



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



Barcode DNA Tumbuhan Pangi (*Pangium edule R.*) Berdasarkan Gen *matK*

Irmi Bangola^a, Lidya Irma Momuat^a, Maureen Kumaunanga^{a*}

^aJurusan Kimia, FMIPA, Unsrat, Manado

KATA KUNCI

Pangium edule
gen *matK*
Barcode DNA
PCR
Elektroforesis

ABSTRAK

DNA *barcoding* merupakan suatu teknik yang digunakan untuk mempercepat dan mempermudah proses identifikasi organisme dengan menggunakan potongan gen tertentu. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan sekuens DNA *barcode* tumbuhan pangi berdasarkan gen standar *matK* dan membandingkannya dengan spesies yang berkerabat dekat di GenBank. DNA total daun pangi diisolasi menggunakan *Innuprep plant DNA kit* dan berhasil diamplifikasi dengan proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer berdasarkan gen *matK*. Hasil sekuensing fragmen DNA yang menunjukkan panjang 720 bp yang teramplifikasi oleh primer *forward* dan 780 bp untuk yang teramplifikasi oleh primer *reverse*. Hasil analisis BLASTn menunjukkan tingkat kemiripan tumbuhan pangi sangat tinggi dengan *Trichadenia zeylanical*, yaitu 99%, dan diikuti spesies lainnya (*Kiggelaria africanal*, 98%; *Guthriea capensis*, 96%; *Acharia tragodes*, 92%; *Erythrospermum phytolaccoides*, 92%; *Hydnocarpus sp. Chase 1301*, 90%; *Carpotroche longifolia*, 89%; *Moultonianthus leembruggianus*, 89% dan *Pimelodendron zoanthogyne*, 88%). Analisis komposisi asam amino menunjukkan bahwa *matK Pangium edule* dan kesembilan spesies tumbuhan lainnya bersifat hidrofobik.

KEYWORDS

Pangium edule
matK gene
DNA barcode
PCR
Elektrophoresis

ABSTRACT

DNA *barcoding* is a technical used to accelerate and simplify the process identification of organism with by using a snipping of specific genes. This study aimed to determine the DNA sequences of plant *barcoding* standard pangi based gene *matK* and compare with closely related species in GenBank. Total DNA was isolated using *Innuprep pangi leaf plant DNA kit* and successfully amplified by the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) using primers based on the gene *matK*. The results of sequencing long DNA fragments showed 720 bp are amplified by the forward primer and 780 bp were amplified by the primer for reverse. Blast analysis of the results showed very extremely high the plant pangi degree of similarity with *Trichadenia zeylanical*, namely 99%, and followed by other species (*Kiggelaria africanal*, 98%; *Guthriea capensis*, 96%; *Acharia tragodes*, 92%; *Erythrospermum phytolaccoides*, 92%; *Hydnocarpus sp. Chase 1301*, 90%; *Carpotroche longifolia*, 89%; *Moultonianthus leembruggianus*, 89% dan *Pimelodendron zoanthogyne*, 88%). Analysis of aminoacid composition showed that *matK Pangium edule* and nine other plant species are hydrophobic.

TERSEDIA ONLINE

20 Oktober 2014

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

1. Pendahuluan

Indonesia memiliki sumber daya alam hayati yang beranekaragam dan menghasilkan berbagai manfaat misalnya sebagai sumber pangan, insektisida dan obat-obatan. Pangi (*Pangium edule* Reinw) merupakan jenis tanaman beracun yang mengandung asam sianida, dapat digunakan sebagai insektisida, bahan pengawet serta dapat pula digunakan sebagai obat-obatan (Yuningsih et al., 2004). Di Sulawesi Utara daun pangi banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai sayuran bahkan dipercaya memiliki khasiat sebagai obat cacang kremi, sedangkan getah daunnya digunakan sebagai antiseptik dan desinfektan untuk membersihkan luka luar (Heriyanto dan Subiandono, 2008).

Basuni (1986) mengemukakan bahwa pangi merupakan salah satu jenis tumbuhan yang sudah tersebar luas di wilayah Indonesia dan memiliki potensi cukup tinggi bagi masyarakat. Sehingga perlu dilakukan pendataan terhadap keragaman jenis tumbuhan pangi di Indonesia (Sulawesi Utara), sebelum terjadi kepunahan yaitu menggunakan metode *Deoxyribose Nucleic Acid (DNA) barcoding*. *DNA barcoding* merupakan salah satu teknik yang digunakan untuk mempercepat dan mempermudah proses identifikasi organisme dengan menggunakan potongan gen tertentu (Rimbawanto et al., 2012).

