

**VARIASI GENETIK KULTIVAR JAMBU SEMARANG
(*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M.
Perry) DARI KABUPATEN DEMAK MENGGUNAKAN
*SECOND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS-2)***

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Syarat Guna Memperoleh
Gelar Sarjana Sains dalam Ilmu Biologi



Oleh: **SYIFARA CHIKA**

NIM: 1908016030

PROGRAM STUDI S-1 BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG
2023

**VARIASI GENETIK KULTIVAR JAMBU SEMARANG
(*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M.
Perry) DARI KABUPATEN DEMAK MENGGUNAKAN
*SECOND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS-2)***

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Syarat Guna Memperoleh
Gelar Sarjana Sains dalam Ilmu Biologi



Oleh: **SYIFARA CHIKA**

NIM: 1908016030

PROGRAM STUDI S-1 BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG

2023

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Syifara Chika

NIM : 1908016030

Program Studi : S1 Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

**VARIASI GENETIK KULTIVAR JAMBU SEMARANG
(*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry)
DARI KABUPATEN DEMAK MENGGUNAKAN *SECOND
INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS-2)***

Secara keseluruhan adalah hasil penelitian/karya saya sendiri,
kecuali bagian tertentu yang dirujuk sumbernya.

Semarang, 24 Maret 2023

Pembuat Pernyataan



Syifara Chika

NIM: 1908016030



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
Jl. Prof. Dr. Hamka Ngaliyan Semarang
Telp.024-7601295 Fax. 7615387

PENGESAHAN

Naskah skripsi berikut ini:

Judul : Variasi Genetik Kultivar Jambu Semarang
(*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. &
L.M. Perry) Dari Kabupaten Demak
Menggunakan *Second Internal Transcribed
Spacer* (ITS-2)

Penulis : Syifara Chika
NIM : 1908016030

Program Studi : Biologi

Telah diujikan dalam sidang tugas akhir oleh Dewan
Penguji Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo dan
dapat diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar
sarjana dalam ilmu Biologi.

Semarang, 12 April 2023

DEWAN PENGUJI

Penguji I,

Penguji II,

Arnia Sari Mukaromah, M.Sc.
NIP. 19870911201801200

Asri Febriana, M. Si.
NIP. 198902012019032015

Penguji III,

Penguji IV,

Dr. Lianah, M.Pd.
NIP. 19590313198103007000

Hafidha Asni Akmalia, M.Sc.
NIP. 198908212019032013

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Arnia Sari Mukaromah, M.Sc.
NIP. 19870911201801200

Asri Febriana, M. Si.
NIP. 198902012019032015



NOTA DINAS

Semarang, 24/03/2022

Yth. Ketua Program Studi Biologi

Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Walisongo Semarang

Assalamu'alaikum. Wr. Wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : **Variasi Genetik Kultivar Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) Dari Kabupaten Demak Menggunakan *Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2)**

Penulis : Syifara Chika

NIM : 1908016030

Program Studi : S1 Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang *Munaqasyah*.

Wassalamu'alaikum. Wr. Wb.

Pembimbing I,



Arnia Sari Mukaromah, M.Sc.

NIP: 19870911201801200

NOTA DINAS

Semarang, 24/03/2022

Yth. Ketua Program Studi Biologi

Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Walisongo Semarang

Assalamu'alaikum. Wr. Wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : **Variasi Genetik Kultivar Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) Dari Kabupaten Demak Menggunakan *Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2)**

Penulis : Syifara Chika

NIM : 1908016030

Program Studi : S1 Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang *Munaqasyah*.

Wassalamu'alaikum. Wr. Wb.

Pembimbing II,



Asri Febriana, M. Si.

NIP: 198902012019032015

MOTTO

إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا^{١٥}

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan

(QS Al-Insyirah: 6)

ABSTRAK

Tanaman jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) merupakan tanaman buah tropis dari suku *Myrtaceae* yang dikelompokkan dalam buah non klimaterik. Salah satu daerah yang menjadi sentra jambu semarang adalah Kabupaten Demak. Belum ada yang melakukan analisis variasi genetik kultivar jambu semarang di Kabupaten Demak menggunakan DNA *Barcoding Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2). Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi variasi genetik kultivar tanaman jambu semarang dari Kabupaten Demak pada wilayah DNA Barcode ITS-2, menentukan hasil amplikon ITS-2 dapat digunakan dalam analisis variasi genetik kultivar tanaman jambu semarang dari Kabupaten Demak, dan menganalisis hubungan kekerabatan pohon filogenetik kultivar jambu semarang dari Kabupaten Demak. Langkah-langkah pada penelitian ini terdiri dari pengambilan sampel daun, isolasi DNA, amplifikasi DNA, elektroforesis, sekuensing, analisis data sekuensing, dan rekonstruksi pohon filogenetik. Hasil menunjukkan bahwa terdapat variasi intraspesies yang rendah antar keempat sampel kultivar *S. samarangense* pada daerah ITS-2 dan terdapat variasi nukleotida yang tinggi antara spesies *S. samarangense* dengan spesies *Syzygium* lainnya pada daerah ITS-2. Pohon filogenetik menggambarkan bahwa sekuen sampel *S. samarangense* memisah sesuai perbedaan kultivar. Sampel *S. samarangense* kultivar Citra Botorejo berkerabat dekat dengan kultivar Citra Wonosari dan kultivar Citra Tempuran. *S. samarangense* kultivar Delima berada memisah pada cabang berbeda.

Kata kunci: DNA *barcoding*, ITS-2, *Syzygium samarangense*, Variasi genetik

ABSTRACT

Wax apple (Syzygium samarangense (Blume) Merr. & L.M. Perry) is a tropical fruit plant from the Myrtaceae tribe which is classified as a non-climacteric fruit. One of the areas that are the center of wax apple is Demak Regency. There is no analysis regards to the genetic variation of S. samarangense cultivars in Demak Regency by using the DNA Barcoding Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2). The aim of this study is that to identify the genetic variation of the S. samarangense cultivar from Demak Regency in the ITS-2 DNA Barcode region, determine the results of the ITS-2 amplicon which can be used in the analysis of genetic variation of the S. samarangense cultivar from Demak Regency, and analyze the phylogenetic relationships among S. samarangense cultivars from Demak Regency. Furthermore, the stages in this study consisted of sampling, DNA isolation, DNA amplification, electrophoresis, sequencing, analysis of sequencing data, and build a phylogenetic tree. The result shows that there is low intraspecific variation between S. samarangense species in the ITS-2 area and there is high nucleotide variation between S. samarangense species and other Syzygium species in the ITS-2 area. The result of the phylogenetic tree shows that the sequences of S. samarangense are separated based on the cultivar differences. In addition, the S. samarangense cultivar Citra Botorejo is closely related to Citra Wonosari and Citra Tempuran. Samples of Delima cultivar S. samarangense are separated into different branches.

Keywords: *DNA barcoding, ITS-2, Syzygium samarangense, the genetic variation*

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur penulis ucapkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik. Sholawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW keluarga, para sahabat dan para pengikutnya. Skripsi ini berjudul **“Variasi Genetik Kultivar Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) Dari Kabupaten Demak Menggunakan *Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2)”**. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan banyak pihak yang telah memberikan arahan, bimbingan dan semangat kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan banyak karunia, kesehatan, petunjuk, dan hidayah sehingga bisa skripsi dapat terselesaikan dengan baik;
2. Bapak Prof. Dr. Imam Taufiq, M.A. selaku Rektor UIN Walisongo;

3. Bapak Dr. H. Ismail, M.Ag. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Walisongo;
4. Ibu Dr. Baiq Farhatul Wahidah, M.Si. selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Walisongo;
5. Ibu Arnia Sari Mukaromah, M.Sc. selaku pembimbing I selalu memberikan bimbingan, dukungan, fasilitas, dan kesempatan selama penelitian dan penulisan skripsi;
6. Ibu Asri Febriana, M.Si selaku pembimbing II yang telah memberikan arahan dan bimbingan yang tiada henti selama penelitian dan penulisan skripsi;
7. Ibu Niken Kusumarini, M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan arahan dan bimbingan semenjak semester I hingga akhir penyusunan skripsi;
8. Kedua orang tua, Bapak Triyono, S.Si. dan Ibu Wheni Nurhanani Astuti, SH. yang tak hentinya memberikan doa, kasih sayang dan dukungan yang sangat besar;
9. Adik kandung, Cinta Nabilla Zahirra yang selalu memberikan dukungan dan semangat;
10. Keluarga besar Bapak Muljanto, A. Md. dan Bapak Kapten Infanteri (Purn) Kirmadji yang selalu memberikan dukungan, arahan, doa dan semangat;

11. Tim Riset Jambu Semarang, Tiara, Mas Ramdhan, Mbak Devi, Mbak Annisa, dan Mas Afrizal yang telah bekerja sama dalam penelitian dan menjadi tempat untuk banyak belajar;
12. Sahabat dan teman-teman tercinta, Kelvin Demanda, Fathimah, Amida, Laila, Izza, Mbak Chusnul, dan semua teman-teman Biologi B 2019 yang selalu ada dan memberikan dukungan selama perkuliahan;
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan dukungan dan doa.

Penulis berharap penelitian dalam skripsi ini dapat berguna bagi masyarakat luas. Tentu saja manusia tidak luput akan kesalahan dan penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karenanya, penulis mengharapkan kritikan dan saran agar penulis dapat memperbaiki tugas akhir ini.

Semarang, 24 Maret 2023

Penulis



Syifara Chika

NIM. 1908016030

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PENGESAHAN	iv
NOTA DINAS.....	v
MOTTO.....	vii
ABSTRAK.....	viii
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR GAMBAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR TABEL LAMPIRAN	xix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	6
C. Tujuan Penelitian	6
D. Manfaat Penelitian.....	7
BAB II LANDASAN PUSTAKA.....	9
A. Kajian Teori	9
1. Tinjauan Umum Jambu Semarang (<i>Syzygium samarangense</i> (Blume) Merr. & L.M. Perry)	9

2.	Kabupaten Demak.....	17
3.	<i>DNA Barcoding</i>	18
4.	<i>Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2)</i>	19
5.	Keanekaragaman Genetik Tumbuhan dalam Islam.....	21
B.	Kajian Hasil Penelitian yang Relevan.....	23
C.	Hipotesis.....	26
BAB III METODE PENELITIAN.....		27
A.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	27
B.	Alat dan Bahan.....	27
C.	Metode.....	28
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		37
A.	Deskripsi Hasil Penelitian.....	37
B.	Pembahasan Hasil Penelitian.....	61
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....		77
A.	Simpulan.....	77
B.	Saran.....	78
LAMPIRAN.....		89
RIWAYAT HIDUP.....		108

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Perbedaan jambu semarang dan jambu air.....	11
Tabel 3.1	Daftar kultivar sampel.....	30
Tabel 4.1	Parameter lingkungan tiga desa di Demak.....	38
Tabel 4.2	Nilai %HQ keempat sampel.....	44
Tabel 4.3	Daftar accession number.....	45
Tabel 4.4	Tabel jarak genetik sekuen <i>Syzygium</i>	49
Tabel 4.5	Persentase komposisi nukleotida.....	57
Tabel 4.6	Variasi Nukleotida pada ITS-2.....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi jambu semarang.....	12
Gambar 2.2 <i>Syzygium samarangense</i> ‘Citra’.....	13
Gambar 2.3 <i>Syzygium samarangense</i> ‘Delima’.....	14
Gambar 2.4 Organisasi Gen ITS.....	19
Gambar 3.1 Lokasi pengambilan sampel	29
Gambar 4.1 Hasil elektroforesis isolasi DNA.....	40
Gambar 4.2 Hasil isolasi DNA yang tidak berhasil.....	41
Gambar 4.3 Visualisasi elektroforesis produk PCR.....	42
Gambar 4.4 Pohon filogenetik keempat sampel.....	52
Gambar 4.5 Pohon filogenetik seluruh sekuen.....	53
Gambar 4.6 Variasi genetik berupa <i>double peak</i>	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Sekuen <i>S. samarangense</i> hasil <i>contig</i>	89
Lampiran 2 <i>Accession Number S. samarangense</i>	91
Lampiran 3. Hasil <i>Alignment Syzygium</i>	95

DAFTAR GAMBAR LAMPIRAN

Gambar Lampiran 1 Dokumentasi penelitian.....	101
Gambar Lampiran 2 Elektroforegram parsial sampel...	102
Gambar Lampiran 3. Daftar Kode <i>Degenerate Primer</i> ...	103

DAFTAR TABEL LAMPIRAN

Tabel Lampiran 1 Analisis statistik lingkungan.....	104
Tabel Lampiran 2 Hasil BLAST.....	105
Tabel Lampiran 3 Daftar sekuen genus <i>Syzygium</i>	107

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang sangat tinggi yaitu terdiri dari keanekaragaman tumbuhan, hewan, dan biota lainnya. Eksplorasi dan pemanfaatan keanekaragaman hayati dilakukan sebagai bentuk konservasi berkesinambungan dalam pemenuhan kebutuhan pangan dan kebutuhan energi terbarukan. Keanekaragaman hayati dapat menjadi dasar untuk merakit kultivar unggul (Sunaryo, 2015). Salah satu keanekaragaman hayati yang memiliki potensi untuk dikembangkan adalah keanekaragaman buah-buahan tropis seperti jambu semarang.

Tanaman jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) merupakan tanaman buah tropis dari suku *Myrtaceae* yang dikelompokkan dalam buah non klimaterik. Salah satu daerah yang menjadi sentra jambu semarang adalah Kabupaten Demak. Produktivitas jambu air di Jawa Tengah mencapai 46.212 ton pada tahun 2021(BPS Provinsi Jawa Tengah, 2021). Beberapa kultivar jambu semarang seperti citra dan delima memiliki nilai ekonomi yang tinggi dan telah dieskpor. Akan tetapi,

kabupaten Demak belum memiliki data tentang variasi genetik jambu semarang yang tumbuh pada daerah tersebut. Data variasi genetik pada tanaman sangat penting sebagai acuan keanekaragaman genetik suatu plasma nutfah.

Menurut Widodo (2015) masih sedikit peneliti yang melakukan penelitian mengenai karakter morfologi jambu semarang. Sementara itu, munculnya kultivar baru jambu semarang khususnya pada jenis *S. samarangense* mengakibatkan proses identifikasi sulit dilakukan. Pada tahun 2015 jambu semarang diketahui memiliki 73 kultivar yang memiliki banyak variasi seperti bentuk, rasa, dan warna. Kultivar jambu semarang yang paling banyak dibudidayakan oleh masyarakat adalah 'Citra' dan 'Delima'. Kultivar 'Citra' dan 'Delima' mempunyai karakter morfologi yang mirip tetapi mempunyai perbedaan pada karakter buahnya. Pendekatan konvensional berupa pengamatan morfologi hanya bisa menjawab kemiripan fenotip namun belum dapat menjawab kekerabatan dan variasi genetik dari kultivar tanaman jambu semarang (Mukaromah dan Ulfah, 2021).

Data variasi genetik jambu semarang penting untuk dipelajari karena dapat memprediksi masa depan buah jambu semarang agar tetap lestari. Selain mempertahankan

jumlah populasi spesies, kegiatan konservasi juga perlu memperhatikan aspek genetik. Konservasi genetik bertujuan untuk mempertahankan keragaman genetik secara maksimal dan spesies tersebut dapat beradaptasi serta berevolusi dengan baik (Coker, 2017; Widyatmoko, 2019). Konservasi genetik pada tumbuhan membutuhkan keterlibatan dari genetika molekuler seperti *DNA barcoding*.

DNA barcoding merupakan suatu teknik alternatif yang digunakan untuk proses identifikasi kultivar jambu semarang. Proses identifikasi menggunakan metode *DNA barcoding* adalah metode yang konsisten, cepat, dan dapat dipertanggungjawabkan sehingga sangat bermanfaat dalam proses percepatan identifikasi suatu spesies khususnya pada genus *Syzygium* (Irawan *et al.*, 2016; Roslim dan Fitriani, 2021). *DNA barcoding* memiliki beberapa keunggulan antara lain membutuhkan spesimen yang sangat sedikit, dapat menggambarkan keragaman grup taksonomi yang belum pernah dilakukan identifikasi, dan dapat mengungkapkan keragaman atau variasi baru pada spesies yang pada awalnya digolongkan pada satu spesies saja (Sunaryo, 2015).

Cytochrome Oxidase sub unit1 (CO1) merupakan primer universal yang umum digunakan pada spesies hewan

(Kochzius *et al.*, 2010). *DNA barcode* yang digunakan pada spesies tumbuhan sangat beragam dan masing-masing suku memiliki *DNA barcode* yang spesifik, seperti *Internal Transcribed Spacer* (ITS), *rbcL* (*ribulosa-1,5-bifosfat karboksilase Large subunit*), *matK* (*maturase K*), *psbA-trnH*, dan lain-lain. Setiap *DNA barcode* yang digunakan pada proses *DNA barcoding* mempunyai kelebihan dan dapat disesuaikan dengan spesies yang akan diteliti. Menurut Mukaromah dan Ulfah (2021) metode *DNA barcoding* menggunakan *trnL-trnF* belum dapat digunakan untuk mengautentikasi jambu semarang kultivar Citra dan Delima di Kabupaten Demak dikarenakan adanya *secondary structure* sehingga sekuens nukleotida tidak dapat terbaca. Oleh karena itu, perlu digunakan jenis *DNA barcode* lain yang diharapkan dapat digunakan untuk membedakan variasi genetik antara kultivar tanaman jambu semarang asal Kabupaten Demak.

