

REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIK DARI SEKUEN MATURASE K GYRINOPS VERSTEEGII MENGGUNAKAN REFERENSI PENCARIAN MEGABLAST

Oleh :

I Gde Adi Suryawan Wangiyana

Program Studi Kehutanan Universitas Pendidikan Mandalika

gdeadiswangiyana@undikma.ac.id

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis filogenetik terhadap sekuen matK *Gyrinops versteegii* berdasarkan pencarian referensi menggunakan MegaBLAST dari NCBI. Sampel diambil dari tegakan pohon *G. versteegii* di perkebunan gaharu Desa Langko Lombok Barat. Blood Animal Plant DNA Preparation Kit digunakan untuk ekstraksi DNA dari organ daun. Pengukuran absorbansi panjang gelombang 230 nm, 260 nm, dan 280 nm dilakukan pasca ekstraksi DNA. Amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan KAPA 2G PCR mix dengan program initial denaturation 95°C selama 3 menit diikuti 40 siklus denaturasi 95°C selama 15 detik, annealing 37°C selama 1 menit, extension 72°C selama 2 menit, dan final extension 72°C selama 5 menit. Pencarian tipe referensi dilakukan menggunakan MegaBLAST dan dilakukan alignment sekuen dengan menggunakan ClustalX. Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan program MEGA 5.1. dengan dua algoritme filogenetik yaitu Neighbor Joining dan Maximum Parsimony. Hasil penelusuran MegaBLAST menunjukkan sekuen matK *G. versteegii* mengerucut pada dua genus dalam family Thymeleaceae yaitu: *Aquilaria* dan *Gyrinops*. Pohon filogenetik yang direkonstruksi dengan algoritme berbeda memiliki topologi yang berbeda. *G. versteegii* berkumpul dalam satu klade sebagai sister taksa pada pohon filogenetik Neighbor Joining namun terpisah pada klade berbeda pada pohon filogenetik Maximum Parsimony. Tergabungnya *Gyrinops* dan *Aquilaria* dalam beberapa klade yang sama menunjukkan bahwa kedua genus ini memiliki hubungan kekerabatan yang dekat. Dapat disimpulkan bahwa sekuen matK *G. versteegii* berdasarkan penelusuran MegaBLAST merupakan marker ideal yang digunakan untuk melakukan analisis filogenetik genus *Gyrinops* dan *Aquilaria* yang bersifat monofiletik.

Kata kunci : Filogenetik, *Gyrinops versteegii*, Maturase-K, MegaBLAST

PENDAHULUAN

Gaharu merupakan komoditi hasil hutan bukan kayu bernilai ekonomis tinggi yang menjadi salah satu unggulan sektor kehutanan (López-Sampson and Page, 2018). Indonesia merupakan salah satu produsen sekaligus pengeksportir gaharu berputasi di dunia (Turjaman, 2014). Reputasi ini tidak terlepas dari sebaran populasi tanaman produsen gaharu yang merata di wilayah Indonesia serta didominasi oleh dua genus utama yaitu: *Aquilaria* dan *Gyrinops* (Roemantyo and Partomihardjo, 2010).

Aquilaria dan *Gyrinops* merupakan dua genus utama produsen produk gaharu dunia (Susmianto and Santoso, 2014). Secara taksonomi, kedua genus ini dibedakan berdasarkan karakteristik morfologi dan anatomi bunga (Mulyaningsih and Yamada, 2008). Meskipun demikian, berdasarkan analisis numerik fenetik terhadap karakter organ vegetatif, kedua genus ini pada dasarnya tidak berbeda signifikan (Wangiyana, 2019). Oleh karena itu, perlu dilakukan pendekatan taksonomi berbeda untuk menganalisis kedua genus ini. Salah satunya adalah dengan menggunakan marker molekular (Wangiyana, Supriadi, Nikmatullah, Sunarpi, *et al.*, 2022).

Pendekatan filogenetik dengan menggunakan marker molekular terbukti menjadi satu metode studi taksonomi modern yang ideal untuk tanaman penghasil gaharu dari genus *Aquilaria* dan *Gyrinops* (Wangiyana, 2016a). Pendekatan metode ini dapat digunakan sebagai salah satu upaya standarisasi

produk gaharu secara internasional dengan memanfaatkan barcode DNA (Lee *et al.*, 2016; Pern *et al.*, 2020). Aplikasi barcode DNA ini telah banyak dilakukan pada anggota genus *Aquilaria* baik untuk keperluan standarisasi maupun autentifikasi produk hilir dari komoditi ini (Lee, Weber and Mohamed, 2011; Pern *et al.*, 2020). Produk hilir komoditi gaharu dari genus *Aquilaria* memang merupakan produk yang banyak mendominasi pasar internasional (Naziz, Das and Sen, 2019).