DNA *barcoding* dapat digunakan oleh ahli taksonomi dengan cepat dan relatif murah untuk mengidentifikasi spesies yang sulit dilakukan secara morfologi. Identifikasi dan mempertahankan keanekaragaman genetik suatu populasi sangat penting dalam suatu konservasi (Rimbawanto et al., 2012). Metode DNA *barcoding* ini diawali dengan tahap isolasi DNA total, dilanjutkan dengan tahap amplifikasi gen standar ribulosa-1,5-bisfosfat karboksilase (*rbcL*) atau maturase K (*matK*) menggunakan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dan tahap sekuensing untuk mengidentifikasi sekuens DNA *barcode* pada tumbuhan. Gen standar ini digunakan untuk mempelajari keanekaragaman genetik tumbuhan berdasarkan sekuens DNA-nya. Perbedaannya, gen *matK* lebih sulit diamplifikasi tetapi memberikan resolusi yang lebih tinggi dalam membandingkan spesies tumbuhan, sedangkan gen *rbcL* lebih mudah diamplifikasi, akan tetapi resolusinya rendah untuk dapat membedakan beberapa spesies yang berkerabat dekat. Konfirmasi keberhasilan amplifikasi fragmen gen dilakukan dengan visualisasi melalui elektroforesis. Fragmen gen yang berhasil diamplifikasi akan dianalisis untuk sekuensing DNA (Hollingsworth et al., 2011).

Berdasarkan tinjauan tersebut maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengisolasi dan menentukan DNA *barcode* tumbuhan pangi (*Pangium edule* R.) berdasarkan gen *matK*.

2. Metode

2.1. Material

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, adalah tabung mikro (Eppendorf) 1.5 mL, tabung PCR 50 µL, gelas kimia, *hot plate*, mikrosentrifus, inkubator, kolom miniprep, termoblok, mesin PCR (Biometra T-personal, Jerman), 1 set alat elektroforesis, mikropipet, sarung tangan, kamera digital, freezer, spektrofotometer UV-Vis dan UV-transiluminator. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pangi (diperoleh dari daerah Bolaang Mongondow di Tuvalu Aog), akuades, bufer tris-Boric-EDTA (TBE), etidium bromida, agarosa, 1 kb DNA *ladder*, kit isolasi DNA (*InnuPrep plant DNA kit, Analytik Jena*) dan kit PCR (*GoTaq® Green Master Mix, Promega*).

2.2. Isolasi DNA (Kolondam, 2012).

Isolasi DNA total daun pangi dilakukan dengan menggunakan prosedur sesuai manual *InnuPrep plant DNA kit (Analytik Jena)* yang telah dimodifikasi. Diambil daun pangi segar, dipotong jaringan daun dengan ukuran 5 x 5 mm atau berat 0.0048 g, dimasukkan kedalam tabung mikro (eppendorf) kemudian digerus hingga jaringan daun hancur, ditambahkan larutan pelisis SLS 300 µL dan proteinase 25 µL kemudian diinkubasi selama 45 menit pada suhu 55°C menggunakan termoblok lalu disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dipipet ke dalam tabung mikro baru dan dicampur dengan 200 µL larutan pengikat SBS, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit.

Kolom miniprep ditempatkan pada tabung mikro, kemudian supernatannya diambil dan dimasukkan kedalam kolom miniprep lalu disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat dalam tabung dibuang dan kolom miniprep ditempatkan kembali ke tabung mikro, lalu dimasukan larutan pencuci W1 (HS) sebanyak 500 µL kedalam kolom dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Filtrat dibuang dan kolom miniprep ditempatkan kembali pada posisi semula, kemudian dimasukkan larutan pencuci W2 (MS) sebanyak 700 µL kedalam kolom dan disentrifugasi, langkah ini dilakukan sebanyak 2 kali ulangan. Kolom miniprep dipindahkan ke tabung mikro yang baru, kemudian DNA dilusikan dengan menambahkan larutan pengelusi 100 µL, didiamkan pada suhu ruang selama 1 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. DNA total yang diperoleh disimpan dalam suhu -20°C.

2.3. Amplifikasi Gen *matK* dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Komposisi reaksi amplifikasi menggunakan PCR terdiri dari : primer forward gen *matK* yaitu *matK-3F-R* (5'-CGT ACA GTA CTT TGT TTA CGA G-3') dan primer reverse gen *matK-1R-F* (5'-ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3') (Stoeckle et al., 2011). DNA total daun pangi yang telah diisolasi

sebanyak 2 μL sebagai DNA templat, ditambahkan 1 μL primer forward, 1 μL primer reverse, *GoTaq[®] Green Master Mix* (Promega) 5 μL dan 16 μL ddH₂O. Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 25 μL .

