

Rotala rotundifolia (Buch.-Ham. ex Roxb.) KOEHNE, A NEW RECORD OF AQUATIC ALIEN FLORA IN JAVA

Rotala rotundifolia (Buch.-Ham. ex Roxb.) KOEHNE, REKAMAN BARU TUMBUHAN ASING AKUATIK DI JAWA

Muhammad Rifqi Hariri¹, Inggar Damayanti^{2*}, Arifin Surya Dwipa Irsyam³, Zakaria Al Anshori⁴, Rina Ratnasih, Irwanto⁵, Melza Mulyani⁶, Sahromi⁶, Esthi Liani Agustiani¹

¹ Biosystematics and Evolution Research Center, National Research and Innovation Agency, Cibinong, Bogor, Indonesia

² Department of Forestry, Faculty of Agriculture, University of Lampung, Bandar Lampung, Indonesia

³ Herbarium Bandungense (FIPIA), School of Life Sciences and Technology (SITH), Bandung Institute of Technology, Sumedang, Indonesia

⁴ Forest Ecology Laboratory, Faculty of Forestry, IPB University, Bogor, Indonesia

⁵ School of Life Sciences and Technology (SITH), Bandung Institute of Technology, Indonesia

⁶ Center for Applied Botanical Research, National Research and Innovation Agency, Indonesia

*Corresponding Author. E-mail address: inggar.damayanti@fp.unila.ac.id

ARTICLE HISTORY:

Received: 08 April 2023

Peer Review: 31 January 2024

Accepted: 31 October 2024

KEYWORDS:

Alien flora, DNA barcoding, Lythraceae, nuclear DNA region, West Java.

ABSTRACT

Rotala is a genus of freshwater plants belonging to the family Lythraceae. During botanical surveys conducted in April, a previously unreported *Rotala* species was observed naturalizing in Parakan Village, Bogor Province, Java. Morphological analysis identified the species as *Rotala rotundifolia*, a plant native to India and temperate East Asia. This study provides the first confirmed record of *R. rotundifolia* in Java and integrates DNA barcoding to support morphological identification. We used the Internal Transcribed Spacer (ITS) region as a molecular marker, successfully amplifying a 826 bp nucleotide sequence. Phylogenetic analysis using the NCBI database, with *Heimia apetala* as an outgroup, revealed a 99.97% sequence similarity between the collected specimen and reference sequences of *R. rotundifolia*. The resulting phylogenetic tree firmly places the Java specimen within the *R. rotundifolia* clade, confirming its taxonomic identity. The discovery of *R. rotundifolia* as an alien and naturalized species in Java highlights the need for early detection of non-native aquatic flora, which may pose ecological risks if left unmanaged. The integration of molecular and morphological approaches enhances species identification accuracy and contributes to regional floristic documentation. This finding expands the known distribution range of *R. rotundifolia* and underscores the importance of combining DNA barcoding with field taxonomy in biodiversity and invasive species monitoring.

ABSTRAK

Rotala merupakan salah satu marga tumbuhan gulma air yang termasuk dalam suku Lythraceae. Eksplorasi botani yang dilakukan pada April mengungkap adanya satu jenis *Rotala* yang tumbuh meliar dan ternaturalisasi di Desa Parakan, Kabupaten Bogor. Identifikasi morfologi menunjukkan bahwa jenis tersebut merupakan *Rotala rotundifolia*. Jenis ini memiliki distribusi alami dari India ke wilayah beriklim sedang di Asia Timur. Penelitian ini bertujuan untuk melaporkan keberadaan *R. rotundifolia* untuk pertama kalinya di Jawa dan menyediakan sekuen ITS untuk tujuan mendukung hasil identifikasi morfologi. Kami menggunakan wilayah ITS untuk DNA barcode dan berhasil diamplifikasi sebanyak 826 bp nukleotida. Database NCBI digunakan untuk membedakan *R. rotundifolia* dengan jenis *Rotala* lainnya serta penggunaan *Heimia apetala* sebagai outgroup. Hasil konstruksi pohon filogenetik dengan jelas menunjukkan bahwa jenis *Rotala* yang ditemukan tumbuh meliar dan ternaturalisasi di Desa Parakan merupakan *Rotala rotundifolia* dengan tingkat kemiripan sekuen sebesar 99,97%. Pendekatan molekuler melalui DNA barcode dapat membantu proses identifikasi tumbuhan sehingga mampu memperkuat determinasi jenis melalui morfologi secara tepat dan lebih efisien.