Produk hilir komoditi gaharu dari genus *Gyrinops* sebenarnya tidak kalah bersaing dibandingkan produk serupa dari genus *Aquilaria*. *Gyrinops versteegii* yang merupakan spesies dominan genus ini mempunyai produk hilir yang dapat dijadikan investasi jangka panjang di bidang komoditi hasil hutan bukan kayu (Wangiyana *et al.*, 2020; Triandini and Wangiyana, 2022). Beberapa produk tersebut diantaranya adalah: minyak esensial (Wangiyana, Wanitaningsih and Sanjaya, 2018), teh herbal (Wangiyana, Supriadi, Nikmatullah and Sunarpi, 2022) dan bibit. Meskipun mempunyai produk hilir yang prospektif, standarisasi komoditi gaharu dari genus *Gyrinops* masih sangat minim dibandingkan genus *Aquilaria* (Wangiyana, 2020).

Standarisasi produk berbasis analisis filogenetik terhadap gaharu *G. versteegii* membutuhkan marker molekular. Beberapa marker yang telah digunakan diantaranya adalah trnL-trnF (Wangiyana, 2016b) dan

rbcL (Wangiyana, 2022b). Meskipun demikian, tambahan studi marker molekular untuk analisis filogenetik spesies ini masih perlu dilakukan untuk mengejar ketertinggalan database dibandingkan spesies dari genus *Aquilaria* (Pern *et al.*, 2020).

Maturase k (matK) merupakan salah satu marker molekular yang potensial dan banyak digunakan dalam studi filogenetik spesies penghasil komoditi gaharu (Tanaka and Ito, 2020). Studi filogenetik menggunakan marker ini dapat melengkapi database molekular *G. versteegii* sehingga tidak tertinggal dari database genus *Aquilaria* (Wangiyana, 2020). Oleh Karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis filogenetik terhadap sekuen matK *Gyrinops versteegii* berdasarkan pencarian reference menggunakan MegaBLAST dari NCBI.

METODE PELAKSANAAN

a. Sampling Tegakan *G. versteegii*

Tegakan *G. versteegii* dipilih dari populasi yang ada di perkebunan gaharu desa Langko kabupaten Lombok Barat. Tegakan yang dipilih adalah tegakan yang sudah memasuki fase generatif. Selain itu, tegakan *G. versteegii* yang dijadikan sampel harus memenuhi standar pohon sehat berdasarkan kriteria *Forest Health Monitoring* (Supriyanto and Iskandar, 2018)

b. Pengambilan Sampel Daun

Daun *G. versteegii* merupakan organ utama yang dijadikan sampel untuk keperluan ekstraksi DNA. Daun dipilih dari tegakan *G. versteegii* yang lolos hasil seleksi serta memenuhi kriteria daun sehat meliputi: bebas klorosis dan nekrosis serta tidak terserang hama dan penyakit (Wangiyana, Supriadi, *et al.*, 2021). *Surface sterilization* dilakukan terhadap sampel daun sebelum proses ekstraksi DNA.

c. Isolasi DNA

Daun *G. versteegii* disimpan pada suhu -70°C selama 12 jam. Daun selanjutnya dihaluskan menggunakan nitrogen cair hingga menjadi serbuk. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Blood Animal Plant DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) sesuai dengan rekomendasi dari produsen (Simon-Oke, Obimakinde and Afolabi, 2018).

Sebanyak 80 mg serbuk partikel daun halus dipindahkan ke *extraction kit column* berisi semua reagent yang diperlukan untuk ekstraksi DNA. Elusi kolom dilakukan berulang dengan *washing buffer*. Proteinase K dan RNase ditambahkan dalam campuran untuk mendegradasi kontaminan protein dan RNA dalam precipitat DNA genom hasil elusi (Wangiyana, Supriadi, Nikmatullah, Sunarpi, *et al.*, 2022)

DNA genom hasil isolasi dari daun *G. versteegii* diukur konsentrasi dan kemurniannya sebelum diamplifikasi PCR. Pengukuran kemurnian dilakukan

dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 230 nm, 260 nm, dan 280 nm (Lucena-Aguilar *et al.*, 2016). Visualisasi hasil isolasi DNA dilakukan dengan elektroforesis menggunakan agarose 0,8% dengan pewarnaan ethidium bromide dan Ladder 1000 bp (Invitrogen) sebagai marker.

