

**INTEGRASI DNA BARCODE COI DAN ITS MENGUNGKAP
KEANEKARAGAMAN KRIPTIK SERTA BATASAN SPESIES DALAM
GENUS *Padina***

Yessy Yessy¹, Fenti Fatmawati², Malikhatun Ni'mah³
Universitas Negeri Surabaya¹, Universitas Bhakti Kencana²,
Universitas Airlangga³
yessyyessy@unesa.ac.id¹

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis karakteristik molekuler dan hubungan filogenetik genus *Padina* menggunakan penanda COI dan ITS, serta mengevaluasi keberadaan keanekaragaman kriptik dan delimitasi spesies berdasarkan pendekatan filogenetik molekuler. Analisis filogenetik dilakukan terhadap 66 sekuens COI dan 25 sekuens ITS yang diperoleh dari GenBank. Penyelarasan sekuens dilakukan menggunakan algoritma ClustalW, sedangkan rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan metode *Neighbor-Joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML) menggunakan perangkat lunak MEGA 12. Jarak genetik berpasangan dihitung menggunakan model *Maximum Composite Likelihood*, dan analisis *bootstrap* dilakukan sebanyak 1.000 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa topologi pohon NJ dan ML memiliki konsistensi tinggi dengan nilai *bootstrap* sebesar 70–100% pada simpul-simpul utama. Analisis berhasil mengonfirmasi monofili *P. mexicana*, *P. crispata*, *P. durvillei*, *P. antillarum*, *P. bergeseni*, *P. haitiensis*, *P. boryana*, dan *P. minor*. Sebaliknya, *Padina gymnospora* menunjukkan kondisi parafiletik yang mengindikasikan kemungkinan adanya kompleks spesies. Marka COI memperlihatkan adanya *barcoding gap* yang jelas, dengan jarak genetik intraspesifik (0,000–0,081) lebih rendah dibandingkan jarak genetik interspesifik (0,091–0,165). Spesimen yang belum teridentifikasi menunjukkan jarak genetik sebesar 0,064–0,103 terhadap *P. durvillei* dan 0,053–0,215 terhadap *P. gymnospora*, yang mengindikasikan diferensiasi genetik yang signifikan. Marka ITS memiliki 94,8% situs bervariasi dan 82,9% situs informatif-parsimoni, sedangkan COI memiliki 43,2% situs bervariasi dan 34,9% situs informatif-parsimoni. Dengan demikian, kombinasi penanda COI dan ITS terbukti efektif dalam merekonstruksi hubungan filogenetik, mengungkap keanekaragaman kriptik, serta mendukung delimitasi spesies pada genus *Padina* yang memiliki plastisitas morfologi tinggi.

Kata Kunci: COI, Delimitasi Spesies, Filogenetik Molekuler, ITS, Keanekaragaman Kriptik

ABSTRACT

*This study aimed to analyze the molecular characteristics and phylogenetic relationships of the genus *Padina* using COI and ITS markers, as well as to evaluate the presence of cryptic diversity and species delimitation based on molecular phylogenetic approaches. Phylogenetic analysis was conducted on 66 COI sequences and 25 ITS sequences obtained from GenBank. Sequence alignment was performed using the ClustalW algorithm, while phylogenetic tree reconstruction was carried out using Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) methods with MEGA 12 software. Pairwise genetic distances were calculated using the Maximum Composite Likelihood model, and bootstrap analysis was performed with 1,000 replicates. The results showed that the NJ and ML tree topologies had high consistency, with bootstrap values of 70–100% at the main nodes. The analysis successfully confirmed the monophyly of *P. mexicana*, *P. crispata*, *P. durvillei*, *P. antillarum*, *P. bergesenii*, *P. haitiensis*, *P. boryana*, and *P. minor*. In contrast, *Padina gymnospora* showed a paraphyletic condition, indicating the possibility of a species complex. The COI marker revealed a clear barcoding gap, with intraspecific genetic distances (0.000–0.081) lower than interspecific genetic distances (0.091–0.165). Unidentified specimens showed genetic distances of 0.064–0.103 from *P. durvillei* and 0.053–0.215 from *P. gymnospora*, indicating significant genetic differentiation. The ITS marker showed 94.8% variable sites and 82.9% parsimony-informative sites, while COI had 43.2% variable sites and 34.9% parsimony-informative sites. Therefore, the combination of COI and ITS markers was proven effective in reconstructing phylogenetic relationships, revealing cryptic diversity, and supporting species delimitation in the genus *Padina*, which has high morphological plasticity.*

Keywords: *COI, Cryptic Diversity, ITS, Molecular Phylogenetics, Species Delimitation*

PENDAHULUAN

Makroalga coklat dari genus *Padina* merupakan kelompok alga laut yang tersebar luas di wilayah tropis dan subtropis serta berperan penting sebagai produsen primer dan penyedia habitat bagi berbagai organisme laut. Selain memiliki nilai ekologis, genus *Padina* juga dimanfaatkan dalam bidang pangan, farmasi, kosmetik, dan bioteknologi karena kandungan senyawa bioaktif dan metabolit sekundernya yang beragam. Namun demikian, identifikasi spesies *Padina* secara morfologi sering mengalami kesulitan akibat tingginya plastisitas morfologi dan kemiripan karakter antarspesies. Oleh karena itu, pendekatan molekuler menjadi penting untuk mendukung akurasi identifikasi taksonomi (Huynh Thi et al., 2024; Nguyen et al., 2024; Vieira et al., 2024).

Seiring berkembangnya kajian sistematika molekuler, semakin banyak bukti yang menunjukkan bahwa genus *Padina* menyimpan keragaman spesies yang

lebih tinggi daripada yang diperkirakan berdasarkan karakter morfologi semata. Sejumlah penelitian filogenetik mengungkap adanya *cryptic diversity*, yaitu keberadaan garis keturunan yang berbeda secara genetik tetapi memiliki morfologi yang sangat mirip sehingga sulit dibedakan menggunakan pendekatan konvensional. Fenomena ini menyebabkan batas spesies (*species boundaries*) dalam genus *Padina* menjadi kurang jelas dan berpotensi menimbulkan kesalahan identifikasi serta bias dalam estimasi keanekaragaman hayati. Studi global berbasis marka molekuler juga menunjukkan bahwa beberapa kelompok *Padina* yang sebelumnya dianggap sebagai satu spesies ternyata terdiri atas beberapa garis keturunan evolusioner yang berbeda. Sementara itu, spesies lain yang memiliki kemiripan morfologi tinggi dapat dipisahkan secara tegas berdasarkan data genetik. Temuan tersebut menegaskan pentingnya penggunaan pendekatan molekuler untuk mengungkap keragaman tersembunyi dan memperjelas delimitasi spesies dalam genus *Padina* (Win et al., 2022; Pagana et al., 2023; Meneses-Mejía et al., 2025).

Pendekatan molekuler berbasis DNA *barcoding* menjadi metode yang semakin banyak digunakan dalam identifikasi organisme laut karena mampu memberikan resolusi genetik yang lebih tinggi dibandingkan karakter morfologi (Zou et al., 2021). Marka genetik yang umum digunakan pada makroalga meliputi ITS, *rbcL*, *tufA*, dan COI (AbouGabal et al., 2023). Gen ITS memiliki tingkat variasi tinggi sehingga efektif untuk membedakan spesies yang berkerabat dekat, sedangkan gen COI banyak digunakan sebagai *barcode* universal karena memiliki stabilitas evolusioner yang baik (Gabriel et al., 2024; Jin et al., 2020).

Penggunaan marka ITS pada makroalga memungkinkan identifikasi spesies *cryptic* dan analisis hubungan evolusioner yang lebih mendalam. ITS merupakan wilayah *non-coding* yang berada di antara gen ribosomal RNA dan sering mengalami mutasi sehingga cocok digunakan untuk studi variasi intra dan interspesifik (Kazly et al., 2023; Scorsim et al., 2024).

Sementara itu, gen COI mitokondria telah diakui sebagai salah satu marka DNA *barcode* paling efektif untuk organisme eukariotik karena memiliki tingkat konservasi primer yang tinggi, tetapi tetap mampu membedakan spesies secara akurat. Pada alga coklat, COI telah digunakan secara luas untuk mengevaluasi keragaman genetik dan filogenetik berbagai spesies *Padina* (Gabriel et al., 2024). Analisis filogenetik berbasis ITS dan COI juga penting dalam memahami hubungan evolusi antarspesies serta mendeteksi adanya spesies *cryptic* yang sulit dibedakan secara morfologi (Fontana et al., 2024; Preuss & Zuccarello, 2024).

