

METODE *DIRECT* PCR YANG CEPAT DAN HEMAT BIAYA UNTUK DNA *BARCODING* ANGGREK OBAT *Dendrobium crumenatum* Sw.

Yusfi Afidah¹, Mukhamad Su'udi²

Universitas Jember^{1,2}

msuudi.fmipa@unej.ac.id¹

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode *Direct* PCR yang cepat dan hemat biaya untuk amplifikasi gen *rbcL* tanpa memerlukan isolasi DNA, khususnya pada spesies *Dendrobium crumenatum* Sw., salah satu anggrek yang dikenal sebagai tanaman obat dalam pengobatan tradisional. Metode yang digunakan adalah dengan merendam daun segar *D. crumenatum* dalam *buffer* TE, diikuti dengan inkubasi pada suhu 55°C. Produk hasil inkubasi kemudian digunakan langsung sebagai template PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode ini menghasilkan pita DNA yang jelas dengan panjang 600 bp sesuai target gen *rbcL*. Analisis BLAST mengonfirmasi bahwa urutan DNA memiliki tingkat kemiripan sebesar 84-85% dengan spesies lain di *GenBank*. Simpulan, metode *Direct* PCR terbukti efektif untuk aplikasi DNA *barcoding*, dengan keunggulan dalam kecepatan dan efisiensi biaya dibandingkan metode isolasi DNA konvensional.

Kata Kunci: Anggrek Obat, *Dendrobium crumenatum* Sw., *Direct* PCR, DNA *Barcoding*

ABSTRACT

This study aims to develop a rapid and cost-effective Direct PCR method for amplifying the rbcL gene without requiring DNA isolation, particularly for Dendrobium crumenatum Sw., an orchid species known for its traditional medicinal uses. The method involved soaking fresh leaves of D. crumenatum in TE buffer, followed by incubation at 55°C. The incubation product was directly used as a PCR template. The results showed a clear DNA band of 600 bp, corresponding to the target rbcL gene. BLAST analysis confirmed that the DNA sequence shared 84-85% identity with other species in GenBank. In conclusion, the Direct PCR method proved to be effective for DNA barcoding applications, offering advantages in speed and cost-efficiency over conventional DNA isolation methods.

Keywords: Medicinal Orchids, *Dendrobium crumenatum* Sw., *Direct* PCR, DNA *Barcoding*

PENDAHULUAN

Dendrobium merupakan salah satu genus anggrek terbesar dengan jumlah spesies lebih dari 1500 yang tersebar di Asia, Eropa, dan Australia (Cakova et al.,

2017). Genus *Dendrobium* juga dikenal karena manfaatnya sebagai obat. Hampir 80 spesies genus *Dendrobium* telah digunakan dalam pengobatan tradisional di Cina (He et al., 2020). Selain itu, potensi obat dari *Dendrobium* telah banyak dipelajari baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Gong et al., 2024; Nie et al., 2021; Ye et al., 2022). Hal ini dikarenakan *Dendrobium* memiliki senyawa aktif seperti stilbenes, polisakarida, alkaloid, asam amino, seskuiterpen, fluorenon, flavonoid, asam fenolik, fenilpropanoid, lignan, amida, alkaloid, dan steroid. Senyawa-senyawa ini dapat berperan sebagai anti-inflamasi, anti-kanker, anti-virus, dan bahkan memiliki sifat pelindung saraf (Song et al., 2022). Salah satu spesies dari genus ni adalah *Dendrobium crumenatum* Sw.

Dendrobium crumenatum Sw. (*D. crumenatum*) atau anggrek merpati juga telah sejak lama digunakan sebagai obat tradisional. Daun *D. crumenatum* dimanfaatkan sebagai kompresan untuk mengobati bisul dan jerawat di Malaysia (Teoh, 2019). *D. crumenatum* juga memiliki kandungan alkaloid dan flavonoid telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus* (Sandrasagaran et al., 2014). Selain itu, fenantrena dan fluorenon yang diekstrak dari batang *D. crumenatum* memiliki efek imunomodulator pada sel mononuklear darah tepi (*peripheral blood mononuclear cells*) dari pasien dengan gangguan *multiple sclerosis* yang dipelajari secara *in vitro* (Kongkatitham et al., 2023).

