

Filogenetik Jenis-jenis Annonaceae dari Jawa Timur Koleksi Kebun Raya Purwodadi Berdasarkan *Coding* dan *Non-coding* sekuen DNA

Dewi Ayu Lestari^{1*}, Rodiyati Azrianingsih², Hendrian³

¹Purwodadi Botanical Garden LIPI, Jl. Raya Surabaya–Malang Km. 65, Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur 67163

²Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur 65144

³Cibodas Botanical Garden LIPI, PO BOX. 19 Sdl. Sindanglaya, Cipanas, Cianjur, Jawa Barat 43253

*Corresponding author. Tel.: +62 8123 396011. Email: chunyang_dee@yahoo.co.id, dewi021@lipi.go.id

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15/09/2017

Received in revised form 22/01/2018

Accepted 14/03/2018

Keywords:

Annonaceae

coding DNA

non-coding DNA

phylogenetic

DOI: [10.22146/jtbb.28308](https://doi.org/10.22146/jtbb.28308)

© 2018 JTBB

ABSTRACT

Annonaceae species of Purwodadi Botanic Garden collections from East Java encountered problems in species identification based on morphological characters. In addition, the unavailability of molecular data to support identification based on morphological characters hinders accurate identification of species. The aim of this research is to discern phylogenetic of Annonaceae species from East Java collections of Purwodadi Botanic Garden based on coding and non-coding sequence DNA. Annonaceae species used in this study are 30 species, includes outgroup from family of Magnoliaceae. Materials for DNA analysis were young leaves which were processed through DNA extraction, DNA amplification through PCR technique, DNA sequencing and data analysis with Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) and Neighbour-Joining (NJ) method analysis. The results show that phylogenetic tree is divided into two subfamilies, *i.e.* Annonoideae and Malmeoideae. The topology of phylogenetic tree from three DNA molecular marker shows that non-coding sequence DNA (*trnL-F* molecular marker) has the best grouping of relationship and be able to explain the relationship between species of Annonaceae than *rbcl* and *matK* molecular marker as coding sequence DNA. Bootstrap value of *trnL-F* tree is very weak to high (36-100%) while *rbcl* is very weak to weak (17-63%) and *matK* tree is high (98-99%).

1. Pendahuluan

Kebun Raya Purwodadi (KRP) adalah lembaga konservasi *ex-situ* yang mengkoleksi berbagai jenis tumbuhan anggota suku Annonaceae yang berasal dari Kalimantan, Sulawesi, Sumatra (Riau), Maluku (Pulau Seram dan Buru), Papua, Nusa Tenggara dan Jawa Timur. Koleksi jenis Annonaceae yang berasal dari Jawa Timur di KRP memiliki beberapa permasalahan, diantaranya karakter generatifnya tidak sepenuhnya muncul sehingga menjadi kendala untuk identifikasi jenis berdasarkan karakter morfologi, adanya variasi pada beberapa jenis tertentu serta masih banyaknya jumlah spesimen tumbuhan yang belum teridentifikasi hingga tingkatan jenis. Berdasarkan permasalahan tersebut, posisi takson pada spesimen tumbuhan yang belum diketahui identitasnya menjadi tidak jelas. Menurut van Heusden

(1992), Kessler (1993), Priyanti (2001), Bioersity International (2008) serta Folorunso dan Olorode (2008) menyatakan bahwa identitas jenis Annonaceae berdasarkan karakter morfologi dapat diketahui dari karakter bunga dan buahnya. Beberapa jenis koleksi tumbuhan Annonaceae di KRP mengalami pembungaan namun tidak berhasil menjadi buah. Sementara itu, identifikasi berdasarkan karakter morfologi tidak cukup melalui karakter bunga saja tetapi juga harus disertai oleh karakter buah. Hal ini yang menyebabkan kebingungan dalam mengungkap identitas jenisnya, sehingga diperlukan analisis hubungan kekerabatan melalui filogenetik.

