

JURNAL SKRIPSI

KEANEKARAGAMAN GENETIK EDELWEIS (*Anaphalis javanica*)
MENGUNAKAN PENANDA DNA KLOOROPLAS GEN *matK*

Disusun oleh:
I Gede Krisna Dewantara
NPM : 130801383



UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
YOGYAKARTA
2017

KEANEKARAGAMAN GENETIK EDELWEIS (*Anaphalis javanica*)
MENGUNAKAN PENANDA DNA KLOROPLAS GEN *matK*

*GENETIC DIVERSITY OF EDELWEISS (Anaphalis javanica) USING DNA
CHLOROPLAST MARKER matK GENE*

I Gede Krisna Dewantara¹, Ignatius Pramana Yuda¹, Felicia Zahida¹

¹Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta

Jalan Babarsari no.44, Yogyakarta 55281

kdewantara25@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk melihat keanekaragaman genetik Edelweiss yang terdapat pada populasi Gunung Merbabu dan Gunung Lawu, serta hubungan kekerabatannya menggunakan penanda DNA kloroplas gen *matK*. Metode yang digunakan yaitu teknik PCR (*Polymerase chain reaction*) menggunakan primer F *matK*-xf dan primer R *matK*-MALP. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi CTAB. Hasil penelitian berupa sekuens DNA dianalisis menggunakan program Chromas, MEGA7 dan BLASTn. Hasil perbandingan sekuens baik di dalam maupun antar kedua populasi tersebut tidak menunjukkan adanya variasi genetik. Dibandingkan dengan sekuens *A. javanica* yang terdapat di Gunung Sopotan (Rahalus dkk., 2015) terdapat satu variasi pada urutan basa ke-826. Hasil analisis dengan BLASTn diketahui bahwa *Anaphalis javanica* dengan penanda *matK* memiliki kekerabatan yang tinggi dengan spesies lain dalam famili Asteraceae mencapai 99%.

Kata kunci : keanekaragaman genetik, *Anaphalis javanica*, *matK*

Abstract

This research aims to see the genetic diversity of Edelweiss (Anaphalis javanica) found in population of Mt. Merbabu and Mt. Lawu population, also to know the evolutionary relationship using chloroplast marker matK. This method using PCR (Polymerase Chain Reaction) technique with primer F matK-xf and primer R matK-MALP. Edelweiss leaves extraction was performed using CTAB extraction method. The result of DNA sequencing was analyzed using Chromas, MEGA7 program and BLASTn. The sequence alignment revealed the genetic diversity within and between the two population show no any genetic variation. Compared with A. javanica from Mt. Sopotan (Rahalus dkk., 2015) shows one variation at site 826. Analysis with BLASTn found that Anaphalys javanica have a

high similarity with other species from the same family which the highest similarity is 99%

Keywords : *genetic diversity, anaphalis javanica, matK.*

PENDAHULUAN

Anaphalis javanica yang juga disebut Bunga Abadi atau edelweiss Jawa merupakan salah satu tumbuhan endemik yang banyak terdapat di pegunungan Indonesia. Bunga Edelweis yang juga dikenal dengan bunga Senduro ini merupakan tumbuhan khas pegunungan yang memiliki fungsi ekologis penting bagi lingkungan sekitarnya. Tumbuhan ini berfungsi sebagai tumbuhan pelopor di hutan pegunungan yang hidup pada ketinggian 1.600 – 3.000 mdpl dan mampu bertahan di tanah tandus. Tumbuhan ini juga memiliki peran sebagai sumber makanan bagi serangga seperti pada Ordo Hemiptera, Thysanoptera, Lepidoptera, Diptera, dan Hymnoptera (Kusmana dan Hikmat, 2015).

Bunga Abadi ini populasinya dikhawatirkan menurun akibat para pendaki gunung seringkali memetik tumbuhan ini untuk dibawa turun. Hal tersebut juga membuat warga sekitar menjadikannya ladang usaha untuk diperjualbelikan kepada para wisatawan. Untuk itu diperlukan upaya-upaya konservasi agar bunga ini bisa tetap abadi dan tidak punah.

