

**KLARIFIKASI STATUS TAKSONOMI BEBERAPA JENIS *Zingiber* Mill.
(Zingiberaceae) DI SUMATERA BARAT BERDASARKAN PENANDA
INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) DAN MATURASE K GEN
(MatK)**

TESIS



**PROGRAM STUDI PASCA SARJANA BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG, 2022**

**KLARIFIKASI STATUS TAKSONOMI BEBERAPA JENIS *Zingiber* Mill.
(Zingiberaceae) DI SUMATERA BARAT BERDASARKAN PENANDA
INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) DAN MATURASE K GEN
(MatK)**

TESIS



*Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Magister Sains Pada
Program Studi Pascasarjana Biologi FMIPA Universitas Andalas*

**PROGRAM STUDI PASCA SARJANA BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG, 2022**

HALAMAN PENGESAHAN

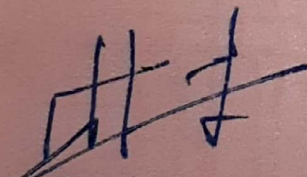
Judul : Klarifikasi Status Taksonomi Beberapa *Zingiber* Mill.
(Zingiberaceae) Di Sumatera Barat Berdasarkan Penanda
Internal Transcribed Spacer (ITS) Dan Maturase K Gen (MatK)
Nama Mahasiswa : Indah Sukarjo
No. BP : 2120421005
Bidang : Biodiversitas
Program Studi : Pascasarjana Biologi

Tesis ini telah diuji dan dipertahankan didepan sidang panitia Ujian Magister Sains
pada program Pascasarjana Universitas Andalas dan dinyatakan Lulus pada tanggal
11 Agustus 2022

Menyetujui,
Komisi Pembimbing


Ketua Pembimbing

Anggota Pembimbing



Dr. Nurainas

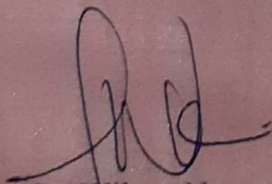
NIP. 196908141995122001



Prof. Dr. Syamsuardi

NIP. 196109101989011001

Ketua Jurusan Biologi FMIPA
Universitas Andalas



Dr. Wilson Novarino
NIP. 197111031998021001

Ketua Program Studi S2 Biologi
FMIPA Universitas Andalas



Prof. Dr. Indra Junaidi Zakaria
NIP. 196706082005011001

RIWAYAT HIDUP



Bismillah...

Indah Sukarjo merupakan nama lengkap penulis yang lahir di Kp. Jambu, 23 Oktober 1998. Penulis dilahirkan dari pasangan Bapak Sukarjo dan Ibu Sutris Supriati yang memiliki 3 orang anak. Penulis pernah bersekolah di SDN 37 Kinali, dilanjutkan di MTsN Padang Panjang, dan pada tahun 2014 melanjutkan sekolah di SMA N Agam Cendekia. Selanjutnya, pada tahun 2017 Penulis melanjutkan studi di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas. Penulis mengikuti program *fast track* untuk melanjutkan studi S2 Biologi dan lulus studi S1 biologi pada tahun 2021. Selama perkuliahan, penulis aktif dalam riset taksonomi molekuler tumbuhan dan mendapatkan gelar Magister pada tahun 2022.

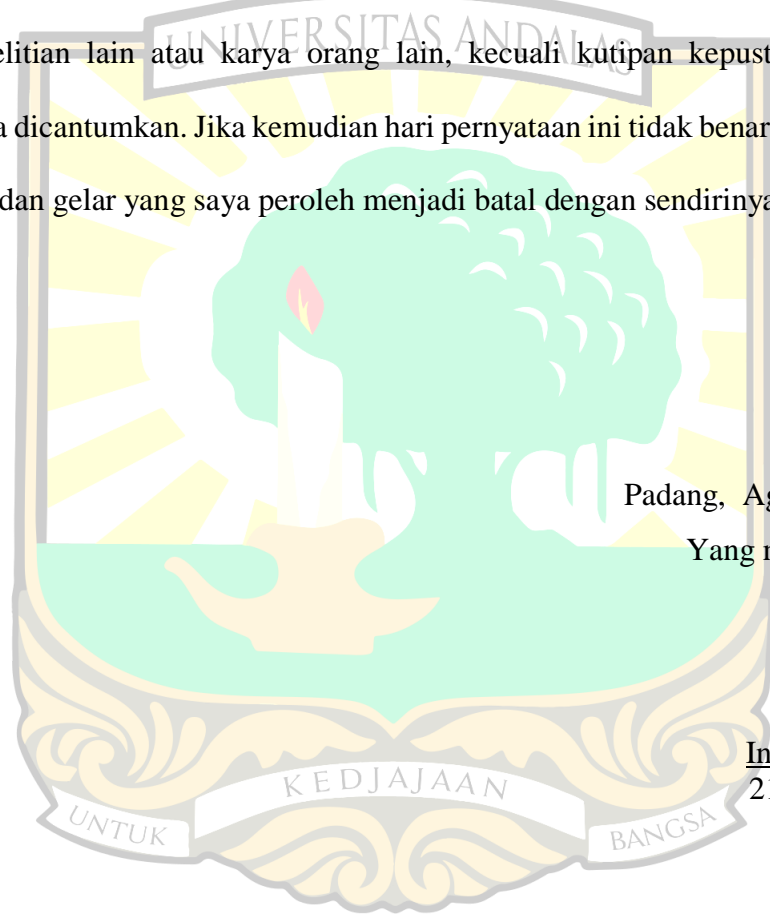
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis yang ditulis dengan judul “Klarifikasi Status Taksonomi Beberapa Jenis *Zingiber* Mill. (Zingiberaceae) di Sumatera Barat Berdasarkan Penanda Internal Transcribed Spacer (ITS) dan Maturase K Gen (MatK)” adalah hasil kerja atau hasil karya saya sendiri dan bukan jiplakan dari hasil penelitian lain atau karya orang lain, kecuali kutipan kepustakaan yang sumbernya dicantumkan. Jika kemudian hari pernyataan ini tidak benar maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

Padang, Agustus 2022

Yang menyatakan,

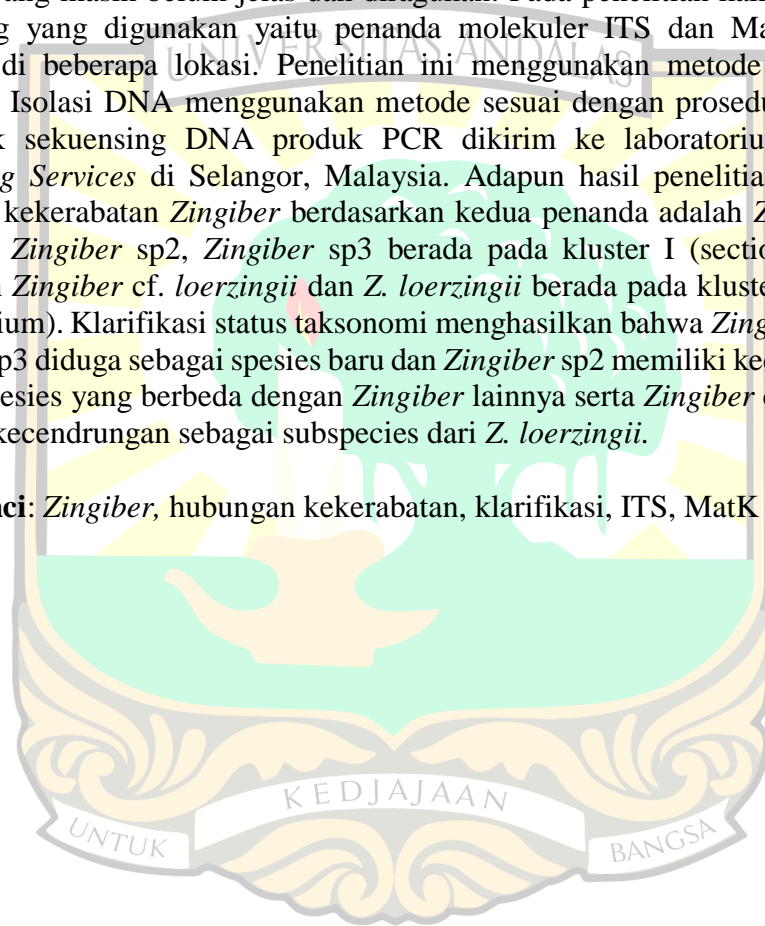
Indah Sukarjo
2120421005



ABSTRAK

Berdasarkan hasil penelitian Chandra, Nurainas, dan Syamsuardi. (2015) ditemukan 10 jenis *Zingiber* yang ada di Sumatera Barat. Dari hasil penelitian ini ditemukan 2 jenis *Zingiber* yang belum teridentifikasi sampai tingkat spesies yaitu *Zingiber cf. loerzingii* dan *Zingiber sp1*. Pada saat survey ke lapangan, peneliti juga menemukan 2 jenis *Zingiber* tidak teridentifikasi. Selain karakter morfologi, dibutuhkan karakter pendukung untuk mengklarifikasikan status taksonomi jenis *Zingiber* yang masih belum jelas dan diragukan. Pada penelitian kali ini karakter pendukung yang digunakan yaitu penanda molekuler ITS dan MatK. Sampel dikoleksi di beberapa lokasi. Penelitian ini menggunakan metode survey dan deskriptif. Isolasi DNA menggunakan metode sesuai dengan prosedur kit isolasi dan untuk sekuensing DNA produk PCR dikirim ke laboratorium *1st Base Sequencing Services* di Selangor, Malaysia. Adapun hasil penelitian ini adalah hubungan kekerabatan *Zingiber* berdasarkan kedua penanda adalah *Zingiber sp1*, *Z. album*, *Zingiber sp2*, *Zingiber sp3* berada pada kluster I (section *Zingiber*) sedangkan *Zingiber cf. loerzingii* dan *Z. loerzingii* berada pada kluster II (section *Cryptanthium*). Klarifikasi status taksonomi menghasilkan bahwa *Zingiber sp1* dan *Zingiber sp3* diduga sebagai spesies baru dan *Zingiber sp2* memiliki kecenderungan sebagai spesies yang berbeda dengan *Zingiber* lainnya serta *Zingiber cf. loerzingii* memiliki kecenderungan sebagai subspecies dari *Z. loerzingii*.

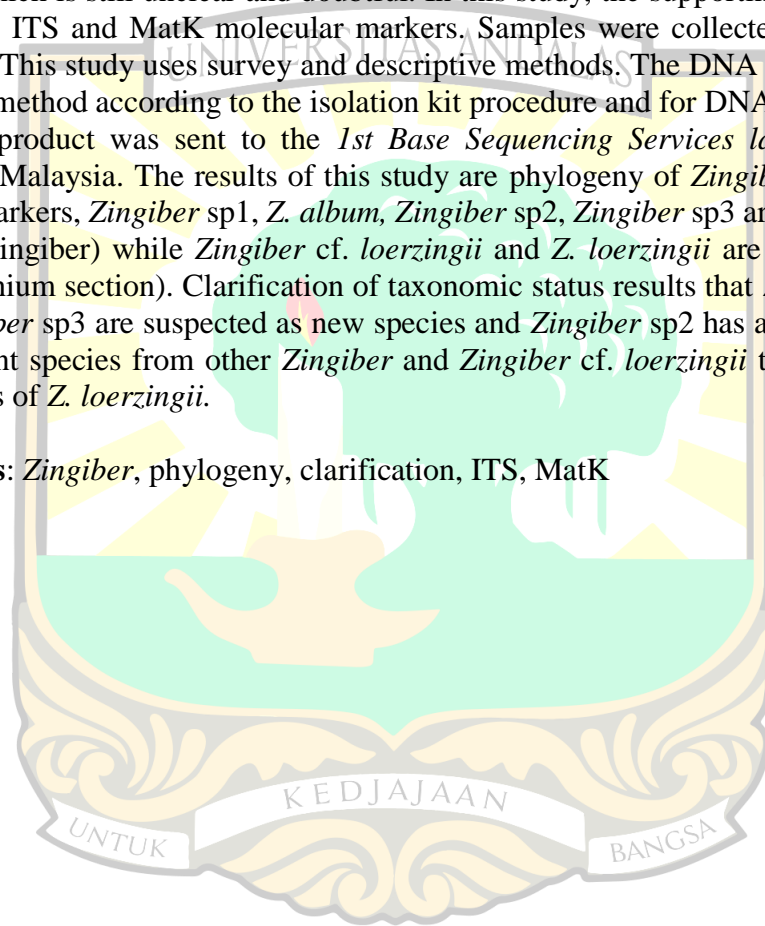
Kata Kunci: *Zingiber*, hubungan kekerabatan, klarifikasi, ITS, MatK



ABSTRACT

Based on the results of research by Chandra, Nurainas, and Syamsuardi. (2015) found 10 types of *Zingiber* in West Sumatra. The results of this study found 2 types of *Zingiber* that have not been identified to the species level, namely *Zingiber* cf. *loerzingii* and *Zingiber* sp1. During the field survey, researcher also found that 2 *Zingiber* species were not identified. In addition to morphological characters, supporting characters are needed to clarify the taxonomic status of the *Zingiber* species which is still unclear and doubtful. In this study, the supporting characters used were ITS and MatK molecular markers. Samples were collected in several locations. This study uses survey and descriptive methods. The DNA was isolated using the method according to the isolation kit procedure and for DNA sequencing the PCR product was sent to the *1st Base Sequencing Services laboratory* in Selangor, Malaysia. The results of this study are phylogeny of *Zingiber* based on the two markers, *Zingiber* sp1, *Z. album*, *Zingiber* sp2, *Zingiber* sp3 are in cluster I (section *Zingiber*) while *Zingiber* cf. *loerzingii* and *Z. loerzingii* are in cluster II (*Cryptanthium* section). Clarification of taxonomic status results that *Zingiber* sp1 and *Zingiber* sp3 are suspected as new species and *Zingiber* sp2 has a tendency to be different species from other *Zingiber* and *Zingiber* cf. *loerzingii* tends to be a subspecies of *Z. loerzingii*.

Keywords: *Zingiber*, phylogeny, clarification, ITS, MatK



RINGKASAN

KLARIFIKASI STATUS TAKSONOMI BEBERAPA JENIS *Zingiber* Mill. (*Zingiberaceae*) DI SUMATERA BARAT BERDASARKAN PENANDA INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) DAN MATURASE K GEN (MATK)

Oleh: **INDAH SUKAJO**

(Dibawah bimbingan Dr. Nurainas dan Prof. Dr. Syamsuardi)

Zingiber merupakan salah satu genus dalam family *Zingiberaceae* dengan jumlah sekitar 100 sampai 150 spesies yang telah terdeskripsi. *Zingiber* terutama terdistribusi di daerah tropis dan subtropis dengan pusat distribusi di wilayah Indo Malaya, tetapi meluas melalui Afrika tropis ke Amerika Tengah dan Selatan. Distribusi *Zingiber* di Indonesia dilaporkan sebanyak 52 jenis dan 6 jenis diantaranya merupakan jenis *Zingiber* yang terdistribusi di Sumatera.

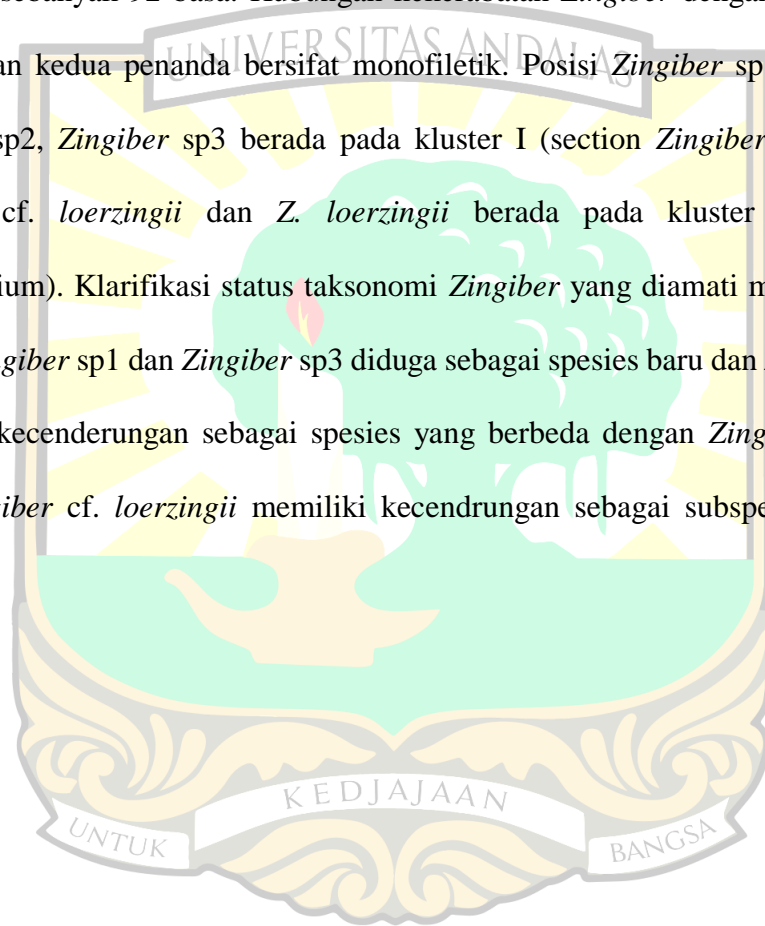
Pada tahun 2015 Chandra, Nurainas, dan Syamsuardi melaporkan ada 10 jenis *Zingiber* yang ditemukan di Sumatera Barat. Jenis *Zingiber* yang ditemukan yaitu 7 jenis *Zingiber*, *Zingiber* cf *loerzingii* dan 2 *Zingiber* tidak teridentifikasi. Selanjutnya Nurainas dan Arbain (2017) melaporkan 17 jenis *Zingiber* yang terdistribusi dari Sumatera. Salah satu jenis yang dilaporkan adalah jenis *Zingiber* tidak teridentifikasi sebelumnya oleh Chandra, Nurainas, dan Syamsuardi (2015). Jenis tersebut dikenal dengan *Zingiber album*. Dari data ini, ditemukan 2 jenis *Zingiber* yang belum jelas status taksonominya yaitu *Zingiber* cf *loerzingii* dan 1 *Zingiber* tidak teridentifikasi yang diberi label *Zingiber* sp1. Selain itu, berdasarkan

hasil survei peneliti ke lapangan, ditemukan juga jenis *Zingiber* yang berbeda dari *Zingiber* lainnya. Kedua jenis tersebut ditemukan di loksai yang berbeda yaitu di Simanau diberi label pengenalan *Zingiber* sp2 dan di Surian diberi label pengenalan *Zingiber* sp3.

Dari kasus *Zingiber* ini karakter morfologi memiliki keterbatasan untuk batasan suatu taksa sehingga ditemukan jenis *Zingiber* tidak teridentifikasi dan masih diragukan. Genus *Zingiber* merupakan salah satu genus yang sulit untuk diidentifikasi. Hal ini dikarenakan adanya karakter morfologi terutama perbungaan dari *Zingiber* yang sulit ditemukan dan tidak lengkap. Oleh karena itu diperlukan teknik pendukung yaitu teknik molekuler untuk melengkapi data morfologi dan mendukung status taksonomi *Zingiber* yang masih diragukan dan belum teridentifikasi. Penanda molekuler yang digunakan dalam penelitian adalah ITS dan MatK yang dianggap dapat mendeterminasi spesies (Kress *et al.*, 2005). Penelitian sebelumnya yang telah menggunakan penanda molekuler MatK dan ITS dalam analisis *Zingiberaceae* diantaranya Kress *et al.* (2002, 2005); Selvaraj, Sarma, dan Ramalingam (2008); Poulsen *et al.* (2018) dan Saha dan Sinha (2020).

