

**EKSPLORASI JENIS DAN POTENSI DNA BARCODE ANGGREK
Thrixspermum SECARA IN SILICO**

**Siti Rohimah¹, Luluk Mukarramah², Vita Sindiya³, Veren Yuliana S.⁴, Gita Ayu K.⁵,
Mukhamad Su'udi^{*6}**

^{1, 3, 4, 5, 6}Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember
e-mail: ¹srohimah24@gmail.com, ²lulukmukarramah07@gmail.com, ³vitasindiya@gmail.com,
⁴verenyluanas11@gmail.com, ⁵gitaayukhoirunnisa24@gmail.com, ⁶msuudi.rda@gmail.com

Diterima : 30 Oktober 2018
Disetujui : 25 November 2018

e-ISSN : 2541-4208
p-ISSN : 2548-1606

DOI: 10.15575/biodjati.v3i2.3409

Abstrak. *Thrixspermum* merupakan anggrek yang memiliki ciri khas berbunga dalam waktu yang singkat. Akibatnya, dalam pengklasifikasian menggunakan morfologi cenderung sulit untuk dilakukan. Sehingga perlu adanya pengklasifikasian menggunakan cara alternatif misalnya dengan marka molekuler menggunakan DNA. Tujuan dari penelitian ini adalah mencari barkode DNA dari beberapa spesies *Thrixspermum* yang ada pada GenBank NCBI. Berdasarkan data dari NCBI, hanya terdapat 19 spesies dari genus *Thrixspermum* yang telah diteliti sekuennya. Dari total 19 spesies tersebut, setelah dilakukan pensejajaran sekuen menunjukkan bahwa pada lokus *matK* dan *rbcL* memiliki tingkat homologi yang tinggi, sementara pada lokus ITS menunjukkan lebih banyak variasi genetik. Terdapat dua spesies yakni *T. annamense* dan *T. marguense* yang berpotensi memiliki barcode pada lokus ITS. Selain itu, didapatkan pohon filogenetik dari 19 spesies *Thrixspermum* yang telah diketahui sekuennya pada NCBI.

Kata Kunci : *Thrixspermum*, ITS, pohon filogenetik

Abstract. *Thrixspermum* is an orchid that has the characteristic of flowering in a short time. As a result, classification using morphology tends to be difficult to perform. Therefore, an alternative method such as molecular markers using DNA is needed for classification purpose. This study was performed to identify DNA barcodes of several *Thrixspermum* species found in the NCBI database. Based on data from NCBI, there are only 19 species of the genus *Thrixspermum* with sequence have been explored. Of total 19 species, after sequence alignment showed that the *matK* and *rbcL* loci had high homology level, while at the ITS locus showed more genetic variant. There are two species namely *T. annamense* and *T. marguense* posses potential barcodes at ITS locus. In addition, a phylogenetic tree from 19 species of *Thrixspermum* was constructed based on the sequences deposited in NCBI.

Keywords: *Thrixspermum*, ITS, phylogenetic tree

Cara Sitasi

Rohimah, S., Mukarramah, L., Sindiya, V., S. Yuliana, V., K. Ayu, A. & Su'udi, M. (2018). Eksplorasi Jenis Dan Potensi DNA Barcode Anggrek *Thrixspermum* Secara In Silico. *Jurnal Biodjati*, 3 (2), 148- 156.

