

METODE FILOGENETIK PADA *INDIGOFERA*

Muzzazinah

Program Studi Pendidikan Biologi FKIP UNS Solo

Email: yayin_am@yahoo.com; yayin_pbio@fkip.uns.ac.id

Abstrak. Metode filogenetik pada *Indigofera* bertujuan menginformasikan langkah kerja pengelompokan pada *Indigofera*. Langkah rekonstruksi filogenetik meliputi seleksi OTU, mencari sumber data yang meliputi morfologi, anatomi, sitologi, warna, ultrastruktur, biokimia, data sequencing DNA, perilaku dan struktur geografi, seleksi dan validitas karakter dan karakter state, memilih analisis, dan rekonstruksi pohon filogenetik. OUT dalam penelitian ini adalah marga, sumber data meliputi morfologi, fitokimia, dan pita DNA. Analisis data menggunakan NTSys. Pohon filogenetik hasil rekonstruksi menunjukkan pengelompokan berdasar struktur geografi.

Kata kunci: OUT, sumber data taksonomi, rekonstruksi, pohon filogenetik

PENDAHULUAN

Sejak Darwin mewariskan prinsip-prinsip dasar teori evolusi, ilmuwan biologi khususnya taksonom semakin mendalami teori evolusi ini pada setiap organisme. Salah satu tujuan utama dari ilmu biologi telah menentukan sejarah hidup keturunan yang lebih dikenal dengan sistematika. Sistematika ini menyediakan seperangkat pengetahuan untuk mengkarakterisasi organisme dalam rangka memahami keanekaragaman. Oleh karena itu tugas penting sistematika adalah mendeskripsikan keanekaragaman suatu organisme, merekonstruksi hubungan kekerabatan terhadap organisme lain, dan mendokumentasikan perubahan yang terjadi selama evolusi dan direpresentasikan dalam bentuk kladogram atau pohon filogenetik. Kladogram adalah grafik dua dimensi yang memiliki titik percabangan (node), cabang dan akar. Titik percabangan menyimbolkan waktu relatif asal mula taksa berbeda, cabang menggambarkan seberapa jauh perbedaan antar taksa terjadi sejak dari nenek moyang yang sama. Tidak semua pohon filogeni memiliki akar. Akar menggambarkan asal mula nenek moyang (genealogi) yang sama (Theobald 2004, Geesink 1987).

Dalam merekonstruksi hubungan evolusi organisme terdapat dua pendekatan, yaitu fenetik dan filetik (Stuessy 1990) atau filogenetik (Geesink 1987) filogeni (Simpson 2006) kladistik (Theobald 2004). Pendekatan fenetik memperkirakan hubungan evolusi bedasar kepemilikan karakter yang sama (Simpson 2006) dan tidak melakukan upaya untuk membedakan homologi dari analogi (Campbell *et al* 2003), sedangkan pendekatan filetik (filogenetik) mendasarkan hubungan evolusi pada karakter dari setiap OTU (*Operational Taxonomic Units*). Analisis filogenetik digunakan untuk mengikuti perubahan yang terjadi secara cepat dari suatu jenis dalam suatu group (Barracough & Nee 2001).

Pemilihan OTU atau satuan operasi taksonomi ini dapat berupa galur, jenis ataupun marga (Rifai 2011), bahkan katagori anak jenis atau populasi yang memiliki ciri khas dan berada pada jalur evolusi sendiri dapat digunakan sebagai OTU (Simpson 2006). Cara obyektif untuk membedakan karakter primitif pada OTU, diperlukan perbandingan dengan kelompok luar (outgroup). Outgroup merupakan suatu jenis atau kelompok jenis yang relatif

berkerabat dekat dengan OTU tetapi tidak sedekat hubungan antar anggota dalam OTU (Campbell *et al* 2003).

Konsep filogenetik yang dicetuskan oleh Hennig pada tahun 1956, sekarang telah menjadi metode standar untuk menarik kesimpulan dari para ahli biologi. Aplikasi metode filogenetik ini bukan sesuatu yang rumit tetapi memerlukan kejelian dan kecerdasan dalam memilih analisis. Adanya software komputer yang digunakan untuk analisis data sangat membantu. Prinsip yang mendasar dalam filogenetik adalah ketika mempertimbangkan dan memutuskan untuk menggunakan karakter dan karakter state yang dipunyai bersama dari sejumlah OTU. Untuk mencari hubungan antar taksa yang dapat mencerminkan sifat evolusioner, tidak lagi melakukan klasifikasi tetapi diperlukan ketepatan dan keyakinan dalam memilih karakter tertentu yang memberikan informasi evolutif.

Kajian dan penelitian tentang filogenetika dari takson telah banyak dilakukan dan sudah menjadi suatu fardu 'ain untuk analisis filogenetika digunakan dalam mengaji. Berbagai kendala dan kesulitan dalam analisis telah teratasi dengan adanya software program sehingga lebih efektif dan lebih akurat dalam perhitungan. Namun terdapat beberapa hal mendasar yang sering dilupakan oleh peneliti, seperti: dasar seleksi OTU, seleksi dan validitas karakter dan karakter state pada ciri morfologi, anatomi, sitologi dan biokimia, dan memilih metode analisis. Melalui kajian ini akan dibahas metode filogenetika pada *Indigofera*. Salah satu marga dari suku *Fabaceae* (*Papilionaceae*). Jenis-jenis dari anggota marga *Indigofera* ini tersebar diseluruh dunia. Jumlah anggota *Indigofera* di seluruh dunia sebanyak 750 jenis (Schrire *et al* 2009).

Pemilihan OTU

Analisis filogenetik yang dilakukan oleh taksonom pada akhirnya bermuara pada mengelasifikasikan obyek. Sistem klasifikasi yang baik adalah sistem klasifikasi yang mantap dan tidak berubah oleh zaman (Rifai 2011). Tentu, hal ini tidak mudah untuk diwujudkan. Oleh karena itu sebelum melakukan penelitian taksonomi, peneliti harus memahami asas-asas dalam mengelasifikasi. Ada lima asas yang harus dipahami, yaitu: (1) keseutuhan obyek yang akan diteliti, (2) kealamiahannya obyek, (3) keharmonisan dan keseimbangan, (4) bertaat asas, (5) multiguna, (6) terbuka, dan (7) memperlihatkan persamaan unsur.