Untuk melakukan konservasi yang dapat memberikan hasil maksimal diperlukan pemahaman mengenai keanekaragaman genetik suatu spesies. Hal tersebut dikarenakan keanekaragaman genetik merupakan faktor penting bagi individu untuk dapat beradaptasi terhadap perubahan lingkungan dan terhindar dari ancaman kepunahan. Terlebih lagi tumbuhan yang berhabitat dipegunungan seperti Edelweiss umumnya memiliki distribusi geografis yang sempit, terisolasi

dari populasi lain dan jumlah populasi yang terus berkurang akibat aktivitas manusia yang dapat mengarah pada terjadinya penurunan keanekaragaman genetik (Lande, 1998; Hou dan Lou, 2011).

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi yang cepat memudahkan dilakukannya penelitian terkait analisis molekuler terutama untuk keanekaragaman genetik. Analisis molekuler dengan penanda DNA kloroplas merupakan salah satu metode yang baik untuk studi filogeni maupun genetika populasinya, termasuk keanekaragaman genetiknya (Yu dkk., 2011). Gen yang digunakan pada penelitian ini yaitu pada gen *matK* yang pada penelitian sebelumnya telah berhasil dilakukan barcoding dan sekuensing pada *Anaphalis javanica* (Rahalus dkk., 2015).

Pada penelitian ini akan dilihat keanekaragaman genetik baik dalam populasi maupun antar populasi Edelweis Jawa yang berada di Gunung Lawu dan Gunung Merbabu karena kedua gunung ini terpisah cukup jauh dan populasi Edelweis didalamnya terisolasi dari populasi lain. Hubungan kekerabatan juga dilihat untuk mengetahui kekerabatan spesies *Anaphalis javanica* dengan spesies lain berdasarkan marka gen *matK*.

METODE PERCOBAAN

Sampel daun Edelweiss Jawa diambil dari 2 populasi, yaitu Gunung Lawu dan Gunung Merbabu dimana diambil sebanyak 8 sampel individu dan pada Gunung Lawu sebanyak 10 sampel individu. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam plastik zip dan ditambahkan silica gel.

Sampel daun diekstraksi dengan metode CTAB menggunakan protokol Doyle dan Doyle (1987) dengan modifikasi. Daun Edelweiss Jawa diambil sebanyak 0,2 gram kemudian digerus menggunakan lumpang dan mortar dengan bantuan nitrogen cair. Daun yang sudah digerus dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1.5 ml dan ditambahkan buffer CTAB (0,1 M Tris-Cl pH 8, 2% pvp (polyvinilpyrrolidone), 4% 2-mercaptoethanol) sebanyak 500 μ l kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Tube tersebut didiamkan dalam waterbath dengan suhu 60⁰C selama 30 menit kemudian sentrifus dengan kecepatan 13.400 rpm selama 5 menit.

Setelah itu ditambahkan chloroform isoamyl (24:1) sebanyak 250 μ l dan divortex. Sentrifus dengan kecepatan 13.400 rpm selama 1 menit. Supernatan dipindahkan ke *microsentrifuge tube* baru dan dilakukan pengulangan dari penambahan chloroform isoamyl sampai sebanyak 3 kali atau supernatan terlihat jernih. Supernatan tersebut ditambahkan dengan 70% isopropanol dingin sebanyak 500 μ l dan diinkubasi pada suhu -20⁰C selama 15 menit.

Setelah inkubasi, sentrifus dengan kecepatan 13.400 rpm selama 10 menit kemudian bagian supernatan dibuang. Pelet dalam mikrosentrifuge tube ditambahkan 500 μ l 70% etanol dingin dan campurkan secara inversi kemudian vortex. Etanol dibuang dengan cara *microcentrifuge tube* dibiarkan terbuka pada suhu ruang. TE buffer sebanyak 20 μ l ditambahkan dan dicampurkan secara inversi dengan perlahan.

Presipitasi dilakukan dengan cara 10 μ l sampel dicampurkan dengan 40 μ l ddH₂O, NaOAc 0,3 M sebanyak 5 μ l dan isopropanol 70% sebanyak 100 μ l.

Campuran tersebut diinversi secara perlahan kemudian dibiarkan dalam suhu ruang selama 15 menit. Setelah itu dilakukan sentrifuge dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 1 ml ethanol 70% lalu diinversi. Sentrifus kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 menit.

Supernatan dibuang dan ditambahkan 1 ml ethanol 95% kemudian diinversi. Ethanol yang tersisa di dalam tube dikeringkan dengan cara tube dibiarkan terbuka dalam oven pada suhu 65°C selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan TE buffer sebanyak 50µl. Hasil ekstraksi kemudian dilakukan uji kualitas DNA melalui proses elektroforesis dengan agarose 0.8% pada tegan 100V selama 30 menit.