KATA KUNCI:

DNA barcoding, DNA region inti, Jawa Barat, Lythraceae, tumbuhan asing.

1. PENDAHULUAN

Rotala L. (Lythraceae) memiliki distribusi tropis dan subtropis dan diwakili oleh 72 jenis di seluruh dunia (POWO, 2022), dengan distribusi paling signifikan di Asia Tropis (Cook, 1979). Menurut perkiraan yang direvisi, di India diwakili oleh 29 jenis, 24 di antaranya berasal dari Semenanjung India (Joseph & Sivarajan, 1988; Joseph & Sivarajan, 1989; Pradeep et al., 1990; Mathew & Lakshminarasimhan, 1990; Yadav et al., 2020; Prasad & Raveendran, 2013a; Gaikwad et al., 2014; Prasad & Raveendran, 2013b; Sunil et al., 2013; Anto et al., 2014; Narayan et al., 2014; Lemiya & Pradeep, 2015). Pada bulan April 2022, tim penulis telah mengoleksi spesimen *Rotala* yang menarik dari substrat berlumpur dari area persawahan di bawah kaki Gunung Salak di Desa Parakan. Secara morfologi, spesimen tersebut menunjukkan perbedaan ciri dibandingkan dengan jenis *Rotala* lainnya yang ada di Jawa. Oleh sebab itu, spesimen *Rotala* perlu divalidasi secara morfologi dan molekuler untuk mendapatkan identitas yang tepat.

Urutan barcode DNA sering menggunakan teknik molekuler untuk menentukan tingkat jenis. Identifikasi jenis tumbuhan dapat dilakukan menggunakan genom plastida atau nucleus yang dikenal sebagai DNA barcode universal. Beberapa contoh region yang umum digunakan adalah *rbcl*, *matK*, *trnH-psbA* intergenic spacer, dan internal transcribed spacer (ITS) (CBOL, 2009; Li, 2012; Samsudin et al., 2012; Olivar et al., 2014; Balkanska et al., 2020). Region ITS telah diuji sebagai sistem DNA barcode dan menghasilkan karakter yang lebih bervariasi dan informatif serta divergensi intra dan interspesifik yang lebih besar. Urutan region ITS juga menunjukkan tingkat diskriminasi jenis dan universalitas primer tertinggi (Rønsted et al., 2008; Li et al., 2012).

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Pengamatan Morfologi

Spesimen *Rotala* sp. diamati dan disimpan di Herbarium Bandungense (FIPIA), Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Pengamatan ciri morfologi mengacu pada de Wilde & Duyfjes (2016). Ciri yang diamati pada spesimen *Rotala* sp. yaitu perawakan, arah tumbuh batang, kedudukan daun, tipe perbungaan, bentuk helaian daun tenggelam dan daun aerial, bentuk daun kelopak bunga, bentuk daun mahkota bunga, dan warna bunga. Spesimen *Rotala* selanjutnya diidentifikasi menggunakan Burks et al., (2003), Bhowmik et al., (2012), dan de Wilde & Duyfjes (2016).

