

KONSTRUKSI POHON FILOGENETIK VIRUS DENGUE DI INDONESIA MENGGUNAKAN METODE MAXIMUM PARSIMONY

Ahmad Maulana Syafi'i*¹

¹Tadris Matematika, Fakultas Tarbiyah dan Ilmu Keguruan, Universitas Islam Negeri Sultan Aji Muhammad Idris Samarinda, Indonesia

*Penulis Korespondensi (maulanasyafii95@gmail.com)

Abstrak: Pada paper ini dijelaskan pembentukan pohon filogenetik virus *dengue* tipe-3 di Indonesia. Pembentukan pohon filogenetik menggunakan Maximum Parsimony dengan mencari pohon yang jumlahnya paling minimum dari perubahan antar virus. Tujuan dari paper ini adalah mengetahui bagaimana evolusi virus *dengue* tipe-3 di Indonesia dari tahun ke tahun. Pada paper ini diberikan jarak antar genetik menggunakan metode Kimura 2 Parameter dan pohon filogenetik menggunakan maksimum parsimony. Hasil yang didapatkan ialah terlihat bahwa pohon filogenetik yang terbentuk menggunakan maksimum parsimony memperkuat analisis jarak genetik.

Kata kunci: Maximum Parsimony, Filogenetik, *Dengue*.

Abstract: This paper describes the establishment of a type-3 dengue virus phylogenetic tree in Indonesia. Formation of a phylogenetic tree using Maximum Parsimony by finding a tree with the minimum number of changes between viruses. The aim of this paper is to find out how the type-3 dengue virus evolves in Indonesia from year to year. In this paper, the distance between genetics is given using the Kimura 2 Parameter method and a phylogenetic tree using maximum parsimony. The results obtained show that the phylogenetic tree formed using maximum parsimony strengthens the genetic distance analysis.

Keywords: Maximum Parsimony, Phylogenetic, *Dengue*.

PENDAHULUAN

Virus *dengue* merupakan salah satu virus yang penyebarannya tercepat di dunia (Nathan, M.B. dkk., 2019). Virus *dengue* umumnya berkembang di daerah tropis dan subtropis pada 100 negara di Asia, Afrika, Amerika dan Mediterania Timur. Dalam beberapa tahun terakhir, lebih dari 55% populasi manusia di dunia berada di daerah yang berisiko terinfeksi virus *dengue*, dengan lebih dari 50 juta manusia yang terinfeksi dan 20.000 manusia mengalami kematian setiap tahunnya akibat virus *dengue* (Abdelrazec, A. dkk, 2016). Infeksi virus *dengue* ditransmisikan ke manusia melalui gigitan nyamuk betina *Aedes aegypti* sebagai vektor utama meskipun terdapat vektor jenis lain, seperti *Aedes albopictus* yang juga berperan dalam penyebaran penyakit. Hasil infeksi virus inilah yang menyebabkan penyakit Demam Berdarah *Dengue* (DBD) (Pudjiadi, A.H. dkk., 2009).

Penyakit DBD merupakan salah satu masalah kesehatan di daerah Asia Tenggara dan Pasifik Barat. Menurut *World Health Organization* (WHO) sekitar 1,8 miliar (lebih dari 70%) populasi manusia yang berada di daerah Asia Tenggara dan Pasifik Barat

berisiko terkena demam berdarah, dan hampir 75% dari beban penyakit global saat ini dikarenakan penyakit demam berdarah (Nathan, M.B. dkk., 2019). Benua Asia menempati urutan pertama dalam jumlah penderita DBD setiap tahunnya dan terhitung sejak tahun 1968 hingga tahun 2009, WHO mencatat negara Indonesia sebagai negara dengan kasus DBD tertinggi di Asia Tenggara (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2015).