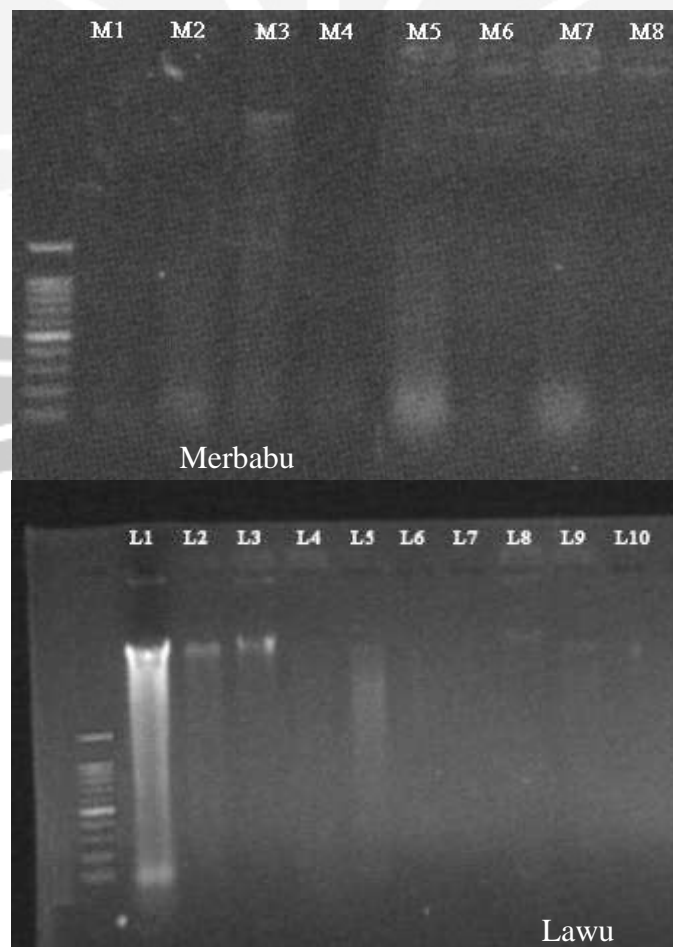
Pembuatan master mix dilakukan dengan mencairkan 10 µL reaksi yang mengandung KOD FX Neo DNA Polymerase, 2x PCR Buffer, 2 mM dNTPs, 10 µM primer (Primer F matK-xf dan primer R matK-MALP), DNA *template*, dan *RNase-free water*. Sekuens primer matK-xf (TAATTTACGATCAATTCATTC) dan matK-MALP (ACAAGAAAGTCGAAGTAT) yang digunakan mengacu pada penelitian Ford dkk. (2009) dan Dunning dan Savolainen (2010). Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus.

Hasil amplifikasi kemudian dilakukan uji kualitas DNA melalui proses elektroforesis dengan agarose 1% pada tegan 100V selama 30 menit. Produk PCR kemudian dikirim untuk dilakukan sekuensing di *Ist BASE*, Malaysia. Data hasil analisis penelitian yang diperoleh dianalisis menggunakan program MEGA7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis versi 7*) (Kumar dkk., 2016) untuk pensejajaran sekuens DNA dan analisis sekuens berupa komposisi nukleotida,

jarak genetik dan perkiraan pohon filogeni. Fasilitas BLAST-n (*Basic Local Alignment Search tool-nucleotide*) pada situs ncbi.nlm.nih.gov digunakan untuk mencari kemiripan urutan nukleotida sampel dengan spesies lain yang terdapat dalam *database* situs tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