2.2 Ekstraksi, Amplifikasi dan Sekuensing DNA

Sampel yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah daun *R. rotundifolia* yang segar dan bebas dari penyakit. Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengikuti protokol standar Plant Genomic DNA Kit (Tiangen Biotech Co., Ltd., Beijing). DNA *R. rotundifolia* diamplifikasi menggunakan primer ITS mengikuti Sun et al., (1994). Amplifikasi region ITS dilakukan mengikuti profil PCR: denaturasi pada 95 °C selama 3 menit, sebanyak 35 siklus denaturasi pada 95°C selama 30 detik, annealing pada 58 °C selama 45 detik, ekstensi pada 72 °C selama 45 detik, serta post-ekstensi pada 72°C selama 5 min. Produk PCR dimigrasikan pada 1% gel agarosa yang telah diberi pewarna GelRed. Pita DNA diamati dan didokumentasikan menggunakan UV trans-illuminator GelDoc (BioRad). Proses sekuensing dilakukan di 1st Base, Singapura, melalui jasa PT Genetika Science Indonesia.

2.3 Penyuntingan Sekuen dan Konstruksi Pohon Filogenetik

Sekuen *contig* dibentuk dengan menyelaraskan sekuen dari sekuen *forward* dan *reverse* menggunakan metode Clustal W (Hung & Weng 2016). Selanjutnya, sekuen *contig* diunggah dalam laman Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) untuk mengetahui tingkat kemiripan sampel dengan sekuen database di NCBI. Beberapa sekuen *Rotala*

yang muncul dari hasil BLAST diunduh untuk digunakan dalam konstruksi pohon filogenetik. Selain itu, sekuen jenis *Heimia apetala* juga diunduh sebagai outgrup.

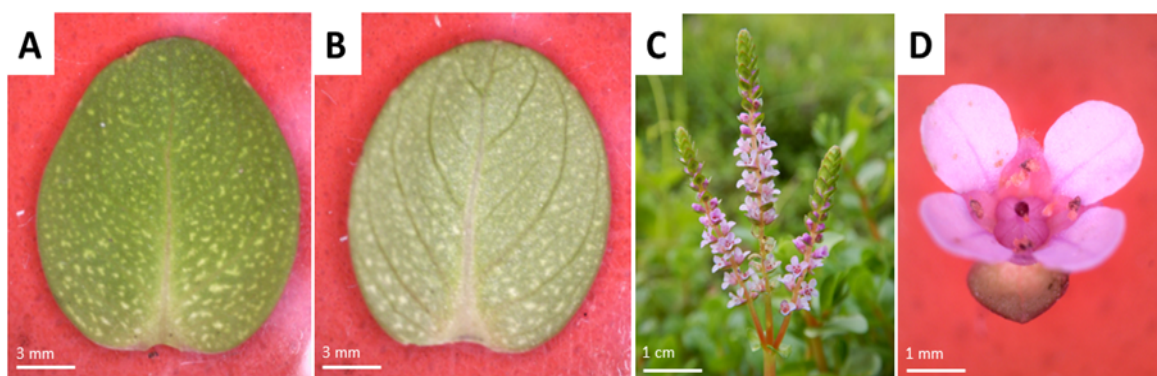
Konstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan metode *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987) berdasarkan parameter Tamura 3 (Tamura, 1992) dan 1000 kali bootstrap (Felsenstein, 1985). Laju variasi setiap situs basa nukleotida dihitung mengikuti model distribusi gamma (parameter bentuk=5). Seluruh analisis dikerjakan menggunakan perangkat lunak MEGA11 (Tamura et al., 2021).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

