

## Analysis of Three DNA Barcoding (*matK*, *rbcL*, *ITS*) in the Anacardiaceae Family

Olivi Aruanda Ningrum<sup>1</sup>, Dewi Indriyani Roslim<sup>1\*</sup>, Herman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia;

### Article History

Received : March 07<sup>th</sup>, 2026

Revised : April 19<sup>th</sup>, 2026

Accepted : May 02<sup>th</sup>, 2026

\*Corresponding Author:

**Dewi Indriyani Roslim,**

Jurusan Biologi, Fakultas

Matematika dan Ilmu

Pengetahuan Alam,

Universitas Riau, Pekanbaru,

Indonesia;

Email:

[dewiindriyaniroslim@gmail.com](mailto:dewiindriyaniroslim@gmail.com)

**Abstract:** The Anacardiaceae family is a group of tropical plants that have important economic value, but the identification of its species is often hampered by morphological similarities. Molecular approaches through DNA barcoding are an alternative to improve the accuracy of identification and kinship analysis. The purpose of this study was to analyze the combination of three DNA barcodes, namely (*matK*, *rbcL* and *ITS*) in the Anacardiaceae family. The materials used in this study were DNA sequence databases (*rbcL*, *matK*, *ITS*) from the Anacardiaceae family consisting of eight genera and one outgroup used, namely *Pometia pinnata*, downloaded from GenBank through the NCBI website. Sequences were aligned using MAFFT v.7, edited using BioEdit v.7.2, and analyzed using MEGA 11 to calculate nucleotide frequencies, nucleotide base pairs, diversity, and phylogenetic tree reconstruction using the *Neighbor-joining* method with 1000 bootstrapping times. The results showed that the *matK* sequence, a combination of *matK+rbcL* sequences, and a combination of *matK+rbcL+ITS* sequences were the most optimal barcodes for grouping species of the same genus in the Anacardiaceae family and separating out-group species. The *ITS* sequence, a combination of *matK+ITS* sequences, and a combination of *rbcL+ITS* sequences were able to group species of the same genus well but could not separate out-group species. The *rbcL* sequence was not optimal for use as a single DNA barcode.

**Keywords:** Anacardiaceae; DNA barcode; Genetic variation; Multilocus Phylogenetics.

### Pendahuluan

Famili Anacardiaceae yang dikenal sebagai keluarga buah-buahan. Famili Anacardiaceae mencakup sekitar 83 genus dan 860 spesies di seluruh dunia dan ditemukan di wilayah tropis dan subtropis. Secara ekonomi famili ini penting karena menghasilkan buah-buahan yang dapat dimakan. Karakteristik dari famili ini terdiri dari tumbuhan berkayu, buahnya berjenis buah berbiji, daunnya tunggal, majemuk, atau menyirip (Guerra, 2025). Beberapa spesies dari famili Anacardiaceae yaitu, *Mangifera indica*, *Mangifera caesia*, *Mangifera casturi Kosterm*, *Mangifera odorata*, *Anacardium occidentale L*, *Spondias pinnata*

*Kurz*, *Bouea macrophylla* (Latifah & Dharmono, 2018).

Sebagai salah satu famili tumbuhan penting secara ekonomi, identifikasi spesies dalam Anacardiaceae sangat krusial untuk mendukung pemuliaan dan pemanfaatan sumber daya hayati. Selama ini, identifikasi dalam famili Anacardiaceae sering mengandalkan karakter morfologi, seperti bentuk daun, bunga, dan buah. Namun, pendekatan ini memiliki beberapa keterbatasan. Pada spesies mangga madu, identifikasi menggunakan karakter morfologi menjadi sulit karena sifat morfologinya yang tidak stabil dan sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (Ariffin *et al.*, 2015). Selain itu, tingginya perubahan morfologi akibat banyaknya persilangan antar

jenis Mangifera dapat membentuk karakter morfologi yang beragam pada famili ini (Fitmawati *et al.*, 2017), sehingga variasi morfologi yang tumpang tindih dapat menyebabkan kesulitan dalam membedakan spesies secara akurat.

Penelitian morfometrik pada spesies *Anacardium occidentale* (jambu mete), terhadap populasi liar di Brazil menemukan adanya variasi dan tumpang tindih akibat morfologi yang luas (Farias *et al.*, 2024). Bahkan, penelitian pada genus *Pistacia* juga menunjukkan bahwa individu hasil hibridisasi seringkali lebih mirip secara morfologi dengan salah satu induknya meskipun secara genetik lebih dekat ke induk yang lain, sehingga identifikasi berbasis morfologi saja dapat menyesatkan (Temunovic *et al.*, 2024). Menurut Ghorbani *et al.*, (2017); Raclariu *et al.*, (2018); Aulia, (2023) yang menyatakan bahwa pengelompokan yang hanya didasarkan persamaan morfologi bisa menyebabkan salah dalam memilih spesies yang diinginkan, karena kebanyakan spesies memiliki morfologi yang hampir sama. Maka dibutuhkan teknik yang dapat digunakan untuk memperkuat identifikasi spesies secara lebih akurat, salah satunya melalui pendekatan molekuler dengan memanfaatkan teknik barkoding DNA.

Barkoding DNA memanfaatkan sekuens DNA pendek untuk mempermudah proses identifikasi suatu spesies. Barkoding DNA memiliki karakteristik yaitu sekuens DNA bersifat ortolog, mempunyai variabilitas yang bisa membedakan antar spesies. Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan jenis barkode DNA yaitu harus ada pada semua taksa yang dibandingkan, memiliki pengetahuan tentang gen, tingkat evolusi gen sesuai dengan takson yang akan diteliti, mudah dalam melakukan *alignment*, serta harus bersifat homolog. Barkode DNA ini merupakan suatu untai DNA pendek yang unik yang mampu menunjukkan variasi genetik (Rahayu & Jannah, 2019; Aulia, 2023).

Barkode DNA yang ideal harus bersifat universal, memiliki variasi sekuens DNA yang dapat diamplifikasi menggunakan pasangan primer dan bersifat diskriminatif untuk membedakan secara jelas di antara spesies tumbuhan yang memiliki kekerabatan dekat serta menemukan spesies kriptik baru. *The*

*Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) merekomendasikan barkode DNA dari kombinasi dua lokus yaitu *matK* dan *rbcL* untuk barkode tumbuhan. Wilayah *Internal Transcribed Spacer* (*ITS*) yang berada dalam lokus DNA ribosom inti sel (*nuclear ribosomal DNA*) juga direkomendasikan sebagai barkode DNA tumbuhan berbunga (Mishra, 2015; Suudi *et al.*, 2023a).

Studi pada Anacardiaceae menunjukkan bahwa akurasi identifikasi genus menggunakan *matK* mencapai 62,5%, *rbcL* sebesar 60,61%, dan kombinasi *matK+rbcL* meningkat hingga 73,33%, menandakan bahwa penggunaan lebih dari satu barcode dapat meningkatkan ketepatan identifikasi, meskipun masih terdapat tantangan dalam membedakan spesies yang sangat berkerabat dekat (Ryadi *et al.*, 2023). Identifikasi hubungan kekerabatan antar spesies yang tepat sangat penting untuk mendukung analisis filogeni dan menjaga keberlanjutan keanekaragaman hayati. Oleh karena itu dilakukan penelitian ini untuk menganalisis kombinasi tiga barkode DNA (*matK*, *rbcL*, *ITS*) yang dapat memberikan informasi terhadap pengembangan dalam pemuliaan dan taksonomi molekuler sehingga dapat mengurangi kesalahan identifikasi spesies.

## Bahan dan Metode

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan selama bulan Oktober 2025 hingga Januari 2026. Sebagian besar aktivitas penelitian dilakukan secara daring dan berbasis komputer sehingga tidak terdapat lokasi penelitian yang spesifik.

### Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu database sekuens DNA (*rbcL*, *matK*, *ITS*) dari famili Anacardiaceae yang terdiri dari delapan genus serta satu out group yang digunakan yaitu *Pometia pinnata* yang di unduh dari GenBank melalui website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format FASTA, kemudian diolah dan dianalisis menggunakan perangkat lunak berupa notepad, MAFFT v.7, Bioedit v.7.2 dan MEGA 11.

### **Pencarian dan Pengumpulan Sekuens DNA**

Sekuens DNA yang digunakan meliputi gen *matK*, *rbcL* dan *ITS* yang berasal dari famili Anacardiaceae serta ditambahkan spesies *out group* sebagai pembanding. Proses pencarian dilakukan melalui basis data *GenBank* pada website NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan memasukkan nama spesies sesuai barcode DNA pada spesies target. Sekuens yang relevan kemudian dipilih berdasarkan kualitas dan ukuran, lalu diunduh dalam format FASTA. Semua sekuens yang telah diperoleh selanjutnya disimpan dalam *notepad* dan dikelompokkan sesuai dengan jenis sekuens masing-masing.

### **Multiple Sequence Alignment (MSA) dan Pemotongan Sekuens**

*Multiple Sequence Alignment* (MSA) menggunakan perangkat lunak MAFFT v.7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Proses MSA lokus tunggal dimulai dengan mengupload file *notepad* dari sekuens DNA pada masing-masing barkode dari famili Anacardiaceae beserta sekuens *out group* di MAFFT kemudian menekan tombol submit dan proses *running* MSA akan berjalan beberapa detik hingga semua sekuens berhasil diselaraskan. Setelah penyelarasan berhasil dilakukan, kemudian dilakukan analisis arah sekuens menggunakan hasil plot MSA untuk memastikan apakah sekuens sudah berada pada arah *forward* atau *reverse*. Sekuens yang arahnya terbalik akan diperbaiki dengan proses *reverse complement* menggunakan Bioedit v.7.2. Hasil MSA diunduh dalam bentuk format FASTA dan melakukan tahap perapian dengan memotong bagian depan dan belakang sekuens yang mengandung gap akibat mutasi seperti insersi, duplikasi maupun delesi menggunakan Bioedit v.7.2.

### **Penggabungan Sekuens Barkode DNA**

Proses penggabungan dilakukan menggunakan Bioedit v.7.2. Proses ini dilakukan dengan cara membuka file FASTA di mana setiap sekuens tunggal yang telah diselaraskan dan dirapikan digabungkan menjadi satu rangkaian multilokus. Memisahkan antar sekuens digunakan huruf N. Hasil penggabungan kemudian disimpan kembali dalam format FASTA sehingga siap digunakan dalam tahap analisis genetik dan filogenetik.