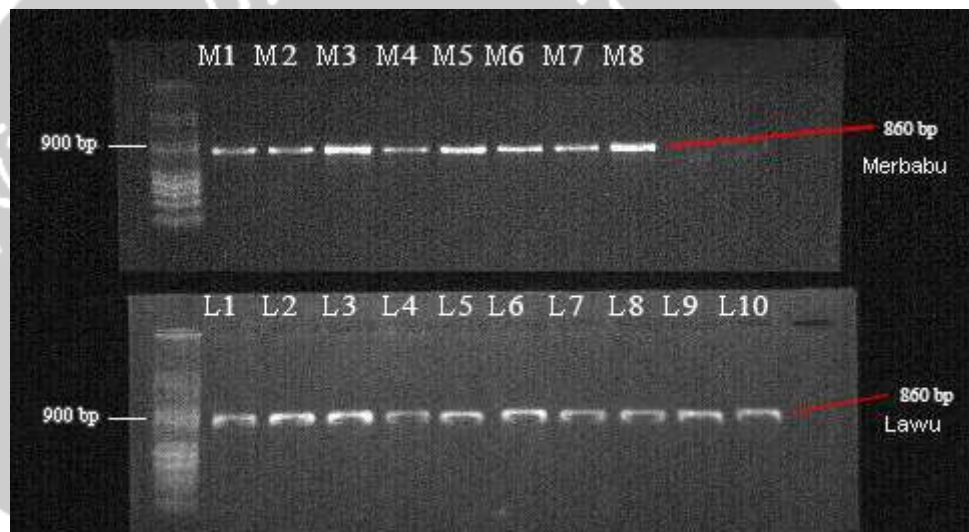
Hasil dari uji kualitatif ekstraksi DNA pada gambar 1. menunjukkan pita DNA hasil ekstraksi terlihat tidak begitu jelas dan terlihat adanya *smear* yang dapat mengindikasikan bahwa DNA hasil ekstraksi jumlahnya sedikit dan ada kemungkinan terjadinya degradasi DNA.



Gambar 1. Visualisasi Hasil Ekstraksi DNA Edelweiss

Keterangan : M = sampel dari Gunung Merbabu, L = sampel dari Gunung Lawu, no. 1-10 = menunjukkan nomor individu

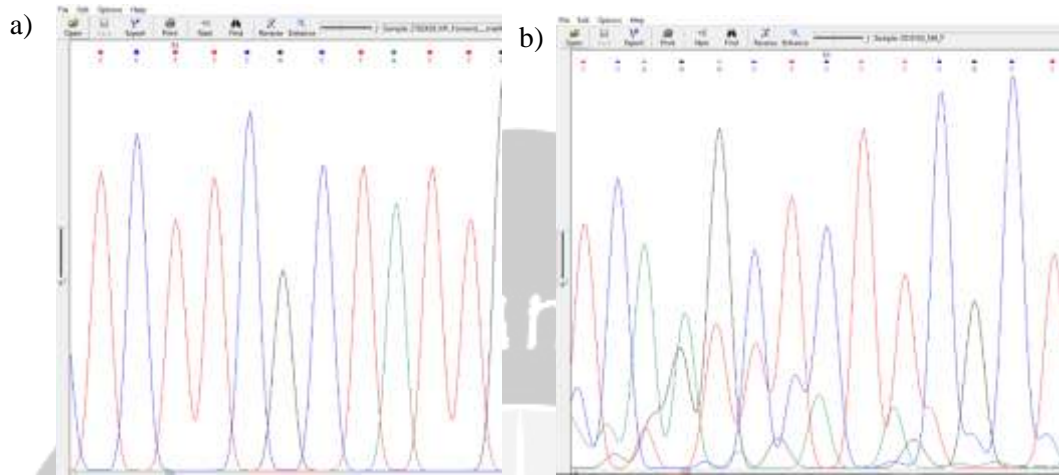
Hasil amplifikasi sampel daun Edelweiss menggunakan primer *matK*-xf (*forward*) dan *matK*-MALP (*reverse*) menunjukkan hasil pita DNA yang jelas untuk seluruh sampel baik dari populasi Merbabu maupun Lawu.



Gambar 2. Visualisasi Hasil amplifikasi Edelweiss.

Keterangan : M = sampel dari Gunung Merbabu, L = sampel dari Gunung Lawu, no. 1-10 = menunjukkan nomor individu

Hasil sekuensing DNA Edelweiss berupa kromatogram diketahui 14 sampel menunjukkan hasil yang baik ditandai dengan puncak yang terlihat jelas dan terpisah dengan puncak yang lain (Gambar 3a), sedangkan dua sampel menunjukkan hasil yang kurang baik terlihat dari puncak yang tidak beraturan dan saling tumpang tindih (Gambar 3b), sehingga kedua sampel tersebut tidak dilakukan analisis lebih lanjut. Hasil yang kurang baik tersebut dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti masih terdapat kontaminan dalam sampel dan konsentrasi DNA *template* yang terlalu rendah.



Gambar 3. Potongan Kromatogram Hasil Sekuensing sampel M1(a), dan sampel M6 (b).