Berdasarkan uraian tersebut, masih diperlukan kajian yang secara khusus menggabungkan penanda COI dan ITS untuk menganalisis hubungan filogenetik, mendeteksi keanekaragaman kriptik, dan menelaah delimitasi spesies pada genus *Padina*. Kebaruan penelitian ini terletak pada penggunaan dua marka molekuler, yaitu COI dan ITS, secara komparatif untuk mengevaluasi pola monofili, parafili, *barcoding gap*, serta diferensiasi genetik antarspesies *Padina* berdasarkan data sekuens dari GenBank. Pendekatan ini diharapkan dapat memberikan gambaran

yang lebih komprehensif mengenai batas spesies dan hubungan evolusioner dalam genus *Padina*.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis karakteristik molekuler dan hubungan filogenetik genus *Padina* menggunakan data ITS dan COI dari GenBank. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengevaluasi keberadaan keragaman kriptik dan menelaah batas spesies dalam genus *Padina* berdasarkan pendekatan filogenetik molekuler. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi genetik yang mendukung pengembangan DNA *barcoding* makroalga di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Sumber Data

Data penelitian terdiri atas dua berkas FASTA yang diunduh dari GenBank, yaitu 66 sekuens COI dan 25 sekuens ITS. Data tersebut selanjutnya digunakan sebagai dataset utama dalam seluruh rangkaian analisis bioinformatika.

Kurasi Data Sekuens

Sekuens dalam format FASTA diperiksa untuk memastikan tidak terdapat karakter ambigu berlebih, duplikasi data, maupun sekuens dengan panjang sangat pendek. Data kemudian dikelompokkan berdasarkan marka molekuler ITS dan COI.

Multiple Sequence Alignment

Penyelarasan (*alignment*) sekuens dilakukan menggunakan algoritma ClustalW pada perangkat lunak MEGA 12 untuk mengidentifikasi posisi homolog antarsekuens yang dianalisis.

Konstruksi Pohon Filogenetik

Hubungan filogenetik antarsekuens genus *Padina* berdasarkan marka ITS dan COI direkonstruksi menggunakan metode *Maximum Likelihood* (ML) yang diimplementasikan dalam perangkat lunak MEGA 12. Model substitusi nukleotida terbaik ditentukan berdasarkan nilai *Bayesian Information Criterion* (BIC). Hasil seleksi model menunjukkan bahwa dataset ITS paling sesuai dianalisis menggunakan model Kimura 2-parameter dengan *invariant sites* (K2+I), sedangkan dataset COI menggunakan model Hasegawa-Kishino-Yano dengan distribusi gamma dan *invariant sites* (HKY+G+I). *Gap* dan data yang hilang diperlakukan menggunakan metode *partial deletion* dengan batas cakupan situs (*site coverage cutoff*) sebesar 50%.

Uji *bootstrap* dilakukan sebanyak 1.000 replikasi untuk mengevaluasi tingkat kepercayaan topologi pohon filogenetik. Nilai *bootstrap* $\geq 70\%$ dianggap memiliki dukungan kuat. Sebagai pembandingan, rekonstruksi filogenetik tambahan juga dilakukan menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ).

Analisis Jarak Genetik

Jarak genetik berpasangan (*pairwise genetic distance*) antarsekuens ITS dan COI genus *Padina* dihitung menggunakan model *Maximum Composite Likelihood* (MCL) yang tersedia pada perangkat lunak MEGA 12. *Gap* dan data yang hilang diperlakukan menggunakan metode *partial deletion* dengan batas cakupan situs sebesar 50%.

Keandalan hubungan filogenetik yang dihasilkan dievaluasi melalui analisis *bootstrap* sebanyak 1.000 replikasi. Analisis ini digunakan untuk mengevaluasi tingkat divergensi genetik serta mendukung delimitasi spesies pada taksa yang dianalisis.

Analisis *Alignment* Sekuens dan Komposisi Nukleotida

Komposisi nukleotida dan kandungan GC dihitung menggunakan perangkat lunak MEGA 12. Penyelarasan sekuens dilakukan menggunakan algoritma ClustalW. Statistik *alignment* yang meliputi situs terkonservasi (*conserved sites*), situs variabel (*variable sites*), situs berinformasi parsimoni (*parsimony-informative sites*), dan situs *singleton* (*singleton sites*) diperoleh dari dataset *alignment* akhir.

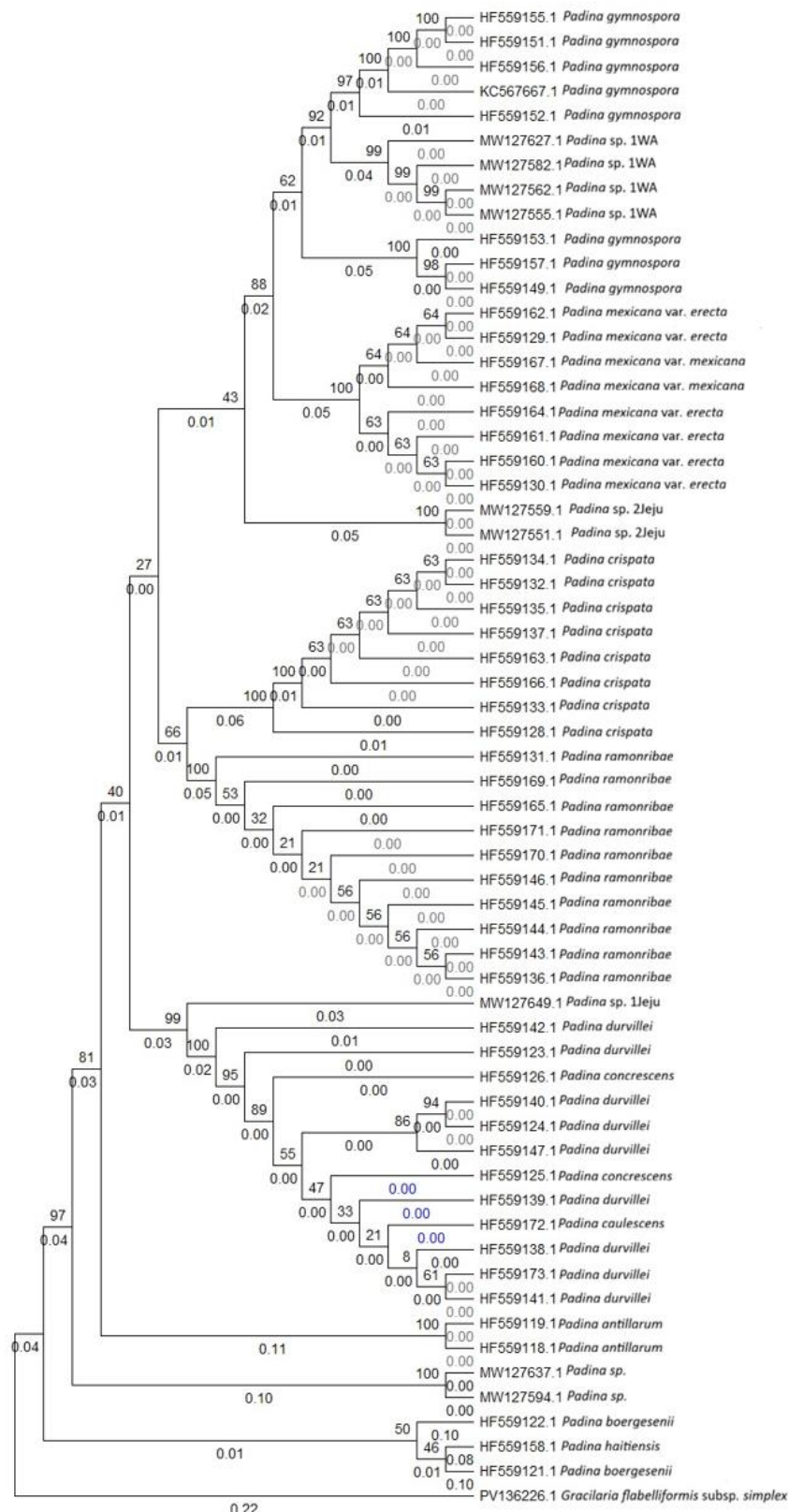
Situs terkonservasi didefinisikan sebagai posisi nukleotida yang identik pada seluruh sekuens, sedangkan situs variabel menunjukkan adanya perbedaan nukleotida antarsekuens. Selanjutnya, situs variabel dikategorikan menjadi situs berinformasi parsimoni dan situs *singleton* berdasarkan distribusi variasinya pada seluruh sekuens yang dianalisis.