Dalam pemilihan OTU ini ada dua pertanyaan yang harus dijawab oleh peneliti, yaitu: (1) permasalahan apa yang terjadi pada OTU tertunjuk, (2) dan bagaimana batasan status, (3) seberapa besar kelompok. Singkatnya bahwa ketelitian dan kecermatan mengurai permasalahan dalam OTU diperlukan untuk menghindari bias dengan klasifikasi yang ada.

Batasan OTU dapat berupa takson atau wilayah, artinya bahwa kelompok sasaran penelitian dapat suatu suku, marga, atau dapat pula batasan geografi misalnya seluruh dunia, wilayah, pulau (Rifai 2011), atau batasan yang lebih sempit seperti jenis, subspecies bahkan populasi (Simpson 2006). Pada prinsipnya kelompok OTU memiliki banyak kesamaan karakter yang dianggap memiliki hubungan sangat dekat dan diturunkan dari nenek moyang yang sama. Kesatuan organisme itu harus disatukan oleh monofiletik. Kelompok monofiletik mencakup kelompok organisme yang disatukan oleh satu atau lebih karakter (synapomorf) dan kelompok organisme yang mempunyai suatu karakter turunan unik oleh satu jenis atau kelompok monofiletik tertentu (autapomorf).

Seleksi OTU dengan ketat dilakukan oleh Schrire *et al* (2009) kelompok takson puak Indigofereae dengan batasan geografi dan ekologi untuk wilayah Afrika dan Madagaskar. Dengan membagi menjadi 4 klade yaitu klade palaeotropical, klade pantropical, klade cape, dan klade Tethyan. Batasan wilayah di timur jauh untuk melihat kekerabatan *Indigofera* dilakukan oleh (Choi & Kim 1997). Vieira *et al* (2006) mencari tumbuhan untuk antikanker dengan menggunakan *Indigofera sufruticosa*. Berbeda dengan yang lain Nwachuku & Mbagu 2007 menggunakan OTU kelompok jenis *Indigofera* dari wilayah Nigeria Timur untuk mempelajari bentuk dan ukuran stomata, dan dari wilayah yang sama untuk kategorisasi takson, anatomi gagang daun (Nwachuku & Mbagu 2006a, 2006b), morphometric (Soladoye *et al* 2010), klasifikasi *Indigofera* berdasar morfologi trichom dan anatomi pada daun di wilayah Cuba (Quesada 1997).

Dalam analisis filogenetik diperlukan kelompok outgroup dengan tujuan untuk mengetahui karakter primitif (plesiomorf) dan karakter derivat (apomorf) dari kelompok ingroup serta untuk menentukan titik awal pembentukan sebuah pohon filogenetik. Seleksi terhadap outgroup harus cermat, yaitu dengan memilih kelompok takson yang memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan ingroup tetapi tidak sedekat seperti anggota kelompok dalam ingroup. Kelompok outgroup dapat diambil dari anakseksi, anakpuak, atau marga terdekat. Marga *Phylloxylon*, *Cyamopsis*, *Indigastrum*, *Microcharis*, *Millettoid*, *Phaseoloid* dan *Rhynchotropis* dapat digunakan sebagai outgroup dari *Indigofera* (Schrire *et al* 2009). Sebaliknya *Indigofera* sebagai outgroup dari marga *Millettieae* (Hu *et al* 2000). Sementara Choi & Kim (1997) menggunakan *Indigofera pseudotinctoria* dari subsection *Pseudotinctoria* sebagai outgroup dari kelompok ingroup yang termasuk dalam subsection *Psiloceratiae*.

Penelitian ini menginformasikan pemilihan out pada *indigofera*, menganalisis sumber data, mengumpulkan sumber data, memilih alat analisis data, dan merekonstruksi pohon filogenetik pada *indigofera*.

METODE

Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan untuk pengumpulan data berupa: gunting dahan, cutter, platik klip 15x10 cm, amplop, plastic bening 60X100 cm, plastic bening 40x60 cm, sasak, tali, koran, box, GPS, altimeter, higrometer, Hagameter, meteran, mistar, jangka sorong, alcohol 70%, sprayer, label gantung, pH meter, color chart, kamera, lakban.

Sampel

Sampel *Indigofera* dikoleksi dari 68 lokasi di Pulau Jawa, Pulau Madura, Pulau Samosir, dan Pulau Flores. Total sampel adalah 173 individu yang terdiri dari 170 sampel *Indigofera* dan 3 sampel outgroup mewakili tiga spesies yaitu *Tephrosia noctiflora*, *Crotalaria pallida* dan *Eritrina variegata*. Jumlah individu yang mewakili tiap spesies tidak sama bergantung pada sebaran di lokasi. Semua spesimen hasil eksplorasi disimpan di Laboratorium Laboratorium Taksonomi Program Studi Pendidikan Biologi FKIP UNS Solo.

Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengambilan sampel dilakukan secara eksploratif. Waktu pengambilan sampel menyesuaikan dengan peruntukan sampel, masa berbunga dan masa berbuah. Untuk keperluan karakterisasi morfologi, sampel yang diamati meliputi batang, daun, bunga, buah dan biji dari 5 cabang dalam setiap individu, dan sampel berjumlah 5 pohon setiap populasi atau aksesori.

Sampel untuk herbarium diseleksi dari individu yang sehat dan tersedianya organ seperti daun, bunga, buah, dan biji yang lengkap. Koleksi dibuat tiga duplikat. Nomor koleksi diurutkan sesuai waktu pengambilan. Sampel yang sudah bernomor ditata dalam kertas koran dimasukkan dalam plastik berukuran 40 x 60cm, disiram dengan alkohol 70% dan dilakban. Sampel dibawa ke laboratorium untuk selanjutnya diproses menjadi herbarium.