d. Amplifikasi PCR

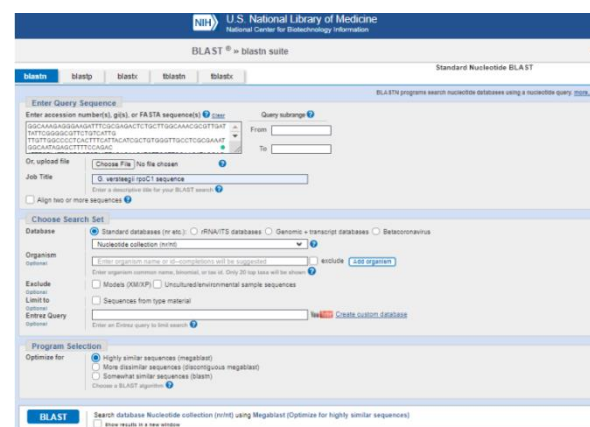
Amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan primer universal matK seperti pada gambar 1. Reaksi PCR dilakukan pada volume total 25 μl yang mengandung 12,5 μl 2 x KAPA 2G PCR mix (KAPA Biosystem), 8,5 μl ddH₂O, 2 μl primer (10 pmol/ μl), dan 2 μl DNA template (40 ng/ μl). Amplifikasi PCR dilakukan pada labcyler thermocycler dengan program: initial denaturation 95°C selama 3 menit diikuti 40 siklus denaturasi 95°C selama 15 detik, annealing 37°C selama 1 menit, extension 72°C selama 2 menit, dan final extension 72°C selama 5 menit. Amplicon di visualisasi dengan elektroforesis pada 1,2% agarose dengan pewarnaan ethidium bromide. Ladder 1000bp (Invitrogen) digunakan sebagai marker (Wangiyana, Nugraheni, *et al.*, 2021)

Region	Primer	Sekuen (5'→3')
matK	3F-KIM f	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG
	1R-KIM r	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC

Gambar 1. Sekuen primer matK

e. Aplikasi BLAST NCBI

Pencarian referen untuk sekuen matK dilakukan menggunakan aplikasi BLAST NCBI. File sekuen dalam format FASTA dimasukkan dalam website NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Beberapa parameter operasi yang dilakukan diantaranya adalah “blastn” sebagai opsi pencarian yang melakukan pencarian sekuen berdasarkan “nucleotide query”. Database pencarian yang digunakan adalah “standar database”. Program selection dioptimalkan untuk “high similar sequence” atau MegaBLAST (gambar 2). MegaBLAST yang disediakan oleh NCBI merupakan salah satu tools untuk pencarian sekuen referen yang efektif dan efisien (Chen *et al.*, 2015).



Gambar 2. Tampilan aplikasi BLAST NCBI

f. Multiple Alignment Sekuen

Sekuen berupa file FASTA yang diperoleh dari

hasil pencarian referen dengan menggunakan MegaBLAST selanjutnya ditabulasi. Tabulasi dilakukan dengan menggunakan aplikasi notepad dengan penomoran dan pengkodean pada setiap sekuen. Multiple Alignment Sequence dilakukan terhadap sekuen dengan menggunakan program ClustalX (Larkin *et al.*, 2007).

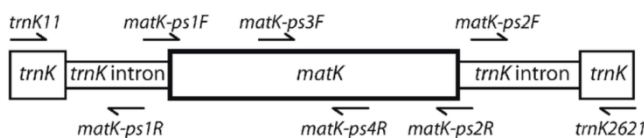
g. Analisis Filogenetik

Data hasil *multiple alignment sequence* selanjutnya disesuaikan formatnya dengan program analisis filogenetik. Penyesuaian format dapat memudahkan sistem retrieval data. Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan program MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011)

Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan 2 algoritme dengan prinsip berbeda. Algoritme pertama adalah algoritme berbasis distance yaitu Neighbor Joining (Gascuel and Steel, 2006). Algoritme kedua adalah algoritme berbasis karakter yaitu Maximum Parsimony (Farris, 2008). Masing – masing pohon filogenetik menggunakan 1000 bootstrap dalam analisisnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Maturase K (*matK*) secara struktural diapit oleh dua region *trnK* yang dipisahkan oleh *trnK* intron (gambar 3) (kim *et al.*, 2017). Region ini merupakan salah satu region dalam sekuen kloroplast yang memiliki tingkat diskriminasi tinggi terutama pada kelompok Angiospermae (Fazekas *et al.*, 2008). Penggunaan region ini sebagai marker DNA barcoding memiliki keunggulan dalam hal identifikasi variasi, kemudahan amplifikasi dan sekuensing serta analisis alignment yang ideal (Lahaye *et al.*, 2008).