HASIL PENELITIAN

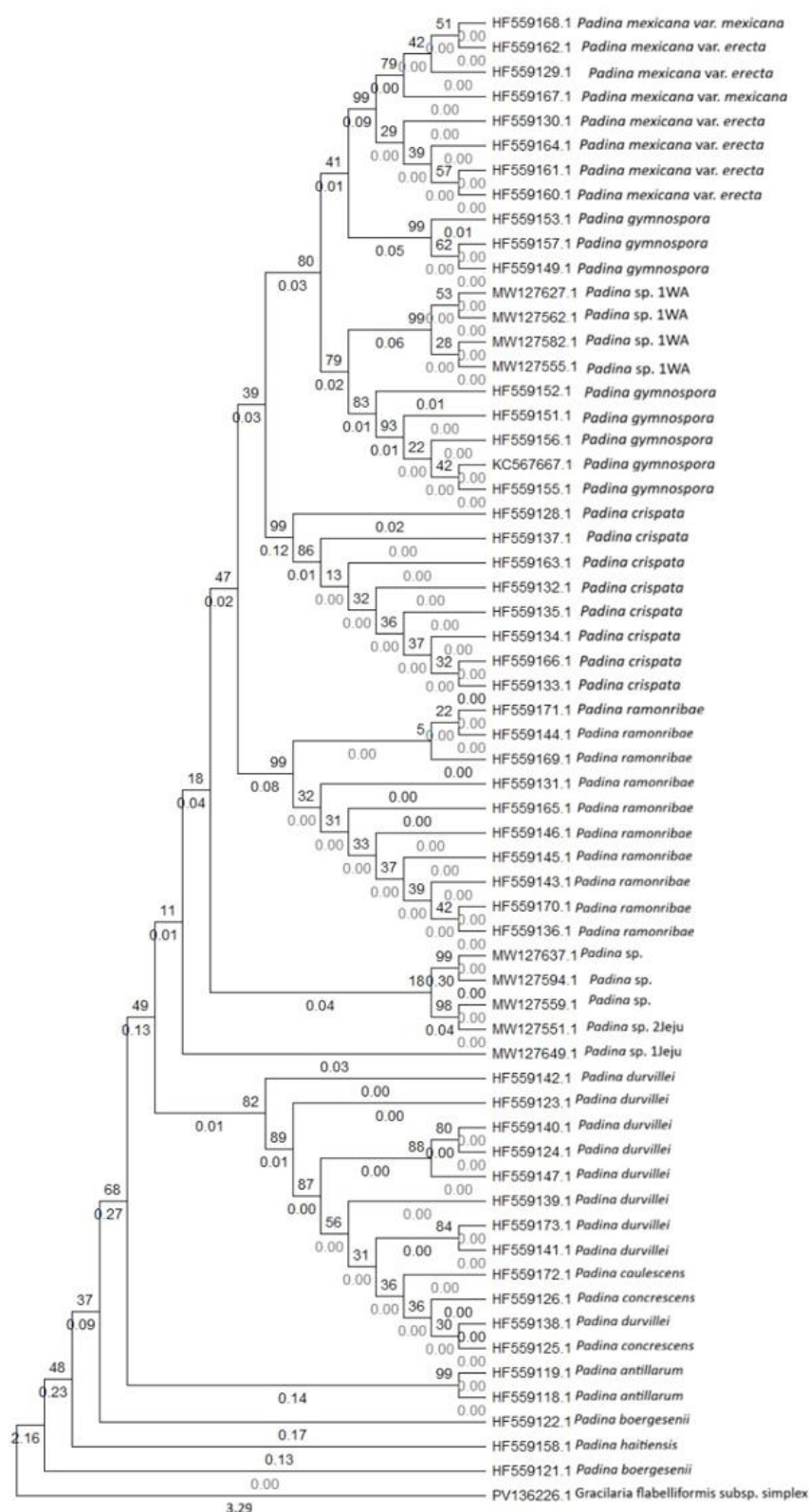
Analisis Filogenetik Sekuens COI

Analisis sekuens COI mencakup 61 OTU spesies *Padina* yang mewakili *P. mexicana* dengan beberapa varietas, *P. gymnospora*, *P. crispata*, *P. ramonribae*, *P. durvillei*, *P. concregens*, *P. antillarum*, *P. bergesenii*, dan *P. haitiensis*, dengan *Gracilaria flabelliformis* subsp. *simplex* sebagai *outgroup*. *Alignment* akhir setelah pemotongan ujung menghasilkan panjang sekitar 641 bp.

Topologi pohon yang diperoleh melalui metode *Neighbor-Joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML) secara umum konsisten dan menunjukkan pemisahan yang jelas antarspesies utama *Padina*. Dukungan nodal pada simpul-simpul kunci tergolong tinggi, dengan nilai *bootstrap* 70–100% pada kedua pendekatan. Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan dua metode independen, yaitu NJ berbasis jarak dan ML berbasis *likelihood*, merupakan pendekatan standar untuk memvalidasi topologi yang dihasilkan karena kedua metode memiliki asumsi dan sensitivitas berbeda terhadap sinyal filogenetik dalam data sekuens (Som, 2009; Tamura et al., 2021). Pohon filogenetik hasil analisis NJ dan ML disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Pohon Filogenetik Neighbor-Joining (NJ) Genus *Padina* Berdasarkan Sekuens COI (641 Bp) Menggunakan Model Kimura 2-Parameter. Nilai Bootstrap (1000 Kali Ulangan) Ditampilkan Pada Simpul. *Gracilaria Flabelliformis* Subsp. *Simplex* Digunakan Sebagai Outgroup.



Gambar 2. Pohon Filogenetik Maximum Likelihood (ML) Genus *Padina* Berdasarkan Sekuens COI (641 Bp). Nilai Bootstrap (1000 Kali Ulangan) Ditampilkan Pada Simpul. *Gracilaria Flabelliformis* Subsp. *Simplex* Digunakan Sebagai Outgroup.

Pada kedua pohon, sekuens *P. gymnospora* tidak membentuk satu klad monofiletik yang utuh, tetapi terpisah menjadi dua subklad yang dipisahkan oleh kelompok *Padina* sp. 1WA. Pada pohon ML, kedua subklad *P. gymnospora* didukung oleh nilai *bootstrap* yang tinggi, yaitu 99% dan 93%. Pada pohon NJ, subklad yang sama juga memperoleh dukungan kuat, yaitu 100% dan 97%, serta terpisah secara tegas dari *P. mexicana* dan *P. crispata*. Kompleks *P. mexicana* var. *erecta* dan var. *mexicana* terkonsolidasi dalam satu klad besar yang terpisah dari *P. gymnospora* dan *P. crispata* dengan dukungan NJ 100% dan ML 99%. Beberapa haplotipe var. *erecta* berkelompok bersama var. *mexicana*, yang menunjukkan adanya batas genetik yang tumpang tindih di dalam kompleks tersebut.

Padina crispata juga membentuk klad monofiletik dengan dukungan tinggi, yaitu NJ 100% dan ML 99%. Kelompok *P. ramonribae* membentuk klad tersendiri dengan dukungan tinggi, yaitu NJ/ML 99–100%, dan terpisah dari *P. crispata*. *Padina durvillei* konsisten membentuk klad monofiletik dengan dukungan NJ/ML 80–100% dan berkerabat dekat dengan *P. conrescens* serta *P. caulescens*. Beberapa subklad didukung nilai *bootstrap* 47–97%, yang mengindikasikan adanya variasi genetik intraspesifik.

Padina antillarum tampil sebagai klad terpisah dengan dukungan tinggi, yaitu NJ/ML 99–100%, dan bercabang lebih basal relatif terhadap kelompok *P. durvillei*–*conrescens*. Spesimen tak teridentifikasi (*Padina* sp.) dari 1WA dan 2Jeu masing-masing berkelompok pada klad rujukan *P. gymnospora* dan *P. crispata*, sehingga mendukung penentuan identitasnya. Kelompok *P. bergesenii* dan *P. haitiensis* juga muncul sebagai klad berbeda dengan dukungan tinggi ($\geq 95\%$) dan menempati posisi lebih basal terhadap kompleks *P. durvillei*. *Outgroup* *Gracilaria* berada pada cabang paling basal dan memisahkan genus *Padina* secara jelas dari taksa luar.

