

## ANALISIS FILOGENETIK *Curcuma zedoaria* (TEMU PUTIH) BERDASARKAN GEN *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER* (ITS)

YULIANDINI PANGESTIKA\*, ANTO BUDIHARJO, HERMIN PANCASAKTI  
KUSUMANINGRUM

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro. Jl. Prof. H. Soedharto, SH, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50275. \*Tel/Fax. +6282171677272 email: pangestikandini@gmail.com

**Abstract.** *Curcuma zedoaria* belongs to Zingiberaceae family which has a local name white turmeric. This local name is not only used by *C. zedoaria*, but also used by *C. mangga* and *Kaempferia rotunda*. This problem leads to incorrect selection of ingredients, so that the therapeutic effect can not be achieved. Therefore phylogenetic analysis is important to differentiate three types of these plants. Phylogenetic analysis illustrated the taxonomic classification of organisms based on evolutionary history. Sequence which used in this study was Internal Transcribed Spacer (ITS). ITS flanked by the coding region of 18S, 5.8S and 26S rDNA on each unit in a series of chromosomes. Aimed of this study was to perform phylogenetic analysis of *C. zedoaria* which from Indonesia based on ITS gene sequences. Methods included were DNA isolation using Doyle and Doyle method (1987), ITS gene amplification using ITS1 and ITS4 primer, analysis of ITS gene sequences using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), and construction of phylogenetic trees using MEGA6 by neighbor-joining tree method and bootstrap method with 1000 replications. DNA isolation resulted DNA concentration of 853 ng/ $\mu$ l and purity value of 2.17. Amplification of ITS region resulted in 700 bp product. Result of homology search showed *C. zedoaria* had homology with *C. zedoaria* voucher JLS 71432 clone 4 from Czech Republic with 72 % homology and 3 % gap. Phylogenetic analysis showed that white turmeric collected in this study was *C. zedoaria* and different from *C. mangga* and *K. rotunda*. This study concluded that *C. zedoaria* different from *C. zedoaria* from the Czech Republic, however both were in a *Curcuma* monophyletic group.

**Keywords:** *Curcuma zedoaria*, *Internal Transcribed Spacer*, *phylogenetic*, *white turmeric*

**Abstrak.** *Curcuma zedoaria* merupakan salah satu jenis dari Zingiberaceae yang memiliki nama lokal temu putih. Nama lokal temu putih tidak hanya dimiliki oleh *C. zedoaria*, namun juga dimiliki oleh *C. mangga* dan *Kaempferia rotunda*. Hal ini akan menyebabkan pemilihan bahan obat menjadi tidak benar, sehingga efek terapi yang diinginkan tidak tercapai. Oleh karena itu, analisis filogenetik penting dilakukan untuk membedakan tiga jenis tanaman tersebut. Analisis filogenetik akan menggambarkan klasifikasi secara taksonomi dari organisme berdasarkan pada sejarah evolusi menggunakan sekuen DNA. Sekuen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Internal Transcribed Spacer* (ITS). ITS diapit oleh daerah pengkode 18S, 5.8S, dan 26S pada setiap unit rDNA dalam satu rangkaian kromosom. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis filogenetik *C. zedoaria* yang berasal dari Indonesia berdasarkan sekuen gen ITS. Metode yang digunakan adalah isolasi DNA menggunakan metode Doyle dan Doyle (1987), amplifikasi gen ITS menggunakan primer ITS1 dan ITS4, analisis sekuen gen ITS menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), dan konstruksi pohon filogenetik menggunakan MEGA6 dengan metode *neighbor-joining tree* serta metode *bootstrap* sebanyak 1000 pengulangan. Hasil isolasi DNA memperoleh konsentrasi 853 ng/ $\mu$ l dan nilai kemurnian 2,17. Amplifikasi daerah ITS memperoleh produk berukuran 700 bp. *C. zedoaria* memiliki homologi dengan *C. zedoaria* voucher JLS 71432 clone 4 yang berasal dari Ceko dengan nilai persentase homologi 72 % dan *gap* 3 %. Analisis filogenetik menunjukkan temu putih yang diperoleh merupakan *C. zedoaria* dan berbeda dengan *C. mangga* dan *K. rotunda*. Penelitian ini menyimpulkan bahwa sekuen ITS *C. zedoaria* dari Indonesia berbeda dengan *C. zedoaria* sekuen pembandingan yang berasal dari Ceko, namun keduanya berada dalam kelompok monofiletik *Curcuma*.