Pengamatan morfologi menggunakan metode deskriptif. Karakter yang diamati berjumlah 42. Karakter yang diamati di lapangan adalah habitus, bentuk kanopi, warna batang bagian ujung, bentuk pertumbuhan tunas (Valladares & Niinemets 2007). Karakter pada daun terdiri dari bentuk daun, ada tidaknya kelenjar, indumentum, bentuk rambut, kerapatan rambut, bentuk tepi daun, ujung daun, dan ukuran anak daun (Soladoye *et al.* 2010; Gafar *et al.* 2011). Karakter morfologi bunga yang diamati meliputi bentuk perbungaan, bentuk dan ukuran kelopak bunga, keadaan permukaan dan ukuran dari bendera, sayap, lunas dan warna pada kalik, bendera, lunas, dan sayap (Wilson & Rowe 2008; Gandi *et al.* 2011; Sanjappa 1985; Quiseda 1997). Karakter buah meliputi ukuran, bentuk, kedudukan, rambut, warna, jumlah biji, dan keberadaan kelenjar (Wilson & Rowe 2004; Schrire *et al.* 2009; Adema 2011). Karakter biji yang diamati adalah ukuran biji, bentuk biji, warna kulit biji (Al Ghamdi 2011; Paulino *et al.* 2011). Trichome sebagai karakter spesifik dalam *Indigofera* diamati struktur, sebaran, dan kerapatan (Leite *et al.* 2009, Marquifavel *et al.* 2009). Karakter baru yang digunakan dalam penelitian ini meliputi warna daun segar, warna permukaan atas daun kering, warna permukaan bawah daun kering, dan keberadaan trichome pada anther. Untuk standarisasi warna dibandingkan dengan standar color test (Kornerup & Wanscher 1967).

Analisis data

Analisis gugus dilakukan menggunakan koefisien simple matching (SM) dan metode UPGMA dari program NTSys 2.11a (Rohlf 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Karakter dan Karakter state Pada *Indigofera*

Karakter adalah atribut atau fitur (Simpson 2006), atau penanda (Rifai 2011) yang mengacu kepada bentuk, susunan, kandungan, atau perilaku makhluk yang dapat digunakan untuk membandingkan, mendeterminasi, menginterpretasi, mengelompokkan atau memisahkan kelompok organisme dengan organisme lainnya. Bagaimana cara mengetahui karakter dan karakter state bersifat synapomorf dan karakter tersebut baik digunakan dalam analisis filogenetik? *Pertama*, karakter yang baik menunjukkan variasi yang lebih besar di antara taksa yang dipelajari (OTU). *Kedua*, variasi harus diwariskan dan bersifat independen

terhadap karakter yang lain. Misalnya: karakter "mempunyai xylem sekunder" dan karakter "mempunyai kambium pembuluh" tidak independen, karena xylem sekunder dihasilkan oleh kambium pembuluh (Wiley & Lieberman 2011). *Ketiga*, relatif invariabel dalam sebuah OTU. *Keempat*, mempunyai kisaran variasi yang jelas pada beberapa ciri. *Kelima*, pada ciri lain menunjukkan pola variasi berkesinambungan atau tidak terputus-putus. *Keenam*, kita harus memastikan bahwa karakter dan karakter state yang dipelajari benar-benar sebanding (homolog) (Rifai 2011, Simpson 2006 dan Wiley & Lieberman 2011).

Homologi menandakan struktur dan organ tubuh yang mempunyai hubungan evolusi. Tiga kriteria homologi adalah kecocokan dalam posisi dan detil pada struktur organ tersebut, kecocokan dalam asal perkembangan, tanpa adanya perubahan dari sifat plesiomorf pada nenek moyang sampai kepada apomorf pada turunannya.

Penentuan homologi dalam menyusun karakter merupakan aspek yang sangat penting. Homologi dapat dihipotesiskan atas dasar kesamaan langsung atau kesamaan melalui gradasi. Namun demikian perlu diwaspadai bahwa bisa terjadi adanya perubahan karakter tidak selalu karena terjadi evolusi. Rifai (2011) dan Simpson (2006) menjelaskan bahwa sebab persebaran karakter pada OTU mungkin merupakan hasil evolusi yang paralel, atau konvergen atau bahkan pembalikan (reversal) dari sifat apomorf ke plesiomorf. Ketika bukti dan ciri adanya homologi pada setiap karakter yang disusun oleh peneliti tidak jelas bahkan tidak ditemukan sumber referensi yang benar, maka diperlukan keberanian untuk meyakinkan diri untuk mengambil keputusan. Oleh karena itu memilih karakter dan menyusun karakter state diperlukan seni, intuisi dan sedikit meramal.

Karakter dapat bersifat terlihat, dan tidak terlihat (Kalkman 1978). Karakter terlihat (visible) adalah karakter yang dapat diamati dengan mata telanjang, lensa tangan, mikroskop cahaya dan mikroskop elektron. Sedangkan karakter tidak terlihat (non visible) adalah karakter yang dapat dideteksi dalam proses kimia (produk yang dihasilkan) dan proses fisiologis. Karakter tidak terlihat (non visual) pada *Indigofera* dapat dibedakan atas: ada tidaknya indigotin, kandungan indigotin dalam daun muda, kandungan indigotin dalam daun tua, kandungan indigotin pada bunga.

Suatu karakter merupakan ciri yang dapat dikenali dari suatu organisme, misalnya panjang polong, bentuk biji, warna bunga. Sedangkan karakter state merupakan nilai dari suatu karakter misalnya 12 cm, bulat, merah marun. Karakter morfologi pada *Indigofera* telah dideskripsikan sejumlah 84 karakter (Schrire *et al* 2009), 62 karakter (Muzzazinah & Suratman 2010). Karakter morfologi tersebut dibedakan menjadi karakter sintesis dan karakter analisis. Karakter sintesis meliputi: habitat, habitus, ada tidaknya rambut biramus, ada tidaknya kelenjar pada bagian bawah daun, ada tidaknya kelenjar pada bunga (standar), cladodes, susunan daun majemuk, susunan daun tunggal, kerapatan rambut pada daun, bentuk daun, warna daun, tepi daun, tepi daun melipat, tepi daun lengket, bentuk stipula, daun mereduksi, stipel, ukuran tangkai bunga, perbungaan, braktea persisten, bentuk braktea, brakteaola, panjang tangkai buah, ukuran bunga, warna petal, ukuran sepala, panjang lobus kalik, indumentum pada kalik, petal, simetrisasi petal, permukaan dorsal veksilum, indumentum pada veksilum, rambut pada sayap bagian distal, stigma, jumlah biji dalam polong, septa dalam buah, ketinggian habitat. Sedangkan karakter analisis meliputi: bakal buah, rambut pada bakal buah, bentuk polong, cara membuka polong, tipe rambut pada polong, posisi polong dengan tangkai daun, polong memuntir, tanin pada indokarp, warna biji, aril pada biji, warna biji dan jumlah kromosom.