Secara keseluruhan, NJ dan ML menghasilkan struktur klad utama yang identik. Hasil tersebut menegaskan monofili *P. mexicana* termasuk varietasnya, *P. crispata*, *P. durvillei*, *P. antillarum*, *P. bergesenii*, dan *P. haitiensis*. Perbedaan kecil hanya muncul pada urutan percabangan beberapa subklad dalam kompleks *P. durvillei*–*conrescens* dan kelompok *P. ramonribae*, tanpa memengaruhi batas spesies.

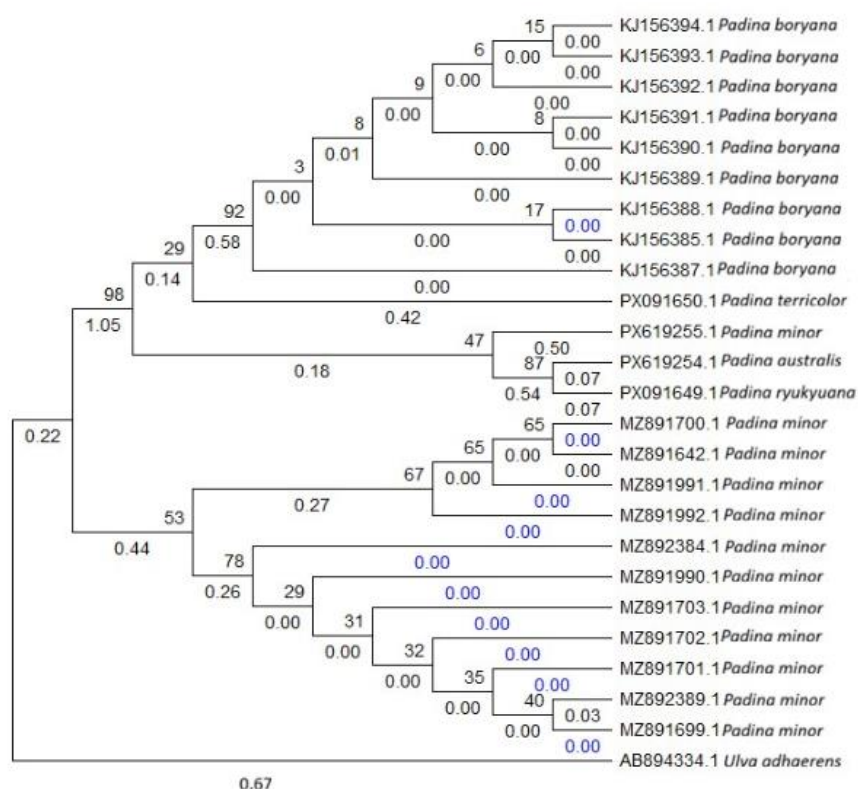
Karakteristik Sekuens ITS

Analisis marka ITS pada genus *Padina* melibatkan rangkaian sekuens rujukan yang mencakup *P. boryana*, *P. terricolor*, *P. australis*, *P. ryukyuana*, dan *P. minor*, dengan *Ulva adhaerens* sebagai *outgroup*. *Alignment* akhir setelah pemangkasan menghasilkan matriks sepanjang sekitar 385 bp.

Analisis Filogenetik Sekuens ITS

Topologi yang direkonstruksi menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML) menunjukkan pola yang secara umum konsisten, ditandai dengan pemisahan jelas antarspesies utama. Dukungan nodal pada simpul

kunci berada pada kisaran sedang hingga tinggi, dengan nilai *bootstrap* NJ 53–98% dan ML 71–100% pada klad utama. Penggunaan metode NJ dan ML secara bersamaan memungkinkan evaluasi konsistensi topologi dan identifikasi simpul-simpul yang didukung secara kuat oleh kedua pendekatan, sekaligus mengungkap area ketidakpastian filogenetik yang memerlukan investigasi lebih lanjut (Som, 2009b). Pohon filogenetik hasil analisis *Neighbor-Joining* (NJ) pada marka ITS digunakan untuk melihat pola pengelompokan antarsekuens genus *Padina* berdasarkan pendekatan berbasis jarak. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik NJ disajikan pada Gambar 3 berikut.

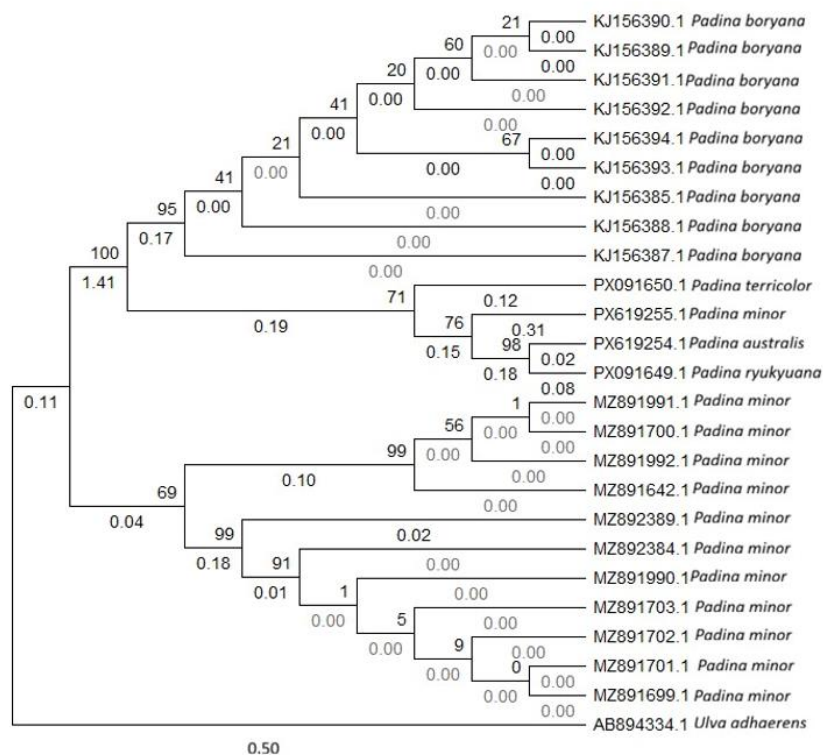


Gambar 3. Pohon Filogenetik Neighbor-Joining (NJ) Genus *Padina* Berdasarkan Sekuens ITS (385 Bp) Menggunakan Model Kimura 2-Parameter. Nilai Bootstrap (1000 Kali Ulangan) Ditampilkan Pada Simpul. *Ulva Adhaerens* Digunakan Sebagai Outgroup.

Berdasarkan Gambar 3, pohon filogenetik NJ menunjukkan adanya pemisahan antartaksa utama dalam genus *Padina*. *Padina boryana* membentuk klad monofiletik dengan dukungan *bootstrap* sebesar 92%, sedangkan *P. minor* membentuk klad tersendiri dengan dukungan *bootstrap* sebesar 53%. Selain itu, *P. terricolor*, *P. australis*, dan *P. ryukyuana* menempati posisi percabangan yang terpisah dari klad utama lainnya. Posisi *Ulva adhaerens* sebagai *outgroup* berada pada cabang paling basal dan memisahkan secara jelas genus *Padina* dari taksa luar.

Pohon filogenetik hasil analisis *Maximum Likelihood* (ML) pada marka ITS

digunakan sebagai pembandingan untuk mengevaluasi konsistensi topologi yang diperoleh dari metode NJ. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik ML disajikan pada Gambar 4 berikut.



Gambar 4. Pohon Filogenetik Maximum Likelihood (ML) Genus *Padina* Berdasarkan Sekuens ITS (385 Bp). Nilai Bootstrap (1000 Kali Ulangan) Ditampilkan Pada Simpul. *Ulva adhaerens* Digunakan Sebagai Outgroup.

Berdasarkan Gambar 4, pohon filogenetik ML memperlihatkan pola pengelompokan yang secara umum konsisten dengan pohon NJ. *Padina boryana* tetap membentuk klad monofiletik dengan dukungan *bootstrap* sebesar 95%, sedangkan *P. minor* membentuk klad yang mencakup sebagian besar spesimen uji dan sekuens rujukan dengan dukungan *bootstrap* sebesar 69%. Posisi *P. terricolor* sebagai taksa yang berkerabat dekat dengan *P. boryana* memperoleh dukungan *bootstrap* ML yang tinggi, yaitu 100%. Hasil ini menunjukkan bahwa metode ML memperkuat pola hubungan filogenetik utama yang diperoleh dari metode NJ, meskipun terdapat perbedaan kecil pada dukungan percabangan internal.