**Kata kunci:** *Curcuma zedoaria*, *filogenetik*, *gen*, *Internal Transcribed Spacer*, *temu putih*

### PENDAHULUAN

Bangsa Indonesia telah lama mengenal dan menggunakan tanaman berkhasiat obat sebagai salah satu upaya dalam menanggulangi masalah kesehatan. Pengetahuan tentang tanaman berkhasiat obat berdasar pada pengalaman dan ketrampilan yang secara turun temurun telah diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya. Penggunaan tanaman obat atau pengobatan herbal di Indonesia

sampai saat ini masih dikelompokkan ke dalam pengobatan tradisional (Sari, 2006). *World Health Organization* merekomendasikan penggunaan obat tradisional termasuk herbal dalam pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit, terutama untuk penyakit kronis, penyakit degeneratif dan kanker (WHO, 2003). Efek samping obat tradisional relatif kecil jika digunakan secara tepat yang meliputi kebenaran bahan, ketepatan dosis, ketepatan waktu penggunaan, ketepatan cara penggunaan, ketepatan

telaah informasi, tanpa penyalahgunaan obat, dan ketepatan pemilihan obat untuk indikasi tertentu (Sari, 2006).

Zingiberaceae adalah salah satu kelompok tanaman obat yang banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional karena kandungan senyawa kimianya. Zingiberaceae disebut juga tanaman temu-temuan yang merupakan salah satu sumber plasma nutfah yang perlu dilestarikan (Rukmana, 2004). Zingiberaceae tersebar hampir di seluruh dunia khususnya di sepanjang daerah tropik dan subtropik, meliputi tropikal Afrika, Asia, dan Amerika. Pusat keanekaragamannya berada di Asia bagian selatan dan Asia Tenggara (Takano & Okada, 2003).

*Curcuma zedoaria* merupakan salah satu jenis dari Zingiberaceae yang memiliki nama lokal temu putih. Nama lokal temu putih tidak hanya dimiliki oleh *C. zedoaria* saja, namun juga dimiliki oleh *C. mangga*, dan *Kaempferia rotunda*. Penyebutan nama lokal yang sama pada spesies yang berbeda disebabkan karena beragamnya bahasa dan budaya di Indonesia. Padahal ketiganya memiliki sifat-sifat morfologi dan khasiat yang berbeda sebagai tanaman obat. Hal ini akan menyebabkan pemilihan bahan obat menjadi tidak benar, sehingga efek terapi yang diinginkan tidak tercapai. Menurut Utami (2000), secara empiris rimpang temu putih digunakan sebagai anti inflamasi, anti kanker, melancarkan sirkulasi darah, bersifat fibrinolitik, dan anti neoplastik.

Mulyani dkk (2013) telah melakukan identifikasi rimpang *C. zedoaria*, *C. mangga*, dan *K. rotunda* dalam hal identitas makroskopi, mikroskopi, dan pemeriksaan komponen penyusun minyak atsiri untuk mendapatkan ciri pembeda dari ketiga rimpang tersebut serta diperoleh senyawa identitas dari minyak atsirinya. Namun, menurut Suskendriyati dkk (2000) karakterisasi melalui pendekatan morfologi tersebut mempunyai beberapa kelemahan, diantaranya penampilan karakter yang sering kali dipengaruhi oleh faktor lingkungan atau kemungkinan terjadinya spesies kembar atau *sibling*. Hal ini dapat mengakibatkan ketidakjelasan identitas suatu tanaman yang dapat mempengaruhi penelitian selanjutnya. Oleh karena itu, karakterisasi filogenetik penting untuk dilakukan terhadap *C. zedoaria* untuk memberikan informasi ilmiah pada masyarakat mengenai hasil analisis hubungan filogenetik yang akan mempengaruhi kebenaran penggunaannya sebagai tanaman obat. Analisis filogenetik dalam penelitian ini direpresentasikan melalui konstruksi pohon filogenetik yang menggunakan karakter sekuen DNA.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro pada Pebruari-Juni 2015.