Gambar 3. Sekuen region *matK*

Pencarian type reference sekuen *matK* menggunakan MegaBLAST secara spesifik mengacu pada dua genus pada family Thymeleaceae yaitu: *Gyrinops* dan *Aquilaria* (tabel 1). Hasil ini lebih spesifik jika dibandingkan pencarian type reference serupa dengan menggunakan sekuen *rbcL* karena menghasilkan referensi genus non-thymeleaceae (Wangiyana, 2022a). Sekuen *matK* dan *rbcL* memang sering dijadikan sebagai marker dalam analisis filogenetik produsen komoditi gaharu dari genus *Aquilaria* dan *Gyrinops* (Farah *et al.*, 2018). Dalam konteks hasil riset ini menunjukkan sekuen *matK* memiliki tingkat diskriminasi yang lebih baik dibandingkan sekuen *rbcL*.

Hasil pencarian type reference menggunakan sekuen *matK* lebih didominasi oleh spesies dari genus *Aquilaria*. Genus *Gyrinops* hanya memiliki number of

hits sementara genus *Aquilaria* memiliki total 102 number of hits. Hal ini pada dasarnya disebabkan minimnya sekuen spesies dari genus *Gyrinops* pada pangkalan data NCBI (Wangiyana, 2020). Selain itu, hasil ini juga mempertegas bahwa dari segi sekuen DNA barcode, genus *Gyrinops* dan *Aquilaria* memiliki similaritas yang tinggi (Wangiyana, 2016b)

Tabel 1. Type Reference dari MegaBLAST

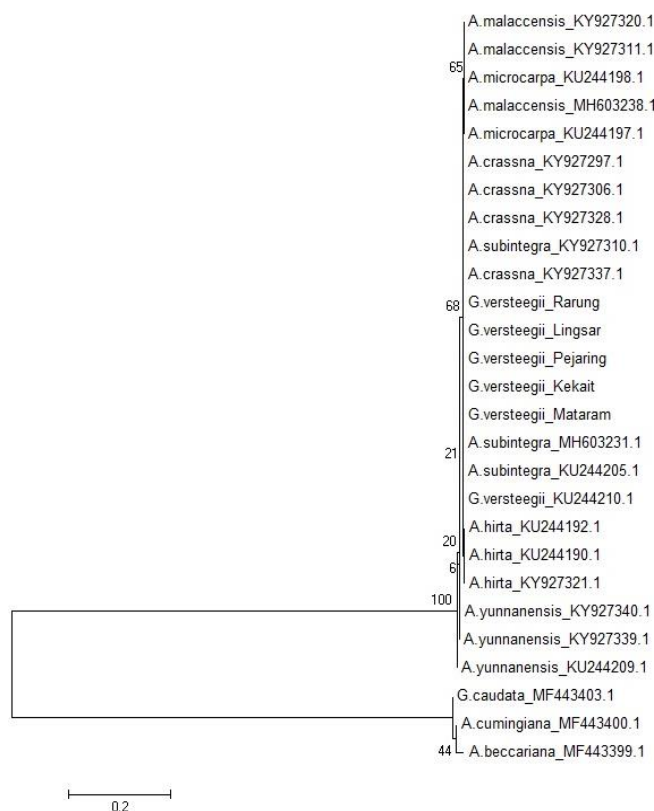
Genus	Species	number of hits	number of organisms
Gyrinops	<i>Gyrinops versteegii</i>	1	1
	<i>Gyrinops walla</i>	1	1
	<i>Gyrinops caudata</i>	1	1
Aquilaria	<i>Aquilaria yunnanensis</i>	8	1
	<i>Aquilaria sinensis</i>	18	1
	<i>Aquilaria microcarpa</i>	5	1
	<i>Aquilaria malaccensis</i>	9	1
	<i>Aquilaria subintegra</i>	8	1
	<i>Aquilaria hirta</i>	6	1
	<i>Aquilaria crassna</i>	42	1
	<i>Aquilaria boccariana</i>	3	1
	<i>Aquilaria rostrata</i>	2	1
	<i>Aquilaria cumingiana</i>	1	1