Padina boryana membentuk klad monofiletik kuat yang mencakup beberapa aksesori rujukan dengan nilai *bootstrap* NJ 92% dan ML 95%, serta terpisah tegas dari taksa lain. *Padina terricolor* menempati posisi *sister* terhadap klad *P. boryana* dengan dukungan NJ 29% dan ML 100%. Hasil ini menunjukkan adanya kedekatan kekerabatan, tetapi keduanya tetap terpisah sebagai unit takson. Cabang *P. australis* dan *P. ryukyuana* muncul berurutan di luar kelompok *P.*

boryana-terricolor dengan dukungan tinggi, yaitu NJ 98% dan ML 100%.

Padina minor membentuk satu klad yang mencakup sebagian besar spesimen uji dan sekuens rujukan pada kedua metode analisis. Klad ini didukung oleh nilai *bootstrap* sebesar 53% pada pohon NJ dan 69% pada pohon ML. Di dalam klad *P. minor*, beberapa subklad dengan nilai *bootstrap* 56–99% menunjukkan struktur intraspesifik yang jelas. Kondisi tersebut mencerminkan adanya keberagaman haplotipe atau garis keturunan regional.

Perbandingan metode NJ dan ML memperlihatkan kesesuaian monofili untuk *P. boryana* dan *P. minor*, serta penempatan *P. terricolor*, *P. australis*, dan *P. ryukyuana* sebagai garis saudara berurutan. Perbedaan kecil hanya tampak pada urutan percabangan subklad internal dalam *P. minor*, tanpa memengaruhi batas spesies. *Outgroup Ulva adhaerens* selalu berada pada cabang paling basal dan memisahkan genus *Padina* secara jelas dari taksa luar.

Analisis Jarak Genetik Berpasangan (*Pairwise Distance*) Marka COI dan ITS

Analisis jarak genetik berpasangan (*pairwise distance*) berbasis marka COI dan ITS pada genus *Padina* menunjukkan pemisahan antartaksa yang tegas dan konsisten. Pada marka COI yang melibatkan 61 sekuens, 641 posisi teranalisis, dan model *Maximum Composite Likelihood*, jarak antarspesies *Padina* berada pada kisaran 0,000–0,281, dengan nilai tertinggi antara *Padina* dan *outgroup Gracilaria* sebesar 0,358–0,431. Jarak intraspesies umumnya rendah, yaitu *P. gymnospora* 0,000–0,081, *P. mexicana* 0,000–0,002, *P. crispata* 0,000–0,024, *P. durvillei* 0,000–0,148, *P. ramonribae* 0,000–0,003, *P. conrescens* 0,002, dan *P. antillarum* 0,000. Kelompok *P. bergeseni* menunjukkan nilai yang lebih besar, yaitu 0,214.

Jarak antarspesies kunci menegaskan adanya *barcoding gap*. Jarak *P. gymnospora* terhadap *P. mexicana* berada pada kisaran 0,091–0,102; *P. gymnospora* terhadap *P. crispata* sebesar 0,135–0,156; *P. mexicana* terhadap *P. crispata* sebesar 0,161–0,165; *P. durvillei* terhadap *P. conrescens* sebesar 0,005–0,006; serta *P. ramonribae* terhadap *P. crispata* sebesar 0,128–0,130. Spesimen *Padina* sp. (MW127627, MW127562, MW127582, MW127555) menunjukkan jarak genetik sebesar 0,064–0,103 terhadap klad rujukan terdekat, yaitu *P. durvillei*. Sementara itu, spesimen *Padina* sp. (MW127637, MW127594, MW127559, MW127551, MW127694) memiliki jarak genetik sebesar 0,053–0,215 terhadap klad rujukan *P. gymnospora*. Nilai jarak tersebut mendukung penempatan taksonomi kedua kelompok spesimen pada klad yang berkerabat dekat dengan masing-masing spesies rujukan, sekaligus menunjukkan adanya diferensiasi genetik yang cukup untuk mempertahankan identitas filogenetiknya.

Pada marka ITS yang melibatkan 25 sekuens dan 377 posisi teranalisis, rentang jarak antarkelompok lebih lebar dibandingkan intrakelompok, sehingga menegaskan daya pisah yang tinggi. Di dalam spesies, *P. minor* menunjukkan jarak 0,000–2,691, sedangkan *P. boryana* menunjukkan jarak 0,000–0,022. Antarspesies utama, jarak *P. minor* terhadap *P. boryana*, *P. australis*, *P. terricolor*, dan *P.*

ryukyuana masing-masing berada pada kisaran 2,405–2,491; 2,518–2,536; 2,538–2,549; dan 2,417–2,447. Nilai *pairwise distance* paling rendah antarspesies tercatat antara *P. australis* dan *P. ryukyuana* sebesar 0,136 serta antaraksesi *P. boryana* sebesar 0,004–0,022. Sementara itu, jarak *P. boryana* terhadap *P. terricolor* berada pada kisaran 0,981–1,026. *Outgroup Ulva adhaerens* memperlihatkan jarak sangat tinggi terhadap seluruh *Padina*, yaitu 1,495–2,680, sehingga memisahkan taksa luar secara jelas dari genus *Padina*.

Analisis *Alignment* Sekuens dan Komposisi Nukleotida

Karakterisasi variabilitas nukleotida menunjukkan bahwa dua penanda yang digunakan bersifat komplementer dan memadai untuk resolusi spesies *Padina*. Pada ITS, dari 385 posisi yang dianalisis, hanya 19 situs yang terkonservasi (*conserved sites*) atau sebesar 4,9%, sedangkan 365 situs bersifat variabel (*variable sites*) atau sebesar 94,8%. Di dalamnya terdapat 319 situs berinformasi parsimoni (*parsimony-informative sites*) atau sebesar 82,9% dari total situs dan 87,4% dari situs variabel, serta 46 situs *singleton* atau sebesar 11,9%. Proporsi situs informatif yang sangat tinggi ini menegaskan daya pisah ITS dalam membedakan taksa yang berkerabat dekat serta merekonstruksi hubungan intraspesifik.

Sebaliknya, pada COI yang mencakup 641 posisi, terdapat 364 situs terkonservasi atau sebesar 56,8% dan 277 situs variabel atau sebesar 43,2%. Dari jumlah tersebut, 224 situs merupakan situs berinformasi parsimoni atau sebesar 34,9% dari total situs dan 80,9% dari situs variabel, sedangkan 53 situs merupakan situs *singleton* atau sebesar 8,3%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa COI memiliki proporsi situs terkonservasi yang lebih tinggi dibandingkan ITS, tetapi tetap menyediakan variasi yang cukup untuk mendukung identifikasi spesies dan analisis DNA *barcoding* pada genus *Padina*.

PEMBAHASAN

Validasi Marka Molekuler COI dan ITS sebagai Barcode DNA untuk Genus *Padina*

Penggunaan dua marka molekuler yang berbeda, yaitu COI mitokondria dan ITS nukleus, terbukti memberikan resolusi taksonomi yang saling melengkapi dalam penelitian ini. Marka COI dengan panjang *alignment* sekitar 641 bp menghasilkan 43,2% situs variabel dan 34,9% situs berinformasi parsimoni, sedangkan ITS dengan panjang sekitar 385 bp menunjukkan proporsi situs variabel yang jauh lebih tinggi, yaitu 94,8%, dengan 82,9% situs berinformasi parsimoni. Komplementaritas ini sejalan dengan prinsip dasar DNA *barcoding* bahwa marka yang ideal harus memiliki variabilitas antarspesies yang cukup untuk membedakan taksa, tetapi tetap terkonservasi dalam spesies (Emerson, 2025).

