

# **Analisis Filogenetik Molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) Menggunakan Urutan Basa DNA Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS)**

**Topik Hidayat, Diah Kusumawaty, Kusdianti, Dian Din Yati, Astry Agusthina Muchtar, dan Dina Mariana**

*Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung  
e-mail: topikhidayat@upi.edu*

Diterima 19 Februari 2008, disetujui untuk dipublikasi 11 Maret 2008

## **Abstrak**

Variasi urutan basa DNA daerah internal transcribed spacer (ITS) telah digunakan sebagai karakter molekuler untuk mengetahui hubungan filogenetik atau kekerabatan pada *Phyllanthus niruri* dan hubungan kekerabatan *Phyllanthus niruri* dengan jenis lainnya dalam famili Euphorbiaceae. Analisis filogenetik dari 19 sampel tumbuhan berdasarkan metode parsimoni menunjukkan bahwa secara keseluruhan famili Euphorbiaceae adalah kelompok monofiletik dan dibagi menjadi dua kelompok besar berdasarkan susunan daun tunggalnya; marga *Phyllanthus* adalah kelompok non-monofiletik, walaupun jenis *Phyllanthus niruri* merupakan kelompok monofiletik; klasifikasi mayor untuk *Phyllanthus niruri* L. pada tingkat DNA tidak mendukung sistem klasifikasi mayor sebelumnya; *Saoropus androgynus* memiliki hubungan filogenetik yang sangat dekat dengan *Phyllanthus niruri*.

**Kata kunci:** Daerah ITS, Euphorbiaceae, Filogenetik Molekuler, *Phyllanthus niruri* L.

## **Abstract**

Variation of DNA sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region has been used as a molecular character to understand the phylogenetic relationships within different strains of *Phyllanthus niruri* and with other species belonging to family Euphorbiaceae. Phylogenetic analysis of 19 plant samples using parsimony method revealed several findings: as a whole family, Euphorbiaceae is a monophyletic group and the family is divided into two major clades based upon its single leaf arrangement; genus *Phyllanthus* is a non-monophyletic group, though species *Phyllanthus niruri* is a monophyletic group; major classification system of *Phyllanthus niruri* at the molecular level does not support previous major classification; *Saoropus androgynus* is closely related with *Phyllanthus niruri*.

**Keywords:** ITS region, Euphorbiaceae, Molecular Phylogenetics, *Phyllanthus niruri* L.

## **1. Pendahuluan**

*Phyllanthus niruri* L. (meniran), yang dikenal oleh masyarakat Indonesia khususnya sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan diare, sariawan, kencing batu, malaria dan peluruhan air seni (diuretikum), merupakan salah satu kelompok tumbuhan besar dan beraneka ragam dalam morfologinya dan belum menjadi obyek penelitian dalam bidang filogenetik molekuler. Meniran merupakan tumbuhan terna, berumah satu dan bunganya berkelamin tunggal, batang tumbuh tegak mencapai 100 cm dengan warna yang bervariasi, antera memecah secara horizontal, dan berbuah licin. Distribusi tumbuhan ini sangat luas meliputi Asia, Australia, Amerika, dan Afrika (Unander *et al.*, 1991). Tumbuhan ini tumbuh liar di tempat terbuka (misalnya di pantai, ladang, dan tepi sungai) pada ketinggian mulai dari satu sampai 1000 m dpl (Backer and van den Brink, 1963).

Meskipun karakteristik jenis ini secara morfologi sudah jelas (Backer and van den Brink, 1963), tetapi hubungan filogenetik atau kekerabatan di dalam

jenis (*intraspecies*) dan kekerabatannya dengan jenis-jenis lainnya (*interspecies*) di dalam famili Euphorbiaceae masih belum terselesaikan karena keanekaragaman morfologi anggota-anggotanya, misalnya, warna batang/cabang, bentuk daun, dan pola percabangan. Satu sistem klasifikasi yang tersedia saat ini adalah sistem yang diusulkan oleh Hadad *et al.* (1993). Sistem ini membagi meniran menjadi tiga kelompok berdasarkan karakter morfologi warna batang dan cabang, yaitu meniran merah, meniran kuning, dan meniran hijau. Tetapi karakter warna batang cenderung sangat dipengaruhi oleh lingkungan (West and Faith, 1990).