### Bahan dan Alat

Bahan penelitian meliputi *C. zedoaria* (diperoleh dari Taman Djamo Indonesia, Nyonya Meneer), bufer ekstraksi *Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), bufer Tris-EDTA (TE), bufer Tris-Asetat-EDTA (TAE), *chloroform: isoamyl alcohol* (CIA) (24:1), *2-mercaptoethanol* (2-ME), isopropanol, etanol hidrosida (EtOH), alkohol 70%, akuades, akuabides (ddH<sub>2</sub>O), agarosa, etidium bromida (EtBr), *nuclease free water* (Promega™), 100bp DNA ladder (Geneaid™), *loading dye* (Geneaid™), KAPA Taq Extra, primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3'), primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3'), *ice gel*, kapas, plastik klip, dan aluminium foil.

Alat penelitian meliputi erlenmeyer, botol reagen, gelas ukur, gelas beker, rak tabung, timbangan analitik, pipet tetes, tip biru, tip kuning, tip putih, tabung *falcon*, *microtube*, *micropipet*, kotak sterofoam, vorteks, mortar, *pestle*, *autoklaf*, *freezer*, elektroforesis, *gel documentation*, *centrifuge* (Corning), *thermal cycler* (Kyratex), *nanodrop* (Thermo Scientific), dan inkubator.

### Cara kerja

#### Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode Doyle & Doyle (1987) dengan sedikit modifikasi. Daun *C. zedoaria* segar ditimbang 0,3 gr, dicuci bersih, dikeringkan, kemudian disemprot dengan alkohol 70%. Daun digerus dengan mortar dan *pestle* sampai halus di atas *ice gel*. Hasil gerusan ditambahkan bufer CTAB 2-ME yang telah dipreinkubasi 65°C. Sampel dimasukkan ke dalam *microtube* dan diinkubasi 65°C selama 30 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan dari sampel dipindah ke tabung *microtube* dan ditambahkan CIA (24:1) sebanyak volume supernatan. Sampel divorteks sampai homogen, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Lapisan atas diambil dengan hati-hati kemudian ditambahkan dengan isopropanol dingin dengan volume yang sama. Inkubasi dilakukan pada suhu -20°C selama 1-2 jam. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian pellet dicuci dengan 80 % EtOH. Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Sampel dikeringkan secara *overnight*. Sampel ditambahkan dengan 100 µl TE bufer dan dapat disimpan di dalam *freezer*.

Kemurnian dan konsentrasi DNA diukur menggunakan nanodrop.

#### Amplifikasi Gen ITS

Amplifikasi daerah target ITS dilakukan menggunakan *thermo cycler* dengan program sebagai berikut: denaturasi awal 95°C selama 5 menit; denaturasi 95°C selama 1 menit, annealing 57,1°C selama 1 menit, ekstensi 72°C selama 1 menit, ekstensi akhir 72°C selama 7 menit, dan suhu penyimpanan pada tahap akhir 4°C. Primer yang digunakan adalah ITS1 sebagai primer *reverse* dan ITS4 sebagai primer *forward*. Sekuen primer ITS1 adalah (5'-TCCGTAGGTGAACCTG CCG-3') dan primer ITS4 adalah (5'-TCCTCCGC TTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Komponen reaksi PCR mengandung 50 µL yang terdiri atas 1,5 µL primer forward; 1,5 µL primer reverse; DNA template 3 µL; KAPA *Taq* Extra 25 µL; dan *nuclease free water* 19 µL. Program tersebut dijalankan selama 35 siklus. Elektroforesis gel agarosa 1 % dilakukan sebesar 100 V selama 50 menit untuk melihat hasil amplifikasi. Hasil pita yang terbentuk dilihat menggunakan *gel documentation*.

#### Analisis Sekuen Gen ITS

Tahapan ini berguna untuk memperoleh data urutan nukleotida daerah target dari sampel *C. zedoaria* yang dilakukan menggunakan jasa di Laboratorium 1st BASE. Urutan sekuen yang telah diperoleh dianalisis kesamaan sekuennya dengan data *gene bank* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada situs NCBI.