Berkembangnya penelitian yang berfokus pada potensi anggrek sebagai obat, maka sangat penting untuk mengetahui spesies anggrek yang tepat untuk mempelajari kandungannya yang berpotensi sebagai obat (Choudhary et al., 2019). Anggrek dapat diidentifikasi baik dengan pendekatan morfologi maupun molekuler (Bateman, 2001). Namun, identifikasi melalui morfologi memiliki beberapa hambatan seperti kemiripan organ vegetatif terutama pada anggrek dengan genus yang sama. Hal ini terlihat dari batang beberapa spesies *Dendrobium* yang terlihat mirip satu sama lain (Raskoti & Ale, 2021). Identifikasi molekuler dapat menjadi alat pendukung keakuratannya dalam mengidentifikasi suatu spesies sehingga tidak akan terjadi kesalahan target spesies yang akan digunakan sebagai obat. Salah satu metode identifikasi molekuler yang saat ini banyak digunakan adalah DNA *barcoding* (Antil et al., 2023).

DNA *barcoding* sebagai alat identifikasi molekuler membutuhkan serangkaian langkah yaitu pemilihan sampel, isolasi DNA genom, amplifikasi DNA target, konfirmasi hasil amplifikasi, dan sekuensing (Antil et al., 2023). Dari serangkaian langkah tersebut, isolasi DNA dan amplifikasi DNA target merupakan langkah yang paling penting. Penelitian kami sebelumnya telah berhasil mengidentifikasi berbagai genus anggrek obat seperti *Dendrobium crumenatum*, *Thrixspermum longipilosum*, *Bulbophyllum lobbii*, dan *Dendrobium linearifolium* menggunakan metode *cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) (Fitri et al., 2024; Rohimah et al., 2021; Su'udi et al., 2022).

Namun, isolasi DNA dengan penggerusan sampel sering kali terdapat kendala, terutama pada tanaman yang mengandung kadar metabolit sekunder yang tinggi (Friar, 2005). Oleh karena itu, beberapa penelitian kami juga menggunakan kit komersial (GeneAll Exgene™ dan NEXprep™, Korea) sebagai salah satu cara mengatasi kendala tersebut untuk mengisolasi DNA genom dari daun tanaman anggrek *Phalaenopsis deliciosa* dan *Dendrobium discolor* (Maulidya et al., 2020; Perwitasari et al., 2020).

Beberapa metode isolasi DNA telah dimodifikasi untuk mengurangi metabolit sekunder. Metode yang paling umum adalah CTAB, yang dimodifikasi dengan penambahan polivinilpirolidon (PVP) ke dalam *buffer* lisis (Scobeyeva et al., 2018). Namun, metode ini memiliki kelemahan karena memerlukan waktu yang lama dengan banyak tahapan. Selain CTAB, tersedia berbagai kit komersial untuk mengoptimalkan isolasi DNA, tetapi kit-kit ini tidak selalu menghasilkan ekstraksi berkualitas tinggi dan harganya mahal, sehingga kurang efisien untuk penanganan sampel dalam skala besar (Abdel-Latif & Osman, 2017; Miura et al., 2013). Oleh karena itu alternatif lain yang dapat dilakukan adalah mengamplifikasi DNA langsung dari jaringan tanaman tanpa melalui isolasi DNA terlebih dahulu atau lebih sering dikenal dengan istilah *Direct PCR* (Li et al., 2017).

Beberapa metode *Direct PCR* telah dikembangkan untuk identifikasi gen pada berbagai tanaman. Sebagai contoh, *Direct PCR* dapat mengamplifikasi gen *Actin* pada padi dan tomat, serta fragmen ITS dan RAPD pada tanaman legum seperti kacang polong, kedelai, dan kacang tunggak (Choudhary et al., 2019; Hwang et al., 2013). Namun, informasi mengenai metode *Direct PCR* untuk identifikasi tanaman anggrek melalui DNA *barcoding* masih sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini mengembangkan metode *Direct PCR* dengan merendam sampel daun anggrek segar dalam *buffer* Tris-EDTA (TE), menginkubasi pada suhu 55°C, dan menggunakan produk tersebut untuk PCR pada *D. crumenatum*.