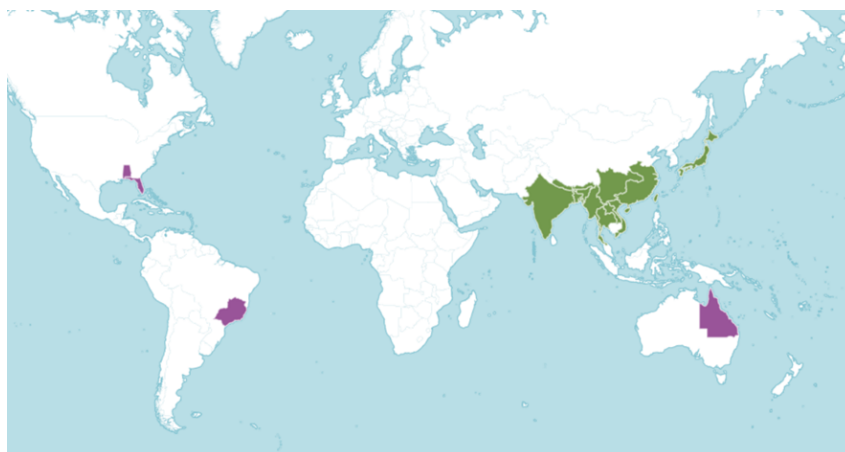
Marga *Rotala* merupakan tumbuhan terna yang berasal dari suku Lythraceae. Sebanyak empat jenis *Rotala* telah terekam dari Pulau Jawa, yaitu *R. hexandra* Koehne, *R. indica* (Willd.) Koehne, *R. mexicana* Schltdl. & Cham., dan *R. rosea* (Poir.) C.D.K.Cook (de Wilde & Duyfjes, 2016). Berdasarkan hasil identifikasi secara morfologi, *Rotala* yang dikoleksi dari Parakan, Kabupaten Bogor, yaitu *R. rotundifolia* (Buch.-Ham. ex Roxb.) Koehne. Keberadaan populasi meliarnya di Pulau Jawa dilaporkan untuk pertama kalinya melalui penelitian ini. Dengan demikian, *R. rotundifolia* dari Parakan telah ditetapkan sebagai sebuah rekaman baru tumbuhan asing ternaturalisasi untuk Flora Jawa. Temuan ini menambah jumlah jenis *Rotala* di Jawa menjadi 5 jenis. Deskripsi *R. rotundifolia* dijabarkan sebagai berikut.

3.1 Perlakuan Taksonomi *Rotala rotundifolia* (Buch.-Ham. ex Roxb.) Koehne, Bot. Jahrb. Syst. 1(2): 175 (1880).

Perlakuan Taksonomi *Rotala rotundifolia* (Buch.-Ham. ex Roxb.) Koehne, Bot. Jahrb. Syst. 1(2): 175 (1880) terdapat pada Gambar 1. Terna, akuatik atau terestrial, merayap, gundul. Batang menyegi empat, hijau atau kemerahan. Daun tunggal, berhadapan bersilangan; daun duduk atau bertangkai pendek; helaian daun membundar atau membundar telur-menjorong, 5–15 × 3,5–13 mm, pangkal menumpul, tepi rata, ujung membundar, gundul, permukaan adaksial dan abaksial daun hijau muda mengilap, tulang daun sekunder 4. Perbungaan tandan, terminal, terdiri dari banyak bunga. Daun gagang menyirap, membundar telur, hijau atau jambon. Bunga banci, lebar 1 mm; tabung daun kelopak bunga seperti terompet, 1–2 × 1–1,5 mm, jambon; cuping daun kelopak bunga 4 helai, jambon; daun mahkota bunga 4 helai, membundar telur sungsang atau agak membundar, 1–3 × 1–2 mm, jambon; benang sari 4 helai, muncul dari pangkal tabung daun kelopak bunga; kepala sari melonjong, cokelat; putik 1 helai; bakal buah menumpang; kepala putik memerisai. Menurut Bhowmik et al., (2012) Buah kapsul, agak membulat, lebar 1–5 mm, berkatup 4. Biji 15–20, panjang 0,5 mm.



Gambar 1. *Rotala rotundifolia*. A= Permukaan adaksial daun, B= Permukaan abaksial daun, C= Perbungaan, D = Bunga.