#### Analisis Filogenetik

Tahapan ini dimulai penjajaran sekuen (*sequence alignment*) menggunakan ClustalX dan konstruksi pohon filogenetik menggunakan MEGA6 dengan *Construct / Test Neighborjoining tree* dan *Bootstrap method* dengan *No. of Bootstrap Replications* 1000.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Hasil Isolasi DNA *C. zedoaria* menggunakan Metode Doyle dan Doyle

Hasil isolasi DNA *C. zedoaria* memperlihatkan konsentrasi DNA yang diperoleh, yaitu 853 ng/µl. Nilai tersebut dapat dipengaruhi oleh teknik awal isolasi DNA yang berupa penggerusan. Teknik penggerusan daun *C. zedoaria* merupakan teknik isolasi secara mekanis yang bertujuan untuk memecah dinding sel daun. Apabila dinding sel pecah (lisis), maka semua isi sel dapat keluar termasuk DNA dan dilepaskan ke dalam bufer ekstraksi. Hasil isolasi juga memperlihatkan nilai kemurnian 2,17. Nilai tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu penggunaan bufer

ekstraksi CTAB, CIA (24:1), dan penambahan 2-ME ke dalam bufer ekstraksi CTAB. Bahan-bahan kimia tersebut penting digunakan untuk menghilangkan kandungan polisakarida dan metabolit sekunder, yaitu senyawa fenol yang berupa minyak atsiri dari *C. zedoaria*. Apabila tidak dihilangkan, maka akan mengganggu proses analisis DNA selanjutnya. Seperti yang dinyatakan oleh Fang *et al.* (1992) dan Pandey *et al.* (1996) bahwa kehadiran polisakarida telah menunjukkan terhambatnya aktivitas enzim *Taq* polimerase dan aktivitas enzim restriksi.

Penggunaan bufer ekstraksi CTAB dalam metode Doyle dan Doyle didukung oleh Stewart & Via (1993), bahwa bufer ekstraksi CTAB adalah salah satu senyawa yang dapat digunakan untuk mengendapkan protein dan senyawa makromolekul lain, seperti polisakarida. Sahu *et al.* (2012), melaporkan bahwa penggunaan CIA (24:1) berfungsi untuk menghilangkan klorofil, pigmen, dan pewarna. Selain itu, menurut Lodhi *et al.* (1994), 2-ME yang ditambahkan ke dalam bufer ekstraksi CTAB berfungsi sebagai agen pereduksi yang kuat, sehingga dapat menghilangkan tanin dan polifenol dalam sel tanaman dengan cara membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa polifenol yang kemudian akan terpisah dengan DNA. Berdasarkan hasil analisis kemurnian dan konsentrasi tersebut memperlihatkan bahwa metode Doyle dan Doyle berhasil dilakukan untuk mengisolasi DNA *C. zedoaria*.

#### Hasil Amplifikasi DNA *C. zedoaria* pada Daerah Gen ITS

Hasil amplifikasi DNA yang dilakukan pada daerah target gen ITS memperoleh produk amplifikasi berukuran 700 bp yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil visualisasi amplifikasi gen ITS dengan gel agarosa 1% (Keterangan: M = 100 bp DNA ladder; 1 = produk amplifikasi)

Daerah ITS dapat teramplifikasi dengan baik oleh primer ITS1 dan primer ITS4, karena ukuran produk amplifikasi yang diperoleh sesuai dengan pernyataan Baldwin *et al.* (1995) bahwa daerah ITS

pada tanaman berukuran antara 500-700 bp. Hasil visualisasi juga menunjukkan pita yang terbentuk cukup tebal dengan tidak adanya *smear*. Hal ini menunjukkan suhu *annealing* telah optimal untuk menempel pada DNA cetakan. Amplifikasi pada daerah ITS tersebut dilakukan sebanyak 35 siklus. Menurut Fatchiyah dkk (2011), peningkatan jumlah siklus PCR di atas 35 siklus tidak memberikan efek yang positif.

### Hasil Sekuensing Gen ITS

Produk hasil amplifikasi ITS tersebut selanjutnya dipurifikasi dan disekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotidanya. Primer yang digunakan dalam proses sekuensing adalah primer ITS1. Urutan basa nukleotida gen ITS selanjutnya dilakukan pencarian homologi sekuen menggunakan fasilitas *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada situs *website* (NCBI) untuk mengetahui homologinya dengan spesies yang memiliki kemiripan urutan sekuen. Hal tersebut sesuai dengan NCBI (2015), bahwa

BLAST akan menemukan daerah kesamaan dari sekuen. Program BLAST akan membandingkan sekuen nukleotid atau protein pada database sekuen dan menghitung kecocokannya secara statistik. Hasil dari BLAST menunjukkan *C. zedoaria* memiliki homologi atau identik dengan *C. zedoaria voucher* JLS 71432 *clone* 4 yang berasal dari Ceko dengan nilai persentase homologi 72% dan *gap* 3%.