METODE PENELITIAN

Persiapan Sampel

Sampel dikoleksi dari *Greenhouse* Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Jember. Daun anggrek *D. crumenatum* dipilih yang segar dan sehat untuk dijadikan sampel penelitian

Direct PCR

Daun dibersihkan dengan alkohol lalu diambil menggunakan perforator (diameter 5 mm), kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* yang berisi 500 µl *buffer* Tris-EDTA (TE). Sampel divortex selama kurang lebih 10 detik lalu diinkubasi di dalam *thermoshaker* selama 15 menit pada suhu 55°C. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, suhu 25°C, selama 3 menit. Hasil sentrifugasi diambil sebanyak 250 µl larutan dimasukkan ke dalam *microtube* baru yang kemudian dijadikan sebagai *template PCR*.

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA untuk metode CTAB dan *Direct PCR* diawali dengan pembuatan PCR *mixture*. Komposisi PCR *mixture* untuk satu kali reaksi terdiri dari 10 µl *green master mix*, 6 µl *nuclease free water*, 2 µl larutan *template*, 1 µl primer forward *rbcL_F* (5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'), dan 1 µl primer reverse *rbcL_R* (5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'). Primer tersebut menghasilkan produk PCR atau amplicon dengan panjang sekitar 600 bp. Reaksi amplifikasi dilakukan dalam tiga tahap, yaitu predenaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, 35 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit 20 detik, dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit (Maulidya et al., 2020).

Analisis Hasil PCR

Analisis kualitatif hasil amplifikasi DNA target dilakukan dengan elektroforesis yang menggunakan gel *agarose* 1,25%. Marker yang digunakan adalah 100 bp. Hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan *UV-transilluminator* untuk melihat ada tidaknya pita DNA hasil PCR.

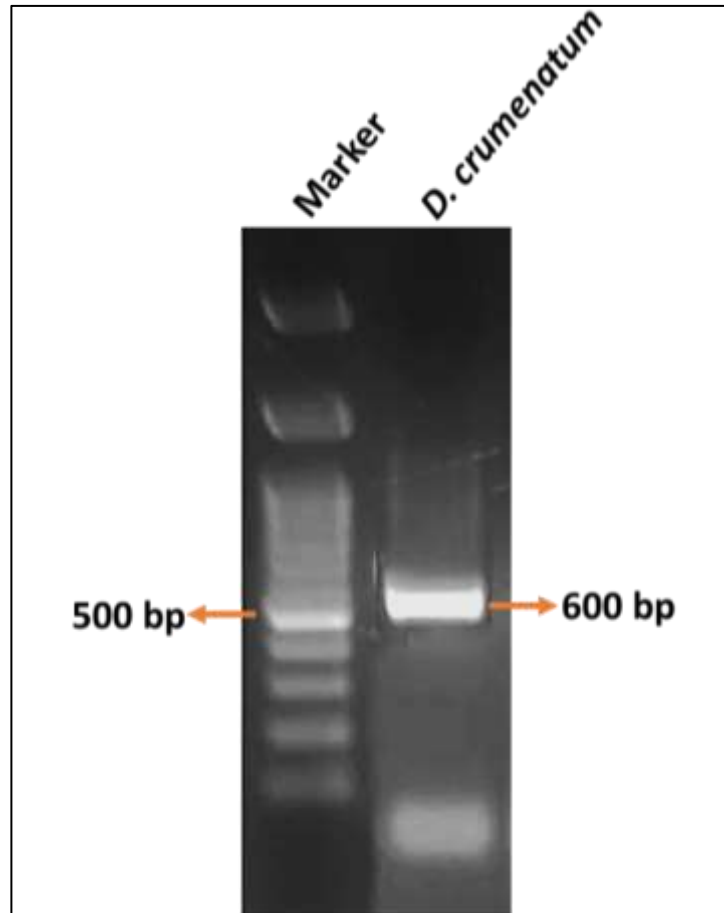
Sekuensing

Produk hasil PCR dipindahkan ke dalam 1,5 ml *microtube* baru untuk proses purifikasi dan sekuensing DNA. Tahapan ini dilakukan dengan mengirimkan produk hasil PCR ke 1st BASE. Data hasil yang diperoleh berupa kromatogram yang kemudian dianalisis menggunakan software *BioEdit*. Data hasil sekuensing diolah pada software *BioEdit*, kemudian dianalisis menggunakan software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) untuk membandingkan informasi sekuen DNA target. Sekuen yang didapatkan kemudian disejajarkan dengan *GeneDoc*.