Gambar 2. Daerah distribusi alami *Rotala rotundifolia* (blok warna hijau) dan daerah yang telah diintroduksi (blok warna ungu) (POWO, 2022).

3.2 Distribusi

Rotala rotundifolia tersebar di India hingga Asia Timur Tropik (Gambar 2, POWO 2022). Pada penelitian ini, jenis tersebut ditemukan tumbuh meliar di Parakan (6° 37' 16,356" LS, 106° 45' 58,719" BT), Kota Bogor, Jawa Barat.

3.3 Habitat

Pada daerah sebaran aslinya, *R. rotundifolia* tumbuh pada danau dan rawa yang dangkal. Namun, jenis ini juga mampu menginvasi kanal atau saluran air di daerah sebaran barunya (Burks et al., 2002; Gettys, 2014). Pada lokasi yang diamati, *R. rotundifolia* tumbuh pada daerah genangan air yang berlumpur di sekitar persawahan.

3.4 Spesimen yang Diamati

Spesimen yang diamati yaitu di daerah Jawa Barat, Kabupaten Bogor, Kecamatan Ciomas, Desa Parakan, 07.IV.2022, MR Hariri & ZA Anshori s.n. (FIPIA); Jawa Barat, Lebak Gede, 31.IX.1977, Didih RG s.n. (FIPIA). *Rotala rotundifolia* merupakan tumbuhan akuatik introduksi yang persebaran alamnya terdapat di India hingga Asia Timur (Burks et al., 2002). Jenis ini telah banyak dibudidayakan sebagai tanaman hias akuarium di berbagai negara, terutama di kawasan tropis (Burks et al., 2002). Populasi meliar *R. rotundifolia* di Parakan kemungkinan besar berasal dari potongan batang yang dibuang oleh manusia. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa jenis ini mampu memperbanyak diri di alam dari potongan organ vegetatif yang sengaja dibuang atau terbawa aliran air (Burks et al., 2002; Bhowmik et al., 2012; Gettys, 2014). Fragmentasi batang merupakan mekanisme utama bagi *R. rotundifolia* untuk menyebar dan membentuk populasinya yang mapan di daerah sebaran barunya (Bhowmik et al., 2012). Selain di Pulau Jawa, jenis tersebut juga telah dilaporkan sebagai tumbuhan asing invasif di Florida (Ronsted, 2008; Gettys, 2014).

3.5 DNA Barcoding dan Analisis Filogenetik *Rotala*

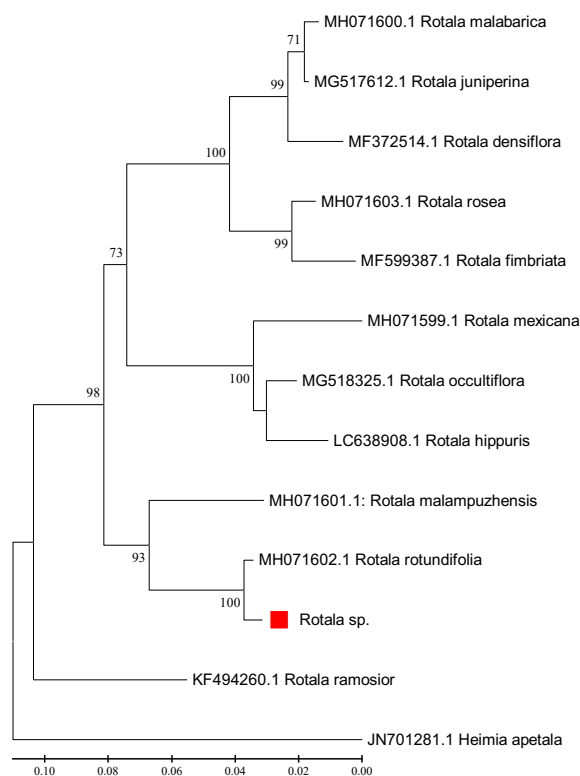
Sampel DNA *R. rotundifolia* berhasil diekstraksi dan diamplifikasi menggunakan primer ITS sepanjang 826 pasang basa. Sekuen yang diamplifikasi terdiri dari sekuens parsial gen RNA ribosom 18S, sekuens lengkap ITS1, sekuens lengkap gen RNA ribosom 5.8S, sekuens lengkap ITS2, dan sekuens parsial RNA ribosom 28S. pPada umumnya, region ITS yang diamplifikasi oleh primer 17SE dan 26SE mampu meng-cover region tersebut dari awal hingga akhir dengan panjang sekuen memiliki rentang antara 700-1080 pasang basa (Hariri et al., 2021a; Hariri et al., 2021b).

