sebagai tanaman hias maupun produksi bunga potong dan komoditas rempah (Tabel 1). Sedangkan, bahan sekuens nukleotida yang digunakan sebagai kelompok *outgroup* berasal dari spesies *Neomarica variegata* (Tabel 2). Sekuens nukleotida dari *Neomarica variegata* dipilih karena

spesies ini masih berada dalam satu ordo yang sama dengan famili Orchidaceae, serta spesies ini kerap kali dikatakan sebagai bagian dari anggrek tanah oleh masyarakat. *Outgroup* merupakan spesies yang berkerabat dekat dengan ingroup atau kelompok spesies yang sedang dipelajari, tetapi bukan merupakan bagian dari kelompok ingroup tersebut (Post et al, 2023). *Outgroup* berfungsi sebagai titik referensi untuk menentukan hubungan evolusi pada kelompok ingroup dengan menjadi dasar pohon filogenetik dan mengidentifikasi sifat leluhur yang sama.

Sumber data sekuens nukleotida DNA pada spesies dalam genus anggrek diperoleh dari GenBank Nucleotide NCBI, baik pada jurnal yang belum dan telah terpublikasi. Pengambilan data sekuens dilakukan dengan mengunduh file sekuens dalam format file FASTA (Indahsari, 2023). Sekuens nukleotida DNA yang digunakan merupakan sekuens yang berasal dari genom matK atau genom yang mengkodekan produksi maturase K pada kloroplas tumbuhan. Sumber data dalam penulisan ini dibatasi pada genom matK parsial atau potongan genom matK, bukan keseluruhan atau *whole genome*.

Tabel 1. Spesies Anggrek dan *Accession Number* pada Laman NCBI yang Digunakan sebagai Bahan Data untuk Konstruksi Pohon Filogenetik

Genom	Genus	Spesies	Nomor Akses	Panjang Nukleotida (bp)
matK, parsial, kloroplas	<i>Epidendrum</i>	<i>Epidendrum vesicatum</i>	MT518453.1	810
		<i>Epidendrum stamfordianum</i>	MT518452.1	861
		<i>Epidendrum rigidum</i>	MT518451.1	883
		<i>Epidendrum oerstedii</i>	MT518450.1	888
		<i>Epidendrum macrocarpum</i>	MT518449.1	874
	<i>Brassia</i>	<i>Brassia wagneri</i>	MT518274.1	819
		<i>Brassia verrucosa</i>	MT518273.1	806
		<i>Brassia signata</i>	MT518272.1	758
		<i>Brassia pumila</i>	MT518271.1	818
		<i>Brassia arcuigera</i>	MT518269.1	818
	<i>Vanilla</i>	<i>Vanilla norashikiniana</i>	OM313458.1	831
		<i>Vanilla griffithii</i>	OM313457.1	831
		<i>Vanilla pompona</i>	MT518859.1	870
		<i>Vanilla polylepis</i>	MT518858.1	872
		<i>Vanilla planifolia</i>	MT518857.1	809
	<i>Vanda</i>	<i>Vanda pumila</i>	KX298632.1	722
		<i>Vanda cristata</i>	KX298629.1	710
		<i>Vanda coerulescens</i>	KX298627.1	723
		<i>Vanda coerulea</i>	KX298626.1	734
		<i>Vanda bicolor</i>	KX298625.1	729
	<i>Bulbophyllum</i>	<i>Bulbophyllum pentastichum</i>	MN618714.1	1167
		<i>Bulbophyllum viguieri</i>	MN618761.1	1204
		<i>Bulbophyllum nutans</i> var. <i>variifolium</i>	MN618759.1	1204
<i>Bulbophyllum ambohitrense</i>		MN618629.1	1180	
<i>Bulbophyllum alexandrae</i>		MN618624.1	1204	
<i>Cattleya</i>	<i>Cattleya warscewiczii</i>	MT518354.1	861	
	<i>Cattleya warneri</i>	MT518353.1	799	
	<i>Cattleya trianae</i>	MT518352.1	867	
	<i>Cattleya tigrina</i>	MT518351.1	802	
	<i>Cattleya percivaliana</i>	MT518350.1	823	
<i>Coelogyne</i>	<i>Coelogyne stricta</i>	MT518372.1	846	