Proses PCR dimulai dari pra-denaturasi DNA templat pada suhu 95°C selama 2 menit, kemudian denaturasi DNA templat dilakukan pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) dilakukan pada suhu 50°C selama 30 detik, polimerisasi DNA dilakukan pada suhu 72°C selama 50 detik dan polimerisasi DNA akhir pada suhu 72°C selama 1 menit. Siklus ini dilakukan sebanyak 35 kali (Stoeckle *et al.*, 2011).

Pita DNA hasil PCR selanjutnya dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dan divisualisasi menggunakan UV-Transiluminator. Produk PCR selanjutnya disekuensing di First Base Laboratories Sdn Bhd, Malaysia.

2.4. Analisis Data

Sekuensing DNA yang diperoleh dalam bentuk kromatogram disunting dengan menggunakan software Geneious 7.1.5 (Drummond *et al.*, 2012). Bagian awal DNA dan akhir dihapus kurang lebih 30 bp. Sekuensing DNA yang dihasilkan dari primer reverse akan dilanjutkan dengan proses reverse dan complement yang kemudian digabungkan dengan hasil sekuensing primer forward menggunakan *multiple sequence comparison by log-expectation* (MUSCLE). Hasil suntingan sekuens *matK* panggi, selanjutnya dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk membandingkan urutan sekuens *matK* tumbuhan panggi dengan kerabat terdekat di GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Dereeper *et al.*, 2008). Selanjutnya dilakukan analisis in-silico terhadap *matK* dari sepuluh kerabat terdekat panggi.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Isolasi DNA Total

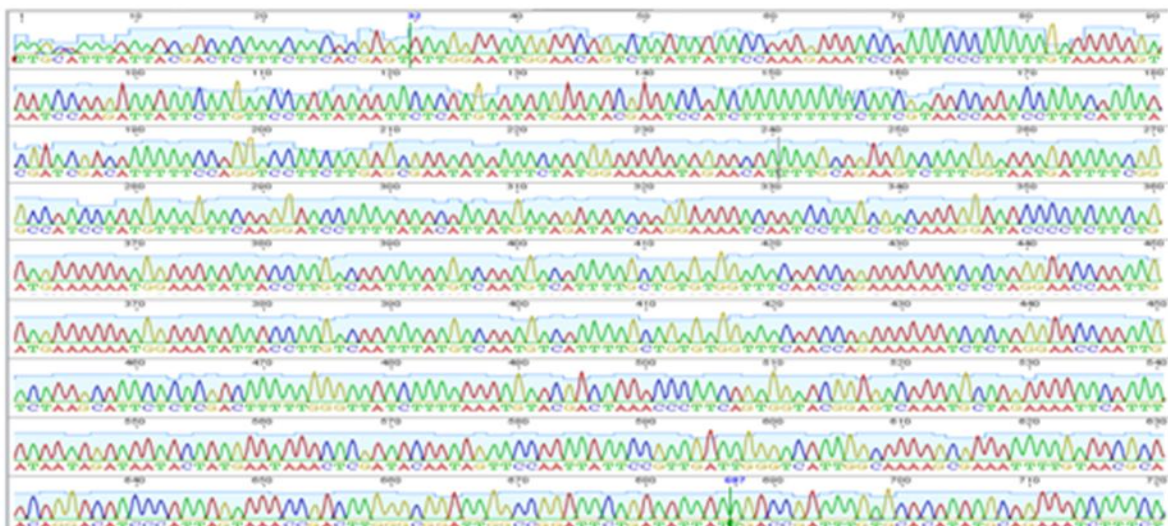
Hasil isolasi DNA daun panggi menunjukkan dua lapisan yaitu berwarna putih bening (DNA) dan

warna sedikit hijau (klorofil). Hal ini menandakan bahwa DNA terisolasi *Innuprep plant DNA kit* dengan baik. DNA yang diperoleh disimpan ke dalam freezer, penyimpanan ini bertujuan untuk menghambat terjadinya denaturasi sebelum digunakan ke proses PCR (tahap replikasi DNA).

