



dapat diakses melalui <http://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/jmuo>



Barcode DNA Edelweis (*Anaphalis javanica*) Berdasarkan Gen *matK*

Muzakir Rahalus^a, Maureen Kumaunang^{a*}, Audy Wuntu^a, Julius Pontoh^a

^aJurusan Kimia, FMIPA, Unsrat, Manado

KATA KUNCI

edelweis
matK
barcode DNA
analisis kekerabatan

ABSTRAK

DNA *barcode* merupakan metode identifikasi organisme hidup dengan menggunakan urutan DNA pendek (\pm 500 pasang basa). Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh *barcode* DNA Edelweis dan menganalisis kemiripan gen *matK* Edelweis (*Anaphalis javanica*) dengan kerabat terdekatnya. Isolasi DNA total Edelweis berhasil dilakukan dengan menggunakan manual prosedur dari *InnuPrep Plant DNA Kit* yang dimodifikasi. Gen *matK* parsial telah diisolasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan *Primer forward matK-1RKIM-f* dan *Primer Reverse matK-3FKIM-r*. Hasil analisis sekuens menghasilkan barcode DNA edelweis berukuran 843 bp. Hasil analisis kemiripan menunjukkan tingkat kekerabatan terdekat dengan *A. margaritaceae* yaitu 99.86% pada BOLD System dan 100 % pada NCBI.

KEYWORDS

edelweiss
matK
DNA barcode
sequence similarity

ABSTRACT

DNA barcode is a method to identify living organism by using several short sequences of DNA (\pm 500 base pairs). The purpose of this study was to obtain a DNA barcode and analyze the similarity of *matK* genes of edelweis (*Anaphalis javanica*) with its closest relatives. Isolation of total DNA of edelweis has been successfully done by using modified manual procedures of *InnuPrep Plant Kit*. *matK* partial gene has been isolated by the method of *Polymerase Chain Reaction* (PCR) using forward primer *MATK-1RKIM-f* and reverse primer *MATK-3FKIM-r*. Analysis of DNA sequences of edelweis confirmed its DNA barcode size was 843 bp. Furthermore, *A. javanica* showed similarity 99.86% in BOLD system and 100% in NCBI with *A. margaritaceae*.

TERSEDIA ONLINE

29 juli 2015

1. Pendahuluan

Anaphalis javanica, yang dikenal secara populer sebagai Edelweis jawa (*Javanese edelweiss*) atau Bunga Senduro, adalah tumbuhan endemik zona alpina/montana di berbagai pegunungan tinggi Nusantara (Whitten *et al.*, 1992). Dalam keadaan kering bunganya tahan lama dan menimbulkan bau yang khas. Tumbuhan ini hidup pada ketinggian antara 1.600-3.600 m dari permukaan laut dan dapat hidup pada tanah yang miskin kandungan hara (Aliadi, *et al.*, 1990). Di Sulawesi Utara edelweis terdapat pada kawasan konservasi Cagar

Alam (CA) Gunung Tangkoko, CA Duasudara dan di Gunung Sopotan.

Ekstrak edelweis telah digunakan sejak zaman dahulu untuk menyembuhkan penyakit disentri, diare dan TBC. Ekstrak edelweis juga sering ditambahkan ke dalam secangkir susu panas yang dicampur dengan madu. Selain itu, ekstrak edelweis juga bermanfaat sebagai anti penuaan karena mengandung antioksidan dan antimikroba (Whitten *et al.*, 1992).

Di Gunung Sopotan sendiri banyak pendaki yang sering mengambil edelweis tanpa memikirkan kelestariannya. Bila pengambilan bunga terus

*Corresponding author: Jurusan Kimia FMIPA UNSRAT, Jl. Kampus Unsrat, Manado, Indonesia 95115; Email address: maureen273@yahoo.com

dibiarkan, bukan mustahil suatu saat edelweis akan punah karena tidak dapat berkembang biak dan akibatnya berbagai manfaat kimiawi untuk kesehatan tidak akan ada lagi.