Setelah dilakukan pemotongan pada awal dan akhir sekuens didapatkan panjang fragmen 860 *bp* (*base pair*) dari 16 sampel. Panjang fragmen yang didapatkan berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Rahalus dkk. (2015) yaitu sepanjang 843 *bp*. Perbedaan panjang sekuens dapat diakibatkan oleh jumlah sampel dan primer yang digunakan berbeda, namun tidak mempengaruhi hasil analisis pada penelitian ini.

Hasil pensejajaran sekuens pada populasi Gunung Lawu dan Gunung Merbabu tidak menunjukkan adanya variasi genetik baik antar populasi maupun dalam satu populasi. Tidak adanya variasi genetik antar populasi Gunung Lawu dengan Gunung Merbabu menunjukkan kemungkinan Edelweis yang terletak di kedua gunung tersebut merupakan satu populasi yang sama. Tidak adanya keanekaragaman genetik juga dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti ukuran populasi yang kecil, fragmentasi habitat dan *Inbreeding depression*.

Penggunaan marka molekuler yang hanya terdiri dari satu jenis juga dapat menyebabkan variasi genetik menjadi kurang variatif.

Analisis hubungan kekerabatan menggunakan BLAST-n (*Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide*) ditemukan adanya kemiripan antara *Anaphalis javanica* dengan spesies lain. 10 spesies teratas pada hasil pencarian yang terdapat pada Gambar 4. menunjukkan kemiripan sebesar 99%. Salah satu spesies yang memiliki kekerabatan yang paling besar yaitu *Anaphalis margaritaceae* yang termasuk dalam genus yang sama. Spesies-spesies hasil pencarian BLAST-n tersebut diketahui termasuk dalam 1 famili yang sama dengan *A. javanica* yaitu Asteraceae.



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Anaphalis margaritacea</i> (RNA-Lys (mK) gene, intron, and maturase K (matK) gene, complete cds, plastid)	1642	1642	100%	0.0	99%	GU311391.1 DQ484423.1
<input type="checkbox"/> <i>Pseudognaphalium oligandrum</i> (RNA-Lys (mK) gene, intron, and maturase K (matK) gene, complete cds, plastid)	1636	1636	100%	0.0	99%	GU311391.1 DQ484423.1
<input type="checkbox"/> <i>Helichrysum helichrysum</i> (RNA-Lys (mK) gene, intron, and maturase K (matK) gene, complete cds, plastid)	1636	1636	100%	0.0	99%	GU311391.1 DQ484423.1
<input type="checkbox"/> <i>Phytolacca lananoides</i> (RNA-Lys (mK) gene, intron, and maturase K (matK) gene, complete cds, plastid)	1631	1631	100%	0.0	99%	GU311391.1 DQ484423.1
<input type="checkbox"/> <i>Pseudognaphalium luteoalbum</i> (RNA-Lys (mK) gene, intron, and maturase K (matK) gene, complete cds, plastid)	1625	1625	100%	0.0	99%	GU311391.1 DQ484423.1
<input type="checkbox"/> <i>Helichrysum zosterifolium</i> (RNA-Lys (mK) gene, intron, and maturase K (matK) gene, complete cds, plastid)	1625	1625	100%	0.0	99%	GU311391.1 DQ484423.1
<input type="checkbox"/> <i>Helichrysum pilosum</i> (RNA-Lys (mK) gene, intron, and maturase K (matK) gene, complete cds, plastid)	1625	1625	100%	0.0	99%	GU311391.1 DQ484423.1
<input type="checkbox"/> <i>Helichrysum italicum</i> subsp. <i>microphyllum</i> (RNA-Lys (mK) gene, intron, and maturase K (matK) gene, complete cds)	1625	1625	100%	0.0	99%	GU311391.1 DQ484423.1
<input type="checkbox"/> <i>Anaphalis sarda</i> (complete genome)	1619	1619	100%	0.0	99%	GU311391.1 DQ484423.1
<input type="checkbox"/> <i>Helichrysum pilosum</i> (RNA-Lys (mK) gene, intron, and maturase K (matK) gene, complete cds, plastid)	1619	1619	100%	0.0	99%	GU311391.1 DQ484423.1

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

Apabila sekuens dari sampel Merbabu dan Lawu (M1) disejajarkan dengan sekuens hasil penelitian Rahalus dkk., (2014) yang menggunakan *A. javanica* dari Gunung Soputan, dan ditambah dengan data sekuens *A. margaritaceae* dan *A. sinica* serta *Pseudognaphalium oligandrum* sebagai *outgroup* yang diambil dari hasil BLAST-n di *database* ncbi.nlm.nih.gov, menunjukkan adanya variasi keanekaragaman genetik Edelweiss yang rendah. Pensejajaran sekuens dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 1. Perbandingan sekuens *A. javanica* dengan spesies lain