Karakter yang telah dipaparkan di atas masih harus direvisi, mengingat belum tercantumnya karakter yang mendukung sebagai ciri tanaman budidaya seperti ciri fenotip yang digunakan oleh para pengguna tanaman *Indigofera* ini. Kemanfaatan dari *Indigofera* ini bermacam-macam, sebagai pewarna tekstil, pakan ternak, antikanker, antibakteri, antijamur. *Indigofera zollingeriana* telah dibudidayakan dan dimanfaatkan sebagai pelet untuk pakan ternak sapi dan domba (Apdini 2011, Tarigan 2009).

Setelah karakter dan karakter state tersusun dan telah diyakini bahwa semua karakter adalah homolog, maka karakter state harus ditransformasikan. Susunan transformasi (morfoklin) ini mencerminkan hipotesis urutan evolusioner dari karakter state yang satu ke karakter state yang lain. Seri transformasi ini dapat berupa karakter biner dan multistate. Pengurutan seri transformasi ini harus mempunyai probabilitas yang sama untuk setiap karakter state. Misalnya ketika kita menemukan karakter state dengan multistate, tidak diperkenankan mentransformasikan karakter state ekstrim, tetapi dengan memasang karakter antara, asumsinya bahwa evolusi berlangsung setahap demi setahap.

Sumber Karakter pada *Indigofera*

Pada akhirnya muara filogenetik adalah klasifikasi, untuk mendapatkan klasifikasi yang tidak lekang oleh zaman diperlukan sumber karakter yang bervariasi, banyak dan memanfaatkan segala sumber yang dapat digali. Pada takson *Indigofera* dapat menggunakan sumber-sumber seperti: morfologi, anatomi, sitologi, warna, ultrastruktur, biokimia, data sequencing DNA, perilaku dan struktur geografi.

Karakter yang bersumber dari morfologi masih mendominasi pada penelitian tentang *Indigofera*. Anggota jenis *Indigofera* mempunyai penampakan fenotip yang sangat bervariasi, sehingga dengan ciri morfologi sudah dapat membedakan antar jenis. Selain itu dari setiap daerah (geografi) yang berbeda memiliki penampakan fenotip yang sangat bervariasi. Karakter morfologi khususnya bentuk rambut digunakan sebagai penciri *Indigofera* di China dan menghasilkan dua spesies baru yaitu *Indigofera caloneura* dan *Indigofera cordifolia* (Fen 2007), menggunakan tipe polen yang dilakukan di Islamabad (Masih *et al* 2005).

Sumber karakter anatomi pada penampang petiole menunjukkan variasi pada bentuk sel kolenkim, keberadaan kristal pasir, dan bentuk sel epidermal. Jaringan korteks pada *I. hirsuta* dan *I. priereana* mengandung kristal dan tanin, kristal pasir pada *I. stenophylla*, sementara kristal bentuk bintang terdapat pada *I. pulchra* (Nwachukwu & Mbagu 2006). Karakter daun pada suku Leguminosae mempunyai perilaku menutup ketika ada rangsangan cahaya, maka data anatomis seperti keadaan lembaran daun ketika menutup, dan daun membuka, tebal daun, lubang sirkuler, saluran pada tulang daun dan tepi daun, lokasi saluran, ukuran saluran, bentuk sel palisade, ukuran parenkim, sistem pertulangan, karakter posisi ujung pertulangan. Jaringan pada batang: ukuran epidermis, korteks, ploem skunder, xilem skunder, jumlah lapisan sel kolenkim; tipe kristal kalsium oksalat yang tersebar di sel parenkim pada daun dan akar (Tamilselvi *et al* 2011).

Fitokimia yang terkandung dalam jenis *Indigofera* adalah zat warna biru yang disebut nila atau indigo. Di antara pewarna alam yang banyak diakui di seluruh dunia, nila merupakan salah satu pewarna alami yang dikenal tertua, adalah turunan dari glukosida berwarna bentuk enol dari indoxyl. Indigo terbentuk dari indican dengan fermentasi bahan

tanaman seperti *Baphicacanthus cusia*, *Indigofera suffruticosa*, *Polygonum tinctorium*, *Isatis indigotica*, diikuti dengan oksidasi udara indoxyl. *Indigofera tinctoria* mengandung isatan B (indoxyl- β -ketogluconate), sebagai prekursor indigo yang utama. Hasil reaksi antara indoxil dengan isatin C menghasilkan indigotin, indirubin, isoindigotin, isoindirubin, isoindigo dan indigo kuning (Reyes-Salas *et al* 2004, Laitonjam *et al* 2011). Senyawa indigotin mempunyai nilai terapan penting dalam kualitas warna tekstil (tenun dan batik). Pola sebaran kandungan indigotin bermanfaat sebagai penguat penggolongan dalam klasifikasi jika berkorelasi dengan ciri lain. Oleh karena itu data kandungan indigotin dapat sebagai sumber karakter karena dapat menajagi hubungan kekerabatan antar jenis *Indigofera* secara evolusi.

Dengan perkembangan biologi molekuler yang pesat, sumber karakter tingkat molekul seperti *polymerase chain reaction* (PCR) dan *sequencing* DNA, penggunaan sekuen DNA dalam penelitian filogenetik telah meningkat pesat dan telah dilakukan pada semua tingkatan taksonomi. Alasan menggunakan sekuen DNA, yaitu (1) DNA merupakan unit dasar informasi yang mengkode organisme, (2) lebih memudahkan dalam mengekstrak dan menggabungkan informasi mengenai proses evolusi suatu kelompok organisme, sehingga mudah untuk dianalisis, (3) memudahkan dalam pembuatan model dari peristiwa evolusi secara komparatif, dan (4) menghasilkan informasi yang banyak dan beragam, dengan demikian akan ada banyak bukti tentang kebenaran suatu hubungan filogenetika, (5) merupakan data genetik, (6) terbuka untuk berbagai macam organisme, dan (7) membedakan antara homolog dan analog (Topik & Adi Pancoro 2008; Chikmawati 2012).

Sumber karakter DNA dapat diperoleh dari inti (nDNA), kloroplas (cpDNA), dan mitokondria (mtDNA).