PENDAHULUAN

Anggrek merupakan kelompok tumbuhan berbunga yang memiliki variasi tinggi, aktif berevolusi, sangat terspesialisasi dan beradaptasi untuk menarik polinator. Terdapat 17.000-35.000 spesies anggrek di dunia (Destri et al, 2015). Anggrek termasuk dalam famili Orchidaceae yang terbagi menjadi 5 sub-famili dan tumbuh di dataran tinggi hingga dataran rendah (Kartikaningrum et al, 2017). Salah satu genus anggota Orchidaceae adalah *Thrixspermum*. Kata *Thrixspermum* berasal dari bahasa latin, yaitu kata *thrix* (rambut) dan *sperma* (biji). *Thrixspermum* memiliki beberapa manfaat diantaranya selain dapat dijadikan sebagai tanaman hias juga berpotensi sebagai obat, diantaranya yaitu *Thrixspermum centipede* Lour dan *Thrixspermum pardale* (Ridl.) Schlecht. *Thrixspermum centipede* di Thailand digunakan untuk mengobati penyakit asma dengan memanfaatkan seluruh bagian tanaman (Teoh, 2016). *Thrixspermum pardale* oleh penduduk Malaysia digunakan sebagai obat untuk mengobati bisul pada hidung dengan cara menumbuknya bersama dengan daun *Hetaeria obliqueto* (Teoh, 2016). Penelitian tentang anggrek *Thrixspermum* belum banyak dilakukan, baik karakterisasi maupun potensinya. Keterbatasan literatur mengenai anggrek *Thrixspermum* disebabkan karena minimnya informasi ilmiah atau publikasi tentang anggrek ini.

Thrixspermum termasuk anggrek monopodial dan memiliki ciri khas berbunga dalam waktu yang singkat. *Thrixspermum* tersebar di wilayah tropis dan subtropis mulai dari Asia hingga Australia dan Pasifik (O'Byrne, 2016). Cara hidupnya epifit dengan menempel pada batang pohon (Nurfadilah, 2015). Karakter morfologi daun dan bunga *Thrixspermum* menjadi dasar penanda secara fenotipik untuk membedakan kelompok tanaman tersebut

(Wulanesa et al, 2017). Namun, spesies anggrek ini memiliki morfologi yang mirip dengan kerabat terdekatnya, contohnya *T. tsii* memiliki ciri vegetatif yang mirip dengan *T. centipeda*, namun struktur bunganya mirip dengan *T. subulatum* (Chen & Shui, 2005). Selain itu, spesies anggrek *Thrixspermum* juga memiliki banyak nama lain atau sinonim, diantaranya *Thrixspermum centipeda* yang memiliki sinonim *Thrixspermum arachnites*; *Thrixspermum papillosum*; dan *Sarcochilus arachnites*. Hal tersebut merupakan salah satu kelemahan dalam identifikasi berdasarkan karakter morfologi. Padahal identifikasi sangat penting dalam penentuan suatu spesies, terutama pada spesies yang memiliki peranan penting seperti berfungsi sebagai obat, atau yang lainnya. Berdasarkan studi literatur yang telah dilakukan, artikel-artikel tentang penelitian *Thrixspermum* sebagian besar melaporkan karakter morfologi dan persebarannya (Song et al, 2009; O'Byrne, 2016). Sehingga perlu adanya alternatif identifikasi lain, selain identifikasi berdasarkan morfologi untuk menentukan spesies dari *Thrixspermum*. Salah satu alternatif identifikasi yang dapat digunakan adalah menggunakan marka molekuler dengan DNA *barcoding*.

DNA *barcoding* memiliki prinsip dasar yaitu identifikasi menggunakan sekuen DNA pendek "barcode" dari bagian standar genom dari spesimen yang sedang diteliti. Urutan *barcode* yang tidak diketahui akan dibandingkan dengan pustaka sekuen *barcode* yang telah diketahui identitasnya. Apabila hasil perbandingan antara sekuen yang diteliti sesuai dengan pustaka, maka spesimen tersebut diidentifikasi sebagai spesimen dari pustaka. Namun jika tidak sesuai, maka dapat mengarah kepada sekuen baru untuk spesies baru (Hajibabaei et al, 2007). Identifikasi spesies berbasis DNA merupakan metode yang cepat dan konsisten sehingga dapat dipertang

gungjawabkan (Irawan et al, 2016). Hal tersebut dikarenakan karakter DNA yang relatif lebih konstan dibandingkan karakter morfologi (Hidayat et al, 2008). Sekuen DNA yang diperoleh dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan dari suatu spesies dengan cara mengkonstruksi pohon filogenetik.