Sampel berupa daun segar *Zingiber* dikoleksi dari jalur pendakian Gunung Merapi, Tanah Datar (*Zingiber* sp1), Nagari Simanau Kabupaten Solok (*Z. album* dan *Zingiber* sp2), Nagari Surian (*Zingiber* sp3), Bukit Pinang, Kota Padang (*Zingiber* cf. *loerzingii*) dan Batu Katak, Kabupaten Langkat (*Z. loerzingii*). Isolasi DNA menggunakan prosedur kit Isolasi dan amplifikasi menggunakan penanda ITS dan MatK. Analisis hubungan kekerabatan menggunakan metode Neighbour-Joining dan Maximum-likelihood dalam program MEGA.

Hasil yang didapatkan adalah karakter molekuler *Zingiber* berdasarkan penanda ITS memiliki karakter informatif yang lebih tinggi dibandingkan penanda MatK. Karakter informatif berupa perbedaan basa paling sedikit adalah berdasarkan penanda MatK yaitu *Zingiber cf. loerzingii* dengan *Z. loerzingii* sebanyak 4 basa dan terbanyak adalah berdasarkan penanda ITS yaitu *Z. loerzingii* dengan *Z. officinale* sebanyak 92 basa. Hubungan kekerabatan *Zingiber* dengan kerabatnya berdasarkan kedua penanda bersifat monofiletik. Posisi *Zingiber* sp1, *Z. album*, *Zingiber* sp2, *Zingiber* sp3 berada pada kluster I (section *Zingiber*) sedangkan *Zingiber cf. loerzingii* dan *Z. loerzingii* berada pada kluster II (section *Cryptanthium*). Klarifikasi status taksonomi *Zingiber* yang diamati menghasilkan bahwa *Zingiber* sp1 dan *Zingiber* sp3 diduga sebagai spesies baru dan *Zingiber* sp2 memiliki kecenderungan sebagai spesies yang berbeda dengan *Zingiber* lainnya serta *Zingiber cf. loerzingii* memiliki kecenderungan sebagai subspecies dari *Z. loerzingii*.



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT, serta sholawat salam penulis ucapkan kepada Nabi Muhammad SAW. Berkat, nikmat dan rahmat Allah penulis dapat menyelesaikan Tesis yang berjudul “Klarifikasi Status Taksonomi Beberapa *Zingiber* Mill. (Zingiberaceae) di Sumatera Barat Berdasarkan Penanda *Internal Transcribed Spacer* (ITS) Dan *Maturase K Gen* (MatK)”, sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan pascasarjana pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

Penyelesaian Tesis ini tidak terlepas dari dukungan berbagai pihak terutama kepada Ibu Dr. Nurainas dan Bapak Prof. Dr. Syamsuardi selaku pembimbing, serta Bapak Dr. Djong Hon Tjong, Bapak Dr. Tesri Maideliza, dan Bapak Dr. M. Idris selaku dosen penguji, yang telah membimbing, memberi pengarahan dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian hingga penulisan tesis. Selanjutnya penulis juga mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Dr. Wilson Novarino selaku ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.
2. Bapak Prof. Dr. Indra Junaidi Zakaria selaku ketua program studi S2 Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.
3. Seluruh dosen Pascasarjana Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas yang telah memberikan ilmu kepada penulis selama perkuliahan.

4. Staf karyawan/ti Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.
5. Keluarga penulis yang selalu mendukung dan mendoakan untuk mendapatkan ilmu terbaik dalam studinya.
6. Keluarga Herbarium ANDA dan Laboratorium genetika dan molekuler yang telah mendukung dan membantu penulis dalam melaksanakan penelitian.
7. Teman-teman terbaik di kampus dan di luar kampus yang selalu memberikan dukungan dan bantuan selama perkuliahan.

Penulis menyadari menyadari bahwa setiap hal yang dilakukan tidak luput dari kesalahan dan jauh dari kata sempurna, untuk itu penulis berharap pembaca dapat memberikan masukan dan saran terkait tulisan ini. Terakhir penulis mengucapkan semoga karya tulis ini dapat memperkaya khazanah ilmu pengetahuan bagi penulis sendiri dan pembaca.

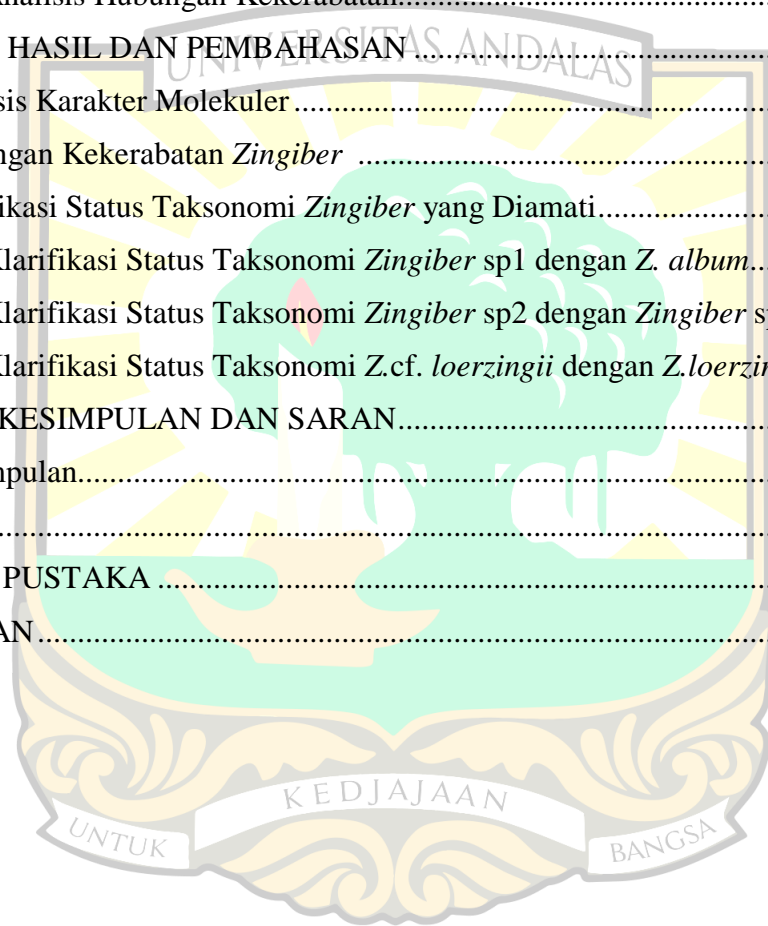
Padang, Agustus 2022

Penulis

DAFTAR ISI

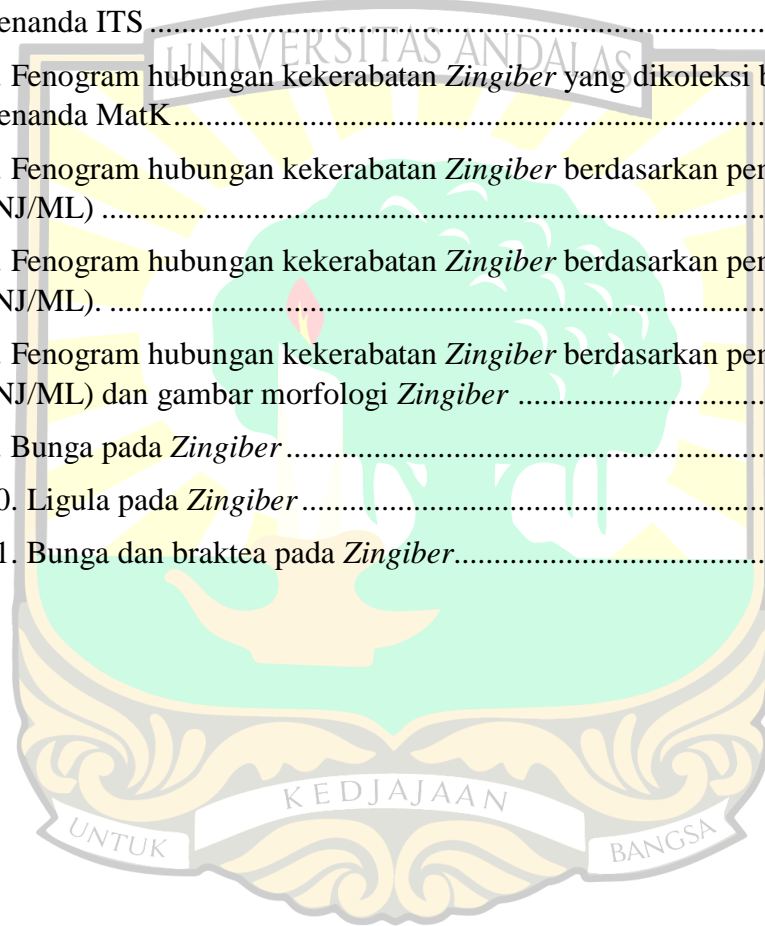
HALAMAN PENGESAHAN.....	i
RIWAYAT HIDUP.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
RINGKASAN.....	vi
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. <i>Zingiber</i> Mill.....	6
B. Penggunaan ITS dalam Family Zingiberaceae.....	10
C. Penggunaan MatK dalam Family Zingiberaceae.....	12
BAB III. METODE PENELITIAN.....	15
A. Waktu dan tempat.....	15
B. Metode Penelitian.....	16
C. Material, Alat dan Bahan.....	16
1. Material.....	16
2. Alat dan Bahan di Lapangan.....	16
3. Alat dan Bahan di Laboratorium.....	16
D. Prosedur Kerja.....	17
1. Pengoleksian Sampel.....	17

2. Isolasi DNA	17
3. Elektroforesis Hasil Isolasi	19
4. Amplifikasi DNA.....	19
5. Purifikasi Produk PCR dan Sekuensing DNA.....	20
E. Analisis Data	21
1. Penyatuan Sekuen DNA (Contig DNA)	21
2. Analisis Karakter Molekuler.....	21
3. Analisis Hubungan Kekerabatan.....	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
A. Analisis Karakter Molekuler.....	26
B. Hubungan Kekerabatan <i>Zingiber</i>	32
C. Klarifikasi Status Taksonomi <i>Zingiber</i> yang Diamati.....	41
1. Klarifikasi Status Taksonomi <i>Zingiber</i> sp1 dengan <i>Z. album</i>	42
2. Klarifikasi Status Taksonomi <i>Zingiber</i> sp2 dengan <i>Zingiber</i> sp3	43
3. Klarifikasi Status Taksonomi <i>Z.cf. loerzingii</i> dengan <i>Z.loerzingii</i>	44
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
A. Kesimpulan.....	46
B. Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN.....	56



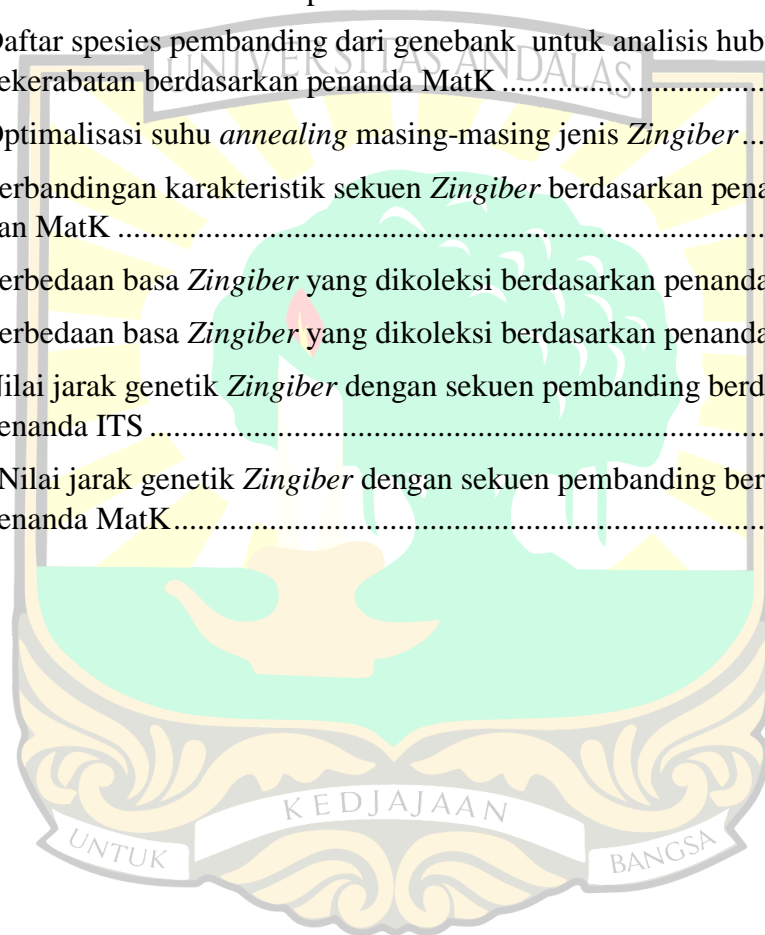
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Region ITS target	10
Gambar 2. Daerah MatK.....	12
Gambar 3. Peta lokasi pengoleksian sampel	15
Gambar 4. Fenogram hubungan kekerabatan <i>Zingiber</i> yang dikoleksi berdasarkan penanda ITS	30
Gambar 5. Fenogram hubungan kekerabatan <i>Zingiber</i> yang dikoleksi berdasarkan penanda MatK.....	31
Gambar 6. Fenogram hubungan kekerabatan <i>Zingiber</i> berdasarkan penanda ITS (NJ/ML)	35
Gambar 7. Fenogram hubungan kekerabatan <i>Zingiber</i> berdasarkan penanda MatK (NJ/ML).	36
Gambar 8. Fenogram hubungan kekerabatan <i>Zingiber</i> berdasarkan penanda ITS (NJ/ML) dan gambar morfologi <i>Zingiber</i>	41
Gambar 9. Bunga pada <i>Zingiber</i>	42
Gambar 10. Ligula pada <i>Zingiber</i>	44
Gambar 11. Bunga dan braktea pada <i>Zingiber</i>	45



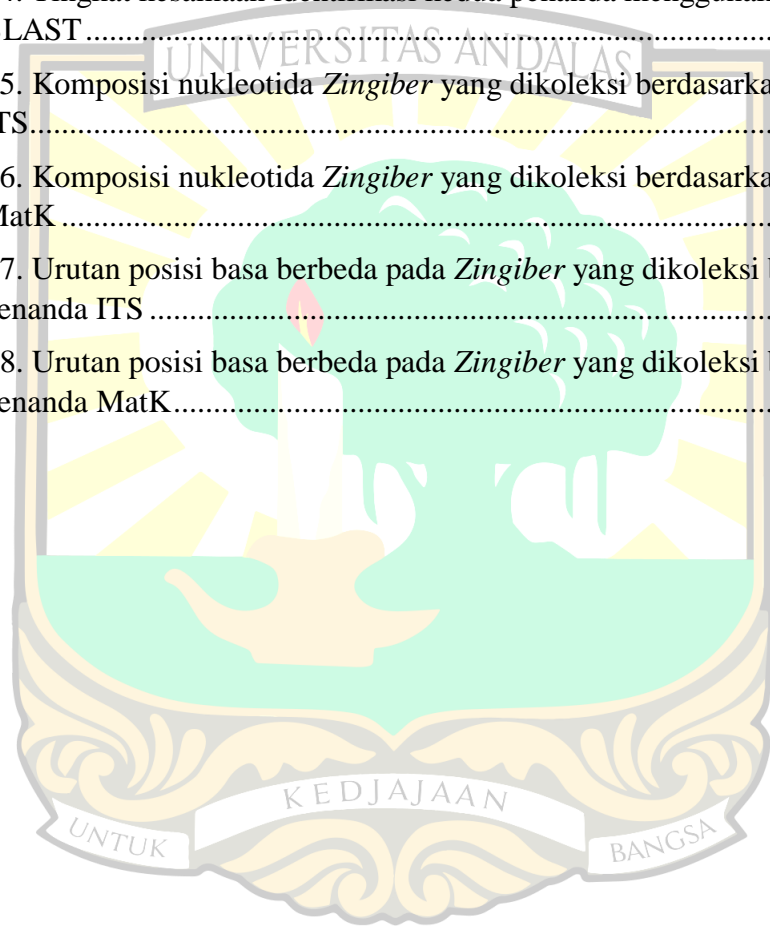
DAFTAR TABEL

Gambar	Halaman
Tabel 1. Primer yang digunakan dalam analisis	17
Tabel 2. Prosedur kerja PCR sesuai dengan primer yang digunakan	20
Tabel 3. Daftar spesies pembanding dari genebank untuk analisis hubungan kekerabatan berdasarkan penanda ITS.....	23
Tabel 4. Daftar spesies pembanding dari genebank untuk analisis hubungan kekerabatan berdasarkan penanda MatK	24
Tabel 5. Optimalisasi suhu <i>annealing</i> masing-masing jenis <i>Zingiber</i>	25
Tabel 6. Perbandingan karakteristik sekuen <i>Zingiber</i> berdasarkan penanda ITS dan MatK	27
Tabel 7. Perbedaan basa <i>Zingiber</i> yang dikoleksi berdasarkan penanda ITS	29
Tabel 8. Perbedaan basa <i>Zingiber</i> yang dikoleksi berdasarkan penanda MatK....	30
Tabel 9. Nilai jarak genetik <i>Zingiber</i> dengan sekuen pembanding berdasarkan penanda ITS	37
Tabel 10. Nilai jarak genetik <i>Zingiber</i> dengan sekuen pembanding berdasarkan penanda MatK.....	38



DAFTAR LAMPIRAN

Gambar	Halaman
Lampiran 1. Jenis <i>Zingiber</i> yang diamati dalam penelitian	56
Lampiran 2. Perbandingan karakter morfologi <i>Zingiber</i> yang diamati.....	57
Lampiran 3. Gambar hasil isolasi dan purifikasi DNA <i>Zingiber</i>	58
Lampiran 4. Tingkat kesamaan identifikasi kedua penanda menggunakan BLAST.....	59
Lampiran 5. Komposisi nukleotida <i>Zingiber</i> yang dikoleksi berdasarkan penanda ITS.....	59
Lampiran 6. Komposisi nukleotida <i>Zingiber</i> yang dikoleksi berdasarkan penanda MatK.....	59
Lampiran 7. Urutan posisi basa berbeda pada <i>Zingiber</i> yang dikoleksi berdasarkan penanda ITS	60
Lampiran 8. Urutan posisi basa berbeda pada <i>Zingiber</i> yang dikoleksi berdasarkan penanda MatK.....	60



BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Zingiber merupakan salah satu genus dalam family Zingiberaceae dengan jumlah sekitar 100 sampai 150 spesies yang telah terdeskripsi (Theerakupisut *et al.*, 2012). *Zingiber* terutama didistribusikan di daerah tropis dan subtropis dengan pusat distribusi di wilayah Indo Malaya, tetapi meluas melalui Afrika tropis ke Amerika Tengah dan Selatan (Kress *et al.*, 2002). Pusat keanekaragamannya berada di selatan Asia dan Asia Tenggara (Takano dan Okada 2003). Zingiberaceae merupakan tumbuhan dari hutan tropis yang banyak ditemukan tumbuh di tempat yang rindang dan lembab, dan terkadang dapat ditemukan di hutan sekunder. Beberapa jenis dapat bertahan hidup di tempat terbuka dan tumbuh pada kemiringan yang tinggi (Delta, Ardinis, dan Syamsuardi, 2013).