### Hasil Filogenetik Gen ITS

Pohon filogenetik gen ITS *C. zedoaria* selanjutnya dikonstruksi menggunakan MEGA6. Konstruksi pohon filogenetik bertujuan untuk melihat kekerabatan antara organisme sampel berdasarkan hubungan evolusionermya dengan sekuen organisme pembanding yang berasal dari situs NCBI. Pohon filogenetik yang dikonstruksi menggunakan sekuen organisme pembanding yang diambil dari hasil BLAST pada situs NCBI. Sekuen pembanding tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Takson organisme pembanding dengan nomor aseksi dari NCBI

Takson	No. Aseksi	Referensi
<i>Curcuma zedoaria</i>	JQ409977.1	Zaveska <i>et al.</i> , 2012
<i>Curcuma amada</i>	KF304476.1	Vinitha <i>et al.</i> , 2014
<i>Curcuma leucorrhiza</i>	JQ409912.1	Zaveska <i>et al.</i> , 2012
<i>Curcuma aromatica</i>	JQ409910.1	Zaveska <i>et al.</i> , 2012
<i>Curcuma caesia</i>	KF304486.1	Vinitha <i>et al.</i> , 2014
<i>Curcuma xanthorrhiza</i>	JQ409918.1	Zaveska <i>et al.</i> , 2012
<i>Curcuma brog</i>	JQ409913.1	Zaveska <i>et al.</i> , 2012
<i>Curcuma wenyujin</i>	HM236127.1	Zheng <i>et al.</i> , 2010
<i>Curcuma rubescens</i>	JQ409911.1	Zaveska <i>et al.</i> , 2012
<i>Curcuma elata</i>	HM236123.1	Zheng <i>et al.</i> , 2010
<i>Kaempferia rotunda</i>	KF304543.1	Vinitha <i>et al.</i> , 2014

Pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode *neighbor joining tree*. Menurut Dharmayanti (2011), metode *neighbor joining tree* memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberikan estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen. Pohon filogenetik diuji secara statistik menggunakan metode *bootstrap* sebanyak 1000 ulangan. Hall (2001) menyatakan nilai *bootstrap* sebanyak 100 sampai 1000 ulangan digunakan untuk memperkirakan tingkat kepercayaan sebuah pohon filogenetik. Selain itu, Ubaidillah & Sutrisno (2009) bahwa semakin besar nilai *bootstrap* yang digunakan maka semakin tinggi kepercayaan topologi pohon hasil rekonstruksi yang didasarkan atas distribusi karakter dalam data sangat dipengaruhi oleh efek acak.

Konstruksi pohon filogenetik yang ditunjukkan pada Gambar 2 menunjukkan bahwa takson sampel, yaitu *C. zedoaria* dengan simbol Cz berada