Penyebaran DBD yang tinggi di Indonesia tidak terlepas dari kondisi geografis Indonesia yang beriklim tropis sehingga nyamuk *Aedes aegypti* dapat berkembang biak dengan baik. Berdasarkan profil kesehatan Republik Indonesia tahun 2014, jumlah penderita DBD dilaporkan sebanyak 100.347 orang dengan jumlah kematian sebanyak 907 orang (*Incidence Rate* (IR) / angka kesakitan = 39,8 per 100.000 penduduk dan *Case Fatality Rate* (CFR) / angka kematian = 0,9%). Provinsi dengan angka kesakitan DBD tertinggi pada tahun 2014 ialah Bali sebesar 204,22, Kalimantan Timur sebesar 135,46, dan Kalimantan Utara sebesar 128,51 per 100.000 penduduk. Bahkan pada tahun 2014 penyakit DBD menjadi Kejadian Luar Biasa di berbagai kabupaten/kota suatu provinsi (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2015).

Penyebaran penyakit DBD semakin meningkat tak lepas dari adanya evolusi dari virus *dengue* yang menyebabkan ketahanan virus *dengue* juga berubah-ubah. Virus *dengue* diketahui mempunyai 4 jenis serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4 (Pudjiadi, A.H. dkk., 2009). Oleh karena itu pada paper ini akan dilihat bagaimana evolusi virus *dengue* dari tahun ke tahun.

Pohon filogenetik atau evolusioner adalah struktur data yang mendorong hubungan evolusi antara spesies biologis, atau entitas lain. Hubungan ini disebut filogeni spesies dan didasarkan pada perbedaan atau kesamaan dalam karakteristik genetik atau fisik mereka (Biro.R.K., 2015). Dalam mempelajari variasi dan diferensiasi genetik antar populasi, jarak genetik dapat dihitung dari jumlah perbedaan basa polimorfik suatu lokus gen masing-masing populasi berdasarkan urutan DNA. Analisis sistematika dilakukan melalui konstruksi sejarah evolusi dan hubungan evolusi antara keturunan dengan nenek moyangnya berdasarkan pada kemiripan karakter sebagai dasar dari perbandingan (NLP Indi Dharmayanti dan Risa Indriani, 2014).

Jenis analisis yang diketahui dengan baik adalah analisis filogenetika atau kadang-kadang disebut *cladistics* yang berarti *clade* atau kelompok keturunan dari satu nenek moyang yang sama. Analisis filogenetik biasanya direpresentasikan sebagai sistem percabangan, seperti diagram pohon yang dikenal sebagai pohon filogenetika (Dharmayanti. N.L.P.I, 2011). Ada sejumlah metode berbeda yang digunakan untuk menyimpulkan filogeni dari data sekuens. Metode tersebut dapat dibagi menjadi dua kategori utama yaitu berdasarkan jarak (misalnya UPGMA, neighbor-joining, dll.) dan berdasarkan karakter (misalnya, parsimony, likelihood dan metode Bayesian).

Beberapa penelitian terkait pembuatan pohon filogenetik untuk melihat evolusi atau turunan nenek moyang telah banyak dilakukan. Erwina Juliantari dkk pada tahun 2016 melakukan pembuatan pohon filogenetik untuk melihat kekerabatan makhluk hidup *Magnifera odorata* di daerah Sumatera Tengah menggunakan metode parsimony maksimum. Hasil dari penelitiannya ialah didapatkan bahwa *Magnifera odorata* adalah hibrid dari *Magnifera foetida* dan *Magnifera indica* (Juliantari & Sofiyanti, 2016). Selanjutnya pada penelitian Winda Ayu melakukan penelitian terkait pembentukan filogenetik ikan tuna (*Thunnus SPP*) di perairan maluku utara menggunakan metode COI (Cytocrome Oxydase I). Hasil penelitian ini adalah keterkaitan spesies yang ditemukan adalah beberapa spesies yang ditemukan di lokasi yang sama dengan morfologi dan makanan yang hampir sama (Fietri, Razak, & Ahda, 2021).