Distribusi *Zingiber* di Indonesia dilaporkan sebanyak 52 jenis dan 6 jenis diantaranya merupakan jenis *Zingiber* yang terdistribusi di Sumatera. 6 jenis *Zingiber* tersebut yaitu *Z. loerzingii*, *Z. macradenium*, *Z. officinale*, *Z. gracile*, *Z. macroglossum*, dan *Z. macrorrhynchus* (Newman, Lhuillier dan Poulsen, 2004). Sebelumnya Miquel (1862) melaporkan 3 jenis *Zingiber* di Sumatera yaitu *Z. officinale*, *Z. zerumbet*, dan *Z. montanum*. Selanjutnya, Chandra, Nurainas, dan Syamsuardi (2015) mencatat 10 jenis *Zingiber* di Sumatera Barat. Jenis *Zingiber* yang ditemukan yaitu *Z. kunstleri*, *Z. macradenium*, *Z. officinale*, *Z. gracile*, *Z. zerumbet*, *Z. montanum*, *Z. multibracteatum*, *Zingiber cf loerzingii* dan 2 *Zingiber* tidak teridentifikasi. Selanjutnya Nurainas dan Arbain (2017) melaporkan 17 jenis

Zingiber yang terdistribusi dari Sumatera. Salah satu jenis yang dilaporkan adalah jenis *Zingiber* yang telah dieksekusi dari *Zingiber* tidak teridentifikasi sebelumnya dari hasil inventarisasi oleh Chandra, Nurainas, dan Syamsuardi (2015). Jenis tersebut dikenal dengan *Zingiber album*.

Dari data ini dapat kita ketahui adanya penambahan jenis *Zingiber* yang ditemukan saat eksplorasi. Selain itu, dapat diasumsikan juga bahwa distribusi *Zingiber* di Sumatera Barat cukup banyak dan dapat mewakili distribusi *Zingiber* di Sumatera. Namun masih ada 1 jenis *Zingiber* tidak teridentifikasi dan masih diragukan yaitu *Zingiber* cf. *Loerzingii* yang mirip dengan *Zingiber loerzingii*. Namun, *Zingiber* cf. *Loerzingii* yang ditemukan di Sumatera Barat ini memiliki perbedaan pada warna bunga dengan *Zingiber loerzingii* yang ditemukan di Sumatera Utara. Diketahui *Zingiber loerzingii* merupakan spesies endemik Sumatera dan selama ini dilaporkan hanya ditemukan di bagian Utara Sumatera (LIPI, 2022).

Selanjutnya, 1 jenis *Zingiber* tidak teridentifikasi yang ditemukan oleh Chandra, Nurainas, dan Syamsuardi (2015) di jalur merapi yang diberi label pengenalan *Zingiber* sp1 juga memiliki kemiripan warna braktea dengan *Z. album*. Diketahui, warna braktea putih pada genus *Zingiber* hanya dimiliki *Z.album* saja. Selain itu, berdasarkan hasil survei peneliti ke lapangan, ditemukan juga jenis *Zingiber* yang berbeda dari *Zingiber* lainnya. Kedua jenis tersebut ditemukan di lokasi yang berbeda yaitu di Simanau diberi label pengenalan *Zingiber* sp2 dan di Surian diberi label pengenalan *Zingiber* sp3. Kedua jenis ini belum teridentifikasi sampai tingkat spesies. Keduanya memiliki kemiripan di braktea namun *Zingiber*

sp2 tidak dikonsumsi sedangkan *Zingiber* sp3 dikonsumsi oleh masyarakat setempat.

Dari kasus *Zingiber* ini karakter morfologi memiliki keterbatasan untuk batasan suatu taksa sehingga ditemukan jenis *Zingiber* tidak teridentifikasi dan masih diragukan. Genus *Zingiber* merupakan salah satu genus yang sulit untuk diidentifikasi. Hal ini dikarenakan adanya karakter morfologi terutama perbungaan dari *Zingiber* yang sulit ditemukan dan tidak lengkap (Theilade, 1999). Oleh karena itu diperlukan teknik pendukung yaitu teknik molekuler untuk mendukung klarifikasi status taksonomi *Zingiber* yang masih diragukan dan belum teridentifikasi. Teknik ini juga dapat membantu mengidentifikasi, memperjelas hubungan taksa sebagai upaya pemanfaatan yang berkelanjutan (Syamsuardi, Chairul, dan Murni, 2018), mengeksplorasi hubungan filogenetik (Purty dan Chatterjee, 2006) mendukung kestabilan sistem klasifikasi dalam taksonomi (Hebert *et al.*, 2005) dan konservasi sumber daya (Roviglioni *et al.* 2000).

Penanda molekuler yang umum digunakan pada tumbuhan diantaranya ITS (*Internal Transcribed Spacer*) untuk genom inti, *rbcl*, *MatK*, *trnH-psbA*, *rpl16* dan *trnl-F* yang terletak di genom kloroplas. Kombinasi dari genom inti dan genom kloroplas akan memberikan data yang lebih akurat dan efektif (Fazekas *et al.*, 2009). Penanda molekuler yang digunakan dalam penelitian adalah ITS dan *MatK* yang dianggap dapat mendeterminasi spesies (Kress *et al.* 2005). Penelitian sebelumnya yang telah menggunakan penanda molekuler *MatK* dan ITS dalam analisis *Zingiberaceae* diantaranya Kress *et al.*, (2002, 2005); Selvaraj, Sarma, dan Ramalingam (2008); Poulsen *et al.*, (2018) dan Saha dan Sinha (2020).

Berdasarkan pendahuluan diatas, maka dilakukan penelitian ini untuk mengidentifikasi dan mengklarifikasi beberapa jenis *Zingiber* yang ditemukan berdasarkan penanda molekuler ITS dan MatK sehingga hasil yang didapatkan bisa digunakan sebagai data pendukung dalam identifikasi dan klarifikasi yang lebih akurat.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana karakter molekuler *Zingiber* yang diamati berdasarkan penanda molekuler ITS dan MatK?
2. Bagaimana hubungan kekerabatan *Zingiber* yang diamati berdasarkan penanda molekuler ITS dan MatK?
3. Bagaimana klarifikasi status taksonomi *Zingiber* yang diamati berdasarkan penanda ITS dan MatK?

C. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk menganalisis karakter molekuler *Zingiber* yang diamati berdasarkan penanda ITS dan MatK.
2. Untuk menganalisis hubungan kekerabatan *Zingiber* yang diamati berdasarkan penanda ITS dan MatK.
3. Untuk mengklarifikasi status taksonomi *Zingiber* yang diamati berdasarkan penanda ITS dan MatK.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah data hasil penelitian dapat mengisi khazanah ilmu pengetahuan terutama di bidang taksonomi molekuler Zingiberaceae. Penanda molekuler yang digunakan serta data sekuensing yang dihasilkan dapat menjadi referensi untuk penelitian terkait selanjutnya.



BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. *Zingiber* Mill.

Nama *Zingiber* kemungkinan berasal dari bahasa arab “Zanjabil” yang dalam bahasa sanskerta “Bingabera” yang berarti berbentuk seperti tanduk. Hal ini mengacu pada bentuk morfologi rimpang dari anggota genus *Zingiber* atau famili Zingiberaceae. Kemudian memunculkan nama klasik yaitu *zingiberi* dan akhirnya disebut dengan *Zingiber* dalam bahasa latin (Larsen *et al.*, 1999). Karakter pembeda genus *Zingiber* dengan genus lain yaitu pada karakter tangkai daun dan anther crest yang berbentuk tanduk (*horn-shaped*). Tangkai daun *Zingiber* mempunyai pembengkakan pada pangkal tangkai daun yang dikenal dengan pulvinus (Bai, Leong-Skornickova, dan Xia, 2015).

Zingiber memiliki rimpang yang dekat dengan permukaan tanah dan jarak antara daun berdekatan. Daun memiliki tesktur yang tipis, panjang daun jarang yang sampai 50 cm. Ligula berukuran pendek sampai panjang. Braktea cukup besar, biasanya berwarna cerah (merah, hijau, kuning, putih). Bunga rapuh, berumur pendek dan satu bunga terdapat di setiap braktea (Holtum, 1950). Pada umumnya *Zingiber* banyak ditemukan pada tempat yang lembab, sebagian di hutan yang hijau sepanjang tahun dan hutan dengan tanah yang kaya bahan organik, tetapi juga bisa tumbuh pada hutan sekunder, tepi hutan habitat yang terbuka serta pada semak bambu di tanah bebatuan (De Guzman dan Siemonsma, 1999).

Genus *Zingiber* dikelompokkan dalam family Zingiberaceae ordo Zingiberales, kelas Liliopsida, divisi Magnoliophyta. Klasifikasi family

Zingiberaceae ini diusulkan pertama kali pada tahun 1889 oleh Petersen dan disempurnakan menjadi empat subfamili dan empat tribus yang didasarkan pada data molekuler (Kress *et al.*, 2002). Sejauh ini daerah yang diketahui kaya akan Zingiberaceae adalah wilayah Malaysia, Indonesia, Brunei, Philipina, dan Papua (Larsen *et al.*, 1999). Pusat keanekaragamannya berada di selatan Asia dan Asia Tenggara (Takano dan Okada 2003).

Penelitian yang dilakukan Kress *et al.* (2002) mengenai phylogeny dan klasifikasi Zingiberacea berdasarkan penanda ITS dan MatK. Hasil yang didapatkan menerangkan hubungan kekerabatan antar genus dalam *Zingiberacea* dengan baik. Klasifikasi baru yang dikemukakan berupa pengenalan 4 subfamili dan 4 tribus. Hasil penelitian ini juga melaporkan bahwa banyak dari genus terbesar dalam family ini mungkin adalah parafiletik dan diperlukan banyak sampel untuk memastikan pengelompokkan dalam taksa ini (*Amomum*, *Alpinia*, *Etilingera*, *Boesenbergia*, dan *Curcuma*).

Klasifikasi *Zingiber* berdasarkan *inflorescence habit* atau bentuk perbungaan dikelompokkan menjadi 4 section yaitu sect. *Zingiber*, sect. *Dymczewiczia*, sect. *Cryptanthium* dan sect. *Pleuranthesis* (Backer 1894; Schuman 1904; Valetton 1918; cf. Theeralkupisut, 2012). Namun Theilade *et al.*, (1993) mengusulkan sect. *Dymczewiczia* bergabung dengan sect. *Zingiber* berdasarkan kesamaan bentuk serbuk sari dari kedua sekte ini. Selanjutnya Theeralkupisut (2012) menganalisis phylogeny genus *Zingiber* menggunakan penanda molekuler ITS. Didapatkan hasil bahwa sect. *Dymczewiczia* yang diwakilkan oleh *Zingiber*

pellitum berada pada kelompok sect. *Zingiber*. Hasil ini mendukung usulan Theiladae *et al.* (1993).

Pemanfaatan *Zingiber* telah banyak digunakan oleh masyarakat dalam kehidupan sehari-hari. Beberapa spesies *Zingiber* digunakan sebagai bumbu masak, obat-obatan, rempah, tanaman hias, bahan kosmetik, bahan minuman, bahan tonik rambut, penunjang upacara adat, dan sebagainya (Auliani, fitmawati dan Neri, 2014). *Zingiber officinale* merupakan jenis yang umum digunakan sebagai obat-obatan dan bumbu masak oleh masyarakat luas sejak dulu (Syahrajabian, Sun, dan Cheng, 2019). *Zingiber macradenium* terdistribusi di Simanau, Solok yang dimanfaatkan masyarakat lokal sebagai obat gigi (Ristoja., 2012; Agustin *et al.*, 2014). *Zingiber album* merupakan spesies baru yang dipublikasi tahun 2017 oleh Nurainas dan Arbain yang dimanfaatkan sebagai oalahan masakan oleh masyarakat local (Sukarjo, 2021).

Di Indonesia dilaporkan sebanyak 52 jenis *Zingiber* dan 6 jenis diantaranya merupakan jenis *Zingiber* yang terdistribusi di Sumatera yaitu *Z. loerzingii*, *Z. macradenium*, *Z. officinale*, *Z. gracile*, *Z. macroglossum*, dan *Z. macrorrhynchus* (Newman, Lhuillier dan Poulsen 2004). Selanjutnya, Chandra, Nurainas, dan Syamsuardi (2015) mencatat ada 10 jenis *Zingiber* yang ditemukan di Sumatera Barat yaitu *Z. kunstleri*, *Z. macradenium*, *Z. officinale*, *Z. gracile*, *Z. zerumbet*, *Z. montanum*, *Z. multibracteatum*, *Zingiber cf loerzingii* dan 2 *Zingiber* tidak teridentifikasi. Salah satu dari keduanya dipublikasi sebagai spesies baru dengan nama *Z. album* (Nurainas dan Arbain, 2017).

Dari data yang dilaporkan Chandra, Nurainas, dan Syamsuardi (2015) masih ada permasalahan taksonomi yang belum diselesaikan yaitu *Zingiber cf loerzingii* dengan *Zingiber loerzingii* yang memiliki morfologi yang sama dan hanya berbeda pada warna bunga. Diketahui bahwa *Zingiber loerzingii* merupakan jenis *Zingiber* asli Sumatera dan merupakan spesies endemik di Sumatera Utara. Berdasarkan data IUCN red list, *Zingiber loerzingii* berada pada kategori threatened spesies. Penyebarannya sangat terbatas dan ukuran populasinya tidak lebih dari seribu individu (LIPI, 2022).

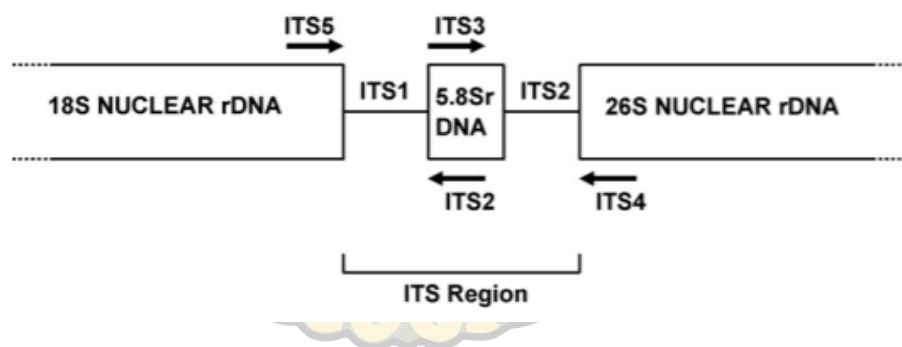
Satu *Zingiber* tidak teridentifikasi ditemukan di jalur pendakian gunung Merapi sehingga jenis ini diberi label *Zingiber* sp1. Secara morfologi *Zingiber* sp1 memiliki kemiripan dengan *Z. album* yaitu warna susunan bractea putih (Lampiran 2). Diketahui bahwa warna susunan bractea putih hanya dimiliki oleh *Z. album*. Berdasarkan persebarannya, *Z. album* dilaporkan di Sumatera Utara, Kabupaten Solok dan Kabupaten Pasaman Sumatera Barat. Masyarakat nagari Simanau mengenal *Z. album* dengan nama penggalan. Secara ekonomis, jenis ini dikonsumsi oleh masyarakat setempat sebagai olahan masakan.

Selain itu, saat di lapangan ditemukan 2 jenis *Zingiber* yang belum teridentifikasi sampai tingkat spesies. Jenis pertama, *Zingiber* ditemukan di Simanau dan diberi label *Zingiber* sp2. Jenis kedua, *Zingiber* yang ditemukan di Surian dan diberi label *Zingiber* sp3. Masyarakat local solok mengenal *Zingiber* sp3 dengan nama bilongkiang dan dikonsumsi sebagai olahan masakan. Berdasarkan morfologi bractea *Zingiber* sp2 dan *Zingiber* sp3 keduanya memiliki kemiripan (Lampiran 1). Namun pada saat di lapangan karakter morfologi *Zingiber*

sp2 ditemukan pada fase yang tidak berbunga sehingga perbandingan karakter morfologinya kurang lengkap.

B. Penggunaan ITS dalam Family Zingiberaceae.

Region *internal transcribed spacer* (ITS) terletak diantara daerah 18S, daerah 5.8S dan daerah 26S. Pada bagian antara daerah 18S dan daerah 5.8S terdapat beberapa ratus pasang basa DNA yang disebut ITS1 dan di antara daerah 5.8S dengan 26S terdapat daerah ITS2. Gen ribosom tersebut mempunyai tingkat konservasi yang sangat tinggi (Gomes *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2005). Menurut Soltis dan Soltis (1998) ITS pada daerah 18S-26S rDNA nuklear menjadi fokus utama untuk digunakan pada rekonstruksi filogenetik. Hal ini dikarenakan daerah ITS memiliki tingkat variasi yang tinggi dibandingkan dengan daerah lainnya pada rDNA subunit kecil dan subunit besar.



Gambar 1. Region ITS target (Baraket, 2006)

ITS (*internal transcribed spacer*) merupakan penanda molekuler yang banyak digunakan dalam studi filogenetik tumbuhan karena tingginya kemampuan diskriminasi spesies dan teknik amplifikasi yang mudah (Alvarez dan Wendel, 2003; Kress *et al.*, 2005). Penggunaan ITS didasarkan pada rDNA yang secara

alamiah terkonservasi dibandingkan dengan penanda molekuler lainnya, ITS merupakan penanda molekuler yang paling banyak data publikasinya. Berdasarkan hasil penelusuran penelitian Sukarjo (2021), ditemukan sekuen *Zingiber* berdasarkan penanda molekuler ITS sebanyak 280 sekuen data yang tersedia di GeneBank NCBI. Kemampuan diskriminasi lokus ITS2 adalah 99,5% pada tingkat genus dan 73,1% pada tingkat tingkat spesies dan diusulkan menjadi ITS2 sebagai barcode DNA untuk identifikasi Zingiberaceae (Shi, 2011).

Penelitian sebelumnya yang telah menggunakan penanda molekuler ITS diantaranya Sukarjo (2021) mengenai autentikasi *Zingiber album* Tumbuhan endemic Sumatera, Zaveska *et al.* (2012) yang menganalisis hubungan kekerabatan *Curcuma* dan mengajukan subgenus baru dalam *Curcuma* yang dinamai *Ecodemata* dengan penanda kloroplas lainnya, dan Ngamriadsakul *et al.* (2004) mengenai analisis tribe *Zingiberaceae* dan meneukan tribe ini mengelompok menjadi 2 kelompok utama yaitu kelompok *Hedychium* dan kelompok *Curcuma* dengan marker kloroplas lainnya,.

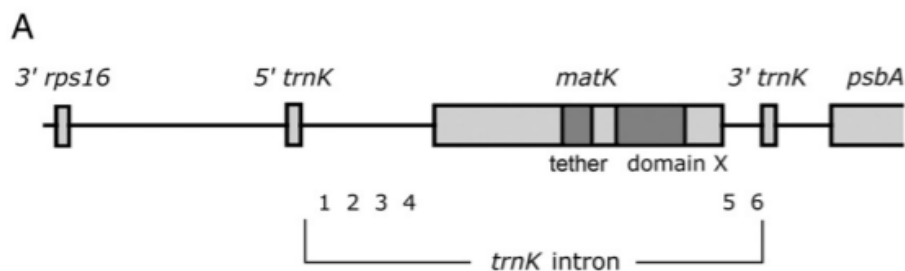
Daerah ITS mengalami perubahan atau mutasi sehingga bervariasi. Perkembangan sekuen rDNA subunit kecil 18S relatif lambat dan digunakan dalam studi hubungan kekerabatan pada tingkat spesies suatu organisme. Daerah ITS dalam pengulangan rRNA berkembang relatif cepat dan memungkinkan terjadi variasi diantara spesies dan populasi (Jamil, 2005). Analisis filogenetik dengan penanda ITS dapat digunakan untuk mengevaluasi hubungan antar jenis. Sekuens daerah ITS pada umumnya tetap atau dapat mengalami sedikit perubahan dalam

suatu jenis, namun masih memperlihatkan adanya perbedaan di antara jenis dalam suatu genus (Edel, 1998).

Daerah ITS mempunyai kelebihan dibandingkan dengan daerah molekuler target lain, diantaranya yaitu memiliki tingkat sensitivitas tinggi karena mempunyai sekitar 100 ulangan dalam genom. Daerah ITS juga memiliki laju evolusi yang tinggi dan terdapat pada semua gen rDNA eukaryot (Jorgensen *et al.*, 1987). sensitivitas cukup tinggi karena berukuran kecil (kurang lebih 700 bp), serta memiliki salinan yang banyak di dalam genom inti (Baldwin *et al.*, 1995).