Walaupun saat ini kandungan kimia edelweis telah diketahui banyak manfaatnya dalam bidang kesehatan, tapi penelitian bahan aktif dalam tanaman tersebut belum banyak dilakukan. Hal ini dimungkinkan karena proses pengambilannya yang sulit. Sebagai langkah awal agar dapat menumbuhkan, mengembangkan, dan merekayasa secara genetik edelweis sebagai tanaman kesehatan produktif, maka diperlukan teknik molekuler. Berbagai teknik analisis dalam pemuliaan tanaman yang berdasarkan pada hibridisasi molekuler seperti pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) membutuhkan DNA dalam jumlah yang cukup dan kualitas yang baik. Oleh karena kandungan senyawa sekunder dalam sel tanaman berbeda-beda maka setiap tanaman membutuhkan prosedur isolasi yang optimum agar diperoleh DNA genom yang dapat digunakan sebagai bahan dalam analisis molekuler (Stoeckle *et al.*, 2011). Salah satu aplikasi analisis molekuler adalah dalam penentuan spesies makhluk hidup.

Metode identifikasi spesies makhluk hidup telah berkembang dari identifikasi morfologi, sampai pada identifikasi molekuler berdasarkan potongan DNA pendek yang disebut "barcode DNA" (Hebert *et al.*, 2003). Barcode DNA memiliki fungsi-fungsi yang aplikatif, di antaranya adalah konfirmasi sampel-sampel tanaman obat (Xue dan Li, 2011). Untuk mempelajari keanekaragaman genetik spesies tumbuhan berdasarkan teknik "barcode DNA" adalah dengan menggunakan sekuens DNA dari gen ribulosa-1,5-bisfosfat karboksilase (*rbcL*) dan gen maturase K (*matK*) yang terdapat dalam kloroplas sebagai gen standar (Kress *et al.*, 2005).

Berdasarkan studi literatur, barcode DNA untuk edelweiss (*A. javanica*) belum pernah dipublikasikan. Oleh karena itu, perlu dilakukan identifikasi DNA barcode edelweis (*A. javanica*), serta analisis hubungan kekerabatannya dengan tanaman lain.

2. bahan dan Metode

2.1. Material

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas kimia, timbangan, *hotplate*, alat elektroforesis, mikropipet, termoblok, Freezer, *UV transilluminator*, spektrofotometer UV-Vis, dan alat PCR (Biometra T-personal, Jerman).

Bahan-bahan yang digunakan, adalah daun edelweis yang diambil dari Gunung Sopotan, *InnuPREP Plant DNA kit* (Analytik Jena), *master mix* untuk PCR (*GoTaq®Green Master Mix*, Promega), *primer forward matK-1RKIM-f* (5'-ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC -3') dan *primer reverse matK-3FKIM-r* (5'-CGT ACA GTA CTT TTG TGT TAC GAG-3') (*Integrated DNA Technology* (IDT), Singapura),

agarosa (Merck), akuades, etidium bromida (Merck) dan buffer Tris-borat-EDTA (TBE, Promega).

2.2. Metode

2.2.1. Isolasi DNA

Isolasi DNA total edelweis dilakukan berdasarkan prosedur manual *InnuPrep Plant DNA Kit* yang dimodifikasi. Sampel edelweis yang telah digerus dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan ditambahkan Lysis Solution SLS (300 µL) dan Proteinase K (25 µL) dan diinversikan beberapa kali sehingga homogen dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 45 menit menggunakan termoblok, kemudian tabung diinversi beberapa kali setiap 10 menit Prefilter dimasukkan ke dalam tabung penampung kemudian sampel dituangkan ke dalam prefilter dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya ditambahkan *Binding solution* SBS 200 µL ke dalam tabung yang berisi supernatant/filtrat. Setelah itu Spin Filter dimasukkan ke dalam tabung penampung kemudian sampel dituangkan ke dalam Spin Filter dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya filtrat dibuang dan Spin Filter dimasukkan kembali ke tabung penampung dan ditambahkan *Washing Solution* HS 500 µL dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang dan dimasukkan kembali Spin Filter ke tabung penampung dan ditambahkan *Washing Solution* MS 750 µL dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang dan dimasukkan kembali Spin Filter ke tabung penampung dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Spin Filter dipindahkan ke tabung Eppendorf, dan ditambahkan larutan pengelusi 100 µL dan didiamkan pada suhu ruang selama 1 menit kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit. Larutan DNA disimpan dalam freezer (-20°C).