Pada paper ini dilakukan rekonstruksi pohon filogenetik virus *dengue* tipe-3 berdasarkan prinsip parsimoni maksimum (MP). Virus *dengue* tipe-3 merupakan jenis virus yang paling banyak di Indonesia. Adapun penggunaan metode maksimum parsimoni adalah karena metode ini mampu memprediksikan pohon evolusi dengan meminimalisir jumlah langkah yang diperlukan untuk menghasilkan variasi atau perbedaan yang diamati dalam sekuen (Dewi Retnaningati, 2017). Metode maximum parsimony dapat menghasilkan pohon dengan jumlah perubahan terkecil (Dharmayanti. N.L.P.I, 2011). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat evolusi bagaimana evolusi virus *dengue* tipe-3 dari tahun ke tahun.

POHON FILOGENETIK

Pohon filogenetik atau evolusioner adalah struktur data yang mendorong hubungan evolusi antara spesies biologis, atau entitas lain. Hubungan ini disebut filogeni spesies dan didasarkan pada perbedaan atau kesamaan dalam karakteristik genetik atau fisik mereka. Filogenetika diartikan sebagai model untuk merepresentasikan sekitar hubungan nenek moyang organisme, sekuen molekul atau keduanya (Dewi Ayu Lestari, Rodiyati Azrianingsih, Hendrian, 2018). Salah satu tujuan dari penyusunan filogenetika adalah untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya (I Gde Adi Suryawan Wangiyana, 2022). Filogenetik juga bisa diterapkan pada pemahaman manusia tentang kehidupan, biokimia, dan evolusi. Banyak aplikasi bioteknologi juga mendapat manfaat dari studi filogeni, dan aplikasinya di bidang kedokteran dapat berdampak langsung pada kehidupan pasien (NLP Indi Dharmayanti dan Risa Indriani, 2014).

MAXIMUM PARSIMONY

Parsimony maksimum (MP) adalah metode berbasis karakter yang membangun pohon filogenetik dengan meminimalkan total panjang pohon. Ini mencari jumlah minimum langkah evolusi yang diperlukan untuk menjelaskan serangkaian data yang diberikan. Langkah-langkah ini misalnya substitusi antara sekuens DNA. Pendekatan ini mencari semua topologi pohon yang mungkin dari data input yang diberikan, dan memilih pohon optimal (minimal). Pohon optimal biasanya disebut pohon yang paling parsimoni. Dalam membentuk pohon parsimony, dapat dilakukan dengan mengidentifikasi semua situs informatif dalam perataan ganda. Selanjutnya untuk setiap pohon yang mungkin, dihitung jumlah perubahan di setiap situs informatif. Kemudian dijumlahkan jumlah perubahan untuk setiap pohon yang mungkin. Pohon dengan jumlah perubahan terkecil dipilih sebagai pohon yang paling mungkin atau pohon paling parsimony. Namun hal ini hanya dapat dilakukan ketika inputan nya tidak terlalu banyak. Pencarian untuk pohon yang optimal sebenarnya merupakan komputasi sulit karena jumlah pohon yang mungkin tumbuh dengan cepat dengan jumlah urutan input. Misalnya, jumlah *unrooted trees* dalam kasus n urutan input ialah