Tabel 1. Variasi Basa Nukleotida antara *R. rotundifolia* Dari Desa Parakan dan *R. Rotundifolia* MH071602.1.

Sampel	Posisi Basa Nukleotida					
	123	134	148	462	523	628
<i>R. rotundifolia</i> MH071602.1 (NCBI)	C	A	G	A	A	A
<i>R. rotundifolia</i> (Desa Parakan, Bogor)	G	T	A	C	G	C

Tabel 2. Variasi Basa Nukleotida antara *R. rotundifolia* (*Rotala* sp.) dari Desa Parakan dan *R. rotundifolia* MH071602.1.

No	Sekuen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	JN701281.1 <i>Heimia apetala</i>												
2	MH071602.1 <i>Rotala rotundifolia</i>	0.202											
3	MH071601.1 <i>Rotala malampuzhensis</i>	0.183	0.068										
4	MG518325.1 <i>Rotala occultiflora</i>	0.195	0.104	0.103									
5	MH071600.1 <i>Rotala malabarica</i>	0.198	0.107	0.116	0.104								
6	LC638908.1 <i>Rotala hippuris</i>	0.210	0.115	0.114	0.029	0.114							
7	MG517612.1 <i>Rotala juniperina</i>	0.198	0.115	0.123	0.113	0.006	0.122						
8	MH071599.1 <i>Rotala mexicana</i>	0.225	0.129	0.128	0.041	0.131	0.064	0.135					
9	MH071603.1 <i>Rotala rosea</i>	0.216	0.117	0.118	0.125	0.056	0.125	0.052	0.135				
10	MF372514.1 <i>Rotala densiflora</i>	0.211	0.127	0.134	0.131	0.029	0.138	0.022	0.139	0.058			
11	MF599387.1 <i>Rotala fimbriata</i>	0.214	0.120	0.128	0.132	0.071	0.133	0.066	0.140	0.028	0.075		
12	KF494260.1 <i>Rotala ramosior</i>	0.165	0.113	0.117	0.137	0.137	0.148	0.142	0.161	0.137	0.151	0.140	
13	<i>Rotala</i> sp.	0.202	0.009	0.073	0.105	0.108	0.119	0.119	0.127	0.123	0.129	0.126	0.118

Gambar 3. Pohon filogenetik *Rotala* berdasarkan metode *Neighbor-Joining* dan 1000 kali bootstrap.

Identifikasi molekuler berbasis BLAST melalui website NCBI menunjukkan bahwa urutan ITS sampel *R. rotundifolia* memiliki kemiripan 99,97% dengan urutan *R. rotundifolia* MH071602.1. Nilai kemiripan yang tinggi menunjukkan bahwa spesimen dari Desa Parakan adalah *R. rotundifolia*. Hasil penjajaran sekuen hanya menunjukkan perbedaan enam basa nukleotida (Tabel 1). Urutan sekuen

ITS mampu menentukan jenis *Rotala* dengan jelas. Pada penelitian ini dilakukan konstruksi pohon filogenetik untuk mengevaluasi akurasi penentuan jenis-jenis *Rotala* dengan membandingkan sekuens ITS dari database NCBI. Sebanyak 11 sekuens *Rotala* dan 1 outgroup berupa *Heimia apetala* digunakan untuk membangun pohon filogenetik.