Tabel 2. Sekuen *Aquilaria* dan *Gyrinops* hasil penelusuran MegaBLAST

specimen	Voucher	T-Score	% Ident	Accession
<i>A. crassna</i>	ML-8	1637	100	KY927327
<i>A. crassna</i>	CS-12	1637	100	KY927318
<i>A. crassna</i>	TP-27	1637	100	KY927306
<i>A. crassna</i>	TM-3	1637	100	KY927299
<i>G. versteegii</i>	FBL01027	1637	100	KU244210
<i>A. subintegra</i>	FBL01016	1637	100	KU244206
<i>A. subintegra</i>	FBL01015	1637	100	KU244205
<i>A. malaccensis</i>	ML-1	1631	99,89	KY927320
<i>A. malaccensis</i>	CS-3	1631	99,89	KY927309
<i>A. microcarpa</i>	FBL01020	1631	99,89	KU244198
<i>A. microcarpa</i>	FBL01018	1631	98,89	KU244196
<i>A. malaccensis</i>	FBL01001	1631	98,89	KU244193
<i>A. hirta</i>	ML-2	1626	99,77	KY927321
<i>A. hirta</i>	FBL01004	1626	99,77	KU244190
<i>A. crassna</i>	ZhangHN02	1616	99,66	MK779998
<i>A. yunnanensis</i>	YN-6	1615	99,55	KY927340
<i>A. sinensis</i>	VN-1	1615	99,55	KY927332
<i>A. yunnanensis</i>	CS-9	1615	99,55	KY927315
<i>A. yunnanensis</i>	FBL01024	1615	99,55	KU244207
<i>A. sinensis</i>	S-5	1609	99,44	KY927336
<i>A. sinensis</i>	CS-1	1609	99,44	KY927307
<i>A. sinensis</i>	GY-2	1604	99,32	KY927330
<i>A. sinensis</i>	FBL01009	1604	99,32	KU244199
<i>G. walla</i>	GWYAG01	1594	99,21	MW557323
<i>A. crassna</i>	FRIM-5	1541	94	MH603238
<i>A. subintegra</i>	FRIM-3	1541	94	MH603239
<i>G. caudata</i>	MTJ0002	1535	94	MF443403
<i>A. cumingiana</i>	MTJ0006	1535	94	MF443400

Penelusuran sekuen reference dari genus *Gyrinops* dan *Aquilaria* menunjukkan hasil 3 spesies yang memiliki nilai similaritas tertinggi (100%) yaitu: *A. crassna*, *G. versteegii*, dan *A. subintegra* (Tabel 2). Munculnya type reference sekuen *G. versteegii* merupakan hal yang wajar mengingat sekuen matK juga diisolasi dari spesies *G. versteegii* asal Lombok Barat. Hal yang agak menyimpang dari ekspektasi adalah munculnya dua spesies genus *Aquilaria* dengan nilai similaritas sama dengan *G. versteegii*. Hal ini mengindikasikan bahwa genus *Aquilaria* dan *Gyrinops* memiliki DNA barcoding dengan similaritas yang tinggi (Pern *et al.*, 2020).

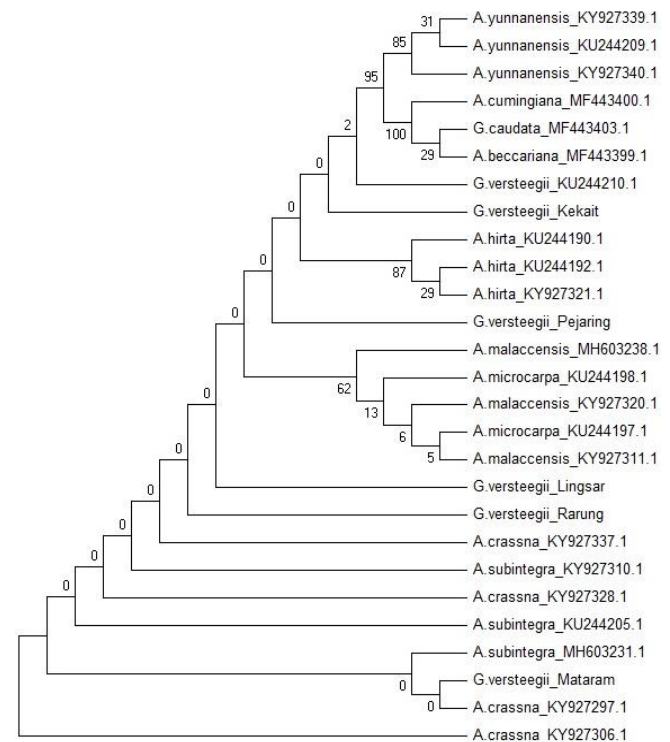
Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan dua algoritme yang memiliki metode pendekatan berbeda yaitu: Neighbor – Joining dan Maximum Parsimony. Neighbor-joining merupakan algoritme filogenetik yang berbasis distance (Gascuel and Steel, 2006). Sementara itu Maximum Parsimony merupakan algoritme filogenetik yang berbasis karakter (Farris, 2008). Analisis filogenetik dengan menggunakan berbagai algoritme dan pendekatan statistik filogenetik berbeda dapat meningkatkan reabilitas data yang diperoleh sekaligus sebagai sistem konfirmasi berbagai topology kladogram yang dihasilkan (Westesson *et al.*, 2012)