### **Analisis Frekuensi Nukleotida, Frekuensi Pasangan Basa Nukleotida, Situs Polimorfisme Nukleotida dan Keragaman Nukleotida**

Analisis komposisi dan variasi genetik dengan menggunakan MEGA 11. Langkah pertama yaitu dengan membuka file sekuens hasil MSA dari setiap barkode, lalu tab statistics dan selanjutnya pilih menu *nucleotide composition* untuk melihat frekuensi rata-rata nukleotida dari setiap sekuens berdasarkan barkodenya. Perhitungan frekuensi pasangan nukleotida hanya berbeda pada langkah setelah memilih tab statistic selanjutnya dipilih menu *nucleotide pair frequencis*. Selanjutnya analisis situs polimorfisme nukleotida pada setiap sekuens, analisis ini dilakukan dengan cara memilih menu *conserved site* (C), *variable site* (V), *parsimony informative site* (Pi), dan *singleton site* (S). Analisis selanjutnya berupa perhitungan keragaman nukleotida dilakukan dengan cara memilih *tab selection* lalu memilih menu *Neutrality Tajima's Test*.

### **Rekonstruksi Filogenetik**

Sekuens tunggal maupun kombinasi, selanjutnya dianalisis menggunakan aplikasi MEGA II. Langkah pertama memilih model substitusi berdasarkan kriteria statistic *Akaike Information Criterion* (AIC) dan *Bayesia Information Criterion* (BIC). Setelah model substitusi didapatkan maka pohon filogenetik dibuat dengan metode *Neighbor Joining* (NJ) menggunakan bootstrap sebanyak 1000 kali. Pohon filogenetik yang didapat lalu diunduh dalam format PNG untuk melakukan analisis dan interpretasi data lebih lanjut.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### **Pencarian dan Pengumpulan Sekuens DNA**

Penelitian ini menggunakan sekuens *matK*, *rbcL*, dan *ITS* baik secara tunggal maupun dalam bentuk kombinasi untuk menganalisis hubungan kekerabatan spesies dalam famili Anacardiaceae. Penggunaan lebih dari satu spesies dilakukan untuk memperoleh hasil analisis yang lebih komprehensif serta meningkatkan konsistensi dalam rekonstruksi pohon filogenetik. Pencarian dan pengumpulan sekuens DNA dilakukan melalui basis data NCBI (*National Center for Biotechnology*

Information). NCBI menyediakan informasi sekuens yang terdokumentasi dengan baik dan dilengkapi nomor akses pada setiap spesies, nomor akses tersebut berfungsi sebagai identitas unik yang memastikan setiap data yang digunakan dapat ditelusuri kembali, sehingga mendukung transparansi dan keakuratan dalam proses analisis.

Penelitian ini menggunakan 29 spesies dari famili Anacardiaceae yang mewakili delapan genus yaitu *Mangifera*, *Pistacia*,

*Anacardium*, *Rhus*, *Toxicodendron*, *Schinus*, *Searsia*, dan *Spondias*, serta satu spesies *out group* yaitu *Pometia pinnata* (Tabel 1). Panjang masing-masing sekuens yang digunakan dalam analisis adalah 389 pb untuk *matK*, 348 pb untuk *rbcL*, 623 Pb untuk *ITS*. Selain itu, analisis juga dilakukan menggunakan kombinasi sekuens dengan panjang 742 pb pada kombinasi *matK+rbcL*, 1016 pb pada kombinasi *matK+ITS*, 975 pb pada kombinasi *rbcL+ITS*, serta 1369 pada kombinasi *matK+rbcL+ITS*.

**Tabel 1.** Nama spesies dan nomor akses spesies pada famili Anacardiaceae

No	Spesies	Nomor Akses		
		<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>ITS</i>
1.	<i>Mangifera indica</i>	MH748955.1	LC417318.1	PX363069.1
2.	<i>Mangifera foetida</i>	LC602981.1	LC602989.1	MF678500.1
3.	<i>Mangifera odorata</i>	MH095574.1	OK052772.1	MF678507.1
4.	<i>Mangifera sylvatica</i>	KR531149.1	KR529673.1	AB071689.1
5.	<i>Mangifera quadrifida</i>	LC737302.1	LC736460.1	MF678511.1
6.	<i>Pistacia lentiscus</i>	KM527361.1	OL537055.1	KY549575.1
7.	<i>Pistacia weinmaniifolia</i>	KR531362.1	MF786696.1	KF664191.1
8.	<i>Pistacia atlantica</i>	MT114345.1	MT160037.1	EF193076.1
9.	<i>Anacardium occidentale</i>	AY594459.1	ON675572.1	PV089661.1
10.	<i>Anacardium excelsum</i>	GQ981932.1	GQ981661.1	KF664193.1
11.	<i>Rhus typhina</i>	HQ593409.1	MK526499.1	DQ499060.1
12.	<i>Rhus chinensis</i>	KP089289.1	PV410548.1	EF682845.1
13.	<i>Rhus ovata</i>	MF963575.1	MF963245.1	MT722590.1
14.	<i>Rhus potaninii</i>	MN722257.1	MN722274.1	MN722094.1
15.	<i>Rhus copallinum</i>	MH552249.1	KY627424.1	OR428720.1
16.	<i>Toxicodendron succedaneum</i>	MF786785.1	MF786473.1	AY510153.1
17.	<i>Toxicodendron vernicifluum</i>	KP089348.1	GU935447.1	AY510151.1
18.	<i>Toxicodendron sylvestri</i>	HQ415319.1	HQ415143.1	AY510154.1
19.	<i>Toxicodendron grandiflorum</i>	MF786837.1	MF786557.1	FJ945936.1
20.	<i>Schinus terebinthifolia</i>	KP149521.1	KP149551.1	KP398507.1
21.	<i>Schinus molle</i>	JX517745.1	JX571890.1	AY641512.1
22.	<i>Schinus terebinthifolius</i>	JQ412287.1	JQ412419.1	AY864894.1
23.	<i>Searsia lucida</i>	KM896892.1	KM894214.1	EF682851.1
24.	<i>Searsia pyroides</i>	JX517333.1	JX572977.1	AY641516.1
25.	<i>Searsia undulata</i>	AY594483.1	JQ025088.1	AY594387.1
26.	<i>Searsia leptodictya</i>	JF270933.1	EU213507.1	AY641515.1
27.	<i>Searsia natalensis</i>	JX518140.1	JX572973.1	FJ945953.1
28.	<i>Spondias mombin</i>	KP774611.1	KP774618.1	AF080064.1
29.	<i>Spondias tuberosa</i>	KP774614.1	KP774626.1	KX522674.1
30.	<i>Pometia pinnata</i>	LC737370.1	OK052786.1	PX452870.1

### Analisis Sekuens DNA

Analisis komposisi nukleotida dilakukan untuk mengetahui proporsi basa nitrogen pada masing-masing kandidat barcode DNA yang digunakan dalam penelitian ini. Parameter yang diamati meliputi persentase timin (T), adenin (A), sitosin (C), guanin (G), serta kandungan total A+T dan G+C pada setiap sekuens tunggal

maupun kombinasi multilokus. Komposisi ini memberikan gambaran mengenai kecenderungan dominansi basa dan kestabilan sekuens sebagai penanda molekuler. Hasil analisis komposisi basa nukleotida dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda, namun secara umum memperlihatkan dominansi pada basa Adenin dan Timin. Hasil Analisis

frekuensi rata-rata nukleotida tersebut disajikan pada (Tabel 2).

**Tabel 2.** Rata-rata Frekuensi nukleotida kandidat barkode DNA pada famili Anacardiaceae

Sekuens	Rata-rata Frekuensi Nukleotida (%)					
	T	A	C	G	A+T	G+C
<i>matK</i>	34,1	30,1	17,9	17,7	64,2	35,6
<i>rbcL</i>	28,2	25,7	22,6	23,3	53,9	45,9
<i>ITS</i>	21,9	17,0	31,4	29,4	38,9	60,8
<i>MatK+rbcL</i>	31,3	28,0	20,1	20,3	59,3	40,4
<i>MatK+ITS</i>	26,9	22,4	25,9	24,6	49,3	50,5
<i>RbcL+ITS</i>	24,3	20,4	28,1	27,1	44,7	55,2
<i>MatK+rbcL+ITS</i>	27,3	23,3	25,0	24,2	50,6	49,2

Sekuens *matK* menunjukkan proporsi nukleotida AT relatif tinggi mencapai 64,2%, sedangkan kandungan GC hanya sebesar 35,6%. Pada sekuens *rbcL*, menunjukkan proporsi nukleotida AT mencapai 53,9%, sedangkan kandungan GC hanya sebesar 45,9%. Tingginya kandungan AT pada sekuens *matK* dan *rbcL* dapat disebabkan karena penanda kloroplas memiliki laju substitusi nukleotida yang lebih tinggi serta tingkat mutasi yang tinggi. Menurut Manurung *et al.*, (2018) komposisi basa nukleotida yang paling banyak pada daerah DNA kloroplas adalah Adenin dan Timin.

Sekuens *ITS* menunjukkan kandungan GC yang lebih tinggi 60,8% dibandingkan kandungan AT 38,9%. Tingginya kandungan GC pada *ITS* mengindikasikan kestabilan ikatan

basa yang lebih tinggi serta tingkat variasi genetik yang relatif besar. Hal ini sejalan dengan sifat *ITS* sebagai penanda molekuler yang memiliki tingkat evolusi yang lebih cepat dan variasi sekuens yang tinggi, sehingga efektif dalam membedakan spesies yang berkerabat dekat. (Suudi *et al.*, 2023b). Kombinasi sekuens *matK+rbcL* menunjukkan kandungan AT 31,3 % yang lebih tinggi dibandingkan GC 28,0%, mencerminkan karakter gen kloroplas yang relatif konservatif namun stabil. Penggabungan kedua gen ini menghasilkan keseimbangan antara kestabilan sekuens dan variasi genetik sehingga lebih efektif untuk identifikasi taksonomi dibandingkan penggunaan satu sekuens tunggal.