2.2.2. Amplifikasi *matK* Edelweis menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

PCR *master mix* dibuat dengan menggunakan *GoTaq®Green Master Mix* (Promega). Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 40 µL. Komposisi reaksi PCR terdiri dari: 2 µL DNA templat sampel edelweis, 20 µL *master mix*, 15 µL akuades steril, 1,5 µL primer *forward matK-3F* (5'-CGT ACA GTA CTT TTG TGT TACGAG-3'), dan 1,5 µL primer *reverse matK-1R* (5'-ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3'). Pengaturan suhu mesin PCR untuk denaturasi awal yaitu 95°C selama 2 menit. Siklus amplifikasi dilakukan sebanyak 35 kali, yaitu denaturasi dilakukan pada suhu 95 °C selama 30 detik, penempelan primer dilakukan pada suhu 52 °C selama 1 menit, dan reaksi polimerase dilakukan pada suhu 72 °C selama 90 detik. Tahap pemantapan dilakukan pada suhu 72 °C selama 10 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis dan ditentukan urutan nukleotidanya. Hasil PCR dikirim ke Malaysia (*First Base Pte.*) untuk dilakukan proses pengurutan nukleotida (sekuensing).

2.2.3. Elektroforesis agarosa

Elektroforesis dilakukan untuk melihat keberhasilan proses PCR. Sebanyak 1 g agarosa dilarutkan dengan aquades sampai 100 mL dan dipanaskan dengan *hot plate*. *Beaker glass* diangkat saat larutan mulai mendidih dan dituang ke dalam cetakan dan didinginkan pada suhu kira-kira 50 °C. Selanjutnya ditambahkan etidium bromida 0,5 µg/mL. Gel agarosa diletakkan dalam alat elektroforesis yang telah diisi dengan larutan buffer Tris-borat-EDTA 1X. Sampel hasil PCR dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis. Sebagai standar, digunakan *DNA ladder* 1 kb. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V selama 30 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan UV-Transiluminator pada panjang gelombang $\lambda = 312$ nm dan didokumentasikan.

2.2.4. Analisis hasil

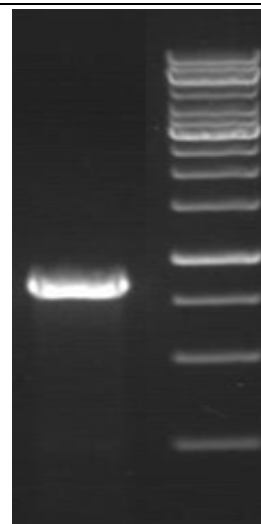
Kromatogram DNA hasil sekuensing disunting menggunakan software Geneious v5.6 (Drummond et. al., 2012). Bagian awal dan akhir hasil kromatogram DNA tersebut dihapus kira-kira 30 bp dan untuk pembacaan nukleotida yang keliru diperbaiki berdasarkan tingkat keakuratan yang terbaca. Hasil sekuensing yang menggunakan primer *reverse* dilakukan proses *reverse and complement* kemudian dipadukan dengan hasil sekuensing primer *forward* menggunakan *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* (MUSCLE) (Edgar, 2004).

Keakuratan amplifikasi gen target diuji dengan memprediksi urutan asam amino berdasarkan sekuens *matK*. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat adanya kodon stop (UAA, UAG atau UGA) di tengah sekuens gen-gen aktif tersebut sehingga diketahui pasti bahwa yang teramplifikasi bukan gen semu (*pseudo gen*). Potongan gen *matK* diidentifikasi lewat *Barcode of Life Database* (BOLD) system (www.boldsystems.org) (Ratnasingham and Hebert, 2007). Selanjutnya dilakukan analisis kekerabatan edelweis (*A. javanica*) menggunakan program BLASTn pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Isolasi DNA dan Amplifikasi *matK* Edelweis

Isolasi DNA total edelweis dilakukan untuk memperoleh templat DNA dalam proses amplifikasi gen *matK* edelweis. Proses PCR telah berhasil mengamplifikasi *matK* edelweis yang ditunjukkan melalui hasil elektroforesis seperti dalam Gambar 1. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA yang jelas dan tebal sebagai bukti keberhasilan amplifikasi *matK*. Hasil PCR ini selanjutnya disekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida *matK* edelweis.