$$N_u = \frac{(2n - 4)!}{2^{(n-2)}(n - 2)!}, n \geq 4$$

dengan jumlah *rooted trees* adalah

$$N_r = \frac{(2n-3)!}{2^{(n-2)}(n-2)!}, n \geq 4$$

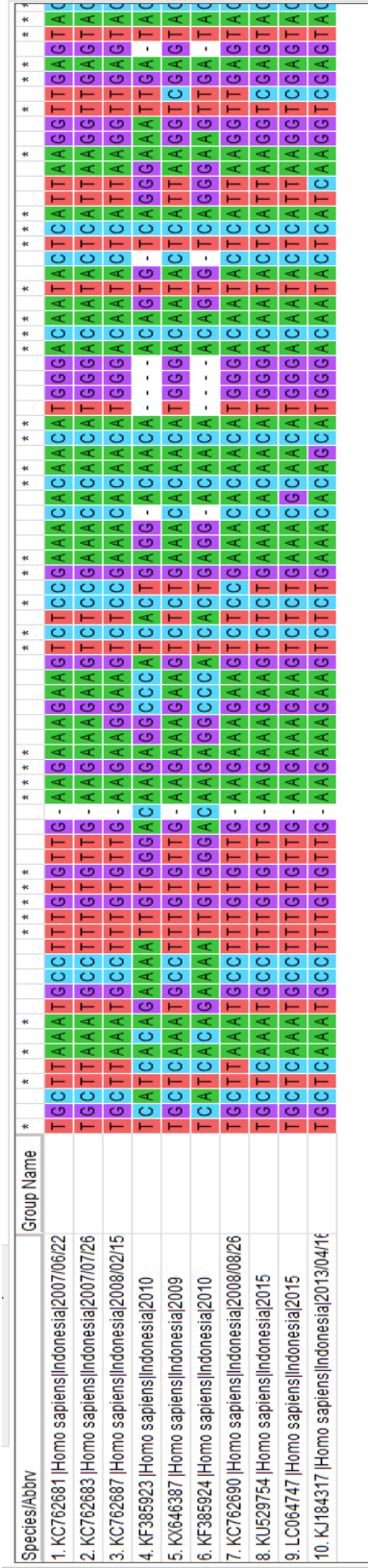
METODE PENELITIAN

Metode penelitian menggunakan data sekunder yang diambil GenBank di *National Center for Biology Information* (NCBI) berupa sekuens nukleotida mencakup 10 DNA virus dengue tipe-3 yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sepuluh Jenis Virus Dengue Tipe-3.

No.	Virus Dengue Tipe-3
1	KC762681_ Homo_sapiens Indonesia 2007/06/22
2	KC762683_ Homo_sapiens Indonesia 2007/07/26
3	KC762687_ Homo_sapiens Indonesia 2008/02/15
4	KF385923_ Homo_sapiens Indonesia 2010
5	KX646387_ Homo_sapiens Indonesia 2009
6	KF385924_ Homo_sapiens Indonesia 2010
7	KC762690_ Homo_sapiens Indonesia 2008/08/26
8	KU529754_ Homo_sapiens Indonesia 2015
9	LC064747_ Homo_sapiens Indonesia 2015
10	KJ184317_ Homo_sapiens Indonesia 2013/04/16

Data sekuens ditulis dalam format teks (Notepad) dan dikonversi menjadi format MEDA serta dilakukan analisis pensejajaran (*alignment*) dengan ClustalW dengan bantuan aplikasi *Molecular Evolutionary Genetic Analysis Software* versi 10 atau MEGA7 (Tamura K, J. Dudley, M. Nei & S. Kumar, 2007). Hasil *alighment* data sekuens dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Sekuensing DNA virus dengue tipe-3 yang telah di *alignment*.

ANALISIS FILOGENETIK

Pohon filogenetik dikonstruksi dengan metode *Maximum Parsimony* dengan model *Kimura 2-parameter*. Konstruksi dilakukan dengan perangkat lunak MEGA7 (Tamura dkk., 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan data yang telah diurutkan pada Gambar 1, jarak genetik antar virus pun bisa didapatkan. Semakin kecil jaraknya maka semakin dekat hubungannya atau *ancestor* nya. Analisis jarak genetik menggunakan metode pairwise analisis Kimura 2 Parameter (K2P). Metode analisis ini efektif untuk DNA barcoding karena opsi tersebut mempertimbangkan tingkat substitusi dan transversi. Terlihat pada Tabel 2 bahwa jarak genetik dari 10 virus dengue tipe-3 berkisar antara 0.001 sampai dengan 1.148. Berdasarkan Tabel 2 juga terlihat bahwa jarak genetik terdekat ialah virus KC762681_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/06/22 dan KC762683_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/07/26 sebesar 0.001 dan jarak genetik terjauh adalah virus KF385923_|Homo_sapiens|Indonesia|2010 dan KC762683_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/07/26 serta KF385923_|Homo_sapiens|Indonesia|2010 sebesar 1.148.

Tabel 2. Jarak Genetik antar virus dengue tipe-3.