Permasalahan tersebut dapat diatasi dengan melakukan analisis hubungan kekerabatan melalui filogenetik. Penentuan jenis berdasarkan pendekatan filogenetik mempertimbangkan tingkatan evolusi dan sangat

penting terutama bagi taksa-taksa yang kategori pengklasifikasiannya masih mengalami perdebatan (Rasnovi, 2004). Penanda molekuler yang digunakan adalah sekuen DNA kloroplas yang terdiri dari *coding* dan *non-coding* DNA. Tujuan dari analisis ini adalah untuk mengkonfirmasi data karakter morfologi dalam proses identifikasi jenis yang telah ada. Disamping itu, KRP belum memiliki data molekuler untuk menguji klasifikasi secara konvensional melalui karakter morfologi dan belum pernah dilakukan pada jenis-jenis Annonaceae di Jawa Timur. Penggunaan sekuen DNA sebagai penanda molekuler merupakan cara yang akurat untuk identifikasi dan diskriminasi suatu jenis (Hollingsworth dkk., 2011). Sekuen DNA kloroplas yang digunakan adalah *rbcl* dan *matK* (untuk *coding* DNA) serta *trnL-F* (untuk *non-coding* DNA) (Pirie dkk., 2007; Couvreur dkk., 2008; Su dkk., 2008; Zhou dkk., 2009; Zhou dkk., 2010; Chaowasku dan KeBler, 2013; Tang dkk., 2015a; Tang dkk., 2015b). Gen *matK* dapat mengkode kelompok II intron maturase pada kloroplas (Young dan de Pamphilis, 2000; Barthet dan Hilu, 2007). Gen *rbcl* merupakan gen kloroplas yang paling banyak digunakan dalam analisis hubungan kekerabatan (Ohsako dan Ohnishi, 2001). Gen *trnL-F* merupakan gen kloroplas yang informatif dan mampu menunjukkan hubungan antar jenis sehingga sangat cocok digunakan dalam identifikasi hingga tingkatan jenis, uniparental maupun mendeteksi hingga tingkatan hibrida (khususnya pada marga *Gaura* dari suku *Onagraceae*). Oleh karena itu, gen *trnL-F* mempunyai *substitution rate* tertinggi dibanding *matK* dan *rbcl* (Hoggard dkk., 2004; Chen dkk., 2013). Sekuen DNA kloroplas dari gabungan antara *matK+rbcl* diketahui dapat digunakan sebagai penanda molekuler (barcode) untuk membedakan kelompok besar dalam kelompok tumbuhan Angiospermae (Wattoo dkk., 2016).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk identifikasi menggunakan karakter sekuen DNA pada jenis-jenis Annonaceae dari Jawa Timur koleksi KRP dengan membedakan *coding* dan *non-coding* sekuen DNA. Hasil yang diperoleh diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penggunaan sekuen DNA yang tepat untuk jenis-jenis Annonaceae dalam mendukung proses identifikasi jenis berdasarkan karakter morfologi.

2. Bahan dan Metode

2.1. Alat dan Bahan

Sampel penelitian berupa material daun muda (berwarna hijau muda hingga hijau kekuningan) sejumlah 30 jenis (Tabel 1). Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari antara pukul 06.00 sampai dengan 07.00 WIB.

2.2. Cara Kerja

Material sampel jenis-jenis Annonaceae yang diuji termasuk outgroup (suku *Magnoliaceae*) diperlakukan melalui beberapa tahapan yaitu isolasi DNA, amplifikasi DNA melalui tehnik PCR, sekuensing DNA dan analisis data.

2.2.1. Isolasi DNA

Isolasi DNA terhadap 28 jenis Annonaceae Jawa Timur dan 2 jenis *Magnoliaceae* menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) mengikuti prosedur Fatchiyah dkk. (2011). Jumlah *pellet* DNA yang diperoleh dilarutkan dalam 50 µl buffer TE (Tris EDTA) pH 7,6. Perlakuan sampel DNA penelitian untuk jangka panjang disimpan pada suhu -20°C.

2.2.2. Amplifikasi DNA dengan teknik PCR

Amplifikasi DNA menggunakan penanda molekuler *matK*, *rbcl* (*coding* DNA) dan *trnL-F* (*non-coding* DNA) pada setiap sampel DNA. Setiap 10 µl larutan (Tang dkk., 2015a; Tang dkk., 2015b), dilakukan pencampuran aquabidest (*ddH₂O*) sebanyak 6,4 µl, larutan PCR *mix* (2x konsentrasi) sebanyak 2,35 µl, primer *forward* (10 pmole) sebanyak 0,375 µl, primer *reverse* (10 pmole) sebanyak 0,375 µl dan 0,5 µl sampel DNA. Amplifikasi menggunakan alat PCR *thermal cycle*.