HASIL PENELITIAN

Direct PCR

Direct PCR adalah metode yang cepat dan hemat biaya untuk mengamplifikasi sekuen DNA tanpa tahapan isolasi DNA terlebih dahulu. Kami kembangkan metode ini menggunakan perendaman dalam *buffer TE*. Hasil amplifikasi gen *rbcL* menunjukkan pita yang jelas dan sesuai target panjangnya yaitu 600 bp (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil elektroforesis gen *rbcL* *D. crumenatum* menggunakan *Direct PCR*. (Marker 100 bp)

Analisis BLAST

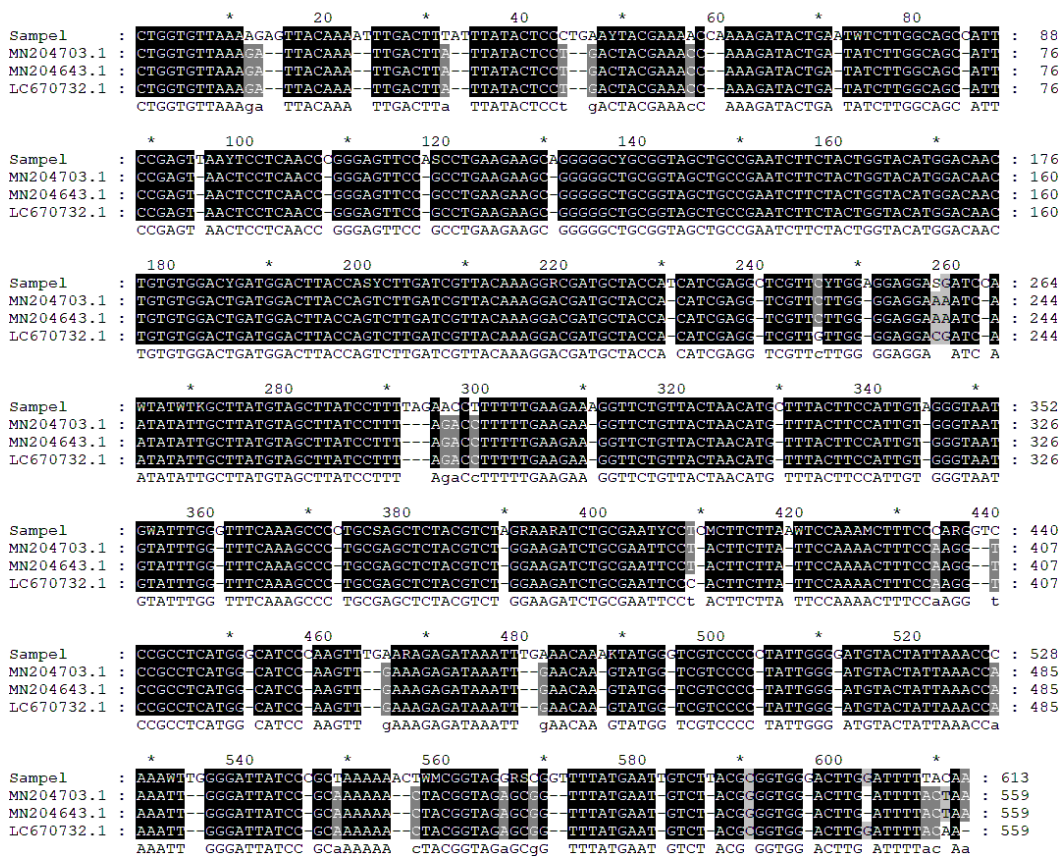
Data hasil sekuensing dianalisis menggunakan BioEdit untuk membentuk konsensus sekuen. Konsensus sekuen yang dihasilkan kemudian dikonfirmasi berdasarkan kemiripan sekuen basa nitrogen dengan melakukan analisis BLAST di NCBI. Hasil analisis BLAST menghasilkan 3 sekuen yang memiliki kemiripan paling tinggi dengan *Percent identity* sekitar 84% - 85% (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil analisis BLAST *Dendrobium crumenatum* di NCBI