**Tabel 3.** Polimorfisme basa dan frekuensi pasangan nukleotida kandidat barkode DNA pada famili Anacardiaceae

Sekuens	Polimorfisme				Frekuensi Pasangan Nukleotida		
	CS pb(%)	VS pb (%)	PIS (%)	SS (%)	ii	si	sv
<i>matK</i>	294 (75,5)	95 (24,4)	47 (12,0)	48 (12,3)	373	7	8
<i>rbcL</i>	317 (91,0)	31 (8,9)	16 (4,5)	15 (4,3)	344	2	2
<i>ITS</i>	253 (40,6)	352 (56,5)	235 (37,7)	112(17,9)	461	49	34
<i>MatK+rbcL</i>	611 (82,3)	126 (16,9)	63 (8,4)	63 (8,4)	717	9	10
<i>MatK+ITS</i>	547 (53,8)	447 (43,9)	282 (27,7)	160(15,7)	834	56	42
<i>RbcL+ITS</i>	570 (58,4)	383 (39,2)	251 (25,7)	127(13,0)	805	51	36
<i>MatK+rbcL+ITS</i>	864 (63,1)	478 (34,9)	298 (21,7)	175(12,7)	1178	58	44

Keterangan: CS: *Conserved site*, VS: *Variable site*, Pi: *Parsimony informative site*, S: *Singleton site*, ii: *Identical pairs*, si: *Transition pairs*, sv: *Transversal pairs*

Kombinasi yang melibatkan *ITS* (*matK+ITS* dan *rbcL+ITS*) menunjukkan peningkatan kandungan GC, yang mendukung kontribusi *ITS* sebagai gen penanda yang lebih variatif dan berevolusi lebih cepat. Peningkatan kandungan GC ini berpotensi meningkatkan resolusi filogenetik, khususnya pada tingkat spesies dalam famili Anacardiaceae. Menurut

(Alex *et al.*, 2021; Saputri & Arsyadi, 2025) yang menyatakan bahwa kestabilan sekuens dipengaruhi oleh ikatan hidrogen antar basa. Pasangan GC memiliki tiga ikatan hidrogen yang lebih kuat dibandingkan pasangan AT yang memiliki dua ikatan. Kandungan GC yang lebih tinggi juga memfasilitasi penumpukan basa (*base stacking*), sehingga menghasilkan sekuens

yang lebih stabil dibandingkan sekuens dengan kandungan GC rendah.

Analisis polimorfisme basa dan frekuensi pasangan nukleotida dilakukan pada masing-masing barkode DNA dalam famili Anacardiaceae. Parameter yang diamati meliputi jumlah *conserved site*, *variable site*, *parsimony informative site*, dan *singleton site*, serta frekuensi pasangan nukleotida yaitu, *identical pairs*, *transition pairs*, dan *transversion pairs*. Data ini memberikan gambaran mengenai stabilitas dan laju evolusi setiap sekuens, baik secara tunggal maupun kombinasi multilokus, dalam mendukung analisis filogenetik dan akurasi identifikasi spesies. Hasil analisis tersebut disajikan pada (Tabel 3).

Hasil penelitian ini, sekuens *rbcL* menunjukkan tingkat konservasi tertinggi dibandingkan sekuens lainnya, yang ditunjukkan oleh persentase *conserved site* sebesar 91,0% dan jumlah *variable site* yang rendah 8,9%. Tingginya tingkat *conserved site* ini mengindikasikan bahwa evolusi sekuens gen *rbcL* sangat lambat sehingga kemampuan diskriminasinya menjadi terbatas. *Conserved site* merupakan situs konstan yang sekuensnya cenderung lestari atau tidak mudah mengalami substitusi (Sumarlina *et al.*, 2023). Hal ini sejalan dengan pernyataan Masruroh *et al.*, (2018) yang menyatakan bahwa sekuens *rbcL* kurang sensitif dalam mendeteksi perbedaan pada spesies yang berkerabat dekat, meskipun tetap bermanfaat untuk analisis pada tingkat taksonomi yang lebih tinggi.

Sebaliknya, sekuens *ITS* memperlihatkan tingkat polimorfisme *variable site* tertinggi sebesar 56,5%. Hal ini memandakan sekuens *ITS* memiliki laju evolusi yang cepat serta tingkat variasi genetik yang tinggi. *Variable site* merupakan situs yang umumnya mengandung setidaknya dua jenis nukleotida yang cukup untuk menggambarkan variasi genetik (Ibrahim *et al.*, 2017). Tingginya variasi pada *ITS* mencerminkan laju evolusi yang cepat yang umumnya ditemukan pada daerah inti nonpengkode sehingga memiliki daya diskriminasi yang tinggi pada tingkat spesies (Vertiana *et al.*, 2023). Selain itu, Risah & Jannah, (2025) juga menyatakan bahwa lokus *ITS* menunjukkan jumlah variasi nukleotida dan gap terbanyak, menandakan gen ini bersifat

polimorfik dan memiliki laju mutasi yang tinggi.

Sekuens *matK* menunjukkan proporsi *conserved site* 75,5% yang lebih tinggi dibandingkan *variable site* 24,4%. Hal ini berkaitan dengan sifat penanda kloroplas yang relatif konservatif sehingga proporsi *conserved site* lebih dominan. Tingkat konservasi yang tinggi pada gen *matK* membuatnya kurang bervariasi sehingga kurang efektif untuk membedakan spesies (Risah & Jannah, 2025). Penggunaan kombinasi sekuens *matK+rbcL*, *matK+ITS* *rbcL+ITS* dan *matK+rbcL+ITS* menunjukkan jumlah *conserved site* yang lebih tinggi dibandingkan *variable site*. Variasi basa nukleotida yang terjadi pada situs-situs tersebut disebabkan karena adanya substitusi basa nukleotida. Perubahan basa yang terjadi berupa substitusi transisi dan transversi (Hasibuan *et al.*, 2017).

Jumlah pasangan identik menunjukkan konsistensi serta kesamaan posisi nukleotida yang tepat di antara sekuens yang dibandingkan. Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai pasangan identik (ii) tertinggi pada sekuens *ITS* serta kombinasi yang melibatkan *ITS* (*matK+ITS*, *rbcL+ITS*, *matK+rbcL+ITS*). Selain itu, pola substitusi basa menunjukkan bahwa perubahan nukleotida cenderung didominasi oleh substitusi transisi dibandingkan transversi. Dominasi transisi dibandingkan transversi menunjukkan bahwa perubahan basa yang terjadi cenderung mempertahankan kesamaan struktur kimia nukleotida, sehingga lebih dapat ditoleransi secara evolusioner. Hal ini sejalan dengan pernyataan (Stansfield, 2006; Masruroh *et al.*, 2018) yang menyatakan bahwa pada mutasi transisi terjadi pergantian suatu pasangan basa yang mengakibatkan perubahan kode genetik, akan tetapi tidak merubah asam amino sehingga tidak mengakibatkan perubahan fungsi protein.

Analisis keragaman genetik dan dinamika variasi pada kandidat barkode DNA famili Anacardiaceae dilakukan dengan menganalisis nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ) serta statistik uji Tajima's D. Parameter ini digunakan untuk menggambarkan bagaimana variasi genetik menyebar dalam populasi spesies yang diuji serta mendeteksi kemungkinan adanya perubahan populasi yang dapat mempengaruhi

pola variasi tersebut. Hasil analisis tersebut disajikan pada (Tabel 4).

**Tabel 4.** Nilai keragaman nukleotida sekuens barkode DNA pada famili Anacardiaceae

Sekuens	<i>m</i>	<i>S</i>	<i>Ps</i>	$\Theta$	$\pi$	<i>D</i>
<i>matK</i>	30	95	0,244215	0,022485	0,038176	-1,452624
<i>rbcL</i>	30	31	0,089080	0,022485	0,011652	-1,745044
<i>ITS</i>	30	352	0,565008	0,142619	0,133532	-0,247956
<i>MatK + rbcL</i>	30	126	0,169811	0,042864	0,025479	-1,557708
<i>MatK + ITS</i>	30	447	0,439960	0,111054	0,096497	-0,510958
<i>RbcL + ITS</i>	30	383	0,392820	0,099155	0,089483	-0,379874
<i>MatK + rbcL + ITS</i>	30	478	0,349159	0,088134	0,074577	-0,599840

Keterangan: *m*: jumlah sekuens sampel, *n*: total situs basa nukleotida, *S*: jumlah situs yang mengalami segregasi, *ps*: *S/n*,  $\Theta$ : *ps/al*,  $\pi$ : keragaman nukleotida, dan *D*: Nilai uji Tajima

Nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ) pada seluruh sekuens berada pada kisaran 0,011652 pada *rbcL* hingga 0,133532 pada *ITS*. Sekuens *ITS* menunjukkan nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ) tertinggi dibandingkan sekuens *matK* dan *rbcL*, mengindikasikan bahwa sekuens *ITS* cenderung memiliki tingkat variasi genetik yang lebih tinggi. Hal ini sejalan dengan karakter *ITS* yang berevolusi lebih cepat dan sering digunakan untuk mendeteksi variasi intraspesifik maupun antarspesies secara lebih sensitif. (Perwitasari *et al.*, 2020).

Pada sekuens *rbcL* memiliki nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ) terendah yang menunjukkan sifatnya sebagai gen konservatif dengan tingkat mutasi relatif rendah. Sementara itu, *matK* menunjukkan nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ) yang lebih tinggi dibandingkan *rbcL*, namun masih lebih rendah dibandingkan *ITS*. Kombinasi antar sekuens *matK+rbcL*, *matK+ITS*, *rbcL+ITS*, dan *matK+rbcL+ITS* menunjukkan nilai keragaman genetik yang bervariasi. Nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ) berkisar antara 0-1, di mana kecenderungan ke arah 0 menunjukkan adanya keragaman yang lebih sedikit atau rendah (Kumar *et al.*, 2022). Keragaman genetik yang rendah dapat terjadi melalui proses domestikasi, seleksi dan *breeding* yang dapat menimbulkan perubahan frekuensi genetik atau mutasi. Hal-hal tersebut dapat menjadi taktor pendorong evolusi pada suatu populasi (Adimaka *et al.*, 2019).

Hasil uji netralitas Tajima's *D* menunjukkan bahwa seluruh sekuens baik sekuens tunggal maupun kombinasi memiliki nilai Tajima's *D* negatif, dengan kisaran antara -0,247956 *ITS* hingga -1,745044 pada *rbcL*. Nilai Tajima's *D* yang lebih rendah pada *ITS*

berkaitan dengan tingginya tingkat polimorfisme dan laju evolusi pada penanda tersebut, sehingga distribusi variasi nukleotidanya didominasi oleh mutasi berfrekuensi rendah dan menunjukkan penyimpangan yang kuat dari keseimbangan netral. Sebaliknya, nilai Tajima's *D* yang sangat tinggi pada *rbcL* mencerminkan sifat gen kloroplas yang lebih konservatif dengan variasi yang relatif terbatas dan distribusi variasi yang lebih merata dalam populasi sehingga menghasilkan nilai Tajima's *D* yang lebih tinggi.