Pada alga coklat, keunggulan COI sebagai marka *barcode* utama telah diakui secara luas karena kemampuannya memisahkan spesies secara tegas melalui *barcoding gap* yang jelas. Penelitian pada *Padina* dan kerabatnya dari Ordo

Dictyotales menunjukkan bahwa kombinasi marka mitokondria dan nukleus mampu mengungkap keanekaragaman tersembunyi sekaligus menegaskan batas spesies yang sebelumnya ambigu secara morfologi (Silberfeld et al., 2013, dikutip dalam Huynh Thi et al., 2024). Tingginya proporsi situs informatif ITS, yaitu 87,4% dari situs variabel, menjadikannya efektif untuk resolusi intraspesifik dan hubungan spesies berkerabat dekat, meskipun potensi saturasi pada jarak filogenetik yang lebih jauh perlu diperhatikan. Pendekatan dua marka ini terbukti efektif dalam mengungkap keanekaragaman kriptik (*cryptic diversity*) pada alga coklat, karena spesies yang secara morfologi identik dapat dibedakan secara tegas melalui sekuens DNA (Rushdi et al., 2021).

Konsistensi Topologi antara Metode *Neighbor-Joining* dan *Maximum Likelihood*

Konsistensi topologi antara pohon *Neighbor-Joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML) pada kedua marka merupakan indikator penting dalam menilai keandalan rekonstruksi filogenetik. Pada marka COI, struktur klad utama yang identik antara NJ dan ML, dengan nilai *bootstrap* 70–100% pada simpul-simpul kunci, menegaskan bahwa sinyal filogenetik yang terkandung dalam data bersifat kuat dan tidak sensitif terhadap pemilihan metode rekonstruksi. Hal ini sesuai dengan pandangan umum dalam filogenetik molekuler bahwa kongruensi antara dua atau lebih metode independen merupakan kriteria validasi topologi yang dapat dipercaya (Zou et al., 2024).

Perbedaan kecil yang hanya muncul pada percabangan subklad internal dalam kompleks *P. durvillei–concrescens* dan kelompok *P. ramonribae*, tanpa memengaruhi batas spesies, merupakan pola yang umum ditemukan pada analisis multi-metode. Perbedaan tersebut umumnya mencerminkan sensitivitas yang berbeda antara metode berbasis jarak seperti NJ dan metode berbasis *likelihood* seperti ML terhadap artefak, misalnya *long-branch attraction*, dan bukan menunjukkan konflik mendasar dalam interpretasi hubungan antarspesies (Bringloe et al., 2020; Zou et al., 2024).

Status Monofiletik dan Delimitasi Spesies *Padina*

Analisis filogenetik berhasil menegaskan monofili sebagian besar spesies *Padina* yang diuji, termasuk *P. mexicana*, *P. crispata*, *P. durvillei*, *P. antillarum*, *P. bergesenii*, *P. haitiensis*, *P. boryana*, dan *P. minor*, dengan dukungan *bootstrap* yang tinggi pada kedua metode. Temuan ini konsisten dengan kajian global *Padina* oleh Silberfeld et al. (2013, dikutip dalam Huynh Thi et al., 2024) yang menetapkan dasar delimitasi spesies berbasis molekuler untuk genus ini, serta studi terbaru yang mengonfirmasi keandalan pendekatan multi-marka dalam merekonstruksi batas spesies alga coklat tropis (Huynh Thi et al., 2024).

Kasus paling menarik ditemukan pada *P. gymnospora* yang pada kedua pohon, baik NJ maupun ML, tidak membentuk satu klad monofiletik tunggal, tetapi

terbagi menjadi dua subklad yang diselingi oleh *Padina* sp. 1WA. Meskipun masing-masing subklad memperoleh dukungan *bootstrap* tinggi, yaitu ML 99% dan 93%, serta NJ 100% dan 97%, kondisi parafiletik ini mengisyaratkan dua kemungkinan. Pertama, *P. gymnospora* merupakan kompleks spesies yang memerlukan revisi taksonomi. Kedua, spesimen *Padina* sp. 1WA kemungkinan merupakan anggota *P. gymnospora* yang belum terdeskripsikan secara formal. Temuan ini sejalan dengan sejumlah penelitian yang menunjukkan kompleksitas taksonomi dalam genus *Padina*, yaitu pendekatan molekuler sering kali mengungkap keragaman genetik yang tidak sepenuhnya tercermin oleh karakter morfologi (Meneses-Mejía et al., 2025; Pagana et al., 2023).

Fenomena parafileti pada *Padina gymnospora* menunjukkan bahwa batas spesies dalam genus *Padina* tidak selalu dapat dijelaskan melalui karakter morfologi semata. Temuan ini memperkuat pentingnya pendekatan molekuler untuk mengungkap keberadaan keanekaragaman kriptik (*cryptic diversity*) yang tersembunyi di balik kemiripan morfologi. Studi terbaru di kawasan Mediterania menunjukkan bahwa revisi taksonomi berbasis data molekuler berhasil mengidentifikasi beberapa spesies *Padina*, termasuk *P. pavonica*, *P. pavonicoides*, *P. ditristomatica*, *P. tetrastrumatica*, dan *P. gymnospora*, yang sebelumnya sulit dibedakan secara morfologis. Hasil tersebut menunjukkan bahwa analisis filogenetik berbasis penanda DNA merupakan pendekatan penting untuk mengklarifikasi hubungan kekerabatan dan mendeteksi spesies kriptik dalam genus *Padina* (Pagana et al., 2023).

Kompleks *P. mexicana* var. *erecta* dan var. *mexicana* yang terkonsolidasi dalam satu klad besar dengan batas genetik yang tumpang tindih, yaitu jarak intraspesies COI sebesar 0,000–0,002, menunjukkan bahwa kedua varietas tersebut kemungkinan belum memiliki pemisahan genetik yang cukup untuk dipertahankan sebagai entitas taksonomi yang berbeda. Fenomena ini selaras dengan temuan global mengenai tingginya plastisitas morfologi pada genus *Padina* yang sering kali tidak berkorelasi dengan perbedaan genetik yang signifikan (Silberfeld et al., 2013, dikutip dalam Huynh Thi et al., 2024).

Analisis *Barcoding Gap* dan Jarak Genetik Berpasangan (*Pairwise Distance*) Marka COI

Terbuktinya *barcoding gap* yang jelas pada marka COI merupakan temuan penting dalam penelitian ini. Jarak intraspesies pada sebagian besar takson berada jauh di bawah jarak antarspesies, seperti *P. mexicana* sebesar 0,000–0,002 dibandingkan dengan jarak *P. mexicana* terhadap *P. crispata* sebesar 0,161–0,165. Demikian pula, jarak intraspesies *P. gymnospora* sebesar 0,000–0,081 lebih rendah dibandingkan jaraknya terhadap *P. mexicana*, yaitu 0,091–0,102. Kisaran nilai tersebut secara konsisten memenuhi kriteria *barcoding gap* sebagai syarat utama efektivitas COI sebagai marka identifikasi spesies, yaitu jarak intraspesies yang lebih kecil dibandingkan jarak antarspesies (Emerson, 2025).

Namun, terdapat dua kasus yang memerlukan perhatian khusus. Pertama, *P. bergesenii* menunjukkan jarak intraspesies yang sangat tinggi, yaitu 0,214, yang melampaui jarak antarspesies pada beberapa pasangan takson lainnya. Nilai ini mengindikasikan adanya struktur populasi yang kuat atau kemungkinan keberadaan spesies kriptik di dalam kelompok tersebut. Kedua, jarak antara *P. durvillei* dan *P. conrescens* yang sangat kecil, yaitu 0,005–0,006, memunculkan pertanyaan mengenai validitas keduanya sebagai spesies yang terpisah secara genetik. Oleh karena itu, kajian integratif yang menggabungkan karakter morfologi, ekologi, dan marka tambahan sangat diperlukan untuk mengklarifikasi status taksonomi pasangan tersebut.

Studi terbaru pada alga coklat dari Teluk Meksiko juga menunjukkan bahwa jarak genetik COI yang tumpang tindih antara spesies berkerabat dekat dalam Dictyotales merupakan tantangan umum dan memerlukan pendekatan multi-marka untuk memperoleh resolusi yang akurat (Camacho & Fredericq, 2025). Keberadaan *barcoding gap* yang jelas pada marka COI menegaskan efektivitas pendekatan ini dalam menetapkan batas spesies (*species boundaries*) secara objektif, khususnya pada taksa dengan plastisitas morfologi tinggi seperti genus *Padina* yang diketahui mencakup banyak spesies tervalidasi secara molekuler di kawasan Indo-Pasifik (Win et al., 2022).