Spesies	Max Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Lengt	Accession	Source
<i>Dendrobium crumenatum</i>	662	92%	0,0	84,46%	560	LC670732.1	Thailand
<i>Dendrobium moniliforme</i>	656	98%	0,0	85,47%	724	MN204703.1	China
<i>Dendrobium moniliforme</i>	656	98%	0,0	85,47%	810	MN204643.1	China

Analisis Alignment

Selain analisis BLAST, sekuen yang diperoleh dari hasil sekuensing juga dianalisis dengan pensejajaran menggunakan *GeneDoc/ClustalW* (Gambar 2). Pensejajaran ini bertujuan untuk melihat kesamaan urutan basa nukleotida dengan membandingkan homologi urutan dan variasi genetik (Zhang et al., 2022).



Gambar 2. Hasil alignment gen *rbcL* pada *D. crumenatum*. LC670732.1 adalah *Dendrobium crumenatum*. MN204703.1 adalah *Dendrobium moniliforme*, dan MN204643.1 adalah *Dendrobium moniliforme*.

PEMBAHASAN

Direct PCR pada tanaman telah banyak dipelajari, namun aplikasinya masih terbatas untuk amplifikasi *housekeeping genes* terutama pada tanaman transgenik (Ben-Amar & Mliki, 2021; Choudhary et al., 2019; Li et al., 2017). Hasil amplifikasi gen *rbcL* pada *D. crumenatum* menunjukkan pita yang jelas tanpa adanya pita ganda pada gel elektroforesis (Gambar 1). Pita yang muncul juga telah sesuai target panjang gen *rbcL* yaitu 600 bp. Hal ini menunjukkan bahwa metode *Direct PCR* yang digunakan dengan merendam sampel daun ke dalam *buffer TE* telah berhasil untuk dijadikan sebagai *template PCR* gen *rbcL*. Dibandingkan dengan metode CTAB, metode yang dikembangkan dalam penelitian ini memakan waktu yang jauh lebih sedikit karena hanya membutuhkan waktu kurang dari 30 menit sebelum masuk ke mesin PCR sedangkan CTAB setidaknya membutuhkan waktu lebih dari 3 jam untuk isolasi DNA (Doyle, 1991). Selain itu, metode ini juga lebih hemat biaya karena hanya menggunakan *buffer Tris-EDTA* sebagai pelarutnya. Dalam DNA *barcoding*, DNA berkualitas tinggi ditentukan oleh kemurnian sampel, yang merupakan salah satu faktor penting untuk keberhasilan DNA *barcoding*, terutama selama amplifikasi dan sekuensing (de Vere et al., 2015).

Hasil amplifikasi yang kemudian dikonfirmasi melalui sekuensing menghasilkan konsensus sekuen, yang selanjutnya disejajarkan menggunakan fitur BLAST di NCBI. Beberapa parameter penting muncul dari hasil BLAST untuk mengukur tingkat kesamaan antara sekuen sampel yang dianalisis dan sekuen target yang tersedia di GenBank (Kumar & Samantaray, 2021). Salah satu parameter adalah *E-value* (*Expectation Value*), yang menunjukkan kemungkinan kecocokan terjadi secara kebetulan atau karena peluang acak. Semakin rendah nilai *E-value*, semakin signifikan skor dan penjarannya (Fassler & Cooper, 2011).

Hasil BLAST dari sekuen *rbcL D. crumenatum* (Tabel 1) menunjukkan nilai *E-value* secara keseluruhan < 0.05 , yaitu 0.0, yang mengindikasikan kecocokan yang signifikan. Nilai *Query cover* menunjukkan persentase kemiripan antara sekuen yang dimasukkan dengan sekuen yang ada di GenBank, sedangkan *Percent identity* mengukur proporsi residu identik antara sampel dan urutan subyek dalam penjarangan. Persentase yang lebih tinggi menunjukkan kemiripan yang lebih besar (Fassler & Cooper, 2011).