Pohon filogenetik merupakan suatu gambaran evolusi yang terjadi pada sekelompok makhluk hidup yang berasal dari nenek moyang yang sama (Ochieng et al, 2007). Filogenetik mengkombinasikan teknik biologi molekuler dengan statistik untuk merekonstruksi hubungan filogenetik. Penggunaan sekuen DNA sangat penting karena dapat mengetahui perubahan basa nukleotida menurut waktu dan dapat memperkirakan kecepatan evolusi yang terjadi. Hal tersebut dapat direkonstruksi hubungan evolusi antara satu spesies dengan spesies lainnya (Hidayat & Pancoro, 2008). DNA kloroplas banyak digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara spesies angiospermae dengan tanaman lainnya, namun memiliki tingkat evolusi yang rendah. Sehingga ada keterbatasan dalam mengamati hubungan intraspesifik (Harsono et al, 2015). Sedangkan DNA nukleus lebih banyak memiliki variasi genetik karena tingkat rekombinasi yang tinggi.

BAHAN DAN METODE

Koleksi Sampel Penelitian

Sekuen DNA dikoleksi dari *GenBank* NCBI dengan cara menulis nama spesies disertai gen yang diinginkan (Contoh: *Trixpermum subulatum* matK/ ITS/ *rbcL*). Data-data yang meliputi aksesori, panjang nukleotida, sekuen parsial atau lengkap (*full*), serta asal anggrek disimpan ke dalam *Microsoft Excel*. Sementara susunan nukleotida disimpan ke dalam

Notepad yang nantinya akan dianalisis menggunakan *CLUSTALX*.

Pensejajaran Menggunakan *CLUSTALX*

Semua sekuen DNA yang telah dikoleksi dari NCBI disejajarkan. Pensejajaran sekuen DNA dilakukan dengan menggunakan *software CLUSTALX*. Hal ini bertujuan untuk mengetahui tingkat homologi dan identifikasi sekuen yang berpotensi sebagai *barcode*. Sekuen yang berpotensi sebagai *barcode* adalah sekuen yang berbeda dan khas dibandingkan yang lain.

Pembuatan Pohon Filogenetik

Data sekuen DNA hasil pensejajaran kemudian digunakan untuk membuat pohon filogenetik menggunakan *software MEGA7* dengan metode *Neighbour-Joining*. Pohon filogenetik bertujuan untuk mengetahui tingkat kekerabatan dari setiap anggrek *Trixpermum*. Selain itu, juga dapat digunakan untuk melihat laju evolusinya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Koleksi sampel penelitian

Hasil penelusuran jenis anggrek *Trixpermum* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara jumlah spesies yang dikoleksi dari *GeneBank database* (NCBI) dan yang disebutkan O'Byrne dalam bukunya. Berdasarkan grafik dapat diketahui bahwa dari total 130 spesies anggrek yang diketahui, hanya terdapat 19 jenis anggrek yang diketahui aksesinya di NCBI (Gambar 1). Jumlah tersebut menunjukkan bahwa masih terdapat banyak jenis anggrek *Trixpermum* yang belum dieksplorasi sekuennya. Hal ini dapat menjadi peluang bagi para peneliti untuk mencari sekuen dari anggrek jenis ini yang kemudian

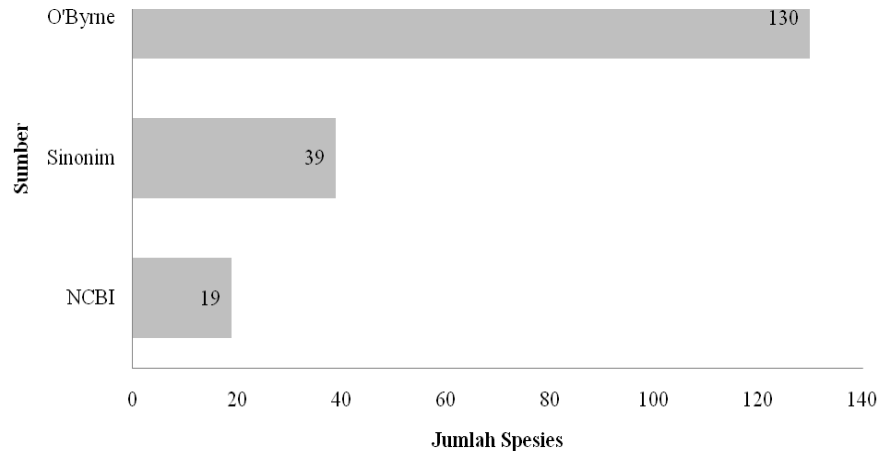
dapat digunakan sebagai data dalam analisis bioinformatika.