Karena kelemahan karakter morfologi inilah, data yang diperoleh dari urutan basa DNA digunakan untuk membangun hubungan filogenetik. Karakter DNA diketahui relatif lebih konsisten dibandingkan karakter morfologi (Moritz and Hillis, 1996; Hidayat, 2005). Dalam penelitian ini, analisis filogenetik dilakukan menggunakan karakter DNA, yaitu urutan nukleotida daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*), untuk

menyediakan bukti lain mengenai (1) hubungan filogenetik antarindividu di dalam *Phyllanthus niruri*, dan (2) hubungan filogenetik *Phyllanthus niruri* dengan jenis-jenis lainnya di dalam famili Euphorbiaceae. Beberapa tahun ke belakang, daerah ITS sering digunakan para ahli untuk analisis filogenetik molekuler pada tumbuhan dalam rangka memahami keanekaragaman dan menjawab beberapa masalah filogenetik. Hal ini karena daerah ITS memiliki karakteristik unggul, diantaranya, yaitu berukuran kecil (kurang lebih 700 pasang basa) dan memiliki salinan yang banyak di dalam genom inti (Baldwin *et al.*, 1995). Karakteristik ini menyebabkan daerah ITS mudah untuk diisolasi, diamplifikasi, dan dianalisis.

## 2. Metode

### 2.1 Bahan Tanaman

Sebanyak 19 sampel tumbuhan yang terdiri dari 16 sampel anggota famili Euphorbiaceae dan tiga sampel *outgroup*, digunakan dalam penelitian ini. Sampel tumbuhan umumnya dikoleksi dari berbagai

tempat di Bandung dan sekitarnya. Tiga kelompok jenis *Phyllanthus niruri* (merah, kuning, dan hijau) masing-masing diwakili oleh dua-tiga individu. Jenis tumbuhan dari famili Fabaceae, Rosaceae dan Cucurbitaceae dipilih sebagai *outgroup*. Pemilihan ketiga famili tersebut sebagai *outgroup* didasarkan kepada penelitian sebelumnya bahwa ketiganya merupakan *sister group* untuk famili Euphorbiaceae (APG, 2003). Tabel 1 menyediakan informasi lengkap mengenai sampel tumbuhan yang digunakan.

### 2.2 Penyiapan DNA genom

DNA genom diekstraksi dari bahan segar (berupa daun muda atau bunga) atau yang dikeringkan dalam *silica gel* dengan menggunakan metode CTAB (*Cationichexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (Porebski *et al.*, 1997) yang telah sedikit dimodifikasi. Hasil isolasi DNA dicampur dan dipresipitasi ulang agar diperoleh DNA dengan konsentrasi dan kemurnian yang lebih tinggi. DNA yang terlarut dalam TE disimpan pada suhu -20 °C untuk digunakan sebagai stok.

**Tabel 1.** Bahan tumbuhan yang digunakan

Famili	Jenis	Nama Lokal	Accession Number**
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus niruri</i> L	Meniran Merah 1	AB441765
		Meniran Merah 2	AB441766
		Meniran Merah 7	AB441769
		Meniran Kuning 6	AB441768
		Meniran Kuning 8	AB441771
		Meniran Hijau 4	AB441767
		Meniran Hijau 5	AB441770
		<i>Phyllanthus acidus</i> (L.) Skeels	Cerme
	<i>Codiaeum variegatum</i> (L.) A. Juss	Puring	AB441764
	<i>Sauropus androgynus</i> (L.) Merr.	Katuk	AB441757
	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Singkong	AB441756
	<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd.) Muell.	Karet	AB441762
	<i>Antidesma bunius</i> (L.) Spreng.	Buni	AB441763
	<i>Ricinus communis</i> L.	Jarak/Kaliki	AB441761
	<i>Claoxylon polot</i> (Burm.) Merr.	Talingkup	AB441759
	<i>Aleurites moluccana</i> (L.) Willd.	Kemiri	AB441753
Fabaceae	<i>Erythrina crista-galli</i> L. *	Dadap	AB441760
Rosaceae	<i>Pyrus communis</i> L. *	Pir	AB441755
Cucurbitaceae	<i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw. *	Labusiam	AB441754

### 2.3 Amplifikasi daerah ITS

Amplifikasi daerah ITS yang dilakukan mengacu pada Hidayat dan Pancoro (2001) dengan menggunakan satu pasang primer, ITS4 (5'-CCCGCCTGACCTGGGGTCGC-3') sebagai *reverse primer* dan ITS5 (5'-TAGAGGAAGGA GAAGTCGTAACAA-3') sebagai *forward primer*. Dengan menggunakan *Taq* polimerase (Fermentas), amplifikasi dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 2 menit (1 siklus); selanjutnya 35 siklus

yang terdiri dari denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 57 °C selama 2 menit, dan pemanjangan (*extension*) pada suhu 71 °C selama 2 menit; dan diakhiri oleh 1 siklus untuk melengkapi proses pemanjangan (*complete extension*) pada suhu 71 °C selama 10 menit.