Gambar 1. Elektroforegram pita DNA hasil elektroforesis (S: sampel, M: marker *DNA ladder*)

3.2. Analisis Urutan Nukleotida *matK* dan Penentuan *Barcode DNA* Edelweis

Panjang hasil sekuensing (pengurutan) DNA edelweis (*A. javanica*) dari *matK forward* adalah 868 bp, sedangkan *matK reverse* setelah pembalikan 867 bp. Penjajaran antara *matK forward* dan *matK reverse* 901 bp. Hasil sekuens yang telah dipotong ± 30 bp pada awal dan akhir untai DNA, menghasilkan sekuens baru (Gambar 2).

Pengujian terhadap asam amino pengkode dari sekuens DNA kloroplas ini menunjukkan tidak adanya kodon stop di tengah-tengah sekuens. Hal ini membuktikan bahwa hasil amplifikasi DNA yang dilakukan sudah valid mengingat gen tersebut pembacaannya dalam bingkai terbuka (*open reading frame*) enzim-enzim fotosintesis. Pembacaan gen *matK* menggunakan *frame 3* yaitu pembacaan dimulai dari asam amino yang ketiga.

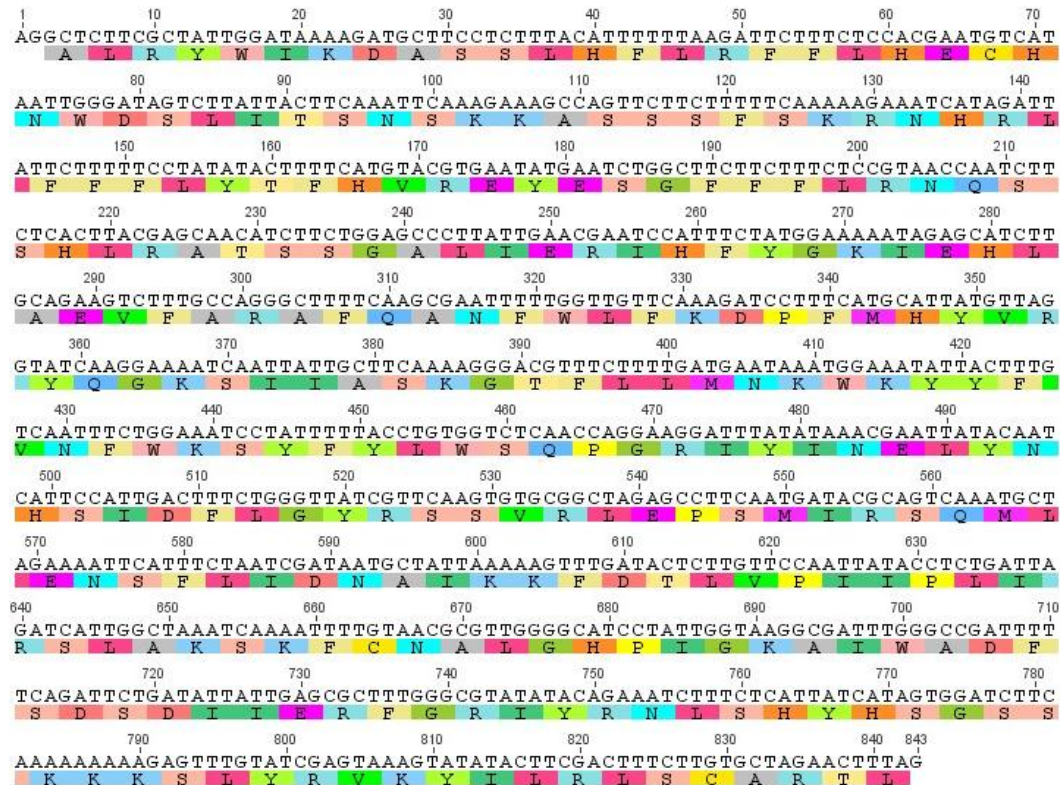
3.3. Analisis Hubungan Kekerabatan Edelweis