No	Virus Dengue Tipe-3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	KC762681_ Homo_sapiens Indonesia 2007/06/22										
2	KC762683_ Homo_sapiens Indonesia 2007/07/26	0,001									
3	KC762687_ Homo_sapiens Indonesia 2008/02/15	0,022	0,021								
4	KF385923_ Homo_sapiens Indonesia 2010	1,148	1,148	1,126							
5	KX646387_ Homo_sapiens Indonesia 2009	0,047	0,046	0,043	1,111						
6	KF385924_ Homo_sapiens Indonesia 2010	1,079	1,079	1,059	0,041	1,047					

No	Virus Dengue Tipe-3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
7	KC762690_ Homo_sapiens Indonesia 2008/08/26	0,009	0,008	0,017	1,146	0,042	1,077				
8	KU529754_ Homo_sapiens Indonesia 2015	0,053	0,051	0,048	1,081	0,031	1,02	0,047			
9	LC064747_ Homo_sapiens Indonesia 2015	0,056	0,055	0,052	1,1	0,026	1,052	0,05	0,021		
10	KJ184317_ Homo_sapiens Indonesia 2013/04/16	0,048	0,047	0,045	1,115	0,026	1,05	0,044	0,035	0,034	

Selanjutnya dibentuk pohon filogeni dari 10 virus dengue tipe-3. Pembentukan pohon filogeni pada paper ini menggunakan metode Maximum Parsimony. Diberikan inputan data sebanyak 10 sehingga dalam mencari pohon paling parsimony akan didapatkan *unrooted trees* sebanyak 2.027.025 dan *rooted trees* sebanyak 34.459.429. Hal ini sangat susah dilakukan jika dilakukan secara manual. Oleh sebab itu, rekonstruksi pohon filogeni dari 10 virus dengue tipe-3 menggunakan software MEGA7 dengan metode *bootstrap Maximum Parsimony*. Rekonstruksi ini dilakukan dengan *bootstrap* 100x untuk menguji kestabilan posisi filogeni dan *clade* tertentu pada pohon filogeni yang dihasilkan.

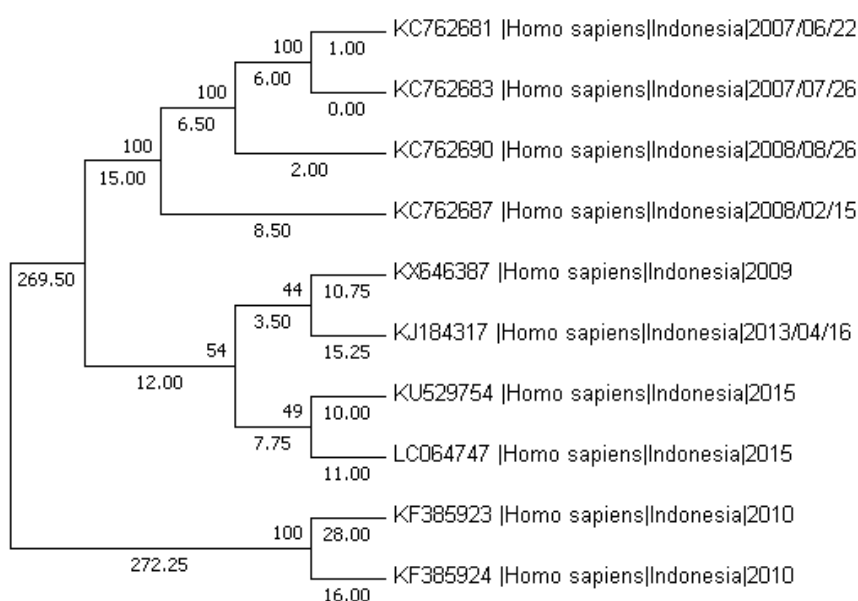
Berdasarkan Gambar 2 terlihat bahwa terdapat beberapa *sister species*. *Sister species* ialah dua spesies yang saling berdekatan satu sama lain karena memiliki kesamaan yang paling banyak. Virus KC762681_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/06/22 dan KC762683_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/07/26 merupakan spesies yang relatif memiliki kesamaan paling banyak. Begitu pula dengan virus LC064747_|Homo_sapiens|Indonesia|2015 dan LC064747_|Homo_sapiens|Indonesia|2015 juga merupakan *sister species*.