### 2.4 Penentuan urutan basa DNA

Penentuan urutan basa DNA terhadap 19 produk amplifikasi (*Direct Sequencing*) dilakukan di

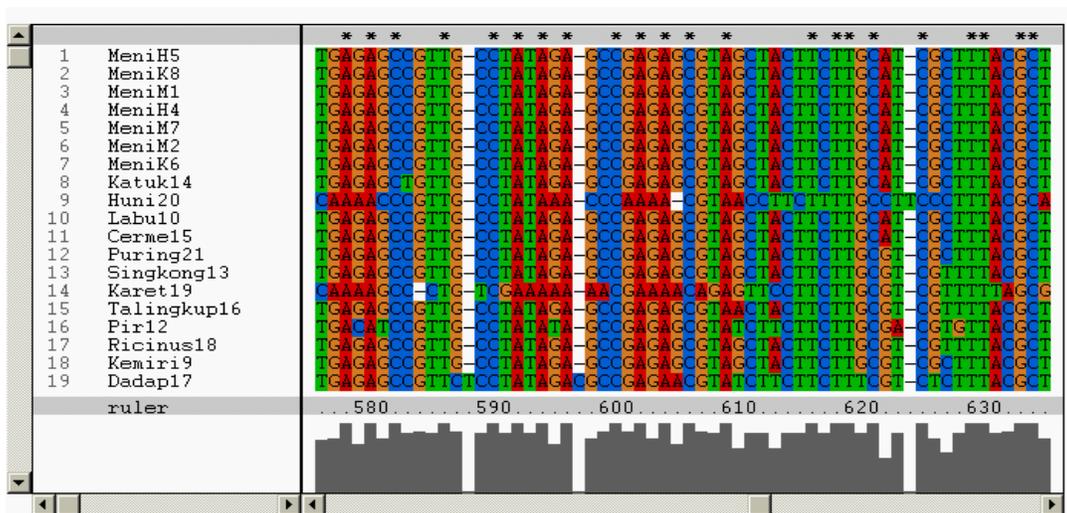
Macrogen, Korea Selatan. Penentuan urutan basa dilakukan dua arah menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5 dengan menggunakan mesin otomatis ABI377A dan pewarnaan dengan kit ABI PRISM™ Dye Terminator (Perkin Elmer).

Urutan basa DNA yang diperoleh dari daerah ITS disejajarkan dengan menggunakan program komputer ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Analisis filogenetik berdasarkan metode parsimoni dilakukan dengan menggunakan program komputer PAUP versi 4.0b10 (Swofford, 1998). Insersi dan delesi diperlakukan sebagai data yang hilang. Semua karakter diberi bobot yang sama (Fitch, 1971). Semua data set dianalisis dengan *heuristic search method* dan *tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping*. *Random addition sequence* dengan *stepwise addition option* dilakukan sebanyak 10 ulangan. Semua pohon filogenetik yang terbentuk disimpan. Evaluasi pohon dilakukan dengan menggunakan analisis *bootstrap*

(Felsenstein, 1985) sebanyak 1000 ulangan. Indeks konsistensi (CI) dan indeks retensi (RI) dihitung untuk pohon konsensus.

### 3. Hasil

Langkah pertama dalam analisis filogenetik adalah melakukan penjajaran (*alignment*) dengan menggunakan program komputer ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Penjajaran dilakukan dengan tujuan untuk menentukan tingkat homologi dari urutan basa DNA yang dianalisis. Hasil penjajaran menunjukkan tingkat homologi yang tinggi diantara sampel-sampel yang diteliti. Karena sifat ITS-1 dan ITS-2 yang variatif, dalam penjajaran ini muncul *gap* (ditandai oleh garis putus-putus). Adanya *gap* ini menunjukkan terjadinya proses mutasi yang tinggi baik itu berupa insersi maupun delesi (Gambar 1).