Program *annealing* saat amplifikasi DNA untuk setiap penanda molekuler berbeda-beda. Program *annealing* untuk penanda molekuler *rbcl* adalah pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit; denaturasi pada suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 2 menit (diulang sebanyak 35 siklus); ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit dengan urutan sekuen (F) 5'-GATTCAAAGCTGGTGTAAAGAGT-3' dan (R) 5'-GGGGCGGACCCTGGAAAGTCT-3' (Su dkk., 2008). Program *annealing* untuk penanda molekuler *matK* adalah pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit; denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72°C selama 2 menit (diulang sebanyak 35 siklus); ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Urutan sekuen dari penanda molekuler *matK* adalah (F) 5'-CTAATACCTCACCCCGTCCATCTG-3' dan (R) 5'-CTGTCCGGTTGGACCACAAGTAA-3' (Tang dkk., 2015a; Tang dkk., 2015b). Zhou dkk. (2010) menyatakan bahwa urutan sekuen dari penanda molekuler *trnL-F* adalah (F) 5'-GACGCTACGGACTTGATTGGATT-3' dan (R) 5'-TGGGGATAGAGGGACTTGAACC-3'. Program *annealing* yang digunakan pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit; denaturasi pada suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* pada

Tabel 1. Jenis-jenis Annonaceae koleksi KRP dari Jawa Timur (Lestari dkk., 2012)

No	Jenis	No voucher	Lokasi	Asal
1	<i>Annona</i> sp.	P19770246	IV.A.I.5	Jawa Timur
2	<i>Saccopetalum horsfieldii</i> Benn.	P1978074	XVIII.C.2	Prigi, Trenggalek
3	<i>Anomianthus dulcis</i> (Dun.) J. Sinel	P19820611	XVIII.C.6	Pulau Bawean
4	<i>Mitrephora polypyrena</i> (Blume) Miq	P19811116	XVIII.C.7	Mt. Kukusan, Lumajang
5	<i>Artabotrys blumei</i> Hook.f. & Thomson	P19790775	XVIII.C.8	Sendangbiru, Malang
6	<i>Stelechocarpus burahol</i> (Blume) Hook.f. & Thomson	P197704130	XVIII.C.10	Cowek, Purwodadi
7	<i>Polyalthia lateriflora</i> (Blume) King	P198302228	XVIII.C.19	Situbondo
8	<i>Mitrephora reticulata</i> (Blume) Hook.f. & Thomson	P19810125	XVIII.C.20	Pulau Sempu
9	<i>Uvaria schizocalyx</i> Back.	P19840321	XVIII.C.23	Banyuwangi
10	<i>Popowia</i> sp.	P19790732	XVIII.C.24	Pulau Sempu
11	<i>Orophea enneandra</i> Blume	P198105274	XVIII.C.25	Meru Betiri, Banyuwangi
12	<i>Orophea enneandra</i> Blume	P19821169	XVIII.C.26	Lebakharjo, Malang
13	<i>Annona muricata</i> L.	P1977091	XVIII.C.28	Lawang, Malang
14	<i>Fissistigma latifolium</i> (Dun.) Merr.	P19820362	XVIII.C.30	Tuban
15	<i>Artabotrys uncinatus</i> (Lam.) Merr.	P19850227	XVIII.C.34	Ngliyep, Malang
16	<i>Mitrephora</i> sp.	P19840317	XVIII.C.35	Banyuwangi
17	<i>Mitrephora javanica</i> Back	P19850167	XVIII.C.38	Tumpak, Malang
18	<i>Uvaria concava</i> Teijsm. & Binn.	P19840389	XVIII.C.39	Blitar
19	<i>Oxymitra</i> sp.	P19850160	XVIII.C.40	Tumpak, Malang
20	<i>Uvaria rufa</i> Blume	P198803196	XVIII.C.47	TN. Baluran, Situbondo
21	<i>Pseuduvaria reticulata</i> (Blume) Merr.	P19910930	XVIII.C.55	Tempursari, Lumajang
22	<i>Uvaria purpurea</i> Blume	P198501315	XVIII.C.56	Jolo Sutro, Blitar
23	<i>Polyalthia</i> sp.	P1989043	XVIII.C.62	Sumenep, Madura
24	<i>Orophea enneandra</i> Blume	P19860266	XVIII.E.3	Tempursari, Lumajang
25	<i>Orophea hexandra</i> Blume	P198502409	XVIII.E.8	Banyuwangi
26	<i>Miliusa macropoda</i> Miq.	P199712239	XVIII.E.36	TN. Alas Purwo, Banyuwangi
27	<i>Meiogyne cylindrocarpa</i> (Burck) Back.	P19991125	XVIII.E.43	TN. Baluran, Situbondo
28	<i>Meiogyne cylindrocarpa</i> (Burck) Heusden	P2005118	XIX.B.I.62	TN. Alas Purwo, Banyuwangi
29	<i>Magnolia candolli</i> (Blume) H.Keng	P19821171	XVIII.D.II.2	Lebakharjo
30	<i>Michelia champaca</i> (L.) Baill. Ex Pierre	P1997110091	XIV.G.I.10	Malang

suhu 61°C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 45 detik (diulang sebanyak 32 siklus); ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit.