C. Penggunaan MatK dalam Family Zingiberaceae

Menurut Yu *et al.* (2011), kesulitan dalam memilih gen spesifik untuk digunakan sebagai DNA barcoding tanaman disebabkan oleh ketidaksempurnaan dari setiap gen pada tanaman, baik kloroplas, mitokondria atau inti genom. Gen yang terdapat pada mitokondria tanaman perkembangannya lambat, sehingga tidak efektif untuk membedakan antar spesies tanaman yang berbeda. CBOL (Consortium Barcode of Life) dari kelompok kerja tanaman merekomendasikan pemakaian gen pada kloroplast yaitu ribulosa-1, 5-bisfosfat karboksilase oksigenase subunit besar (*rbcL*) dan *maturase* K (MatK) sebagai barcode standar pada tanaman (CBOL, 2009).



Gambar 2. Daerah *MatK* (Duffy, 2009)

Berdasarkan hasil penelusuran data di GeneBank NCBI sebelumnya, selain ITS ketersediaan data *Zingiber* menggunakan MatK lebih banyak dibandingkan dengan penanda molekuler lainnya. Gen *Maturase K* (MatK) kloroplas sangat terkonservasi dalam sistematika tanaman yang terlibat dalam penyambungan intron Grup II dan memiliki panjang 1500 bp yang terletak di intron trnK (Selvaraj, 2008). Gen kloroplas MatK merupakan sebagian besar variable gen coding dari angiospermae (Yu, 2011) dan diusulkan untuk menjadi barcode pada Zingiberaceae (Vinitha *et al.*, 2014).

Penelitian sebelumnya yang telah menggunakan penanda molekuler MatK diantaranya Kress *et al.* (2002) mengenai phylogeny Zingiberaceae dengan hasil pengelompokan family Zingiberaceae menjadi 4 subfamily yaitu Siphonochiloideae, Tamijioideae, Alpinioideae, dan Zingiberideae. Selanjutnya Jiranan *et al.* (2006) mengenai analisis genetik diversity dan identifikasi *Boesenbergia* Thailand, didapatkan hasil *Boesenbergia* mengelompok menjadi 3 kelompok utama dan pengelompokan ini sejalan dengan pengelompokan bentuk *inflorescence* dari *Boesenbergia*. Selvaraj, Sarma, dan Ramalingam (2008) yang menganalisis phylogeny sekuen Zingiberaceae berdasarkan gen MatK yang tersedia di NCBI dan mendapatkan hasil MatK memberikan data yang baik untuk barcoding tumbuhan.

Penanda molekuler MatK dibuat berdasarkan DNA kloroplas (cpDNA). Menurut Clegg *et al.* (1986) cpDNA sangat cocok untuk mempelajari evolusi dan filogenetik suatu tumbuhan. Hal ini dikarenakan cpDNA merupakan komponen yang cukup melimpah pada keseluruhan DNA pada tumbuhan sehingga sangat

mendukung dalam ekstraksi DNA beserta analisisnya. Kelebihan lain dari cpDNA dibandingkan dengan marka molekuler lainnya adalah jika sekuens cpDNA diketahui dapat ditelusuri mengenai perubahan gen, perubahan struktur genom, dan tingkat kecepatan evolusi gen. Selain itu, perubahan sekuens cpDNA dapat digunakan untuk memecahkan hubungan filogenetik tumbuhan pada tingkat evolusi yang paling dalam (Soltis *et al.*, 1998).

MatK adalah gen yang telah diusulkan untuk menjadi barcode pada tanaman (Yu *et al.*, 2011). MatK merupakan gen yang ada pada genom kloroplas tanaman yang mengandung domain maturase. MatK sebagai wilayah pengkodean memiliki laju evolusi yang sangat tinggi dan dapat diaplikasikan dalam merekonstruksi filogenetik taksonomi tingkat tinggi baik genus maupun species. MatK memiliki daerah yang menunjukkan tingkat mutasi yang tinggi (Hilu dan Liang, 1997).

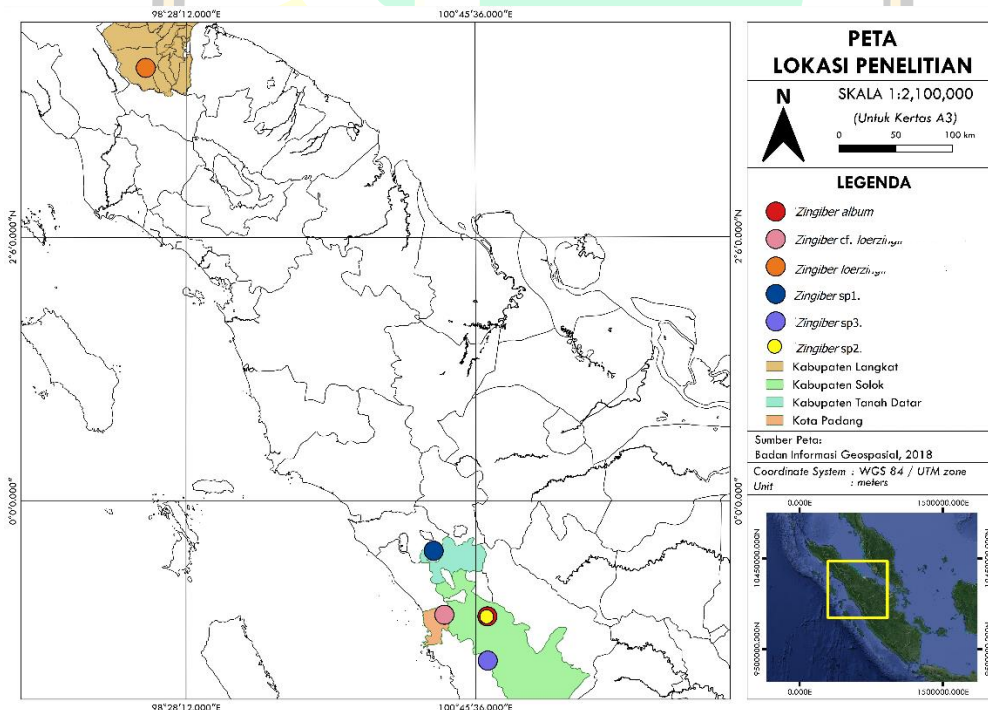
MatK juga salah satu bagian pengkodean yang paling cepat berkembang dari genom plastid dan diperkirakan dapat menjadi analog tanaman terdekat seperti barcode pada hewan yaitu CO1 (Hollingsworth *et al.*, 2011). Menurut Tamura (2004) urutan MatK berisi banyak indel (penyisipan atau penghapusan) di seluruh monokotil. Akan tetapi, jika dilakukan analisis yang tepat dapat memberikan data yang berguna dan signifikan untuk analisis molekuler taksa tingkat tinggi.

Kunci keberhasilan menggunakan penanda MatK yaitu dengan mengembangkan primer yang sesuai terhadap sampel tumbuhan yang digunakan, memiliki primer yang lebih spesifik dengan cara memilah – milah posisi dari region yang digunakan (Dunning dan Savolainen, 2010; Wicke dan Quand, 2009).

BAB III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan dari bulan September 2021 sampai April 2022. Lokasi pengambilan sampel dilakukan mengacu pada lokasi specimen *Zingiber* (Chandra, Nurainas dan Syamsuardi, 2015; Nurainas dan Arbain, 2017) yaitu di Nagari Surian Kabupaten Solok, Nagari Simanau Kabupaten Solok, Bukit Pinang Kota Padang, Gunung Merapi Kabupaten Tanah Datar, dan Batu Katak kabupaten Langkat (Gambar 3). Kemudian pengolahan dan analisis data dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) dan Laboratorium Genetika dan Biomolekuler Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Andalas Padang.



Gambar 3. Peta lokasi pengoleksian sampel

B. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode survei dan eksperimen. Metode survei digunakan pada tahapan observasi dan pengoleksian sampel langsung di lapangan. Metode eksperimen digunakan pada tahap pengerjaan di laboratorium. Kemudian data yang didapatkan dianalisis secara deskriptif.

C. Material, Alat dan Bahan

1. Material

Material yang digunakan adalah daun dari 6 jenis *Zingiber* yang dikoleksi di beberapa lokasi (Gambar 3).

2. Alat dan Bahan di Lapangan

Adapun alat yang digunakan dalam pengoleksian sampel di lapangan adalah kantung plastic, kantung teh, spidol, label gantung, dan alat tulis. Sedangkan bahan yang digunakan dalam pengoleksian sampel di lapangan adalah *silica gel*.

3. Alat dan Bahan di Laboratorium

Adapun alat yang digunakan adalah mesin PCR, pipet mikro, waterbath, cooling box, seperangkat elektroforesis, parafilm, mesin vortex, timbangan analitik, hot plat, oven, UV transluminator, lemari es, unit gel dokumentasi, tissue, sarung tangan, masker, spidol permanen, laptop dan alat tulis. Sedangkan bahan yang digunakan adalah sampel daun kering dari tumbuhan *Zingiber* yang dikoleksi di lapangan. Bahan-bahan lainnya, antara lain: alkohol 70%, ethanol, isopropanol dingin, agarose, ethidium bromida, DNA loading dye, ddH₂O, buffer TE, buffer

TBE, DNA, MasterMix, nitrogen cair, aquadest, silica gel, kit isolasi dan dua pasang primer.

Tabel 1. Primer yang digunakan dalam analisis

Primer	Sekuens (5'-3')	Referensi
ITS		
ITS5-F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White (1990)
ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
MatK		
Trnk1F	CTCAACGGTAGAGTACTCG	Manos and Steele, 1997 Kress <i>et al.</i> 2002
M1R	CGTTTCACAAGTACTGAACTA	

D. Prosedur Kerja

1. Pengoleksian Sampel

Pengoleksian sampel tumbuhan dilakukan di beberapa lokasi (Gambar 3). Sampel dikoleksi berupa daun segar *Zingiber* dan organ generative lainnya. Kemudian organ generative dilanjutkan pekerjaannya di Herbarium ANDA dan ditanam di rumah kaca. Adapun sampel daun segar dimasukkan ke dalam gel yang telah diisi dengan silica gel dan dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi DNA.

2. Isolasi DNA

Isolasi DNA pada penelitian ini dilakukan sesuai dengan protokol Isolate II Plant DNA Kit Bioline. Isolasi DNA diawali dengan penyediaan material daun muda tanaman *Zingiber* sebanyak 20 mg. Material ini dihaluskan menggunakan mortar dengan penambahan nitrogen cair. Hasil gerusan dipindahkan ke dalam tabung *ependrof* 1.5 dan ditambahkan larutan lisis buffer PA1 sebanyak 400 μ l. Sampel dihomogenkan dengan *vortex* lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 65 °C.

Filter isolate II (ungu) diletakkan ke dalam tube 2 mL dan dituangkan semua larutan isolasi ke dalamnya. Kemudian semua sampel disentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan 11000xg selama 2. Selanjutnya dikumpulkan larutan yang turun atau terpisah ke tube 2 mL dan filter isolate II (ungu) dibuang. Jika pelet masih terlihat atau terbawa di tube 2 mL, maka pindahkan supernatan yang jernih ke tube baru tanpa mengaduk dan membawa pelet tersebut.

Selanjutnya sampel ditambahkan 450 μ l. binding buffer PB kemudian di vortex. Kemudian sampel dituangkan ke tube koleksi 2 mL baru yang telah diletakkan spin column isolate II (hijau) di atasnya (sampel dituangkan max 700 μ l.). Selanjutnya sampel disentrifuse dengan kecepatan 11000xg selama 1 menit pada suhu 27 °C. Larutan yang melewati spin column dibuang secara perlahan. Kemudian, sampel ditambahkan 400 μ l wash buffer PAW1. Selanjutnya sampel disentrifugasi dengan kecepatan 11000xg selama 1 menit pada suhu 27 °C dan buang larutan yang melewati spin column.

Kemudian, sampel ditambahkan 700 μ l wash buffer PAW2. Selanjutnya sampel disentrifugasi dengan kecepatan 11000xg selama 1 menit pada suhu 27 °C dan buang larutan yang melewati spin column. Selanjutnya, sampel ditambahkan 200 μ l wash buffer PAW2 dan disentrifugasi dengan kecepatan 11000xg selama 2 menit pada suhu 27 °C untuk remove wash buffer dan mengeringkan membran dengan komplit. Kemudian spin column diletakkan ke tube 1,5 mL baru dan ditambahkan 50 μ l buffer elusi yang telah dipanaskan sebelumnya (65 °C).

Sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu 65 °C. Kemudian sampel disentrifugasi dengan kecepatan 11000xg selama 1 menit pada suhu 27 °C.

Kemudian sampel ditambahkan 50 μl buffer elusi yang telah dipanaskan sebelumnya ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kemudian sampel disentrifugasi dengan kecepatan $11000\times g$ selama 1 menit pada suhu $27\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Elektroforesis Hasil Isolasi

Elektroforesis dilakukan untuk melihat kualitas DNA hasil isolasi. agarosa 1 gram ditimbang lalu dilarutkan dengan larutan buffer TBE 0.5kali sebanyak 100 ml kemudian dipanaskan hingga larut dan ditambahkan 0.5 μl *ethidium bromida* (EtBr). Agarosa didinginkan pada suhu kamar sampai hangat. Selanjtnya larutan dituangkan ke catatan gel elektroforesis yang sudah dipasang sisir (cetakan sumur) dan ditunggu sampai gel padat. 3 μl sampel DNA yang telah diisolasi lalu dicampurkan 1 μl DNA loading dye. Campuran tersebut diinjeksikan ke dalam sumur gel pada gel agarosa.

Elektroforesis dijalankan menggunakan tegangan sebesar 100 volt selama 30 menit (jika diperlukan penambahan waktu dapat dilakukan, menyesuaikan posisi pita DNA dengan kecepatan perpindahan dan jarak tempuh DNA). Hasil elektroforesis diamati di bawah *UV transilluminator* lalu didokumentasikan untuk mengetahui kualitas DNA. Uji kuantitas DNA dilakukan dengan melihat konsentrasi DNA melalui panjang gelombang A260 dan A280 menggunakan NanoDrop Spektrofotometer.

4. Amplifikasi DNA

Hasil isolasi DNA yang telah diperoleh selanjutnya akan diamplifikasi menggunakan konsentrasi DNA hasil yang digunakan. Hasil uji konsentrasi dengan

NanoDrop digunakan sebagai acuan pengenceran DNA hasil isolasi. Cocktail PCR yang digunakan terdiri atas 12,5 µl MasterMix, 3,5 µl ddH₂O, 5 µl DNA hasil isolasi, dan 2 µl masing-masing primer *forward* dan *reverse* untuk amplifikasi *Zingiber* (komposisi cocktail PCR dapat diubah, disesuaikan dengan kondisi pita saat didokumentasi). Kondisi PCR yang digunakan diatur sedemikian rupa sesuai dengan primer yang digunakan (Tabel 2).

Tabel 2. Prosedur kerja PCR sesuai dengan primer yang digunakan

Primer	Tahapan	Suhu	Durasi	Siklus	Reference
ITS	Denaturasi awal	95°C	2 Menit	35	Poulsen, 2018
	Denaturasi	95°C	45 Detik		
	Annealing	50-55°C	30 Detik		
	Ekstensi	72°C	30 Detik		
	Ekstensi akhir	72°C	6 Menit		
MatK	Denaturasi awal	95°C	2 Menit	35	Poulsen, 2018
	Denaturasi	95°C	45 Detik		
	Annealing	50-55°C	30 Detik		
	Ekstensi	72°C	30 Detik		
	Ekstensi akhir	72°C	6 Menit		

Hasil amplifikasi selanjutnya divisualisasikan menggunakan gel elektroforesis sesuai dengan prosedur pada bagian 3. Namun pada proses kali ini, DNA hasil amplifikasi tidak ditambahkan *loading dye*. Proses amplifikasi dinyatakan berhasil apabila hasil visualisasi memperlihatkan adanya satu pita DNA (fragmen) berukuran sesuai dengan ekspektasi ukuran ampikon dari masing-masing primer.

5. Purifikasi Produk PCR dan Saquensing DNA

Produk PCR selanjutnya dikirim untuk purifikasi dan analisis sequensing dua arah ke *First Base Sequencing Service* di Malaysia.

E. Analisis Data

1. Penyatuan Sekuen DNA (Contig DNA)

Hasil sekuen *forward* dan *reverse* DNA kemudian *dicontig* (disatukan) menggunakan program DNA STAR (Burland, 2000) sehingga diperoleh urutan DNA utuh. Kemudian dilakukan pengecekan dan koreksi secara manual jika terdapat sekuen yang memiliki tanda minus (-) dan huruf selain A, C, T dan G pada urutan basa nukleotida. Untuk lebih memastikan hasil penyatuan sekuen telah benar maka dilakukan pengkoreksian kembali dengan melihat puncak-puncak elektroforegram pada setiap basa nukleotida.

Hasil penyatuan sekuen DNA menggunakan DNA STAR kemudian dijadikan input dalam pencarian kesamaan gen menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Analisis ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan memverifikasi suatu spesies dengan membandingkan sekuens spesies yang diperoleh dengan sekuens-sekuens gen yang terdaftar dalam *database* situs resmi NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang telah tersedia.

2. Analisis Karakter Molekuler

Sekuen yang telah disejajarkan dengan menginput data sekuen DNA ke file ClustalX dalam bentuk program pearson (Fasta) (Thompson *et al.*, 1997). Hasil *alignment* kemudian diperiksa dengan menggunakan program Bioedit (Hall, 1999). Kemudian dilanjutkan dengan analisis sekuen polimorfik. Data dianalisis

menggunakan program MEGA X (Kimura *et al.*, 2018). Proses ini dilakukan dengan memasukkan data dalam format fasta. Analisis sekuen dilakukan untuk melihat perubahan basa nukleotida.

Selain itu juga dilakukan analisis jarak genetik untuk menghitung jarak genetic antar spesies yang dianalisis menggunakan program MEGA X. Analisis untuk menghitung jarak genetik dilakukan dengan cara menginput data sekuen align dalam bentuk format Fasta pada lembar kerja MEGA. Kemudian klik analyze dan pilih *nucleotida sequence*. Selanjutnya, pilih menu distance untuk menghitung sequence divergence, pilih Compute between Group Mean Distance dan pilih Kimura-2-parameter model pada Method. Selanjutnya, data disimpan dalam format excel.

3. Analisis Hubungan Kekerbatan

Analisis ini dilakukan dengan penambahan sekuen *Zingiber* dan *outgroup* (Tabel 3 dan 4) yang didapatkan dari data GenBank. Analisis pohon filogenetik menggunakan program MEGA X.3.2 (*Moleculer Evolutionary Genetics Analysis*) (Kimura *et al.*, 2018). Pertama, data sekuen *align* dari semua sekuen diinput kedalam lembar kerja MEGA dengan format data fasta dengan mengklik file dan pilih open file/session. Selanjutnya klik open dan akan muncul pilihan *analyze or alignment* file. Pilih *analyze* dan *nucleotide sequence*. Selanjutnya pilih *Phylogeny* untuk membuat pohon filogenetik. Analisis filogenetik dilakukan dengan pembuatan pohon filogenetik menggunakan kombinasi metode *Neighbour-joining* (NJ) dan *Maximum Likelihood* (ML).

Metode Menurut Saitou dan Nei (1987) metode *Neighbor-Joining* (NJ) bekerja pada jumlah perubahan diantara masing-masing pasangan dalam kelompok untuk mengkonstruksi pohon filogenetik. Pasangan sekuen yang mempunyai jumlah perubahan terkecil diantara mereka disebut dengan *neighbours*. *Maximum-Likelihood* menggunakan kalkulasi untuk menemukan pohon terbaik dalam set sekuen. Metode ini mempertimbangkan untuk masing-masing pohon, jumlah perubahan sekuen atau mutase yang terjadi, yang memeberikan variasi sekuen (Dharmayanti, 2011). Resampling *bootstrap* dilakukan dengan iterasi (pengulangan) sebanyak 1000 kali.