	<i>Coelogyne pandurata</i>	MT518371.1	818
	<i>Coelogyne mayeriana</i>	MT518370.1	858
	<i>Coelogyne flaccida</i>	MT518368.1	847
	<i>Coelogyne fimbriata</i>	MT518367.1	744
Oncidium	<i>Oncidium peltiforme</i>	MT518590.1	819
	<i>Oncidium ornithorhynchum</i>	MT518589.1	823
	<i>Oncidium leucochilum</i>	MT518587.1	824
	<i>Oncidium lehmannii</i>	MT518585.1	802
	<i>Oncidium leleui</i>	MT518586.1	825
Epipactis	<i>Epipactis atrorubens</i>	MF543512.1	819
	<i>Epipactis palustris</i>	MF543513.1	826
	<i>Epipactis helleborine</i>	HQ593283.1	802
	<i>Epipactis papillosa</i>	LC628097.1	837
	<i>Epipactis thunbergii</i>	LC616749.1	837
Ophrys	<i>Ophrys insectifera</i>	HE858506.1	865
	<i>Ophrys episcopalis</i>	AM889736.1	825
	<i>Ophrys araneola</i>	AM889735.1	825
	<i>Ophrys apifera</i>	HE858505.1	865
	<i>Ophrys fuciflora</i>	GQ248170.1	790
Corallorhiza	<i>Corallorhiza mertensiana</i>	KX677787.1	779
	<i>Corallorhiza maculata</i>	KX677685.1	774
	<i>Corallorhiza trifida</i>	KX676592.1	777
	<i>Corallorhiza odontorhiza</i>	MK519945.1	753
	<i>Corallorhiza wisteriana</i>	KM598435.1	1323
Apostasia	<i>Apostasia shenzhenica</i>	KX345134.1	1274
	<i>Apostasia ramifera</i>	KX345133.1	1395
	<i>Apostasia fogangica</i>	KX345132.1	1377
	<i>Apostasia nipponica</i>	AY557215.1	1458
	<i>Apostasia nuda</i>	AY557214.1	1491
Cypripedium	<i>Cypripedium shanxiense</i>	KF261995.1	736
	<i>Cypripedium japonicum</i>	KF261993.1	736
	<i>Cypripedium guttatum</i>	KF261992.1	736
	<i>Cypripedium calceolus</i>	KF261991.1	736
	<i>Cypripedium reginae</i>	MK519987.1	788
Phalaenopsis	<i>Phalaenopsis amabilis</i>	MT518643.1	798
	<i>Phalaenopsis violacea</i>	MT518666.1	846
	<i>Phalaenopsis gigantea</i>	MT518653.1	799
	<i>Phalaenopsis pulcherrima</i>	MT518661.1	851
	<i>Phalaenopsis sumatrana</i>	MT518664.1	884
Paphiopedilum	<i>Paphiopedilum villosum</i>	MT518635.1	853
	<i>Paphiopedilum vejvarutianum</i>	MT518633.1	861
	<i>Paphiopedilum supardii</i>	MT518630.1	863
	<i>Paphiopedilum sukhakulii</i>	MT518629.1	812
	<i>Paphiopedilum tonsum</i>	MT518631.1	862
Dracula	<i>Dracula woolwardiae</i>	MN615360.1	791
	<i>Dracula dalessandroi</i>	MN615346.1	767
	<i>Dracula erythrocodon</i>	MN517250.1	793
	<i>Dracula vespertilio</i>	MT518434.1	904
	<i>Dracula simia</i>	MT518433.1	888
Encyclia	<i>Encyclia parviflora</i>	MT518443.1	898
	<i>Encyclia cordigera</i>	MT518442.1	898
	<i>Encyclia aspera</i>	MT518440.1	894
	<i>Encyclia angustiloba</i>	MT518439.1	898
	<i>Encyclia alata</i>	MT518438.1	890
Dendrobium	<i>Dendrobium terengganuensis</i>	OM313452.1	835
	<i>Dendrobium sarawakense</i>	OM313448.1	835
	<i>Dendrobium sanguinolentum</i>	OM313446.1	829
	<i>Dendrobium ruseae</i>	OM313443.1	820
	<i>Dendrobium roseatum</i>	OM313442.1	835
Eria	<i>Eria neglecta</i>	KX721133.1	605
	<i>Eria unifolia</i>	KX721130.1	605

	<i>Eria truncata</i>	KX721129.1	605
	<i>Eria marginata</i>	KX721128.1	605
	<i>Eria discolor</i>	KX721127.1	605
Cymbidium	<i>Cymbidium sanderae</i>	MT518385.1	819
	<i>Cymbidium madidum</i>	MT518384.1	811
	<i>Cymbidium erythrostylum</i>	MT518383.1	855
	<i>Cymbidium ensifolium</i>	MT518382.1	783
	<i>Cymbidium elegans</i>	MT518381.1	861

Tabel 2. Informasi Mengenai Spesies Tumbuhan yang Digunakan sebagai Data *Outgroup*

Genom	Klasifikasi	Spesies	Numor Akses	Panjang Nukleotida (bp)
matK, parsial, kloroplas	Ordo: Asparagales Famili: Iridaceae Genus: <i>Neomarica</i>	<i>Neomarica variegata</i>	JQ588053.1	808

Proses pengolahan data untuk menghasilkan pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan aplikasi Molecular Evolutionary Genetics Analysis versi 11 (MEGA 11) (Pratiwi et al, 2023). Pengolahan data dilakukan dengan memasukkan data sekuens nukelotida dalam bentuk FASTA file dari masing-masing spesies anggrek ke dalam aplikasi MEGA 11 melalui fitur ALIGN. Sebanyak total 100 data sekuens nukleotida dari 20 genus anggrek dan 1 sekuens outgroup seluruhnya dimasukkan ke dalam aplikasi melalui ALIGN. Selanjutnya, dilakukan pensejajaran sekuens dengan melakukan *alignment* menggunakan *align by ClustalW* pada seluruh sekuens nukelotida (Indahsari, 2023). Tahapan berikutnya adalah melakukan *trim* atau pemotongan sekuens nukleotida yang berlebihan untuk menyamakan panjang seluruh sekuens nukleotida anggrek. Hasil pensejajaran dan pemotongan sekuens nukelotida selanjutnya disimpan dalam MEGA format.

Konstruksi pohon filogenetik dilakukan melalui fitur PHYLOGENY pada aplikasi MEGA 11, dimana metode yang digunakan adalah *bootstrap method* dengan *Neighbor Joining Tree* (Bramasta et al, 2021). Data yang digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik adalah data sekuens nukelotida seluruh spesies yang telah disejajarkan dan dipotong dalam bentuk file MEGA format. *Bootstrap* yang digunakan adalah 1000 *bootstrapping*. Pohon filogenetik yang dihasilkan selanjutnya dilakukan penginterpretasian pohon filogenetik.