2.2.3. Sekuensing DNA

Sekuensing DNA dilakukan untuk mengetahui sekuen DNA dari sampel DNA hasil amplifikasi. Sampel DNA disekuensing menggunakan *automatic sequencer machine* di Laboratorium 1st-Base, Malaysia.

2.2.4. Analisa Data

Evaluasi data sekuen Annonaceae menggunakan program *ABI sequence scanner* untuk mengetahui kualitas sekuen DNA. Pohon filogenetik dihasilkan melalui proses *alignment* menggunakan program *Clustal W*, dilanjutkan

analisis berdasarkan model evolusi Kimura 2 parameter (K2P) dengan metode algoritma *Neighbour-Joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML) dan *Maximum Parsimony* (MP) menggunakan program statistik MEGA 5.03 (Tamura dkk., 2011; Patwardhan dkk., 2014). Perbandingan antara ketiga metode algoritma tersebut menggunakan nilai *bootstrap* 1000 ulangan untuk menguji validitas topologi dari pohon filogenetik. Kategori nilai *bootstrap* meliputi tinggi (>85%), moderat (70–85 %), lemah (50–69 %), atau sangat lemah (<50 %) (Kress dkk., 2002).

3. Hasil dan Pembahasan

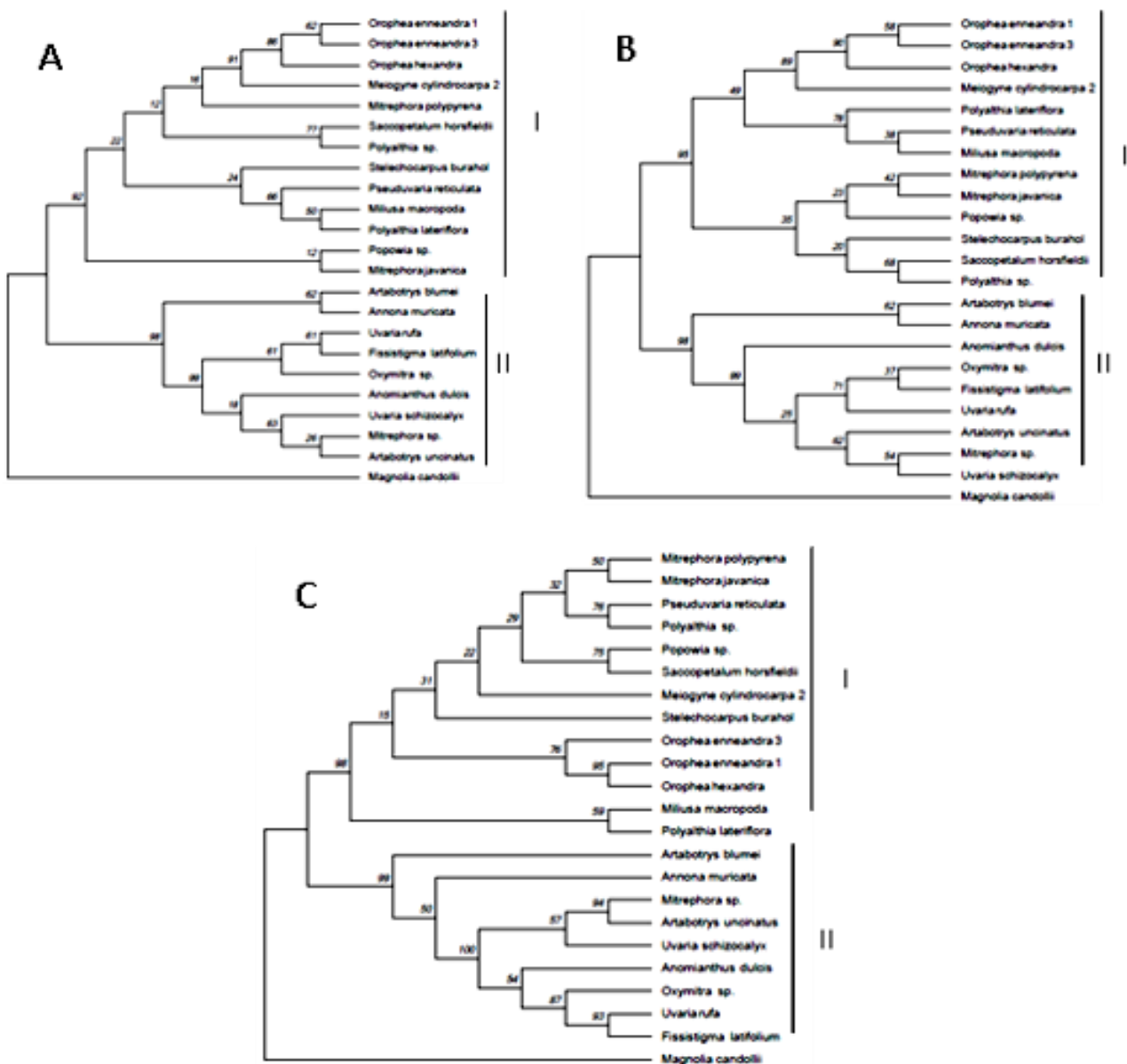
Topologi pohon filogenetik yang dapat diterima dalam biosistematika apabila bersifat monofiletik, dikotom, tidak ada politomi, memiliki nilai *bootstrap* yang tinggi serta klad