Gen atau genom	Metode
DNA kloroplas	Analisis restriksi
Gen <i>rbcL</i> dari DNA kloroplas	Analisis sekuen DNA
Gen <i>matK</i> dari DNA kloroplas	Analisis sekuen DNA
DNA mitokondria	Analisis sekuen DNA
Gen RNA inti	Analisis sekuen DNA
Daerah ITS dari nrDNA	Analisis sekuen DNA
Kelompok gen repetitive:	Analisis sekuen DNA
Knob heterokromatin	
Gen CAB	Analisis sekuen DNA
Gen <i>rbcS</i>	Analisis sekuen DNA
Gen kopi tunggal	Analisis sekuen DNA

Sekuen DNA lebih menarik perhatian para taksonom dunia untuk dijadikan karakter dalam penelitian filogenetika karena beberapa fakta: (1) sekuen DNA menawarkan data yang akurat melalui pengujian homologi yang lebih baik terhadap karakter-karakter yang ada, (2), sekuen DNA menyediakan banyak *character states* karena perbedaan laju perubahan basa-basa nukleotida di dalam lokus yang berbeda adalah besar, (3) sekuen DNA telah terbukti menghasilkan sebuah hubungan kekerabatan yang lebih alami. Namun demikian terdapat beberapa asumsi yang harus diperhatikan sebelum menggunakan data sekuen DNA atau protein dalam analisis filogenetika, di antaranya, yaitu (1) sekuen berasal dari sumber yang spesifik, yaitu dari inti, kloroplas atau mitokondria, (2) sekuen bersifat homolog (diturunkan dari satu nenek moyang), (3) sekuen memiliki sejarah evolusi yang sama (misalnya bukan dari campuran DNA inti dan mitokondria) dan (4) setiap sekuen berkembang secara bebas.

Konstruksi Kladoogram

Terdapat lima tahap penting dalam membangun kladoogram, yaitu merakit data, menyelaraskan data karakter, memilih metode dan model, rekonstruksi pohon filogenetik dan presentasi data pohon filogenetik.

Tahap 1. Merakit data Tahap pertama dalam konstruksi kladoogram adalah merakit data. Ketika kita mengonstruksi pohon filogenetik berdasar sifat morfologi, anatomi, fisiologi, geografi atau sitologi maka data yang disediakan adalah data hasil identifikasi, pengamatan dan pengukuran. Data disusun dalam bentuk karakter dan karakter state yang diberi pembobotan. Kemudian data disusun dalam matrik. Sementara, jika menggunakan data molekuler selain didapatkan dari hasil penelitian, dapat pula didapatkan dari bank data seperti NCBI, GenBank, EMBL dan DDBJ.

Tahap 2. menyelaraskan data karakter Menyelaraskan data karakter tidak hanya diperuntukkan bagi data molekuler tetapi juga non molekuler. Pada data non molekuler dapat dilakukan dengan mengurutkan karakter state berdasar hipotesis evolusi. Dalam data molekuler tujuan utama menyelaraskan adalah untuk menentukan sekuen DNA atau protein sudah homolog dengan lainnya, penjajaran yang melibatkan dua sekuen yang homolog disebut pairwise alignment, sedangkan yang melibatkan banyak sekuen yang homolog disebut multiple alignment. Proses ini sangat menentukan keberhasilan analisis filogenetik. Banyak program untuk membantu proses penajajaran dan penyelarasan, yaitu dengan clustal X, atau BioEdit.

Tahap 3. memilih metode dan model Tahap penjajaran adalah salah satu cara mengeliminir tingkat kesalahan, namun tidak menjamin pohon yang dihasilkan sudah benar. Untuk dipikirkan kembali, dengan menghilangkan gap keseluruhan apakah justru akan dapat memperoleh informasi filogenetik? Selain itu kesenjangan atau gap yang sering dijumpai pada data sekuen DNA dan protein merupakan peristiwa evolusi tunggal.

Metode yang digunakan untuk membangun pohon filogenetik dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu metode yang berdasarkan jarak (*distance-based*) dan berdasarkan karakter (*character based*). Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) dan *Neighbor Joining* (NJ) merupakan algoritme pembuatan pohon yang menggunakan metode jarak, dimana metode ini memanfaatkan banyaknya perbedaan antara dua sekuen untuk membuat pohon. Sedangkan algoritme untuk menyusun pohon berdasar karakter digunakan metode maksimum parsimony, Fitch Margoliash dan maksimum likelihood.

Metode maksimum parsimony, menggunakan jumlah terkecil dari kejadian mutasi dibutuhkan untuk menghitung evolusi dari set sekuen dari *common ancestor* untuk konstruksi pohon. Selain itu metode ini meminimalkan jumlah langkah yang dibutuhkan untuk menghasilkan variasi yang diamati dalam sekuen. Algoritme yang digunakan tidak rumit tetapi dijamin dapat menghasilkan pohon yang terbaik. Namun demikian tidak ada garansi bahwa pohon paling parsimony adalah yang paling benar. Tidak jarang metode parsimony sering gagal memberi topologi yang benar ketika kecepatan substitusi berbeda dalam cabang yang berbeda. Hasil simulasi dalam mengetes reliability secara statistik dari metode konstruksi pohon, mudah menyimpulkan jika analisis data membolehkan satu metode untuk mengassign suatu topologi dengan konfiden statistika bagus, umumnya semua metode populer bekerja bagus. Tetapi jika data memiliki banyak mutasi reverse baru, variasi kecepatan antara cabang atau variasi luas dalam kecepatan sepanjang site, maka tidak ada metode bekerja bagus (Felsenstein 1981, Chikmawati 2012).

Metode maksimum likelihood dapat digunakan untuk mengeksplorasi sekuen yang lebih beragam yang tidak dapat dilakukan oleh metode maksimum parsimony. Metode ini sangat teliti dalam mempertimbangkan setiap pohon sehingga hanya cocok untuk sekuen yang jumlahnya kecil. Kekurangan metode ini membutuhkan perangkat keras yang sangat intensif.