Pengukuran jarak genetik dilakukan dengan menghitung *pairwise distance* pada aplikasi MEGA 11 melalui fitur DISTANCE dengan metode *Compute Pairwise Distance* (Bramasta et al, 2021; Indahsari, 2023). Data yang digunakan untuk menghitung jarak genetik adalah data sekuens nukelotida pada seluruh spesies anggrek yang telah disejajarkan dan dipotong dalam bentuk file MEGA format dengan *bootstrap* yang digunakan adalah 1000 *bootstrapping*. Selanjutnya dilakukan identifikasi terhadap jarak genetik tertinggi dan jarak genetik terendah dari tabel perhitungan jarak genetik yang terbentuk.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil *alignment* dan *trim* sekuens yang telah dilakukan kepada 101 data sekuens ingroup dan outgroup, diperoleh panjang sekuens sepanjang 512 pasang basa (512 base pair/bp). Sekuens dengan panjang 512 bp ini selanjutnya dikonstruksi menjadi pohon filogenetik dan dilakukan analisis penghitungan jarak genetiknya. Hasil konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *bootstrapping* ditampilkan dalam bentuk diagram kladogram yang disertai perhitungan bootstrap dengan pengulangan sebanyak 1000 kali untuk mendapatkan hasil dari topologi pohon filogenetik tersebut. Semakin tinggi nilai bootstrap (maksimal mencapai nilai 100%) maka nilai akurasi dari percabangan pohon filogenetik yang terbentuk akan bernilai semakin tinggi (Wirdatei & Nugraha, 2016; Bramasta et al, 2021).

Berdasarkan hasil konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining Tree*, dapat diketahui jika terdapat 19 clade yang terbentuk (Gambar 1). Nilai akurasi percabangan pada clade ke-6, clade ke-15, clade ke-16, clade ke-18, dan clade ke-19 bernilai sebesar 100% yang merupakan nilai akurasi percabangan tertinggi pada keseluruhan clade yang terbentuk, dengan kata lain percabangan pada clade tersebut tersebut dapat dipercaya sebesar 100% yang bermakna adanya akurasi yang sangat tinggi. Nilai akurasi percabangan tertinggi kedua dimiliki oleh clade ke-2, clade ke-3, clade ke-9 dengan nilai sebesar 99%. Selanjutnya, nilai akurasi percabangan tertinggi ketiga sebesar 98% dimiliki oleh clade pertama. Clade 13 merupakan clade dengan nilai akurasi percabangan yang paling rendah, yakni hanya bernilai sebesar 50%, sehingga percabangan pada clade ini hanya dapat dipercaya sebesar 50% saja. Nilai akurasi percabangan terendah kedua terdapat pada clade 17 dengan nilai akurasi percabangan sebesar 67%. Selanjutnya, nilai akurasi percabangan terendah ketiga terdapat pada clade 4 dengan nilai akurasi percabangan sebesar 87%.

Suatu clade tidak dapat dipercaya apabila memiliki nilai akurasi sebesar 25% atau kurang, dan suatu clade dapat dipercaya dengan baik dan memiliki akurasi yang tinggi jika memiliki nilai akurasi sebesar 90% atau lebih (Vertiana et al, 2023). Secara keseluruhan, seluruh clade genus pada famili Orchidaceae yang dilakukan konstruksi menggunakan metode *Neighbor Joining Tree* memiliki tingkat akurasi 50% ke atas, sehingga seluruh clade yang terbentuk dari hasil konstruksi pohon filogenetik masih dapat dipercaya. Clade 1, clade 2, clade 3, clade 6, clade 7, clade 8, clade 9, clade 10, clade 11, clade 14, clade 15, clade 16, clade 18, dan clade 19 memiliki tingkat akurasi 90% ke atas sehingga clade-clade tersebut memiliki akurasi yang tinggi dan dapat dipercaya dengan sangat baik. Sedangkan, clade 4, clade 5, clade 12, clade 13, dan clade 17 memiliki tingkat akurasi 50% ke atas tetapi tidak lebih dari 89% sehingga clade-clade tersebut dapat dipercaya dengan tingkat

akurasi yang lemah. Pohon filogenetik yang dinilai baik adalah pohon filogenetik yang memiliki nilai *bootstrap* sebesar 70% ke atas (Subari et al, 2021). Secara keseluruhan, dengan nilai *bootstrap* yang dominan tinggi pada *bootstrap* 90% ke atas, maka pohon filogenetik yang dihasilkan dengan menggunakan metode konstruksi *Neighbor Joining Tree* telah menghasilkan pohon filogenetik dengan kualitas yang baik.

Pada setiap clade yang terbentuk dengan metode *Neighbor Joining Tree*, umumnya hanya terdiri atas beberapa spesies anggrek yang berasal dari genus yang sama. Akan tetapi, pada clade ke-4 terdapat beberapa spesies anggrek yang berasal dari genus yang berbeda, dimana pada clade tersebut terdapat empat macam genus yang menyusunnya, yakni *Vanilla*, *Brassia*, *Oncidium*, dan *Cymbidium*. Demikian pula pada clade ke-7 yang terdiri atas spesies-spesies anggrek yang berasal dari dua genus yang berbeda, yakni *Vanda* dan *Epidendrum*. Serta pada clade ke-18 yang terbentuk atas spesies-spesies anggrek yang berada dari dua genus yang berbeda, yakni genus *Paphiopedilum* dan *Oncidium*. Clade lainnya yang terbentuk hanya memiliki spesies-spesies anggrek yang berasal dari 1 genus saja. Clade tersebut antara lain pada clade pertama yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Bullbophyllum*, clade ke-2 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Dendrobium*, clade ke-3 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Dracula*, clade ke-5 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Eria*, clade ke-6 yang terdiri atas 4 spesies anggrek dari genus *Cymbidium*, clade ke-8 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Phalaenopsis*, clade ke-9 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Corallorhiza*, clade ke-10 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Encyclia*, clade ke-11 yang terdiri atas 4 spesies anggrek dari genus *Epidendrum*, clade ke-12 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Cattleya*, clade ke-13 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Coelogyne*, clade ke-14 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Epipactis*, clade ke-15 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Ophrys*, clade ke-16 yang terdiri atas 4 spesies anggrek dari genus *Vanilla*, clade ke-17 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Cypripedium*, serta clade ke-19 yang terdiri atas 5 spesies anggrek dari genus *Apostasia* (Gambar 1).