yang terbentuk konsisten dan kokoh. Kelompok monofiletik hanya mempunyai satu leluhur dan seluruh keturunannya berasal dari leluhur tersebut. Hal ini menyebabkan anggota-anggota dalam kelompok monofiletik dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat serta diasumsikan membawa sifat atau pola genetik dan biokimia yang sama (Hidayat dan Pancoro, 2008; Rahayu dan Nugroho, 2015).

Topologi pohon filogenetik yang dihasilkan dari ketiga metode analisis (Gambar 1) baik *coding* dan *non-coding* sekuen DNA menunjukkan bahwa terdapat pembagian pohon filogenetik dalam 2 klad besar yaitu sub-suku Malmeoideae (klad I) dan Annonoideae (klad II). Klad I terdiri dari anggota dari tribus Miliuseae, sedangkan klad II terdiri dari anggota tribus Xylopieae, Annoneae dan Uvariae. Sub-suku Annonoideae tergolong dalam *Long Branch Clades* (LBC) yang merepresentasikan 60% dari diversitas jenis Annonaceae. Sub-suku Malmeoideae merupakan *sister* dari sub-suku

Annonoideae dan merepresentasikan 35% dari diversitas jenis Annonaceae, sehingga tergolong dalam *Short Branch Clades* (SBC). *Basal grades* dan *sister* dari kedua sub-suku tersebut adalah sub-suku Ambavioideae dan Anaxagoreoideae (Richardson dkk., 2004; Pirie dan Doyle, 2012; Chatrou dkk., 2014).

Berdasarkan evaluasi dari nilai *bootstrap* pada setiap kladogram menunjukkan bahwa *coding* sekuen DNA *rbcl* memiliki kisaran nilai *bootstrap* yang lemah hingga sangat lemah (17-63%) dan *matK* memiliki kisaran nilai *bootstrap* yang tinggi (98-99%). Sedangkan *non-coding* sekuen DNA (*trnL-F*) memiliki nilai *bootstrap* yang sangat lemah (36-53%) hingga tinggi (100%). Secara umum, nilai *bootstrap* yang tinggi ditunjukkan oleh kelompok LBC dari sub-famili Annonoideae khususnya menggunakan penanda molekuler DNA *rbcl* and *trnL-F* (Richardson dkk., 2004).



Gambar 1. Kladogram jenis-jenis Annonaceae terpilih berdasarkan metode analisis (A) *Maximum Parsimony*, (B) *Maximum Likelihood*, (C) *Neighbour-Joining*; I = Malmeoideae dan II = Annonoideae

Tabel 2. Hasil analisis polimorfisme sekuen DNA dari ketiga penanda molekuler DNA.