	10	20	30	40	50	60
M1	GTATTAGATA	TATTAATACC	TTACCCAGCT	CATCTGGAAA	TCTTGGTTCA	GGCT-CTTCG
S						T
<i>A.m</i>					
<i>A.s</i>					
<i>P.o</i>					
	70	80	90	100	110	120
M1	CTATTGGATA	AAAGATGCTT	CCTCTTTACA	TTTTTTAAGA	TCTTTTCTCC	ACGAATGTCA
S					
<i>A.m</i>					
<i>A.s</i>					
<i>P.o</i>					
	130	140	150	160	170	180
M1	TAATTGGGAT	AGTCTTATTA	CTTCAAATTC	AAAGAAAGCC	A GTTCCTTCTT	TTTCAAAAAG
S						T
<i>A.m</i>					
<i>A.s</i>					
<i>P.o</i>					
	190	200	210	220	230	240
M1	AAATCAT T AGA	TT A TTCTTTT	TCCTATATAC	TTTTCATGTA	CGTGAATATG	AATCTGGCTT
S	C	C				
<i>A.m</i>	C	C			
<i>A.s</i>	C	C			
<i>P.o</i>	C	C			
	250	260	270	280	290	300
M1	CTTCTTTCTC	CGTAACCAAT	CTTCTCACTT	ACGA G CAACA	TCTTCTGGAG	CCCTTATTGA
S						T
<i>A.m</i>					
<i>A.s</i>					
<i>P.o</i>					
	310	320	330	340	350	360
M1	ACGAATCCAT	TTCTATGGAA	AAATAGAGCA	TCTTGCAGAA	GTCCTTGCCA	GGGCTTTTCA
S					
<i>A.m</i>					
<i>A.s</i>					
<i>P.o</i>					
	370	380	390	400	410	420
M1	AGCGAATTTT	TGGTTG-TTC	AAAGATCCTT	TCATGCATTA	TGTTAGGTAT	CAAGGAAAAT
S						G
<i>A.m</i>					
<i>A.l</i>					
<i>P.o</i>					
	430	440	450	460	470	480
M1	CAATTATTGC	TTCAAAGGG	ACGTTTCTTT	TGATGAATAA	ATGGAAATAT	TACTTTGT C A
S						T
<i>A.m</i>					
<i>A.s</i>					
<i>P.o</i>					
	490	500	510	520	530	540
M1	ATTTCTGGAA	ATCCTATTTT	TACCTGTGGT	CTCAACCAGG	AAGGATTTAT	ATAAACGAAT
S					
<i>A.m</i>					
<i>A.s</i>					
<i>P.o</i>					

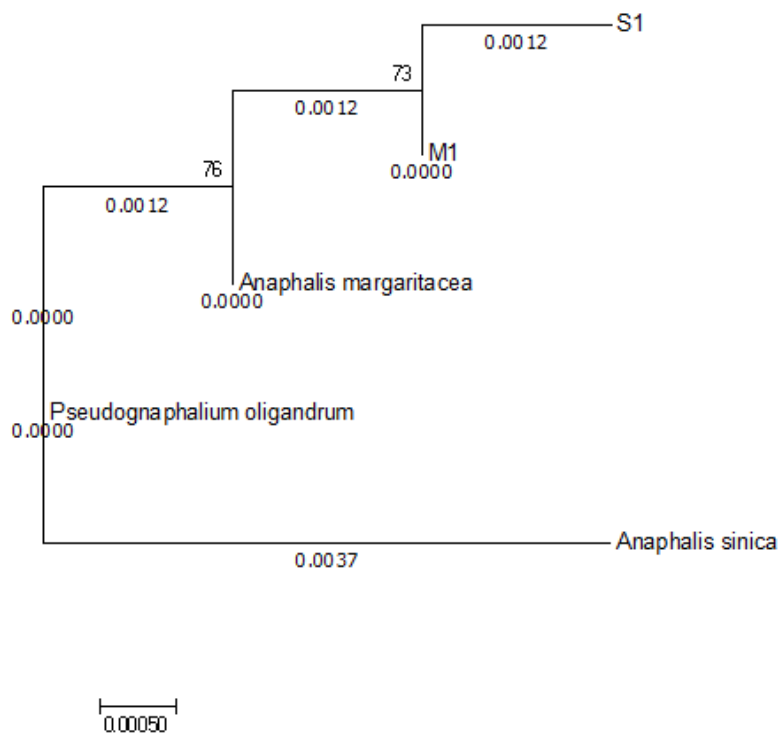
Lanjutan Tabel 1. Perbandingan sekuens *A. javanica* dengan spesies lain