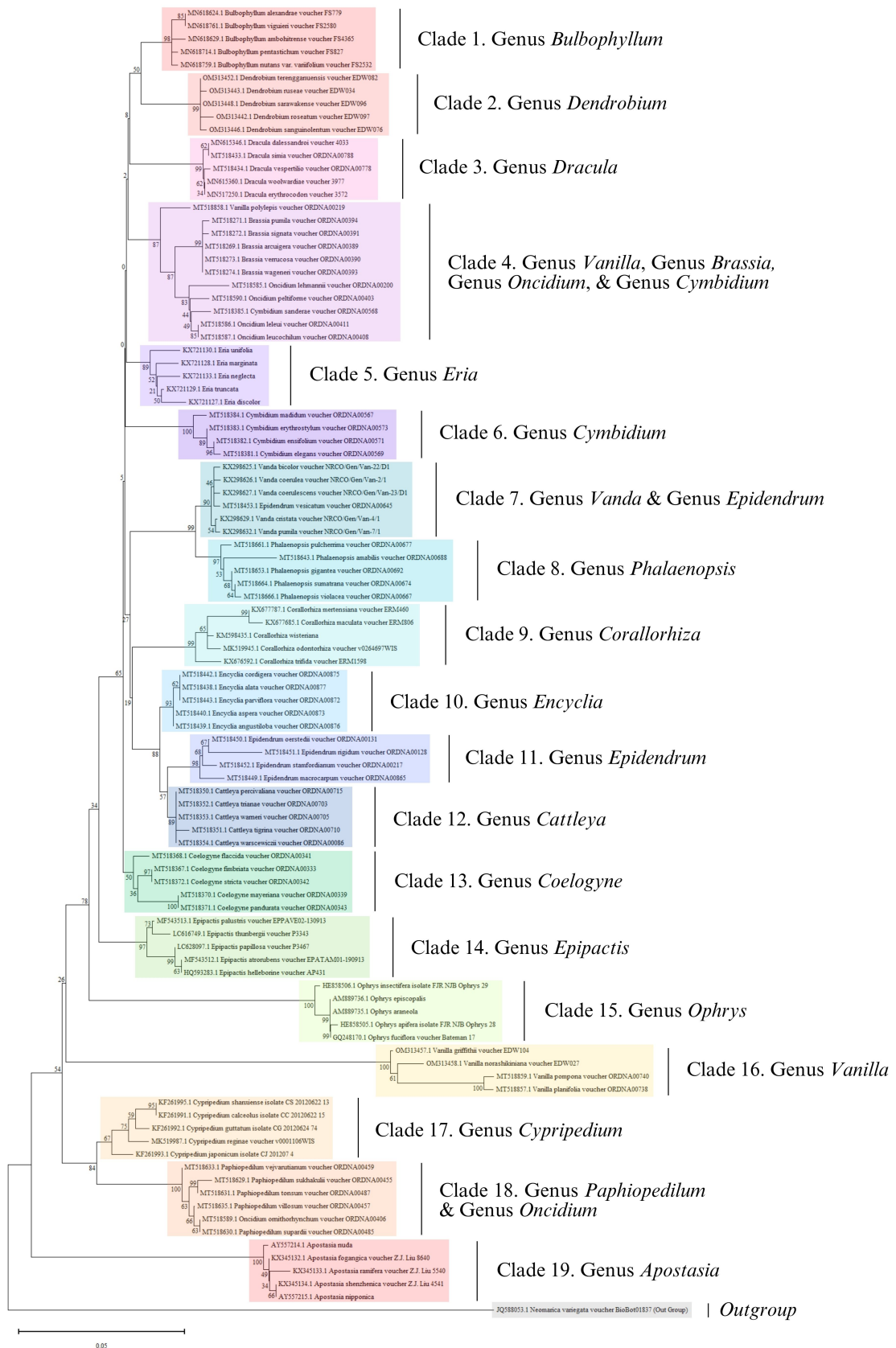
Clade pada pohon filogenetik dapat terbentuk akibat adanya kemiripan urutan basa nitrogen antara suatu spesies dengan spesies lainnya, dimana urutan basa nitrogen yang cenderung sama akan berkumpul dan membentuk kelompok dalam satu clade (Ardiana et al, 2021). Perbedaan komposisi basa nitrogen diantara individu dapat memisahkan spesies dalam genus yang sama pada cabang yang berbeda (Vertiana et al, 2023). Pada clade yang terbentuk oleh spesies-spesies anggrek dengan genus yang sama menandakan jika spesies-spesies tersebut memiliki kemiripan urutan basa nitrogen yang tinggi sehingga mampu membentuk kelompok clade yang terdiri atas spesies-spesies dengan asal genus yang sama. Clade dengan beberapa spesies yang berasal