Menurut Irawan *et al.* (2016) *DNA barcode* gen *matK* memiliki kemampuan yang rendah untuk memisahkan tumbuhan *Syzygium*. Penelitian Julianti *et al.* (2015) menunjukkan bahwa gen *matK* belum dapat digunakan untuk membedakan variasi intraspesies pada tanaman daluga belang-belang, daluga kuning, dan daluga hijau dari Kepulauan Sangihe. Gen *rbcL* juga menunjukkan rendahnya

variasi genetik interspesifik. Menurut Perwitasari *et al.* (2020) menunjukkan bahwa *rbcl* memiliki tingkat rekombinasi genetik yang lebih rendah jika dibandingkan dengan ITS. Hal tersebut dikarenakan adanya homologi tinggi pada gen *rbcl* dan menyebabkan rendahnya variasi genetik. *Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2)* secara khusus telah mendapatkan pengakuan dalam *DNA barcoding* karena kemampuannya dalam membedakan spesies hingga tingkat keberhasilannya mencapai 92,7% pada suatu tanaman (Buys *et al.*, 2016). ITS-2 telah digunakan untuk menganalisis variasi genetik 23 aksesi kultivar pisang Indonesia (Meitha *et al.*, 2020). Oleh karena itu, *DNA barcode ITS-2* diprediksi sesuai untuk digunakan dalam analisis variasi genetik kultivar jambu semarang.

Analisis variasi genetik jambu semarang memiliki peranan penting yaitu sebagai strategi pemuliaan tanaman, konservasi genetik, dan menghasilkan kualitas jambu semarang yang unggul (Ilmi, 2021). Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam pelestarian dan pemuliaan tanaman jambu semarang dan dapat bermanfaat sebagai acuan dalam pemilihan *DNA barcode* yang efektif untuk identifikasi jambu semarang.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana variasi genetik kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak pada wilayah *DNA barcode Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2)?
2. Apakah ITS-2 dapat digunakan untuk menganalisis variasi genetik kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak?
3. Bagaimana hubungan kekerabatan filogenetik di antara kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Menganalisis variasi genetik kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak pada wilayah *DNA barcode Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2);
2. Menentukan hasil amplikon ITS-2 dapat digunakan untuk menganalisis variasi genetik kultivar jambu

semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak;

3. Menganalisis hubungan kekerabatan filogenetik di antara kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak.

D. Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat yang didapat dari penelitian ini adalah:

1. Manfaat Teoritis

- a. Memberikan informasi tentang *Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2) untuk proses identifikasi variasi genetik kultivar tumbuhan Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry);
- b. Memberikan pengembangan pengetahuan dalam bidang molekuler untuk pembaharuan penelitian tentang variasi genetik pada spesies jambu semarang.

2. Manfaat Praktis

a. Bagi Peneliti

Bagi peneliti, penelitian ini bermanfaat untuk mengetahui perbedaan kultivar dan variasi genetik jambu semarang melalui teknik *DNA barcoding*. Penelitian ini juga bermanfaat bagi peneliti untuk

mendalami pengetahuan di bidang biologi molekuler dan meningkatkan keterampilan di laboratorium.

b. Bagi Mahasiswa

1. Menambah pengetahuan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang pemanfaatan metode *DNA barcoding* untuk mengetahui variasi genetik dan kekerabatan dari spesies tertentu;
2. Meningkatkan keterampilan di laboratorium pada bidang molekuler;
3. Menambah pengetahuan tentang tahapan pelaksanaan konservasi genetik.

c. Bagi Masyarakat Luas

1. Sebagai acuan bagi masyarakat untuk melakukan pemuliaan tanaman khususnya jambu semarang;
2. Sebagai dasar konservasi genetik agar jambu semarang tetap lestari.

BAB II

LANDASAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

1. Tinjauan Umum Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry)

Jambu semarang adalah salah satu buah tropis yang disukai masyarakat Indonesia. Jambu semarang memiliki beberapa kultivar yang memiliki banyak variasi seperti bentuk, rasa, dan warna. Buah jambu semarang memiliki banyak manfaat antara lain dikonsumsi sebagai buah segar, dibuat jus, jeli, dan rujak. Selain itu buahnya dapat digunakan sebagai antibakteri, obat diare, dan aktivitas imunofarmakologi (Widodo, 2015). Klasifikasi dari tanaman Jambu Semarang (*S. samarangense*) adalah :

Kingdom : Plantae
Division : Tracheophyta
Class : Magnoliopsida
Order : Myrtales
Family : Myrtaceae
Genus : *Syzygium*
Species : *Syzygium samarangense*
(Sumber: GBIF, 2022).

Para pemulia tanaman jambu semarang terus berupaya untuk mendapatkan kualitas jambu yang lebih baik untuk masa depan. Jambu semarang mempunyai nilai jual yang cukup tinggi sehingga dapat menjadi peluang usaha. Satu pohon jambu dengan umur lebih dari 5 tahun dapat menghasilkan buah jambu sekitar 30 kg/tahun, maka jika terdapat ratusan pohon akan mendapat keuntungan yang besar (Widodo, 2015).

a. Morfologi Jambu Semarang (*S. samarangense*)

Jambu semarang memiliki pohon dengan ukuran yang sedang dan kecil dengan tinggi sekitar 4-15 m dengan diameter 4-15 cm. Pohon memiliki ranting dengan bentuk silinder dengan warna coklat kemerahan hingga hijau. Helai daun berbentuk menjorong, melanset hingga memanjang. Bunga majemuk yang terdiri dari 3-15 bunga. Panjang tangkai bunga bervariasi antara 3-5 mm dengan kelopak bunga berwarna hijau kekuningan. Mahkota bunga membulat berwarna putih dengan panjang sekitar 8-13 mm. Bunga jambu semarang memiliki benangsari sekitar 200-400 benang dengan panjang 3-5 cm. Putik berdiameter 1-2 mm dan panjang mencapai 5 cm (Widodo, 2015).

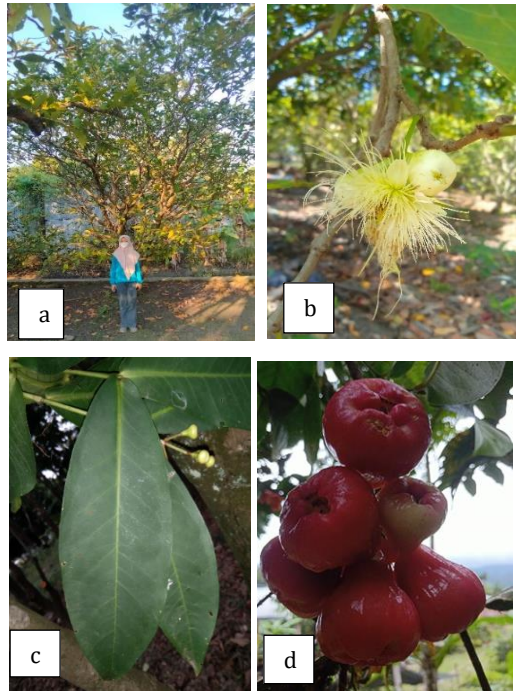
Bentuk buah jambu semarang adalah lonceng dan mempunyai tangkai semu, pada beberapa jambu dengan bentuk membulat tidak mempunyai tangkai semu. Bentuk jambu semarang yang lain yaitu memipih secara vertikal, membulat telur membalik, dan cekung pada bagian pangkalnya. Ujung buah jambu semarang rata, berpinggang, tidak berpinggang, atau menonjol. Warna buah jambu sangat bervariasi yaitu berwarna putih, hijau tua, hijau muda, kuning, merah jambu, merah, dan merah tua (Widodo, 2015).

Tabel 2.1 Perbedaan jambu semarang (*Syzygium samarangense*) dan jambu air (*Syzygium aqueum*)

Karakter	<i>S. samarangense</i>	<i>S. aqueum</i>
Warna buah	Bervariasi yaitu merah muda, merah tua, hijau muda, putih, kehitaman.	Merah muda, merah, merah keputihan, merah tua.
Rasa buah	Manis dan sepat	Asam, jika buah dengan umur yang tua menjadi sedikit manis.

Ketahanan terhadap hama	Sebagian diserang hama	besar	Sebagian besar tidak diserang hama
-------------------------	------------------------	-------	------------------------------------

Buah jambu semarang mempunyai rasa yang manis bercampur agak sepat, dan memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi untuk dibudidayakan. Sedikit rasa sepat pada buah jambu semarang menandakan terdapat indikasi adanya kandungan tannin yang dapat berperan sebagai antibiotik walaupun kandungannya hanya sedikit (Widodo, 2015). Buah jambu semarang dapat digunakan sebagai obat diare dan gangguan pencernaan. Buah pada umumnya mudah terserang oleh hama. Morfologi dari tanaman jambu semarang dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Morfologi jambu semarang (a) Penampakan tanaman *S. samarangense* , (b) Penampakan bunga *S. samarangense* (dokumentasi pribadi, 2022), (c) Penampakan daun *S. samarangense*, (d) Penampakan buah *S. samarangense*. (GBIF, 2022)

b. Kultivar Jambu Semarang (*S. samarangense*)

Menurut Widodo (2015) jambu semarang memiliki beberapa kultivar antara lain camplong, jambu apel, bangkok, citra, cikampek, cincalo semarang, demak, kaget hijau, kaget putih, jamaika, lilin merah, lilin hijau, delima,

madura merah, madura putih, mutiara, dan lain-lain. Contoh kultivar jambu semarang yang ditemukan di daerah Kabupaten Demak dan digunakan dalam penelitian ini adalah Citra dan Delima (Widodo, 2015).

1. Kultivar Citra

Pohon berukuran kecil dengan tinggi 2-3 m, batang berdiameter 10-20 cm. Daun menjorong dan berstektur tebal kaku, panjang daun 17-24 cm dan lebar daun 7-14 cm. Buah berbentuk melonceng dengan panjang 8-10 cm, ujung buah berdiameter 6-7,5 cm, sedangkan pangkal buah berdiameter 4,5 cm. Buah bertesktur bergelombang, kulit buah berwarna merah, dan memiliki rasa manis dengan kandungan air relatif tinggi (Widodo, 2015). Daun dan buah jambu semarang kultivar citra dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Buah *S. samarangense* 'Citra'
(Widodo, 2015)

2. Kultivar Delima

Pohon berukuran sedang dengan tinggi 6-8 m, batang berdiameter 20-30 cm. Daun menjorong dengan panjang 20-30 cm dan lebar 6-13 cm. Memiliki buah dengan bentuk melonceng dan mengerucut dengan panjang 4-6 cm dan berdiameter 3-5 cm, buah berwarna merah tua kecoklatan dengan rasa asam dan manis. Terdapat biji sebanyak 1-3 atau tanpa biji (Widodo, 2015). Daun dan buah jambu semarang kultivar delima dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Buah *S. samarangense* 'Delima'
(Widodo, 2015)

c. Ekologi dan Distribusi Jambu Semarang (*S. samarangense*)

Pohon jambu semarang dapat tumbuh di pekarangan, halaman, dan perkebunan baik di kota maupun desa dengan ketinggian 70-120 mdpl. Jambu semarang tumbuh menyebar pada berbagai wilayah Asia seperti pada Asia Selatan, Asia Tenggara dan Pasifik. Pada wilayah Indonesia, jambu semarang dapat ditemukan dengan mudah di Pulau Jawa, Sumatra, dan Papua dengan kultivar yang bervariasi. Jambu dengan kultivar yang sama apabila tumbuh pada wilayah tertentu akan mempunyai ciri khas tertentu pula, contohnya pada beberapa kultivar jambu semarang yang tumbuh di Pulau Sumatera mempunyai daun yang tebal, kaku, dan lebar, sedangkan jambu semarang yang tumbuh di Jawa mempunyai daun yang tipis dan sempit. Sementara itu, buah jambu semarang yang tumbuh di Pulau Papua memiliki bentuk yang pipih, dengan tekstur yang agak keras, sedangkan buah jambu semarang yang tumbuh di Pulau Jawa umumnya memiliki tekstur buah yang lunak (Widodo, 2015). Jambu semarang lebih baik ditumbuhkan pada dataran rendah dengan kondisi banyak sinar matahari (Widodo, 2015). Salah satu daerah yang menjadi sentra jambu semarang adalah Kabupaten Demak.

2. Kabupaten Demak

Demak adalah salah satu kabupaten di Provinsi Jawa Tengah yang jika dilihat dari segi geografis terletak pada koordinat $6^{\circ} 43'26'' - 7^{\circ} 09'43''$ LS dan $110^{\circ} 27'58'' - 110^{\circ} 48'47''$ BT. Jarak terjauh dari utara ke selatan sepanjang 41 km sedangkan jarak terjauh dari barat ke timur 49 km dengan luas wilayah 89.743 Ha. Kabupaten Demak berbatasan dengan Kabupaten Grobogan dan Kabupaten Kudus. Batas wilayah bagian selatan berbatasan dengan Kabupaten Grobogan dengan Kabupaten Semarang, sedangkan batas wilayah bagian barat berbatasan dengan Kota Semarang. Luas wilayah Kabupaten Demak secara administratif adalah 89.743 ha. Kabupaten Demak terdiri atas 14 kecamatan, 6 kelurahan, dan 243 desa (Dinas Komunikasi dan Informatika Kabupaten Demak, 2022).

Kabupaten Demak terdiri dari dua musim yaitu musim penghujan dan musim kemarau. Kabupaten Demak menjadi sentra budidaya jambu semarang. Sejak tahun 2008 telah dilakukan pengembangan budidaya jambu di Kabupaten Demak melalui bantuan sekitar 2.000 bibit unggul jambu semarang (*S. samarangense*) kultivar delima dan citra. Sementara itu, munculnya kultivar baru jambu semarang khususnya pada jenis *S. samarangense* mengakibatkan proses identifikasi sulit dilakukan. Salah

satu solusi untuk mempermudah proses identifikasi dan mengetahui tentang variasi genetik antara kultivar jambu semarang adalah dengan menggunakan metode *DNA barcoding* (Widodo, 2015).

3. *DNA Barcoding*

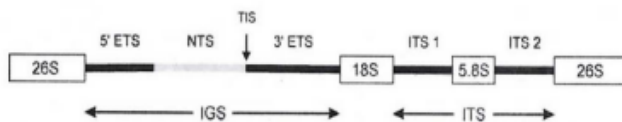
DNA barcoding adalah sebuah metode yang dikembangkan dengan tujuan untuk mempermudah dan mempercepat proses identifikasi suatu organisme menggunakan potongan gen tertentu dan telah diuji kemampuannya untuk membedakan suatu spesies. Metode ini berasal dari konsep bahwa setiap spesies memiliki keunikan pada identitas genetiknya (Chan *et al.*, 2014). Istilah *DNA barcoding* pertama kali diperkenalkan pada tahun 2003 oleh Paul D.N. Hebert. *DNA barcode* yang digunakan adalah sekuen pendek DNA dengan panjang sekitar 400-800 bp (*base pair*) (Masrurroh, 2018). Teknik *DNA barcoding* bermanfaat untuk mempermudah identifikasi pada semua tingkatan kehidupan. Metode ini telah terbukti untuk dapat digunakan oleh berbagai kelompok taksa dengan waktu yang cepat untuk proses identifikasi suatu spesies yang sulit dilakukan dengan pengamatan morfologi. Teknik *DNA barcoding* telah menjembatani dan menjadi solusi pada saat ini karena ahli taksonomi yang semakin langka (Sutrisno, 2018).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh (Balke dan Schmidt, 2012) menyatakan bahwa penggunaan *DNA barcoding* dilakukan untuk beberapa tujuan antara lain agar proses identifikasi dapat dilakukan dengan cepat, menjadi perangkat baru untuk mempermudah ahli taksonomi dalam mengkaji spesimen-spesimen yang sulit untuk diidentifikasi. Proses identifikasi suatu spesies menggunakan *DNA barcoding* dapat dilakukan oleh siapa saja yang telah mempunyai ketrampilan dan pengetahuan tentang *DNA barcoding*. Penggunaan *DNA barcoding* mempunyai tujuan utama yaitu untuk mempermudah proses identifikasi pada spesimen baru hingga tingkat spesies. Selain itu, metode ini bertujuan meningkatkan penemuan spesies baru melalui proses identifikasi khususnya pada spesies yang mikroskopik dan organisme yang memiliki morfologi kompleks sehingga sulit untuk dilakukan identifikasi (Masrurroh, 2018).

4. *Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2)*

Salah satu penanda molekuler yang digunakan dalam kajian filogenetik dan taksonomi untuk tingkat spesies adalah *Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2)*. *DNA barcode* ITS-2 adalah bagian dari rDNA nuklear. ITS-2 merupakan sekuen *non-coding* DNA yang terletak di antara subunit 5.8S dan subunit 26S. Sekuen ITS-2

mempunyai laju mutasi yang tinggi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai penanda pada proses identifikasi spesies yang mempunyai kekerabatan dekat (Wang *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2017). ITS2 memiliki keanekaragaman interspesifik dan memiliki variasi intraspesifik yang rendah. ITS-2 pada daerah 5.8S-26S digunakan dalam proses rekonstruksi filogenetik karena daerah ITS-2 mempunyai tingkat variasi yang tinggi jika dibandingkan dengan daerah lain pada rDNA subunit besar dan subunit kecil (Rusdiana, 2020). Organisasi Gen ITS tersaji pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Organisasi Gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS)

(Calonje *et al.*, 2009)

ITS-2 secara khusus telah mendapatkan pengakuan dalam *DNA barcoding* karena kemampuannya dalam membedakan spesies hingga tingkat keberhasilannya mencapai 92,7% pada suatu tanaman (Buys *et al.*, 2016). ITS-2 telah digunakan dalam identifikasi spesies pisang

dengan tingkat keberhasilan hingga 82.5% (Chen *et al.*, 2010). Pada penelitian Novianti (2012) ITS-2 telah digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan beberapa spesies pada suku *Meliaceae*. DNA barcode ITS-2 telah digunakan untuk mengautentikasi tanaman obat di Taiwan (Chiou *et al.*, 2007). ITS-2 juga telah digunakan untuk membedakan 23 aksesori kultivar pisang di Indonesia (Meitha *et al.*, 2020).

5. Keanekaragaman Genetik Tumbuhan dalam Islam

Keanekaragaman makhluk hidup di bumi adalah suatu fenomena normal pada kehidupan yang terdiri dari keanekaragaman manusia, tumbuhan, dan hewan. Keanekaragaman tersebut dapat dilihat melalui ciri khas yang dimiliki oleh masing-masing spesies. Hal tersebut sesuai dengan Al-Qur'an surat Al-An'am ayat 99:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا
مُتَرَكَبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ
انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

Artinya: "Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang kurma mengurai tangkai-tangkai yang

menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.” (Q.S. Al-An’am : 99) (Al-Quran Kementerian Agama RI, 2015).