Tahap 4. Rekonstruksi pohon filogenetik Prinsip rekonstruksi pohon filogenetik adalah kecermatan menentukan karakter dan ketepatan memilih metode. Ketepatan memilih metode ini akan menghasilkan pohon yang evolusioner. Permasalahan adalah pohon yang dihasilkan dari analisis berjumlah banyak, jadi bagaimana memilih pohon yang benar? Uji reliabilitas pohon filogeni menggunakan tes bootstrap akan didapatkan pohon yang mempunyai dukungan kebenaran bervariasi. Pohon filogenetik dengan nilai bootstrap tinggi setidaknya diatas 70% merupakan pohon filogenetik yang baik. Metode yang dikembangkan untuk menguji reliabilitas diantaranya adalah *interior branch test* (IB) dan *Felstein's bootstrap test* (FB). Prinsip dari IB adalah estimasi pohon dengan menguji reliabilitas setiap cabang sebelah dalam (*interior branch*). Metode FB sangat baik digunakan untuk mengevaluasi pohon filogenetik karena metode ini akan menyuplik secara acak untuk dilakukan konsensus sehingga hanya ada pohon yang dihasilkan.

Tahap 5. Presentasi data Secara intuitif kita menarik pohon filogenetik dari bawah ke atas seperti pohon nyata. Pohon filogenetik dapat ditunjukkan secara lengkap dengan membubuhkan keterangan seperti, karakter pembeda, nilai bootstrap, panjang cabang dan nama OTU. Pola pohon filogenetik dapat ditampilkan menghadap ke kanan, kiri, atas atau tanpa akar.

Filogenetik *Indigofera*

Indigofera terdistribusi secara luas di dunia, berjumlah sekitar 750 jenis dengan pusat keanekaragaman genetik di Afrika–Madagaskar mencapai 550 jenis (Schrire et al 2009). Persebaran *Indigofera* di Asia 105 jenis, Australia 50 jenis, Asia Tenggara 39 jenis, dan China 81 jenis. Jumlah jenis dan persebaran yang sangat tinggi berkonsekuensi pada tingginya variasi fenotip maupun genotip sehingga berpotensi meningkatnya kecepatan evolusi. Sumber data yang dapat digunakan untuk membentuk filogenetik pada *Indigofera* meliputi data morfologi, anatomi, letak geografi, ekologi, kandungan senyawa kimia indigotin dan sekuen DNA dari nrDNA ITS/5.8S.

Struktur geografi dan ekologi sebagai prediktor terhadap filogenetik *Indigofera* di Afrika dan sekitarnya menghasilkan empat kelompok (klade) yaitu klade paleotropical, klade pantropical, klade cape, dan klade tethyan. Pengelompokan pada klade paleotropical oleh adanya kesamaan pada karakter lokasi, stipel, kerapatan perforasi pada polen, warna merah pada petal, kerapatan pearl body pada batang dan perbungaan, hidatod, rambut biramus tidak sama panjang dan buah polong yang tegak. Karakter iklim, hidatod merupakan sinapomorfisme, sedangkan karakter kerapatan perforasi pada polen, kerapatan pearl body pada batang dan perbungaan, dan kedudukan buah polong terhadap cabang batang merupakan karakter paralelisme. Pengelompokan pada klade pantropik atas dasar persamaan karakter habitat, warna coklat pada rambut biramus, henis rambut tipe pubescen pada bunga, sayap bunga berambut, kerapatan rambut pada tepi lunas, kerapatan pearl body pada batang dan perbungaan, dan panjang lobus kalik. Klade cape dikelompokkan oleh kesamaan antara karakter pada habitus perdu, apek lunas yang lancip, ukuran ovary dan stilus, panjang jenggot lunas, lobus kaliks yang pendek dan bentuk biji

berbentuk bola. Sedangkan klade tethyan dicirikan oleh karakter tanin pada endokarp tidak ada, bentuk polong segiempat, dan buah polong memuntir.

Indigofera di Indonesia ditemukan sebanyak 9 spesies. Analisis pengelompokan dilakukan terhadap 173 nomor koleksi *Indigofera* dengan menggunakan 42 karakter morfologi. Pendekatan morfologi ini kemudian divisualisasikan dalam bentuk dendrogram (Gambar 1). Berdasarkan dendrogram tersebut, koefisien keserupaan antara sampel berkisar 0,32 sampai dengan 1. Pada tingkat keserupaan 0,32 *Indigofera* mengelompok dan terpisah dari outgroup. Gugus *Indigofera* disatukan oleh karakter adanya stipela, tipe perbungaan menandan, panjang tangkai perbungaan pendek kurang 2,5 mm, indumentum braktea uniseriate dan rambut panjang (*hirsut*), bentuk cuping, ada alat tambahan berupa kantong di kanan dan kiri tepi lunas, trichome pada anther, dan trichome pada polong. Gugus *Indigofera* ini selanjutnya memisah dan mengelompok berdasar spesies.

Pada tingkat keserupaan 0,48 gugus *I. hirsuta* memisahkan dari kelompok *Indigofera* yang lain oleh karakter panjang tandan bunga ($> 11,1-16,7$ cm), panjang tangkai perbungaan (2,7-5,5 cm), dan jumlah polong 33-99. Karakter ini menandai kedekatan hubungan kekerabatan dengan outgroup. Dapat dikatakan *I. hirsuta* merupakan spesies primitif dalam *Indigofera* Indonesia.

Tingkat koefisien keserupaan 0,50 *I. zollingeriana* memisahkan dari gugus *Indigofera* lainnya. Karakter yang memisahkan *I. zollingeriana* dengan gugus *Indigofera* lainnya adalah panjang petiole 1,8-2,6 cm, jumlah bunga 57-109, dan jumlah biji lebih dari 13. Selanjutnya pada koefisien keserupaan 0,56 menyatukan gugus *I. linifolia* dan *I. trifoliata* oleh karakter bentuk crown piramid. Namun kedua gugus selanjutnya memisah oleh karakter bentuk polong dan kelenjar pada kulit polong. Pada koefisien 0,61 *I. galeoides* membentuk gugus dan memisah oleh karakter habitus irregular, buah berparuh, ukuran polong 4,3-6,7 cm, dan polong tidak membuka.

Pada tingkat kemiripan 0,61 menyatukan empat gugus *I. longiracemosa*, *I. arrecta*, *I. suffruticosa* dan *I. tinctoria*. Keempat gugus disatukan oleh karakter habitus perdu, tingkat warna dari hijau tua, hijau kebiruan sampai hijau keabu-buan pada permukaan atas daun kering, warna hijau gelap, hijau keabu-abuan sampai biru hijau, bentuk segitiga memanjang pada stipula, dan cuping kaliks segitiga dan segitiga melebar. Pengelompokan ini memiliki relevansi dengan penelitian sebelumnya mengenai potensi sebagai pewarna. Empat spesies tersebut mengandung indican dan menghasilkan pewarna biru indigo dengan kualitas baik.