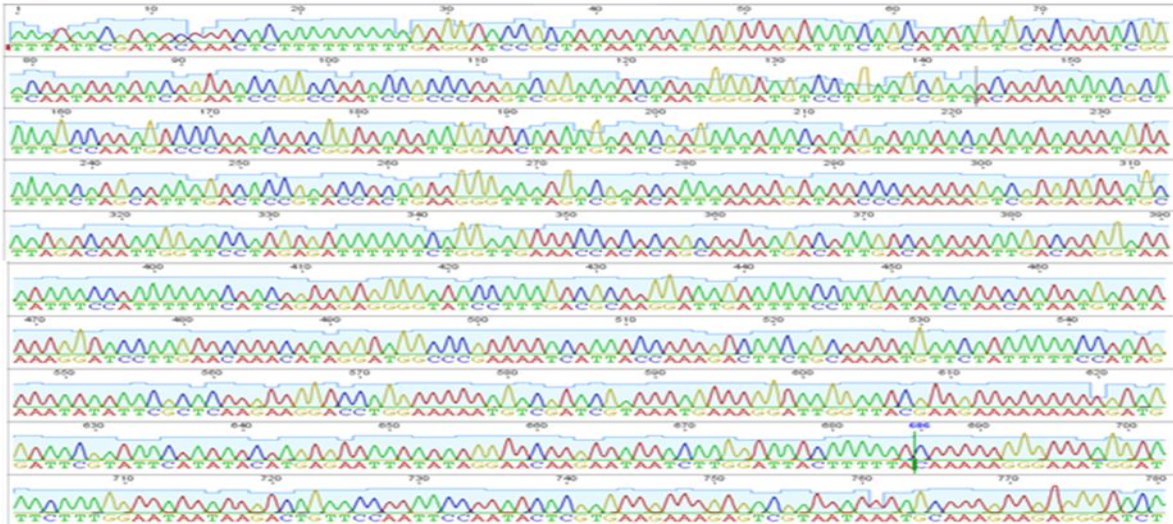
Hasil isolasi DNA tumbuhan panggi yang diperoleh akan dilanjutkan ke proses amplifikasi PCR menggunakan pemanasan. Dalam pemanasan ini DNA akan melewati 5 tahapan yaitu pra-denaturasi DNA, denaturasi DNA, penempelan primer, polimerisasi DNA dan polimerisasi DNA akhir. Tahapan ini disebut dengan proses replikasi DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme. Dengan teknik ini, DNA dapat dihasilkan dalam jumlah besar serta waktu relatif singkat dan memudahkan teknik lain yang menggunakan DNA seperti elektroforesis dan sekuensing. Hasil amplifikasi gen *matK* dengan PCR tumbuhan panggi yang dilakukan dalam proses elektroforesis dapat dilihat pada (Gambar 1). Berdasarkan ukuran DNA *ladder*, menunjukkan bahwa pita DNA *pangium edule* berada pada ukuran diantara 700 bp dan 800 bp yaitu 799 bp.

3.2. Hasil sekuens DNA dan analisis asam amino

Amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR menghasilkan fragmen DNA sepanjang kurang dari 800 bp. Hasil sekuensing fragmen DNA yang menunjukkan panjang 720 bp yang trampilikasi primer *forward* (Gambar 8) dan 780 bp (Gambar 9) untuk yang terampilikasi primer *reverse* menunjukkan puncak-puncak dalam 4 warna yang berbeda sesuai dengan warna basa pirimidin dan basa purin tertentu. Hasil sekuensing yang baik ditunjukkan oleh grafik dengan puncak yang sangat tinggi dan terpisah satu sama lain. Sedangkan hasil sekuensing yang jelek ditunjukkan pada puncak landai atau tidak terpisah satu sama lain. Namun sekuensing fragmen DNA yang diperoleh cukup spesifik karena urutan basa yang divisualisasi berhasil terbaca semua.