Menurut Al-Jazairi (2007), berdasarkan ayat tersebut dapat disimpulkan bahwa Allah SWT telah menciptakan tumbuhan dengan berbagai macam jenis dan karakter. Kemudian Allah menumbuhkan tumbuhan melalui air yang mempunyai keanekaragaman jenis, bentuk, ciri khas, kelebihan dan kekurangannya. Allah juga menciptakan tumbuh-tumbuhan hijau, buah zaitun, delima, dan kebun anggur, baik yang memiliki kesamaan maupun yang berbeda pada sebagian sifatnya ataupun dalam hal yang lain, misalnya serupa pada bentuk buah dan daunnya tetapi mempunyai perbedaan pada warna buah, rasa buah ataupun karakter morfologi yang lain.

B. Kajian Hasil Penelitian yang Relevan

1. *DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore* (Chan et al., 2014)

DNA barcoding merupakan metode yang dilakukan untuk mengidentifikasi makhluk hidup menggunakan daerah DNA yang terdapat pada garis keturunan target secara universal dan mempunyai urutan yang bervariasi untuk mengidentifikasi spesies dengan benar. *DNA barcoding* perlu dilakukan sebagai salah satu solusi untuk memecahkan keterbatasan dan kekurangan dari proses identifikasi konvensional.

2. Jambu Semarang dan Jambu Air (Widodo, 2015)

Buah jambu semarang memiliki banyak manfaat antara lain dikonsumsi sebagai buah segar, dibuat jus, jeli, dan rujak, selain itu buahnya dapat digunakan sebagai anti bacteria, obat diare, aktivitas imunofarmakologi. Adanya pemuliaan tanaman dan pemeliharaan jambu untuk menghasilkan jambu yang unggul mengakibatkan munculnya spesiasi. Akibatnya, jambu semarang mempunyai banyak kultivar baru yang muncul yaitu camplong, jambu apel, bangkok, citra, cikampek, cincalo semarang, demak, kaget hijau, kaget putih, jamaika, lilin merah, lilin hijau, madura merah, madura putih, mutiara, dan lain-lain. Data tentang karakter morfologi jambu

semarang di Indonesia masih belum banyak yang membahas dan meneliti. Penelitian yang mengulas tentang jambu semarang terdahulu hanya membahas tentang deskripsi dan koleksi dari sampel jambu yang telah dikoleksi.

3. *Estimating the effectiveness of species identification by sequencing of two chloroplast DNA loci (matK and rbcL) in selected groups of Polish flora* (Combik & Mirek, 2015)

Metode *DNA barcoding* menjadi salah satu solusi untuk ahli taksonomi yaitu proses identifikasi dapat dilakukan dengan cepat. Penggabungan sekuen DNA menggunakan karakter morfologi yang ada dapat memfasilitasi klasifikasi dan identifikasi spesies. Penilaian keefektifan identifikasi spesies menggunakan *DNA barcode* (matK dan rbcL) untuk mengidentifikasi kelompok flora Polandia. Keberhasilan amplifikasi PCR adalah 100% (dari semua sampel) untuk primer rbcL dan 64% untuk primer matK yang menghasilkan 87 fragmen untuk diurutkan.

4. *Preparing for the invasion: efficacy of DNA barcoding to discern the host range of myrtle rust (Puccinia psidii) among species of Myrtaceae* (Buys et al., 2016)

Puccinia psidii merupakan salah satu tanaman yang terancam keberadaannya bagi anggota *Myrtaceae*. Perlu dilakukan identifikasi dan rekaman data genetik menggunakan *DNA barcode* ITS, ETS, dan matK. Hasil

penelitian didapatkan bahwa *DNA barcode* ITS memiliki tingkat keberhasilan identifikasi tertinggi untuk spesies diikuti oleh *matK* dan *ETS*, yang diukur dengan metode *BLAST1* dan *Near Distance*. Tingkat keberhasilan identifikasi menjadi lebih tinggi ketika *DNA barcode* ITS dan *matK* dikombinasikan.

5. Autentikasi Tanaman Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) Kultivar Delima dan Citra di Kabupaten Demak Menggunakan *DNA Barcoding* (Mukaromah dan Ulfah, 2021)

Penggunaan metode *DNA barcoding* untuk membedakan jambu semarang kultivar Citra dan Delima yang berasal dari Kabupaten Demak menggunakan wilayah DNA kloroplas *trnL-trnF*. Akan tetapi, metode *DNA barcoding* menggunakan *trnL-trnF* belum dapat digunakan untuk mengautentikasi jambu semarang kultivar Citra dan Delima di Kabupaten Demak dikarenakan adanya *secondary structure* sehingga sekuens nukleotida tidak dapat terbaca. Oleh karena itu, perlu digunakan jenis *DNA barcode* lain yang diharapkan dapat digunakan untuk membedakan variasi genetik antara kultivar tanaman jambu semarang asal Kabupaten Demak.

C. Hipotesis

Hipotesis yang muncul pada penelitian ini yaitu:

1. H_0 : Tidak ada variasi genetik kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak pada wilayah *DNA barcode Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2);
 H_1 : Ada variasi genetik kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak pada wilayah *DNA barcode Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2).
2. H_0 : Amplikon *Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2) tidak dapat digunakan untuk menganalisis variasi genetik kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak;
 H_1 : Amplikon *Second Internal Transcribed Spacer* (ITS-2) dapat digunakan untuk menganalisis variasi genetik kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak.
3. H_0 : Tidak terdapat hubungan kekerabatan filogenetik diantara kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak.

H₁ : Terdapat hubungan kekerabatan filogenetik diantara kultivar jambu semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) di Kabupaten Demak.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2022–Februari 2023 di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang. Lokasi pengambilan sampel kutivar jambu semarang dilaksanakan di lahan budidaya jambu semarang di Kabupaten Demak yaitu : (1) Desa Botorejo, Kecamatan Wonosalam, (2) Desa Wonosari, Kecamatan Bonang, (3) Desa Tempuran, Kecamatan Demak.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik (Mettler Toledo), spatula, erlenmeyer, (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), gelas beaker (Pyrex), microwave (Electrolux), kit elektroforesis (Mupid-exu), refrigerator (Esco), kulkas (Aqua), mortar dan pestle, gunting, PCR-Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), *microcentrifuge* (Eppendorf), mikropipet (Biorad), vortex (Biorad), *dry bath* (Biorad), *spin down* (Biorad), autoklaf (Hirayama), GelDoc (Bio-RED EZ imager), kulkas, gel silika, rak *microtube*, kontainer nitrogen cair (LocknLock), soil pH

meter (ITuin), GPS, lux meter (Struman), altimeter (OEM), dan kamera (Nikon).

2. Bahan

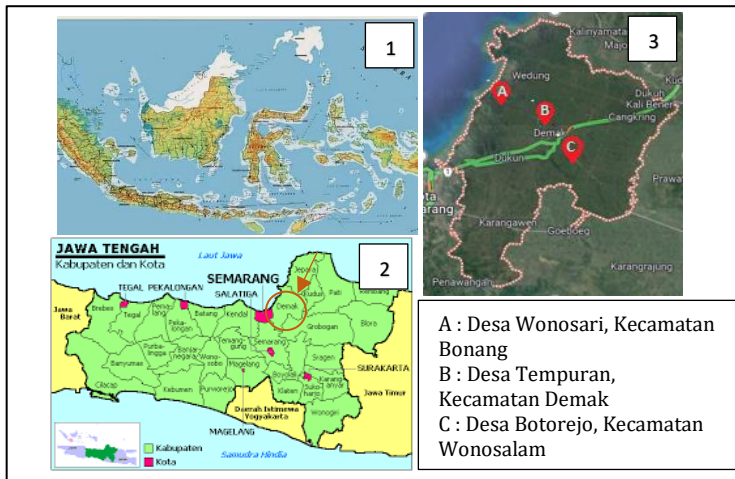
Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *FavorPrep Plant Genomic DNA Extraction* Mini Kit (Favorgen), primer ITS-2 *degenerate* (*Forward* dan *Reverse*), MyTaq HS Red Mix 2X (Meridian), TBE (Tris-borat EDTA) Buffer 1x (Merck), *microtube* 1,5 mL (Biologix), *microtube* 200 μ L (Biologix), serbuk agarose (GeneDirex), pipet tip (*blue, yellow, white*; Biologix), etanol absolut (Merck), isopropanol (Merck), *loading dye* (6X) (Genaid), GelRed (Merck), *Nuclease Free Water* (Thermo Scientific), *DNA ladder* 100bp (Norgen), *DNA ladder* 1kb (Norgen), etanol 70%, nitrogen cair, kantong teh, gloves, tissue, aluminium foil, plastik dan akuades steril.

C. Metode

1. Pengambilan Sampel

Lokasi titik sampling ditentukan berdasarkan data dari Dinas Pertanian Kabupaten Demak dan hasil wawancara dengan petani jambu semarang di tiga desa target. Lokasi pengambilan sampel ditentukan menggunakan metode *purposive sampling*. Metode tersebut merupakan teknik penentuan sampel dengan pertimbangan tertentu

(Sugiyono, 2014). Pertimbangan pemilihan ketiga desa target pengambilan sampel adalah karena pada desa tersebut memiliki kebun budidaya jambu semarang yang luas dan memiliki jambu semarang kultivar unggulan. Lokasi pengambilan sampel pada lahan budidaya jambu semarang di Kabupaten Demak yaitu : (1) Desa Botorejo, Kecamatan Wonosalam, (2) Desa Wonosari, Kecamatan Bonang, (3) Desa Tempuran, Kecamatan Demak. Lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Peta penelitian (1) Peta Indonesia; (B) Peta Jawa Tengah; (C) Peta Kabupaten Demak lokasi pengambilan sampel pada beberapa desa
 (Google Maps, 2023)

Sampel daun jambu semarang yang diambil adalah kultivar 'Citra' dan 'Delima'. Sampel daun jambu semarang yang dipilih adalah daun yang memiliki kondisi baik, tidak terdapat luka, dan dipilih daun nomor 3-4 dihitung dari tajuk daun yang merupakan daun dewasa. Daun dari masing-masing tanaman jambu semarang yang berasal dari masing-masing desa diambil lima lembar. Daun dibersihkan dengan alkohol dan dimasukkan dalam kantong teh yang telah ditambah silika gel. Sampel yang telah didapat selanjutnya diberi kode sesuai nama kultivar dan lokasi budidaya untuk memudahkan dalam proses analisis. Daftar sampel kultivar *S. samarangense* dari Kabupaten Demak tersaji pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Sampel kultivar *S. samarangense* dari Kabupaten Demak

No.	Kode Sampel	Kultivar	Lokasi
1.	CR1	Citra	Desa Botorejo, Kecamatan Wonosalam
2.	DR1	Delima	
3.	DR2	Delima	
4.	CW1	Citra	Desa Wonosari, Kecamatan Bonang
5.	CW2	Citra	
6.	DW1	Delima	Desa Tempuran, Kecamatan Demak
7.	CT1	Citra	
8.	DT1	Delima	

2. Isolasi DNA

Metode isolasi DNA dilakukan sesuai dengan protokol kerja dari FavorPrep *Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit* (Favorgen). Sebanyak 20 mg daun jambu semarang kering dihancurkan menggunakan nitrogen cair hingga menjadi serbuk dan dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL. Sebanyak 8 μ L Rnase A dan 400 μ L FAPG1 buffer ditambahkan ke dalamnya lalu divorteks dan diinkubasikan pada suhu 65°C selama 10-20 menit. Selama proses inkubasi, *microtube* 1,5 mL diinversi setiap 5 menit sekali. Selanjutnya, *microtube* 1,5 mL dari tahapan sebelumnya ditambahkan 130 μ L FAPG2 Buffer, divorteks lalu diinkubasi di *freezer* pada suhu 0°C selama 5 menit. *Filter column* ditempatkan pada 2 mL *collection tube* dan campuran dipindahkan ke *filter column*, disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Supernatan dalam 2 mL *collection tube* dipindahkan dalam *microtube* 1,5 mL baru secara hati-hati. Ditambahkan 1,5 kali dari volume sampel dengan FAPG3 Buffer ke sampel dan dilakukan pipetting (*up and down*). FAPG coloumn diletakkan pada *collection tube* baru dan dipindahkan 750 μ L dari campuran sampel ke FAPG coloumn, lalu disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. *Flow trough* dibuang dan ditempatkan kembali FAPG coloumn ke *collection tube*. Sisa campuran dimasukkan

kembali ke FAPG column dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. *Flow through* pada collection tube dibuang dan FAPG column dipasang kembali ke collection tube. Sebanyak 400 μ L W1 buffer ditambahkan pada FAPG column dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. *Flow through* pada collection tube dibuang dan FAPG column dipasang kembali ke collection tube. Sebanyak 650 μ L wash buffer (telah ditambahkan etanol absolut) ditambahkan pada FAPG column dan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. *Flow through* pada collection tube dibuang dan FAPG column dipasang kembali ke collection tube serta disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan kolom matriks. FAPG column kering dipindahkan ke *microtube* 1,5 mL baru. Sebanyak 50 μ L *elution buffer* yang telah dipanaskan ditambahkan ke bagian tengah kolom matriks, ditegakkan selama 3-5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit untuk mengelusikan DNA murni.

3. Amplifikasi DNA

Amplifikasi *DNA Barcode* ITS-2 dilakukan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan pasangan primer yang dirancang oleh Cheng *et al.*, (2016)

yang telah dilakukan modifikasi yaitu *forward primer* ITS-u3F (5'-CAW CGA TGA AGA ACG YAG C-3') dan *reverse primer* ITS-u4R (5'-RGT TTC TTT TCC TCC GCT TA-3'). Reaksi PCR dilakukan dalam volume total 50 μL terdiri dari 25 μL MyTaq HS Red Mix, 13 μL ddH₂O steril, 2 μL primer *forward*, 2 μL primer *reverse*, dan 8 μL *DNA template*. Pada proses PCR menggunakan ITS-2, pra-denaturasi menggunakan suhu 95°C selama 3 menit, tahap denaturasi dengan suhu 94°C selama 30 detik, tahap *annealing* dengan suhu 55°C selama 30 detik, tahap ekstensi dengan suhu 72°C selama 1 menit, tahap post ekstensi selama 10 menit dengan suhu 72°C, dan tahap penyimpanan dengan suhu 15°C sebelum amplikon dikeluarkan dari mesin PCR. Tahap denaturasi, *annealing*, ekstensi diulang sebanyak 35 kali.

4. Elektroforesis dan Sekuensing

Larutan agarose dibuat dengan konsentrasi 1%. Serbuk agarose dilarutkan sebanyak 0.8 gr kedalam 80 ml TBE 1x. Larutan agarose dihomogenkan sebentar dan dilarutkan kedalam *microwave* selama 8-10 menit. Setelah itu, larutan agarose diteteskan 2 μL GelRed. Selanjutnya agarose dituang dalam cetakan dan ditunggu sampai memadat. Cetakan agar direndam dalam TBE 1x pada alat elektroforesis, mesin elektroforesis dinyalakan dan diatur 100 volt selama 30 menit. Setelah itu, agarose dilepas dari

tempat agar dan diletakkan diatas *UV tray*. Selanjutnya dilakukan visualisasi hasil elektroforesis dengan menggunakan GelDoc dan komputer. Hasil amplikon selanjutnya dikirim untuk dilakukan sekuensing. Proses sekuensing dilakukan di 1st BASE (Malaysia) menggunakan metode *sanger sequencing*. Dokumentasi seluruh tahapan penelitian tersaji pada Gambar Lampiran 1.

5. Analisis Data

a. Analisis Parameter Lingkungan

Parameter lingkungan yang diukur meliputi derajat keasaman tanah menggunakan pH meter, ketinggian dan suhu udara menggunakan altimeter serta kelembapan udara diukur menggunakan thermohyrometer. Parameter lingkungan dianalisis perbedaan signifikansinya menggunakan uji OneWay ANOVA menggunakan SPSS 22 dengan tingkat kepercayaan 95%.

b. Pembacaan Hasil Sekuensing

Hasil *DNA sequencing* dalam format file AB1 dibaca menggunakan aplikasi BioEdit dan MEGA 11 (Kumar *et al.*, 2018). Data sekuensing sampel *S. samarangense* berupa data *forward* dan *reverse* diolah melalui aplikasi BioEdit untuk memperoleh sekuen contig. Sekuen akan dirapikan menggunakan metode trimming sampai memiliki panjang yang sama dengan sekuen pembanding.

c. Analisis Nilai *High Quality* (%HQ) Elektroforegram

Analisis nilai *high quaity* (%HQ) elektroforegram sampel *S. samarangense* dilakukan menggunakan aplikasi Geneious v5.6.7. Keempat sekuen diinputkan pada sistem dan dianalisis sesuai ketentuan yang ada pada sistem tersebut.

d. Pendaftaran *Accession Number* di NCBI *GenBank*

Pendaftaran *Accession Number* di NCBI *GenBank* melalui tautan: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Peneliti login menggunakan akun yang telah terdaftar di NCBI lalu dipilih fitur *All Resouces, GenBank: Banklt*, dan submit *new sequences to GenBank* sesuai gen yang akan didaftarkan. Selanjutnya jika menggunakan *DNA Barcode ITS-2*, fitur yang dipilih adalah *Ribosomal RNA (Rrna) or rRNA-ITS* dan diklik *start*. Selanjutnya klik *new submission, rRNA-ITS, Eukaryotic nuclear rRNA-ITS, contains rRNA-ITS region* dan judul dituliskan sesuai jenis file yang akan disubmit. Diisikan data *submitter* sesuai afiliasi dari peneliti yang mendaftarkan sekuens tersebut. Selanjutnya diisikan jenis metode DNA sekuensing yang digunakan, *assembled sequences, data release* dari sekues tersebut, lalu diunggah data dengan format FASTA, jenis sampel, diunggah *tab-delimited table*, data referensi, *author* dari sekuens tersebut dan data siap didaftarkan.

e. Analisis Variasi Genetik

Analisis variasi genetik dilakukan melalui proses BLAST (*Basic Local Alignment Sequence*) pada masing-masing sekuen *contig* dihalaman NCBI. Selanjutnya diunduh beberapa sekuen pembanding dari NCBI yang muncul. Pemilihan sekuen hasil BLAST didasarkan nilai *query cover*, *percent identity* dan *expectation value (E-value)* dengan nilai yang paling tinggi. Setelah itu keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak dan sekuen pembanding dari NCBI yang telah diunduh dilakukan proses *alignment* menggunakan program Clustal-W pada aplikasi MEGA 11 untuk melihat variasi genetik pada seluruh sekuen.

f. Rekonstruksi Pohon Filogenetik

Pohon filogenetik direkonstruksi dari hasil sekuensing amplifikasi *S. samarangense* dari Kabupaten Demak dan sekuen pembanding dari NCBI menggunakan aplikasi MEGA 11 dengan metode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)* dengan *bootstrap* 1000 dan Kimura 2 parameter.

g. Analisis Jarak Genetik

Data hasil *alignment* sekuens dianalisis jarak genetiknya menggunakan *pairwise distance* pada aplikasi MEGA 11.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Deskripsi Hasil Penelitian

1. Parameter Lingkungan Tempat Budidaya Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) Kultivar Delima dan Citra di Kabupaten Demak

Jambu semarang yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari beberapa desa di Kabupaten Demak yaitu Desa Botorejo, Desa Wonosari, dan Desa Tempuran. Jambu semarang kultivar Citra dan Delima dapat ditemukan di ketiga desa tersebut. Berdasarkan hasil pengamatan parameter lingkungan dari Desa Botorejo, Desa Wonosari, dan Desa Tempuran diketahui terdapat perbedaan namun tidak signifikan.