Sinonim merupakan istilah atau nama lain yang digunakan untuk menyebut jenis suatu spesies. Pemahaman terhadap sinonim suatu tumbuhan akan sangat membantu masyarakat akademik untuk tujuan identifikasi spesies. Anggrek merupakan tumbuhan yang memiliki banyak sinonim pada beberapa spesiesnya. Dari total 130 jenis anggrek *Thrixpermum* yang diketahui, terdapat 39 jenis anggrek *Thrixpermum* yang memiliki sinonim (Tabel 1). Apabila sinonim pada anggrek-anggrek tersebut tidak dipublikasikan, maka masyarakat cenderung akan membedakan spesies-spesies anggrek yang memiliki sinonim menjadi spesies yang berbeda. Sehingga penting sekali adanya publikasi mengenai sinonim dan nama yang telah diterima secara luas pada suatu spesies.

Hasil penelusuran juga menunjukkan bahwa dari 130 spesies anggrek jenis *Thrixpermum* yang diketahui, hanya terdapat 19 spesies yang sekuennya telah didepositkan di NCBI. Hal ini menjadi peluang besar dalam identifikasi molekuler anggrek jenis ini. Apabila pada identifikasi morfologi terdapat 39 spesies anggrek yang memiliki sinonim, tidak menutup kemungkinan pada identifikasi molekuler, akan terdapat spesies anggrek lain yang belum memiliki sinonim menjadi memiliki sinonim. Selain itu, akan ditemukan adanya peluang perbedaan antara spesies yang telah memiliki sinonim dengan spesies anggrek lainnya menurut urutan sekuen basa

nukleotidanya. Berdasarkan hasil penelusuran aksesori jenis anggrek *Thrixpermum* pada NCBI, dapat diketahui bahwa anggrek yang diteliti sebagian besar berasal dari dataran China dan Malaysia, hanya sebagian kecil yang didapatkan dari negara lain seperti Jepang, Polandia, USA, dan Korea.

Aksesori dalam penelitian ini merupakan hasil penelusuran menggunakan lokus gen *matK*, *rbcL*, dan *ITS* (Tabel 2). *Consortium Barcode Of Life* (CBOL) merekomendasikan *rbcL* yang secara umum dikombinasikan dengan *matK* sebagai *barcode* untuk identifikasi tumbuhan. Gen *rbcL* dan *matK* digunakan karena eksistensi, efektifitas, dan kelestarian laju mutasi kedua gen tersebut yang ditemukan pada hampir semua tumbuhan. Gen *rbcL* dan *matK* juga dapat digunakan dalam analisis filogenetik dan kekerabatan tanaman dalam satu genus. Laju mutasi *rbcL* yang rendah dari gen-gen kloroplas lainnya, seperti *trnH*, *trnM*, *trnS*, *rps18*, *psbH*, dan *ORF31*, menyebabkan *rbcL* masih dapat membawa informasi gen dari nenek moyang terdahulu (Suparman, 2012). Akibat laju mutasi yang rendah tersebut, apabila terdapat spesiasi pada suatu populasi, maka sekuen yang mengalami perubahan akan terlihat dan kemungkinan dapat menjadi sebuah *barcode* bagi spesies baru tersebut. Namun, laju mutasi yang rendah pada gen *rbcL* juga mengakibatkan tingkat homologi yang tinggi pada spesies dalam satu genus terutama jika spesies tersebut ditemukan dalam lingkungan, habitat, atau asal yang sama.