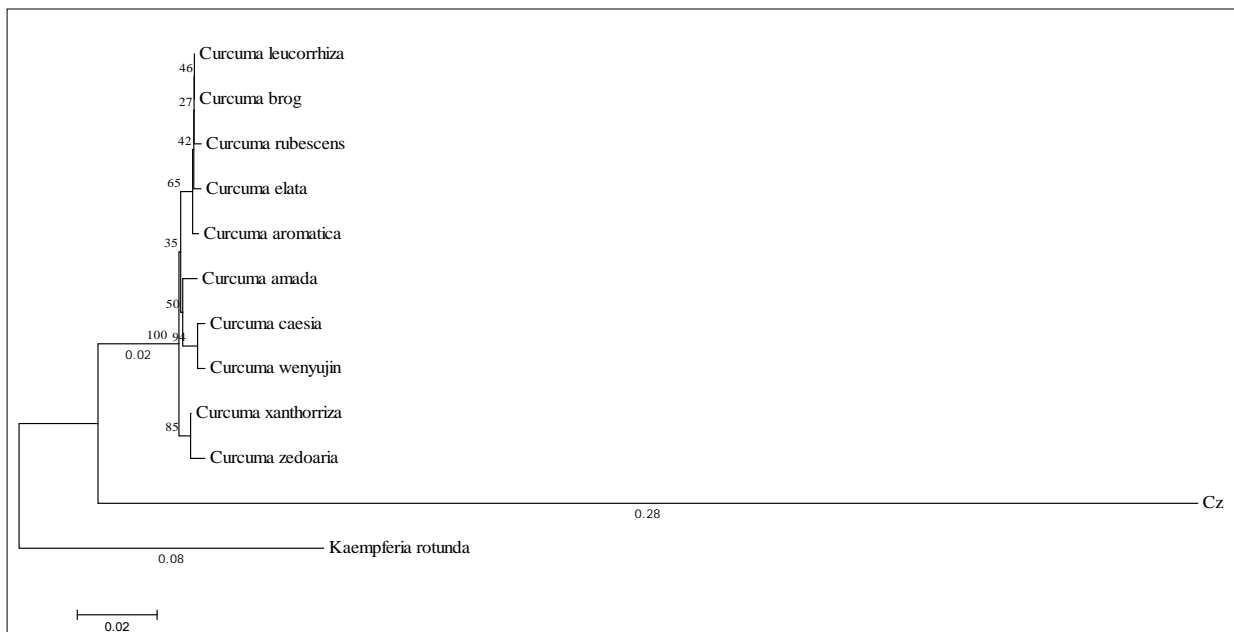
dalam satu kelompok dengan *Curcuma* lainnya, yaitu *C. leucorrhiza*, *C. brog*, *C. rubescens*, *C. elata*, *C. aromatica*, *C. amada*, *C. caesia*, *C. wenyujin*, *C. xanthorrhiza*, *C. zedoaria*. Hal ini menunjukkan sampel *C. zedoaria* berada dalam kelompok monofiletik dengan *Curcuma* lainnya. Menurut Hidayat dan Adi (2008), sebuah kelompok organisme yang anggota-anggotanya memiliki banyak kesamaan karakter atau ciri dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang; nenek moyang dan anggota-anggotanya diasumsikan membawa sifat atau pola genetik dan biokimia yang sama. Pohon filogenetik juga menunjukkan hubungan kekerabatan *Curcuma* dengan nilai *bootstrap* 100%. Nilai *bootstrap* dinilai tinggi karena menurut Hall (2001), suatu klad dapat dipercaya dengan nilai *bootstrap* 90% dan tidak dipercaya dengan nilai *bootstrap* 25%. Selain itu, Hillis & Bull (1993) menyatakan, analisis *bootstrap* dengan nilai-nilai dari 70% atau

lebih tinggi mengindikasikan sebuah pengelompokan yang dapat dipercaya.

Pohon filogenetik menunjukkan bahwa sampel *C. zedoaria* tidak berada dalam satu cabang dengan sekuen pembandingan *C. zedoaria* yang berasal dari Ceko. Hal ini dapat disebabkan karena adanya *gap* (ditandai oleh garis putus-putus) pada hasil penjajaran (*alignment*) yang disebabkan oleh sifat dari daerah ITS yang variatif. *Gap* menunjukkan terjadinya proses mutasi baik berupa delesi maupun insersi. Dari hasil penjajaran juga terlihat bahwa daerah ITS merupakan daerah dengan evolusi cepat, diperlihatkan oleh banyaknya perbedaan basa di daerah tertentu pada sekuen antara masing-masing spesies. Panjang cabang sampel *C. zedoaria* memiliki panjang cabang yang lebih panjang (0,28) daripada panjang cabang lainnya (0,02 dan 0,08). Hal ini menurut Hall (2001) dapat diartikan bahwa semakin besar nilai panjang cabang maka terdapat lebih banyak perubahan sekuen yang terjadi. Pohon filogenetik juga menunjukkan bahwa *C. zedoaria* yang

diperoleh berbeda dengan *C. mangga* dan *K. rotunda*.

Berdasarkan pohon filogenetik tersebut diketahui bahwa gen ITS dapat memberikan gambaran yang informatif mengenai filogenetik molekuler dari *C. zedoaria* pada tingkat spesies. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Yip *et al.* (2007), bahwa daerah ITS biasa digunakan untuk identifikasi pada tingkat spesies, namun juga dapat diaplikasikan pada tingkat yang lebih rendah, seperti strain. Konstruksi pohon filogenetik menempatkan *K. rotunda* sebagai *outgroup*. *Outgroup* sangat dibutuhkan dalam konstruksi pohon filogenetik, sesuai dengan pernyataan Hidayat & Adi (2008), bahwa kelompok *outgroup* sangat dibutuhkan untuk memberikan polarisasi karakter atau ciri, yaitu karakter apomorfik dan plesiomorfik. Karakter apomorfik adalah karakter yang berubah dan diturunkan pada *ingroup*, sedangkan karakter plesiomorfik merupakan karakter primitif yang terdapat pada *outgroup*.