Hal ini berarti bahwa semakin besar nilai *Query cover*, maka semakin besar pula nilai *Percent identity* dan sebaliknya. Hasil BLAST menunjukkan bahwa sekuen *rbcL D. crumenatum* memiliki homologi tertinggi dengan *D. moniliforme* yang berasal dari Cina, dengan nilai *Query cover* sebesar 98% dan *Percent identity* sebesar 85,47%.

Selain analisis BLAST di NCBI, konsensus sekuen hasil penelitian juga disejajarkan dengan sekuen yang diperoleh dari NCBI untuk mengidentifikasi kesamaan dan variasi genetik. Hasil penyelarasan sekuen gen *rbcL* dalam genus yang sama menunjukkan adanya variasi genetik yang tinggi, ditandai oleh tingkat homologi antar sekuen yang kurang dari 90%. Tingginya variasi genetik ini mengindikasikan perbedaan evolusi atau adaptasi di antara spesies dalam genus tersebut.

Gen *rbcL* atau ribulosa-1,5-bisfosfat karboksilase/oksigenase subunit besar yang digunakan sebagai marka molekuler dalam penelitian ini merupakan gen yang terletak di dalam kloroplas (Omonhinmin & Onuselogu, 2022). *rbcL* telah dikenal sebagai salah satu penanda molekuler universal yang sering digunakan dalam DNA barcoding tanaman (Pere et al., 2023). Gen ini direkomendasikan oleh CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*) bersama dengan gen *matK* sebagai standar dalam identifikasi molekuler tumbuhan (CBOL Plant Working Group et al., 2009).

Keunggulan *rbcL* dibandingkan penanda molekuler lainnya meliputi fleksibilitas primernya yang tinggi, kemudahan dalam amplifikasi, kesederhanaan dalam penyelarasan, dan tingkat mutasi yang relatif rendah (Kang et al., 2017; Newmaster et al., 2006). Selain itu, *rbcL* merupakan salah satu daerah pengkodean plastida yang paling banyak dikarakterisasi dalam basis data GenBank, memberikan cakupan yang luas di berbagai kelompok utama tumbuhan dan menyediakan data referensi yang melimpah (Newmaster et al., 2006).

Hasil analisis BLAST dan penyelarasan sekuen *rbcL* dari sampel *Dendrobium crumenatum* yang dilakukan menggunakan metode Direct PCR menunjukkan bahwa gen ini memiliki potensi besar dalam DNA *barcoding*. Dengan kemampuannya untuk secara efektif menggambarkan variasi genetik di antara generasi dalam genus anggrek, *rbcL* dapat digunakan sebagai alat yang andal dalam studi identifikasi molekuler dan hubungan filogenetik.