Gambar 1. Grafik perbandingan jumlah spesies dari genus *Thrixpernum* yang dikoleksi dari *GeneBank database* (NCBI) dan yang disebutkan O'Byrne dalam bukunya, serta yang memiliki sinonim

Tabel 1. Jenis anggrek *Thrixpernum* yang memiliki sinonim

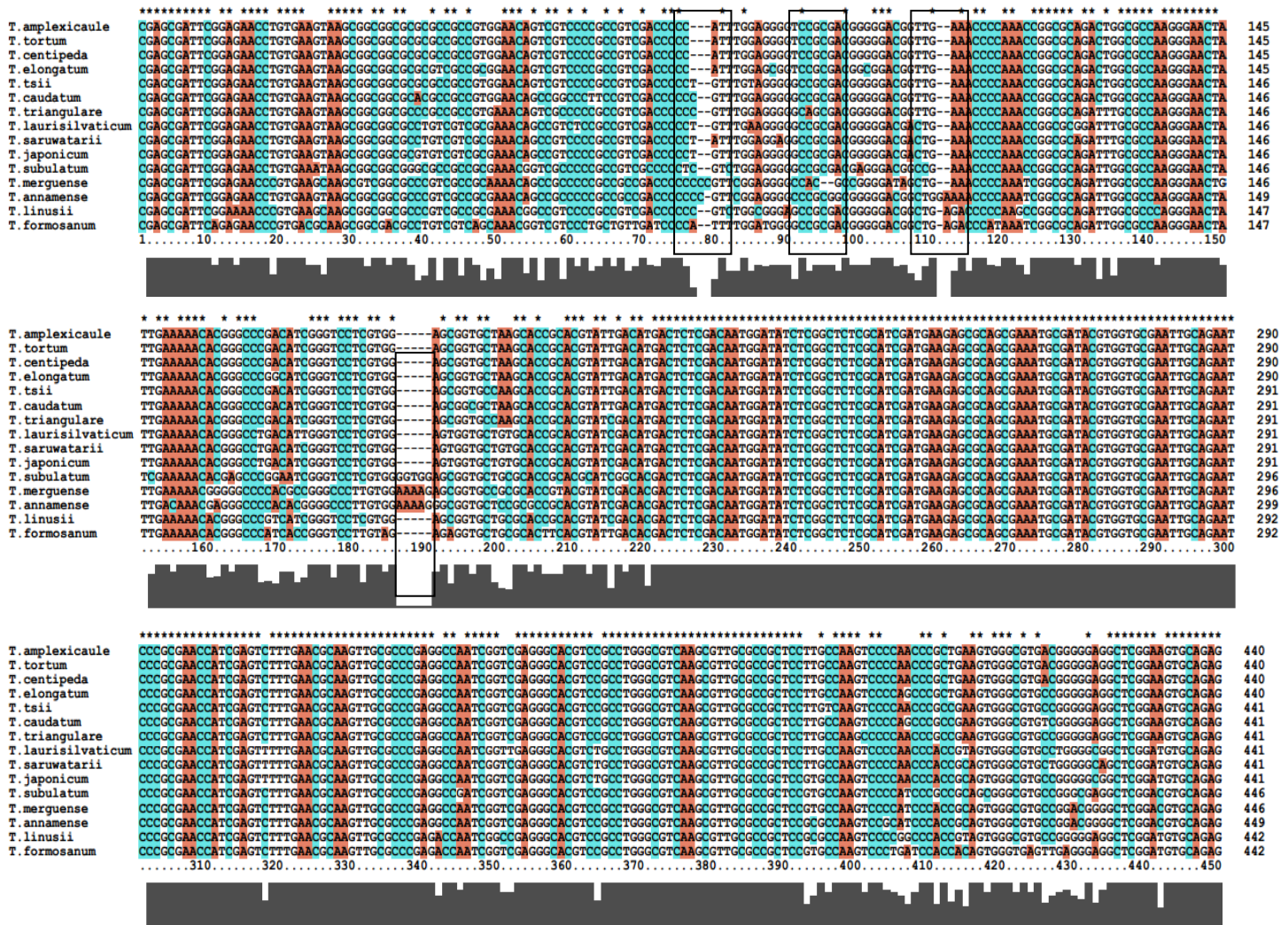
Nama	Sinonim
<i>Thrixpernum acuminatissimum</i>	<i>Thrixpernum notabile</i> ; <i>Thrixpernum affine</i> (subsp); <i>Sarcochilus acuminatissimus</i>
<i>Thrixpernum adenotrichum</i>	<i>Cleisostoma congestum</i> ; <i>Thrixpernum congestum</i>
<i>Thrixpernum amplexicaule</i>	<i>Thrixpernum oeonioides</i> ; <i>Sarcochilus amplexicaulis</i>
<i>Thrixpernum annamense</i>	<i>Thrixpernum devolium</i> ; <i>Ascochilus annamensis</i>
<i>Thrixpernum batuense</i>	<i>Sarcochilus carinatifolius</i> ; <i>Dendrocolla carinatifolia</i> ; <i>Thrixpernum carinatifolium</i>
<i>Thrixpernum bicristatum</i>	<i>Thrixpernum merguense</i>
<i>Thrixpernum centipeda</i>	<i>Thrixpernum arachnites</i> ; <i>Thrixpernum papillosum</i> ; <i>Thrixpernum arachnites</i> ; <i>Sarcochilus arachnites</i>
<i>Thrixpernum ciliatum</i>	<i>Thrixpernum clavatum</i>
<i>Thrixpernum falcilobum</i>	<i>Thrixpernum subulatum</i>
<i>Thrixpernum fantasticum</i>	<i>Thrixpernum neglectum</i>
<i>Thrixpernum formosanum</i>	<i>Thrixpernum pricei</i> ; <i>Thrixpernum sasaoi</i> ; <i>Sarcochilus formosanus</i>
<i>Thrixpernum fragrans</i>	<i>Thrixpernum simondii</i>
<i>Thrixpernum graeffei</i>	<i>Thrixpernum oreadum</i>
<i>Thrixpernum merguense</i>	<i>Thrixpernum bicristatum</i> ; <i>Thrixpernum comans</i> ; <i>Thrixpernum comans</i> var. <i>bicristatum</i> ; <i>Thrixpernum kusukusense</i> ; <i>Sarcochilus merguensis</i>)
<i>Thrixpernum neo-hibernicum</i>	<i>Thrixpernum platystachys</i>
<i>Thrixpernum pensile</i>	<i>Thrixpernum pendulicaule</i>
<i>Thrixpernum raciborskii</i>	<i>Thrixpernum raciborskii</i> var. <i>hamatum</i>
<i>Thrixpernum rubrocallosum</i>	<i>Thrixpernum clavatum</i>
<i>Thrixpernum xanthanthum</i>	<i>Thrixpernum pygmaeum</i>