Penanda molekuler DNA	Jumlah karakter hasil <i>alignment</i>	Jumlah karakter terkonservasi	Jumlah karakter <i>singleton</i>	Jumlah karakter informatif parsimoni
<i>rbcL</i>	374	100	61	38
<i>matK</i>	442	77	109	56
<i>trnL-F</i>	541	116	44	34

Pengelompokan dengan menggunakan filogenetik melalui penanda molekuler DNA (*coding* dan *non-coding* sekuen DNA), memberikan kelebihan dibandingkan pengelompokan menggunakan karakter morfologi. Masalah pengelompokan yang saling bertentangan dan pada umumnya banyak ditemui pada pola pengelompokan menggunakan karakter morfologi dapat diminimalisir. Menurut Chatrou dkk. (2012), topologi dari pohon filogenetik memberikan klarifikasi yang lebih besar dibandingkan pengelompokan dengan karakter morfologi meskipun memiliki nilai *bootstrap* yang rendah. Topologi pohon filogenetik digunakan untuk menjawab berbagai permasalahan yang terkait dengan tingkatan evolusi dalam karakter morfologi. Suatu penanda molekuler DNA dapat digunakan secara kombinasi dengan penanda molekuler DNA lainnya dan pada umumnya memberikan signal serta topologi yang lebih baik dalam pengelompokan pohon filogenetik (Pirie dkk., 2007).

Analisis polimorfisme terhadap kladogram dari *coding* dan *non-coding* sekuen DNA dilakukan untuk mengetahui karakter polimorfisme pada masing-masing penanda molekuler DNA. Karakter yang diamati meliputi karakter yang terkonservasi, *singleton* dan informatif parsimoni (Tabel 2). Karakter yang bersifat polimorfik terdiri dari karakter *singleton* dan informatif parsimoni. Berdasarkan tabel 2 dapat diketahui bahwa *non-coding* sekuen DNA (*trnL-F*) memiliki jumlah karakter *singleton* dan informatif parsimoni paling sedikit dibanding *coding* sekuen DNA. Kedua karakter tersebut mempengaruhi tinggi rendahnya nilai *bootstrap* pada topologi pohon filogenetik yang dibentuk. Banyaknya karakter *singleton* dan informatif parsimoni pada *coding* sekuen DNA menyebabkan nilai *bootstrap*nya rendah sehingga klad yang terbentuk kurang kokoh. Penanda molekuler DNA dari *coding* sekuen DNA (*rbcL* dan *matK*) hanya sedikit menjelaskan hubungan antar jenis maupun antar marga di dalam suku Annonaceae, namun memberikan kontribusi yang besar dalam pemisahan klad untuk masing-masing sub-suku. Erkens dkk. (2007) menyatakan bahwa penanda molekuler dari *coding* sekuen DNA seperti *matK* hanya mampu memberikan sedikit kontribusi dalam pengelompokan hubungan kekerabatan secara filogenetik. Berdasarkan hasil penelitian ini, penanda

molekuler dari *non-coding* sekuen DNA (*trnL-F*) menghasilkan topologi pohon filogenetik yang paling baik dibanding *coding* sekuen DNA (*rbcL* dan *matK*).

Hasil penelitian dalam kasus ini menunjukkan bahwa topologi pohon filogenetik pada *non-coding* sekuen DNA (*trnL-F*) menghasilkan resolusi tinggi dalam membagi kelompok jenis Annonaceae dari Jawa Timur. Kasus lain menunjukkan bahwa analisis menggunakan *trnL-F* pada jenis Annonaceae dari klad *Sapranthus* dan *Tridimeris* menghasilkan resolusi yang rendah (Ortiz-Rodriguez dkk., 2016). Disamping itu, *coding* sekuen DNA seperti *rbcL* tidak cukup variabel dan konsisten dalam membedakan antar marga (tingkat keberhasilan tertinggi sebesar 97%).

Secara umum, *coding* sekuen DNA lainnya yaitu *matK* lebih mampu membedakan antar marga maupun jenis dibandingkan *rbcL*. *rbcL* merupakan penanda molekuler yang universalitasnya tinggi namun resolusinya rendah, sedangkan *matK* memberikan universalitas rendah namun memiliki resolusi tinggi diantara jenis-jenis yang berbeda. Kombinasi antara keduanya (*rbcL+matK*) dapat membantu dalam membedakan sejumlah jenis tertentu (Wattoo dkk., 2016). Kombinasi penanda molekuler DNA dengan jumlah yang lebih banyak lebih baik dalam menghasilkan topologi pohon filogenetik karena *barcode* yang digunakan pada jenis-jenis tanaman masih sangat labil. Semakin banyak penanda molekuler DNA yang digunakan maka upaya dalam melakukan konfirmasi identifikasi jenis tanaman tertentu semakin besar.