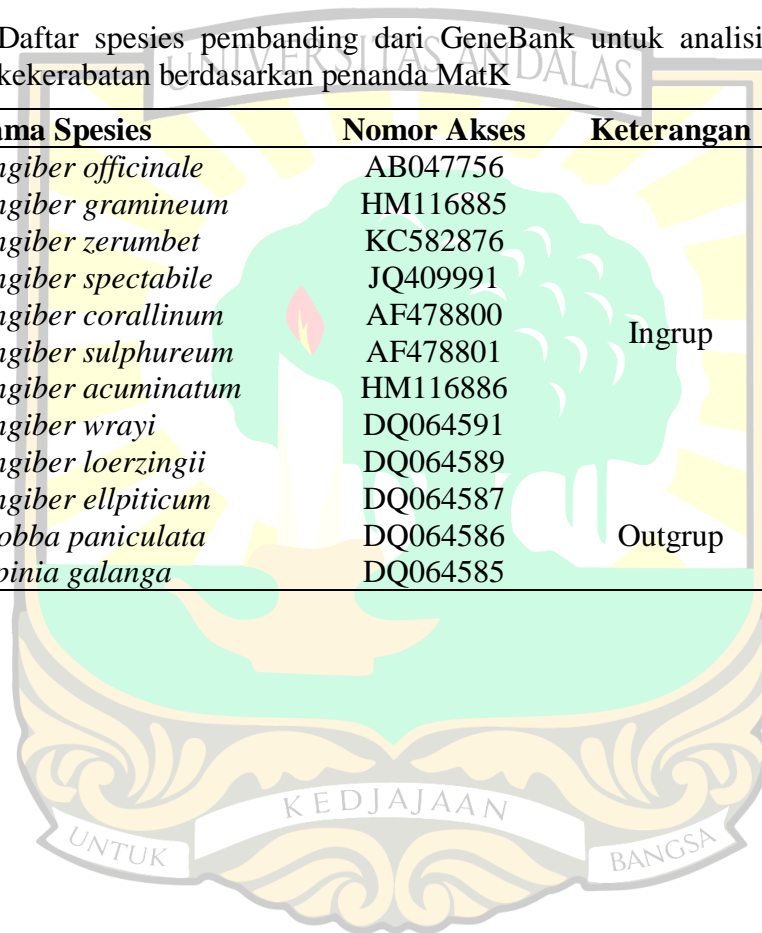
Tabel 3. Daftar spesies pembanding dari genebank untuk analisis hubungan kekerabatan berdasarkan penanda ITS

No	Nama Spesies	Nomor Akses	Keterangan
1.	<i>Zingiber wrayi</i>	AF478802	
2.	<i>Zingiber kawagoi</i>	HM116885	
3.	<i>Zingiber zerumbet</i>	KC582876	
4.	<i>Zingiber capitatum</i>	JQ409991	
5.	<i>Zingiber gramineum</i>	AF478800	
6.	<i>Zingiber sulphureum</i>	AF478801	
7.	<i>Zingiber shuanglongensis</i>	HM116886	
8.	<i>Zingiber citriodorum</i>	DQ064591	
9.	<i>Zingiber corallinum</i>	DQ064587	
10.	<i>Zingiber isanense</i>	DQ064586	
11.	<i>Zingiber montanum</i>	DQ064585	
12.	<i>Zingiber ottensii</i>	DQ064582	
13.	<i>Zingiber barbatum</i>	DQ064578	
14.	<i>Zingiber newmanii</i>	DQ064575	
15.	<i>Zingiber parishii</i>	DQ064576	
16.	<i>Zingiber mioga</i>	KJ025068	Ingrup
17.	<i>Zingiber spectabile</i>	AF414499	
18.	<i>Zingiber coloratum</i>	AF414498	
19.	<i>Zingiber pellitum</i>	MK811016	
20.	<i>Zingiber wightianum</i>	KM983550	
21.	<i>Zingiber ligulatum</i>	KM983543	
22.	<i>Zingiber papuanum</i>	KU215127	
23.	<i>Zingiber roseum</i>	KJ872281	
24.	<i>Zingiber odoriferum</i>	KJ872246	
25.	<i>Zingiber nimmonii</i>	KJ872244	

26.	<i>Zingiber neesatum</i>	KJ872236	
27.	<i>Zingiber teres</i>	EF488009	
28.	<i>Zingiber ultralimitale</i>	KU891639	
29.	<i>Zingiber striolatum</i>	HM116888	
30.	<i>Zingiber longipedunculatum</i>	AB097254	
31.	<i>Zingiber acuminatum</i>	MN803333	
32.	<i>Zingiber officinale</i>	DQ064590	
33.	<i>Alpinia galanga</i>	MN545635	Outgrup
34.	<i>Globba paniculata</i>	AB049296	

Tabel 4. Daftar spesies pembandingan dari GeneBank untuk analisis Hubungan kekerabatan berdasarkan penanda MatK

No	Nama Spesies	Nomor Akses	Keterangan
1.	<i>Zingiber officinale</i>	AB047756	
2.	<i>Zingiber gramineum</i>	HM116885	
3.	<i>Zingiber zerumbet</i>	KC582876	
4.	<i>Zingiber spectabile</i>	JQ409991	
5.	<i>Zingiber corallinum</i>	AF478800	Ingrup
6.	<i>Zingiber sulphureum</i>	AF478801	
7.	<i>Zingiber acuminatum</i>	HM116886	
8.	<i>Zingiber wrayi</i>	DQ064591	
9.	<i>Zingiber loerzingii</i>	DQ064589	
10.	<i>Zingiber ellipticum</i>	DQ064587	
11.	<i>Globba paniculata</i>	DQ064586	Outgrup
12.	<i>Alpinia galanga</i>	DQ064585	



BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses isolasi DNA dari enam sampel daun *Zingiber* telah berhasil dilakukan dengan menggunakan protokol isolasi Kit Bioline. Hasil Isolasi DNA dari enam sampel daun *Zingiber* memunculkan pita DNA yang jelas dan terang (Lampiran 3). Keseluruhan sampel telah diamplifikasi menggunakan ITS dan MatK. Berdasarkan keberhasilan proses amplifikasi, penanda ITS cenderung lebih sulit didapatkan bila dibandingkan dengan penanda MatK karena diperlukan beberapa kali pengulangan untuk mendapatkan optimasi suhu *annealing* dengan hasil pita yang baik. Masing-masing primer dan sampel *Zingiber* memiliki suhu optimum *annealing* yang berbeda-beda yang ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Optimasi suhu *annealing* masing-masing jenis *Zingiber*

Jenis	Suhu annealing (°C)	
	ITS	MatK
<i>Zingiber</i> sp1	53,2	52,6
<i>Zingiber</i> sp2	55,2	52,6
<i>Zingiber</i> sp3	55	50,9
<i>Zingiber album</i>	51	55,2
<i>Zingiber loerzingii</i>	50,6	53,2
<i>Zingiber cf loerzingii</i>	53,2	54

Berdasarkan Poulsen *et al.* (2018) suhu yang disarankan pada tahap *annealing* untuk ITS dan MatK adalah 55 °C. Namun, pada saat proses PCR untuk mendapatkan suhu optimum *annealing* dilakukan modifikasi suhu pada ITS dan MatK yaitu pada kisaran suhu 50,6-55 °C (Tabel 5). Hasil sekuen forward dan reverse masing-masing sampel *Zingiber* memiliki peak yang bagus sehingga bisa disatukan untuk mendapatkan sekuen lengkap dari masing-masing penanda

A. Analisis Karakter Molekuler

Analisis karakter molekuler dilakukan dari analisis sekuen menggunakan BLAST untuk verifikasi sekuen hasil sekuensing dengan data sekuen yang ada di website NCBI. Hasil yang didapatkan adalah keenam sekeun *Zingiber* diidentifikasi sebagai kelompok *Zingiber* (Lampiran 4). Tingkat kesamaan (homolog) hasil BLAST penanda ITS berkisar 92,72-99,22% dan penanda MatK berkisar 98,56-99,67% (Lampiran 4). Nilai tersebut menunjukkan rentang kesamaan sampel yang digunakan berdasarkan penanda ITS dan MatK. Adapaun perbedaan hasil identifikasi yang didapatkan saat di lapangan dan di BLAST diduga kuat karena kurang tersedianya data sekuen pada GenBank terkait jenis-jenis *Zingiber* terutama di wilayah Sumatera. Contohnya *Zingiber album* teridentifikasi sebagai *Z. spectabile* dan *Zingiber* sp2 sebagai *Z. Spectabile*.

Hasil sekuen yang telah di BLAST dan disejajarkan (*Allignment*) kemudian dilakukan pengamatan menggunakan program MEGA untuk mendapatkan perbandingan karakteristik sekuen berdasarkan dua penanda yang digunakan (Tabel 6). Karakteristik sekuen DNA ditentukan berdasarkan keenam sampel yang diisolasi dan ditambah sekuen *Z.officinale* dari GenBank sebagai *type species* untuk *Zingiber* sebagai data pembandingan dalam analisis karakteristik sekuen.

Panjang fragmen sampel yang didapatkan berbeda antara penanda ITS dan MatK. Kisaran panjang fragmen sampel *Zingiber* menggunakan penanda ITS adalah 665-714 bp Sedangkan kisaran panjang fragmen sampel *Zingiber* menggunakan penanda MatK adalah 914-1012 bp (Tabel 6). Kisaran panjang fragmen sekuen yang dihasilkan ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian

sebelumnya. Kisaran panjang sekuen DNA menggunakan penanda ITS adalah 500-700 (Alvarez dan Wendel, 2003; Kress *et al.*, 2005; Theralkupisut, 2012). sedangkan penanda MatK adalah 900-1240 bp (Vinitha *et al.*, 2014; Kress *et al.*, 2005; Syamsuardi *et al.*, 2018).

Tabel 6. Perbandingan karakteristik sekuen *Zingiber* berdasarkan penanda ITS dan MatK

No	Karakteristik Sekuen	ITS	MatK
1.	Panjang Sekuen (pb)	665-714	914-1012
2.	Panjang Sekuen dalam Analisis data (pb)	641	974
3.	Persentase Jumlah G+C (%)	58,8	30,6
4.	Persentase Jumlah A+T (%)	41,2	69,4
5.	Rentang Jarak Genetik (%)	1-17	0,4-3,5
6.	Karakter konservatif(%)	487	910
7.	Karakter informatif (%)	138	46

Persentase komposisi basa G-C genus *Zingiber* berdasarkan penanda ITS lebih tinggi yaitu 58,8% dibandingkan dengan penanda MatK yaitu 30,6%. Sedangkan komposisi basa A-T genus *Zingiber* berdasarkan penanda MatK lebih tinggi yaitu 69,4% dibandingkan dengan penanda ITS yaitu 41,2% (Tabel 6). Hal ini sesuai dengan Degtjareva *et al.* (2012) bahwa genom kloroplas memiliki kandungan A + T yang lebih banyak, dimana ditemukan juga di region noncoding seperti penanda *psbA-trnH*.

Penelitian lain oleh Theralkupisut (2012) pada genus *Zingiber* berdasarkan penanda ITS, mendapatkan kandungan A + T yaitu 41,91% dan G + C yaitu 58,08%. Analisis konten GC dari urutan nukleotida gen matK dalam yang leguminosae berkisar antara 27,29% sampai 30,71% (Udensi *et al.*, 2017). Berdasarkan hal ini, dapat dikatakan bahwa komposisi G-C pada genom inti lebih tinggi bila dibandingkan dengan kloroplas. Kandungan GC lebih rendah di

tumbuhan dikotil dibandingkan tumbuhan monokotil (Li dan Du, 2014). Kandungan GC monokotil bervariasi antara 33,6-48,9% (Smarda *et al.*, 2014).

Jarak genetik yang didapatkan berdasarkan penanda ITS dan MatK menunjukkan data yang berbeda. Penanda ITS memiliki rentang jarak genetik intraspesifik genus *Zingiber* yang lebih besar yaitu 1-17% sedangkan Penanda ITS memiliki rentang jarak genetik intraspesifik genus *Zingiber* yaitu 0,4-3,5% (Tabel 6). Hasil ini tidak jauh berbeda dari rentang jarak genetik dalam satu genus *Alpinia* (Zingiberaceae) berdasarkan penanda ITS yaitu 0,2-12,3% (Maulidah *et al.*, 2019). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Vinitha *et al.* (2014) menggunakan penanda MatK, didapatkan bahwa kisaran jarak genetik intraspesifik dalam Zingiberaceae adalah 0,03-0,09% dan interspesifik adalah 1,9-2,9 %.

Total panjang basa dari keseluruhan sampel yang disejajarkan dalam analisis data menggunakan penanda ITS adalah 641 bp, dimana terdapat 487 bp karakter konservatif dan 138 bp karakter informatif. Sementara itu, panjang basa menggunakan penanda MatK adalah 974 bp, dimana terdapat 910 bp karakter konservatif dan 46 bp karakter informatif (Tabel 6). Berdasarkan jumlah karakter informatif basa ketujuh sekuen *Zingiber* didapatkan hasil bahwa penanda ITS memiliki karakter informatif yang lebih tinggi dibandingkan dengan penanda MatK sehingga dapat diartikan penanda MatK memiliki karakter yang lebih konstan dibandingkan dengan penanda ITS.

Berdasarkan penanda ITS dari ketujuh sampel yang diamati, ditemukan 138 karakter informatif dengan 68 karakter parsimony dan 70 singleton. Karakter informatif menggambarkan jumlah basa berbeda yang dimiliki oleh ketujuh

Zingiber yang dianalisis. Perbedaan basa paling banyak dengan *Z. officinale* adalah *Z. loerzingii* yaitu 92 basa. Sedangkan perbedaan basa paling sedikit dengan *Z. officinale* adalah *Zingiber* sp3 yaitu 65 basa. *Zingiber* sp2, *Zingiber* sp1, *Z album*, dan *Zingiber cf. loerzingii* secara berturut-turut memiliki perbedaan basa dengan *Z. officinale* sebanyak 66, 70, 74, 80 (Tabel 7). Urutan posisi perbedaan basa *Zingiber* yang dikoleksi berdasarkan penanda ITS dapat dilihat pada Lampiran 7.

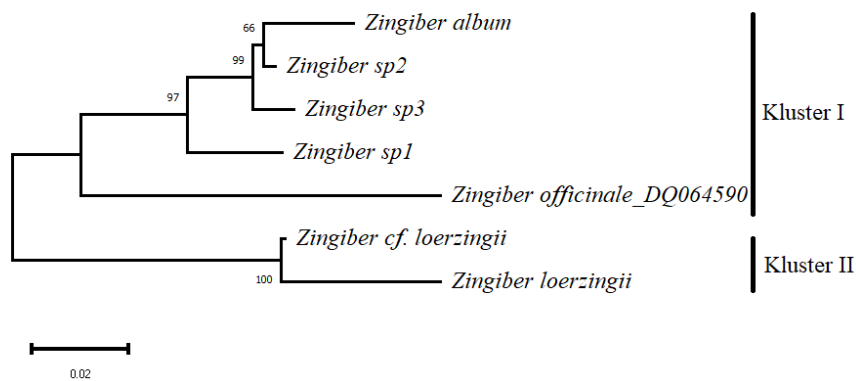
Tabel 7. Perbedaan basa *Zingiber* yang dikoleksi berdasarkan penanda ITS.

No	Spesies	1	2	3	4	5	6	7
1.	<i>Z. officinale</i>							
2.	<i>Z. album</i>	74						
3.	<i>Zingiber</i> sp1	70	34					
4.	<i>Zingiber</i> sp2	66	12	25				
5.	<i>Zingiber</i> sp3	65	18	28	7			
6.	<i>Zingiber cf. loerzingii</i>	80	77	62	67	67		
7.	<i>Z. loerzingii</i>	92	87	75	77	77	19	

Perbedaan basa ini dapat dikaitkan dengan hubungan kekerabatannya. Semakin banyak perbedaan basa yang dimiliki maka semakin jauh hubungan kekerabatannya dan begitu pula sebaliknya. Berdasarkan analisis hubungan kekerabatan yang dilakukan dari ketujuh sampel yang diamati, penanda ITS dan MatK memberikan hasil pengelompokan yang mirip yaitu terdapat dua kluster yang terdiri dari kluster I dan kluster II. Kluster I terdiri dari *Zingiber* sp1, *Zingiber* sp2, *Zingiber* sp3, *Z album*, dan *Z. officinale* sedangkan kluster II terdiri dari *Z. loerzingii* dan *Zingiber cf. loerzingii* (Gambar 4 dan 5).

Berdasarkan hubungan kekerabatan ketujuh sampel *Zingiber*, *Z album* dengan *Zingiber* sp1 berada pada subkluster yang berbeda. Perbedaan jumlah basa yang banyak menjadi salah satu faktor terpisah *Z album* dengan *Zingiber* sp1 pada pohon filogeni (Gambar 4). Perbedaan basa yang dimiliki *Z album* dengan *Zingiber*

sp1 sebanyak 34 basa. *Zingiber* sp2 memiliki sister taksa dengan *Z album* dan memiliki perbedaan basa sebanyak 12 basa. Sementara itu, *Zingiber* sp2 dengan *Zingiber* sp3 memiliki perbedaan basa sebanyak 7 basa dan *Zingiber* cf. *loerzingii* dengan *Z. loerzingii* memiliki perbedaan basa sebanyak 19 basa (Tabel 7).



Gambar 4. Fenogram hubungan kekerabatan *Zingiber* yang dikoleksi berdasarkan penanda ITS

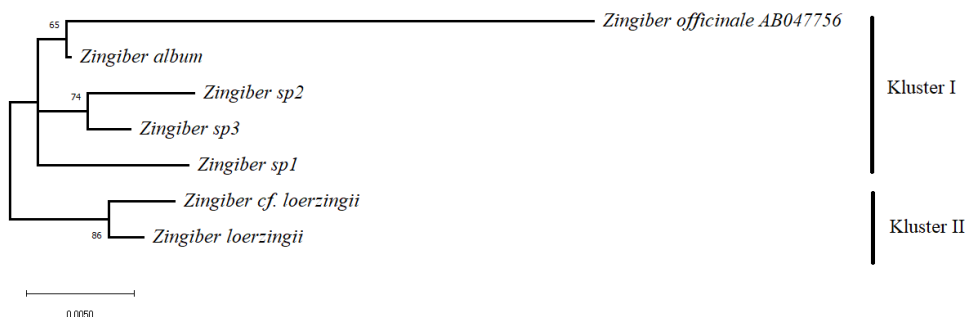
Berdasarkan penanda MatK ditemukan 46 karakter informatif dengan 13 karakter parsimony dan 33 singleton. Perbedaan basa paling banyak dengan *Z. officinale* adalah *Zingiber* cf. *loerzingii* yaitu 31 basa. Sedangkan perbedaan basa paling sedikit dengan *Z. officinale* adalah *Zingiber album* yaitu 21 basa (Tabel 8). Secara berturut-turut perbedaan basa antara *Z. officinale* dengan *Z. loerzingii*, *Zingiber* sp1, *Zingiber* sp2, dan *Zingiber* sp3 adalah sebanyak 27, 28, 29, dan 29.