	550	560	570	580	590	600
M1	TATACAATCA	TTCCATTGAC	TTTCTGGGTT	ATCGTTCAAG	TGTGCGGCTA	GAGCCTTCAA
S
A.m
A.s
P.o
	610	620	630	640	650	660
M1	TGATACGCAG	TCAAATGCTA	GAAAATTCAT	TTCTAATCGA	TAATGCTATT	AAAAAGTTTG
S
A.m
A.s
P.o
	670	680	690	700	710	720
S
A.m
A.s
P.o
	730	740	750	760	770	780
M1	CGTTGGGGCA	TCCTATTGGT	AAGGCGATT	GGGCCGATT	TTCAGATTCT	GATATTATTG
S
A.m
A.s
P.o
	790	800	810	820	830	840
M1	AGCGCTTTGG	GCGTATATAC	AGAAATCTTT	CTCATTATCA	TAGTG	GATCT TCAAAAAAAAA
S
A.m
A.s
P.o
	850	860				
M1	AAGAGTTTGT	ATCGAGTAAA				
S				
A.m				
A.s				
P.o				

Keterangan : M = sampel dari Gunung Merbabu, L= sampel dari Gunung Merbabu, S = *Anaphalis javanica* Soputan, A.m = *Anaphalis margaritaceae*, A.s = *Anaphalis sinica*, P.o = *Pseudognaphalium oligandrum*. Tanda kuning = menunjukkan variasi genetik, tanda titik = menunjukkan basa nukelotida yang sama.

Konstruksi pohon filogenetik yang dilakukan dengan menggunakan metode *Maximum-Likelihood* dengan model Tamura-Nei dan analisis *Bootstrap* 1000 (gambar 7) menunjukkan bahwa populasi Merbabu dan Lawu serta Soputan berada dalam kelompok (*clade*) yang sama dengan perbedaan jarak genetik

0.0012. *Anaphalis sinica* terdapat dalam kelompok yang berbeda dan terpisah dari Genus *Anaphalis* yang lain. *Pseudognaphalium oligandrum* memiliki kekerabatan yang paling dekat dengan nenek moyang.



Gambar 5. Konstruksi Pohon Filogeni *A. javanica* dengan metode *Maximum Likelihood*. Keterangan : M1 = *Anaphalis javanica* sampel Merbabu dan Lawu, S1 = *Anaphalis javanica* Sopotan. Angka pada nodes menunjukkan nilai Bootstrap dan angka pada cabang menunjukkan jarak genetik.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diperoleh bahwa keanekaragaman genetik Edelweiss dalam populasi baik di Gunung Lawu dan Merbabu tidak menunjukkan adanya variasi genetik berdasarkan pensejajaran sekuens menggunakan marka *matK*. Keanekaragaman genetik antar populasi di Gunung Lawu dan Gunung Merbabu juga tidak menunjukkan adanya

keanekaragaman genetik berdasarkan pensejajaran sekuens gen *matK* yang menandakan bahwa Edelweiss di Gunung Lawu dan Merbabu merupakan satu populasi yang sama. Hasil analisis kekerabatan diketahui bahwa *A. javanica* dengan penanda *matK* memiliki tingkat kekerabatan yang tinggi dengan spesies lain dalam satu famili dengan nilai kemiripan paling tinggi 99%

Saran dalam penelitian selanjutnya perlu dilakukannya optimalisasi hasil dengan menggunakan marka gabungan seperti *rbcl* + *matK* atau tambahan beberapa marka lainnya untuk meningkatkan keakuratan data hasil analisis.