Setiap *clade* menunjukkan nilai *bootstrap* yang berbeda-beda. Terlihat pada Gambar 2 bahwa Virus KC762681_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/06/22 dan KC762683_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/07/26 merupakan satu *clade* dimana mereka memiliki nenek moyang yang sama dengan nilai *bootstrap*nya ialah 100. Tidak terdapat beberapa perbedaan yang signifikan dari kedua virus tersebut sebab terjadi pada tahun yang sama dengan bulan yang hanya sedikit berbeda. Begitu pula dengan virus KF385924_|Homo_sapiens|Indonesia|2010 dan KF385923_|Homo_sapiens|Indonesia|2010 merupakan satu *clade* dengan nilai *bootstrap*nya ialah 100. Hal ini menandakan bahwa perbedaan kedua virus tersebut tidak terlalu mencolok.

Selanjutnya berdasarkan Gambar 2 terlihat bahwa virus dengue-3 yang paling banyak berevolusi ialah virus KC762681_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/06/22 dan KC762683_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/07/26. Kedua virus tersebut banyak mengalami perkembangan dengan melihat banyaknya cabang-cabang yang terbentuk hingga terbentuk kedua virus tersebut. Sedangkan virus yang tidak terlalu berevolusi ialah

virus KF385924_|Homo_sapiens|Indonesia|2010 dan
KF385923_|Homo_sapiens|Indonesia|2010.

Hasil pohon filogeni menggunakan metode *maximum parsimony* juga memperkuat data dari analisis jarak genetik. Terlihat bahwa virus KC762681_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/06/22 dan KC762683_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/07/26 memiliki jarak terdekat sehingga mereka merupakan *sister species*. Selanjutnya jarak genetik terjauh adalah virus KC762681_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/06/22 dan KF385923_|Homo_sapiens|Indonesia|2010 serta KC762683_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/07/26 dan KF385923_|Homo_sapiens|Indonesia|2010.



Gambar 2. Pohon Filogeni dari 10 Sekuens DNA Virus Dengue Tipe-3.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Rara Erlina dimana penelitiannya adalah terkait pembentukan filogenetik *Garcinia SPP* atau dikenal dengan tumbuhan manggis manggis menggunakan metode *maximum likelihood*. Hasil dari penelitiannya adalah *Garcinia* terdiri atas 3 Klad yaitu Klad I terdiri dari *G. celebica*, *G. hombroniana*, *G. opaca*, *G. mangostana*, *G. malaccensis*, *G. penangiana*, *G. scortechinii*, *G. hanburyi*, dan *G. urophylla*. Klad II terdiri dari terdiri dari *G. atroviridis*, *G. bancana*, *G. forbesii*, *G. griffithii*, *G. cowa*, *G. nigrolineata*, *G. globulosa*, dan *G. parvifolia*. Kemudian klad III terdiri dari *G. rostrata*, *G. nervosa*, dan *G. praininiana*. *G. nervosa* dianggap paling primitif berdasarkan garis evolusinya (Oktafia & Badruzsaufari, 2021). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Yuliandini Pangestika terkait analisis filogenetik *curcuma zedoaria* (temu putih) berdasarkan gen *internal transcribed spacer* (ITS) juga sejalan dengan hasil dari penelitian ini. Berdasarkan analisis filogenetik yang dilakukan mampu mendapatkan turunan atau nenek moyang dari gen *internal transcribed spacer* (ITS) (Yuliandini Pangestika, Anto Budiharjo, Hermin Pancasakti & Kusumaningrum, 2015).

KESIMPULAN

Pohon filogeni dibentuk menggunakan metode Maximum Parsimony. Hasil analisis dari pohon filogeni menunjukkan kekerabatan yang erat antar 10 virus dengue tipe-3 dan beberapa virus membentuk *clade* sendiri. Berdasarkan pohon filogeni juga terlihat bahwa dari 10 virus dengue tipe-3, virus yang paling banyak mengalami evolusi adalah virus KC762681_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/06/22 dan KC762683_|Homo_sapiens|Indonesia|2007/07/26. Sedangkan virus yang tidak terlalu banyak berevolusi ialah virus KF385924_|Homo_sapiens|Indonesia|2010 dan KF385923_|Homo_sapiens|Indonesia|2010.