Tajima's *D* dihitung sebagai perbedaan antara dua ukuran keragaman genetik, jumlah rata-rata perbedaan berpasangan dan jumlah situs yang memisahkan masing-masing diskalakan sehingga diharapkan sama dalam populasi yang berkembang secara netral dengan ukuran konstan (Kumar *et al.*, 2022). Nilai negatif pada uji Tajima's *D* menunjukkan adanya ekspansi populasi atau seleksi alam yang menyebabkan kehilangan keragaman genetik (Katonge & Ally, 2025). Tajima's *D* sensitif terhadap perubahan populasi seperti, penyempitan populasi (*bottlenecks*) yang menyebabkan nilainya bergerak menuju nilai yang lebih negatif (Tajima, 1989; Naim *et al.*, 2020).

### Analisis Filogenetik

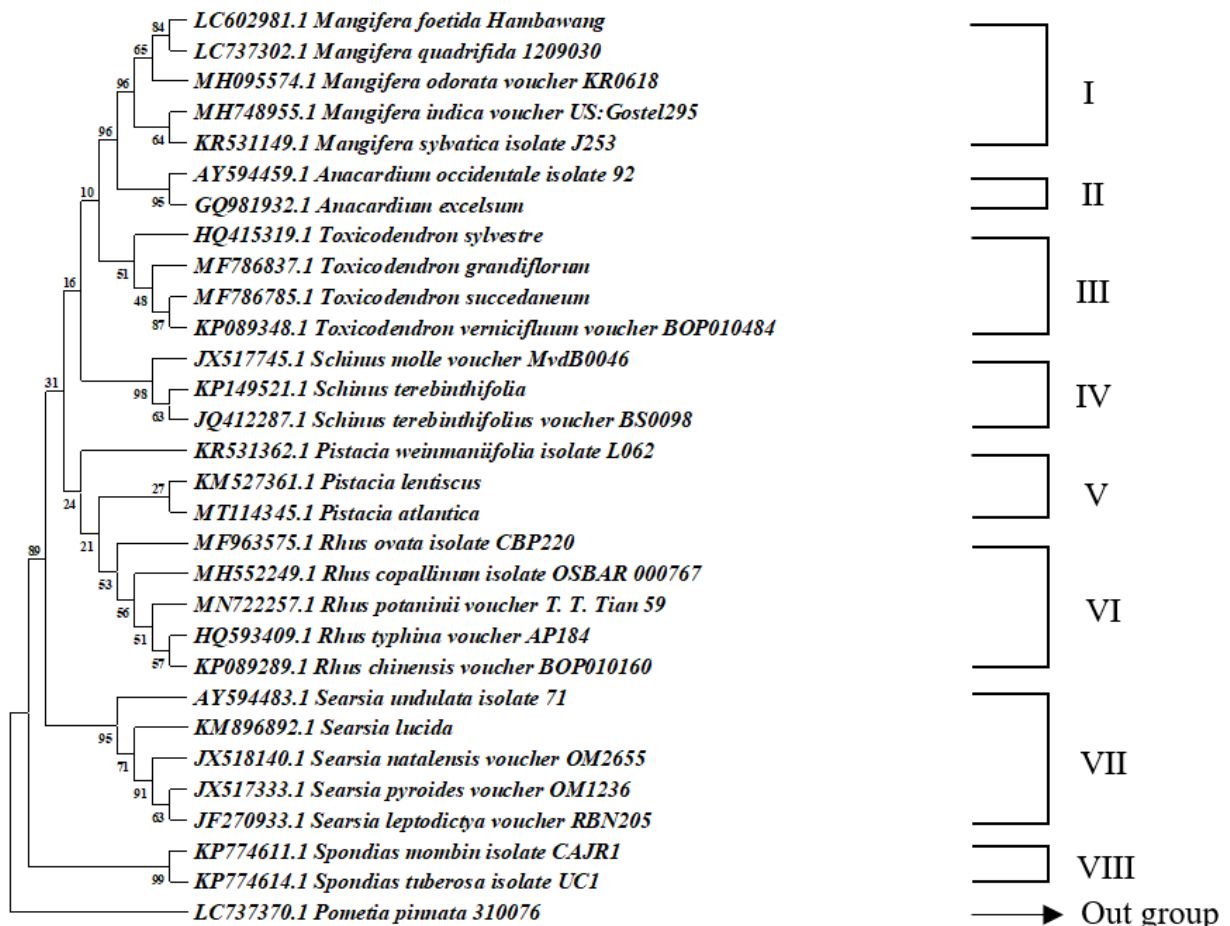
Analisis filogenetik pada penelitian ini dilakukan dengan menyusun pohon filogenetik untuk melihat hubungan kekerabatan antar spesies. Pohon filogenetik direkonstruksi dengan menggunakan metode *Neighbor-joining* (NJ) dengan perhitungan bootstrap 1000x. Nilai pada setiap cabang menunjukkan seberapa jauh atau dekat kekerabatan suatu spesies.

Berdasarkan analisis pohon filogenetik famili Anacardiaceae yang disusun berdasarkan sekuens tunggal *matK*, *rbcL*, dan *ITS*, serta berbagai kombinasi antar sekuens, diperoleh perbedaan pola pengelompokan spesies pada masing-masing sekuens.

Analisis filogenetik dipresentasikan dalam bentuk pohon filogenetik menunjukkan bahwa sekuens *rbcL* tidak mampu memisahkan beberapa genus dengan baik (Gambar 2). Sekuens terbaik diperoleh dari lokus tunggal *matK* (Gambar 1), kombinasi sekuens *matK+rbcL* (Gambar 4), serta kombinasi sekuens *matK+rbcL+ITS* (Gambar 7), kategori terbaik ini didasarkan pada kemampuan sekuens dalam mengelompokkan spesies segenus dalam famili Anacardiaceae serta kemampuannya dalam memisahkan spesies *out group*. Sekuens *ITS* (Gambar 3), kombinasi sekuens *matK+ITS* (Gambar 5), kombinasi sekuens *rbcL+ITS*

(Gambar 6) mampu mengelompokkan spesies segenus dengan baik tetapi tidak dapat memisahkan spesies *out group* dari spesies *in group*.

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik famili Anacardiaceae menggunakan sekuens *matK* (Gambar 4.1) menunjukkan hasil yang optimal. Pohon filogenetik yang dihasilkan oleh sekuens *matK* mampu memisahkan antara klade *in group* dan klade *out group*. Sekuens *matK* mampu merekonstruksi pola kekerabatan dengan baik pada tingkat genus dalam famili Anacardiaceae. Spesies-spesies yang berasal dari genus yang sama cenderung membentuk klade yang jelas dan terpisah dari genus lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa sekuens *matK* mengandung informasi filogenetik yang memadai untuk membedakan kelompok takson yang berbeda secara evolusioner.

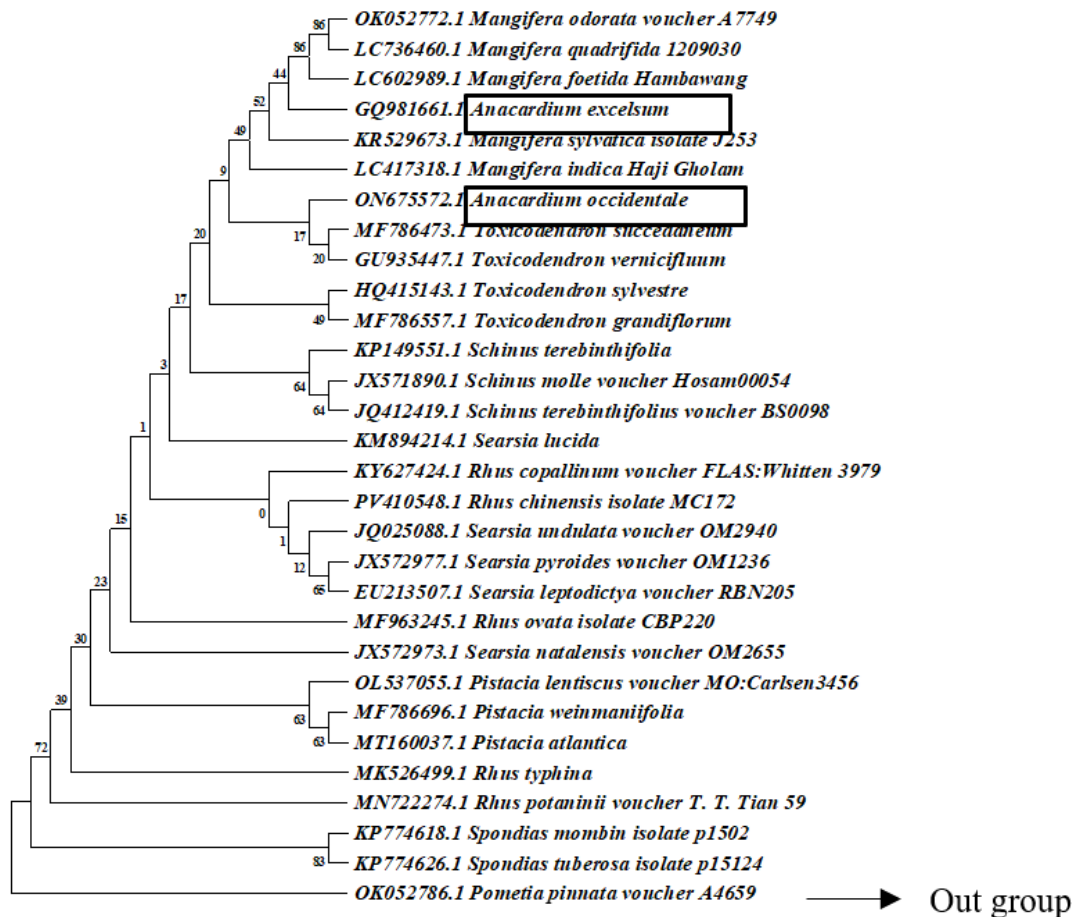


**Gambar 1.** Pohon filogenetik dari famili Anacardiaceae yang dikonstruksi berdasarkan sekuens *matK* menggunakan metode *Neighbor-joining* dengan *bootstrap* 1000x

Genus-genus seperti *Mangifera*, *Anacardium*, *Toxicodendron*, *Schinus*, *Pistacia*, *Rhus*, *Searsia*, dan *Spondias* masing-masing membentuk klade tersendiri, yang mencerminkan adanya kedekatan genetik antarspesies dalam satu genus serta perbedaan genetik yang nyata antar genus. Pola pengelompokan pada sekuens *matK* menunjukkan bahwa variasi nukleotida pada sekuens *matK* cukup untuk menggambarkan hubungan kekerabatan antarspesies, namun tetap bersifat konservatif. Pada beberapa kelompok dengan tingkat kekerabatan yang sangat dekat, resolusi sekuens *matK* pada tingkat spesies masih relatif terbatas yang dapat dilihat dari nilai bootstrap yang tergolong sangat rendah hingga rendah. Kategori nilai bootstrap meliputi tinggi (>85%) moderat (70–85 %), rendah (50–69 %), atau sangat rendah (<50%) (Lestari *et al.*, 2018). Kondisi ini berkaitan dengan sifat gen *matK* sebagai gen kloroplas

yang relatif konservatif. Dengan demikian, sekuens *matK* dapat efektif dalam menyediakan informasi filogenetik untuk analisis kekerabatan pada tingkat genus. Hasil ini sejalan dengan penelitian Lestari *et al.*, (2018) yang menyatakan bahwa sekuens *matK* lebih mampu membedakan antar genus.