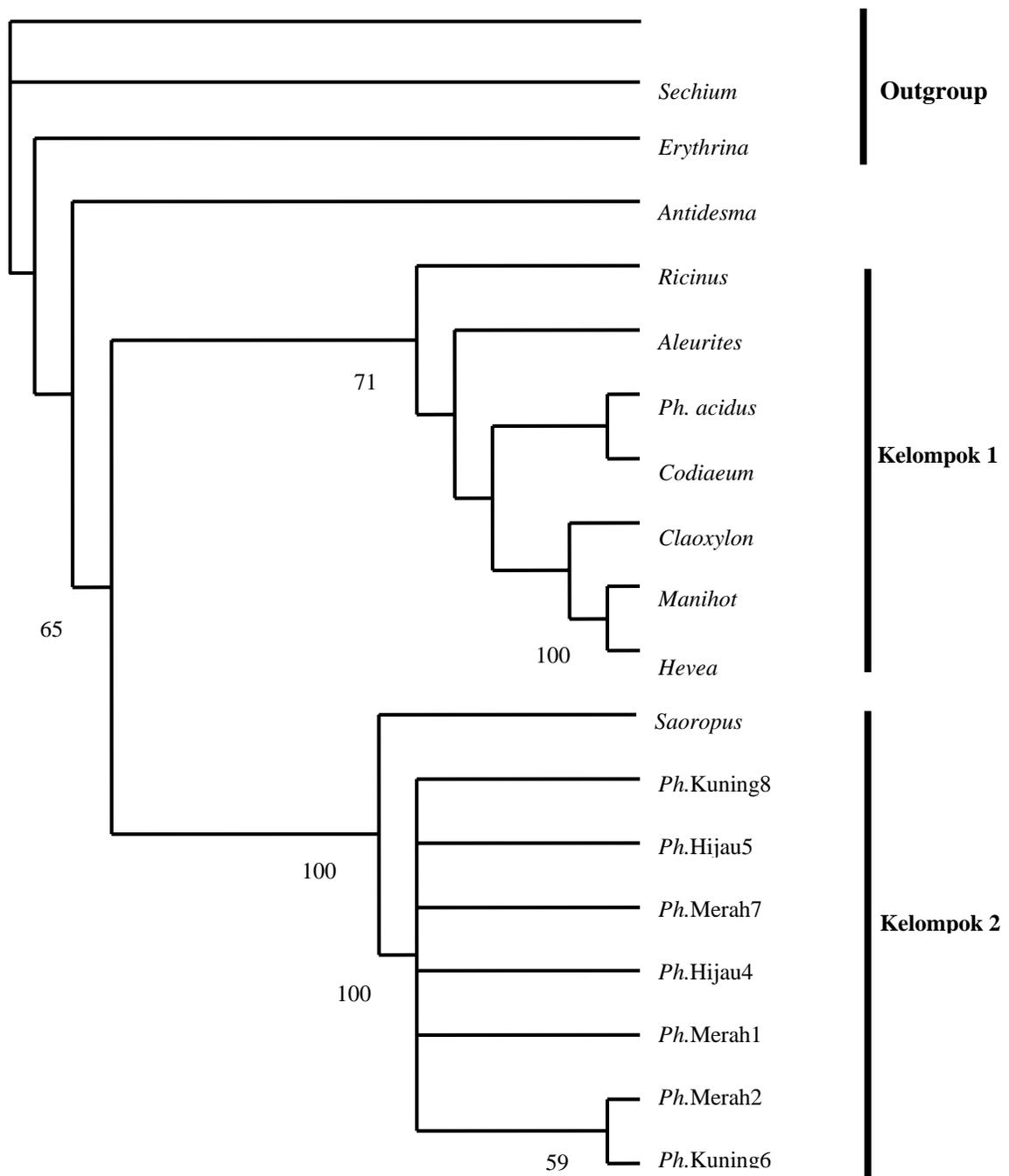
**Gambar 1.** Proses penjajaran dengan program ClustalX. *Gap* menunjukkan insersi dan delesi. Tanda (\*) menunjukkan tingkat homologi.