Tabel 2. Aksesori angrek berdasarkan locus *matK*, *rbcL*, dan *ITS* dari NCBI

Nama Spesies	Lokus <i>ITS</i>			Lokus <i>rbcL</i>			Lokus <i>MatK</i>		
	Aksesori	Length (bp)	Asal	Aksesori	Length (bp)	Asal	Aksesori	Length (bp)	Asal
<i>Thrixspermum centipede</i>	KY966674	644 ^P	CH	KX784194	717 ^P	MLY	AB217767	1803 ^F	JP
<i>Thrixspermum formosanum</i>	KJ733460	647 ^P	CH	DQ195035	823 ^P	CH	KJ733620	1626 ^F	CH
<i>Thrixspermum tsii</i>	KJ733459	646 ^P	CH				KJ733615	1623 ^F	CH
<i>Thrixspermum laurisilvaticum</i>	KJ733457	646 ^P	CH				KJ733613	1622 ^F	CH
<i>Thrixspermum saruwatarii</i>	KJ733458	646 ^P	CH				KJ733614	1575 ^F	CH
<i>Thrixspermum merguense</i>	KX679334	838 ^F	MLY	KX784196	718 ^P	MLY			
<i>Thrixspermum triangulare</i>	KX679348	826 ^F	MLY	KX784210	609 ^P	MLY			
<i>Thrixspermum linusii</i>	KX679333	791 ^F	MLY	KX784195	718 ^P	MLY			
<i>Thrixspermum amplexicaule</i>	KF545882	645 ^P	CH	KX784193	725 ^P	MLY	KF545892	1621 ^F	CH
<i>Thrixspermum tortum</i>	KX679347	781 ^F	MLY	KX784209	720 ^P	MLY			
<i>Thrixspermum elongatum</i>	DQ091674	682 ^P	USA						
<i>Thrixspermum annamense</i>	KF545883	654 ^P	CH				KF545893	1627 ^F	CH
<i>Thrixspermum japonicum</i>	KT338782	645 ^P	KR	KF296714	561 ^P	MLY	KF262105	736 ^P	KR
<i>Thrixspermum caudatum</i>	KX679331	854 ^F	MLY						
<i>Thrixspermum raciborskii</i>							MF349945	824 ^P	US A
<i>Thrixspermum ventricosum</i>				KX784211	662 ^P	MLY			
<i>Thrixspermum pensile</i>				KX784197	721 ^P	MLY			
<i>Thrixspermum arachnites</i>							EF065572	1312 ^P	PL
<i>Thrixspermum subulatum</i>							AB217592	650 ^P	JP