Gambar 4. Pohon Filogenetik Algoritme Neighbor – Joining 1000 Bootstrap

Topology pohon filogenetik dengan algoritme Neighbor Joining menunjukkan OTU *G. versteegii* memiliki clade tersendiri yang menjadi tempat tergabungnya specimens *G. versteegii* dari berbagai wilayah di Pulau Lombok (gambar 4). Hal yang unik

dari pohon filogenetik ini adalah adanya clade yang terpisah jauh dari OTU lainnya. Clade tersebut terdiri dari OTU *G. caudata*, *A. cumingiana* dan *A. beccariana*. Klade pencilan yang terdiri dari anggota genus *Gyrinops* dan *Aquilaria* terkumpul menjadi satu semakin mempertegas bahwa secara filogenetik, kedua genus ini pada dasarnya bersifat monofiletik (Assis and Rieppel, 2011).



Gambar 5. Pohon Filogenetik Algoritme Maximum Parsimony 1000 bootstrap

Pohon filogenetik Maximum Parsimony memiliki topologi sedikit berbeda dengan pohon filogenetik Neighbor Joining. Pada pohon filogenetik ini, OTU *G. versteegii* asal Lombok tersebar dalam beberapa klade berbeda (tidak mengumpul dalam satu klade seperti pada Neighbor Joining). Perbedaan topologi algoritma Neighbor Joining dan Maximum Parsimony ini selaras dengan riset sejenis sebelumnya yang menggunakan marker barcoding *rbcL* (Wangiyana, 2022a). Hal ini sekaligus mengkonfirmasi bahwa kedua marker ini merupakan marker dalam sekuen kloroplast yang ideal digunakan untuk analisis filogenetik (Pham *et al.*, 2021).

Perbedaan topologi pohon filogenetik yang direkonstruksi dengan algoritme berbeda sekaligus menunjukkan pentingnya konfirmasi algoritme dalam analisis filogenetik (Westesson *et al.*, 2012). Perbedaan ini dapat digunakan untuk menganalisis klade maupun sister taxa dari pohon filogenetik secara objektif dari berbagai aspek. Hal ini mampu menempatkan sampel OTU *G. versteegii* asal pulau Lombok secara presisi pada klade tertentu. Dengan demikian diharapkan klasifikasi yang dihasilkan berasal dari metode sistematik yang sifatnya polifasik

PENUTUP

a. Simpulan

Sekuen matK dari *Gyrinops versteegii* menghasilkan type reference spesifik pada genus *Aquilaria* dan *Gyrinops* berdasarkan database MegaBLAST NCBI. Type reference yang digunakan sebagai input pohon filogenetik menggunakan algoritme Neighbor Joining dan Maximum Parsimony menghasilkan topologi yang berbeda berdasarkan penempatan clade dari sampel *G. versteegii*. Hasil analisis filogenetik mengkonfirmasi bahwa genus *Gyrinops* dan *Aquilaria* memiliki similaritas yang tinggi berdasarkan barcode sekuen kloroplast.

b. Saran

Marker DNA barcoding selain dari sekuen kloroplast sebaiknya digunakan sebagai database untuk mengkonfirmasi hasil analisis filogenetik dengan menggunakan marker matK.