Apabila dilakukan pengamatan secara deskriptif, ketiga desa tersebut memiliki pH tanah yang sama. Desa Wonosari memiliki suhu udara dan ketinggian yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan Desa Tempuran dan Desa Botorejo. Sementara itu, Desa Tempuran memiliki kelembaban yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan Desa Wonosari dan Desa Botorejo. Desa Botorejo memiliki intensitas cahaya dan suhu tanah yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan Desa Wonosari dan Desa Tempuran.

Data parameter lingkungan lokasi budidaya *S. samarangense* kultivar Citra dan Delima di Kabupaten Demak tersaji pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Parameter lingkungan lokasi budidaya kultivar *S. samarangense* di Kabupaten Demak

Jenis Parameter Lingkungan	Lokasi Budidaya		
	Desa Wonosari	Desa Tempuran	Desa Botorejo
Suhu Udara (°C)	36±1,47 ^a	34±0,05 ^a	34±0,50 ^a
pH	7.0±0 ^a	7.0±0 ^a	7±0,28 ^a
Intensitas Cahaya (Cd)	63±24,1 ^a	93±56,5 ^a	394±69,0 ^a
Suhu Tanah (°C)	31±1,73 ^a	29±1,73 ^a	32±2,30 ^a
Ketinggian (mdpl)	99±1,15 ^a	97±0 ^a	95±0,57 ^a
Kelembaban	57±4,61 ^a	65±3,78 ^a	50±0 ^a

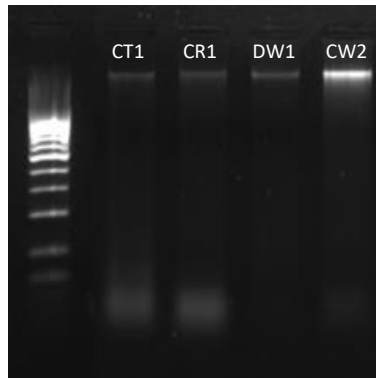
Huruf a : tidak ada beda nyata secara statistik pada tingkat kepercayaan 95%

Berdasarkan analisis statistik pada Tabel Lampiran 1 menunjukkan hasil perhitungan parameter lingkungan menggunakan *OneWay* ANOVA. Pada uji *OneWay* ANOVA

perlu diperhatikan nilai *p value* (sig). Jika nilai *p value* (sig) lebih besar dari α (0.05) menandakan bahwa setiap kelompok homogen. Berdasarkan uji *OneWay* ANOVA ketiga lokasi budidaya *S. samarangense* di Kabupaten Demak, didapatkan nilai sig (0,535) yang berarti lebih besar dari α (0,05), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan parameter lingkungan dari Desa Botorejo, Desa Wonosari, dan Desa Tempuran.

2. Isolasi DNA Genom Jambu Semarang (*S. samarangense*) Kultivar Delima dan Citra di Kabupaten Demak

Kedelapan sampel jambu *S. samarangense* yang telah dilakukan isolasi DNA menunjukkan bahwa terdapat empat sampel yang berhasil diisolasi dengan baik dan empat sampel lainnya tidak berhasil diisolasi. Hasil isolasi yang baik ditandai dengan adanya pita tunggal yang jelas dan tidak terdapat *smear*. Sampel yang berhasil diisolasi dengan baik adalah sampel Citra Tempuran (CT1), Citra Botorejo (CR1), Delima Wonosari (DW1), dan Citra Wonosari (CW2). Hasil visualisasi isolasi DNA keempat sampel *S. samarangense* yang berhasil diisolasi tersaji pada Gambar 4.1.

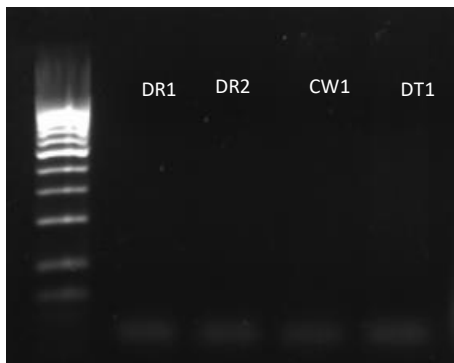


Gambar 4.1 Hasil elektroforesis isolasi DNA *S. samarangense* yang berhasil diisolasi yaitu kultivar Citra Tempuran (CT1), Citra Botorejo (CR1), Citra Wonosari (CW2) dan Delima Wonosari (DW1)

Berdasarkan Gambar 4.1 dapat diketahui bahwa sampel jambu semarang kultivar Citra dari desa Tempuran (CT1) dan kultivar Citra dari desa Botorejo (CR1) memiliki pita yang tipis dan tampak adanya *smear*. Sampel jambu semarang kultivar Delima dari desa Wonosari (DW1) memiliki pita yang tipis tetapi tidak ada *smear*, sementara itu kultivar Citra dari desa Wonosari (CW2) terlihat memiliki pita yang tebal tetapi masih terdapat *smear*.

Sampel yang tidak berhasil diisolasi adalah DR1, DR2, CW1, dan DT1. Sampel yang tidak berhasil diisolasi ditandai dengan tidak adanya pita DNA yang muncul. Hasil

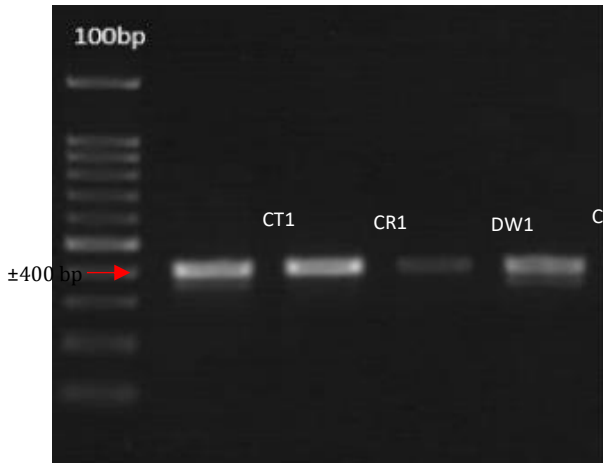
visualisasi isolasi DNA keempat sampel *S. samarangense* yang tidak berhasil diisolasi tersaji pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil elektroforesis sampel yang tidak berhasil diisolasi

3. Amplifikasi *DNA Barcode* ITS-2 Jambu Semarang (*S. samarangense*) Kultivar Delima dan Citra di Kabupaten Demak

Keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak berhasil teramplifikasi dengan baik menggunakan *DNA barcode* ITS-2 dengan ukuran sesuai target yaitu sekitar 400 bp. Hasil amplifikasi tersaji pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Visualisasi elektroforesis produk PCR sampel *S. samarangense* kultivar Citra Tempuran (CT1), Citra Botorejo (CR1), Citra Wonosari (CW2) dan Delima Wonosari (DW1)

Berdasarkan Gambar 4.3 dapat diketahui bahwa hasil amplifikasi sampel *S. samarangense* kultivar Citra Tempuran (CT1), Citra Botorejo (CR1), Citra Wonosari (CW2) dan Delima Wonosari (DW1) memperlihatkan hasil yang baik yaitu mempunyai pita tunggal yang cukup besar, tebal dan jelas. DNA yang tervisualisasi telah sesuai target dari sekuen ITS-2 yaitu sekitar 400 bp.

4. Elektroforegram Sekuen Jambu Semarang (*S. samarangense*) di Kabupaten Demak

Berdasarkan hasil elektroforegram dapat diketahui bahwa keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak menghasilkan elektroforegram yang baik sehingga memudahkan dalam proses *contig* (penggabungan sekuens *forward* dan *reverse*). Panjang sekuen setelah *contig* pada sampel Citra Botorejo adalah 396 bp, Citra Tempuran adalah 403 bp, Citra Wonosari adalah 399 bp, dan Delima Wonosari adalah 397 bp.

Hasil sekuensing yang baik ditandai dengan elektroforegram yang memiliki puncak yang tinggi dan saling terpisah satu sama lain. Elektroforegram keempat sampel memiliki elektroforegram dengan *peak* yang terbentuk baik. Data elektroforegram parsial tersaji pada Gambar Lampiran 2. Data sekuensing sampel *S. samarangense* berupa data *forward* dan *reverse* diolah melalui aplikasi BioEdit untuk memperoleh sekuen *contig*. Sekuen *contig* keempat sampel *S. samarangense* tersaji pada Lampiran 1. Keempat sampel *S. samarangense* yang terbaca pada aplikasi Geneious v5.6.7 memiliki nilai %HQ (*High Quality*) elektroforegram antara 82.9% sampai 87.9%. Nilai %HQ yang baik adalah sekitar 70-100%. Nilai %HQ pada

keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak tersaji pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Nilai %HQ (*High Quality*) sampel *S. samarangense*

	Sampel	%HQ
Citra	<i>Forward</i>	86.7%
Tempuran	<i>Reverse</i>	83.1%
Citra	<i>Forward</i>	87.5%
Botorejo	<i>Reverse</i>	82.9%
Delima	<i>Forward</i>	87.9%
Wonosari	<i>Reverse</i>	85.1%
Citra	<i>Forward</i>	87.5%
Wonosari	<i>Reverse</i>	85.8%

5. Pendaftaran *Accession Number* NCBI *GenBank*

Keempat sekuen sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak telah didaftarkan ke NCBI *GenBank* dan berhasil mendapatkan *accession number* dengan rincian seperti yang tersaji pada Lampiran 2. Keempat sampel tersebut telah terdaftar dengan rincian sesuai organisasi gen ITS-2 yaitu 5.8S *ribosomal RNA gene (partial sequence)*; *internal transcribed spacer 2 (complete sequence)*, dan *large subunit ribosomal RNA gene (partial sequence)*. Daftar

accession number keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak tersaji pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Daftar *Accession Number* Keempat Sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak

Jenis Kultivar	Lokasi	Kode	<i>Accession Number</i>
<i>S. samarangense</i>	Budidaya	Sampling	
Citra	Tempuran	CT1	OQ581467
Citra	Botorejo	CR1	OQ581466
Citra	Wonosari	CW2	OQ581468
Delima	Wonosari	DW1	OQ581469

6. Analisis *DNA Barcoding* Jambu Semarang (*S. samarangense*)

Keempat sampel *S. samarangense* hasil *contig* selanjutnya digunakan pada proses *blasting* di NCBI dan proses *alignment* di MEGA 11 sebagai data identifikasi pembuatan pohon filogenetik. Hasil BLAST tersebut menunjukkan kemiripan dari suatu sekuen yang diteliti dengan sekuen spesies-spesies yang ada di *database* NCBI. Sebanyak 100 spesies hasil BLAST sampel *S. samarangense* terdiri dari genus *Syzygium* (98%), dan beberapa genus lain seperti genus *Terminalia* (1%) dan genus *Badula* (1%). Daftar spesies hasil BLAST tersaji pada Tabel Lampiran 2. Sebanyak 13 spesies yang memiliki nilai *percent identity*

yang paling tinggi dipilih dan diunduh dalam format FASTA untuk dilakukan proses *alignment* lalu data di simpan dalam format mega untuk rekonstruksi pohon filogenetik.

Sebanyak empat sekuen hasil *contig* sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak, 13 sekuen genus *Syzygium* hasil BLAST di NCBI dan 1 sekuen dari genus *Carica* sebagai *outgroup* diolah melalui proses *alignment* menggunakan program ClustalW. Keempat sekuen *S. samarangense* dari Kabupaten Demak dilakukan pemotongan sekuen (*trimming*) mengikuti sekuen terpendek atau panjang rata-rata seluruh sekuen. Panjang sekuen setelah dilakukan proses *trimming* pada sampel Citra Wonosari adalah 373 bp, Citra Botorejo adalah 372 bp, Citra Tempuran adalah 371 bp, dan Delima Wonosari adalah 373 bp. Daftar sekuen genus *Syzygium* hasil BLAST yang digunakan pada pohon filogenetik tersaji pada Tabel Lampiran 2 sedangkan data hasil alignment tersaji pada Lampiran 3.

Seluruh sekuen selanjutnya dilakukan analisis jarak genetik. Nilai jarak genetik diperoleh dari analisis perbedaan dan persamaan nukleotida. Analisis jarak genetik tersaji pada Tabel 4.4. Berdasarkan tabel tersebut jika dilihat berdasarkan nilai jarak genetik, maka *S. samarangense* ketiga sampel kultivar Citra saling

berkerabat dekat satu sama lain. Ketiga sampel kultivar Citra saling berkerabat dekat, sedangkan sekuen kultivar Delima jika dibandingkan dengan ketiga sekuen kultivar Citra memiliki nilai jarak genetik yang lebih besar. Berdasarkan hal tersebut menunjukkan bahwa perbedaan kultivar mempengaruhi nilai jarak genetik dan perbedaan lokasi desa pertumbuhan pada kultivar yang sama pada *S. samarangense* tidak berpengaruh terhadap nilai jarak genetik. Jarak genetik semua sekuen *Syzygium* memiliki nilai yang cukup besar dikarenakan berasal dari spesies yang berbeda. Nilai jarak genetik tertinggi yaitu pada sekuen *Carica papaya* dengan semua sekuen *Syzygium*. Hal tersebut dikarenakan *Carica papaya* merupakan *outgroup* yang berasal dari genus yang berbeda.

Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan metode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). Rekonstruksi pohon filogenetik empat kultivar *S. samarangense* dari Kabupaten Demak tersaji pada Gambar 4.4. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik selaras dengan nilai jarak genetik yaitu sekuen *S. samarangense* dari Kabupaten Demak memisah sesuai perbedaan kultivar. Kultivar Citra mengelompok pada satu kluster sedangkan Kultivar Delima memisah pada cabang paling bawah.

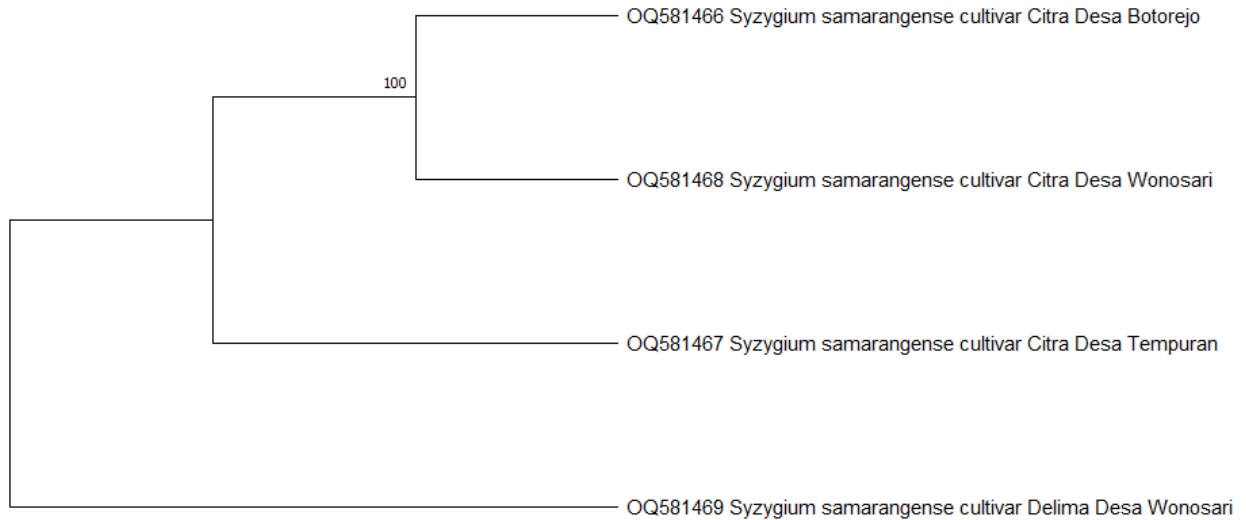
Pohon filogenetik keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak dan 14 sekuen pembandingan dari NCBI direkonstruksi menggunakan metode UPGMA dan Kimura-2 parameter menggunakan nilai *bootstrap* 1000x pengulangan tersaji pada Gambar 4.5. Berdasarkan pohon filogenetik tersebut dapat diketahui bahwa sekuen *S. samarangense* dari Kabupaten Demak dan sekuen *S. samarangense* pembandingan dari NCBI mengelompok pada klaster yang sama dan memisah dengan sekuen *Syzygium* lainnya. Hal tersebut menandakan bahwa spesies dengan hubungan kekerabatan yang dekat akan tergabung dalam satu klaster.