Keterangan: F= Full
MLY= Malaysia
P= Parsial
CH= China
PL= Polland
KR= Korea

Pensejajaran sekuen DNA



Gambar 2. Hasil *alignment* sekuen *ITS*, tanda (*) menunjukkan homologi, *gap* menggambarkan adanya delesi atau insersi. Setiap warna menandai basa nitrogen tertentu.

Hasil *alignment* menggunakan lokus *ITS* memperlihatkan bahwa spesies *T. subulatum*, *T. merguense* dan *T. annamense* memiliki urutan sekuen yang unik dan berpotensi sebagai *barcode*, karena berbeda dengan spesies lainnya. Sekuen *T. merguense* dan *T. annamense* memiliki urutan yang terip yaitu AAAAG dan *T. subulatum* memiliki sekuen GGTGG pada urutan nukleotida 187-191 yang tidak dimiliki

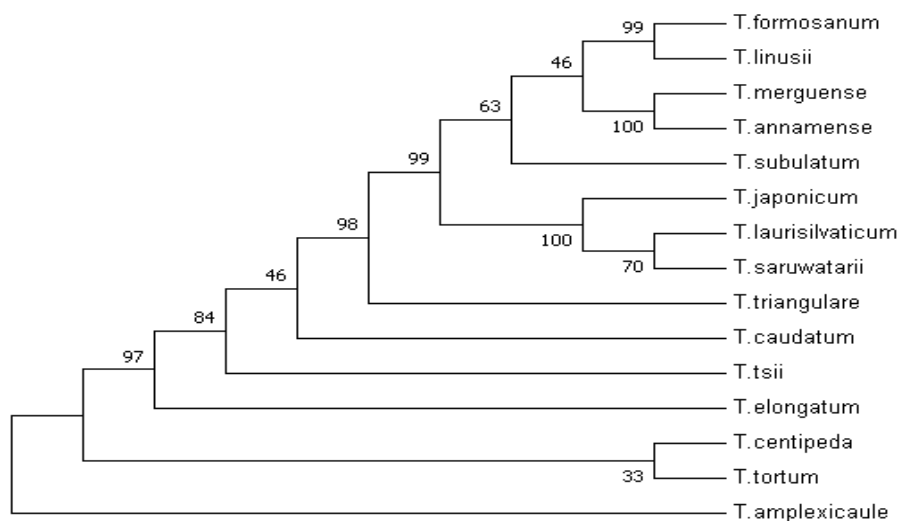
oleh spesies lainnya. Sekuen tersebut memiliki persentase keunikan sebesar 0.89%. Selain itu pada urutan basa 95-96 spesies *T. merguense* mengalami delesi. *T. annamense* mengalami insersi basa C dan G pada urutan basa 78 dan 111. Meskipun sekuen *ITS* banyak digunakan untuk mengidentifikasi atau mencari *barcode* pada fungi, namun tidak menutup kemungkinan bahwa *ITS* juga dapat digunakan

untuk menemukan *barcode* spesifik pada tumbuhan.

Pembuatan Pohon Filogenetik

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik *Thrixspermum* menunjukkan bahwa *T. annamense* dan *T. merguense* memiliki kekerabatan dekat dengan *T. formosanum* dan *T. linusii*. Berdasarkan data dari pohon

filogenetik, maka keempatnya diduga kuat memiliki nenek moyang yang sama. Sementara nenek moyang keempat spesies tersebut berkerabat dengan dengan *T. subulatum*. Selain itu, dapat diketahui pula bahwa kemungkinan besar *T. amplexicaule* merupakan spesies tertua dari genus *Thrixspermum* pada pohon filogenetik tersebut.