Penelusuran pada BOLD System untuk sekuens *matK* dari *A. javanica* menunjukkan belum adanya publikasi mengenai DNA barcode *A. javanica*. Berdasarkan hasil penelusuran BOLD System, terdapat 99 jenis urutan nukleotida yang mempunyai kemiripan dengan *A. javanica* yang terurut dari *rank* pertama (1) sampai *rank* ke (99) sesuai panjang sekuens pasangan basa. Hasil penelusuran juga tidak ditemukan kemiripan sampai 100% (identik). Keseluruhan 99 nukleotida *matK* berbagai organisme yang berhasil dideteksi melalui BOLD System memiliki variasi tingkat kemiripan. Beberapa organisme memiliki tingkat kemiripan yang tinggi, yaitu > 99 % walaupun dari genus yang berbeda, namun masih berada dalam satu famili *Asteraceae*. Spesies yang kemiripannya sangat tinggi dan masih satu genus dengan *A. javanica* yaitu *A. margaritaceae* dengan tingkat kemiripan 99,88 % dengan panjang sekuens 817 bp (dapat dilihat di *rank* ke 11 pada Gambar 3, yang

diberi kotak). Hasil identifikasi pada BOLD system tidak ditampilkan semua. Data yang ditampilkan hanya rank 1-20.

Hasil penelusuran melalui BOLD system diperkuat juga melalui situs NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://ncbi.nlm.nih.gov>).

Dalam situs ini, urutan nukleotida *matK* *A. javanica* juga tidak ditemukan, yang menunjukkan bahwa penentuan urutan nukleotida *matK* *A. javanica* belum pernah dilakukan, sehingga penelitian ini merupakan penelitian yang pertama kali dilakukan.



Gambar 2. Sekuens barcode DNA *matK* dan Asam Amino *A. javanica*

Match Rank	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Score	Similarity
1	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Gnaphalium	<i>luteo-album</i>	835	99.53
2	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Helichrysum	<i>kraussii</i>	833	99.52
3	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Pseudognaphalium	<i>luteoalbum</i>	833	99.52
4	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Helichrysum		831	99.41
5	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Gnaphalium	<i>sylvaticum</i>	823	98.81
6	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Pseudognaphalium	<i>luteoalbum</i>	819	99.28
7	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Helichrysum	<i>petiolare</i>	818	99.4
8	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Filago	<i>minima</i>	817	98.46
9	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Filago	<i>minima</i>	817	98.46
10	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Filago	<i>minima</i>	817	98.46
11	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Anaphalis	<i>margaritacea</i>	817	99.88
12	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Pseudognaphalium	<i>oligandrum</i>	815	99.76
13	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Helichrysum	<i>foetidum</i>	815	99.76
14	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Antennaria	<i>dioica</i>	813	98.68
15	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Pterygopappus	<i>lawrencii</i>	813	99.63
16	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Helichrysum	<i>plicatum</i>	811	99.51
17	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Helichrysum	<i>pallasii</i>	811	99.51
18	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Helichrysum	<i>italicum subsp. microphyllum</i>	811	99.51
19	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Pseudognaphalium	<i>luteoalbum</i>	811	99.51
20	Magnoliophyta	Magnoliopsida	Asterales	Asteraceae	Gnaphalium	<i>norvegicum</i>	810	98.8

Gambar 3. Penelusuran BOLD system untuk sekuens *matK* Edelweis (*A. javanica*)

Berdasarkan hasil analisis BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool - nucleotida*), ditemukan bahwa *matK A. javanica* memiliki kemiripan terdekat dengan *A. margaritaceae* sebesar 99% (Gambar 4, urutan pertama), sehingga memperkuat

hasil analisis BOLD System. Kemiripan ini juga diperkuat dengan melihat pohon kekerabatan *A. javanica* yang berada satu root dengan *A. margaritaceae* (Gambar 5).