Dari hasil penjajaran urutan basa DNA daerah ITS diperoleh 645 karakter, yang meliputi 103 karakter bersifat konstan, 206 karakter bersifat tidak informatif, dan 336 karakter bersifat sangat informatif. Selanjutnya karakter-karakter ini dianalisis dengan menggunakan program PAUP untuk merekonstruksi pohon filogenetik. Hasil analisis berdasarkan kriteria parsimoni diperoleh 572 pohon filogenetik, dengan nilai indeks konsistensi (CI)= 0,638 dan indeks retensi (RI)= 0,455. Nilai CI dan RI di atas menunjukkan konsistensi dan resolusi yang cukup tinggi dari pohon filogenetik yang dihasilkan (Swofford, 1998). Gambar 2 merupakan pohon konsensus dari 572 pohon yang terbentuk.

### 4. Diskusi

#### 4.1 Hubungan filogenetik famili Euphorbiaceae

Satu pertanyaan yang mendasar adalah apakah famili Euphorbiaceae merupakan kelompok monofiletik? Pertanyaan ini muncul karena marga *Antidesma* berada di luar kelompok besar famili Euphorbiaceae (Gambar 2). Dengan perkataan lain bahwa posisi filogenetik *Antidesma* belum jelas. Dalam banyak analisis filogenetik molekuler pada tumbuhan Angiospermae, penambahan sampel tumbuhan dapat menyelesaikan masalah filogenetik seperti ini (Clegg and Durbin, 1990). Namun demikian, tanpa *Antidesma*, untuk sementara dapat dinyatakan bahwa famili Euphorbiaceae merupakan kelompok monofiletik.



**Gambar 2.** Pohon filogenetik famili Euphorbiaceae berdasarkan urutan basa DNA daerah ITS. Angka pada cabang menunjukkan nilai *bootstrap*.

Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa sampel tumbuhan Euphorbiaceae yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua kelompok besar, yaitu kelompok 1 dengan dukungan nilai *bootstrap* yang cukup besar, yaitu sebesar 71 dan kelompok 2 dengan nilai *bootstrap* sangat tinggi, yaitu 100. Hasil yang mengejutkan ini ternyata didukung oleh karakter morfologi daun. Susunan daun tunggal yang mirip daun majemuk merupakan karakter bersama (*synapomorphic*

*character*) yang dimiliki oleh kelompok 2, sedangkan kelompok 1 memiliki karakter bersama daun tunggal sejati, kecuali *Phyllanthus acidus*.

#### 4.2 Hubungan filogenetik marga *Phyllanthus*

Marga ini menurut Backer and van den Brink (1963) memiliki ciri khas pada perbungaannya yang uniseksual, yang terletak pada setiap ketiak daun

tunggalnya. Tetapi, secara mengejutkan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa marga *Phyllanthus* bukan merupakan kelompok monofiletik. Dua jenis dari marga ini terpisah dalam kelompok yang berbeda: *Phyllanthus acidus* berada dalam kelompok 1, sedangkan *Phyllanthus niruri* dalam kelompok 2 (Gambar 2). Jika dilihat dari habitusnya, kedua jenis ini berbeda: *Phyllanthus acidus* merupakan tumbuhan pohon, tetapi *Phyllanthus niruri* adalah herba (Backer and van den Brink, 1963).

Berdasarkan anatomi stomata, kedua jenis ini pun berbeda. *Phyllanthus acidus* memiliki penyebaran stomata yang hipostomatik (keberadaannya hanya pada sisi bawah daun yang tidak terdedah sinar matahari) dan densitasnya tidak padat (rata-rata 12,53 buah per mm<sup>2</sup>). Sebaliknya, stomata pada *Phyllanthus niruri* bersifat amfistomatik (terdapat baik pada sisi bawah maupun atas daun) dan densitasnya sangat padat di sisi bawah daun (rata-rata 48,08 buah per mm<sup>2</sup>).

Meskipun organ vegetatif relatif lebih tidak konsisten dibandingkan organ reproduksi (bunga), tetapi dalam beberapa kelompok tumbuhan, organ vegetatif sangat penting dalam taksonomi, misalnya pada anggrek (van den Berg *et al.*, 2000; Pridgeon *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001; Cameron, 2005; Hidayat, 2005). Penelitian lanjut yang lebih rinci untuk memastikan posisi atau status filogenetik *Phyllanthus acidus* dengan melibatkan sampling yang banyak dan menggunakan karakter-karakter yang lain sangat diperlukan. Status filogenetik penting sebagai dasar atau acuan apakah perlu dilakukan perubahan nama taksonomik (*nomenclature change*) atau tidak.