Tabel 8. Perbedaan basa *Zingiber* yang dikoleksi berdasarkan penanda MatK

No	Spesies	1	2	3	4	5	6	7
1.	<i>Z. officinale</i>							
2.	<i>Z. album</i>	21						
3.	<i>Zingiber</i> sp1	28	8					
4.	<i>Zingiber</i> sp3	29	9	12				
5.	<i>Zingiber</i> sp2	29	9	11	8			
6.	<i>Zingiber</i> cf. <i>loerzingii</i>	31	13	14	15	9		
7.	<i>Z. loerzingii</i>	31	9	12	15	14	4	

Perbedaan basa *Z. album* dengan *Zingiber* sp1 dan *Zingiber* sp2 dengan *Zingiber* sp3 masing-masingnya adalah 8. Sementara itu, perbedaan basa paling sedikit dari ketujuh sampel yang dianalisis berdasarkan penanda MatK yaitu pada *Zingiber* cf. *loerzingii* dengan *Z. loerzingii* yang memiliki perbedaan basa sebanyak 4 basa. Berdasarkan analisis hubungan kekerabatan yang dilakukan, *Zingiber* cf. *loerzingii* dengan *Z. loerzingii* berada pada kluster yang sama dan keduanya menjadi sister taksa pada analisis ITS dan MatK (Gambar 4 dan 5). Urutan posisi perbedaan basa *Zingiber* cf. *loerzingii* dengan *Z. loerzingii* berdasarkan penanda MatK yaitu pada urutan 950, 951, 973, 974 (Lampiran 8).

Berdasarkan analisis hubungan kekerabatan dari ketujuh sampel *Zingiber* yang dilakukan, terbentuk dua kluster besar yaitu kluster I terdiri dari *Zingiber* sp1, *Zingiber* sp2, *Zingiber* sp3, *Z. album*, dan *Z. officinale* sedangkan kluster II terdiri dari *Z. loerzingii* dan *Zingiber* cf. *loerzingii* (Gambar 5). *Z. officinale* memiliki sister taksa dengan *Zingiber album*. Perbedaan basa yang sedikit dibandingkan *Zingiber* lainnya menjadi salah satu faktor dekatnya hubungan kekerabatan antara *Z. album* dengan *Z. officinale*.



Gambar 5. Fenogram hubungan kekerabatan *Zingiber* yang dikoleksi berdasarkan penanda MatK

B. Hubungan Kekerabatan *Zingiber*

Pada analisis hubungan kekerabatan jumlah sekuen *Zingiber* yang digunakan dari genbank untuk penanda ITS dan MatK tidak sama banyak. Hal ini disebabkan karena keterbatasan jumlah sekuen jenis-jenis *Zingiber* yang tersedia untuk penanda ITS dan MatK. Jumlah data sekuen penanda MatK lebih sedikit tersedia dibandingkan dengan jumlah data ITS di genbank.

Analisis hubungan kekerabatan *Zingiber* berdasarkan penanda ITS telah dilakukan dengan menggunakan 6 sekuen *Zingiber* koleksi pribadi dan 34 sekuen *Zingiber* dari genbank, yang terdiri dari 32 sekuen *Zingiber* dan 2 sekuen sebagai *outgroup* yaitu *Alpinia galanga* dan *Globba paniculata*. Sedangkan analisis hubungan kekerabatan *Zingiber* berdasarkan penanda MatK telah dilakukan dengan menggunakan 6 sekuen *Zingiber* koleksi pribadi dan 12 sekuen dari genbank, yang terdiri dari 10 sekuen *Zingiber* dan 2 sekuen yang dijadikan *outgroup* yaitu *Alpinia galanga* dan *Globba paniculata*.

Penambahan *outgroup* dalam analisis dilakukan untuk mendapatkan informasi yang lebih meyakinkan dari sekuen yang berdekatan dengan kelompok taksa yang sedang diteliti. *Outgroup* sangat dibutuhkan sebagai pembanding dan dilibatkan dalam analisis kekerabatan (Rahayu dan Nugroho, 2015). Menurut Li dan Graur (1991) pemilihan *outgroup* yang terlalu jauh hubungan kekerabatannya dapat menyebabkan kesalahan dalam memprediksi pohon filogenetik yang diakibatkan oleh perbedaan sekuen yang random dan terlalu banyak. Oleh karena itu, pada penelitian ini dipilih 2 spesies yang dijadikan *outgroup* yang berasal dari subfamily yang sama dengan genus *Zingiber* yaitu Zingiberoideae.

Hasil rekonstruksi fenogram hubungan kekerabatan *Zingiber* yang terbentuk berdasarkan penanda ITS dari analisis NJ/ML secara umum memiliki hasil pengelompokan yang mirip. Didapatkan hasil bahwa genus *Zingiber* mengelompok dari satu cabang pohon yang sama dan terpisah dari *outgroup* (Gambar 6). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa *Zingiber* berada pada posisi pohon yang bersifat monofiletik.

Fenogram hubungan kekerabatan berdasarkan penanda ITS mendapatkan hasil bahwa genus *Zingiber* mengelompok menjadi dua kluster besar yaitu kluster I dan kluster II. Kluster I terdiri dari 25 spesies dengan nilai bootstrap 87/83% pada NJ/ML dan kluster II terdiri dari 13 spesies dengan nilai bootstrap 94/98% pada NJ/ML. Pengelompokan dua kluster ini didukung oleh pengelompokan berdasarkan habit perbungaan pada *Zingiber* yaitu section *Zingiber* dan section *Cryptanthium* (Gambar 6).

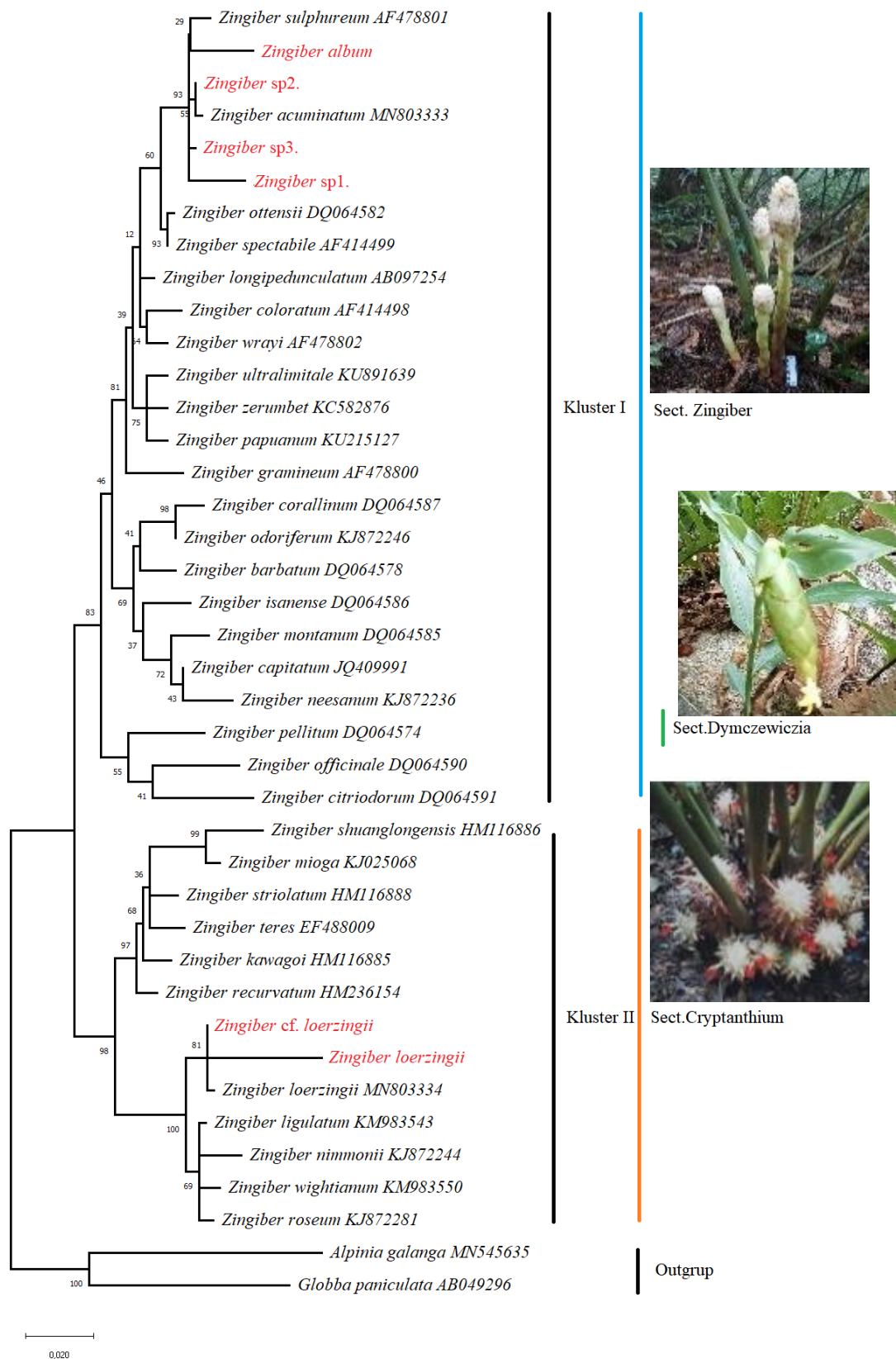
Section *Zingiber* memiliki habit perbungaan dengan spike tegak dan biasanya memiliki peduncle yang panjang sedangkan section *Cryptanthium* radikal dengan spike muncul di permukaan tanah (Theralkupisut *et al.*, 2012; Ardiyani *et al.* 2017). Pada kluster I terdiri dari jenis *Zingiber* section *Zingiber* dan pada kluster II terdiri dari jenis *Zingiber* section *Cryptanthium*. Pada kluster I juga ditemukan *Zingiber pellitum* yang merupakan jenis *Zingiber* section *Dymczewiczia* dengan habit perbungaan di ujung.

Hasil fenogram hubungan kekerabatan yang menunjukkan bahwa section *Dymczewiczia* bergabung dengan section *Zingiber* tidak jauh berbeda dengan Jayakrishnan *et al.* (2021) bahwa section *Dymczewiczia* mengelompok dengan

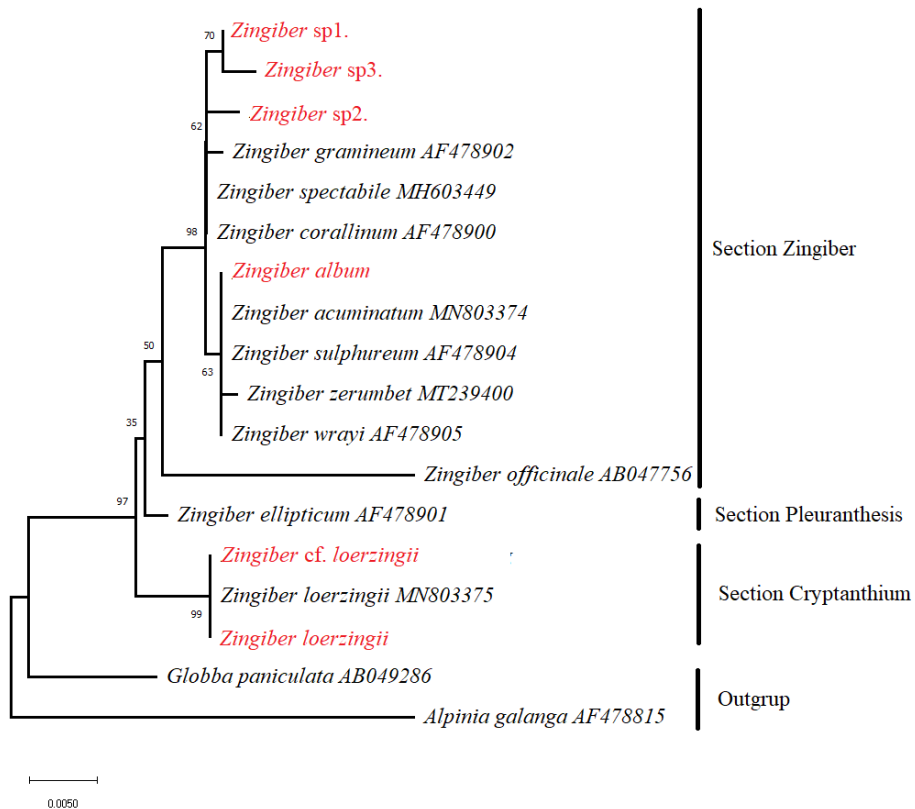
jenis *Zingiber* section *Zingiber* lainnya. Selain itu, morfologi pollen section *Zingiber* dan section *Dymczewiczia* memiliki bentuk yang sama yaitu spherical pollen dengan cerebroid sculpturing (Jayakrishnan *et al.*, 2021; Theralkupisut *et al.*, 2012). Pengelompokan yang dekat antara section *Zingiber* dengan section *Dymczewiczia* mendukung usulan sebelumnya oleh Theilade *et al.* (1993) bahwa section *Dymczewiczia* digabungkan dengan section *Zingiber*.

Pada kluster I ditemukan *Z. album*, *Zingiber* sp1, *Zingiber* sp2, dan *Zingiber* sp3. Keempat spesies ini memiliki percabangan yang dekat dengan *Z. sulphureum* dan *Z. acuminatum*. Percabangan ini didukung oleh nilai bootstrap yang tinggi yaitu 90/93% pada NJ/ML dan menurut Kress *et al.* (2002) nilai bootstrap ini dikelompokkan dalam kategori kuat. Selain itu, jarak genetik dari percabangan ini berkisar 0,04-3,1% (Tabel 11). Menurut Qin *et al.* (2017) menyatakan bahwa nilai jarak genetik berdasarkan barcode ITS2 pada kelompok angiospermae intraspesifik yaitu 1,20% dan interspesifik 7,88%.

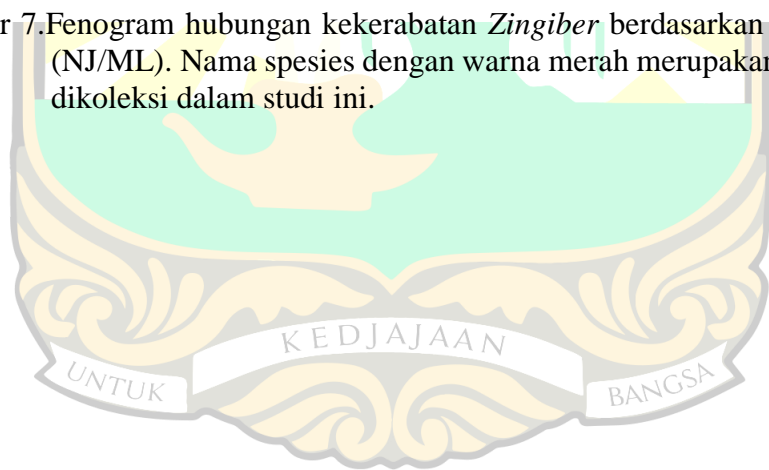
Selain itu pada kluster I juga ditemukan *Z. officinale* yang merupakan type spesies genus *Zingiber* dan berada pada kluster I (Gambar 6). Pada kluster I terdiri dari jenis *Zingiber* section *Zingiber* dan section *Dymczewiczia*. Hasil pengelompokan ini tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya oleh Ardiyani *et al.* (2017) yang menempatkan *Z. officinale* pada section *Zingiber* bersama 16 spesies *Zingiber* lainnya.



Gambar 6. Fenogram hubungan kekerabatan *Zingiber* berdasarkan penanda ITS (NJ/ML). Nama spesies dengan warna merah merupakan *Zingiber* yang dikoleksi dalam studi ini.



Gambar 7. Fenogram hubungan kekerabatan *Zingiber* berdasarkan penanda MatK (NJ/ML). Nama spesies dengan warna merah merupakan *Zingiber* yang dikoleksi dalam studi ini.



Tabel 12. Jarak genetik *Zingiber* dengan sekuen pembandingan berdasarkan penanda MatK

No	Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	<i>Zingiber officinale_AB047756</i>																		
2	<i>Z. album</i>	2,2971																	
3	<i>Zingiber</i> sp1.	2,2971	0,2368																
4	<i>Zingiber</i> sp2.	2,4217	0,3555	0,3555															
5	<i>Zingiber</i> sp3.	2,5453	0,4745	0,2367	0,5938														
6	<i>Z. cf. loerzingii</i>	2,5468	1,1983	1,1983	1,3204	1,4413													
7	<i>Z. loerzingii</i>	2,5468	1,1983	1,1983	1,3204	1,4413	0,0000												
8	<i>Z. loerzingii_MN803375</i>	2,5468	1,1983	1,1983	1,3204	1,4413	0,0000	0,0000											
9	<i>Z. ellipticum_AF478901</i>	2,2985	0,7149	0,7149	0,8355	0,9553	0,7149	0,7149	0,7149										
10	<i>Z. zerumbet_MT239400</i>	2,4217	0,1183	0,3555	0,4746	0,5938	1,3204	1,3204	1,3204	0,8355									
11	<i>Z. acuminatum_MN803374</i>	2,2971	0,0000	0,2368	0,3555	0,4745	1,1983	1,1983	1,1983	0,7149	0,1183								
12	<i>Z. sulphureum_AF478904</i>	2,2971	0,0000	0,2368	0,3555	0,4745	1,1983	1,1983	1,1983	0,7149	0,1183	0,0000							
13	<i>Z.wrayi_AF478905</i>	2,2971	0,0000	0,2368	0,3555	0,4745	1,1983	1,1983	1,1983	0,7149	0,1183	0,0000	0,0000						
14	<i>Z. spectabile_MH603449</i>	2,1741	0,1182	0,1182	0,2367	0,3555	1,0780	1,0780	1,0780	0,5956	0,2367	0,1182	0,1182	0,1182					
15	<i>Z. gramineum_AF478902</i>	2,2971	0,2368	0,2368	0,3555	0,4745	1,1983	0,0120	1,1983	0,7149	0,3555	0,2368	0,2368	0,2368	0,1182				
16	<i>Z. corallinum_AF478900</i>	2,1741	0,1182	0,1182	0,2367	0,3555	1,0780	1,0780	1,0780	0,5956	0,2367	0,1182	0,1182	0,1182	0,0000	0,1182			
17	<i>Globba paniculata_AB049286</i>	3,6788	2,4253	2,4253	2,5509	2,6744	2,1756	2,1756	2,1756	1,9291	2,5509	2,4253	2,4253	2,4253	2,3023	2,4253	2,3023		
18	<i>Alpinia galanga_AF478815</i>	5,6249	4,4487	4,5796	4,7109	4,8396	4,5796	4,5796	4,5796	4,3209	4,5796	4,4487	4,4487	4,4487	4,4514	4,5796	4,4514	4,0576	

Z. album memiliki sister taksa dengan *Z. sulphureum*. Keduanya memiliki jarak genetik 2,29%. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Sukarjo (2021), yang mendapatkan hasil bahwa *Z. album* memiliki sister taksa dengan *Z. sulphureum* dan *Z. acuminatum* dan memiliki rentang jarak genetik 2,79-3,1% berdasarkan penanda ITS. Sementara itu *Zingiber* sp2 memiliki sister taksa *Z. acuminatum*. Kedua spesies ini memiliki jarak genetik sebesar 2%. Secara morfologi keduanya memiliki susunan dan bentuk bractea yang sama dengan warna merah. Sedangkan *Zingiber* sp3 dan *Zingiber* sp1 berada pada subkluster yang dekat. Keduanya berada dalam kluster yang sama dan subkluster yang berdekatan dengan *Zingiber* sp2, *Z. sulphureum*, *Z. album*, dan *Z. acuminatum*.

Berdasarkan daerah persebarannya, *Z. album* dilaporkan terdistribusi di Sumatera Barat dan Sumatera Utara (Nurainas dan Arbain 2017) *Zingiber sulphureum* merupakan *native* dari Peninsula Malaysia dan holotypenya berada di Pahang, Malaysia (IPNI, 2022). *Z. acuminatum* dilaporkan terdistribusi di kawasan Jawa (Newman, Lhuillier and Poulsen 2004) dan *Zingiber* sp2 merupakan spesies yang baru ditemukan di Simanau, Kabupaten Solok dan belum teridentifikasi tingkat spesies.