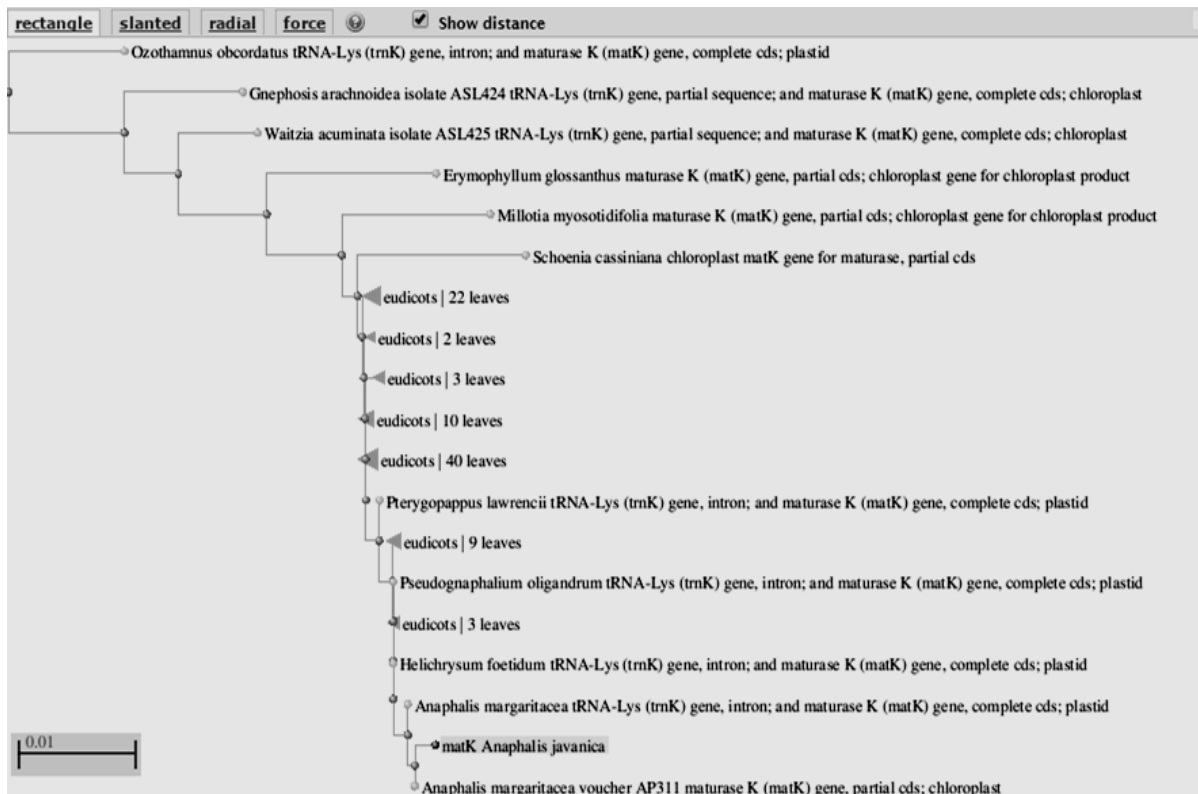
Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 100

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Anaphalis margaritacea tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1528	1528	99%	0.0	99%	HM445632.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudognaphalium oligandrum tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1522	1522	99%	0.0	99%	HM445636.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helichrysum foetidum tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1522	1522	99%	0.0	99%	HM445633.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pterygopappus lawrencii tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1517	1517	99%	0.0	99%	HM445651.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudognaphalium luteoalbum tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1511	1511	99%	0.0	99%	HM445639.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helichrysum plicatum tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1511	1511	99%	0.0	99%	HM445635.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helichrysum pallasii tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1511	1511	99%	0.0	99%	HM445634.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helichrysum italicum subsp. microphyllum tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1511	1511	99%	0.0	99%	HM445630.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helichrysum petiolare tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1506	1506	99%	0.0	99%	HM445631.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helichrysum serotinum subsp. picardii tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1506	1506	99%	0.0	99%	HM445629.1
<input checked="" type="checkbox"/> Ewartiothamnus sinclairii tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1506	1506	99%	0.0	99%	HM445625.1
<input checked="" type="checkbox"/> Helichrysum lanceolatum tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1506	1506	99%	0.0	99%	HM445624.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leucogenes grandiceps voucher CHR 514141 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1506	1506	99%	0.0	99%	HM445616.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leucogenes leontopodium voucher CHR 510025 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1506	1506	99%	0.0	99%	HM445615.1
<input checked="" type="checkbox"/> Anaphaloides bellidoidea tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1506	1506	99%	0.0	99%	HM445613.1
<input checked="" type="checkbox"/> Raoulia grandiflora tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1506	1506	99%	0.0	99%	HM445597.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cassinia scabrata tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1500	1500	99%	0.0	99%	HM445649.1
<input checked="" type="checkbox"/> Parantennaria uniceps tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1500	1500	99%	0.0	99%	HM445627.1
<input checked="" type="checkbox"/> Leucogenes neolecta tRNA-Lys (trnK) gene, intron; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1500	1500	99%	0.0	99%	HM445614.1
<input checked="" type="checkbox"/> Anaphaloides trinervis voucher CHR 569864 tRNA-Lys (trnK) gene, partial sequence; and maturase K (matK) gene, complete cds; plastid	1500	1500	99%	0.0	99%	HM445612.1