#### 4.3 Hubungan filogenetik *Phyllanthus niruri*

Berdasarkan pohon filogenetik pada Gambar 2, *Phyllanthus niruri* merupakan kelompok monofiletik. Bersama-sama dengan *Saoropus*, *Phyllanthus niruri* membentuk kelompok. Dalam kasus ini, *Saoropus* bertindak sebagai *sister group*, yaitu jenis yang sangat erat kekerabatannya.

Satu-satunya sistem klasifikasi mayor yang tersedia saat ini untuk *Phyllanthus niruri* adalah sistem yang diusulkan oleh Hadad *et al.* (1993). Sistem ini membagi *Phyllanthus niruri* menjadi tiga kelompok berdasarkan warna batang: (1) Meniran merah, (2) Meniran kuning, dan (3) Meniran hijau. Tetapi, hasil penelitian ini tidak mendukung sistem klasifikasi Hadad. Seperti yang dapat dilihat pada Gambar 2, *Phyllanthus niruri* tidak mengelompok berdasarkan warna batangnya. Alasan yang dapat diajukan dalam kasus ini adalah bahwa karakter warna batang secara taksonomik tidak konsisten, sangat dipengaruhi lingkungan di mana mereka biasa tumbuh. Dengan kata lain, karakter warna batang bersifat plastis. Plastisitas pada tumbuhan lebih umum terjadi pada organ vegetatif

dibandingkan organ reproduksi (Evans, 1975; Pigliucci, 1996).

#### 4.4 Implikasi taksonomik

Hasil menunjukkan bahwa anggota-anggota famili Euphorbiaceae yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi dua kelompok besar berdasarkan susunan daun tunggalnya. Tentu saja untuk mengusulkan suatu sistem klasifikasi yang baru diperlukan sampling yang banyak dengan melibatkan berbagai macam karakter. Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan sangat terbatas, sehingga terlalu dini untuk mengusulkan suatu sistem klasifikasi. Meskipun demikian, hasil ini dapat dipakai sebagai landasan yang kuat untuk mengembangkan sebuah sistem klasifikasi. Tidak diragukan, klasifikasi berbasis DNA ini dipercaya menghasilkan sistem yang alami dan akurat, karena DNA merupakan unit dasar informasi yang mengkode organisme (Hillis *et al.*, 1996).

#### 4.5 Meniran vs Katuk

Meniran sangat bermanfaat sebagai obat tradisional (Subarnas dan Sidik, 1993). Bahkan, penelitian terakhir menyebutkan bahwa tumbuhan ini berkhasiat sebagai imuno-modulator. Pola alami yang dihasilkan dari kajian filogenetik dapat dipakai sebagai landasan untuk membuat prediksi sifat-sifat organisme yang belum teramati. Seperti telah dijelaskan di atas bahwa meniran (*Phyllanthus niruri*) dan katuk (*Saoropus androgynus*) berkerabat sangat dekat, berasal dari satu nenek moyang yang sama (monofiletik). Hal ini menunjukkan bahwa pola genetik dan sifat-sifat biokimia keduanya mirip. Ini berimplikasi kuat bagi penemuan senyawa yang bertindak sebagai agen imunomodulator dari tumbuhan selain meniran. Dari hasil penelitian ini katuk diprediksi kuat mengandung senyawa imunomodulator, seperti halnya meniran.

### 5. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa famili Euphorbiaceae pada umumnya dan jenis *Phyllanthus niruri* khususnya merupakan kelompok tumbuhan yang sangat kompleks sehingga merupakan obyek yang menarik untuk diteliti lebih lanjut. Posisi atau status filogenetik dari beberapa jenis (*Phyllanthus acidus* dan *Antidesma bunius*) masih belum jelas. Secara mengejutkan penelitian ini tidak mendukung sistem klasifikasi Hadad *et al.*, (1993) untuk *Phyllanthus niruri*. Analisis filogenetik lanjutan dengan memperbanyak sampel tumbuhan dan menambah penanda molekuler yang lain perlu dilakukan di masa yang akan datang untuk mengembangkan sebuah sistem klasifikasi baru berbasis DNA yang lebih baik lagi.

## Ucapan Terimakasih

Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Fundamental DIKTI-DIKNAS (No. 032/SP2H/PP/DP2M/III/2007, tanggal 31 Desember 2006). Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada R. Deden Juansah atas bantuan pemeliharaan alat dan bahan.