dari genus yang berbeda menandakan jika spesies-spesies tersebut meskipun berbeda genus tetapi memiliki kemiripan urutan basa nitrogen yang tinggi sehingga mampu mengelompok pada clade yang sama dengan spesies lainnya yang berasal dari genus yang berbeda. Materi genetik DNA pada marka gen matK merupakan DNA pada kloroplas tumbuhan yang berasal dari keturunan maternal dengan tingkat rekombinasi genetik yang rendah sehingga memiliki tingkat homologi yang tinggi (Sindiya et al, 2018). Homologi yang tinggi diantara berbagai spesies pada gen matK mengakitkannya menjadi kurang mampu dalam membedakan antar jenis spesies (Anzani et al, 2021; Aulia, 2022). Penelitian lain mengungkapkan jika penggunaan gen DNA pada kloroplas menunjukkan ketidaksesuaian atau ketidakselarasan hasil dengan hasil yang ditunjukkan oleh penggunaan gen DNA pada inti sel tumbuhan sehingga mampu menghasilkan pola konstruksi pohon filogenetik yang menyesatkan (Fahey et al, 2021; Perez-Escobar et al, 2021). Sekuens nukleotida pada inti sel bersifat lebih informatif daripada kebanyakan gen pada plastida termasuk kloroplas, sehingga penggunaan DNA pada inti sel mampu memberikan hasil yang lebih baik dalam konstruksi pohon filogenetik dibandingkan dengan konstruksi pohon filogenetik menggunakan sekuens DNA yang terdapat pada kloroplas (Perez-Escobar et al, 2021). Adanya tingkat homologi yang tinggi pada gen matK dan kemungkinan potensi ketidaksesuaian hasil dengan penanda gen pada inti sel dapat menjadi penyebab mengapa dalam satu clade yang terbentuk pada hasil konstruksi pohon filogenetik dapat ditemukan beberapa spesies anggrek dari genus yang berbeda.

Tingkat evolusi dari masing-masing spesies anggrek dapat diamati dari garis evolusi yang terbentuk pada pohon filogenetik. Dari pohon filogenetik yang terbentuk, dapat diamati jika spesies *Vanilla planifolia* merupakan spesies dengan tingkat evolusi yang paling jauh diantara spesies-spesies anggrek lainnya, dimana hal ini dapat diamati dari garis evolusi yang paling panjang diantara spesies-spesies yang lainnya. Tingkat evolusi suatu spesies dapat dikatakan semakin jauh apabila memiliki garis evolusi yang semakin panjang diantara spesies-spesies lainnya (Ardiana et al, 2021; Subari et al, 2021). Selain itu, tingkat evolusi terjauh pada *Vanilla planifolia* juga diperkuat oleh hasil perhitungan jarak genetik, dimana *Vanilla planifolia* memiliki jarak genetik yang paling jauh diantara spesies anggrek lainnya. Sebaliknya, *Cypripedium japonicum* merupakan spesies anggrek dengan tingkat evolusi yang paling rendah berdasarkan pada garis evolusinya yang paling pendek. Garis yang terbentuk pada spesies *Cypripedium japonicum* pada pohon filogenetik yang terbentuk menggunakan metode konstruksi *Neighbor Joining Tree* merupakan garis yang paling pendek diantara garis-garis yang terbentuk pada spesies-spesies anggrek lainnya. Pada konstruksi pohon filogenetik, keberadaan *outgroup*

diperlukan untuk mengetahui karakter primitif (plesiomorf) dan karakter derivate (apomorf) pada kelompok *ingroup*, sekaligus menentukan titik awal dari pembentukan sebuah pohon filogenetik (Subari et al, 2021).

Berdasarkan hasil perhitungan jarak genetik dengan *pairwise distance*, dapat diketahui jika nilai jarak genetik tertinggi terdapat pada spesies anggrek *Ophrys apifera* dengan *Vanilla planifolia* sebesar 0,21106 (21,106%) pada kelompok *ingroup*. Sedangkan jarak genetik tertinggi dengan *outgroup* terdapat pada spesies anggrek *Vanilla planifolia* dengan *Neomarica variegata* (spesies *outgroup*) yang bernilai sebesar 0,31287 (31,287%). Nilai jarak genetik yang dihasilkan ini diperkuat dengan topologi pohon filogenetik yang menunjukkan bahwa jarak diantara kedua spesies tersebut memang terletak saling berjauhan. Semakin besar nilai matriks jarak genetik yang terbentuk, maka tingkat kekerabatan spesies semakin jauh dan jarak yang terbentuk pada pohon filogenetik juga semakin jauh (Bramasta et al, 2021). Nilai jarak genetik terendah bernilai sebesar 0,00000 (0,00%), dimana nilai jarak genetik ini terdapat pada spesies anggrek *Brassia verrucosa* dengan *Brassia wagneri*, spesies anggrek *Brassia arcuigera* dengan *Brassia wagneri*, spesies anggrek *Brassia arcuigera* dengan *Brassia verrucosa*, spesies anggrek *Bulbophyllum viguieri* dengan *Bulbophyllum alexandrae*, spesies anggrek *Cattleya warscewiczii* dengan *Cattleya percivaliana*, spesies anggrek *Cattleya warneri* dengan *Cattleya percivaliana*, spesies anggrek *Cattleya trianae* dengan *Cattleya percivaliana*, spesies anggrek *Cattleya warscewiczii* dengan *Cattleya trianae*, spesies anggrek *Cattleya warneri* dengan *Cattleya trianae*, spesies anggrek *Cattleya warscewiczii* dengan *Cattleya warneri*, spesies anggrek *Coelogyne stricta* dengan *Coelogyne fimbriata*, spesies anggrek *Coelogyne pandurata* dengan *Coelogyne mayeriana*, spesies anggrek *Oncidium leuochilum* dengan *Oncidium lelei*, spesies anggrek *Epipactis helleborine* dengan *Epipactis atrorubens*, spesies anggrek *Ophrys araneola* dengan *Ophrys episcopalis*, spesies anggrek *Ophrys fuciflora* dengan *Ophrys episcopalis*, spesies anggrek *Ophrys fuciflora* dengan *Ophrys araneola*, spesies anggrek *Apostasia nipponica* dengan *Apostasia shenzhenica*, spesies anggrek *Cypripedium calceolus* dengan *Cypripedium shanxiense*, spesies anggrek *Phalaenopsis sumatrana* dengan *Phalaenopsis gigantea*, spesies anggrek *Dracula simia* dengan *Dracula dalessandroi*, spesies anggrek *Encyclia cordigera* dengan *Encyclia parviflora*, spesies anggrek *Encyclia alata* dengan *Encyclia parviflora*, spesies anggrek *Encyclia alata* dengan *Encyclia cordigera*, spesies anggrek *Encyclia angustiloba* dengan *Encyclia aspera*, spesies anggrek *Dendrobium sarawakense* dengan *Dendrobium terengganuensis*.