Keberagaman Genetik Intraspesifik dan Struktur Haplotipe

Variasi genetik intraspesifik yang ditemukan pada beberapa spesies, terutama *P. durvillei* dengan nilai COI 0,000–0,148, *P. minor* dengan nilai ITS 0,000–2,691, dan subklad-subklad dalam klad *P. minor* dengan nilai *bootstrap* 56–99%, mencerminkan adanya struktur haplotipe atau garis keturunan regional yang bermakna secara biogeografis. Keberagaman intraspesifik seperti ini pada alga laut tropis umumnya berkaitan dengan pemisahan populasi akibat penghalang geografis, perbedaan habitat, atau sejarah kolonisasi yang kompleks.

Pada *P. durvillei*, jarak intraspesies COI yang mencapai 0,148 jauh melampaui nilai tipikal untuk spesies tunggal dan mengarah pada kemungkinan adanya struktur populasi yang tersegmentasi secara geografis. Studi global keanekaragaman *Padina* berbasis data molekuler menunjukkan bahwa genus ini kerap menyimpan keanekaragaman yang tidak terduga, termasuk spesies baru, di balik fenotipe yang secara morfologi tampak seragam (Meneses-Mejía et al., 2025). Temuan ini menegaskan perlunya eksplorasi lebih lanjut terhadap populasi *P. durvillei* dari berbagai lokasi geografis yang berbeda untuk mengevaluasi apakah variasi intraspesifik yang tinggi mencerminkan keberadaan spesies kriptik. Struktur haplotipe yang kompleks ini memperkuat urgensi penggunaan data sekuens ITS dan COI secara komplementer untuk mengungkap batas spesies yang sesungguhnya dalam genus *Padina*.

Posisi Filogenetik Spesimen Tak Teridentifikasi dan Implikasi Identifikasi Molekuler

Analisis filogenetik molekuler mengungkapkan bahwa spesimen *Padina* sp. dalam penelitian ini terkelompok menjadi dua klaster genetik yang berbeda secara taksonomi. Klaster pertama, yang terdiri atas spesimen MW127627, MW127562, MW127582, dan MW127555, menunjukkan jarak genetik sebesar 0,064–0,103 terhadap klad rujukan terdekat, yaitu *Padina durvillei*. Sementara itu, klaster kedua yang mencakup spesimen MW127637, MW127594, MW127559, MW127551, dan MW127694 memperlihatkan jarak genetik sebesar 0,053–0,215 terhadap klad rujukan *Padina gymnospora*. Nilai jarak genetik tersebut mendukung penempatan taksonomi kedua kelompok spesimen pada klad yang berkerabat dekat dengan masing-masing spesies rujukan, sekaligus mengindikasikan adanya diferensiasi genetik yang memadai untuk mempertahankan identitas filogenetiknya secara distingtif.

Besaran jarak genetik yang terdeteksi melampaui ambang batas variasi intraspesifik yang umum dilaporkan untuk genus *Padina*. Kajian filogenetik pada *Padina* dari kawasan Indo-Pasifik melaporkan bahwa variasi intraspesifik umumnya berkisar antara 0–0,9% untuk gen *rbcL* dan 0–3,2% untuk gen *cox3* (Win et al., 2022). Berdasarkan acuan tersebut, jarak genetik 5,3–21,5% dan 6,4–10,3% yang teramati pada spesimen penelitian ini mengindikasikan kemungkinan status taksonomi yang berbeda dari spesies rujukan yang digunakan.

Signifikansi pendekatan molekuler ini menjadi semakin relevan mengingat kompleksitas identifikasi morfologi pada genus *Padina* yang dikenal memiliki plastisitas fenotipik tinggi. Investigasi terkini yang mengintegrasikan pendekatan morfologi dan molekuler di Vietnam menunjukkan bahwa kombinasi kedua metode tersebut efektif untuk mengidentifikasi spesimen yang sulit ditentukan berdasarkan karakter morfologi semata, terutama ketika material koleksi tidak berada dalam kondisi reproduktif (Huynh Thi et al., 2024). Keberhasilan identifikasi molekuler spesimen lapangan dalam penelitian ini menegaskan keunggulan pendekatan DNA *barcoding* dalam mengungkap keanekaragaman kriptik (*cryptic diversity*), khususnya ketika karakter morfologi diagnostik tidak tersedia atau bersifat ambigu.

Posisi Filogenetik Relatif Antarspesies dan Implikasi Biogeografis

Posisi *P. antillarum* sebagai klad yang bercabang lebih basal relatif terhadap kompleks *P. durvillei–concrescens*, serta posisi *P. bergesenii*, *P. boryana*, dan *P. haitiensis* yang menempati posisi lebih basal dari kompleks *P. durvillei*, memberikan gambaran tentang urutan divergensi filogenetik dalam genus ini. Pola percabangan basal tersebut konsisten dengan hipotesis bahwa beberapa spesies dengan distribusi Atlantik, seperti *P. antillarum* dan *P. haitiensis*, merupakan garis keturunan yang lebih tua dan telah lama terisolasi secara geografis dari spesies Indo-Pasifik (Win et al., 2022).

Kajian biogeografi global genus *Padina* menunjukkan bahwa pusat keanekaragaman genus ini berada di kawasan Indo-Pasifik tropis, dengan penyebaran sekunder ke Atlantik dan Mediterania melalui peristiwa dispersal historis (Silberfeld et al., 2013, dikutip dalam Huynh Thi et al., 2024).

Analisis *Alignment* Sekuens dan Komposisi Nukleotida

Perbandingan komposisi nukleotida antara ITS dan COI mengungkapkan perbedaan mendasar dalam karakter informatif kedua marka. ITS dengan hanya 4,9% situs terkonservasi dan 82,9% situs berinformasi parsimoni berfungsi sebagai marka dengan resolusi intraspesifik dan interspesifik yang sangat tinggi. Namun, potensi saturasi pada tingkat divergensi yang besar, seperti nilai jarak ITS *P. minor* terhadap spesies lain yang mencapai lebih dari 2,4, perlu dievaluasi secara hati-hati. Di sisi lain, COI dengan 56,8% situs terkonservasi memberikan sinyal filogenetik yang lebih stabil untuk merekonstruksi hubungan antarspesies yang lebih jauh.

Pola komplementaritas tersebut sesuai dengan prinsip seleksi marka dalam filogenetik molekuler modern, yaitu marka dengan laju evolusi berbeda memberikan informasi yang relevan pada tingkatan taksonomi yang berbeda pula. Dalam konteks alga, studi terbaru bahkan menunjukkan bahwa penggunaan seluruh genom organel dapat mengungkap diskordansi antargen yang tidak terdeteksi oleh satu marka tunggal, sehingga menegaskan pentingnya pendekatan multi-marka (Verbruggen et al., 2025). Secara keseluruhan, komplementaritas marka ITS dan COI dalam penelitian ini berhasil mengungkap keanekaragaman kriptik dan menetapkan batas spesies (*species boundaries*) yang lebih akurat pada genus *Padina*. Temuan ini mendukung paradigma bahwa pendekatan multi-marka merupakan standar penting dalam taksonomi molekuler alga coklat kontemporer. Studi terbaru pada *Padina pavonica* juga menunjukkan bahwa ekstrak alga ini memiliki potensi farmakologis yang signifikan, sehingga delimitasi spesies yang akurat menjadi penting untuk mendukung aplikasi bioteknologi (Mesripour et al., 2025).

SIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi marka mitokondria *cytochrome c oxidase subunit I* (COI) dan marka nuklir *internal transcribed spacer* (ITS) merupakan pendekatan yang efektif untuk delimitasi spesies dan rekonstruksi filogenetik dalam genus *Padina*. Analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML) menghasilkan topologi yang konsisten, sehingga mengonfirmasi keandalan hubungan evolusioner yang diinferensikan serta mendukung monofili sebagian besar spesies yang dianalisis, yaitu *P. mexicana*, *P. crispata*, *P. durvillei*, *P. antillarum*, *P. bergesenii*, *P. haitiensis*, *P. boryana*, dan *P. minor*. Marka COI menunjukkan adanya *barcoding gap* yang jelas, ditandai oleh jarak genetik intraspesifik yang secara konsisten lebih rendah dibandingkan jarak genetik interspesifik, sehingga menegaskan

kesesuaiannya sebagai DNA *barcode* untuk identifikasi spesies. Sementara itu, marka ITS memiliki tingkat variasi nukleotida yang lebih tinggi serta proporsi situs berinformasi parsimoni yang lebih besar, sehingga memberikan resolusi yang lebih baik dalam mendeteksi keragaman intraspesifik dan hubungan kekerabatan antartaksa yang berkerabat dekat.