SARAN

Penelitian mengenai DNA virus dengue merupakan suatu hal yang baru dan menjadi tantangan bagi ilmu pengetahuan. Kajian ini akan sangat berguna untuk ilmu pengetahuan khususnya dalam masalah pemberantasan virus ataupun pengobatannya. Sebab jika kita dapat mengenali evolusi yang terjadi pada virus tersebut maka kita juga akan dapat melakukan tindakan pengobatan maupun pencegahan yang tepat.

DAFTAR RUJUKAN

- Abdelrazec, A. dkk. (2016). Modelling the spread and control of dengue with limited public health resources. *Mathematical Biosciences*, 271, 136–145.
- Biro.R.K. (2015). *Constructing Phylogenetic Trees*. Faculty of Science Eötvös Loránd University: Budapest.
- Dewi Ayu Lestari, Rodiyati Azrianingsih, Hendrian. (2018). Filogenetik Jenis-jenis Annonaceae dari Jawa Timur Koleksi Kebun Raya Purwodadi Berdasarkan Coding dan Non-coding sekuen DNA. *J. Trop. Biodiv. Biotech*, 3, 1–7.
- Dewi Retnaningati. (2017). Hubungan Filogenetik Intraspesies Cucumis melo L. berdasarkan DNA Barcode Gen matK. *Biota*, 2, 62–67.
- Dharmayanti. N.L.P.I. (2011). Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *WARTAZOA*, 21, 1.
- Fietri, W. A., Razak, A., & Ahda, Y. (2021). ANALISIS FILOGENETIK IKAN TUNA (*THUNNUS SPP*) DI PERAIRAN MALUKU UTARA MENGGUNAKAN COI (*CYTOCHROME OXYDASE I*). 6.
- I Gde Adi Suryawan Wangiyana. (2022). REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIK DARI SEKUEN MATURASE K GYRINOPS VERSTEEGII MENGGUNAKAN REFERENSI PENCARIAN MEGABLAST. *Jurnal Ilmiah Sangkareang P-ISSN:2355-9292/e-ISSN:2775-2127 Mataram*, 9, 19.
- Juliantari, E., & Sofiyanti, N. (2016). Analisis Filogenetik *Mangifera odorata* Sumatera Tengah dan Kerabatnya Menggunakan Gen *rbcL*.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. (2015). *Profil Kesehatan Indonesia 2014*. Jakarta, Indonesia: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Nathan, M.B. dkk. (2019). *Dengue Guidelines For Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. France: World Health Organization.
- NLP Indi Dharmayanti dan Risa Indriani. (2014). IDENTIFIKASI MOLEKULER VIRUS SUBTIPE H3 DAN H10 PADA UNGGAS. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 8 No.1.
- Oktafia, R. E., & Badruzaufari, B. (2021). ANALISIS FILOGENETIK *GARCINIA SPP*. BERDASARKAN SEKUENS GEN rRNA. *ZIRAA'AH MAJALAH ILMIAH PERTANIAN*, 46(2), 259. <https://doi.org/10.31602/zmip.v46i2.4526>

- Pudjiadi, A.H. dkk. (2009). *Pelayanan Kesehatan Anak di Rumah Sakit. Pedoman Bagi Rumah Sakit Rujukan Ringkat Pertama di Kabupaten/Kota*. Jakarta, Indonesia: World Health Organization.
- Tamura K, J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. (2007). *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. (Vol. 24). Molecular Biology and Evolution.
- YULIANDINI PANGESTIKA, ANTO BUDIHARJO, HERMIN PANCASAKTI & KUSUMANINGRUM. (2015). ANALISIS FILOGENETIK *Curcuma zedoaria* (TEMU PUTIH) BERDASARKAN GEN INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS). *Jurnal Biologi*, 4, 8–13.