Gambar 1. Topologi Hasil Konstruksi Pohon Filogenetik Menggunakan Metode *Neighbor Joining* (Bootstrap 1000) pada Beberapa Spesies dalam Famili Orchidaceae dengan Gen matK Parsial

Jarak genetik dengan nilai 0,00 (0%) menunjukkan jika spesies-spesies dengan jarak genetik tersebut berasal dari satu populasi yang sama (Zamroni et al, 2014). Hasil yang diperoleh menunjukkan hal yang demikian, dimana pada spesies-spesies dengan jarak genetik sebesar 0,00 (0%) merupakan spesies-spesies yang berasal dari genus yang sama. Nilai matriks jarak genetik yang bernilai semakin rendah menunjukkan adanya hubungan kekerabatan yang semakin dekat. Hasil penghitungan jarak genetik ini dapat digunakan untuk mengukur tingkat perbedaan gen diantara seluruh spesies anggrek yang telah dianalisis dalam penghitungan jarak genetik.

Hasil perhitungan jarak genetik diantara clade dengan *pairwise distance* menunjukkan jika clade 16 dengan *outgroup* memiliki jarak genetik yang paling tinggi dengan nilai jarak genetik sebesar 0,30 (30%). Pada *ingroup*, jarak genetik tertinggi terdapat pada clade 15 dengan clade 16 dengan nilai jarak genetik sebesar 0,20 (20%). Sedangkan, nilai jarak genetik terendah diantara seluruh clade dengan nilai sebesar 0,01 (1%) terdapat pada clade 12 dengan clade 10 (Tabel 3). Hasil yang diperoleh menunjukkan jika clade 10 dan clade 12 memiliki hubungan kekerabatan yang paling dekat jika ditinjau dari nilai matriks jarak genetik yang paling kecil. Sebaliknya, hubungan kekerabatan pada *ingroup* yang paling jauh terdapat pada clade 15 dengan clade 16 dengan nilai matriks jarak genetik yang paling besar diantara nilai matriks jarak genetik pada clade lainnya (Zein, 2020).

Jarak genetik diantara spesies-spesies anggrek dalam satu clade dengan nilai terendah terdapat pada clade 10 dengan besar nilai jarak genetik yaitu 0.00122 ± 0.0012 (Tabel 4). Selanjutnya, nilai terendah kedua disusul oleh clade 12 dengan nilai jarak genetik sebesar 0.00163 ± 0.0012 , lalu nilai terendah ketiga yang bernilai sebesar 0.00204 ± 0.0014 terdapat pada clade 3 dalam pohon filogenetik. Sebaliknya, nilai jarak genetik diantara spesies-spesies anggrek dalam satu clade pada pohon filogenetik dengan nilai tertinggi terdapat pada clade 16 yang bernilai sebesar 0.02642 ± 0.0062 , yang selanjutnya disusul oleh clade 11 yang bernilai sebesar 0.01589 ± 0.0042 dan clade 9 yang bernilai sebesar 0.01568 ± 0.0040 (Tabel 4). Perhitungan jarak genetik ini menunjukkan jika tingkat kekerabatan antar spesies anggrek pada clade 10, clade 12, dan clade 3 memiliki kekerabatan yang sangat dekat. Selanjutnya, pada clade 16, clade 11, dan clade 9 terdapat hubungan kekerabatan antar spesies anggrek dalam satu clade yang berkerabat cukup jauh apabila ditinjau dari nilai matriks jarak genetiknya (Zein, 2020).

Tabel 3. Hasil Penghitungan Jarak Genetik Intraspesifik diantara Seluruh Clade Menggunakan *Between Group Mean Distance* pada MEGA 11 terhadap Spesies dalam Famili Orchidaceae dengan Gen matK Parsial (*Bootstrap 1000*)