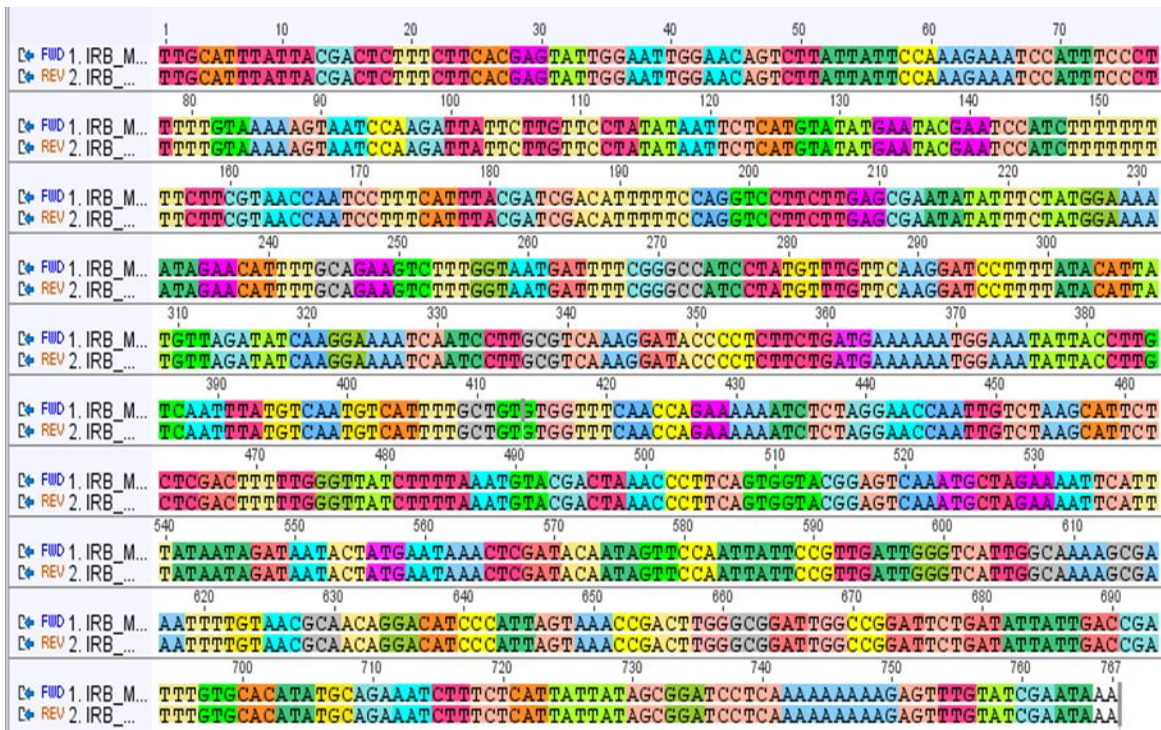
Gambar 2. Hasil sekuensing forward *matK* tumbuhan panggi.



Gambar 3. Hasil sekuensing reverse *matK* tumbuhan pangi.

Barcode DNA berupa hasil penjajaran sekuens DNA dari primer forward dan primer reverse tumbuhan pangi (Gambar 4) menunjukkan kemiripan genetik yang lestari. Dengan demikian

bahwa kedua primer tersebut teramplifikasi gen *matK* dalam teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan baik.



Gambar 4. Barcode DNA hasil penjajaran dari sekuens forward dan reverse *matK* tumbuhan pangi.

3.3. Analisis in-silico Matk

3.3.1. Penjajaran MatK dengan BLAST

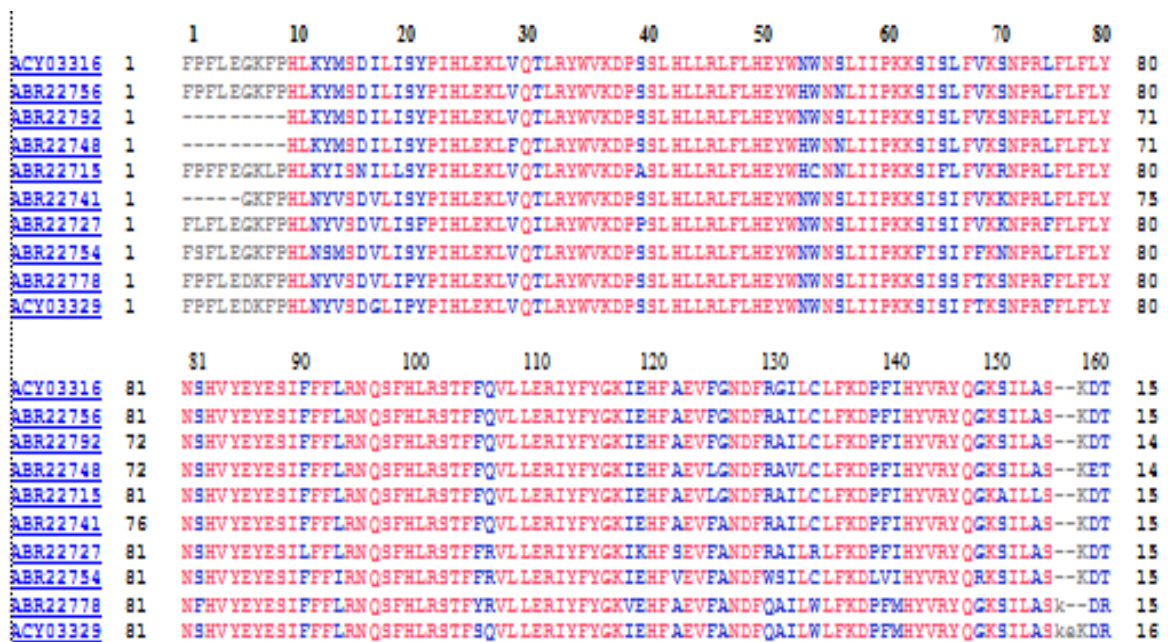
Sebanyak sepuluh spesies tumbuhan dipilih untuk analisis asam amino. Tabel 1 menunjukkan nama-nama spesies tumbuhan yang telah dipilih berdasarkan tingkat kemiripan yang hampir mendekati dengan tumbuhan pangi. Spesies ini diunduh dalam program BLAST untuk keperluan analisis selanjutnya yaitu penjajaran urutan sekuens

DNA, analisis komposisi asam amino dan penentuan sifat fisika-kimia protein.