DAFTAR PUSTAKA

- Aliadi, A., Zuhud, E.A.M. dan Djamhuri, E. 1990. Kemungkinan Penangkaran Edelweiss (*Anaphalis javanica* (Bl.) Boerl.) Dengan Stek Batang. *Media Konservasi*. 3(1) : 37–45.
- Amos, W. dan Harwood, J. 1998. Factor Affecting Levels of Genetic Diversity in Natural Population. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 353 : 177-186..
- Caliskan, M. 2012. *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*. Intech, Rijeka.
- Chen, B.Y. dan Janes, H.W. 2002. *PCR Cloning Protocols* 2nd ed. Humana Press Inc, New Jersey.
- Dunning, L.T. dan Savolainen, V. 2010. Broad-scale Amplification of *matK* for DNA Barcoding Plants, A Technical Note. *Botanical Journal of Linnean Society* (1) 169 : 1-9.
- Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N., Stahl, J.V.A., Kelly, L.J., Wikstrom, N., Hollingsworth, P.M., Duff, R.J., Hoot, S.B., Cowan, R.S., Chase, M.W., dan Wilkinson, M.J. 2009. Selection of Candidate Coding DNA Barcoding Region For Use On Land Plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* (1) (159) : 1-11.
- Frankham, R. 1996. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology* 10 (6) : 1500-1508.
- Hamzah, M.F. 2010. Studi Morfologi dan Anatomi Daun Edelweiss Jawa (*Anaphalis javanica*) Pada Zona Ketinggian Yang Berbeda Di Taman Nasional Bromo Tengger Semeru Jawa Timur. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang,

Malang.

- Handoyo, D. dan Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Unitas*. 9 (1) : 17-29.
- Hidayat, P.A., Pratiknyo, H. dan Basuki, E., 2016. Keragaman Serangga Polinator Pada Tumbuhan Edelweiss Jawa (*Anaphalis javanica*) Di Gunung Slamet Jawa Tengah. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Saintek*. Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Hilu, K.W., Borsch, T., Muller, K., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Savolainen, V., Chase, M.W., Powell, M.P., Alice, L.A., Evans, R., Sauquet, H., Neinhuis, C., Slotta, T.A., Rohwer, J.G., Campbell, C.S., dan Chatrou, L.W. 2003. Angiosperm Phylogeny Based on *matK* Sequence Information. *American Journal of Botany*. 90(12) : 1758–1776.
- Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. dan Little, D.P., 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE*. 6(5) : 1-13.
- Hou, Y. dan Lou, A. 2011. Population Genetic Diversity and Structure of a Naturally Isolated Plant Species, *Rhodiola dumulosa* (Crassulaceae). *PLoS One*. 6(9): e24497.
- Kar, P., Goyal, A. dan Sen, A., 2015. *Maturase K gene in plant DNA barcoding and phylogenetics*. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken.
- Kumar, S., Stecher, G. dan Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(1) : 1870-1874
- Kurniawan, L.H., Hakim, L., dan Arumingtyas, E.L. 2014. Effectiveness of *trnL* (UAA) Intron Sequence for Detecting Genetic Variation of *Anaphalis* spp. Along Mount Semeru Hiking Track, Bromo Tengger Semeru National Park Indonesia. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 5(1): 501-507.
- Kusmana, C. dan Hikmat, A., 2015. Keanekaragaman Hayati Flora di Indonesia. *Journal Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*. 5(2): 187–198.
- Lande, R. 1998. Anthropogenic, Ecological, and Genetic Factors in Extinction and Conservation. *Researches on Population Ecology*. 40 (3): 259-269.
- Patwardhan, A., Ray, S. dan Roy, A. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *J. Phylogen Evolution*. 2(2): 1-9.
- Rahalus, M., Kumaunang, M., Wuntu, A., Pontoh, J. 2015. Barcode DNA Edelweis (*Anaphalis javanica*) Berdasarkan Gen *matK*. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*. 4(2): 131–136.
- Taufiq, A., Syamsuardi, S., Arbain, A., Maideliza, T., Mansyurdin, M. 2013. Analisis Morfometri dan Biologi Reproduksi *Anaphalis javanica* dan *A. longifolia* (Asteraceae) Di Sumatera Barat. *Floribunda*. 4(7): 161-168.
- van Steenis, C.G.G.J. 2010. *Flora Pegunungan Jawa*. Diterjemahkan oleh

:Kartawinata. LIPI Press, Jakarta.

Viljoen, Viljoen, G.J., Nel, L.H., dan Crowther, J.R. 2005. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer Netherland, Dordrecht.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., dan Kahl, G. 2005. *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*. CRC Press, Florida.

Yuzammi, Witono, J.R., Hidayat, S., Handayani, T., Sugiarti, Mursidawati, S., Triono, T., Astuti, I.P., Sudarmono, dan Wawangningrum. 2007. *Ensiklopedia Flora*. PT. Kharisma Ilmu, Jakarta.