Keseluruhan jenis *Rotala* sebagai ingroup dan *H. apetala* sebagai outgroup (Gambar 3) terpisah secara jelas satu sama lain. Pada pohon filogenetik terlihat dengan jelas bahwa *Rotala* dari Desa Parakan merupakan jenis yang sama dengan *R. rotundifolia* MH071602.1 yang didukung oleh nilai bootstrap sangat tinggi dan jarak genetik rendah (0,009) (Tabel 2) (Zhang et al., 2022).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan identifikasi molekuler menggunakan sekuens ITS, identitas spesimen *Rotala* dari Desa Parakan terkonfirmasi sebagai *Rotala rotundifolia* dengan tingkat kesamaan urutan 99,13%. Jenis ini merupakan rekaman baru tumbuhan asing akuatik untuk Pulau Jawa.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Anto, P. V., C. S. Devikrishna, P. Jacob Abraham, and C. D. Varghese. 2014. A new species of *Rotala* L. (Lythraceae) from the lateritic hills of Thrissur district, Kerala, India. *International Journal of Advanced Research*. 2(11):532–535.
- Balkanska, R., K. Stefanova, R. Stoikova-Grigorova, and M. Ignatova. 2020. A preliminary assessment of *trnH-psbA* as DNA barcode for botanical identification of polyfloral honey samples and comparison with *rbcL* marker. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 26(1):238–242.
- Bhowmik, S., M. Saha and B. K. Datta. 2012. Extended distribution of *Rotala rotundifolia* (Buch.-Ham. ex Roxb.) Koehne (Lythraceae) from India. *NeBio*. 3:48–50.
- Burks, K.C., D.W. Hall, V.V. Vandiver Jr, and C.C. Jacono. 2003. *Rotala rotundifolia* (Lythraceae) new to Florida. *SIDA, Contributions to Botany*. 20(4):1765–1769.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 12794–12797.
- Cook. 1979. A revision of the genus *Rotala* (Lythraceae). *Boissiera*. 29:1–156.
- de Wilde, W. J. J. O. and B. E. E. Duyfjes. 2016. *Lythraceae. Flora Malesiana - Series 1, Spermatophyta*, 22. Foundation Flora Malesiana, Naturalis Biodiversity Center, The Netherlands. pp. 1–64.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783–791.
- Gaikwad, S.P., M.M. Sardesai and S.R. Yadav. 2014. *Rotala sahyadrica* sp. nov. (Lythraceae) from western ghats, India. *Nordic Journal of Botany*. 32(5):575–577.
- Gettys, L.A. 2014. *Rotala rotundifolia*: a new canal invader in south Florida. *Ecisma Newsletter*. pp. 1–3.
- Hariri, M.R., P. Peniwidiyanti, A.S.D. Irsyam, R.R. Irwanto, I. Martiansyah, K. Kusnadi, and E. Yuhaeni. 2021a. Molecular Identification and Morphological Characterization of *Ficus* sp. (Moraceae) in Bogor Botanic Gardens. *Jurnal Biodjati*. 6(1):36–44.
- Hariri, M.R., A.S.D. Irsyam, A.B. Setiawan, E. Setiawan, R.R. Irwanto, and M. Atria. 2021b. Identifikasi molekuler dan karakterisasi morfologi kamandin saebo, tumbuhan obat dari pulau madura. *BIOTIKA Jurnal Ilmiah Biologi*. 19(2):41–48.
- Hung, J.H. and Z. Weng. 2016. Sequence alignment and homology search with BLAST and ClustalW. *Cold Spring Harbor Protocols*. 11:pdb-prot093088.
- Joseph, K.T., and V.V. Sivarajan. 1988. *Rotala cookii*: A new species of Lythraceae from India showing Hippuris syndrome. *Plant Systematics and Evolution*. 59:141–144.