Clade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Out	
1																					
2	0.03																				
3	0.04	0.05																			
4	0.04	0.05	0.05																		
5	0.03	0.04	0.04	0.04																	
6	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04																
7	0.05	0.05	0.05	0.06	0.04	0.05															
8	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.02														
9	0.05	0.06	0.06	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06													
10	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.04												
11	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06	0.03											
12	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.01	0.02										
13	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	0.04	0.03									
14	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.07	0.07	0.04	0.06	0.05	0.04								
15	0.10	0.11	0.11	0.10	0.10	0.11	0.10	0.11	0.11	0.10	0.12	0.10	0.09	0.09							
16	0.15	0.16	0.16	0.16	0.15	0.16	0.16	0.17	0.17	0.15	0.16	0.15	0.14	0.15	0.20						
17	0.06	0.06	0.07	0.07	0.06	0.07	0.08	0.09	0.08	0.06	0.07	0.06	0.06	0.06	0.10	0.14					
18	0.07	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.09	0.10	0.09	0.08	0.09	0.08	0.07	0.08	0.12	0.16	0.04				
19	0.12	0.13	0.12	0.13	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12	0.17	0.18	0.11	0.13			
Out	0.20	0.22	0.20	0.20	0.19	0.20	0.22	0.22	0.22	0.20	0.21	0.20	0.20	0.20	0.25	0.30	0.18	0.20	0.23		

Keterangan:

- Jarak genetik tertinggi (*outgroup*)
- Jarak genetik tertinggi (*ingroup*)
- Jarak genetik terendah

Tabel 4. Hasil Penghitungan Jarak Genetik Intraspesifik diantara Spesies-Spesies Anggrek pada Seluruh Clade Menggunakan *Within Group Mean Distance* pada MEGA 11 dengan Gen matK Parsial (*Bootstrap 1000*)

Clade	Jarak Genetik	Standar Error
Clade 1	0.00573	0.0025
Clade 2	0.00327	0.0017
Clade 3	0.00204	0.0014
Clade 4	0.01531	0.0034
Clade 5	0.01399	0.0034
Clade 6	0.0065	0.0027
Clade 7	0.0045	0.0019
Clade 8	0.01031	0.0031
Clade 9	0.01568	0.004
Clade 10	0.00122	0.0012
Clade 11	0.01589	0.0042
Clade 12	0.00163	0.0012
Clade 13	0.01238	0.0038
Clade 14	0.00972	0.0035
Clade 15	0.00327	0.0017
Clade 16	0.02642	0.0062
Clade 17	0.01323	0.0036
Clade 18	0.00548	0.0024
Clade 19	0.00494	0.0022

Keterangan:

- Jarak genetik tertinggi
- Jarak genetik terendah

4. SIMPULAN

Berdasarkan hasil konstruksi pohon filogenetik yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan jika konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining Tree* menghasilkan sebanyak 19 clade yang mewakili 20 genus anggrek yang dilakukan analisis, dimana pohon filogenetik yang dihasilkan memiliki tingkat kepercayaan atau akurasi yang baik. Hasil konstruksi pohon filogenetik juga menunjukkan adanya tingkat evolusi tertinggi yang terjadi pada spesies *Vanilla planifolia* dengan berdasarkan pada garis evolusi yang terbentuk pada pohon filogenetik. Hasil penghitungan jarak gen menunjukkan jika jarak genetik tertinggi bernilai sebesar 0,21106 (21,106%) pada kelompok *ingroup* yang terdapat pada spesies anggrek *Ophrys apifera* dengan *Vanilla planifolia*. Sedangkan, jarak genetik terendah bernilai sebesar 0,0000 (0,000%), dimana hasil penghitungan ini dapat digunakan untuk mengukur tingkat perbedaan gen diantara seluruh spesies-spesies anggrek yang dilakukan analisis dengan konstruksi pohon filogenetik.

Saran yang dapat diberikan dari hasil studi ini adalah perlu dilakukan adanya upaya analisis lebih lanjut terhadap spesies-spesies dalam famili Orchidaceae melalui pendekatan secara morfologi yang lebih kompleks maupun pendekatan dengan menggunakan data molekuler dari materi genetik berbagai spesies anggrek pada marka gen atau lokus gen yang lainnya guna mendapatkan hasil konstruksi pohon filogenetik yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelsalam, N. R., Hasan, M. E., Javed, T., Rabie, S. M. A., El-Wakeel, H. E. D. M. F., Zaitoun, A. F., Abdelsalam, A. Z., Aly, H. M., Ghareeb, R. Y., Hemeida, A. A., & Shah, A. N. (2022). Endorsement and phylogenetic analysis of some Fabaceae plants based on DNA barcoding. *Molecular Biology Reports*, 49(6), 5645–5657. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07574-z>
- Anzani, A. N., Martiansyah, I., & Yuliani, N. (2021). Studi In Silico DNA barcoding pada bunga soka (*Ixora*). *Jurnal UIN Alauddin*, November, 168–177. <http://journal.uin-alauddin.ac.id/index.php/psb>
- Ardiana, S. A., Astarini, I. A., Putra, I. N. G., Pertiwi, P. D., Sembiring, A., Yusmalinda, A., & Al Malik, D. (2021). Genetic Diversity and Phylogenetic of Longtail Tuna (*Thunnus tonggol*) Landed in Pabean Fish Market, Surabaya. *Musamus Fisheries and Marine Journal*, March, 107–115. <https://doi.org/10.35724/mfmj.v3i2.3375>
- Aulia, A. (2022). Studi In Silico Potensi DNA Barcode Berbasis DNA Kloroplas (CpDNA) untuk Identifikasi Variasi Genetik *Opuntia* sp. *Jurnal Syntax Admiration*, 3(11), 1383–1394.