Tabel 4.4 Tabel jarak genetik sekuen genus *Syzygium*

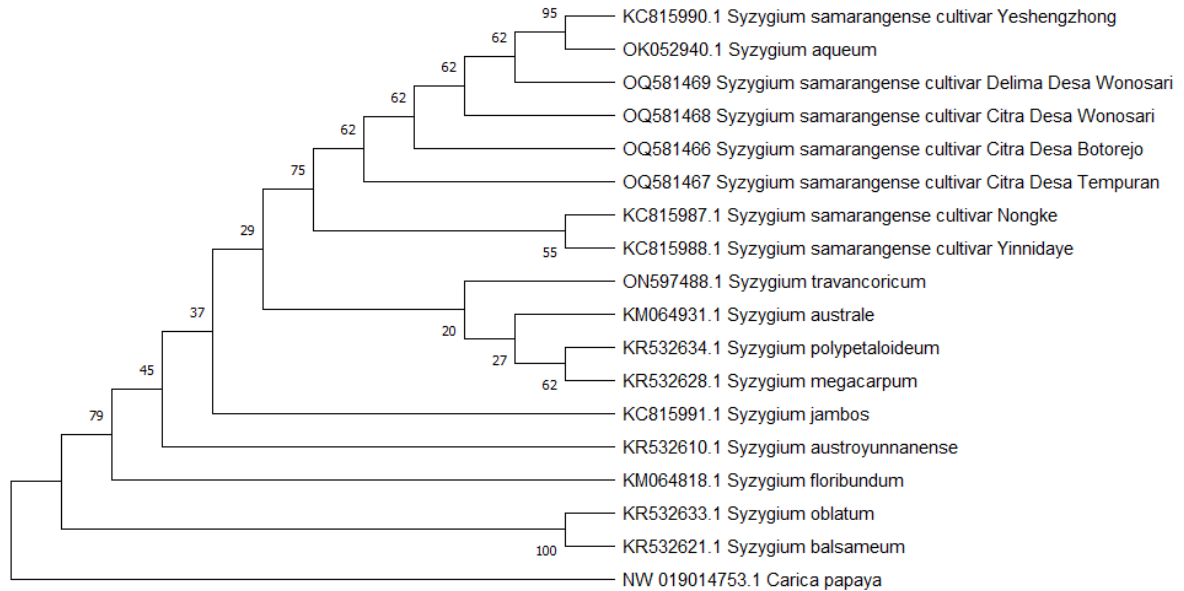
	<i>Carica papaya</i>	<i>S. samarangense cult. Nongke</i>	<i>S. samarangense cult. Yeshengzhong</i>	Sampel DW1	Sampel CW2	Sampel CR1	Sampel CT1	<i>S. samarangense cult. Yinnidaye</i>	<i>S. australe</i>
<i>Carica papaya</i>									
<i>S. samarangense cult. Nongke</i>	1,33529								
<i>S. samarangense cult. Yeshengzhong</i>	1,33123	0,00820							
Sampel DW1	1,65367	1,15893	1,16366						
Sampel CW2	1,65367	1,15135	1,15619	0,00538					
Sampel CR1	1,67331	1,12634	1,13074	0,00540	0,00270				
Sampel CT1	1,65664	1,13426	1,13877	0,00541	0,00270	0,00270			
<i>S. samarangense cult. Yinnidaye</i>	1,35657	0,00822	0,01096	1,17617	1,16859	1,14273	1,15093		
<i>S. australe</i>	1,32210	0,01655	0,00822	1,16465	1,15735	1,13141	1,13954	0,01376	
<i>S. travancoricum</i>	1,30167	0,02513	0,01664	1,15176	1,14446	1,11895	1,12692	0,02799	0,01386

	<i>Carica papaya</i>	<i>S. samarangense</i> <i>cult. Nongke</i>	<i>S. samarangense</i> <i>cult. Yeshengzhong</i>	Sampel DW1	Sampel CW2	Sampel CR1	Sampel CT1	<i>S. samarangense</i> <i>cult. Yinnidaye</i>	<i>S. australe</i>
<i>S. floribundum</i>	1,41499	0,02784	0,02503	1,21428	1,20687	1,17857	1,18749	0,02499	0,02223
<i>S. jambos</i>	1,34251	0,02225	0,01382	1,15572	1,14836	1,12287	1,13086	0,01942	0,01105
<i>S. balsameum</i>	1,75061	1,14740	1,15228	0,05041	0,04757	0,05051	0,04477	1,16465	1,15346
<i>S. austro-yunannense</i>	1,81038	1,19709	1,20296	0,03321	0,03042	0,03328	0,03337	1,21632	1,20520
<i>S. megacarpum</i>	1,72496	1,14740	1,15228	0,01357	0,01085	0,01359	0,01363	1,16465	1,15346
<i>S. oblatum</i>	1,75061	1,16465	1,16982	0,05336	0,05051	0,05347	0,04770	1,18251	1,17132
<i>S. polypetal- oideum</i>	1,68494	1,14740	1,15228	0,01083	0,00811	0,01085	0,01088	1,16465	1,15346
<i>S. aqueum</i>	1,41433	0,00563	0,00280	0,00553	0,01110	0,00831	0,00831	0,00847	0,02630

	<i>S. travancoricum</i>	<i>S. floribundum</i>	<i>S. jambos</i>	<i>S. balsameum</i>	<i>S. austroyunnanense</i>	<i>S. megacarpum</i>	<i>S. oblatum</i>	<i>S. polypetaloidium</i>	<i>S. aqueum</i>
<i>S. floribundum</i>	0,03676								
<i>S. jambos</i>	0,02242	0,02229							
<i>S. balsameum</i>	1,14057	1,20296	1,14446						
<i>S. austroyunnanense</i>	1,19128	1,26036	1,17630	0,05661					
<i>S. megacarpum</i>	1,14057	1,20296	1,14446	0,04183	0,02480				
<i>S. oblatum</i>	1,15811	1,22257	1,16201	0,00268	0,05961	0,04474			
<i>S. polypetaloidium</i>	1,14057	1,20296	1,14446	0,03893	0,02199	0,00270	0,04183		
<i>S. aqueum</i>	0,04290	0,03217	0,03439	0,04856	0,03689	0,01669	0,05156	0,01387	



Gambar 4.4 Rekonstruksi pohon filogenetik empat kultivar jambu semarang dari Kabupaten Demak dengan metode UPGMA dan Kimura-2 parameter menggunakan nilai *bootstrap* 1000x pengulangan



Gambar 4.5 Rekonstruksi pohon filogenetik dengan metode UPGMA dan Kimura-2 parameter menggunakan nilai *bootstrap* 1000x pengulangan

7. Variasi Genetik DNA *Barcode* ITS-2 Kultivar Jambu Semarang (*S. samarangense*)

Keempat sampel kultivar *S. samarangense* dari Kabupaten Demak dan sekuen pembanding dari NCBI dilakukan karakterisasi untuk mengetahui komposisi nukleotida dari masing-masing sekuen. Sekuen sampel *S. samarangense* dan sekuen dari genus *Syzygium* hasil BLAST memiliki persentase komposisi nukleotida yang berbeda-beda. Komposisi nukleotida beberapa sekuen tersebut tersaji pada Tabel 4.5. Berdasarkan tabel tersebut menunjukkan bahwa nukleotida paling banyak adalah cytidylate (C).

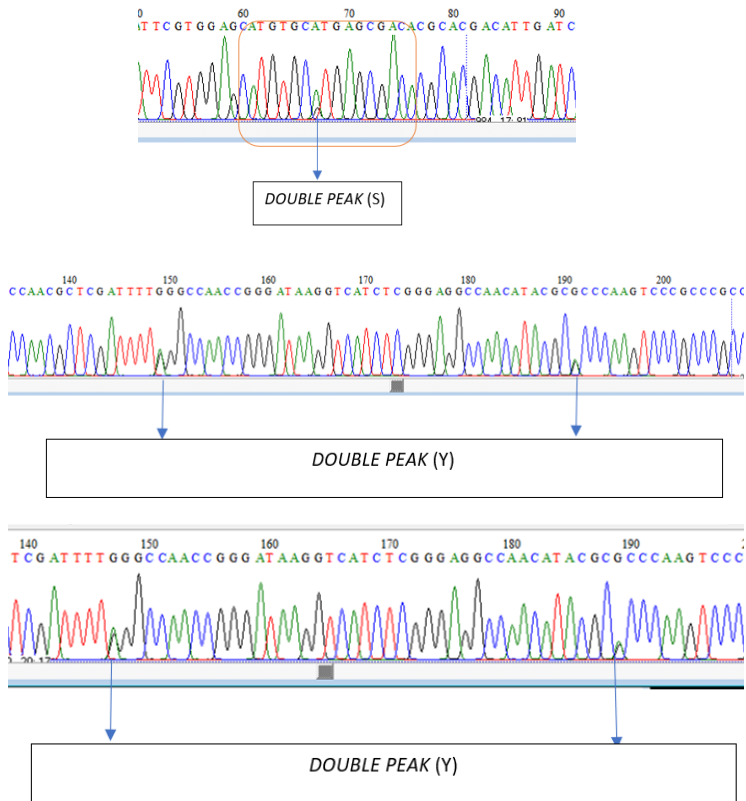
ITS-2 adalah sekuen *non-coding* DNA yang terletak di antara subunit 5,8S dan subunit 26S. Sebanyak empat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak, satu sekuen *S. samarangense* pembanding dari NCBI yaitu kultivar Nongke, dan dua sekuen *Syzygium* lain yaitu *S. aqueum* dan *S. jambos* dipilih untuk mewakili semua data dan dianalisis variasi genetiknya. Data tentang variasi nukleotida pada organisasi gen *DNA barcode* ITS-2 tersaji pada Tabel 4.6. Tabel tersebut menggambarkan variasi nukleotida wilayah 5.8S, ITS-2, dan 26S pada spesies *S. samarangense* dan spesies *Syzygium* lain.

Berdasarkan tabel tersebut dapat diketahui bahwa *DNA barcode* ITS2 memiliki variasi intraspesifik yang rendah dan memiliki keanekaragaman interspesifik. Variasi intraspesifik yaitu antar keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak pada wilayah ITS-2 hanya memiliki satu variasi nukleotida yaitu berupa C188T. Wilayah 5.8S memiliki satu variasi yaitu S54G pada sekuen Delima Wonosari sedangkan pada wilayah 26S memiliki satu variasi yaitu Y341C.

Keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak dan sekuen *Syzygium* lainnya memiliki variasi nukleotida yang tinggi pada wilayah ITS-2 jika dibandingkan dengan wilayah 5.8S dan 26S. Variasi paling tinggi pada wilayah ITS-2 ditemukan pada sekuen *S. jambos* yaitu sebanyak delapan variasi yaitu A133G, T146Y, C152T, A171C, G238A, G262C, C264T, dan T273Y.

Salah satu jenis variasi genetik yang ditemukan pada keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak adalah adanya *double peak*. Adanya *double peak* tersebut mewakili dua nukleotida yang berbeda. *Double peak* yang ditemukan adalah simbol 'Y' pada keempat

sampel dan simbol 'S' hanya ditemukan pada sampel Delima Wonosari.



Gambar 4.6 Variasi genetik berupa *double peak* pada keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak (warna merah : *deoxythymidylate*, hijau : *adenylate*, hitam : *guanylate*, biru : *cytidylate*)

Tabel 4.5 Persentase komposisi sekuen nukleotida genus *Syzygium*

No.	Sekuen	Komposisi Nukleotida (%)				Total (bp)
		T	C	A	G	
1.	OQ581469 <i>Syzygium samarangense</i> cultivar Delima Desa Wonosari	23,0	27,8	21,7	27,3	373
2.	OQ581468 <i>Syzygium samarangense</i> cultivar Citra Desa Wonosari	23,0	27,8	21,4	27,6	373
3.	OQ581466 <i>Syzygium samarangense</i> cultivar Citra Desa Botorejo	22,5	28,2	21,5	27,6	372
4.	OQ581467 <i>Syzygium samarangense</i> cultivar Citra Desa Tempuran	22,3	28,3	21,5	27,7	371
5.	KC815987.1 <i>Syzygium samarangense</i> cultivar Nongke	19,0	28,5	23,9	28,5	368
6.	KC815990.1 <i>Syzygium samarangense</i> cultivar Yeshengzhong	19,0	28,2	24,1	28,5	368

Tabel 4.5 Lanjutan

No.	Sekuen	Komposisi Nukleotida (%)				Total (bp)
		T	C	A	G	
7.	OK052940.1 <i>Syzygium aqueum</i>	22,2	28,0	22,2	27,4	364
8.	KC815988.1 <i>Syzygium samarangense</i> cultivar Yinnidaye	19,0	28,5	24,1	28,2	368
9.	KM064931.1 <i>Syzygium australe</i>	19,3	28,0	24,5	28,0	367
10.	ON597488.1 <i>Syzygium travancoricum</i>	20,2	27,3	24,6	27,6	365
11.	KM064818.1 <i>Syzygium floribundum</i>	18,8	28,8	25,0	27,2	367
12.	KC815991.1 <i>Syzygium jambos</i>	18,3	28,9	24,5	28,1	366
13.	KR532621.1 <i>Syzygium balsameum</i>	22,7	27,8	21,1	28,3	374
14.	KR532610.1 <i>Syzygium austroyunnanense</i>	22,6	27,4	21,2	28,5	371
15.	KR532628.1 <i>Syzygium megacarpum</i>	22,5	27,9	21,2	28,2	372
16.	KR532633.1 <i>Syzygium oblatum</i>	22,9	27,5	21,1	28,3	374
17.	KR532634.1 <i>Syzygium polypetaloides</i>	22,8	27,6	21,2	28,2	372

Tabel 4.5 Lanjutan

No.	Sekuen	Komposisi Nukleotida (%)				Total (bp)
		T	C	A	G	
18.	NW 019014753.1 <i>Carica papaya</i> cultivar SunUp	25,6	27,0	35,0	12,2	351
	Rata-rata	21,4	28,0	23,3	27,0	368

Tabel 4.6 Variasi Nukleotida pada Organisasi Gen *DNA Barcode ITS-2*

Sekuen	Posisi Nukleotida												
	5.8S			ITS-2									26S
	54	67	69	133	146	152	171	188	238	262	264	273	341
KC815987.1 <i>S. samarangense</i> cult. Nongke	G	C	T	G	Y	T	C	T	A	C	T	Y	C
OQ581467 <i>S. samarangense</i> cult. Citra Tempuran	C
OQ581466 <i>S. samarangense</i> cult. Citra Botorejo	C	Y
OQ581469 <i>S. samarangense</i> cult. Delima Wonosari	S	C
OQ581468 <i>S. samarangense</i> cult. Citra Wonosari	C
OK052940.1 <i>S. aqueum</i>	T	C	.
KC815991.1 <i>S. jambos</i>	.	T	G	A	T	C	A	.	G	G	C	T	.

B. Pembahasan Hasil Penelitian

1. Parameter Lingkungan Tempat Budidaya Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) Kultivar Delima dan Citra di Kabupaten Demak

Parameter lingkungan di tempat budidaya tanaman *S. samarangense* menunjukkan ketinggian yang tidak berbeda. Tanah dari ketiga desa lokasi budidaya memiliki pH yang cenderung netral dengan suhu tanah, suhu udara dalam kelembaban relatif yang hampir sama. Akan tetapi pada Desa Wonosari memiliki intensitas cahaya yang cenderung rendah dikarenakan rimbunnya wilayah budidaya tanaman *S. samarangense*.

Tanaman *S. samarangense* memiliki kemampuan beradaptasi yang cukup besar di daerah tropis baik di dataran rendah maupun di dataran dengan ketinggian 1.000 m di atas permukaan laut. Tanaman ini dapat tumbuh dengan baik dengan kelembapan udara sekitar 50 hingga 80%. pH tanah ideal bagi pertumbuhannya sebesar 5,5 hingga 7,5 dan sangat cocok tumbuh pada tanah yang datar (Joko, 2014). Hal tersebut menunjukkan bahwa karakteristik lingkungan di Desa Wonosari, Desa Botorejo, dan Desa Tempuran di Kabupaten Demak sesuai dengan tempat pertumbuhan *S. samarangense*.

2. Isolasi DNA Genom Jambu Semarang (*S. samarangense*) Kultivar Delima dan Citra di Kab. Demak

Hasil visualisasi elektroforesis isolasi DNA genom daun keempat sampel *S. samarangense* yang berhasil diisolasi menunjukkan adanya pita DNA yang tervisualisasi dengan jelas dan tebal. Semakin tebal pita DNA yang terbentuk maka semakin tinggi konsentrasi DNA sampel daun *S. samarangense* yang berhasil terisolasi. Hasil isolasi menunjukkan pada beberapa sampel terdapat noda memanjang di bawah pita DNA yang disebut dengan istilah *smear*. Adanya *smear* pada pita DNA disebabkan oleh beberapa faktor seperti kandungan protein atau materi selain DNA yang masih terbawa hingga tahapan elusi DNA (Ratnasari & Faridah, 2019). Adanya *smear* juga dapat terjadi karena tingginya kadar metabolit sekunder dari sampel daun yang digunakan dan jenis kit yang digunakan belum dapat membuang metabolit sekunder tersebut dengan baik. Optimasi isolasi DNA selanjutnya dapat dilakukan menggunakan *Plant DNA Kit* (TianGen). Hal tersebut didasarkan pada penelitian Octavia *et al.*, (2021) yang membandingkan kit TianGen dan jenis kit lain untuk isolasi DNA pada beberapa sampel tumbuhan. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kit TianGen dinilai

lebih baik dengan tingkat keberhasilan munculnya pita DNA yang lebih tinggi daripada jenis kit isolasi lainnya. Pada penelitian ini, adanya *smear* pada isolasi DNA tidak mempengaruhi hasil PCR.

3. Amplifikasi *DNA Barcode* ITS-2 Jambu Semarang (*S. samarangense*) Kultivar Delima dan Citra di Kab. Demak

Pasangan primer Cheng *et al.*, 2016 yang digunakan dalam penelitian ini adalah ITS-2 *degenerate* (ITS u-3 dan ITS u-4). Pasangan primer ini dapat digunakan untuk mengamplifikasi wilayah ITS-2 dari kultivar *S. samarangense*. Berdasarkan gambar tersebut menandakan jika DNA berhasil diisolasi dan diamplifikasi. Hasil amplifikasi sampel *S. samarangense* memperlihatkan hasil yang baik yaitu pita tunggal yang cukup besar, tebal dan jelas. DNA yang tervisualisasi telah sesuai target dari sekuen ITS-2 yaitu sekitar 400 bp. Menurut Chen (2010), region ITS-2 memiliki ukuran yang cukup pendek yaitu sekitar 160-400 bp.