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik famili Anacardiaceae menggunakan sekuens *rbcL* (Gambar 4.2) menunjukkan hasil yang tidak optimal digunakan sebagai barkode DNA tunggal. Pohon filogenetik yang dihasilkan oleh sekuens *rbcL* menunjukkan bahwa penanda ini belum mampu memisahkan seluruh genus dalam famili Anacardiaceae secara jelas. Pada sekuens *rbcL*, spesies dari genus *Mangifera* cenderung mengelompok dalam satu kelompok dengan genus *Anacardium*. Selain itu, genus *Rhus* dan *Searsia* menunjukkan pola pengelompokan yang saling bercampur.

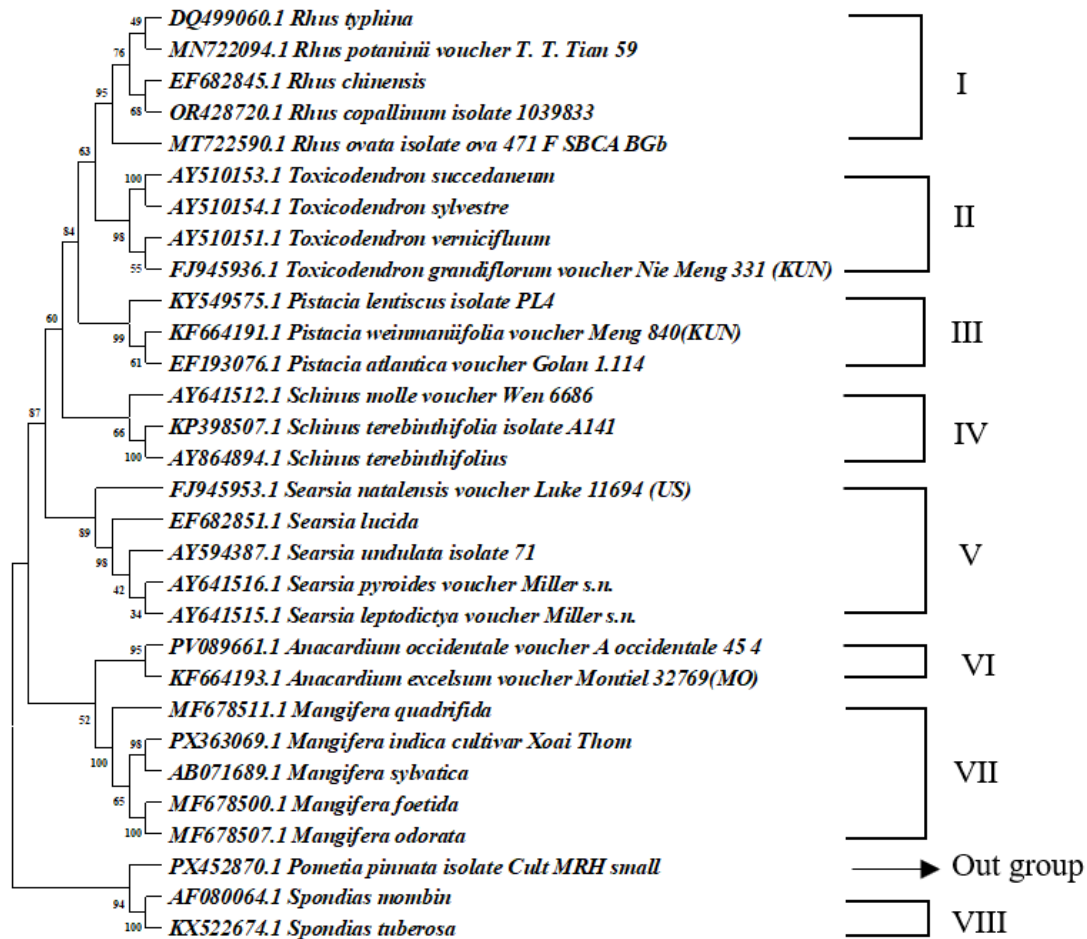


**Gambar 2.** Pohon filogenetik dari famili Anacardiaceae yang dikonstruksi berdasarkan sekuens *rbcL* menggunakan metode *Neighbor-joining* dengan *bootstrap* 1000x.

Pohon filogenetik yang dihasilkan dengan sekuens *rbcL* terlihat bahwa topologi pohon cenderung lebih sederhana dan konservatif. Banyak spesies yang berada dalam satu klade besar tanpa pemisahan yang jelas antar spesies dalam genus yang sama. Kondisi ini menunjukkan bahwa *rbcL* memiliki kemampuan diskriminasi yang rendah pada tingkat spesies terutama pada kelompok yang memiliki kekerabatan dekat. Menurut Perwitasari *et al.*, (2020); Dwinianti *et al.*, (2025) variasi genetik yang rendah pada sekuens *rbcL* menyebabkan gen tersebut kurang efektif digunakan sebagai barkode DNA pada tingkat spesies. *rbcL* mengkode protein RuBisCo yang berperan dalam fiksasi karbon saat proses fotosintesis. Salah satu karakter dari DNA kloroplast bersifat

lebih konservatif dengan tingkat substitusi nukleotida yang rendah (Sundari *et al.* 2019). Hal ini diperkuat oleh pernyataan Risah & Jannah (2025) yang menyatakan, laju mutasi yang rendah pada *rbcL* juga menghasilkan tingkat kesamaan sekuens yang tinggi terutama di antara spesies dalam satu genus.

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik famili Anacardiaceae menggunakan sekuens *ITS* (Gambar 3) menunjukkan hasil yang optimal. Pohon filogenetik yang dihasilkan oleh sekuens *ITS* menunjukkan resolusi yang baik. Sekuens *ITS* mampu mengelompokkan spesies ke dalam kelompok masing-masing berdasarkan genusnya serta dapat membentuk klade yang kuat. Namun masih terbatas dalam memisahkan klade *in group* dan klade *out group*.



**Gambar 3.** Pohon filogenetik dari famili Anacardiaceae yang dikonstruksi berdasarkan sekuens *ITS* menggunakan metode *Neighbor-joining* dengan *bootstrap* 1000x.

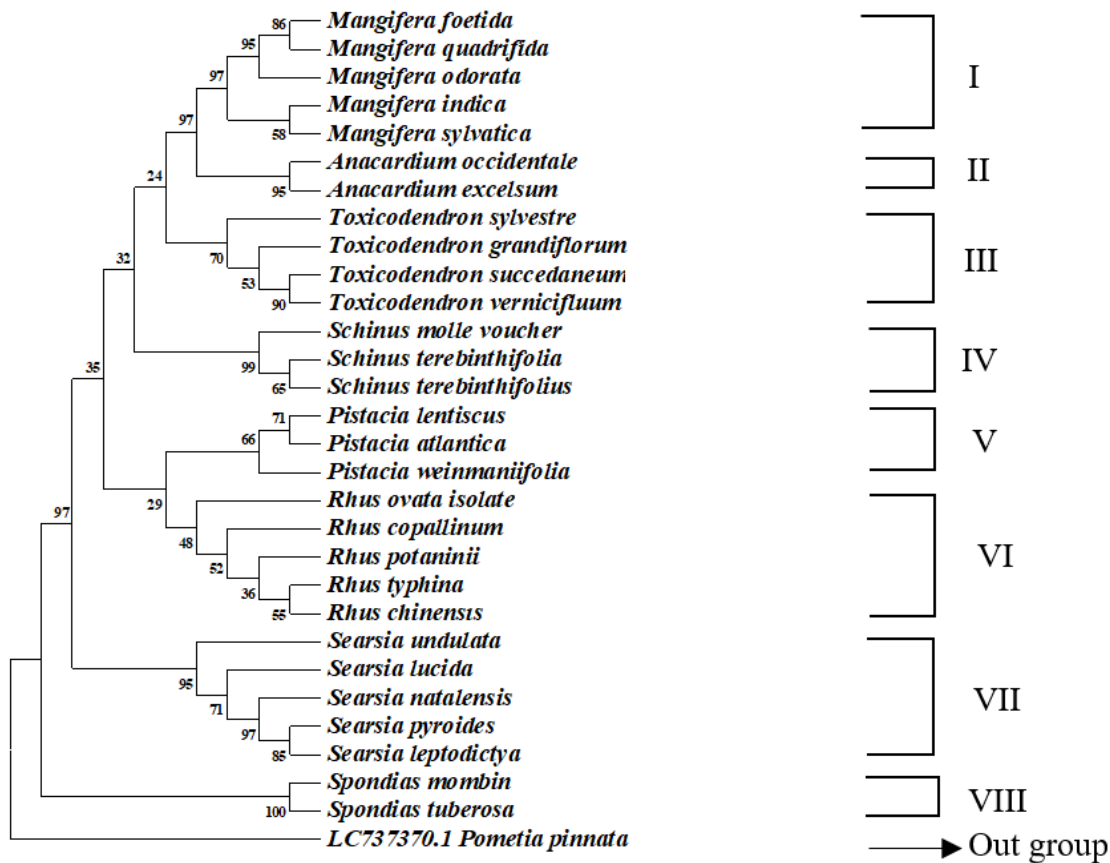
Tingginya jumlah variable site pada *ITS* berkontribusi besar terhadap meningkatnya kemampuan sekuens ini dalam mendeteksi

perbedaan genetik antar spesies. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Vertiana *et al.*, (2023) bahwa sekuens *ITS* dapat

memberikan gambaran yang informatif mengenai filogenetik molekuler dari *Heliconia* pada tingkat spesies. Selain itu, Pohon filogenetik yang dihasilkan sekuens *ITS* menunjukkan bahwa genus *Mangifera* berkelompok berdekatan dengan genus *Anacardium*, meskipun masing-masing berada pada cabang yang berbeda. Pola ini mengindikasikan adanya hubungan kekerabatan yang dekat antara kedua genus tersebut dalam famili Anacardiaceae. Hal ini sejalan dengan penelitian Savadi *et al.*, (2022) bahwa spesies *Anacardium* memiliki kedekatan filogenetik dengan *Mangifera*. Sekuens *ITS* memiliki potensi sebagai barkode DNA karena kemampuannya dalam membedakan spesies

berdasarkan pewarisan biparental dan tingginya variasi genetik (Risah & Jannah, 2025).