4. Kesimpulan

Topologi pohon filogenetik dari ketiga penanda molekuler DNA menunjukkan bahwa *non-coding* sekuen DNA (*trnL-F*) memberikan topologi pohon filogenetik terbaik serta mampu menunjukkan hubungan antar jenis dalam Annonaceae dibanding *coding* sekuen DNA (*rbcL* dan *matK*).

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada beasiswa Karyasiswa LIPI yang telah mendanai kegiatan penelitian ini, Risca Adiyani Rachma yang banyak membantu selama penelitian di laboratorium dan Didik Wahyudi yang banyak membantu dalam proses analisis data.

Acuan

- Barthet, M.M. & Hilu, K.W., 2007, Expression of *matK*: functional and evolutionary implications, *American Journal of Botany* 94(8), 1402-1412.
- Bioversity International, 2008, Descriptors for cherimoya (*Annona cherimola* Mill.), Rome, Italy.
- Chaowasku, T. & Keßler, P.J.A., 2013, Phylogeny of *Miliusa* (Magnoliales: Annonaceae: Malmeoideae: Miliuseae), with descriptions of two new species from Malesia, *European Journal of Taxonomy* 54, 1-21.
- Chatrou, L.W., Pirie, M.D., van Velzen, R. & Bakker, F.T., 2014, Annonaceae substitution rates – a codon model perspective, *Fevereiro* 36, 108-117.
- Chatrou, L.W., Pirie, M.D., Erkens, R.H.J., Couvreur, T.L.P., Neubig, K.M., Abbott, R.J., Mols, J.B., Maas, J.W., Saunders, R.M.K. & Chase, M.W., 2012, A new subfamily and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics, *Botanical Journal of Linnean Society* 169, 5-40.
- Chen, C.W., Huang, Y.M., Kuo, L.Y., Nguyen, Q.D., Luu, H.T., Callado, J.R., Farrar, D.R. & Chiou, W.L., 2013, *trnL-F* is a powerful marker for DNA identification of field vittarioid gametophytes (Pteridaceae), *Annals of Botany*, 1-11. doi:10.1093/aob/mct004.
- Couvreur, T.L.P., Richardson, J.E., Sosef, M.S.M., Erkens, R.H.J. & Chatrou, L.W., 2008, Evolution syncarpy and other morphological characters in African Annonaceae: a posterior mapping approach, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47, 302-318.
- Erkens, R.H.J., Chatrou, L.W., Maas J.W. & Pirie M.D., 2007, Phylogenetic relationships, saturation and marker-use in the Long Branch Clade of Annonaceae, PhD Thesis, pp 25-41.
- Fatchiyah, Arumingtyas, E.L., Widyarti, S., & Rahayu, S., 2011, Biologi Molekuler: Prinsip Dasar Analisis, PT Erlangga, Jakarta.
- Folorunso, A.E. & Olorode, O., 2008, Biosystematic studies in Annonaceae II. Vegetative and floral morphological studies of some marga of Annonaceae in Nigeria, *Research Journal of Botany* 3, 1-8.
- Hidayat, T. & Pancoro, A., 2008, Kajian filogenetika molekuler dan peranannya dalam menyediakan informasi dasar untuk meningkatkan kualitas sumber genetik anggrek, *Jurnal AgroBiogen* 4(1), 35-40.
- Hoggard, G.D., Kores, P.J., Molvray, M. & Hoggard, R.K., 2004, The phylogeny of *Gaura* (Onagraceae) based on ITS, ETS, and *trnL-F* sequence data, *American Journal of Botany* 91(1), 139-148.
- Hollingsworth, P.M., Graham S.W. & Little, D.P., 2011, Choosing and using a plant DNA barcode, *PLoS ONE* 6 (5): e19254. DOI: 10.1371/journal.pone.0019254.
- Kessler P.J.A., 1993, Annonaceae, Translated Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V, eds. The sukues and marga of vascular plants, Volume 2, Springer-Verlag, Berlin.
- Kress, W.J., Prince, L.M. & Williams, K.J., 2002, The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data, *Ann. J. Bot.* 89, 1682-1696.
- Lestarin, W., Matrani, Sulasmi, Trimanto, Fauziah, Laksono, R.A., Damaiyani, J. & Fiqa, A.P., 2012, An alphabetical list of plant species cultivated in Purwodadi Botanic Garden, Purwodadi Botanic Garden, Indonesian Institute of Sciences.
- Ohsako, T. & Ohnishi O., 2001, Nucleotide sequence variation of the chloroplast *trnK/matK* region in two wild *Fagopyrum* (Polygonaceae) species, *Fagopyrum leptopodum* and *Fagopyrum stative*, *Genes Genetics and Systematics* 76, 39-46.
- Ortiz-Rodriguez, A.E., Escobar-Castellanos, M.A. & Pérez-Farrera, M.A., 2016, Phylogenetic analyses and morphological characteristics support the description of a second species of *Tridimeris* (Annonaceae), *PhytoKeys* 74, 79-96. DOI: 10.3897/phytokeys.74.10371.
- Patwardhan, A., Ray, S. & Roy, A., 2014, Molecular markers in phylogenetic studies – A review, *Phylogenetics and Evolutionary Biology* 2(2), 1-9. DOI:10.4172/2329-9002.1000131.
- Pirie, M.D., Vargas, M.P.B., Botermans, M., Bakker, F.T. & Chatrou, L.W., 2007, Ancient paralogy in the cpDNA *trnL-F* region in Annonaceae: implications for plant molecular systematics, *American Journal of Botany* 94(6), 1003-1016.
- Pirie, M.D. & Doyle, J.A., 2012, Dating clades with fossils and molecules: the case of Annonaceae, *Botanical Journal of the Linnean Society* 169, 84-116.
- Priyanti, 2001, A floristic study of the Annonaceae in the Bearu District, East Kalimantan, Indonesia, Thesis, Post Graduate Programme of Biology, Bogor Agricultural University, Bogor.
- Rahayu, D.A. & Nugroho, E.D., 2015, Biologi molekuler dalam perspektif konservasi, Plantaxia, Yogyakarta.