Gambar 2. Pohon filogenetik berdasarkan gen ITS menggunakan metode *neighbor-joining* dengan uji *bootstrap* 1.000 ulangan

## SIMPULAN

Analisis filogenetik berdasarkan gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) menunjukkan temu putih yang diperoleh merupakan *C. zedoaria* dan berbeda dengan *C. mangga* dan *K. rotunda*. Analisis filogenetik *C. zedoaria* memperoleh sekuen yang berbeda dengan *C. zedoaria* sekuen pembandingan yang berasal dari Ceko, namun keduanya berada dalam kelompok monofiletik *Curcuma*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Supto Purnomo Putro, PhD sebagai Dosen wali dan Dr. Munifatul Izzati, M.Sc sebagai Ketua Jurusan, Dr.rer.nat. Anto Budiharjo, M.Biotech dan Dr. Hermin Pancasakti Kusumaningrum, S.Si, M.Si sebagai dosen pembimbing penelitian dan Dr. Endang Kusdiyantini, DEA serta Dr. Sri Pujiyanto, M.Si

sebagai dosen penguji atas segenap kritik dan saran yang membangun dalam skripsi ini, serta kedua orang tua yang telah memberikan doa dan dukungan selama penulisan naskah skripsi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Baldwin, B.G., Michael J.S., J. Mark Porter, Martin F.W., Christopher S.C., and Michael J.D. 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Garden* 2(82): 247-277.
- Dharyamanti, I.N.L.P. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa* 1(21): 1-10.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Fang, D.Q. and Roose M.L. 1997. Identification of closely related Citrus cultivars with Inter Simple Sequence Repeats Markers. *Theoretical Genetics* 95: 408-417.
- Fatchiyah, E.L.A., Sri W., dan Sri R. 2011. Biologi Molekuler - Prinsip Dasar Analisis. Erlangga, Jakarta.
- Hall, B.G. 2001. Phylogenetic Trees Made Easy: A How - To Manual for Molecular Biologists. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hidayat, T. dan Adi P. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen* 4(1): 35-40.
- Hillis, D.M. and Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* 42, 182-192.
- Lodhi, M.A., G.N. Ye., N.F. Weeden, and B.I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extractions from grapevine cultivars, Vitis species and Ampelopsis. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1): 6-13.
- Mulyani, S., Novia D.N., Hendri M.S., dan Alifia Z.A.S. 2013. Identitas Makroskopi, Mikroskopi, dan Kimiawi Rimpang *Curcuma mangga*, *Curcuma zedoaria*, dan *Kaempferia rotunda*. *Traditional Medicine Journal* 2(18): 67-74.
- NCBI. 2015. BLAST®. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Diakses: 10 Juni 2015
- Rukmana, H.R. 2004. Temu-Temuan. Apotik Hidup di Pekarangan. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Sahu, S.K., Muthusamy T., and Kandasamy K. 2012. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology* (2012): 1-6
- Sari, L.O.R.K. 2006. Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 1(3): 1-7.
- Stewart C.N.Jr. and Via L.E. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 14: 748-751.
- Suskendriyati, H.A., Wijayanti, Nurhidayah dan D. Cahyuningdari. 2000. Studi Morfologi dan Hubungan Keekerabatan Varietas Salak Pondoh (*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss) di Dataran Tinggi Sleman. *Biodiversitas* 1(1): 26-31.
- Takano, A. and Okada, H. 2003. Taxonomy of Globba (Zingiberaceae) in Sumatra, Indonesia. *Systematic Botany* 28: 524-546.
- Ubaidillah, R. dan Sutrisno H. 2009. Pengantar Biosistemik: Teori dan Praktikum. LIPI Press, Jakarta.
- White, T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M., Gelfand D., Sninsky J., (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. Academic Press. San Diego.
- WHO. 2003. Traditional medicine. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Diakses: 20 Mei 2015
- Yip, P.Y., Chi F. C., Chun Y. M., and Hoi S. K. 2007. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chinese Medicine* 2:9.