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik famili Anacardiaceae menggunakan sekuens *matK+rbcL* (Gambar 4) menunjukkan hasil yang optimal. Penggunaan kombinasi sekuens menunjukkan peningkatan kualitas pohon filogenetik. Pada kombinasi *matK+rbcL*, resolusi pohon meningkat dibandingkan *rbcL* saja, ditandai dengan pemisahan klade yang lebih jelas. Hal ini menunjukkan bahwa kontribusi *matK* mampu meningkatkan variasi genetik pada pohon yang awalnya bersifat sangat konservatif, serta kombinasi *matK+rbcL* mampu memisahkan antara klade *in grup* dan klade *out grup*.



**Gambar 4.** Pohon filogenetik dari famili Anacardiaceae yang dikonstruksi berdasarkan sekuens *matK+rbcL* menggunakan metode *Neighbor-joining* dengan *bootstrap* 1000x.

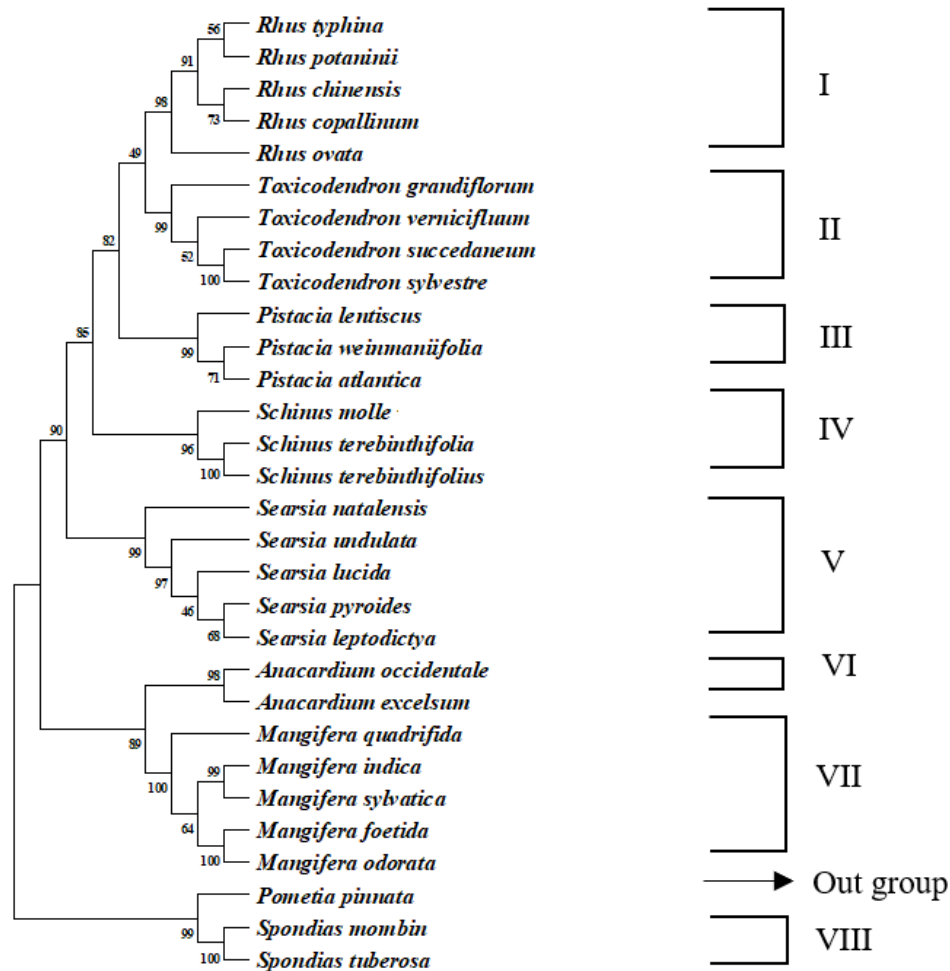
Topologi pohon memperlihatkan bahwa sebagian besar spesies dalam genus yang sama berada pada cabang yang berdekatan dan membentuk kelompok yang jelas. Pola ini menunjukkan adanya kesamaan sekuens DNA yang tinggi di antara spesies dalam satu genus. Struktur percabangan antar kelompok utama

juga tampak tersusun secara sistematis, mencerminkan hubungan kekerabatan yang bertahap sesuai tingkat kedekatan genetik.

Sekuens *rbcL* sebagai gen kloroplas yang relatif konservatif berperan dalam menggambarkan hubungan pada tingkat famili dan genus karena memiliki laju evolusi yang

lambat dan stabil. Sekuens *matK* memiliki variasi nukleotida yang lebih tinggi sehingga memberikan tambahan karakter pembeda antarspesies. Kombinasi kedua gen ini meningkatkan jumlah karakter informatif dalam analisis, sehingga struktur pohon yang dihasilkan menjadi lebih representatif dalam menggambarkan pola kekerabatan. Hal ini sejalan dengan penelitian wardani *et al.*, (2022) yang menyatakan bahwa *matK+rbcL* efektif sebagai barkode tumbuhan, kedua penanda kloroplas ini bekerja dengan baik dalam mengidentifikasi spesies, serta memiliki tingkat akurasi tinggi dalam mengidentifikasi spesies. Dengan demikian, pohon filogenetik yang dihasilkan oleh kombinasi sekuens *matK+rbcL* menunjukkan bahwa pendekatan multilokus kloroplas mampu merefleksikan hubungan kekerabatan dalam Anacardiaceae secara cukup jelas dan terstruktur.

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik famili Anacardiaceae menggunakan sekuens *matK+ITS* (Gambar 5) menunjukkan hasil yang optimal. Pohon filogenetik hasil kombinasi sekuens *matK+ITS* menunjukkan pengelompokan spesies famili Anacardiaceae ke dalam masing-masing klade secara konsisten. Kombinasi kedua sekuens ini memberikan resolusi yang lebih baik karena menggabungkan karakter sekuens *matK* yang relatif konservatif dengan sekuens *ITS* yang lebih variatif, sehingga mampu merekonstruksi hubungan kekerabatan. Setiap genus seperti *Rhus*, *Toxicodendron*, *Pistacia*, *Schinus*, *Searsia*, *Anacardium*, *Mangifera*, dan *Spondias* cenderung membentuk dengan nilai bootstrap yang cukup tinggi, menunjukkan dukungan hubungan kekerabatan yang kuat terhadap pola percabangan tersebut.

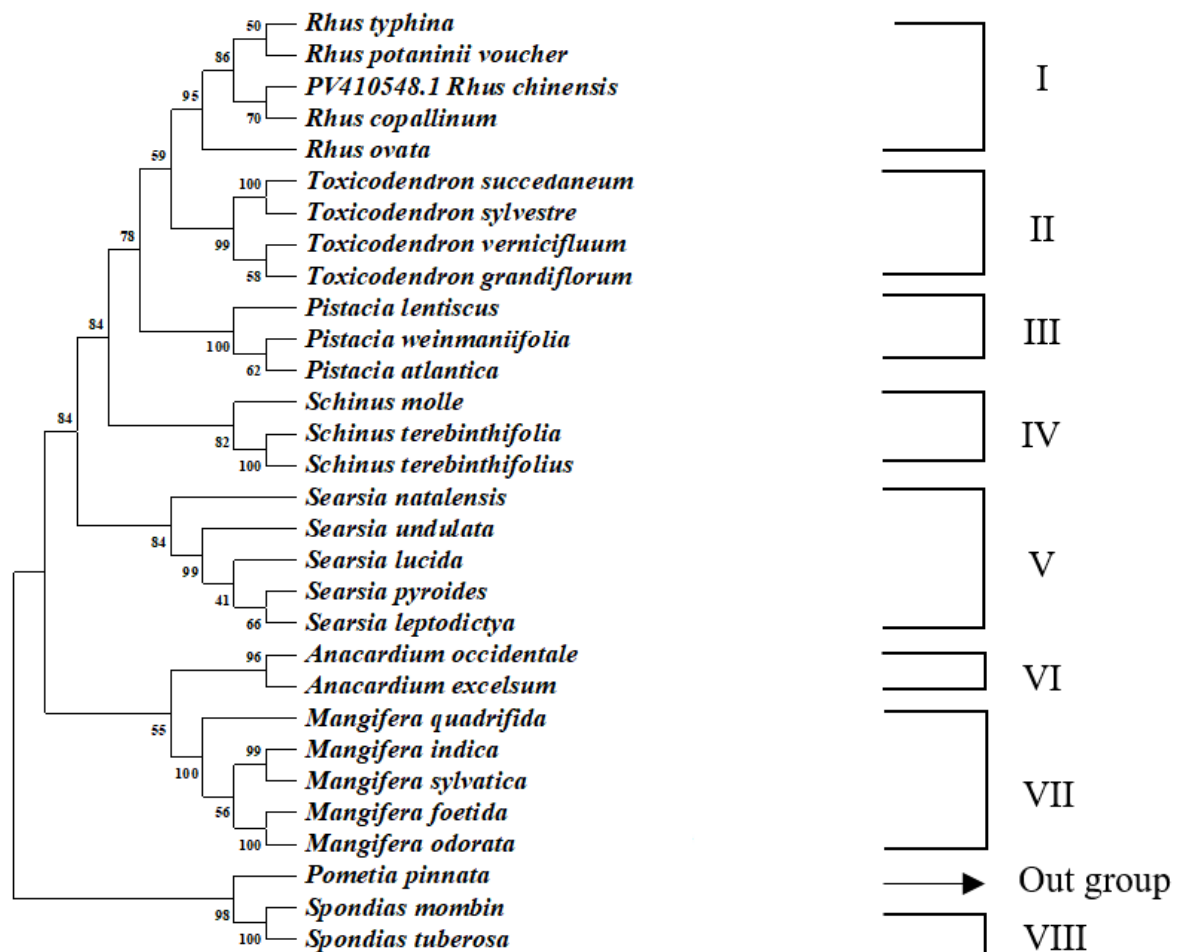


**Gambar 5.** Pohon filogenetik dari famili Anacardiaceae yang dikonstruksi berdasarkan sekuens *matK+ITS* menggunakan metode *Neighbor-joining* dengan *bootstrap* 1000x

Kombinasi sekuens *matK*+*ITS* efektif dalam mengungkap divergensi genetik dalam Anacardiaceae. Namun, posisi *out group* yaitu *Pometia pinnata* tampak tidak terpisah dari spesies *in group* dan berada relatif dekat dengan genus *spondias*. Kondisi ini dapat disebabkan oleh kedekatan evolusioner *out group* dengan genus yang dianalisis, serta sifat gen *matK* yang konservatif sehingga jarak genetik yang terbentuk tidak terlalu besar. Meskipun demikian, *Pometia pinnata* tetap berada di luar kelompok *in group* dan masih berfungsi sebagai penentu arah evolusi pada pohon sehingga tidak mempengaruhi hubungan kekerabatan. Oleh karena itu, kombinasi *matK*+*ITS* mampu memberikan gambaran struktur filogenetik yang

jelas meskipun pemisahan *out group* tidak terlalu jauh secara topologi.