## Daftar Pustaka

- APG (Angiospermae Phylogeny Group), 2003, An Update of the Angiospermae Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II., *Bot. J. Linn. Soc.*, **141**, 399-436.
- Backer, C. A. and R. C. N. van den Brink, 1963, *Flora of Java: Volume I*. NVP Noordhoff, Groningen, The Netherlands.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue, 1995, The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: a Valuable Sources of Evidence on Angiospermae Phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **82**, 247-277.
- van den Berg, C., W. E. Higgins, R. L. Dressler, W. M. Whitten, M. A. Soto-Arenas, A. Culham, and M. W. Chase, 2000, A Phylogenetic Analysis of Laeliinae (Orchidaceae) Based on Sequence Data from Internal Transcribed Spacers (ITS) of Nuclear Ribosomal DNA, *Lindleyana*, **15**, 96-114.
- Cameron, K. M., 2005, Leave it to the Leaves: a Molecular Phylogenetic Study of Malaxideae (Epidendroideae, Orchidaceae), *Am. J. Bot.*, **92**, 1025-1032.
- Clegg, M. T. and M. L. Durbin, 1990, Molecular Approaches to the Study of Plant Biosystematics, *Australian Syst. Bot.*, **3**, 1-8
- Evans, L. T., The Physiological Basis of Crop Yield, in Evans, L. T., (Ed), 1975, *Some case histories*, Cambridge University Press, London, 327-550.
- Felsenstein, J., 1985, Confidence Limit on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap, *Evolution*, **39**, 783-791.
- Fitch, W. M., 1971, Toward Defining the Course of Evolution: Minimum Change for a Specific Tree Topology, *Syst. Zool.*, **20**, 406-416.
- Hadad, M. E. A., O. Udin, N. S. D. Bermawie, dan Taryono, 1993, Keragaman Meniran di Kebun Percobaan Sukamulia Balitro. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, **4**, 20-21.
- Hidayat, T. dan A. Pancoro, 2001, Studi Filogenetik Molekuler Anacardiaceae Berdasarkan pada Variasi Urutan Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS), *Hayati*, **8**, 98-101.
- Hidayat, T., 2005, *Systematic study of Subtribe Aeridinae (Orchidaceae)*, PhD Thesis, The University of Tokyo, Japan.
- Hillis, D. M., C. Moritz, and B. K. Mable, 1996, *Molecular Systematic*, 2<sup>nd</sup> ed., Sinauer Associates Inc, Massachussetts.
- Moritz, C. and D. M. Hillis, *Molecular Stematics: Context and Controversies*, in Hillis, D. M., C. Moritz, and B. K. Mable, [Eds.], 1996, *Molecular Systematics*, 2<sup>nd</sup> ed, Sinauer Associate, Sunderland, 1-13.
- Pigliucci, M., 1996, How Organisms Respond to Environmental Changes: from Phenotypes to Molecules (and Vice Versa), *TREE*, **4**, 168-173
- Porebski, S., L. G. Bailey, and B. R. Baum, 1997, Modification of CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components, *Plant Mol. Biol. Rep.*, **15**, 8-15.
- Pridgeon, A. M., R. Solano, and M. W. Chase, 2001, Phylogenetic Relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): Combined Evidence from Nuclear and Plastid DNA Sequences, *Am. J. Bot.*, **88**, 2286-2308.
- Subarnas, A dan Sidik, 1993, *Phyllanthus niruri* L., Kimia, Farmokalogi, dan Penggunaannya sebagai Obat Tradisional, *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, **4**, 13-18.
- Swofford, D. L., 1998, *PAUP\*4.0b10. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other Methods)*, Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets, USA.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins, 1997, The ClustalX-Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Alignment through Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools, *Nuc. Acids Res.*, **25**, 4876-4882.
- Unander, D. W., G. L. Webster, and B. S. Blomberg, 1991, Uses and Bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbaiceae): A Compilation II. The subgenus *Phyllanthus*, *J Ethnopharmacology*, **34**, 97-133.
- West, J. G. and D. P. Faith, 1990, Data, Methods and Assumption in Phylogenetic Inference. *Australian Syst. Bot.*, **3**, 9-20.
- Williams, N. H., M. W. Chase, T. Fulcher, and W. M. Whitten, 2001, Molecular Systematics of the Oncidiinae Based on Evidence from Four DNA Sequence Regions: Expanded Circumscriptions of *Cyrtorchilum*, *Erycina*, *Otoglossum*, and *Trichocentrum* and A New Genus (Orchidaceae), *Lindleyana*, **16**, 113-139.