SIMPULAN

Metode *Direct PCR* yang dikembangkan dengan perendaman dalam *buffer TE* telah menunjukkan potensi untuk DNA *barcoding* tanpa memerlukan prosedur isolasi DNA. Metode ini juga memiliki keunggulan waktu yang cepat dan hemat biaya karena hanya memerlukan bahan yang sedikit seperti Tris-Cl, EDTA, dan akuades. Oleh karena itu, metode dapat menjadi salah satu alternatif dalam DNA *barcoding* dengan mempercepat proses dan menawarkan efektivitas biaya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Antil, S., Abraham, J. S., Sripoorna, S., Maurya, S., Dagar, J., Makhija, S., Bhagat, P., Gupta, R., Sood, U., Lal, R., & Toteja, R. (2023). DNA barcoding, an effective tool for species identification: A review. *Molecular Biology Reports*, 50(1), 761–775. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7>
- Bateman, R. (2001). Evolution and classification of European orchids: Insights from molecular and morphological characters. *Journal Europäischer Orchideen*, 33, 33–119. dikutip dari https://www.researchgate.net/publication/287854443_Evolution_and_classification_of_European_orchids_Insights_from_molecular_and_morphological_characters
- Ben-Amar, A., & Mliki, A. (2021). Timely gene detection assay and reliable screening of genetically engineered plants using an improved Direct PCR-based technology. *Transgenic Research*, 30(3), 263–274. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00250-1>
- Cakova, V., Bonte, F., & Lobstein, A. (2017). Dendrobium: Sources of active ingredients to treat age-related pathologies. *Aging and Disease*, 8(6), 827-849. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0214>
- CBOL Plant Working Group, Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., Erickson, D. L., Fazekas, A. J., Graham, S. W., James, K. E., Kim, K.-J., Kress, W. J., Schneider, H., van AlphenStahl, J., Barrett, S. C. H., van den Berg, C., & Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences, 106(31), 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Choudhary, P., Das, S., Chakdar, H., Singh, A., Goswami, S. K., & Saxena, A. K. (2019). Rapid high throughput template preparation (rHTTP) method: A novel cost-effective method of Direct PCR for a wide range of plants. *BMC Biotechnology*, 19(1), Article 69. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0560-4>
- de Vere, N., Rich, T. C. G., Trinder, S. A., & Long, C. (2015). DNA barcoding for plants. In J. Batley (Ed.), *Plant Genotyping: Methods and Protocols*, 101–118. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_8
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In G. M. Hewitt, A. W. B. Johnston, & J. P. W. Young (Eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*, 283–293. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Fassler, J., & Cooper, P. (2011). BLAST glossary. In *BLAST® Help* [Internet]. National Center for Biotechnology Information (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/>
- Fitri, N. E., Su'udi, M., & Ikrimah, S. W. (2024). DNA barcode characteristic of *Dendrobium crumenatum* based on ITS2. *Life Science and Biotechnology*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.19184/lbs.v2i1.48632>
- Friar, E. A. (2005). Isolation of DNA from plants with large amounts of secondary metabolites. In *Methods in Enzymology*, 395, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95001-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95001-5)
- Gong, L., Xu, J., Guo, M., Zhao, J., Xin, X., Zhang, C., Ni, X., Hu, Y., & An, F. (2024). Octahydroindolizine alkaloid Homocrepidine A from *Dendrobium crepidatum* attenuate *P. acnes*-induced inflammatory in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 333, 118455. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118455>
- He, L., Su, Q., Bai, L., Li, M., Liu, J., Liu, X., Zhang, C., Jiang, Z., He, J., Shi, J., Huang, S., & Guo, L. (2020). Recent research progress on natural small molecule bibenzyls and its derivatives in *Dendrobium* species. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 204, 112530. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112530>
- Hwang, H., Bae, S.-C., Lee, S., Lee, Y.-H., & Chang, A. (2013). A rapid and simple genotyping method for various plants by direct-PCR. *Plant Breeding and Biotechnology*, 1(3), 290–297. <https://doi.org/10.9787/PBB.2013.1.3.290>
- Kang, Y., Deng, Z., Zang, R., & Long, W. (2017). DNA barcoding analysis and phylogenetic relationships of tree species in tropical cloud forests. *Scientific Reports*, 7(1), Article 12564. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13057-0>
- Kongkatitham, V., Dehlinger, A., Wang, M., Poldorn, P., Weidinger, C., Letizia, M., Chaotham, C., Otto, C., Ruprecht, K., Paul, F., Rungrotmongkol, T., Likhitwitayawuid, K., Böttcher, C., & Sritularak, B. (2023). Immunomodulatory effects of new phenanthrene derivatives from