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik famili Anacardiaceae menggunakan sekuens *rbcL*+*ITS* (Gambar 6) menunjukkan hasil yang optimal. Analisis filogenetik menggunakan kombinasi sekuens *rbcL*+*ITS*, pohon yang dihasilkan menunjukkan pengelompokan spesies ke dalam beberapa klade utama yang umumnya konsisten dengan batasan genus dalam famili Anacardiaceae. Spesies dalam genus yang sama cenderung mengelompok dalam satu klade dengan nilai bootstrap yang relatif tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi penanda *rbcL* dan *ITS* mampu meningkatkan resolusi dan memperjelas hubungan kekerabatan.



**Gambar 6.** Pohon filogenetik dari famili Anacardiaceae yang dikonstruksi berdasarkan sekuens *rbcL*+*ITS* menggunakan metode *Neighbor-joining* dengan *bootstrap* 1000x.

Spesies *out group* dalam pohon ini tidak sepenuhnya terpisah dari kelompok *in group*.

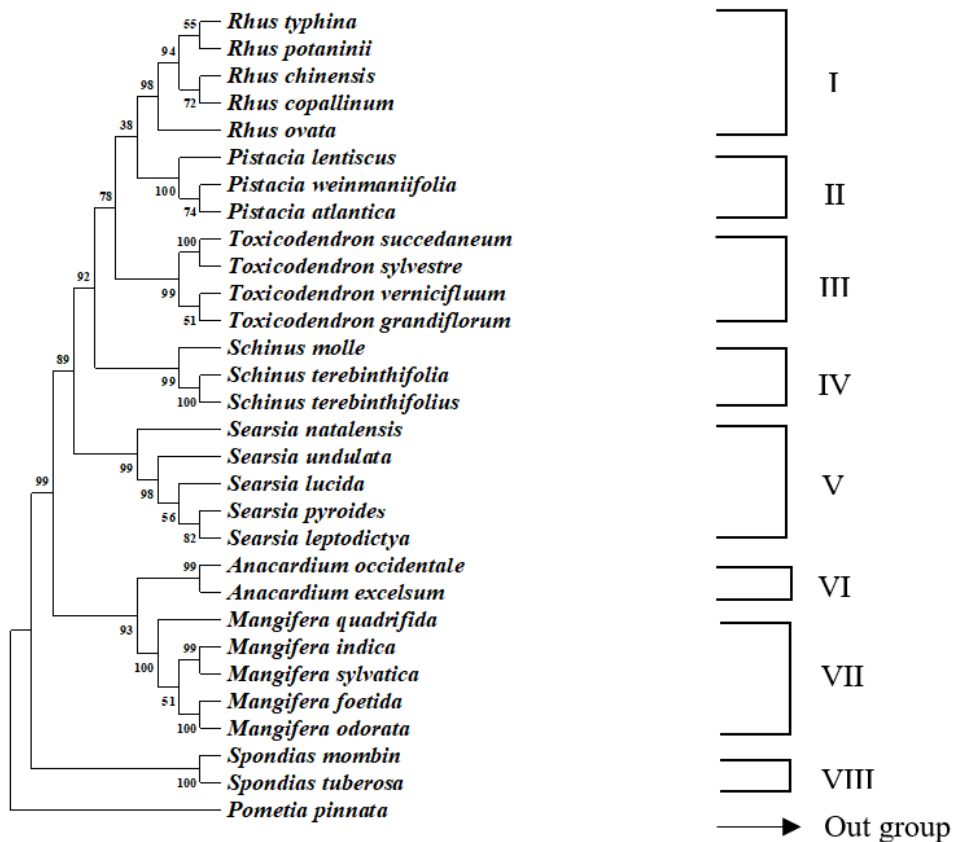
Spesies yang digunakan sebagai *out group* yaitu *Pometia pinnata*, terlihat berada pada cabang

yang masih relatif dekat dengan genus *Spondias*. *Out group* berfungsi sebagai pembanding dan terpisah jelas dari seluruh spesies *in group* untuk membantu menentukan arah evolusi. Pemisahan yang kurang jelas dapat mengindikasikan bahwa jarak genetik antara klade *out group* dan klade *in group* tidak terlalu besar, sekuens *rbcL* yang cenderung konservatif belum cukup memberikan sinyal divergensi yang kuat pada tingkat spesies. Selain itu, kemungkinan adanya kesamaan sekuens pada daerah *ITS* tertentu juga dapat mempengaruhi posisi topologi pohon.

Hal ini dapat mencerminkan kedekatan evolusioner antar spesies dalam lingkup yang sama atau keterbatasan jumlah dan variasi karakter molekuler yang digunakan. Meskipun demikian, secara keseluruhan struktur klade utama tetap terbentuk dengan baik dan sebagian besar genus menunjukkan pengelompokan yang konsisten sesuai kekerabatannya. Oleh karena itu, kombinasi *rbcL+ITS* dalam penelitian ini

cukup efektif dalam merekonstruksi hubungan kekerabatan famili Anacardiaceae.

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik famili Anacardiaceae menggunakan sekuens *matK+rbcL+ITS* (Gambar 7) menunjukkan hasil yang optimal. Berdasarkan pohon filogenetik kombinasi sekuens *matK+rbcL+ITS*, hubungan kekerabatan spesies dalam famili Anacardiaceae menunjukkan pola pengelompokan yang jelas dan tersusun secara sistematis. Spesies *Pometia pinnata* digunakan sebagai *out group* menunjukkan pemisahan evolusioner yang sangat kuat antara kelompok luar dan seluruh anggota Anacardiaceae. Topologi pohon memperlihatkan bahwa spesies-spesies yang berada dalam genus yang sama cenderung mengelompok dalam satu cabang yang sama dengan dukungan nilai *bootstrap* yang tinggi. Struktur percabangan antar kelompok utama juga terlihat stabil, dengan pemisahan antar spesies yang jelas dan konsisten.



**Gambar 7.** Pohon filogenetik dari famili Anacardiaceae yang dikonstruksi berdasarkan sekuens *matK+rbcL+ITS* menggunakan metode *Neighbor-joining* dengan *bootstrap* 1000x.

Kombinasi penanda kloroplas *matK* dan *rbcL* dengan penanda inti *ITS* menghasilkan jumlah karakter informatif yang cukup besar untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan secara detail. Gen *rbcL* yang relatif konservatif berperan dalam menjaga kestabilan struktur percabangan, *matK* memberikan variasi tambahan, sedangkan *ITS* yang memiliki laju evolusi lebih cepat membantu memperjelas perbedaan antar spesies yang berkerabat dekat. Secara keseluruhan, pohon filogenetik kombinasi *matK+rbcL+ITS* menunjukkan bahwa pendekatan multilokus mampu menggambarkan pola kekerabatan dalam Anacardiaceae secara jelas, terstruktur, dan didukung oleh nilai bootstrap yang kuat pada sebagian besar percabangan.

Berdasarkan hasil penelitian ini, sekuens terbaik diperoleh dari lokus tunggal *matK*, kombinasi sekuens *matK+rbcL*, serta kombinasi sekuens lokus *matK+rbcL+ITS*, kategori terbaik ini didasarkan pada kemampuan sekuens dalam mengelompokkan spesies segenus dalam famili Anacardiaceae serta kemampuannya dalam memisahkan spesies *out group*. Sekuens *ITS*, Kombinasi sekuens *matK+ITS*, kombinasi sekuens *rbcL+ITS*, mampu mengelompokkan spesies segenus dengan baik tetapi tidak dapat memisahkan spesies *out group* dari spesies *in group*. Sedangkan sekuens *rbcL* tidak mampu memisahkan beberapa genus dengan baik dengan resolusi filogenetik yang relatif rendah yang didukung dari nilai *bootstrap* cenderung rendah

## Kesimpulan

Sekuens *matK*, kombinasi sekuens *matK+rbcL*, serta kombinasi sekuens lokus *matK+rbcL+ITS* adalah barkode yang paling optimal untuk mengelompokkan spesies segenus dalam famili Anacardiaceae serta memisahkan spesies *out group*. Sekuens *ITS*, kombinasi sekuens *matK+ITS*, kombinasi sekuens *rbcL+ITS*, mampu mengelompokkan spesies segenus dengan baik tetapi tidak dapat memisahkan spesies *out group*. Sekuens *rbcL* tidak optimal digunakan sebagai barkode DNA tunggal.

## Ucapan Terima Kasih

Peneliti menyampaikan terima kasih kepada Prof. Dr. Dewi Indriyani Roslim, M.Si., Teknisi Laboratorium Genetika Jurusan Biologi FMIPA UNRI, keluarga, serta teman-teman, yang telah memberikan dukungan, saran, dan bantuan selama proses penelitian ini.