Penjajaran sekuens DNA dilakukan melalui situs *NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov) dan divisualisasikan dengan BLAST. Hasil penjajaran DNA *Pangium edule* dengan sekuens spesies tumbuhan yang diambil dari GenBank menunjukkan bahwa selain memiliki tingkat kesamaan pada jajaran asam amino, juga memiliki tingkat perbedaan yang dominan, tampak pada asam amino berwarna biru (Gambar 5).

Tabel 1. Tumbuhan yang digunakan dalam analisis asam amino]

No	Kode Akses	Organisme Sumber	Tingkat Kemiripan
1.	ACY03316	<i>Pangium edule</i>	100%
2.	ABR22792	<i>Trichadenia zeylanica</i>	99%
3.	ABR22756	<i>Kiggelaria Africana</i>	98%
4.	ABR22748	<i>Guthriea capensis</i>	96%
5.	ABR22715	<i>Acharia tragodes</i>	92%
6.	ABR22741	<i>Erythrospermum phytolaccoides</i>	92%
7.	ABR22754	<i>Hydnocarpus sp. Chase 1301</i>	90%
8.	ABR22727	<i>Carpotroche longifolia</i>	89%
9.	ACY03329	<i>Moultonianthus leembruggianus</i>	89%
10.	ABR22778	<i>Pimelodendron zoanthogyne</i>	88%



Gambar 5. Penjajaran urutan sekuens barcode DNA berdasarkan gen matK tumbuhan panggi (*Pangium edule*) dengan kerabat terdekat di GenBank

Hasil visualisasi sekuens DNA berdasarkan gen *matK* spesies lain, tingkat kemiripan *Trichadenia zeylanica* sangat tinggi dengan tumbuhan panggi (Tabel 1) yaitu 99% dan diikuti spesies lainnya (*Kiggelaria africana*, 98%; *Guthriea capensis*, 96%; *Acharia tragodes*, 92%; *Erythrospermum phytolaccoides*, 92%; *Hydnocarpus sp. Chase 1301*, 90%; *Carpotroche longifolia*, 89%; *Moultonianthus leembruggianus*, 89% dan *Pimelodendron zoanthogyne*, 88%). Dengan hasil persentase tersebut dan penjajaran sekuens barcode DNA, gen *matK* dikatakan mampu membandingkan atau membedakan variasi antar spesies tumbuhan yang berkerabat dekat di GenBank.

3.3.2. Analisis asam amino

Analisis asam amino merupakan suatu identifikasi kadar asam-asam amino yang terkandung dalam suatu protein. Hasil analisis komposisi asam amino (Tabel 2), menunjukkan bahwa *matK*

Pangium edule dan kesembilan spesies lainnya lebih bersifat hidrofobik, karena memiliki residu asam amino non-polar cukup tinggi, hal ini ditunjukkan pada residu asam amino leusin (L). Asam amino yang semakin bersifat hidrofobik biasanya terdapat dibagian dalam protein yang berinteraksi dengan lipida.

Tabel 3 menunjukkan sifat fisika-kimia protein dari spesies *Pangium edule* dengan kerabat terdekat di GenBank. Berdasarkan data bobot molekul (BM) dari kesepuluh spesies tersebut berkisar antara 43.237,5-44.986,5 Da. Sedangkan koefisien ekstingsinya (KE) molar bervariasi antara 74175-63175M⁻¹cm⁻¹. Koefisien ekstingsi ACY03316, ABR22778 dan ACY03329 lebih tinggi diantara protein yang lain. Nilai koefisien ekstingsi dapat digunakan dalam analisis kuantitatif interaksi antar protein dengan protein, bahkan protein dengan ligan.

Tabel 2. Analisis komposisi asam amino *Pangium edule* dengan kerabat terdekat di GenBank menggunakan *protparam* (dalam % mol).