<https://doi.org/10.46799/jsa.v3i11.512>

- Barthet, M. M., Pierpont, C. L., & Tavernier, E. K. (2020). Unraveling the role of the enigmatic MatK maturase in chloroplast group IIA intron excision. *Plant Direct*, 4(3), 1–17. <https://doi.org/10.1002/pld3.208>
- Bramasta, R. C., Faiqoh, E., Hendrawan, I. G., Sembiring, A., & Yusmalinda, N. L. A. (2021). Identifikasi Hiu yang Diperdagangkan di Bali Menggunakan Metode DNA Barcoding dan Analisis Filogenetik. *Journal of Marine and Aquatic Sciences*, 7(1), 84. <https://doi.org/10.24843/jmas.2021.v07.i01.p12>
- Ekajaya, R. K., Endlessa, C., Putri Salsabila, A., Ratu Rahayu Ningrum, S., & Hidayat, T. (2023). Klasifikasi Accipitriformes dan Falconiformes Berdasarkan Penanda DNA Parsial Cytochrome Oxidase 1 (CO1) secara In Silico. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 8(3), 148–158. <https://doi.org/10.24002/biota.v8i3.6761>
- Fahey, P. S., Fowler, R. M., Udovicic, F., Cantrill, D. J., & Bayly, M. J. (2021). Use of Plastid Genome Sequences in Phylogeographic Studies of Tree Species Can be Misleading without Comprehensive Sampling of Co-Occurring, Related Species. *Tree Genetics and Genomes*, 17(6). <https://doi.org/10.1007/s11295-021-01524-9>
- Indahsari, L. I. N. (2023). Studi Filogenetik Kantung Semar (*Nepenthes* spp.) Berdasarkan Sekuens Gen Nep2 dan trnK di Paparan Sunda: Studi in Silico. *Wahana-Bio: Jurnal Biologi Dan Pembelajarannya*, 15(1), 12. <https://doi.org/10.20527/wb.v15i1.14577>
- Liu, L., Du, J., Liu, Z., Zuo, W., Wang, Z., Li, J., & Zeng, Y. (2023). Comparative and phylogenetic analyses of nine complete chloroplast genomes of Orchidaceae. *Scientific Reports*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48043-2>
- Pratiwi, A., Kinasih, A., Meidianing, M. I., Kurniawan, F. Y., & Semiarti, E. (2023). In Silico Approach for DNA Barcoding using Phylogenetic Analysis of *Coelogyne* spp. based on the matK, rpoC1, rbcL and nrDNA Markers. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 8(3), 1–14. <https://doi.org/10.22146/jtbb.73130>
- Perez-Escobar, O. A., Dodsworth, S., Bogarín, D., Bellot, S., Balbuena, J. A., Schley, R. J., Kikuchi, I. A., Morris, S. K., Epitawalage, N., Cowan, R., Maurin, O., Zuntini, A., Arias, T., Serna-Sánchez, A., Gravendeel, B., Torres Jimenez, M. F., Nargar, K., Chomicki, G., Chase, M. W., & Baker, W. J. (2021). Hundreds of nuclear and plastid loci yield novel insights into orchid relationships. *American Journal of*

- Botany*, 108(7), 1166–1180. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1702>
- Post, N. W., Gilbert, C. C., Pugh, K. D., & Mongle, C. S. (2023). Implications of outgroup selection in the phylogenetic inference of hominoids and fossil hominins. *Journal of Human Evolution*, 184, 103437. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2023.103437>
- Rani J, J., & Nandagopalan, V. (2023). Molecular Characterization of Maturase K Gene and Protein Prediction of *Vanda spathulata* (L.) - An Ayurinformatics Approaches. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 15(3), 382–393. <https://doi.org/10.25004/ijpsdr.2023.150319>
- Rina, V. S., & Safitri, E. (2023). Anggrek yang Ditemukan di Kawasan Air Terjun Sungai Geringging Kabupaten Padang Pariaman Sebagai Sumbangsih Pada Materi Keanekaragaman Hayati. *Jurnal Pendidikan Tambusai*, 7, 21994–22001.
- Sindiya, V., Mukarramah, L., Rohimah, S., Al GhifariPerwitasari, D., & Su'udi, M. (2018). Studi In Silico Potensi DNA Barcode pada Anggrek Langka *Paphiopedilum*. *BIOSFER : Jurnal Biologi Dan Pendidikan Biologi*, 3(1). <https://doi.org/10.23969/biosfer.v3i1.1250>
- Subari, A., Razak, A., & Sumarmin, R. (2021). Phylogenetic Analysis of *Rasbora* spp. Based on the Mitochondrial DNA COI gene in Harapan Forest. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(1), 89–94. <https://doi.org/10.29303/jbt.v21i1.2351>
- Vertiana, E. V., Oksari, A. A., & Hariri, M. R. (2023). Studi Perbandingan Kode Batang DNA Inti dan Kloroplas pada *Heliconia* sp. In Silico. *BIO-SAINS: Jurnal Ilmiah Biologi*, 2(2), 39–47. <https://doi.org/10.34005/bio-sains.v2i2.2108>
- Wirdateti, & Nugraha, R. T. P. (2016). Variasi dan Filogeni Kancil dan Napu (*Tragulus* Sp.) di Indonesia Menggunakan Gen 12s rRNA Mitokondria. *Jurnal Veteriner*, 17(1), 22–29. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.1.22>
- Zamroni, A., Suwarso, S., & Nugroho, E. (2016). Struktur genetika populasi ikan malalugis biru (*Decapterus macarellus* Cuvier, 1833) Di Sekitar Sulawesi Berdasarkan Mt-DNA Marker. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 20(1), 31-41.
- Zein, M. S. A. (2020). Pelacakan Molekuler terhadap Hasil Sitaan Karkas Trenggiling pada Perdagangan Ilegal di Indonesia Berbasis Gen Barkode. *Jurnal Biologi Indonesia*, 16(1), 13–23. <https://doi.org/10.47349/jbi/16012020/13>