## Referensi

- Adimaka, N., Rifki, M., Dewanti, R. & Cahyadi, M. (2019). Keragaman genetik puyuh Jepang (*Coturnix japonica*) berdasarkan analisis sekuen DNA mitokondria gen Cytochrome-b. *Jurnal Ilmu-lmu Peternakan*, 29(2):143-151.  
<https://doi.org/10.21776/ub.jiip.2019.029.02.05>.
- Alex, VN., Denisse, T. & Christine, RB. (2021). *Hotspots of Human mutation. Trends in Genetics*, 37:717-729.  
doi:10.1016/j.tig.2020.10.003.
- Ariffin, Z., Sah, MD., Idris, S. & Hashim, N. (2015). Genetic diversity of selected *mangifera* species revealed by inter simple sequence repeats markers. *International Journal of Biodiversity*, 1–8.  
<https://doi.org/10.1155/2015/458237>.
- Aulia, A. (2022). Studi in silico potensi dna barcode berbasis dna kloroplas (Cpdna) untuk identifikasi variasi genetik *opuntis sp.* *Jurnal Syntax Admiration*, 3(11):1383- 1394.  
<https://doi.org/10.46799/jsa.v3i11.512>.
- CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. Di dalam: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. hlm. 12794-12797.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>.
- Dwinianti, EF., Ainiyah, D., Afidah, Y & Suudi, M. (2025). DNA barcode analysis of *dendrobium sp.* based on *rbcL* sequence. *Jurnal Biologis Tropis*, 25(4):5795-5803.  
doi:10.29303/jbt.v25i4.10177.
- Farias, JC., Mayo, SJ., Vieira, IR. & Andrade, IMD. (2024). Using morphometrics to distinguish the restinga and cerrado

- ecotypes of wild *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae): a preliminary study in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 310(3):1-23.  
doi:10.1007/s00606-023-01887-7
- Fitmawati, F., Juliantari, E. & Sofiyanti, N. (2017). Phylogenetic study of *mangifera* central sumatra based on *rbcL* sequences. *Applied Science and Technology*, 1(1): 128-131.  
[https://www.researchgate.net/publication/323357181\\_Phylogenetic\\_Study\\_of\\_Man\\_gifera\\_Central\\_Sumatra\\_Based\\_on\\_rbcl\\_Sequences](https://www.researchgate.net/publication/323357181_Phylogenetic_Study_of_Man_gifera_Central_Sumatra_Based_on_rbcl_Sequences).
- Ghorbani, A., Saeedi, Y. & De Boer, HJ. (2017). Unidentifiable by morphology: DNA barcoding of plant material in local markets in Iran. *PLoS One*, 12(4):1-15.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175722>.
- Guerra, RNM., Oliveira, AS., Farias, JR., Franco, DCG., Santos, PG., Barbosa, NT., Muniz, SB., Abreu, AG. & Nascimento, FRF. (2025). Anacardiaceae family: effect of isolated compounds and other identified phytochemicals against clinically relevant candida species-a short review. *Antibiotics* 14(308):2-19.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics14030308>.
- Hasibuan, F.E., Mantiri, F.R. & Rumende, R.R.H. 2017. Kajian variasi sekuen intraspecies dan filogenetik monyet hitam sulawesi (*Macaca nigra*) dengan menggunakan gen COI. *Jurnal Ilmiah Sains*, 17(1): 59-67.  
<https://doi.org/10.35799/jis.17.1.2017.15558>.
- Ibrahim, K.S., Gurusubramanian, G., Zothansanga, Yadav, R.P., Kumar, N.S., Pandian, S.K. & Mohan, P.B.S. (2017). *Bioinformatics-A Students Companion*. Singapore: Bussines Media Singapore.
- Katonge, J.H. & Ally, Z.K. (2025). Evolutionary relationships and genetic diversity in the BlaTEM gene among selected gram-negative bacteria. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 42:1-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2025.101985>.
- Kumar, K., Anjoy, P., Sahu, S., Durgesh, K., Das, A., Tribhuvan, K.U., Sevanti, A.M., Joshi, R., Jain, P.K., Singh, N.K., Rao, A.R. & Gaikwad, K. (2022). Single trait versus principal component based association analysis for flowering related traits ni pigeonpea. *Scientific Reports*, 12(1):1-15.  
doi: 10.1038/s41598-022-14568-1.
- Latifah, N. & Dharmono. (2018). Keanekaragaman genus dan spesies tumbuhan dari famili anacardiaceae di hutan Pantai Tabanio, Kabupaten Tanah Laut. Di dalam: *Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah*, April 2018. Banjarmasin: Universitas Lambung Mangkurat. Program Studi Magister Pendidikan Biologi FKIP. hlm. 306-310.  
<https://snllb.ulm.ac.id/prosiding/index.php/snllb-lit/article/view/64>.
- Lestari, D.A., Azrianingsih, R. & Hnedrian. (2018). Filogenetik jenis-jenis annonaceae dari jawa timur koleksi kebun raya purwodadi berdasarkan coding dan non-coding sekuen DNA. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 3:1-7.  
doi:10.22146/jtbb.28308.
- Manurung, J., Prakasa, H., Tanjung, U.J. & Harsono, T. (2018). Hubungan kekerabatan spesies dalam genus *zanthoxylum* menggunakan sekuens gen *Maturase K (matK)* DNA kloroplas. *Jurnal Biosains*, 4(2):69-77.  
doi:10.24114/jbio.v4i2.10166.
- Masruroh, I.H., Triesita, N.I.P., Sulistiono & Santoso, A.M. (2018). Hubungan Kekerabatan Bambu Berdasarkab Gen *rbcL* Berbasis Analisis In Silico Sebagai Bukti Adanya Evolusi Molekuler. Didalam: *Prosiding Seminar Nasional VI Hayati*. Universitas Nusantara PGRI Kediri. Kediri. hlm. 164-178.  
<https://doi.org/10.29407/hayati.v6i1.650>.
- Mishra, P., Kumar, A., Nagireddy, A., Mani, D.N., Shukla, AK., Tiwari, R. &

- Sundaesan, V. (2015). DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnol Journal*, 14(1):8-21.  
doi:10.1111/pbi.12419.
- Naim, D.M.D., Kamal, N.Z.M. & Mahboob, S. (2020). Population structure and genetic diversity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Penang as revealed by mitochondrial DNA cytochrome oxidase I. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27:953-967.  
doi: 10.1016/j.sjbs.2020.01.021.
- Perwitasari, D.A.G., Rohimah, S., Ratnasari, T., Sugiharto, B. & Su'udi, M. (2020). DNA barcoding anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. *tanimbar* menggunakan gen *rbcL* dan *ITS*. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah Dan Obat*, 31(1):8-20.  
doi:10.21082/bullitro.v31n1.2020.8-20.
- Raclariu, A.C., Heinrich, M., Ichim, M.C. & Boer, D.H. (2018). Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication. *Phytochemical Analysis*, 29(2):123–128.  
doi: 10.1002/pca.2732.
- Rahayu, D.A. & Jannah, M. (2019). *DNA Barcode Hewan dan Tumbuhan Indonesia*. Jakarta: Yayasan Inspirasi Ide Berdaya.  
doi:10.17605/OSF.IO/TY7E5.
- Risah & Jannah, M. (2025). Studi in silico potensi dna barcode berdasarkan gen *matK*, *ITS*, dan *rbcL* serta analisis filogenetik pada anggrek langka phalaeonopsis. *Biotropic The Journal of Tropical Biology*, 9(2):11-24.  
<https://doi.org/10.29080/biotropic.v9i2.2343>.
- Ryadi, A., Siregar, I., Moura, C.D.M., Gailing, O. & Amandita, F.Y. (2023). An early reference to dna barcode for the anacardiaceae family *Journal Of Biosciences*, 30(3): 543-550.  
<https://doi.org/10.4308/hjb.30.3.543-550>.
- Saputri, R. & Arsyadi, A. (2025). Identifikasi molekuler Pelawan Kepuh (*Tristaniopsis obovata* Benn.) dari Pulau Bangka berdasarkan gen *Internal Transcribed Spacer*. *Journal of Natural Sciences*, 6(3):213-223.  
doi:10.34007/jonas.v6i3.1005.
- Savadi, S., Muralidhara, B.M., Godwin, J., Adiga, J.D., Mohana, G.S., Eradasappa, E., Shamsudheen, M. & Karun, A. (2022). De novo assembly and characterization of the draft genome of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Scientific report*, 12(1):1-13.  
doi:10.1038/s41598-022-22600-7.
- Stansfield, W.D. (2006). *Biologi Molekuler dan Sel*. Erlangga: Jakarta. ISBN: 9797811913.
- Sumarlina, Napitupulu T.S., Nadhirah, A. & Mulyadi, F. (2023). Analisis molekuler tanaman fungsional genus *Momordica* berdasarkan DNA barcode region *matK*. *Jurnal Agriment*, 8(1):51-59.  
doi:10.51967/jurnalagriment.v8i1.2543.
- Sundari, Khadijah, Jayali, A.M., & Sukamto, N. H. (2019). The application of barcode DNA *rbcL* gene for identification of medicinal plants: Red jabon and gofasa. *Journal of Physics: Conference Series*, 1146(1): 1-5.  
doi:10.1088/1742-6596/1146/1/012030.
- Suudi, M., Ramadany, Z., Rohimah, S., Arum, A.Y., Setyati, D. & Ulum, F.B. (2023a). Peran mini-barcode *Internal Transcribed Spacer 2* (*ITS 2*) untuk identifikasi molekuler spesies Anggrek. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 7(1):34-45.  
<https://doi.org/10.47007/ijobb.v7i1.166>.
- Suudi, M., Ulum, F.B., Ardiyansah, M. & Fitri, N.E. (2023b). Evaluasi lokus potensial *matK* dan *ITS 2* untuk DNA barcoding Anggrek *Bulbophyllum lobbii* Lindl. *AL-KAUNIYAH: Jurnal Biologi*, 17(2):406-418.  
<https://doi.org/10.15408/kauniyah.v17i2.33897>.

- Tajima, F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3):597-601.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.597>.
- Temunovic, M., Sola, Z., Jaksic, F., Vidakovic, A., Liber, Z., Poljak, I. & Bogdanovic, S. (2024). Clarifying genetic and taxonomic relationships among *Pistacia* taxa (Anacardiaceae) in Croatia. *Acta Bot Croat*, 83(1):1-13.  
<https://doi.org/10.37427/botcro-2024-009>.
- Vertiana, E.V., Oari, A.A. & Hariri, M.R. (2023). Studi perbandingan kode batang DNA inti dan kloroplas pada *Heliconia* in silico. *Jurnal Ilmiah Biologi*, 2(2): 39-47.  
doi:10.6084/m9.figshare.23564679.
- Wardani, I.G.A.K., Amandita, F.Y., de Melo Moura, C.C., Gailing, O. & Siregar, I.Z. (2022). Molecular taxonomy via DNA barcodes for species identification in selected genera of Fabaceae. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam Dan Lingkungan*, 12(1) 112-122.  
doi:10.29244/jpsl.12.1.112-122.