Residu asam amino	Protein <i>Pangium edule</i> dengan spesies lain									
	ACY03316	ABR22756	ABR22792	ABR22748	ABR22715	ABR22741	ABR22727	ABR22754	ABR22778	ACY03329
Met (M)	1.1	1.1	1.1	1.1	0.8	0.8	0.8	1.3	1.1	1.1
Cys (C)	1.9	1.9	1.9	1.9	2.1	1.9	1.6	1.9	1.3	1.3
Trp (W)	2.1	1.9	1.9	1.9	1.6	1.6	1.6	1.9	1.9	1.9
Gln (Q)	2.4	2.4	2.5	2.5	2.4	2.4	1.9	1.9	2.7	2.7
Ala (A)	2.7	2.9	3.0	3.0	2.9	3.0	2.7	2.4	2.7	2.7
Gly (G)	2.9	2.7	2.5	2.5	2.9	2.2	2.1	2.1	2.1	2.1
Thr (T)	2.9	3.2	2.7	3.0	2.9	2.7	2.7	2.4	2.4	2.7
Asp (D)	4.0	3.8	4.1	3.6	3.2	4.1	4.0	3.8	4.0	4.0
His (H)	4.0	4.3	4.1	4.4	4.3	3.8	3.8	3.8	3.7	3.7
Pro (P)	4.3	4.0	3.8	3.6	4.0	3.8	4.3	3.5	4.3	4.2
Glu (E)	4.3	4.3	4.1	4.4	4.3	4.3	4.0	4.6	4.5	4.8
Asn (N)	4.3	4.6	4.4	4.7	4.8	4.3	4.6	5.1	4.8	4.8
Val (V)	4.8	4.8	4.9	4.9	4.8	5.4	5.4	5.4	5.1	5.0
Tyr (Y)	5.4	5.4	5.5	5.5	5.6	5.7	5.4	5.1	6.1	5.6
Arg (R)	5.9	5.6	6.3	5.8	5.9	6.0	6.7	6.4	6.4	6.4
Lys (K)	7.5	7.5	7.4	7.4	7.7	8.2	8.3	7.2	7.5	8.0
Phe (F)	7.8	8.0	7.1	7.4	8.0	7.3	8.0	8.6	8.3	7.4
Ile (I)	8.0	7.5	8.2	8.0	8.5	8.7	8.6	8.8	8.5	8.5
Ser (S)	9.9	10.2	10.2	10.2	9.1	10.1	9.9	10.5	10.1	10.3
Leu (L)	13.7	13.9	14.0	14.3	14.1	13.6	13.7	13.4	12.5	13.0

Tabel 3. Sifat fisika-kimia protein *Pangium edule* dengan kerabat terdekat di GenBank.

No	Protein	Ukuran	BM (Da)	KE	pI	II	GRAVY
1	ACY03316	373	44315.8	74175	9.55	35.25	-0.064
2	ABR22756	373	44248.6	68675	9.55	36.75	-0.059
3	ABR22792	364	43248.6	68675	9.60	35.51	-0.061
4	ABR22748	364	43237.5	68675	9.56	33.99	-0.037
5	ABR22715	375	44539.3	64790	9.65	34.34	-0.003
6	ABR22741	368	43716.2	64665	9.59	34.87	-0.041
7	ABR22727	373	44453.2	63175	9.80	34.16	-0.052
8	ABR22754	373	44549.2	67185	9.61	35.64	0.014
9	ABR22778	375	44954.4	73020	9.62	37.43	-0.124
10	ACY03329	377	44986.5	70040	9.65	39.62	-0.152

Data isoelektrik (pI) merupakan pH dari suatu protein yang memiliki nilai lebih dari 7, hal ini menunjukkan bahwa kesepuluh spesies tersebut memiliki protein bersifat basa. Program *protparam* juga menampilkan nilai indeks ketidakstabilan (II) dari kesepuluh protein yaitu 33.99-39.62. Indeks ketidakstabilan sangat mempengaruhi konsentrasi

suatu larutan protein. Berdasarkan nilai GRAVY, kesepuluh protein yang terdata membentuk ion negatif yaitu berkisar antara -0.152 sampai -0.003, hal ini menunjukkan bahwa protein berada dalam suasana basa yang berinteraksi sangat baik dengan air.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Gen *matK* pangi (*Pangium edule*) berhasil diamplifikasi dengan PCR. Hasil sekuensing fragmen DNA yang menunjukkan panjang 720 bp yang teramplifikasi oleh primer *forward* dan 780 bp untuk yang teramplifikasi oleh primer *reverse*.
2. Hasil analisis BLAST menunjukkan tingkat kemiripan tumbuhan pangi (*P. edule*) sangat tinggi dengan *Trichadenia zeylanical*, yaitu 99%. Analisis komposisi asam amino menunjukkan bahwa *matK* *P. edule* dan kesembilan spesies tumbuhan kerabat terdekatnya bersifat hidrofobik.