Gambar 4. Hasil analisis BLASTn *matK A. javanica*



Gambar 5. Pohon kekerabatan *A. javanica*

4. Kesimpulan

Barcode DNA Edelweis (*Anaphalis javanica*) telah diperoleh dengan panjang sekuens 843 pb berdasarkan gen *matK*. Hasil analisis kekerabatan menunjukkan bahwa Edelweis (*A. javanica*) memiliki kerabat terdekat dengan *A. margaritacea*, dengan tingkat kemiripan 99%.

Daftar Pustaka

- Aliadi, A., A.M.Z. Efrizal, dan Dj. Edje. 1990. Kemungkinan Penangkaran Edelweis (*Anaphalis javanica* (Bl.) Boerl.) dengan Stek Batang (*Possibilities of Cultivating Edelweis with Stem Cuttings*). *Media Konservasi*. **3 (1)**: 37-45.
- Drummond, A. J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, M. Kearse, S. Markowitz, S. Sturrock, T. Thierer, and A. Wilson. 2012. Geneious v5.6. Biomatters, New Zealand.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Res.***5** : 1792-1797.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. deWard. 2003. Biological identifications Through DNA Barcodes. *Proc Roy Soc Biol Sci.* **270**: 313-321.
- Hollingsworth, P.M., S.W. Graham, and D.P. Little. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE*. **6(5)**: 19254.
- Kolondam, B.J., E. Lengkong, dan J. Polii-Mandang. 2012. Barcode DNA Berdasarkan Gen *rbcl* dan *matK* Anggrek Payus Limondok (*Phalus tancarvilleae*). *Jurnal Biologos*. **2**: 55-62.
- Kress, W.J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt, and D.H. Janzen. 2005. Use of DNA Barcodes to Identify Flowering Plants. *PNAS*. **102**: 8369-8374.
- Ratnasingham, S. and P.D.N. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*. **7**: 355-364.
- Stoeckle, M.Y., C.C. Gamble, R. Kirpekar, G. Young, S. Ahmed, and D.P. Little. 2011. Commercial Teas Highlight Plant DNA Barcode Identification Successes and Obstacles. *Sci. Rep.* **1(42)**: 1-7.
- Van Leeuwen, W. M. D. 1933. *Biology of Plants and Animals Occuring in the Higher Part of Mount Pangrango-Gede in West Java*. Uitgave van de N. V. Noord Hollandsche. Amsterdam.
- Van Steenis, C. G. J. 1978. *The Mountain Flora of Java*. E. J. B. Leiden.
- Wahyudi, D. and R. Azrianingsih. 2011. Distribution and Density of Edelweis (*Anaphalis* spp) at Mount Batok Bromo Tengger Semeru National Park. *Biodiversity Conservation*. **1**: 25-29.
- Whitten, T., Whitten, J., and Cubbit, G. 1992. *Wild Indonesia: The Wildlife and Scenery of the Indonesian Archipelago*. United Kingdom: New Holland.
- Xue, C.Y. & Li, D.Z. 2011. Use of DNA Barcode Sensulato to Identify Traditional Tibetan Medicinal Plant *Gentianopsis Plasudosa* (*Gentianaceae*). *J. Syst Evol.***49(3)**: 267-270.