Karakteristik yang saling melengkapi dari kedua marka tersebut memungkinkan pengungkapan pola filogenetik yang tidak dapat diselesaikan hanya berdasarkan karakter morfologi. Hal ini mencakup posisi parafiletik *P. gymnospora*, tingginya divergensi genetik intraspesifik pada *P. bergesenii*, *P. durvillei*, dan *P. minor*, serta posisi filogenetik yang berbeda pada beberapa spesimen *Padina* yang belum teridentifikasi. Temuan tersebut mengindikasikan adanya keanekaragaman kriptik dalam genus *Padina*. Selain itu, rendahnya diferensiasi genetik antara *P. durvillei* dan *P. conrescens* serta tumpang tindih batas genetik dalam kompleks *P. mexicana* menunjukkan bahwa beberapa entitas taksonomi yang saat ini diakui masih memerlukan kajian ulang melalui pendekatan integratif yang menggabungkan bukti molekuler, morfologi, dan ekologi.

Secara keseluruhan, integrasi marka COI dan ITS mampu meningkatkan resolusi delimitasi spesies, mengungkap keragaman genetik tersembunyi, serta memperdalam pemahaman mengenai hubungan evolusioner dalam genus *Padina*. Hasil penelitian ini memberikan landasan molekuler yang penting bagi pengembangan studi taksonomi, biogeografi, dan keanekaragaman hayati makroalga coklat tropis pada masa mendatang.

DAFTAR PUSTAKA

- AbouGabal, A. A., A.-E., M. A., Aboul-Ela, H. M., Khaled, A. A., Aly, H. M., Abdullah, M. I., & Shalaby, O. K. (2023). DNA barcoding of marine macroalgae as bioindicators of heavy metal pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 189, 114761. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114761>
- Bringloe, T. T., Starko, S., Wade, R. M., Vieira, C., Kawai, H., De Clerck, O., Cock, J. M., Coelho, S. M., Destombe, C., Valero, M., Neiva, J., Pearson, G. A., Faugeron, S., Serrão, E. A., & Verbruggen, H. (2020). Phylogeny and evolution of the brown algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39(4), 281–321. <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1787679>
- Camacho, O., & Fredericq, S. (2025). Diversity of brown macroalgae (Phaeophyceae) emerging from deepwater rhodoliths collected in the Gulf of Mexico. *Diversity*, 17(12), 860. <https://doi.org/10.3390/d17120860>
- Emerson, B. C. (2025). Delimiting species: Prospects and challenges for DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 34(5), e17677. <https://doi.org/10.1111/mec.17677>
- Fontana, S., Wang, W.-L., Tseng, K.-Y., Draisma, S. G. A., Dumilag, R. V., Hu, Z.-M., Li, J.-J., Lai, P.-H., Mattio, L., Sherwood, A. R., Boo, S. M., & Liu, S.-L. (2024). Seaweed diversification driven by Taiwan's emergence and

- the Kuroshio Current: Insights from the cryptic diversity and phylogeography of *Dichotomaria* (Galaxauraceae, Rhodophyta). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 12, 1346199. <https://doi.org/10.3389/fevo.2024.1346199>
- Gabriel, D., Schmidt, W. E., Micael, J., Moura, M., & Fredericq, S. (2024). DNA barcode-assisted inventory of the marine macroalgae from the Azores, including new records. *Phycology*, 4(1), 65–86. <https://doi.org/10.3390/phycology4010004>
- Huynh Thi, T. H., Vu, D. P., Nguyen Thi, B. N., Nguyen Thi, T. X., Do Thi, T. T., Dam, D. T., & Thanh, L. T. (2024). Combining morphological and molecular data to identify *Padina* seaweed samples collected from Hon Thom, Phu Quoc in Vietnam. *Academia Journal of Biology*, 46(2). <https://doi.org/10.15625/2615-9023/20583>
- Jin, S., Kim, K. Y., Kim, M.-S., & Park, C. (2020). An assessment of the taxonomic reliability of DNA barcode sequences in publicly available databases. *Algae*, 35(3), 293–301. <https://doi.org/10.4490/algae.2020.35.9.4>
- Kezlya, E., Tseplik, N., & Kulikovskiy, M. (2023). Genetic markers for metabarcoding of freshwater microalgae: Review. *Biology*, 12(7), 1038. <https://doi.org/10.3390/biology12071038>
- Meneses-Mejía, D. K., Díaz-Martínez, S., Hernández-Anaya, L., García-Vázquez, U. O., & Avila-Ortiz, A. G. (2025). Molecular and morphological examination of bistratose *Padina* (Dictyotaceae, Phaeophyceae) on the coasts of Yucatan Peninsula and Cozumel Island, Mexico, reveals two new species. *SSRN*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.5187457>
- Mesripour, A., Asgari, N., & Yegdaneh, A. (2025). The brown alga *Padina pavonica* methanol and hexane partitions prevented depressive behavior induced by dexamethasone in mice. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 20(2), 241–249. https://doi.org/10.4103/RPS.RPS_3_24
- Nguyen, L. M., Akita, S., Cao, L. V., Nguyen, A. T. M., Pham, Q. V., Vu, H. M., Nguyen, T. D., Nguyen, V. X., Nguyen, Q. V., & Vieira, C. (2024). Concise review of the brown algal genus *Padina* (Dictyotaceae): Knowledge in biodiversity, biogeography, potential, and scope future research for Vietnam. *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 24(4), 399–418. <https://doi.org/10.15625/1859-3097/22126>
- Pagana, I., Marroccia, G., Marletta, G., & Alongi, G. (2023). Re-examination of the distribution and species diversity of the genus *Padina* (Dictyotales, Phaeophyceae) in the Mediterranean Sea. *Phytotaxa*, 619(3), 205–218. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.619.3.1>
- Preuss, M., & Zuccarello, G. C. (2025). Review of available DNA sequence data: Our understanding of macroalgal diversity in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 63(5), 2264–2274. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2024.2330634>

- Rushdi, M. I., Abdel-Rahman, I. A. M., Saber, H., Attia, E. Z., Madkour, H. A., & Abdelmohsen, U. R. (2021). A review on the pharmacological potential of the genus *Padina*. *South African Journal of Botany*, 141, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.018>
- Scorsim, B., Da Silva, A. C., Ramos, L. I., Passere, M. D., Thomaz, S. M., & De Oliveira, A. V. (2024). Molecular markers in genetic studies of aquatic macrophytes: A systematic review. *Hydrobiologia*, 851(16), 3809–3820. <https://doi.org/10.1007/s10750-024-05556-9>
- Som, A. (2009). ML or NJ-MCL? A comparison between two robust phylogenetic methods. *Computational Biology and Chemistry*, 33(5), 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2009.07.007>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Verbruggen, H., Uthannumallian, K., Powrie, F., Jalali, T., Cremen, C., Preuss, M., Duchene, S., & Diaz-Tapia, P. (2025). Scaling up species delimitation from DNA barcodes to whole organelle genomes: Strong evidence for discordance among genes and methods for the red alga *Dasyclonium*. *Molecular Ecology Resources*, 25(7), e14132. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.14132>
- Vieira, C., Daudinet, M., & Kim, M. S. (2024). Untangling the peacock’s tail: Species diversity, taxonomy and origins of the economically valuable brown alga *Padina* (Dictyotales, Phaeophyceae) in Korea. *Algal Research*, 79, 103439. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103439>
- Win, N.-N., Wai, M.-K., Geraldino, P. J. L., Liao, L. M., Aye, C.-T. P. P., Mar, N. N., Hanyuda, T., Kawai, H., & Tokeshi, M. (2022). Taxonomy and species diversity of *Padina* (Dictyotales, Phaeophyceae) from the Indo-Pacific with the description of two new species. *European Journal of Phycology*, 57(1), 1–17. <https://doi.org/10.1080/09670262.2021.1883742>
- Zou, S., Bao, Y., Wu, X., & Wang, C. (2021). DNA barcoding diatoms from China with multiple genes. *Frontiers in Marine Science*, 8, 698331. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.698331>
- Zou, Y., Zhang, Z., Zeng, Y., Hu, H., Hao, Y., Huang, S., & Li, B. (2024). Common methods for phylogenetic tree construction and their implementation in R. *Bioengineering*, 11(5), 480. <https://doi.org/10.3390/bioengineering11050480>