DAFTAR PUSTAKA

- Assis, L. C. S. and Rieppel, O. (2011) 'Are monophyly and synapomorphy the same or different? Revisiting the role of morphology in phylogenetics', *Cladistics*, 27(1), pp. 94–102.
- Chen, Y. *et al.* (2015) 'High speed BLASTN: An accelerated MegaBLAST search tool', *Nucleic Acids Research*, 43(16), pp. 7762–7768. doi: 10.1093/nar/gkv784.
- Farah, A. H., Lee, S. Y., Gao, Z., Yao, T. L., Madon, M., and Mohammed, R. (2018) 'Genome size, molecular phylogeny, and evolutionary history of the Tribe Aquilariaceae (Thymelaeaceae), the natural source of agarwood', *Front. Plant Sci.*, 9, pp. 712
- Farris, J. S. (2008) 'Parsimony and explanatory power', *Cladistics*, 24(5), pp. 825–847.
- Fazekas, A. J., Buerge K. S., Kesankurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., Percy, D. M., Haibabei, M., Barrett, S. C. H. (2008) 'Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plants species equally well', *Plos ONE*, 3, e2802
- Gascuel, O. and Steel, M. (2006) 'Neighbor-joining revealed', *Mol Biol Evol*, 23(11), pp. 1997–200.
- Kim, S. T., Donoghue, M. J., Sultan, S. E. (2017) 'on the resurrection of *Persicaria puritanorum* (Polygonaceae)', *Phytotaxa*, 308 (1), pp. 20
- Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T. G., Savolainen, V. (2008) 'DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots' *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 105 (8), Pp. 2923–2928
- Larkin, M. A. *et al.* (2007) 'ClustalW and ClustalX version 2', *Bioinformatics*, 23(21), pp. 2947–2948.
- Lee, S. Y. *et al.* (2016) 'DNA barcoding of the endangered *aquilaria* (Thymelaeaceae) and its application in species authentication of Agarwood Products traded in the market', *PLoS ONE*, 11(4), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0154631.
- Lee, S. Y., Weber, J. and Mohamed, R. (2011) 'Genetic variation and molecular authentication of selected *Aquilaria* species from natural population in Malaysia using RAPD and SCAR markers', *Asian Journal of Plant Science*, 10(3), pp. 202–211.
- López-Sampson, A. and Page, T. (2018) 'History of Use and Trade of Agarwood', *Economic Botany*, 72(1), pp. 107–129. doi: 10.1007/s12231-018-9408-4.
- Lucena-Aguilar, G. *et al.* (2016) 'DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis', *Biopresserv Biobank*, 14(4), pp. 264–270.
- Putri, Y. S., Wangiyana, I G. A. S., Nahlunnisa, H. (2021) 'Effectiveness of *Gyrinops versteegii* leaves extraction based on maceration method', *Jurnal Silva Samalas*, 4 (2), pp. 1-8.
- Mulyaningsih, T. and Yamada, I. (2008) 'Notes on Some Species of Agarwood in Nusa Tenggara, Celebes and West Papua', in *Natural Resource Management and Socio-economic transformation under decentralization in Indonesia: Toward Sulawesi area studies*. Kyoto: CSEAS Kyoto University, pp. 365–372.
- Naziz, P. S., Das, R. and Sen, S. (2019) 'The scent of stress: Evidence from the unique fragrance of agarwood', *Frontiers in Plant Science*, 10(840), pp. 1–13. doi: 10.3389/fpls.2019.00840.
- Pern, Y. C. *et al.* (2020) 'Genetic variation and DNA barcoding of the endangered agarwood-producing *Aquilaria beccariana* (Thymelaeaceae) populations from the Malesia Region', *Forestist*, 70(2), pp. 85–94. doi: 10.5152/forestist.2020.20009.
- Pham, M. P. *et al.* (2021) 'Phylogenetics of native conifer species in Vietnam based on two chloroplast gene regions *rbcL* and *matK*', *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 57, pp. 58–66.
- Roemantyo and Partomihardjo, T. (2010) 'Analisis Prediksi Sebaran Alami Gaharu Marga *Aquilaria* dan *Gyrinops* di Indonesia', *Berita Biologi*.
- Simon-Oke, I. A., Obimakinde, E. T. and Afolabi, O. J. (2018) 'Prevalence and distribution of malaria, *Pfcr* and *Pfmdr 1* genes in patients attending FUT Health Centre, Akure, Nigeria', *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), pp. 98–103. doi: 10.1016/j.bjbas.2017.07.009.
- Supriyanto and Iskandar, T. (2018) 'Penilaian kesehatan kebun benih semai *Pinus merkussii* dengan metode FHM (Forest Health Monitoring) di KPH Sumedang', *Jurnal Silviculture Tropika*, 9(2), pp. 99–108. doi: 10.29244/j-siltrop.9.2.99-108.
- Susmianto, A. and Santoso, E. (2014) 'Ketika Gaharu Menjadi Booming', in Susmianto, A., Turjaman, M., and Setio, P. (eds) *Rekam Jejak Gaharu*