Daftar Pustaka

- Basuni, S. 1986. Lampu Kuning bagi Status Pohon Pangi. *Media Konversi* **1**: 17 – 19.
- Burkill, I.H. 1935. A Dictionary Of The Economic Product Of The Malay Peninsula. Governments Of The Straits Settlements. London. Page 45.
- Darwis, D. 2000. Teknik Dasar Laboratorium Dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati, Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia Dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati. FMIPA Universitas Andalas, Padang.
- Dereeper, A., V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, Chevenet, J.F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J.M. Claverie, and O. Gascuel. 2008. Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*. **1**: 36.
- Drummond A.J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, C. Duran, M. Field, J. Heled, M. Kearse, S. Markowitz, R. Moir, S. Stones-Havas, S. Sturrock, T. Thierer, and A. Wilson. 2012. Geneious v5.6. Biomatters, New Zealand.
- Fessenden, R.J., and J.S. Fessenden. 1986. *Organic Chemistry*. Third Edition, University Of Montana, Wadsworth, Inc, Belmont, California 94002. Massachuset, USA.
- Handoyo, D., dan A. Rudiretna. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Unitas*. **9**:17-29.
- Hebert, P.D.N., N.A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. Waard (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **270**: 313–321.
- Heriyanto, N.M., dan E. Subiandono. 2008. Ekologi pohon kluwak/pakem (*Pangium edule* Reinw.) di Taman Nasional Meru Betiri Jawa Timur. *Buletin Plasma Nutfah* **14**: 33-42.
- Hollingsworth, P.M., S.W. Graham, dan D.P. Little. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *Plo. Sone*. **6**:e19254.
- Kolondam, B.J. 2012. Barcode DNA *rbcL* dan *matK* *Aglaonema* (*Aglaonema* sp.), *Anthurium Gelombang Cinta* (*Anthurium plowmanii*) dan *Anggrek Payus Limondok* (*Phaius tancarvilleae*) [tesis]. Program Pascasarjana UNSRAT, Manado.
- 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. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**: 8369–8374.
- Lawodi, E.N., T.E. Tallei, F.R. Mantiri, dan B.J. Kolondam. 2013. Variasi Genetik Tanaman Tomat dari Beberapa Tempat Di Sulawesi Utara Berdasarkan Gen *matK*. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. **2**: 144-121.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1*. Erlangga, Jakarta.
- Newton, C.R., and A. Graham. 1994. *Polymerase Chain Reacton* (PCR). UK: Bios Scientific Publisher.
- Partomihardjo, T., dan Rugayah. 1989. Pangi (*Pangium edule* Reinw) dan Potensinya yang Mulai dilupakan. *Media Konservasi*. **2**:45-50.
- Rianta, P. 2001. Mengenal Metode Elektroforesis. *Oseana*. **24**: 25-31.
- Rimbawanto, A., B. Leksono, dan Widyatmoko. 2012. Bioteknologi Hutan untuk Produksi dan Konservasi Sumber Daya Hutan. Prosiding Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan; Yogyakarta, 9 Oktober 2012. Seminar Nasional Bioteknologi Hutan. Hlm 11-20.
- Soltis, E.D., S.P. Soltis, and J.J. Doyle. 1992. Choosing an Approach and an Appropriate Gene for Phylogenetic Analysis. Kluwer Academi Publisher. *Netherlands*. **2**:3-11.
- Stoeckle, Y.M., C.C. Gamble, R. Kirpekar, G. Young, S. Ahmed, dan D.P. Little. 2011. Commercial teas highlight plant DNA barcode identification successes and obstacles. *Sci Rep*. **1**: 42.
- Sudarmono. 2006. Pendekatan Konservasi Tumbuhan dengan Teknik Molekuler Elektroforesis. *Inovasi*. **7**: 50-56.
- Witarto, A.B. 2001. Protein Engineering: Perannya dalam Bioindustri dan Prospeknya di Indonesia. Bioteknologi Indonesia; 1-14 Februari 2001. Seminar on-Air Bioteknologi untuk Indonesia. Hlm 2-5.
- Yuningsih, R. Damayanti, dan L. Udarno. 2004. Efek Toksikopatologik beberapa Tanaman Beracun pada Mencit dalam Upaya Mencari Zat Pengganti Racun Strychnine untuk Pemberantasan Penyakit Rabies pada Anjing. *Seminar Nasional Teknik Peternakan*. **96**: 767 – 775.