Gugus *I. longiracemosa*, memisahkan dari tiga gugus *I. arrecta*, *I. suffruticosa* dan *I. tinctoria* pada koefisien kemiripan 0,62. Gugus *I. arrecta* dari berbagai wilayah mengelompok pada koefisien kemiripan 0,64. Gugus ini disatukan oleh karakter tekstur biji berbubungan (ridged), warna batang muda beralur coklat kemerahan, dan bentuk polong silindris, panjang, dan lurus. Pada koefisien kemiripan 0,76 gugus *I. arrecta* mengelompok berdasar wilayah membentuk dua subgugus (Subgugus 1 dan 2). Subgugus 1 terdiri dari *I. arrecta* koleksi asal Yogya dan Temanggung, sedangkan subgugus 2 terdiri dari *I. arrecta* koleksi Samosir dan Magelang. Pada koefisien kemiripan 0,66 menyatukan dua gugus *I. suffruticosa*, dan gugus *I. tinctoria*. Pada koefisien kemiripan 0,78 gugus *I. tinctoria* asal Flores memisah dari *I. tinctoria* asal Jawa dan Madura. Secara fenotip *I. tinctoria* asal P. Flores dan P. Jawa terdapat karakter yang berbeda seperti warna permukaan atas daun kering, warna permukaan bawah daun kering, warna daun segar, warna buah matang. Karakter warna pada daun dan buah yang berbeda dari spesies wilayah lain dapat terjadi karena faktor lingkungan seperti suhu dan intensitas cahaya. Efek radiasi sinar matahari secara luas

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Langkah merekonstruksi pohon filogenetik pada *indigofera* melalui tahap pemilihan out, mencari sumber data, seleksi dan validitas karakter dan karakter state, analisis, dan rekonstruksi pohon filogenetik. Tahapan dalam rekonstruksi pohon filogenetik meliputi merakit data, menyelaraskan data karakter, memilih metode dan model, rekonstruksi pohon filogenetik, dan presentasi data. Besarnya koefisien keserupaan antara sampel berkisar 0,32 sampai dengan 1. Pada tingkat keserupaan 0,32 *Indigofera* mengelompok dan terpisah dari outgroup. Gugus *Indigofera* disatukan oleh karakter adanya stipela, tipe perbungaan menandan, panjang tangkai perbungaan pendek kurang 2,5 mm, indumentum braktea uniseriate dan rambut panjang (*hirsut*), bentuk cuping, ada alat tambahan berupa kantong di kanan dan kiri tepi lunas, trichome pada anther, dan trichome pada polong. Gugus *Indigofera* ini selanjutnya memisah dan mengelompok berdasar spesies.

SARAN

Data fitokimia, anatomi dan molekuler pada *indigofera* masih terbatas, sumber data dan sebaran di Indonesia belum tuntas. Eksplorasi lanjutan di seluruh pulau di Indonesia dan pemanfaatannya sangat diperlukan untuk kelanjutan penelitian pada *indigofera*.

DAFTAR PUSTAKA

- A. Tarigan. 2009. Produktifitas dan Pemanfaatan *Indigofera* sp. Sebagai Pakan ternak Kambing Pada Interval dan Intensitas Pemoangan Yang Berbeda. *Thesis*. Sekolah Pasca Sarjana IPB Bogor.
- Apdini TAP. 2011. Pemanfaatan Pellet *Indigofera* sp. Pada Kambing Perah Peranakan
- B.D. Schrire, Matt Lavin, Barker NP, Forest F. 2009. Phylogeny of The Tribe *Indigoferaeae* (*Leguminosae-Papilionoideae*): Geographically Structured More in Succulent-Rich and Temperate Setting Than in Grass-Rich Environments. *American Journal of Botany* 96 (4): 816-852.
- Choi BH & Kim JH. 1997. ITS Sequences and Speciation on Far Eastern *Indigofera* (*Leguminosae*). *Journal of Plant Research* 110: 339-346.
- C. Kalkman. 1987. The Two Challenges for Plant Systematics. De Vogel EF (ed). *Manual of Herbarium Taxonomy Theory and Practice*. Unesco.
- C.U. Nwachukwu and Mbagu FN. 2006. Anatomical Studies on the Ptirole of Some Species of *Indigofera*. *American Journal* 1 (2): 55-58.
- 2006. Morphological Features in Some Sp of *Indigofera* L (*Leguminosae-Papilionoideae*). *Journal of Fisheries International* 1 (2-4): 50-54.
- D. Theobald. 2004. Evidence for Macroevolution "Phylogenetic Primer".
<http://www.talkorigins.org/faqs/comdesc/phylo.html>. Diakses 7 April 2012.