- Inokulasi*. 2nd edn. Bogor: FORDA Press, pp. 1–17.
- Tamura, K. *et al.* (2011) ‘MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods’, *Mol Biol Evol*, 28(10), pp. 2731–2739.
- Tanaka, S. and Ito, M. (2020) ‘DNA barcoding for identification of agarwood source species using trnL-trnF and matK DNA sequences’, *Journal of Natural Medicine*, 74(2), pp. 42–50.
- Triandini, I. G. A. A. H. and Wangiyana, I. G. A. S. (2022) ‘Mini-review uji hedonik pada produk teh herbal hutan’, *Jurnal Silva Samalas*, 5(2), pp. 12–19.
- Turjaman, M. (2014) ‘Industri Hulu-Hilir Gaharu’, in Susmianto, A., Turjaman, M., and Setio, P. (eds) *Rekam Jejak Gaharu Inokulasi*. 2nd edn. Bogor: FORDA Press, pp. 185–216.
- Wangiyana, I. G. A. S. (2015) ‘Pemanfaatan medium alternatif untuk pertumbuhan isolat *Fusarium* Sp. penginduksi pembentuk gaharu pada *Gyrinops versteegii*(Gilg) Domke’, *Jurnal Sangkareang Mataram*, 1 (3), pp. 54–59.
- Wangiyana, I. G. A. S. (2016a) ‘Molecular Phylogenetic Analyze of *Fusarium* from Agarwood and Others *Fusarium* with Different Type of Nutrition Based on Gen ITS 1’, *Jurnal Sangkareang mataram*, 2(1), pp. 1–5.
- Wangiyana, I. G. A. S. (2016b) ‘Phylogenetic Analysis of *Aquilaria* and *Gyrinops* Member Based on trnL-trnF Gene Sequence of Chloroplast’, *Jurnal Sangkareang Mataram*, 2(4), pp. 41–46.
- Wangiyana, I. G. A. S. (2019) ‘Similarity analysis of Genera *Aquilaria* and *Gyrinops* based on vegetative structure feature using different clustering method’, *Jurnal Sangkareang mataram*, 5(1), pp. 62–68.
- Wangiyana, I. G. A. S. (2020) ‘DNA Barcoding Library Database of *Aquilaria* Member and *Gyrinops* Member’, *Jurnal Silva Samalas*, 3(2), pp. 68–75.
- Wangiyana, I. G. A. S. *et al.* (2020) ‘Pemberdayaan Kelompok Karang Taruna Desa Kekait Pucang dalam Optimalisasi Investasi Gaharu dari Jenis *Gyrinops Versteegii*’, *Lambung Inovasi: Jurnal Pengabdian kepada Masyarakat*, 5(2), pp. 48–55.
- Wangiyana, I. G. A. S., Nugraheni, Y. M. M. A., *et al.* (2021) ‘Morphological and DNA Polymorphism Analyses of *Fusarium Solani* Isolated from *Gyrinops Versteegii* in the West Nusa Tenggara Forest’, *ASM Science Journal*, 14(2), pp. 65–74.
- Wangiyana, I. G. A. S., Supriadi, *et al.* (2021) ‘Tannin Concentration of Gyrinops Tea Taken Form Different Agarwood Plantation and Different Processing Method Tannin Concentration of Gyrinops Tea Taken Form Different Agarwood Plantation and Different Processing Method’, *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 913(012068), pp. 1–7. doi: 10.1088/1755-1315/913/1/012068.
- Wangiyana, I. G. A. S., Supriadi, Nikmatullah, A. and Sunarpi (2022) ‘A mini review on agarwood tea development towards alternative utilization of agarwood commodity in Indonesia’, *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B: Biological Science*, 65(2), pp. 189–196.
- Wangiyana, I. G. A. S. (2022a) ‘Aplikasi BLAST NCBI dalam pencarian type reference sekuen rbcL *Gyrinops versteegii*’, *Jurnal Ilmiah Sangkareang Mataram*, 9(1), pp. 19–24.
- Wangiyana, I. G. A. S. (2022b) ‘Aplikasi BLAST NCBI dalam pencarian type reference sekuen rbcL *Gyrinops versteegii*’, *Jurnal Sangkareang Mataram*, 9(1), pp. 19–24.
- Wangiyana, I. G. A. S., Supriadi, Nikmatullah, A., Sunarpi, *et al.* (2022) ‘Diversity of *Gyrinops versteegii* from several agarwood plantation on Lombok Island (Indonesia) as raw material of *Gyrinops* tea’, *Biodiversitas*, 23(1), pp. 178–186.
- Wangiyana, I. G. A. S., Wanitaningsih, S. K. and Sanjaya, A. (2018) ‘Bioinduksi *Gyrinops versteegii* Menggunakan Inokulan Berbahan Baku Medium Tauge dengan Berbagai Kedalaman Pengeboran’, in Sukartono *et al.* (eds) *Seminar Nasional Implementasi Iptek Pertanian Berkelanjutan yang Tangguh Menuju Kedaulatan Pangan*. Mataram: Universitas Mataram, pp. 144–152.
- Wicaksono, H., Wangiyana, I. G. A. S., Nizar, W. Y. (2019) ‘Studi kolonisasi fungi mikoriza arbuskular pada gaharu (*Gyrinops versteegii*) dengan sumber inokulan rizosfer perkebunan gaharu’, *Jurnal Agrotek Ummat*, 6 (2), pp. 45–50.
- Westesson, O. *et al.* (2012) ‘Accurate Reconstruction of Insertion-Deletion Histories by Statistical Phylogenetics’, *PLoS ONE*, 7(4), pp. 1–12.