- Dendrobium crumenatum*. *Journal of Natural Products*, 86(5), Article 5. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00107>
- Kumar, D., & Samantaray, S. D. (2021). Identification of nutritionally important protein in *Amaranthus* genes. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(4), 238–248. <https://www.phytojournal.com/archives/2021.v10.i4.14157/identification-of-nutritionally-important-protein-in-amaranthus-genes>
- Li, Y., Zhao, H., Yan, X., Li, M., Chen, P., & Zhang, S. (2017). A universal method for direct PCR amplification of plant tissues. *Analytical Methods*, 9(11), 1800–1805. <https://doi.org/10.1039/C6AY03156K>
- Maulidya, N. N., Rohimah, S., Ramadany, Z., Ratnasari, T., & Su'udi, M. (2020). Assessment of the DNA barcodes characteristic of *Phalaenopsis deliciosa* based on matK, rbcL, and ITS. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 8(2), 138–144. <https://doi.org/10.24252/bio.v8i2.13278>
- Miura, M., Tanigawa, C., Fujii, Y., & Kaneko, S. (2013). Comparison of six commercially available DNA polymerases for direct PCR. *Revista do Instituto de Medicina*, 55(6), 401–406. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000600005>
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., & Ragupathy, S. (2006). DNA barcoding in land plants: Evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. *Canadian Journal of Botany*, 84(3), 335–341. <https://doi.org/10.1139/b06-047>
- Nie, G., Zhang, Y., Zhou, Z., Xu, J., Wang, H., Chen, D., & Wang, K. (2021). Dynamic evaluation of the protective effect of *Dendrobium officinale* polysaccharide on acute alcoholic liver injury mice in vitro and in vivo by NIR fluorescence imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(23), 5715–5724. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03546-7>
- Omonhinmin, C., & Onuselegu, C. (2022). rbcL gene in global molecular data repository. *Data in Brief*, 42, 108090. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108090>
- Pere, K., Mburu, K., Muge, E. K., Wagacha, J. M., & Nyaboga, E. N. (2023). Molecular discrimination and phylogenetic relationships of *Physalis* species based on ITS2 and rbcL DNA barcode sequence. *Crops*, 3(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/crops3040027>
- Perwitasari, D., Rohimah, S., Ratnasari, T., Sugiharto, B., & Su'udi, M. (2020). DNA barcoding of medicinal orchid *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar using rbcL and ITS genes. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah Dan Obat*, 31, 8–20. <https://doi.org/10.21082/bullittro.v31n1.2020.8-20>
- Raskoti, B. B., & Ale, R. (2021). DNA barcoding of medicinal orchids in Asia. *Scientific Reports*, 11(1), 23651. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03025-0>
- Rohimah, S., Ratnasari, T., & Su'udi, M. (2021). DNA barcoding of *Thrixspermum longipilosum* based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) region. *IOP*

- Conference Series: Earth and Environmental Science*, 743(1), 012092.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/743/1/012092>
- Sandrasagaran, U. M., Subramaniam, S., & Murugaiyah, V. (2014). New perspective of *Dendrobium crumenatum* orchid for antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria. *Pakistani Journal of Botany*, 46(2), 719–724. [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/46\(2\)/45.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/46(2)/45.pdf)
- Scobeyeva, V. A., Omelchenko, D. O., Dyakov, L. M., Konovalov, A. S., Speranskaya, A. S., & Krinitsina, A. A. (2018). Comparison of some plant DNA extraction methods. *Russian Journal of Genetics*, 54(5), 576–586. <https://doi.org/10.1134/S1022795418050095>
- Song, C., Ma, J., Li, G., Pan, H., Zhu, Y., Jin, Q., Cai, Y., & Han, B. (2022). Natural composition and biosynthetic pathways of alkaloids in medicinal *Dendrobium* species. *Frontiers in Plant Science*, 13, 850949. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.850949>
- Su'udi, M., Budyartini, D. W., & Ramadany, Z. (2022). DNA barcoding *Dendrobium linearifolium* Teijsm. & Binn. berdasarkan penanda molekuler ITS2. *Al-Kauniah: Jurnal Biologi*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.15408/kauniah.v15i1.16710>
- Su'udi, M., Ulum, F. B., Ardiyansah, M., & Fitri, N. E. (2024). Evaluasi lokus potensial matK dan ITS2 untuk DNA barcoding *Bulbophyllum lobbii* Lindl. *Al-Kauniah: Jurnal Biologi*, 17(2), Article 2. <https://doi.org/10.15408/kauniah.v17i2.33897>
- Teoh, E. S. (2019). *Orchids as aphrodisiac, medicine or food*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0843-2>
- Ye, M., Liu, J., Deng, G., Cai, X., Zhang, X., Yao, L., Wu, J., He, X., Peng, D., & Yu, N. (2022). Protective effects of *Dendrobium huoshanense* polysaccharide on D-gal induced PC12 cells and aging mice: In vitro and in vivo studies. *Journal of Food Biochemistry*, 46(12), e14496. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14496>
- Zhang, Y., Zhang, Q., Zhou, J., & Zou, Q. (2022). A survey on the algorithm and development of multiple sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 23(3), bbac069. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac069>