- Etawah Dan Saanen Di Peternakan Bangun Karso Farm. *Skripsi*. Departemen Ilmu Nutrisi Dan Teknologi Pakan Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor.
- E.M. Quesada. 1997. Taxonomix Significance of Foliar Dermatotypes and Floral Trichomes in Some Cuban Taxa of *Indigofera* L (*Fabaceae-Faboideae*). *Polibotanica* No 6: 1-18.
- E.O. Rayes-Salas, Manzanilla-Cano JA, Barcelo-Quintal MH, Ramizes-Balderas J. 2004. Direct Electrochemical Determination of Indigo in Dimethylsulfoxide. *Analytical Letters* Vol. 37, No. 3: 463-472.
- E.M. Quiseda.1997. Taxonomic significance of foliar dermatotypes and floral trichomes in some Cuban taxa of *Indigofera* L (*Fabaceae-Faboideae*). *Polibotanica* 6:1-18.
- E. O. Wiley & Lieberman B S. 2011. *Phylogenetics : theory and practice of phylogenetics systematics*. Hoboken, N.J. : Wiley-Blackwell.
- F. Adema 2011. Notes on Malesian Fabaceae (*Leguminosae-Papilionoideae*) 15. notes on *Indigofera*. *Blumea* 56:270-272.
- F.A Al-Ghamdi. 2011. "Seed Morphology of Some Species of *Indigofera* (*Fabaceae*) from Saudi Arabia (Identification of Species and Systematic Significance)". *Am J Pl Sci* 2:484-495.
- F.S . Marquiafavel, Ferreira MDS, Teixeira S. 2009. Novel reports of glands in Neotropical species of *Indigofera* L. (*Leguminosae, Papilionoideae*). *Flora* 204 :189–197
- F.J. Rohlf. 2004. *NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System 2.1 User Guide*. Department of Ecology and Evolution. State University of New York.
- F. Valladares, Niinemets U. 2007. The architecture of plant crown:from design rules to light capture and performance in F Pugnaire and F Valladares (Eds). *Functional plant ecology*. 116-119. Taylor and Francis. New York.
- H. Morlon, Schwikl DW, Bryant JA, Marquet PA, Rebelo AG, Tauss C, Bohannan BJM and Green JL. 2011. Spatial Patterns of Phylogenetic Diversity. *Ecology Letter* 14: 141-149.
- J.Felsenstein 1981. Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376 M. P. Brown and K. Austin, *The New Physique* (Publisher Name, Publisher City, 2005), pp. 25–30.
- J.J Doyle, Doyle JL, Ballinger JA, Dickson EE, Kajita T. and Ohashi H. 1997. A phylogeny of The Chloroplast Gene RBCL in The Leguminosae: Taxonomic Correlation and Insights into The Evolution of Nodulation. *American Journal of Botany* 84 (4): 541-554.
- J.M Hu, Lavin M. Wojciechowski MF, and Sanderson MJ. 2000. Phylogenetics of The Tribe *Millettieae* (*Leguminosae*) Based on Chloroplast TRNK/MATK Sequences and ITS Implications for Evolutionary Patterns in Papilionoideae. *American Journal of Botany* 87 (3): 418-430.
- J.V. Paulino, Groppo M. 2011. Floral Developmental Morphology of Tree *Indigofera* species (*Leguminosae*) and ITS Systematic significant within Papilionoideae. *Plant Syst Evol* 292:165-176.
- J.R.C. Vieira & de Souza IA. 2006. *Indigofera suffruticosa*: an Alternative Anticancer Therapy. <http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk>. Diakses 5 Pebruari 2010.
- Kornerup A & JH Wanscher. 1967. *Methuen Handbook of Colour*. Mathuen & Co Ltd. London

- M. P. Brown and K. Austin, *Appl. Phys. Letters* **85**, 2503–2504 (2004).
- M.K Gafar, Itodo AU, Attiku FA, Hassan AM, Peni IJ. 2011. “Proximate and Mineral Composition of the Leaves of Hairy Indigo (*Indigofera astragalina*)”. *Pakistan J Nut* 10(2):168-175.
- Muzzazinah & Suratman. 2010. Pemetakan Sumber Genetic Plasmanutfah Tumbuhan Tarum (*Indigofera* sp.) di Jawa Sebagai Upaya Pelestarian bahan Pewarna Alami Batik. *Laporan Penelitian*. Pusat Studi Biodiversitas dan Bioteknologi LPPM. UNS Surakarta.
- M.A .Rifai. 2011. *Asas-asas Sistematika Biologi*. Bogor. Herbarium Bogoriense.
- M. Sanjappa. 1985. “The Marga *Indigofera* L. (Fabaceae-Papilionaceae) In Burma”. *Reindwardtia* 10 (2): 211-244.
- M.G. Simpson. 2006. *Plant Systematics*. Elsevier Academic Press. California USA
- M.O. Soladoye, Sonibare MA, Chukwuma EC. 2010. Morphometric Study of the Genus *Indigofera* Linn. (*Leguminosae-Papilionoideae*) in South-Western Nigeria. *International Journal of Botany* 2010: 1-7.
- N.A Campbell, Reece JB, Mitchel LG. 2003. *Biologi*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- N. Tamiselvi, Dharmatharan R, Krishnamoorthy, Shivakumar. 2011. Anatomical Studies in *Indigofera asplathoides* Vahl (*Fabaceae*). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3 (2): 738-746.
- Topik Hidayat dan Adi Pancoro. 2000. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen* 4 (1): 35-40.
- P.G. Wilson., Rowe R. 2004. A Revision of the *Indigofereae* (*Fabaceae*) in Australia. 1. *Indigastrum* and the simple or unifoliolate species of *Indigofera*. *Telopea* 10(3):653-682.
- P.G. Wilson, Rowe R. 2008. A Revision of the *Indigofereae* (*Fabaceae*) in Australia. 2. *Indigofera* species with trifoliolate and alternately pinnate leaves. *Telopea* 12(2): 293–307.
- R. T. Wang, “Title of Chapter,” in *Classic Physiques*, edited by R. B. Hamil (Publisher Name, Publisher City, 1999), pp. 212–213.
- R. Geesink 1987. Theory of Classification of Organisms in De vogel EF (ed). *Manual of Herbarium Taxonomy Theory and Practice*. Unesco.
- S.L.Baldauf 2003. Phylogeny For The Faith Of Heart: a Tutorial. *Trend in Genetics* Vol.19 No. 6: 345-351.
- _____. 2008. An Overview of The Phylogeny and Diversity of Eucaryotes. *Journal of Sytematics and Evolution* 46 (3): 263-273.
- Tatik Chikmawati. 2012. Penggunaan Molekular Data Dalam Sistematika. *Diklat Kuliah*. Departemen Biologi. FMIPA IPB Bogor
- T.G Barraclough and Nee. 2001. Phylogenetics and speciation. *TRENDS in Ecology & Evolution* Vol. 16 No. 7: 391-399

- V.G Leite, Marquiavafe FS, Moraes DP, Teixeira SDP. 2009. Fruit anatomy of neotropical species of *Indigofera* (Leguminosae Papilionaceae) with functional and taxonomic implication. *J Torrey Botanical Society* 136(2):203-211.
- W.S Laitonjam and Wangkheirakpam SD. 2011. Comparative Study of The Major Components of the Indigo dye Obtained from *Strobilanthes flaccidifolius* Nees and *Indigofera tinctoria* Linn. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* Vol. 3 (7): 108-116
- Wu Ming Jou, Huang TC. 1995. A Palynological Study of The Genus *Indigofera* (Leguminosae) in Taiwan. *Grana* 34 (3): 160-181.