Berdasarkan penanda MatK, genus *Zingiber* mengelompok menjadi dua kluster besar yaitu kluster I dan kluster II. Pengelompokan kluster ini didukung oleh nilai bootstrap 97/98% pada NJ/ML. Pada kluster I terdiri dari jenis *Zingiber* section *Zingiber* dan Section *Pluerentthesis*. Section *Pluerentthesis* diwakilkan oleh *Zingiber ellipticum*. Berdasarkan habit perbungaannya, section *Pluerentthesis* memiliki

perbungaan yang muncul dari pelepah daun secara lateral (Theralkupisut *et al.*, 2012; Ardiyani *et al.*, 2017).

Z. album, *Zingiber* sp1, *Zingiber* sp2, dan *Zingiber* sp3 juga berada pada kluster yang sama yaitu pada kluster I section *Zingiber* (Gambar 6 dan 7). *Zingiber* sp1 memiliki sister taksa dengan *Zingiber* sp3. Secara morfologi keduanya memiliki ujung braktea acuminate dan memiliki *bracteola*. Namun *Zingiber* sp3 memiliki ukuran *bracteola* yang lebih besar. Muharani (2022) melaporkan bahwa *Zingiber* sp3 memiliki ukuran *bracteola* yang lebih besar dibandingkan dengan *Zingiber* lainnya yaitu 2-2,5 cm.

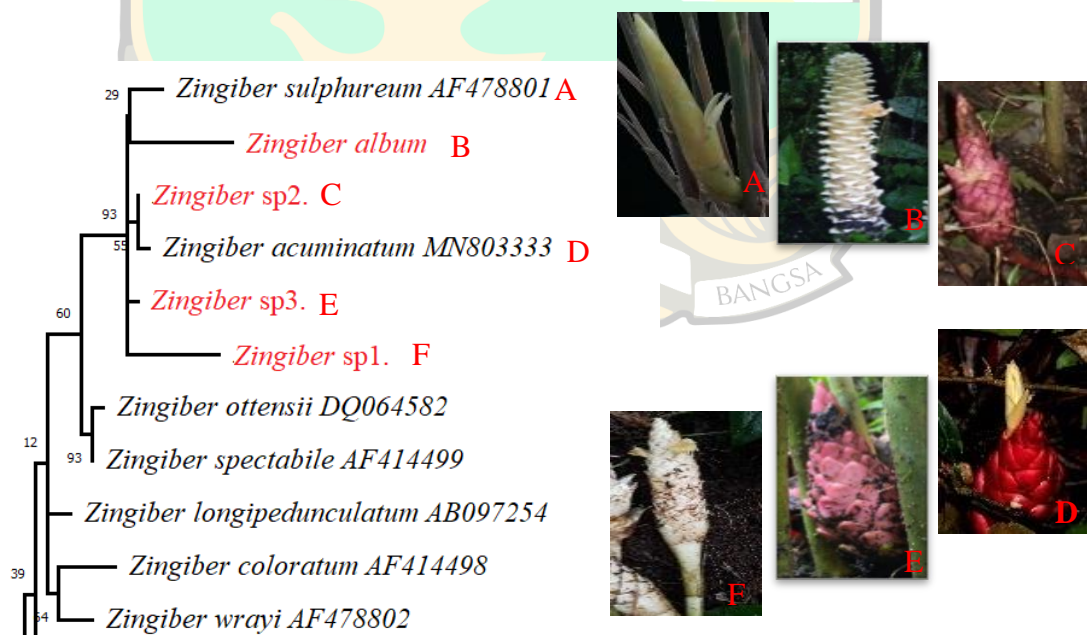
Zingiber sp2 berada pada posisi cabang yang terpisah dan mengelompok sendiri. Hal ini berbeda dengan percabangan *Z. album* yang memiliki sister taksa dengan *Z. Zerumbet*, *Z. acuminatum*, *Z. wrayi*, dan *Z. sulphureum*. *Z.* Percabangan ini memiliki nilai bootstrap sebesar 63/63 pada ML/NJ dan nilai jarak genetik sebesar 0-0,12%. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Vinita *et al* (2014), didapatkan bahwa kisaran jarak genetik interspesifik dalam *Zingiberaceae* berdasarkan penanda MatK adalah 1,9-2,9 %. Namun nilai ini cukup tinggi dibandingkan nilai yang didapatkan untuk jarak genetik interspesifik *Z.album* dengan lainnya. Oleh karena itu, perlu kajian lebih lanjut mengenai jenis ini dengan penanda molekuler lainnya. Secara morfologi, *Z.album* *Z. Zerumbet*, *Z. acuminatum*, *Z. wrayi*, dan *Z. sulphureum* memiliki persamaan pada habit perbungaan yang tegak namun berbeda pada bentuk braktea dan bunga.

Sedangkan *Zingiber cf. loerzingii* dan *Z. loerzingii* berada pada kluster II subkluster D section *Cryptanthium* dengan dukungan nilai bootstrap 81/73% pada

ML/NJ. Keduanya berada pada percabangan yang sama dengan *Z. loerzingii* yang diambil dari GenBank. Jarak genetik dari percabangan ini yaitu 0,02-3,3%. Sedangkan berdasarkan analisis pohon filogenetik dengan penanda MatK, didapatkan hasil bahwa ketiga spesies ini berada pada percabangan yang sama yaitu kluster II section *Cryptanthium* dan memiliki jarak genetik 0%. Secara morfologi keduanya memiliki kesamaan pada bentuk braktea (Lampiran 2).

C. Klarifikasi Status Taksonomi *Zingiber* yang Diamati

Berdasarkan praduga awal, secara morfologi *Zingiber* sp1 memiliki kemiripan dengan *Z. album*, *Zingiber* sp2 memiliki kemiripan dengan *Zingiber* sp3 dan *Zingiber cf. loerzingii* memiliki kemiripan dengan *Zingiber cf. loerzingii*. Setelah dilakukan analisis secara molekuler berdasarkan penanda ITS dan Matk, didapatkan hasil bahwa dari keenam sampel yang diteliti, diduga ada sebagai spesies baru dan kecenderungan sebagai subspecies baru.



Gambar 8. Fenogram hubungan kekerabatan berdasarkan penanda ITS (NJ/MP) dan gambar morfologi *Zingiber*

Menurut Zhachos (2016), batasan untuk karakter spesies bersifat objektif sehingga dibutuhkan bukti yang pasti dan karakter pembeda dominan untuk membatasi perbedaan pada taksa spesies sedangkan untuk subspecies merupakan taksa dibawah spesies yang digolongkan pada secondary rank (IAPT, 2018) dimana bersifat subjektif dan tidak memiliki status ontologis sebagai unit evolusioner.

1. Klarifikasi Status Taksonomi *Zingiber* sp1 dengan *Z. album*

Secara morfologi, *Zingiber* sp1 dengan *Z. album* memiliki karakter yang berbeda pada arah braktea dan bentuk pinggir bunga. *Zingiber* sp1 memiliki arah braktea yang saling menyatu dengan ujung tertutup sedangkan *Z. album* tidak saling menyatu dengan ujung terbuka. Selain itu, bentuk pinggir labelum dari *Zingiber* sp1 adalah entire sedangkan *Z. album* adalah repand (Gambar 9).



Gambar 9. Bunga pada *Zingiber* (A) *Zingiber* sp1. (B) *Zingiber album*

Hubungan kekerabatan *Zingiber* sp1 dengan *Z. album* berada pada percabangan pohon filogenetik yang berbeda. Nilai jarak genetik dari keduanya berdasarkan penanda ITS adalah 3,1% sedangkan penanda MatK adalah 0,24%. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Maulidah *et al.* (2019) yang meneliti

genus *Alpinia* menggunakan penanda ITS mendapatkan hasil jarak genetik antar spesies dalam satu genus *Alpinia* adalah 0,2-12,3%.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan Vinita *et al.* (2014) menggunakan penanda MatK, didapatkan bahwa kisaran jarak genetik intraspecific dalam Zingiberaceae adalah 0,03-0,09% dan interspecific adalah 1,9-2,9 %. Berdasarkan karakter morfologi dan karakter molekuler yang didapatkan, maka dapat disimpulkan bahwa keduanya diduga sebagai spesies yang berbeda dan *Zingiber* sp1 merupakan spesies baru yang belum pernah dilaporkan.

2. Klarifikasi Status Taksonomi *Zingiber* sp2 dengan *Zingiber* sp3.

Secara morfologi *Zingiber* sp2 dan *Zingiber* sp3 memiliki perbedaan pada ligula. *Zingiber* sp2 memiliki ligula berlobus sedangkan *Zingiber* sp3 memiliki ligula entire (Gambar 10). Selain itu, bentuk susunan braktea *Zingiber* sp2 ellipsoid sedangkan *Zingiber* sp3 narrowly avoid (Lampiran2). Namun saat pengoleksian sampel, organ generatif *Zingiber* sp2 tidak ditemukan karena tidak sedang fase berbunga sehingga keduanya tidak bisa dibandingkan dari morfologi bunga.

Berdasarkan hubungan kekerabatan *Zingiber* sp2 dengan *Zingiber* sp3 keduanya berada pada percabangan pohon filogenetik yang berbeda namun masih dalam kluster dan subkluster yang sama. Pengelompokan keduanya berdasarkan penanda ITS *Zingiber* sp3 mengelompok sendiri sedangkan *Zingiber* sp2 mengelompok dekat dengan *Z. acuminatum*. Sedangkan berdasarkan penanda MatK, *Zingiber* sp2 mengelompok sendiri sedangkan *Zingiber* sp3 mengelompok dekat dengan *Zingiber* sp1.



Gambar 10. Ligula pada *Zingiber* (A) *Zingiber* sp2. (B) *Zingiber* sp3.

Nilai jarak genetik dari *Zingiber* sp2 dan *Zingiber* sp3 berdasarkan penanda ITS adalah 0,4% sedangkan penanda MatK adalah 0,56%. Jarak genetik yang jauh untuk nilai intraspesifik pada Matk. Analisis molekuler mendukung keduanya sebagai jenis yang berbeda. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa keduanya diduga merupakan spesies yang berbeda dan *Zingiber* sp3 merupakan spesies baru yang belum pernah dilaporkan. Karakter morfologi *Zingiber* sp2 yang tidak lengkap mengakibatkan *Zingiber* sp2 belum dapat diduga sebagai spesies baru. Namun berdasarkan karakter morfologi yang ada dan didukung oleh karakter molekuler, *Zingiber* sp2 memiliki kecenderungan berbeda dari *Zingiber* lainnya. Oleh karena itu, diperlukan kajian morfologi yang lengkap *Zingiber* sp2 untuk membuktikan dugaan ini.

3. Klarifikasi status taksonomi *Zingiber* cf. *loerzingii* dengan *Z. loerzingii*

Zingiber cf. *loerzingii* dengan *Z. loerzingii* secara morfologi memiliki bentuk braktea yang sama namun berbeda pada warna braktea dan bunga serta bentuk bunga yang berbeda (Gambar 11). Sementara itu, hubungan kekerabatan antara

Zingiber. cf loerzingii dengan *Z. loerzingii* berdasarkan kedua penanda menunjukkan hasil bahwa keduanya mengelompok pada subkluster yang sama.



Gambar 11. Bunga dan braktea pada *Zingiber* (A) *Z. loerzingii*. (B) *Zingiber cf. loerzingii*

Pengelompokan *Zingiber cf. loerzingii* dengan *Z. loerzingii* didukung oleh nilai bootstrap yang tinggi yaitu 85/81% pada NJ/ML berdasarkan penanda ITS dan 99/98% pada NJ/ML berdasarkan penanda MatK. Menurut Kress *et al* (2002) pengelompokan nilai bootstrap dapat dikategorikan menjadi kuat (>85%), sedang (70-85%), lemah (50-69%).

Nilai jarak genetik dari keduanya berdasarkan penanda ITS adalah 3,3% sedangkan penanda MatK adalah 0,0%. Jarak genetik yang tidak ada memiliki perbedaan diduga karena saat penyejajaran basa yang berbeda pada *Z. cf loerzingii* dan *Z. loerzingii* terpotong. Alasan ini dikarenakan pada saat analisis karakter molekuler keduanya memiliki basa yang berbeda sebanyak 4 basa pada urutan (Tabel 8). Berdasarkan karakter morfologi dari kedua jenis ini memiliki bentuk bunga yang berbeda dan didukung oleh jarak genetic yang sama maka disimpulkan bahwa diduga keduanya merupakan spesies yang sama dan *Zingiber cf. loerzingii* memiliki kecenderungan sebagai subfamily dari *Z. loerzingii*. Namun diperlukan karakter pendukung lainnya untuk mendukung hasil ini.

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Karakter molekuler *Zingiber* berdasarkan penanda ITS memiliki karakter informatif yang lebih tinggi dibandingkan pada penanda MatK. Karakter informatif berupa perbedaan basa paling sedikit adalah berdasarkan penanda MatK yaitu *Zingiber cf. loerzingii* dengan *Z. loerzingii* sebanyak 4 basa dan terbanyak adalah berdasarkan penanda ITS yaitu *Z. loerzingii* dengan *Z. officinale* sebanyak 92 basa.
2. Hubungan kekerabatan *Zingiber* dengan kerabatnya berdasarkan kedua penanda bersifat monofiletik. Posisi *Zingiber* sp1, *Z. album*, *Zingiber* sp2, *Zingiber* sp3 berada pada kluster I (section *Zingiber*) sedangkan *Zingiber cf. loerzingii* dan *Z. loerzingii* berada pada kluster II (section *Cryptanthium*).
3. Klarifikasi status taksonomi *Zingiber* yang diamati menghasilkan kesimpulan bahwa *Zingiber* sp1 dan *Zingiber* sp3 diduga sebagai spesies baru dan *Zingiber* sp2 memiliki kecenderungan sebagai spesies yang berbeda dengan *Zingiber* lainnya serta *Zingiber cf. loerzingii* memiliki kecenderungan sebagai subspecies dari *Z. loerzingii*.

B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian direkomendasikan penelitian selanjutnya yaitu mengenai karakterisasi morfologi lengkap *Zingiber* sp2 dan *Zingiber cf.*

loerzingii, fenologi pembungan dan kajian genetika populasi pada *Zingiber* yang diduga dan memiliki kecenderungan sebagai spesies baru dan subfamily baru menggunakan penanda molekuler lainnya. Hal ini dilakukan untuk penguat dugaan dan kecenderungan dari hasil masing-masing *Zingiber* yang diamati.



DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, L., Nurainas., Syamsuardi., and Chairul. 2021. *Zingiber macradenium* K. Schum, an Endemic Ginger from Sumatera: Traditional use and Antimicrobe Potential. *Journal Eduvest*. 1(10): 1036-1046.
- Alvarez, I and J.F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS Sequences and Plant Phylogenetic Inference. *Molecular Phylogenetics And Evolution* 29:417-434.
- Ardiyani, M., M.F Newman., and A. D. Poulsen. 2017. A New Species of *Zingiber* (Zingiberaceae) East of Wallace's Line. *Gardens' Bulletin Singapore*. 69(2): 189-199.
- Auliani, A., Fitmawati., dan Neri S. 2014. Studi Etnobotani Famili Zingiberaceae dalam Kehidupan Masyarakat Lokal di Kecamatan Siak Hulu Kabupaten Kampar. *JOM FMIPA*. 1(2).
- Brunell, M. S., and Whitkus, R. 1998. Assessment of morphological variation in *Eriastrum densifolium* (Polemoniaceae): Implications for subspecific delimitation and conservation. *Systematic Botany*. 351-368.
- Bai, L., L. J. Škorničková., and N. H Xia. 2015. Taxonomic studies on *Zingiber* (Zingiberaceae) in China I: *Zingiber kerrii* and the synonymy of *Z. menghaiense* and *Z. stipitatum*. *Garden Bulletin Singapore*. 67(1): 129-142.
- Baldwin, G, Bruce., M. J. Sanderson., J. M. Porter., M. F. Wojciechowski., C. S. Campbell and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA a Valuable Sources of Evidence on Angiospermae Phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*. 82(2): 247-277.
- Burland, T. G. 2000. DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis Software. *Methods Mol Biol*. 132: 71-91.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA Barcode for LandPlants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 106(31):12794– 12797.

- Chandra, R. Nurainas. Syamsuardi. 2015. Jenis-jenis *Zingiber* mill di Sumatera Barat. *Prosiding Seminar Nasional Biologi - Biodiversitas dan Ekologi Tropika Indonesia (BioETI)*. 3(1):173-181.
- Chen. S.L., Y.Yao., J.P Han., C. Liu., J.Y.Song., L.C.Shi., Y.J.Zhu., X.Y Ma., T.Gao., X.H.Pang., K.Luo., Y.Li., X.W.Li., X.C.Jia., Y.L.Lin., and C.Leon. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*. 5(1): e8613.
- Clegg. MT., K. Ritland., and G. Zuwarski. 1986. Processes of chloroplast DNA evolution In *Evolutionary Processes and Theory* (ed.S. Karlin and E. Nevo). New York: Academic Press.
- Cue Noud, P., V. Savolainen., M. Powell., R.J. Grayer., and M.W.Chase. 2002. Molecular phylogenetics of the Caryophyllales based on combined analyses of 18S *rDNA* and *rbcL*, *atpB*, and *MatK* sequences. *American Journal of Botany*. 89(1):132–144.
- De Guzman, C. C. and J.S. Siemonsma. 1999. *Plant Resource of South-East Asia*. Leiden, The Netherlands: Backhyus Publishers. 400 pp.
- Delta, A. M., Ardinis A., dan Syamsuardi. 2013. Studi Jenis-Jenis Zingiberaceae di Kawasan Hutan Lindung Gunung Talang Sumatera Barat. *J Bio UA*. 2(3): 161-168.
- Degtjareva, G., M. Logacheva., T.H.Samigullin., and C.M.V.Roman. 2012. Organization of Chloroplast *psbA-trnH* Intergenic Spacer in Dicotyledonous Angiosperms of the Family Umbelliferae. *Biochemistry*. 77(9):1056-1064.
- Dunning, L.T. and V. Savolainen. 2010. Broad-scale Amplification of *MatK* for DNA Barcoding Plants, a Technical Note. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 164: 1-9.
- Edel, V. 1998. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. *Applications of PCR in Mycology*. 1-20.

- Fazekas, A. J., P.R. Kesanakurti., K.S. Burgess., D.M. Percy., S.W. Graham., S.C. Barrett., and B.C. Husband. 2009. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular Ecology Resources*. 9(1):130-139.
- Gomes EA., M.C. Kasaya., E.G. deBarros., A.C. Borgs and EF Araujo. 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genet Mol Biol*. 25(4): 477-483.
- Hajibabaei M., M. A. Smith., D.H. Janzen., J.J. Rodriguez., J.B. Whitfield., and P. D. N. Hebert 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *J Compilation Blackwell Publishing*. 6: 959-964.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp*. 41: 95-98.
- Hebert, P.D. N., and G. T. Ryan. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*. 54(5):852–859.
- Hilu, K.W. and H. Liang.1997. The matK gene: sequence variation and application in plant systematics. *American journal of botany*. 84(6):830-839.
- Hollingsworth, P.M., S.W.Graham., and D.P.Little. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PloS One*. 6(5):19254.
- IAPT. 2018. International Code of Nomenclature For Algae, Fungi, And Plants. <https://www.iapt-taxon.org/nomen/pages/main/preamble.html>. Terakhir diakses 20 Mei 2022.
- Holtum RE. 1950. The Zingiberaceae of the Malay Peninsula. *Gard. Bull. Singapore*, 13: 1-249. <https://www.biodiversitylibrary.org/part/171621>.
- Jamil, I. 2005. Analisis Sekuen Daerah ITS DNA Ribosom (rDNA) dan Desain Primer Untuk Mendeteksi *Phytophthora palmivora* Butl pada Kakao. Repository IPB.ac.id.