Hasil visualisasi sampel *S. samarangense* berupa pita tunggal yang cukup besar, tebal dan jelas menandakan bahwa DNA yang diperoleh utuh dan tidak ada *smear* saat proses elektroforesis. DNA dengan kualitas baik ditandai dengan pita yang bersih dan tebal saat proses visualisasi

(Taariwuan *et al.*, 2021). DNA dengan kualitas baik merupakan hal yang penting karena pita DNA yang utuh dan tunggal akan menghasilkan data sekuensing yang lebih akurat. Keunggulan pasangan primer *degenerate* adalah dapat mewakili dua macam atau lebih nukleotida pada sampel sehingga kemungkinan pengikatan primer ke DNA cetakan menjadi lebih tinggi. Selain itu, kondisi PCR telah dioptimasi hingga menemukan kondisi PCR yang paling sesuai untuk kultivar *S. samarangense*.

4. Elektroforegram Sekuen Jambu Semarang (*S. samarangense*) di Kabupaten Demak

Hasil sekuensing berupa elektroforegram yang memiliki 4 warna puncak-puncak yang berbeda. Hasil sekuensing yang baik ditandai dengan elektroforegram yang memiliki puncak yang tinggi dan saling terpisah satu sama lain. Hasil sekuensing yang kurang baik ditandai dengan elektroforegram yang memiliki puncak yang landai, tidak terpisah, dan memiliki puncak ganda (*double peak*) (Bangol *et al.*, 2014). Hasil elektroforegram sampel *S. samarangense* memiliki puncak-puncak yang bervariasi dan menunjukkan sebagian besar elektroforegram tersebut memiliki kualitas yang cukup baik. Hal tersebut dikarenakan keempat sampel *S. samarangense* yang di sekuensing memiliki nilai %HQ (*High Quality*)

elektroforegram antara 82.9% hingga 87.9%. Nilai HQ tersebut menggambarkan kualitas puncak dari suatu elektroforegram. Semakin tinggi nilai HQ maka puncak elektroforegram yang terbentuk semakin baik (Wardi *et al.*, 2020). Elektroforegram sampel *S. samarangense* memiliki elektroforegram dengan puncak yang terbentuk jelas dan hanya sedikit *peak* yang tumpang tindih.

5. Analisis DNA Barcoding Jambu Semarang (*S. samarangense*)

Data sekuensing sampel *S. samarangense* berupa data *forward* dan *reverse* dilakukan pengeditan dan penggabungan untuk menghasilkan sekuen *contig* menggunakan aplikasi BioEdit (Hall, 1999). Sekuen *contig* yang telah diperoleh kemudian dilakukan analisis melalui BLAST di NCBI. Tujuan melakukan proses BLAST adalah membandingkan nukleotida suatu sekuen dan menghitung nilai kesamaan secara statistik (Pangestika *et al.*, 2015). Sebanyak 100 sekuen dengan kemiripan yang paling tinggi dengan sekuen sampel yang dibandingkan akan muncul.

Hasil yang diperoleh dari proses BLAST adalah 98 sekuen dari genus *Syzygium*, satu sekuen dari genus *Terminalia* dan satu sekuen dari genus *Badula*. Pemilihan 14 sekuen *Syzygium* hasil BLAST seperti yang tersaji pada Tabel Lampiran 3 berdasarkan nilai persentase *query cover*

yang tinggi yaitu antara 93% hingga 100%; nilai *percent identity* yang tinggi yaitu antara 95.05% hingga 99.49%; dan nilai *expectation value* antara 0.0 hingga $8e-179$.

Pemilihan sekuen hasil BLAST didasarkan nilai *query cover*, *percent identity* dan *expectation value* (E-value) dengan nilai yang paling tinggi. Nilai *query cover* menunjukkan persentase jumlah nukleotida sekuen sampel sama dengan sekuen pembanding di *GenBank*. Nilai *expectation value* (*e-value*) menggambarkan total perbedaan *alignment* dengan skor yang sesuai di *GenBank*. Nilai *e-value* yang semakin rendah maka semakin rendah pula perbedaan suatu sekuen (nilai homologi sekuen tinggi). Pemilihan tingginya nilai *percent identity* dikarenakan semakin tinggi nilai *percent identity* tersebut maka nilai homologi atau kemiripan suatu spesies dengan spesies tertentu akan semakin besar (Sofiyanti & Isda, 2019).

Berdasarkan hasil BLAST sekuen sampel *S. samarangense* menunjukkan nilai homologi pada tingkat genus hingga tingkat dibawah spesies yang bervariasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa *DNA barcode* ITS-2 memiliki kemampuan untuk membedakan hingga tingkatan di bawah spesies (kultivar). *DNA region* inti seperti ITS-2 pada saat proses pembelahan sel sering mengalami pindah silang

sehingga rekombinan yang dihasilkan memiliki variasi genetik yang banyak.

Proses *alignment* menggunakan program Clustal-W pada aplikasi MEGA 11. Sekuen yang dianalisis antara lain empat sekuen sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak, 13 sekuen spesies *Syzygium* dan satu spesies dari genus lain yaitu *Carica papaya* sebagai *outgrup*. Pemilihan *Carica papaya* sebagai *outgrup* dilakukan berdasarkan penelitian Wei *et al.*, (2022) yang menggunakan *Carica papaya* sebagai *outgrup* dalam merekonstruksi pohon filogenetik sampel *S. samarangense*.

ClustalW merupakan suatu program yang sering digunakan dalam pembuatan *multiple sequence alignment*. ClustalW memiliki beberapa kelebihan antara lain dapat dijalankan pada semua platform, dapat dijalankan pada sekuen protein atau DNA, mampu menangani beberapa format input (PIR, Swiss-Prot, dan FASTA), dan mampu mengolah data yang besar hingga 500 sekuen secara cepat (Alzohairy, 2008).

Hasil *alignment* semua sekuen memiliki rata-rata panjang sekuen yaitu 368 bp. Sekuen yang memiliki ukuran paling panjang yaitu 374 bp (*Syzygium balsameum* dan *Syzygium oblatum*) dan sekuen paling pendek yaitu 351 bp (*Carica papaya* sebagai *outgrup*). Hal tersebut sesuai

dengan rata-rata panjang sekuen ITS-2 yang memiliki ukuran yang cukup pendek yaitu sekitar 160-400 bp (Chen, 2010).

Jarak genetik dianalisis untuk mengetahui hubungan kekerabatan. Jarak genetik merupakan nilai perbedaan suatu gen pada suatu spesies atau populasi yang dianalisis dan dihitung melalui kuantitas numerik (Saitou & Nei, 1987). Pada suatu spesies, semakin rendah nilai jarak genetik maka akan semakin dekat hubungan kekerabatannya (Irawan *et al.*, 2016). Secara teoritis, jarak genetik dalam kultivar *S. samarangense* pada umumnya rendah sehingga sekuen dengan kultivar yang sama akan mengelompok pada satu klaster. Berdasarkan analisis jarak genetik antar sekuen sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak menunjukkan bahwa sekuen dengan jarak genetik terendah yaitu pada ketiga sekuen *S. samarangense* kultivar Citra pada masing-masing desa yang memiliki kesamaan nilai jarak genetik antar ketiga sekuen tersebut yaitu sebesar 0,00270. Sekuen *S. samarangense* kultivar Delima (DW1) memiliki perbedaan jarak genetik dengan ketiga sekuen kultivar Citra yaitu antara lain dengan sekuen CW2 sebesar 0,00538; sekuen CR1 sebesar 0,00540; sekuen CT1 sebesar 0,00541. Berdasarkan jarak genetik tersebut dapat disimpulkan bahwa semua kultivar Citra

pada ketiga desa saling berkerabat dekat, sedangkan sekuen kultivar Delima jika dibandingkan dengan ketiga sekuen kultivar Citra memiliki nilai jarak genetik yang lebih besar. Berdasarkan hal tersebut menunjukkan bahwa perbedaan kultivar mempengaruhi nilai jarak genetik dan perbedaan lokasi desa pertumbuhan pada kultivar yang sama pada *S. samarangense* tidak berpengaruh terhadap nilai jarak genetik. Hal tersebut selaras dengan analisis statistik hasil perhitungan parameter lingkungan menggunakan *OneWay* ANOVA menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan parameter lingkungan dari Desa Botorejo, Desa Wonosari, dan Desa Tempuran. Oleh karena itu, tidak ada pengaruh faktor lingkungan terhadap jarak genetik dari *S. samarangense* yang berasal dari tiga tempat budidaya di Kabupaten Demak.

Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan metode UPGMA (*Unwight Pair Group Method with Arithmetic Average*) dengan nilai pengulangan *bootstrap* 1000 kali dan perhitungan jarak evolusi menggunakan Kimura 2-parameter (Kumar *et al.*, 2018). Pohon filogenetik menggambarkan kekerabatan suatu spesies dengan nenek moyang dari spesies yang lain sehingga kekerabatannya dapat diketahui (Su'udi, 2018). Hasil pohon filogenetik menunjukkan bahwa spesies dengan hubungan

kekerabatan yang dekat akan tergabung dalam satu klaster. Berdasarkan pohon filogenetik tersebut menunjukkan sekuen *S. samarangense* memisah sesuai perbedaan kultivar. Sampel *S. samarangense* kultivar Citra Desa Botorejo berkerabat dekat dengan *S. samarangense* kultivar Citra Desa Wonosari dan *S. samarangense* kultivar Citra Desa Tempuran. Sampel *S. samarangense* kultivar Delima berada memisah pada cabang berbeda. Hal tersebut dikarenakan kultivar Delima merupakan kultivar yang berbeda sehingga memiliki perbedaan nukleotida dari sampel kultivar Citra yang lainnya. Nilai *bootstrap* yang tertera adalah 100%. Nilai tersebut merupakan nilai yang paling tinggi dan menandakan tingkat kepercayaan cabang yang terbentuk tinggi. Nilai *bootstrap* yang semakin tinggi maka hasil rekonstruksi pohon memiliki kepercayaan topologi yang tinggi (Ubaidillah, 2009).

Keempat sampel kultivar *S. samarangense* dari Kabupaten Demak terpisah dari sekuen pembanding lain yang ada di *GenBank*. Hal tersebut dikarenakan sampel kultivar *S. samarangense* dari Kabupaten Demak memiliki variasi genetik pada nomor nukleotida yang berbeda dari sampel pembanding atau jenis variasi nukleotida yang berbeda dari sampel pembanding. Sekuen *S. samarangense* dengan kultivar yang berbeda akan memisah pada cabang

yang berbeda. Hal tersebut menandakan bahwa *DNA barcode* ITS-2 dapat digunakan untuk menganalisis variasi genetik pada tingkat kultivar. Hal tersebut selaras dengan penelitian Meitha *et al*, (2020) yang telah berhasil menggunakan *DNA barcode* ITS-2 untuk menganalisis variasi genetik pada 23 aksesori kultivar pisang di Indonesia.

Hasil kekerabatan filogenetik berdasarkan penanda ITS-2 selaras dengan hasil kekerabatan fenetik yang didasarkan pada karakter morfologi dari penelitian sebelumnya oleh Mukaromah dan Ulfah (2021) yang menyatakan bahwa *S. samarangense* kultivar Citra dan Delima dari Kabupaten Demak mengelompok secara terpisah menjadi dua klaster. Oleh karena itu, sifat karakter morfologi dari *S. samarangense* kultivar Citra dan Delima lebih dipengaruhi oleh jenis kultivar daripada oleh lokasi tempat budidaya. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Ananto (2022) yang melakukan pengamatan morfologi *S. samarangense* kultivar Citra dari beberapa desa di Kabupaten Demak yaitu Desa Betokan, Desa Jungpasir dan Desa Wonosari dari segi kualitas tidak ada perbedaan baik dari permukaan, warna, tekstur buah, daun, bunga maupun batang namun dalam segi kuantitas berupa panjang, lebar, dan berat terdapat perbedaan namun tidak signifikan. Hal tersebut dikarenakan hasil pengamatan parameter

lingkungan dari Desa Betokan, Desa Jungpasir dan Desa Wonosari diketahui tidak terdapat perbedaan secara signifikan. Selaras dengan penelitian Rachmah (2022) yang melakukan observasi di Desa Boyolali, Kabupaten Demak menunjukkan adanya tiga kultivar *S. samarangense* yang ditemukan, meliputi jambu semarang kultivar 'Citra', 'Delima', dan 'Madu Deli Hijau'. Hasil karakterisasi menunjukkan adanya keanekaragaman morfologi dari ketiga kultivar *S. samarangense*. Karakterisasi morfologi pada tanaman dilakukan untuk mengetahui ciri-ciri fenotip yang ditampilkan. Penelitian ini dilakukan pada lokasi yang sama sehingga memiliki karakteristik lingkungan yang cenderung homogen. Keanekaragaman yang diperoleh dipengaruhi oleh adanya perbedaan kultivar. Perbedaan susunan genetik menyebabkan adanya variasi yang diekspresikan pada fenotip tiap kultivar, sehingga ketika ditanam pada lingkungan yang sama, kultivar tersebut akan menghasilkan penampilan fenotip yang berbeda (Sinay *et al.*, 2016).

Rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode UPGMA. Metode UPGMA (*Unwight Pair Group Method with Arithmetic Average*) merupakan suatu metode yang membutuhkan kecepatan substitusi dari asam amino atau nukleotida menjadi seragam dan tidak berubah pada

seluruh proses evolusi (Isaev, 2004). Metode UPGMA menghitung nilai similaritas yaitu jumlah keseluruhan dari total sekuen yang identik dan total substitusi konservatif pada proses pensejajaran dua sekuen dengan mengabaikan adanya *gap*. Metode UPGMA merupakan metode yang sederhana dalam merekonstruksi pohon filogenetik dengan menghitung rata-rata perubahan sepanjang pohon adalah konstan. Metode UPGMA dimulai dengan menghitung panjang suatu cabang yang berada diantara sekuen terdekat yang saling berhubungan, lalu rata-rata jarak antar sekuen atau kelompok sekuen dan sekuen berikutnya dan seterusnya hingga seluruh sekuen yang termasuk dalam pohon. Hasil akhir metode UPGMA adalah memprediksi posisi *root* dari suatu pohon (Andriani, 2016). Metode UPGMA juga telah digunakan untuk merekonstruksi pohon filogenetik untuk mengidentifikasi kultivar kurma menggunakan *DNA barcoding* (Hani *et al.*, 2020).

6. Variasi Genetik *DNA Barcode* ITS-2 Kultivar Jambu Semarang (*S. samarangense*)

Keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak memiliki komposisi nukleotida dengan persentase yang hampir sama dengan komposisi *cytidylate* (C) dan *guanylate* (G) yang tinggi. Nukleotida *cytidylate* (C) dan

guanylate (G) memiliki jumlah yang paling banyak yaitu 28,0% dan 27,2%. Jumlah tersebut lebih banyak daripada jumlah nukleotida *deoxythymidylate* (T) dan *adenylate* (A) yaitu 21,4% dan 23,2%. Hal tersebut selaras dengan penelitian Meitha *et al* (2020) yang menjelaskan bahwa komposisi nukleotida sekuen region ITS-2 mengandung nukleotida *cytidylate* (C) dan *guanylate* (G) yang paling banyak.

DNA barcode ITS2 memiliki variasi intraspesifik yang rendah dan memiliki keanekaragaman interspesifik. Variasi intraspesifik yaitu antar keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak pada wilayah ITS-2 hanya memiliki satu variasi nukleotida yaitu berupa C188T. Hal tersebut menandakan bahwa wilayah ITS-2 sangat *conserve*. Hal tersebut selaras dengan penelitian Peltier *et al* (2017) yang menyatakan bahwa wilayah ITS-2 merupakan daerah yang *highly conserved* pada intraspesifik.

Wilayah ITS-2 memiliki keanekaragaman interspesifik yang tinggi. Hal tersebut dapat dilihat dari variasi nukleotida yang tinggi antara spesies *S. samarangense* dengan spesies *Syzygium* lainnya pada daerah ITS-2 jika dibandingkan daerah 5.8S dan 26S. Sekuen ITS-2 mempunyai homogenitas intraspesifik dan variabilitas interspesifik yang tinggi sehingga dapat dimanfaatkan

sebagai penanda pada proses identifikasi spesies yang mempunyai kekerabatan dekat (Wilkerson *et al.*, 2014). Hal tersebut selaras dengan penelitian Duan *et al.* (2019) yang menyatakan bahwa ITS-2 memiliki keanekaragaman interspesifik dan memiliki variasi intraspesifik yang rendah pada identifikasi *Rehmannia*. Penelitian tersebut juga menjelaskan bahwa kombinasi *DNA barcode* ITS2+psbA-trnH menunjukkan hasil baik pada proses klasifikasi dan identifikasi spesies *Rehmannia*.

Salah satu jenis variasi genetik yang ditemukan pada keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak adalah adanya *heterogenous (double peak)*. *Heterogenous* yaitu adanya dua puncak (*double peak*) dengan nukleotida yang berbeda pada satu tempat yang sama. *Heterogenous* merupakan variasi pada sekuen nukleus dalam individu tumbuhan yang dilaporkan pada banyak spesies. *Heterogenous* dapat terjadi karena adanya kontaminasi sekuen dari genom lainnya seperti genom mitokondria atau kloroplas (Feng *et al.*, 2015). *Heterogenous* yang terdapat pada keempat sampel *S. samarangense* dari Kabupaten Demak berupa kode 'Y' yang mewakili nukleotida *cytidylate* (C) dan *deoxythymidylate* (T). Sampel Delima Wonosari mempunyai variasi dengan kode 'S' yang mewakili nukleotida *cytidylate* (C) dan *guanylate* (G). Kode 'Y'

ditemukan pada keempat sampel *S. samarangense* pada nukleotida nomor 147 dan 268. Pada sampel Citra Tempuran ditemukan variasi dengan kode 'Y' pada nukleotida nomor 273. Daftar kode *degenerate primer* tersaji pada Gambar Lampiran 3.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Terdapat variasi intraspesies yang rendah yaitu ditandai dengan sedikitnya variasi nukleotida antar spesies *S. samarangense* pada daerah ITS-2 dan terdapat variasi nukleotida yang tinggi antara spesies *S. samarangense* dengan spesies *Syzygium* lainnya pada daerah ITS-2;
2. *DNA barcode* ITS-2 dapat digunakan dalam menganalisis variasi genetik kultivar *S. samarangense* di Kabupaten Demak secara molekuler;
3. Hasil pohon filogenetik menggambarkan bahwa sekuen *S. samarangense* ITS-2 memisah sesuai perbedaan kultivar. Hasil kekerabatan filogenetik lebih dipengaruhi oleh jenis kultivar daripada oleh lokasi budidaya.