- Rasnovi, S., 2004, Species concepts: why phenetic or phylogenetic?, *Floribunda* 2(5), 138-143.
- Richardson, J.E., Chatrou, L.W., Mols, J.B., Erkens, R.H.J. & Pirie, M.D., 2004, Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae, *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences* 359(1450), 1495-1508. DOI: 10.1098/rstb.2004.1537.
- Su, Y.C.F., Smith, G.J.D. & Saunders, R.M.K., 2008, Phylogeny of the basal angiosperm genus *Pseuduvaria* (Annonaceae) inferred from five chloroplast DNA regions, with interpretation of morphological character evolution, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48, 188-206.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S., 2011, MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods, *Molecular Biology and Evolution* 28(10), 2731-2739.
- Tang, C.C., Thomas, D.C. & Saunders, R.M.K., 2015a, Molecular phylogenetics of the species-rich angiosperm genus *Goniothalamus* (Annonaceae) inferred from nine chloroplast DNA regions: synapomorphies and putative correlated evolutionary changes in fruit and seed morphology, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 92, 124-139.
- Tang, C.C., Thomas, D.C. & Saunders, R.M.K., 2015b, Molecular and morphological data supporting phylogenetic reconstruction of the genus *Goniothalamus* (Annonaceae), including a reassessment of previous infrageneric classifications, *Data in Brief* 4, 410-421.
- Van Heusden, 1992, Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution, *BLUMEA Supplement* 7, 1-218.
- Wattoo, J.I., Saleem, M.Z., Shahzad, M.S., Arif, A., Hameed, A. & Saleem, M.A., 2016, DNA barcoding: amplification and sequence analysis of *rbcl* and *matK* genome regions in three divergent plant species, *Advancements in Life Sciences* 4(1), 3-7.
- Young, N.D. & de Pamphilis, C.W., 2000, Purifying selection detected in plastid gene *matK* and flanking ribozyme regions within a group II intron of nonphotosynthetic plants, *Molecular Biology and Evolution* 17(12), 1933-1941.
- Zhou, L., Su, Y.C.F. & Saunders, R.M.K., 2009, Molecular phylogenetic support for a broader delimitation of *Uvaria* (Annonaceae), inclusive of *Anomianthus*, *Cyathostemma*, *Ellipeia*, *Ellipeiopsis* and *Rauwenhoffia*, *Systematics and Biodiversity* 7(3), 249-258.
- Zhou, L., Su, Y.C.F., Chalermglin, P. & Saunders, R.M.K., 2010, Molecular phylogenetics of *Uvaria* (Annonaceae): relationships with *Balanga*, *Dasoclema* and Australian species of *Melodorum*, *Botanical Journal of the Linnean Society* 163, 33-43.