- Jayakrishnan, T., A. Joe., V.S. Hareesh., and M.Sabu. 2021. Two new Zingiber (Zingiberaceae) species from Arunachal Pradesh, Northeastern India. *Taiwania*, 66(1).
- Jorgensen RA., Cueller RE., Thomson WF., and Kavanagh TA. 1987. Structure and variation in ribosomal RNA gene of Pea. *Plant Molecular Biology*. 8(1):3-12.
- Kress WJ., A.Z.Liu., M. Newman., and Q.C. Li. 2005. The Molecular Phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A complex and polyphyletic genus of gingers. *American Journal of Botany* 92(1): 167-178.
- Kress WJ., L.M. Prince., and K.J. Williams. 2002. The phylogeny and a new classification of ginger (Zingiberaceae): Evidence from molecular data. *American Journal of Botany*. 89(10): 1682-1696.
- Kumar, S., Glen, S., Michael L., Christina, K., and Koichiro, Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6):1547.
- LIPI. 2022. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. <http://lipi.go.id/publikasi/zingiber-loerzingii-the-iucn-red-list-of-threatened-species-2019-et117465518a124284822/36144>. Terakhir diakses 22 Februari 2022.
- Li, W., and Graur, D. 1991. *Fundamental of Molecular Evolution*. Sinauer Associates.Inc..
- Larsen K., Ibrahim H., Khaw SH., and Saw LG. 1999. Ginger of Peninsular, Malaysia, and Singapore. Kinabalu, Malaysia: Natural History Publication (Borneo).
- Maulidah. R., Fitri. S. E., Nurainas., Syamsuardi., and Arbain. N. 2019. Two Records of *Alpinia* in Sumatera, Indonesia and Phylogenetic relationship to their allied species. *Check List*. 15(1): 109-117.

- Miquel F.A.W. 1862. *Sumatra Zijne Plantenwereld Hare Vootbrengselen* Volume III. Amsterdam. Hal 273.
- Moller M., and Cronk Q.C.B. 1997. Origin and Relationships of *Saintpaulia* (*Gesneriaceae*) Based on Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequence. *American Journal of Botany*. 84(7): 956-965
- Muellner, A.N., Samuel, R., Johnson, S.A., Cheek, M., Pennington, T.D., and Chase, M.W. 2003. Molecular Phylogenetics of *Meliaceae* (Sapindales) Based on Nuclear and Plastid DNA Sequences. *American Journal of Botany*. 90(3):471-480.
- Muharani. M. 2022. Autentikasi Jenis, Studi Etnobotani dan Mikrohabitat *Bilongkiang* (*Zingiber* Sp. *Zingiberaceae*) di Kabupaten Solo. Tesis. Pascasarjana Biologi Universitas Andalas.
- NCBI. 2021. National Center for Biological Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Terakhir diakses pada 02 September 2021
- Newman, M., A. Lhuillier and A.D. Poulsen. 2004. Checklist of The *Zingiberaceae* of Malesia. *Blumea Supplement*. 16:1-166.
- Nurainas, N., and Arbain, D. 2017. A New Species and Record of *Zingiberaceae* From Sumatera Indonesia. *Taiwania* 62(3): 294-298.
- O'Brien HE, JLParrrent, JA Jackson, JM Moncalvo and R Vilgays. 2005. Fungal communities' analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and environmental microbiology*. 71(9): 5544-5550.
- Poulsen, A. D., Muthisen, H. B., Newman, M. F., Ardiyani, M., Lofthus, O., and Bjora, C. S. 2018. *Sulettaria*: A New Ginger Genus Disjunct from *Elettaria cardamomum*. *Taxon*. 67 (4): 725-738.
- Purty, R. S., & Chatterjee, S. 2016. DNA barcoding: an effective technique in molecular taxonomy. *Austin J Biotechnol Bioeng*. 3(1):1059.

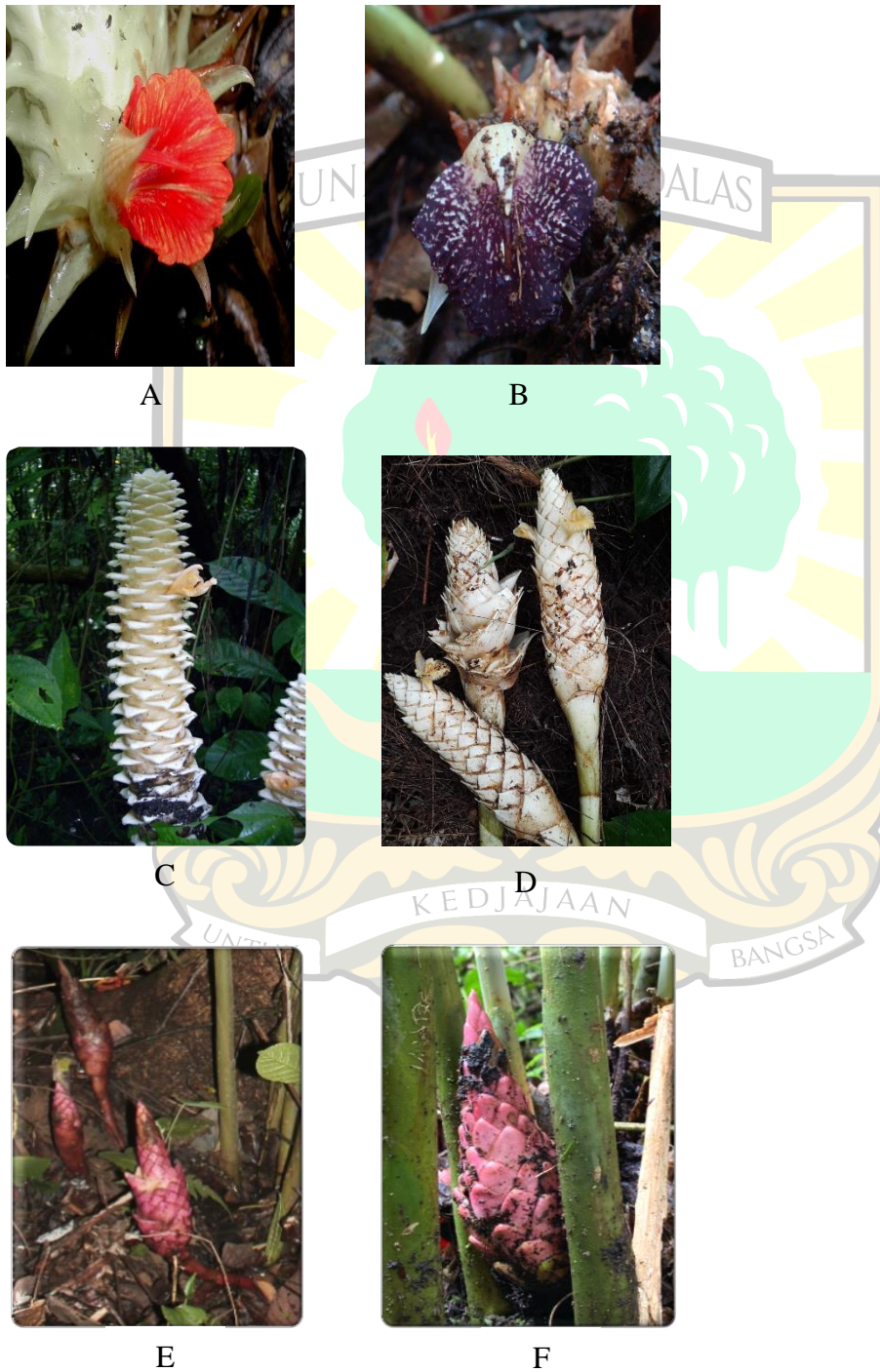
- Qin, Y., Meihui, L., Yong, C., Ya, G. and Wei, Z. 2017. Molecular thresholds of ITS2 and their implications for molecular evolution and species identification in seed plants. *Scientific Reports*. 7(1):1-8.
- Ristoja. 2012. *Eksplorasi Pengetahuan Lokal Etnomedisin dan Tumbuhan Obat di Indonesia Berbasis Komunitas*. Jakarta: Lembaga Penerbitan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
- Roviglioni, R., De Vicente, M. C., Dudnik, N., and Hodgkin, T. 2000. Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources. In *International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture 546* (pp. 107-118).
- Saha, K., Sinha, R. K., and Sinha, S. 2020. Distribution, Cytology, Genetic Diversity and Molecular phylogeny of selected species of Zingiberaceae—A Review. *Feddes Repertorium*. 131(1): 58-68.
- Selvaraj, D., Sarma, R, K., and Ramalingam S. 2018. Phylogenetic analysis of Chloroplast Matk Gene from Zingiberaceae for Plant DNA Barcoding. *Biomedical Informatics Publishing Group*. 3(1):24-27.
- Shi, I. C., Zhang, J., Han, J. P., Song, J. Y., Yao, H., Zhu, Y. J., and Chen, S. L. 2011. Testing the potential of proposed DNA barcodes for species identification of Zingiberaceae. *Journal of Systematics and Evolution*. 49(3): 261-266.
- Smarda, P., Bures, P., Horova, L., Leitch, I. J., Mucina, L., Pacini, E., ... and Rotreklová, O. 2014. Ecological and evolutionary significance of genomic GC content diversity in monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(39): E4096-E4102.
- Soltis DE, Soltis PS. 1998. Choosing an Approach and an Appropriate Gene for Phylogenetic Analysis. Di dalam: Soltis DE, Soltis Ps, Doyle JJ, editor. *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers.

- Sukarjo, Indah. 2021. *Autentikasi Zingiber album Tumbuhan Endemik Sumatera Menggunakan Penanda Molekuler Internal Transcribed Spacer*. Skripsi. Sarjana Biologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas.
- Syahrajabian, M. H., Sun, W., Cheng, Q. 2019. Pharmacological Uses and Health Benefits of Ginger (*Zingiber officinale*) in Traditional Asian and Ancient Chinese Medicine, and Modern Practice. *Notule Scientia Biologicae*. 11(3): 309-319.
- Syamsuardi, H., Okada, and Makotoogawa. 2002. New Variety of *Ranunculus japonicus* (Ranunculaceae) Its Genetic Relationships to the Related Species of Sect. *Acris* in Japan. *Acta Phytotax Geobot*. 53 (2):121-132.
- Syamsuardi, S., C. Chairul., and P. Murni. 2018. Analysis of Genetic Impurity of An Original Cultivar Duku (*Lansium parasiticum* (Osbeck.) KC Sahni Bennet.), from Jambi, Indonesia Using ITS and MatK Gene. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*. 3(2): 239084.
- Takano, A., and H. Okada. 2003. Taxonomy of *Globba* (Zingiberaceae) in Sumatra, Indonesia. *Systematic Botani*. 28 (3): 524-546.
- Tamura, M. N., J. Yamashita., S. Fuse., and M. Haraguchi. 2004. Molecular phylogeny of monocotyledons inferred from combined analysis of plastid matK and rbcL gene sequences. *Journal of Plant Research*. 117(2): 109-120.
- Theerakulpisut, P., P. Triboun., W. Mahakham., D. Maensiri., J. Khampila., and P. Chantaranothai. 2012. Phylogeny of the genus *Zingiber* (Zingiberaceae) based on nuclear ITS sequence data. *Kew Bulletin*. 67(3): 389-395.
- Theilade, I. 1999. A synopsis of the genus *Zingiber* (Zingiberaceae) in Thailand. *Nordic Journal of Botany*. 19(4):389-410.
- Theilade, I., M.L. Mærsk-Møller., J. Theilade., and K. Larsen. 1993. Pollen morphology and structure of *Zingiber* (Zingiberaceae). *Grana*. 32(6): 338-342.

- Thompson JD, T.J. Gibson., F. Plewniak., F. Jeanmougin., and D.G.Higgins. 1997. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25(24): 4876- 4882.
- Udensi, O. U., E.E. Ita., E.V. Ikpeme., G. Ubi., and L.I. Emeagi. 2017. Sequence analysis of maturase K (matk): a chloroplast-encoding gene in some selected pulses. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*. 23(2): 213-230.
- Valeton, T. 1918. New notes on the Zingiberaceae of Java and Malaya. *Bull. Jard. Bot. Buitenzorg*. 2(27): 1 – 176.
- Vinitha, M. R., U.S. Kumar., K. Aishwarya., M. Sabu., and G. Thomas. 2014. Prospects for discriminating Zingiberaceae species in India using DNA barcodes. *Journal of integrative plant biology*. 56(8):760-773.
- White, T. J., T. Bruns., S.J.W.T. Lee., and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 18(1): 315-322.
- Wicke, S. and Quandt, D. 2009. Universal Primers for the amplification of the plastid trnK/MatK region in land plants. *Anales del Jardín Botánico de madrid*. 66(2):285-288.
- Yu, J., J.H. Xue., and S.L. Zhou. 2011. New universal *MatK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*. 49(3):176-181.
- Zachos, F. E. 2016. *Species concepts in biology*. Volume 801. Cham: Springer.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Jenis *Zingiber* yang diamati dalam penelitian



Gambar 1. Jenis *Zingiber* sampel penelitian:
 (A) *Z.loerzingii* (B) *Z.cf loerzingii* (C) *Z.album*
 (D) *Zingiber* sp1 (E) *Zingiber* sp2 (F) *Zingiber* sp3

Lampiran 2. Perbandingan karakter morfologi *Zingiber* yang diamati

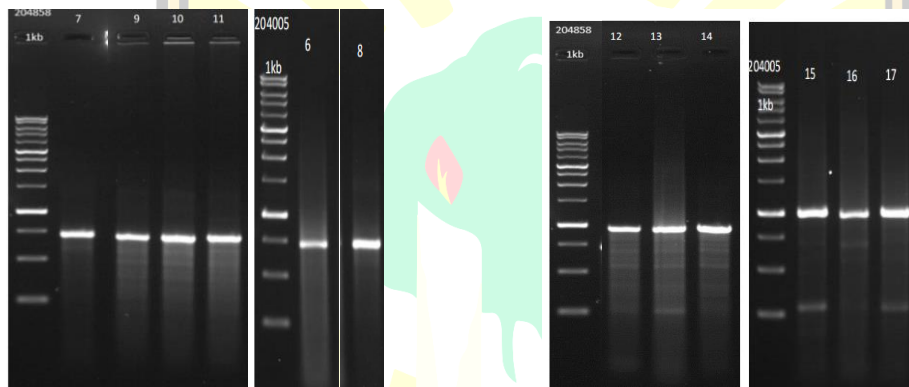
Karakter	<i>Z. album</i>	<i>Zingiber</i> sp1.	<i>Zingiber</i> sp2.	<i>Zingiber</i> sp3.	<i>Z. cf loerzingii</i>	<i>Z. loerzingii</i>
Warna Rizom	Putih	Putih kecoklatan	Putih kecoklatan	Putih kekuningan	Putih kecoklata	Putih ke
Pseudotem	Licin	Licin	Licin	Licin	Licin	Licin
Lamina	Lanseolate	Lanseolate	Lanseolate-ellips	Ellips-avoid	Lanseolate-oblonga	Lanseolate-oblonga
Ligula	Tidak ada- sangat pendek	Ada,rounded	Ada, bilobed	Ada, entire	Ada, scariosa	Ada, scariosa
Susunan bractea	Elongated,like-rose	Elipsoid	Elipsoid	Narrowly Avoid	Crymbiformes	Crymbiformes
Ujung susunan braktea	Emargine	Acuminate	Acuminate	Acuminate	Rounded	Rounded
Arah braktea	Arah braktea tidak saling menyatu dan ujung terbuka	Arah braktea saling menyatu dan ujung tertutup	Arah braktea saling menyatu dan ujung tertutup	Arah braktea saling menyatu dan ujung tertutup	Arah braktea saling menyatu dan ujung tertutup	Arah braktea saling menyatu dan ujung tertutup
Ujung braktea	Acute	Acute	Acute	Acute	Runcing menyatu	Runcing menyatu
Warna braktea	Putih	Putih	Merah muda pekat *	Hijau kecoklatan-merah muda pekat	Coklat kemerahan	Putih
Bracteola	Ada	Ada	*	Ada	Ada	Ada
Warna bunga	Putih kekuningan	Kuning oren	*	Kuning cerah	Kuning dengan bintik ungu	Merah
Margin labellum	Repand	Entire	*	Avoid		Crenate
Pemanfatan	Dikonsumsi sebagai makanan	-	-	Dikonsumsi sebagai makanan	-	-
Sumber	Chandra 2015, Nurainas 2017	Chandra, 2015	Koleksi Pribadi	Muharani, 2022	Chandra, 2015	Ardiyani, 2017

*Saat di lapangan tidak ditemukan organ generatif yang lengkap(tidak fase berbunga)

Lampiran 3. Gambar hasil isolasi dan purifikasi DNA *Zingiber*



Gambar 2. Profil pita hasil isolasi DNA *Zingiber* (a) *Z. album* (b) *Z. loerzingii* (c) *Zingiber* cf. *loerzingii* (d) *Zingiber* sp1 (e) *Zingiber* sp2 (f) *Zingiber* sp3



Gambar 3. Profil pita purifikasi DNA *Zingiber* berdasarkan penanda ITS: (6) *Zingiber* sp1 (7) *Zingiber* sp2, (8) *Zingiber* sp3 (9) *Z. album* (10) *Zingiber* cf. *loerzingii* (11) *Z. loerzingii* dan MatK: (12) *Zingiber* sp1 (13) *Zingiber* sp2 (14) *Zingiber* sp3 (15) *Z. album* (16) *Z. loerzingii* (17) *Zingiber* cf. *loerzingii*

Lampiran 4. Tingkat kesamaan identifikasi kedua penanda menggunakan BLAST

Identifikasi Lapangan	Analisis BLAST		Ketepatan Identifikasi (%)	
	ITS	MatK	ITS	MatK
<i>Z. album</i>	<i>Z. spectabile</i>	<i>Z. zerumbet</i>	94,55	99,59
<i>Zingiber</i> sp1	<i>Z. spectabile</i>	<i>Z. acuminatum</i>	92,72	99,67
<i>Zingiber</i> sp2	<i>Z. spectabile</i>	<i>Z. acuminatum</i>	97,75	98,56
<i>Zingiber</i> sp3	<i>Z. acuminatum</i>	<i>Z. acuminatum</i>	99,22	99,12
<i>Z. loerzingii</i>	<i>Z. loerzingii</i>	<i>Z. loerzingii</i>	96,12	99,48
<i>Z. cf. loerzingii</i>	<i>Z. loerzingii</i>	<i>Z. loerzingii</i>	99,09	99,68

Lampiran 5. Komposisi Nukleotida *Zingiber* yang dikoleksi berdasarkan penanda ITS

No	Spesies	T	C	A	G	Total
1.	<i>Z. officinale</i>	20.5	27.2	20.0	32.2	624
2.	<i>Z. album</i>	21.1	26.1	21.4	31.4	612
3.	<i>Zingiber</i> sp1.	20.6	26.9	20.8	31.8	607
4.	<i>Zingiber</i> sp2.	20.5	26.7	20.3	32.5	606
5.	<i>Zingiber</i> sp3.	20.5	27.2	19.9	32.4	599
6.	<i>Z. cf. loerzingii</i>	21.6	26.3	20.1	32.0	612
7.	<i>Z. loerzingii</i>	20.7	25.8	20.2	33.2	608
	Rata-rata	20.8	26.6	20.4	32.2	609.7

Lampiran 6. Komposisi Nukleotida *Zingiber* yang dikoleksi berdasarkan penanda MatK

No	Spesies	T	C	A	G	Total
1.	<i>Z. officinale</i>	34.9	14.0	35.2	15.8	891
2.	<i>Z. album</i>	34.1	14.6	34.9	16.4	911
3.	<i>Zingiber</i> sp1.	34.2	14.6	34.8	16.4	909
4.	<i>Zingiber</i> sp2.	33.9	14.9	34.9	16.4	921
5.	<i>Zingiber</i> sp3.	33.8	14.9	35.0	16.3	912
6.	<i>Z. cf. loerzingii</i>	34.2	14.1	36.0	15.7	952
7.	<i>Z. loerzingii</i>	34.4	14.2	35.9	15.5	953
	Rata-rata	34.2	14.5	35.2	16.1	921.3