B. Saran

Beberapa saran pada penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan isolasi DNA menggunakan jenis kit isolasi yang lainnya seperti Tiangen untuk mendapatkan hasil isolasi DNA yang lebih jernih;
2. Perlu dilakukan analisis variasi genetik ITS-2 pada kultivar jambu semarang yang lebih banyak agar dapat diaplikasikan pada pemuliaan tanaman untuk menghasilkan variasi baru yang unggul.
3. Perlu dilakukan analisis variasi genetik jambu semarang pada berbagai daerah lainnya yang ada di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Alzohairy. (2008). ClustalW: Widespread Multiple Sequences Alignment Program. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 7(1), 81–82.
- Ananto, A. D. (2022). Autentikasi Metabolit Ekstrak Buah Jambu Semarang (*Syzygium samarangense (Blume) Merr. & L.M. Perry*) 'Citra' di Kabupaten Demak. Skripsi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang.
- Andriani, T. (2016). Aplikasi Metode UPGMA untuk Identifikasi Kekerabatan Jenis Virus dan Penyebaran Epidemi Ebola Melalui Pendekatan Pohon Filogenetik (*Doctoral dissertation, Institut Teknologi Sepuluh Nopember*).
- Balke, M., & Schmidt, S. (2012). Indonesian-German Network for Teaching, Training and Research Collaborations (IGN-TTRC) Training of Trainers and Students Module II: DNA barcoding course material. *Zoologische Staatssammlung Munich, Germany*.
- Bangol, I., Momuat, L. I., & Kumaunang, M. (2014). Barcode DNA tumbuhan pangi (*Pangium edule* R.) berdasarkan gen matK. *Jurnal MIPA*, 3(2), 113–119.
- BPS Provinsi Jawa Tengah. (2021). *Produksi Buah-Buahan Menurut Kabupaten/Kota dan Jenis Tanaman di Provinsi*

Jawa Tengah. <https://jateng.bps.go.id/>

- Buys, M. H., Flint, H. J., Miller, E. M., Yao, H., Caird, A. R., & Ganley, R. J. (2016). Preparing for the invasion: efficacy of DNA barcoding to discern the host range of myrtle rust (*Puccinia psidii*) among species of *Myrtaceae*. *Forestry*, *89*(3), 263–270.
- Calonje, M., Martín-Bravo, S., Dobeš, C., Gong, W., Jordon-Thaden, I., Kiefer, C., Kiefer, M., Paule, J., Schmickl, R., & Koch, M. A. (2009). Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. *Plant Systematics and Evolution*, *282*, 257–280.
- Chan, A., Chiang, L.-P., Hapuarachchi, H. C., Tan, C.-H., Pang, S.-C., Lee, R., Lee, K.-S., Ng, L.-C., & Lam-Phua, S.-G. (2014). DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. *Parasites & Vectors*, *7*(1), 1–12.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., & Pang, X. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS One*, *5*(1), e8613.
- Chiou, S. J., Yen, J. H., Fang, C. L., Chen, H. L., & Lin, T. Y. (2007). Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified

- ITS2 with specific primers. *Planta Medica*, 73(13), 1421–1426. <https://doi.org/10.1055/s-2007-990227>
- Coker, O. M. (2017). Importance of genetics in conservation of biodiversity. *J Wildl Manage*, 1, 11–18.
- Combik, M., & Mirek, Z. (2015). Estimating the effectiveness of species identification by sequencing of two chloroplast DNA loci (matK and rbcL) in selected groups of Polish flora. *DNA*, 3, 17–26.
- Duan, H., Wang, W., Zeng, Y., Guo, M., & Zhou, Y. (2019). The screening and identification of DNA barcode sequences for *Rehmannia*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.
- Feng, S., Jiang, Y., Wang, S., Jiang, M., Chen, Z., Ying, Q., & Wang, H. (2015). Molecular identification of *Dendrobium* species (*Orchidaceae*) based on the DNA barcode ITS2 region and its application for phylogenetic study. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21975–21988.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95–98.
- Hani, H. A., Gadalla, E. G., & Haggag, S. (2020). Identification of some cultivars of Egyptian date palm (*Phoenix dactylifera*

- L.) using DNA barcoding. *Plant Arch*, 20, 1807–1813.
- Ilmi, Z. L. (2021). Keragaman kultivar Pisang Kepok (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana* (ABB) cv. Kepok) di Kabupaten Malang berdasarkan karakter morfologi dan molekuler RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Irawan, P. D., Tallei, T. E., & Kolondam, B. J. (2016). Analisis Sekuens dan Filogenetik Beberapa Tumbuhan *Syzygium* (*Myrtaceae*) di Sulawesi Utara Berdasarkan Gen matK. *Jurnal Ilmiah Sains*, 16(2), 43. <https://doi.org/10.35799/jis.16.2.2016.14022>
- Isaev, A. (2004). *Introduction to mathematical methods in bioinformatics*. Springer.
- Joko. (2014). *Sukses Bertanam Jambu Biji Dan Jambu Air Di Pekarangan Rumah Dan Kebun*. Pustaka Baru Press.
- Julianti, E., Pinaria, A., Lengkong, E. F., & Kolondam, B. J. (2015). DNA Barcoding Tanaman Daluga (*Cyrtosperma* spp) dari Kepulauan Sangihe Berdasarkan Gen matK (DNA Barcoding Daluga Plant (*Cyrtosperma* spp) of Sangihe Island Based on matK Gene). *Jurnal Bios Logos*, 5(2). <https://doi.org/10.35799/jbl.5.2.2015.10547>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018).

MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547.

Mandamaruta. (2017). *Location map of Demak Regency, Indonesia*. Geographic Coordinate System WGS 1984 (EPSG: 4326) Equirectangular Projection.

Masrurroh, D. (2018). Penggunaan Marker Dna Barcoding its2 Dan Coi Untuk Analisis Polimorfisme Genetik Nyamuk *Anopheles* Asal Desa Bangsring Banyuwangi. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Meitha, K., Fatmawati, I., Dwivany, F. M., Sutanto, A., Pratama, S. N., Nugrahapraja, H., & Wikantika, K. (2020). Phylogenetic analysis of 23 accessions of Indonesian banana cultivars based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) region. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 25(1), 1-11.

Mukaromah, A.S., Ulfah, M. (2021). Autentikasi Tanaman Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) Kultivar Delima dan Citra di Kabupaten Demak Menggunakan DNA Barcoding. Laporan Penelitian Litapdimas Kemenag Tahun 2021.

- Novianti, M. (2012). *Genetic Differentiation of Meliaceae based on Second Internal Transcribed Spacer (ITS2) dan Maturase-K (Mat-K) Regions.*
- Octavia, D., Mukaromah, A. S., Martiansyah, I., Mimin, M., Ma'mun, S., & Rukmanto, H. (2021). Isolasi DNA tumbuhan hasil eksplorasi di Nusakambangan dengan metode kit di Laboratorium Treub, Kebun Raya Bogor. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 7(1), 291–299.
- Pangestika, Y., Budiharjo, A., & Kusumaningrum, H. P. (2015). Analisis Filogenetik *Curcuma zedoaria* (Temu Putih) Berdasarkan Gen Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Akademika Biologi*, 4(4), 8–13.
- Peltier, S. K., Brown, J. D., Ternent, M., Niedringhaus, K. D., Schuler, K., Bunting, E. M., Kirchgessner, M., & Yabsley, M. J. (2017). Genetic characterization of *Sarcoptes scabiei* from black bears (*Ursus americanus*) and other hosts in the eastern United States. *Journal of Parasitology*, 103(5), 593–597.
- Perwitasari, D. A. G., Rohimah, S., Ratnasari, T., Sugiharto, B., & Su'udi, M. (2020). DNA barcoding anggrek obat *Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar menggunakan gen *rbcL* dan ITS. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah Dan Obat*, 31(1), 8–20.

- Rachmah, A. N. (2022). Autentikasi Tiga Kultivar Jambu Semarang (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M. Perry) Berdasarkan Karakter Morfologi dan Profil Metabolit Buah. Skripsi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang.
- Ratnasari, Y. A., & Faridah, I. N. (2019). Otimasi Metode Isolasi Dna Sampel Fta Cards Menggunakan Purelink® Genomic Dna Kits Dan Chelex-100 Optimization of Fta Cards Sample Dna Isolation Method Using Purelink® Genomic Dna Kits and. *Bachelor Thesis*, 1(1), 1–13.
- Roslim, D. I., & Fitriani, A. (2021). Barkoding DNA pada Tumbuhan Durik-Durik (*Syzygium* sp.) Asal Riau Menggunakan Daerah Gen ndhF. *Jurnal Bios Logos*, 11(1), 41–46.
- Rusdiana, N. (2020). *Karakterisasi Molekuler Gen Penyandi Second Internal Transcribed Spacer (ITS-2) Sarcoptes Scabiei Pada Kelinci Di Beberapa Daerah Jawa Timur*. UNIVERSITAS AIRLANGGA.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Sinay, H., Arumingtyas, E. L., Harijati, N., & Indriyani, S. (2016).

- Keragaman dan kekerabatan kultivar jagung (*Zea mays* L.) lokal asal Pulau Kisar Kabupaten Maluku berdasarkan karakter fenotip. *BIOPENDIX: Jurnal Biologi, Pendidikan Dan Terapan*, 3(1), 18–27.
- Sofiyanti, N., & Isda, M. N. (2019). Paku Kawat *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm. (*Lycopodiaceae-Lycopodiales*) dari Provinsi Riau—Kajian Morfologi dan Sekuen DNA berdasarkan Primer RBCL. *Jurnal Biologi UNAND*, 7(1), 43–50.
- Su'udi, M. (2018). Studi in silico potensi DNA barcode pada anggrek langka *Paphiopedilum*. *Biosfer: Jurnal Biologi Dan Pendidikan Biologi*, 3(1), 20–26.
- Sugiyono. (2014). *Statistika untuk Penelitian*. Alfabeta.
- Sunaryo, W. (2015). Aplikasi DNA Barcoding untuk analisis keragaman genetik lai-durian (*Durio zibethinus x kutejensis*) asal Kalimantan Timur. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 1(6), 1273–1277.
- Sutrisno, H. (2018). Peran Ilmu Dasar Biosistemika Pada Era Bioteknologi. *Prosiding Seminar Nasional Biotik*, 4(1).
- Taariwuan, M. B., Ngangi, J., Mokosuli, Y., & Gedoan, S. (2021). DNA Barcoding Dalugha (*Cyrtosperma merkusii*) di Kepulauan Talaud dan Minahasa Selatan Berdasarkan

Gen rbcL. *Jurnal Bios Logos*, 11(2), 134–138.

Tang, L., Gao, H., Zhu, X., Wang, X., Zhou, M., & Jiang, R. (2013). Construction of “small-intelligent” focused mutagenesis libraries using well-designed combinatorial degenerate primers. *Biotechniques*, 52(3), 149–158.

Ubaidillah, R. & S. (2009). *Pengantar Biosistemik: Teori dan Praktik*. LIPI Press.

Wang, X., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J., Cai, D., & Li, J. (2015). ITS 1: a DNA barcode better than ITS 2 in eukaryotes? *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 573–586.

Wardi, E. S., Jamsari, J., Irwandi, I., Sartika, D., & Ningsih, A. R. (2020). Barkod DNA Pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) Berdasarkan Gen matK Dan rbcL. *Jurnal Ilmiah As-Syifaa*, 12(1), 22–28.

Wei, X., Li, L., Xu, L., Zhang, X., Zeng, L., & Xu, J. (2022). Complete chloroplast genome sequence of *Syzygium samarangense* (*Myrtaceae*) and phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA Part B*, 7(6), 977–979.

Widodo, P. (2015). Jambu semarang dan jambu air. *Purwokerto: Universitas Jenderal Soedirman*.

- Widyatmoko, D. (2019). Strategi dan Inovasi Konservasi Tumbuhan Indonesia Untuk Pemanfaatan Secara Berkelanjutan. *Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Saintek (SNPBS) Ke-IV, 2527-533X*(Tabel 2), 1–22.
- Wilkerson, R. C., Reinert, J. F., & Li, C. (2014). Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiate six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41(3), 392–401.
- Yu, N., Wei, Y., Zhang, X., Zhu, N., Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, H., Li, F., Yang, L., & Sun, J. (2017). Barcode ITS2: a useful tool for identifying *Trachelospermum jasminoides* and a good monitor for medicine market. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Sekuen *S. samarangense* hasil sekuensing dan hasil *contig*

Citra Tempuran (CT1)

>Consensus

```
CATCGATGAAGAACGTAGCGAACTGCGATACTTGGTGTGAATTG
CAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCC
GAAGCCTCGGCTTAGGGCACGTTTGCCTGGGTGTCACACATGGC
GTTGCCCTAACCCCTCGCCTTGAATTGGGCGGGCGGGACTTGG
GYGCGTATGTTGGCCTCCCGAGATGACCTTATCCCGGTTGGCCC
AAAATCGAGCGTTGGAGCGATTAGCACCACGACATTCGGTGGTT
GATAAGACCCCAATGATCAATGTCGTGCGTGTGCGTCAYGCACA
TGCTCCACGAATCTACCTTTCACCAACGCGACCCCAGGTCAAGC
GGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAA
GAAACTA
```

Citra Botorejo (CR1)

>Consensus

```
ATGAAGAACGTAGCGAACTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA
TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGC
CTCGGCTTAGGGCACGTTTGCCTGGGTGTCACACATGGCGTTGC
CCCTAACCCCTCGCCTTGAATTGGGCGGGCGGGACTTGGGCGCG
TATGTTGGCCTCCCGAGATGACCTTATCCCGGTTGGCCAAAAT
CGAGCGTTGGAGCGATTAGCACCACGACATTCGGTGGTTGATAA
GACCCCAATGATCAATGTCGTGCGTGTGCGTCAYGCACATGCTC
CACGAATCTACCTTTCACCAACGCGACCCCAGGTCAAGCGGGC
TAYCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAAC
```

Lampiran 1. Lanjutan

Citra Wonosari (CW2)

>Consensus

CGATGAAGAACGTAGCGAACTGCGATACTTGGTGTGAATTGCTA
 GAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGA
 AGCCTCGGCTTAGGGCACGTTTGCCTGGGTGTCACACATGGCGT
 TGCCCCCTAACCCCTCGCCTTGAATTGGGCGGGCGGGACTTGGGT
 GCGTATGTTGGCCTCCCGAGATGACCTTATCCCGGTTGGCCCAA
 AATCGAGCGTTGGAGCGATTAGCACCACGACATTCGGTGGTTGA
 TAAGACCCCAATGATCAATGTCGTGCGTGTGCGCTCATGCACATG
 CTCCACGAATCTACCTTTCACCAACGCGACCCAGGTCAAGCGG
 GGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGA
 AAC

Delima Wonosari (DW1)

>Consensus

CGATGAAGAACGTAGCGAACTGCGATACTTGGTGTGAATTGCAS
 TAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGA
 AGCCTCGGCTTAGGGCACGTTTGCCTGGGTGTCACACATGGCGT
 TGCCCCCTAACCCCTCGCCTTGAATTGGGCGGGCGGGACTTGGGT
 GCGTATGTTGGCCTCCCGAGATGACCTTATCCCGGTTGGCCCAA
 AATCGAGCGTTGGAGCGATTAGCACCACGACATTCGGTGGTTGA
 TAAGACCCCAATGATCAATGTCGTGCGTGTGCGCTCATGCACATG
 CTCCACGAATCTACCTTTCACCAACGCGACCCAGGTCAAGCGG
 GGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGA
 A

Lampiran 2. Daftar Accession Number *S. samarangense* dari Kabupaten Demak

LOCUS OQ581466 396 bp DNA linear PLN 07-MAR-2023
 DEFINITION Syzygium samarangense cultivar Citra Botorejo 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION OQ581466
 VERSION OQ581466
 KEYWORDS .
 SOURCE Syzygium samarangense
 ORGANISM Syzygium samarangense
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; malvids; Myrtales; Myrtaceae; Myrtoideae; Syzygieae; Syzygium.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 396)
 AUTHORS Mukaromah,A.S., Chika,S., Meilina,T.D., Arfan,M.R. and Febriana,A.
 TITLE Genetic Variation of Wax Apple (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M Perry) Cultivar Using Internal Transcribed Spacer 2
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 396)
 AUTHORS Mukaromah,A.S., Chika,S., Meilina,T.D., Arfan,M.R. and Febriana,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (07-MAR-2023) Biology, Faculty of Science and Technology, Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang, Jl. Prof. Dr. Hamka, Tambakaji, Ngaliyan, Semarang City, Central Java 50185, Indonesia
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..396
 /organism="Syzygium samarangense"
 /mol_type="genomic DNA"
 /cultivar="Citra Botorejo"
 /db_xref="taxon:260143"
 /country="Indonesia"
 /collection_date="2022-07-02"
 misc_RNA <1..>396
 /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large subunit ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 atgaagaacg tagcgaaactg cgatacttgg tgtgaattgc agaatccccg gaaccatcga
 61 gtctttgaac gcaagttgcg cccgaagcct cggcttaggg cagctttgcc tgggtgtcac
 121 acatggcgtt gccctaacc cctcgcttgg aattgggctg cgggacttg ggcgcgtatg
 181 ttggcctccc gagatgacct tatccccggt ggcccaaaat cgagcgttgg agcgattagc
 241 accacgacat tcggtggttg ataagacccc aatgatcaat gtcgtgcgtg tcgctcaygc
 301 acatgctcca cgaattcacc tttcaccaac gcgaccocag gtcaagcggg gctayccgct
 361 gagtttaagc atatcaataa gcggaggaaa aaaaac