- Joseph, K.T., and V.V. Sivarajan. 1989. *Rotala* Linn. (Lythraceae) in Peninsular India. *Proceeding of Indian Academic Science (Plant Science)*. 99:179–197.
- Lemiya, K.M. and A.K. Pradeep. 2015. A new species of *Rotala* (Lythraceae) from Kerala, India. *Rheedeia*. 25(2):159–163.
- Li, H.Q., J.Y. Chen, S. Wang, and S.Z. Xiong. 2012. Evaluation of six candidate DNA barcoding loci in *Ficus* (Moraceae) of China. *Molecular Ecology Resources*. 12(5):783–790.
- Mathew, S.P., and P. Lakshminarasimhan. 1990. *Rotala andamanensis* Mathew & Lakshminarasimhan - a New Species of Lythraceae from Andaman Islands, India. *Nelumbo*. 32(1-4): 189–191.
- Narayan, M.K.R., C.N. Sunil, T. Shaju, M.K. Nandakumar, M. Sivadasan, and A.H. Alfarhan. 2014. *Rotala dhaneshiana*, a new species of Lythraceae from India. *Phytotaxa*. 188(4):227–232.
- Olivar, J.E.C., R.Y. Brillantes, R.R. Rubite, and G.J.D. Alejandro. 2014. Evaluation of three candidate DNA barcoding loci in selected *Ficus* L. (Moraceae). *International Journal of Scientific and Technology Research*. 3(9):43–48.
- Pradeep, A.K., K.T. Joseph, and V.V. Sivarajan. 1990. *Rotala malabarica*, a new species of Lythraceae from India. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 3:51–61.
- Prasad, K.S. and K. Raveendran. 2013a. A new species of *Rotala* L. (Lythraceae) from Kerala, India. *Taiwania*. 58(2):104–107.
- Prasad, K.S. and K. Raveendran. 2013b. *Rotala kasaragodensis* (Lythraceae), a new species from Kerala, India. *Edinburgh Journal of Botany*. 70(3):451–454.
- POWO. 2022. Plant of the world online. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30048023-2>. Diakses 23 Agustus 2022.
- Rønsted, N., G.D. Weiblen, V. Savolainen, and J.M. Cook. 2008. Phylogeny, biogeography, and ecology of *Ficus* section *Malvanthera* (Moraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 48(1):12–22.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406–425.
- Samsuddin, M., N. Mat, N.Z. Mazlan, S.N.I. Omar, S. Tajuddin, N. Ngah, and A.M. Ali. 2012. Internal Transcribed Spacer (ITS) as the molecular marker for identification of *Dioscorea hispida* Dennst. (Dioscoreaceae). *Journal Of Agrobiotechnology*. 3:47–55.
- Sun, Y., D.Z. Skinner, G.H. Liang, and S.H. Hulbert. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics*. 89(1):26–32.
- Sunil, C.N., M.K.R. Narayanan, M.K. Nandakumar, J.P. Joseph, V.A. Jaleel, and N.A. Kumar. 2013. *Rotala khaleeliana* sp. nov. (Lythraceae), a new species from lateritic hills of Kannur, Kerala, India. *International Journal of Advanced Research*. 1(2):14–16.
- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*. 9:678–687.
- Tamura, K., G. Stecher, and S. Kumar. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*. 38(7):3022–3027.
- Yadav, S.R., N.V. Malpure, and A.N. Chandore. 2010. *Rotala belgumensis* (Lythraceae) from the Western Ghats, India. *Nordic Journal of Botany*. 28:499–500.
- Zhang, G., H. Wang, L. Shi, Y. Liu, R. Yao, C. Sui, C. Yang, H. Ji, Q. Wang, and J. Wei. 2022. Identification of the original plants of cultivated *Bupleuri Radix* based on DNA barcoding and chloroplast genome analysis. *PeerJ*. 10:p.e13208.