Gambar 3. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik *Thrixspermum* menggunakan MEGA7 dengan metode *Neighbour-Joining*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada LPPM Universitas Jember yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Hibah Keris tahun 2018.

DAFTAR PUSTAKA

Chen, W. H. & Shui, Y. M. (2005). A New Species of *Thrixspermum* (Orchidaceae) from China. *Brittonia*, 57.

Destri, Fudola A., Harto & Kusnadi. (2015). Survei Keanekaragaman Anggrek (Orchidaceae) di Kabupaten Bangka Tengah dan Belitung, Provinsi Kepulauan Bangka Belitung, et al.

litung. *PROS SEMNAS MASY BIODIV INDON*, 1(3), 509-514.

Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. & Hickey, D. A. (2007). DNA Barcoding: How it Complements Taxonomy, Molecular Phylogenetics and Population Genetics. *Trends in Genetics*, 23(4).

Harsono, T., Pasaribu, N., Sobir, Fitmawati & Prasetya, E. (2015). Variasi Intraspesifik Berdasarkan DNA Kloroplas (CPDNA) Pada *Bouea macrophylla* Griffit. *Prosiding Seminar Nasional Biodiversitas dan Ekologi Tropika Indonesia*.

- Hidayat, T. & Pancoro, A. (2008). Kajian Filogenetik Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal Agro Biogen*. 4(1), 35-40.
- Hidayat, T., Kusumawaty, D., Kusdianti., Yati, D. D., Muchtar, A. A. & Mariana, D. (2008). Analisis Filogenetik Molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) Menggunakan Urutan Basa DNA Daerah *Internal Transcribed Spaces* (ITS). *Jurnal Matematika dan Sains*, 13(1), 16-21.
- Irawan, P. D., Tallei, T. E. & Kolondam, B. J. (2016). Analisis Sekuen dan Filogenetik Beberapa Tumbuhan *Syzygium* (Myrtaceae) di Sulawesi Utara berdasarkan Gen matK. *Jurnal Ilmiah Sains*, 16(2), 43-50.
- Kartikaningrum, S., Pramanik, D., Dewanti, M., Soehendi, R. & Yufdy, M.P. (2017). Konservasi Anggrek Spesies Alam Menggunakan Eksplan Biji pada Media Vacin & Went. *Buletin Plasma Nutfah*, 23(2), 109-118.
- Nurfadilah, S. (2015). Diversity of Epiphytic Orchids and Host Trees (Phorophytes) in Secondary Forest of Coban Trisula, Malang Regency, East Java, Indonesia. *Biotropia*, 22(2), 120-128.
- O'Byrne, P. (2016). Trixsperrum in Borneo; 24 New and Old Species. *Malesian Orchid Journal*, 18, 5-74.
- Ochieng, J. W., Murigai, A. W. T. & Ude, G. N. (2007). Review: Phylogenetics in Plant Biotechnology: Principles, Obstacles, and Opportunities for Resource Poor. *African Journal of Biotechnology*, 6(6), 639-649.
- Suparman. (2012). Markah Molekuler Dalam Identifikasi Dan Analisis Kekerabatan Tumbuhan Serta Implikasinya Bagi Mata Kuliah Genetika (Telaah Keilmuan Genetika Molekuler Tumbuhan), *Jurnal Bioedukasi*, 1(1), 59-68.
- Song, X. Q., Meng, Q. W., Wing, Y. T. & Luo, Y. B. (2009). *Thrixsperrum odoratum* (Orchidaceae), a New Species from Hainan Island, China. *Ann. Bot. Fennici*, 46, 595-598.
- Teoh, E. S. (2016). *Medicinal Orchids of Asia*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Wulanesa, W. O. S., Soegianto, A. & Basuki, N. (2017). Eksplorasi dan Karakterisasi Anggrek Epifit di Hutan Coban Trisula-Kawasan Taman Nasional Bromo Tengger Semeru. *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(1), 125-131.