Lampiran 2. Lanjutan

```

//
LOCUS       OQ581467                403 bp    DNA        linear    PLN 07-MAR-2023
DEFINITION  Syzygium samarangense cultivar Citra Tempuran 5.8S ribosomal RNA
            gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete
            sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OQ581467
VERSION     OQ581467
KEYWORDS    .
SOURCE      Syzygium samarangense
  ORGANISM  Syzygium samarangense
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetalae; rosids; malvids; Myrtales; Myrtaceae; Myrtoideae;
            Syzygieae; Syzygium.
REFERENCE   1 (bases 1 to 403)
  AUTHORS   Mukaromah,A.S., Chika,S., Meilina,T.D., Arfan,M.R. and Febriana,A.
  TITLE     Genetic Variation of Wax Apple (Syzygium samarangense (Blume) Merr.
            & L.M Perry) Cultivar Using Internal Transcribed Spacer 2
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 403)
  AUTHORS   Mukaromah,A.S., Chika,S., Meilina,T.D., Arfan,M.R. and Febriana,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-MAR-2023) Biology, Faculty of Science and Technology,
            Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang, Jl. Prof. Dr. Hamka,
            Tambakaji, Ngaliyan, Semarang City, Central Java 50185, Indonesia
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..403
                     /organism="Syzygium samarangense"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /cultivar="Citra Tempuran"
                     /db_xref="taxon:260143"
                     /country="Indonesia"
                     /collection_date="2022-07-02"
     misc_RNA         <1..403
                     /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
                     spacer 2, and large subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
1  catcgatgaa gaactgtagc aactgcgata cttgggtgtga attgcagaat cccgtgaacc
61  atcgaagtct tgaacgcaag ttgcgcccga agcctcggct tagggcacgt ttgcctgggt
121  gtcaacacat gcgttgcccc taaccctcgc ccttgaattg ggcgggcggg acttgggygc
181  gtatgttgcc ctcccagat  gaccttatcc cggttggccc aaaatcgagc gttggagcga
241  ttgacccac  gacattcgtt ggttgataag accccaatga tcaatgtcgt gcgtgtcgtc
301  caygcacatg ctcccagaa  ctacctttca ccaacgcgac cccaggtcaa gcggggctac
361  ccgctgagtt taagcatatc aataagcgga ggaaaaaata cta

```


Lampiran 2. Lanjutan

```
//
LOCUS      OQ581468                399 bp    DNA        linear    PLN 07-MAR-2023
DEFINITION Syzygium samarangense cultivar Citra Wonosari 5.8S ribosomal RNA
            gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete
            sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  OQ581468
VERSION    OQ581468
KEYWORDS   .
SOURCE     Syzygium samarangense
ORGANISM   Syzygium samarangense
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetalae; rosids; malvids; Myrtales; Myrtaceae; Myrtoideae;
            Syzygieae; Syzygium.
REFERENCE  1 (bases 1 to 399)
AUTHORS    Mukaromah,A.S., Chika,S., Meilina,T.D., Arfan,M.R. and Febriana,A.
TITLE      Genetic Variation of Wax Apple (Syzygium samarangense (Blume) Merr.
            & L.M Perry) Cultivar Using Internal Transcribed Spacer 2
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 399)
AUTHORS    Mukaromah,A.S., Chika,S., Meilina,T.D., Arfan,M.R. and Febriana,A.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (07-MAR-2023) Biology, Faculty of Science and Technology,
            Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang, Jl. Prof. Dr. Hamka,
            Tambakaji, Ngaliyan, Semarang City, Central Java 50185, Indonesia
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
            source                1..399
                                     /organism="Syzygium samarangense"
                                     /mol_type="genomic DNA"
                                     /cultivar="Citra Wonosari"
                                     /db_xref="taxon:260143"
                                     /country="Indonesia"
                                     /collection_date="2022-07-02"
            misc_RNA              <1..>399
                                     /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
                                     spacer 2, and large subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
1 cgatgaagaa cgtagcgaac tgcgatactt ggtgtgaatt gctagaatcc cgtgaacccat
61 cgagtcctttg aacgcaagtt gcgcccgaag cctcgggtta gggcacgttt gcctgggtgt
121 cacacatggc gttgcccccta acccctcgcc ttgaattggg cgggcggggac ttgggtgcgt
181 atgtttggcct ccgagatga cettatcccg gttggcccaa aatcgagcgt tggagcgatt
241 agcaccacga cattcggtyg ttgataagac cccaatgac aatgtcgtgc gtgtcgctca
301 tgcacatgct ccacgaatct acctttcacc aacgcgaccc caggtcaaag ggggctaccc
361 gctgagttta agcatatcaa taagcggagg aaaagaac
```

Lampiran 2. Lanjutan

```
//
LOCUS      QQ581469                397 bp    DNA        linear    PLN 07-MAR-2023
DEFINITION Syzygium samarangense cultivar Delima Wonosari 5.8S ribosomal RNA
            gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete
            sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  QQ581469
VERSION    QQ581469
KEYWORDS   .
SOURCE     Syzygium samarangense
ORGANISM   Syzygium samarangense
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetalae; rosids; malvids; Myrtales; Myrtales; Myrtales; Myrtales;
            Syzygieae; Syzygium.
REFERENCE  1 (bases 1 to 397)
AUTHORS    Mukaromah,A.S., Chika,S., Meilina,T.D., Arfan,M.R. and Febriana,A.
TITLE      Genetic Variation of Wax Apple (Syzygium samarangense (Blume) Merr.
            & L.M Perry) Cultivar Using Internal Transcribed Spacer 2
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 397)
AUTHORS    Mukaromah,A.S., Chika,S., Meilina,T.D., Arfan,M.R. and Febriana,A.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (07-MAR-2023) Biology, Faculty of Science and Technology,
            Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang, Jl. Prof. Dr. Hamka,
            Tambakaji, Ngaliyan, Semarang City, Central Java 50185, Indonesia
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
            source                1..397
                                     /organism="Syzygium samarangense"
                                     /mol_type="genomic DNA"
                                     /cultivar="Delima Wonosari"
                                     /db_xref="taxon:260143"
                                     /country="Indonesia"
                                     /collection_date="2022-07-02"
            misc_RNA              <1..>397
                                     /note="contains 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed
                                     spacer 2, and large subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
1 cgatgaagaa cgtagcgaac tgcgatactt ggtgtgaatt gcastaatcc cgtgaacct
61 cgagtccttg aacgcaagtt gcgcccgaag cctcggctta gggcacgttt gcttgggtgt
121 cacacatggc gttgccccta acccctcgcc ttgaattggg cgggcgggac ttgggtgcgt
181 atgttgccct cccgagatga ccttatcccc gttggcccaa aatcgagcgt tggagcgatt
241 agcaccacga cattcgggtg ttgataagac cccaatgatc aatgtcgtgc gtgtcgtcca
301 tgcacatgct ccacgaatct acctttcacc aacgcgaccc caggtcaacc ggggctaccc
361 gctgagttaa agcatatcaa taagcggagg aaaagaa
```

Lampiran 3. Hasil *Alignment Syzygium*

	5	15	25	35	45	55
Sampel CT1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
Sampel CR1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
Sampel DW1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
Sampel CW2	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
OK052940.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KR532634.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KR532628.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KR532610.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
ON597488.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KR532633.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KR532621.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KC815991.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KC815987.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KC815988.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAGCCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KC815990.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KM064931.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
KM064818.1	-TGTGAATTG	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCA-AGTTG	CGCCCGAAGC
NW 0190147	CCAAAACCAT	AAGATTTCCA	TACCCCGTCC	GGCATGTGAG	ACCACAATCC	CGGTAGGGTT

Lampiran 3. Lanjutan

	65	75	85	95	105	115
Sampel CT1	--CTCGGCTT	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
Sampel CR1	--CTCGGCTT	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
Sampel DW1	--CTCGGCTT	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
Sampel CW2	--CTCGGCTT	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
OK052940.1	--CTCGGCTT	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
KR532634.1	--TTCGGCTG	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
KR532628.1	--TTCGGCTG	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
KR532610.1	--TTCGGTTG	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCC-	AACCCCTCGC
ON597488.1	--TTCGGTTG	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
KR532633.1	CATTTGGTCG	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCTC
KR532621.1	CATTTGGTCG	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCTC
KC815991.1	--TTCGGTTG	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
KC815987.1	--CTCGGCTT	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
KC815988.1	--CTCGGCTT	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
KC815990.1	--CTCGGCTT	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
KM064931.1	--TTCGGTTG	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
KM064818.1	CATTCGGCGG	AGGGCACGTT	TGCCTGGGTG	TCACACATGG	CGTTGCCCCCT	AACCCCTCGC
NW 0190147	CCCTACGGAC	CCGGTCCGTC	CACCATCTCC	CAGGATATAT	AGTCAGGCTG	A--CCCCCAT

Lampiran 3. Lanjutan

 125 135 145 155 165 175
Sampel CT1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGYGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
Sampel CR1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGYGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
Sampel DW1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGYGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
Sampel CW2	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGYGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
OK052940.1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGTGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
KR532634.1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGTGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
KR532628.1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGTGCG	TACGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
KR532610.1	CCTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CCTGGGTGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACATTATCCC
ON597488.1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGTGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCTC
KR532633.1	CTTGAATTGG	GCGGGTGGGA	CTTGGGTGCG	TATGATGGCC	TCCCGAGACA	ACCTTGTCCT
KR532621.1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGTGCG	TATGATGGCC	TCCCGAGACA	ACCTTGTCCT
KC815991.1	CTTGAATTGG	GCGAGCGGGA	CTTGGGTGCG	TACGTTGGCC	TCCCGAGATG	AACTTATCCC
KC815987.1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGCGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
KC815988.1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGCGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
KC815990.1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGCGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
KM064931.1	CTTGAATTGG	GCGGGCGGGG	CTTGGGTGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGATG	ACCTTATCCC
KM064818.1	CTCGAATTGG	GCGGGCGGGA	CTTGGGTGCG	TATGTTGGCC	TCCCGAGACG	ACCTTGTCCT
NW 0190147	AATACAATTA	CCAGTTTACA	CAATCTTTCA	TTTTTCCTTT	TCCCCAATC	AGCAT-CATC

Lampiran 3. Lanjutan

	185	195	205	215	225	235
Sampel CT1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATAA
Sampel CR1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATAA
Sampel DW1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATAA
Sampel CW2	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATAA
OK052940.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATAA
KR532634.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATGA
KR532628.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATGA
KR532610.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--CGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATGA
ON597488.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATGA
KR532633.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGGCATTCGG	TGGTTGATGA
KR532621.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGGCATTCGG	TGGTTGATGA
KC815991.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATGA
KC815987.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATAA
KC815988.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATAA
KC815990.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--TGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATAA
KM064931.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	T--CGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATGA
KM064818.1	GGTTGGCCCA	AAATCGAGCG	TGTTGGAGCG	ATTAGCACCA	CGACATTCGG	TGGTTGATGA
NW 0190147	AATTCACATT	TAAACAAGCA	A---ATGGTA	ATTCATACCA	-AACAGACAA	CATACAGTAT

Lampiran 3. Lanjutan

	245	255	265	275	285	295
Sampel CT1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCAYGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
Sampel CR1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCAYGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
Sampel DW1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCAYGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
Sampel CW2	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCAYGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
OK052940.1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCACGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
KR532634.1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCATGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
KR532628.1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCATGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
KR532610.1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCATGCACAT	GCTCCACGAA	TCTATCTTTC
ON597488.1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCGTGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
KR532633.1	GGCCCCAATG	ATTAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCACGTACAC	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
KR532621.1	GGCCCCAATG	ATTAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCACGTACAC	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
KC815991.1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGGGCGTCGC	TCATGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
KC815987.1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCACGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
KC815988.1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCACGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
KC815990.1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCACGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
KM064931.1	GACCCCAATG	ATCAATGTCG	TGCGTGTCGC	TCATGCACAT	GCTCCACGAA	TCTACATTTT
KM064818.1	GACCCCAATG	GTCAATGTCG	CGCGTGTCGC	TCACGGACAA	GCTCCACGAA	TCTACCTTTC
NW 0190147	CAGTTTTTCA	GTCA---TTC	AACCCATAAT	TAATAAAAAA	GTAGTACATG	CACACAAATC

Lampiran 3. Lanjutan

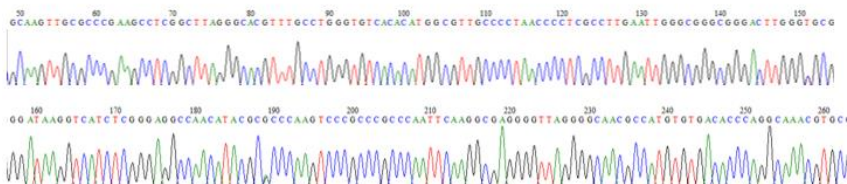
	305	315	325	335	345	355
Sampel CT1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
Sampel CR1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	AYCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
Sampel DW1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
Sampel CW2	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
OK052940.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KR532634.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KR532628.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KR532610.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
ON597488.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AGTCGGGACT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KR532633.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KR532621.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KC815991.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KC815987.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KC815988.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KC815990.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KM064931.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
KM064818.1	ACCAACGCGA	CCCCAGGTCA	AG-CGGGGCT	ACCCGCTGAG	--TTTAAGCA	TATCAATAA
NW 0190147	TGTAAAATGA	ACACA--TCA	AACCTCATTT	TGCATTTAAA	GCTGTAAACA	GGCCAAA--

GAMBAR LAMPIRAN

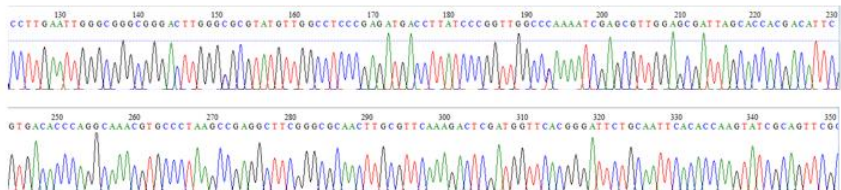


Gambar Lampiran 1. A) Sampling dan pengambilan sampel daun *S. samarangense*, B) Penggerusan sampel, C) Proses isolasi DNA dengan kit Favorgen, D) Proses PCR, E) Elektroforesis hasil PCR dan F) Visualisasi hasil elektroforesis

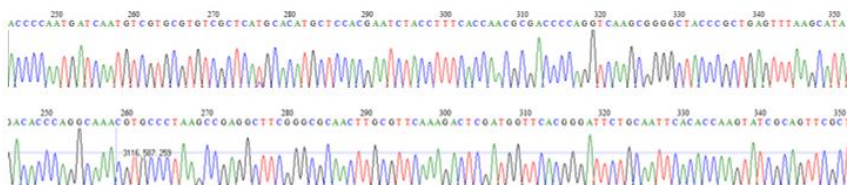
CT1. Atas forward, bawah reverse.



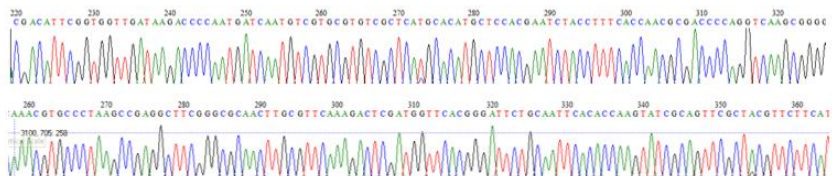
CR1. Atas forward, bawah reverse



CW2. Atas forward, bawah reverse.



DW1. Atas forward, bawah reverse.



Gambar Lampiran 2. Elektroforegram parsial hasil sekuensing sampel *S. samarangense* sekuen ITS-2

Degenerate base designation	Actual bases coded
N	A or C or G or T
B	C or G or T
D	A or G or T
H	A or C or T
V	A or C or G
K	G or T
M	A or C
R	A or G
S	C or G
W	A or T
Y	C or T

Gambar Lampiran 3. Daftar Kode *Degenerate Primer*
(Tang *et al.*, 2013)

TABEL LAMPIRAN

Tabel Lampiran 1. Analisis statistik faktor lingkungan tempat budidaya *S. samarangense* kultivar Citra dan Delima di Kabupaten Demak

➔ **Oneway**

Descriptives

Parameter_lingkungan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Wonosari	6	48.83	31.676	12.932	15.59	82.08	7	99
Tempuran	6	54.17	36.674	14.972	15.68	92.65	7	97
Botorejo	6	102.00	145.990	59.600	-51.21	255.21	7	394
Total	18	68.33	86.973	20.500	25.08	111.58	7	394

Test of Homogeneity of Variances

Parameter_lingkungan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.819	2	15	.091

ANOVA

Parameter_lingkungan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10286.333	2	5143.167	.652	.535
Within Groups	118307.667	15	7887.178		
Total	128594.000	17			

Tabel Lampiran 2. Hasil BLAST sekuen *S. samarangense*

No.	Nama Ilmiah	Jumlah (sekuen)
1.	<i>Syzygium polypetaloides</i>	1
2.	<i>Syzygium megacarpum</i>	3
3.	<i>Syzygium samarangense</i> cultivar Yeshengzhong	1
4.	<i>Syzygium samarangense</i> cultivar Nongke	3
5.	<i>Syzygium samarangense</i>	6
6.	<i>Syzygium samarangense</i> cultivar Yinnidaye	1
7.	<i>Syzygium aqueum</i>	1
8.	<i>Syzygium austroyunnanense</i>	1
9.	<i>Syzygium</i> sp.	7
10.	<i>Syzygium jambos</i>	4
11.	<i>Syzygium travancoricum</i>	3
12.	<i>Syzygium euneuron</i>	1
13.	<i>Syzygium paniculatum</i>	2
14.	<i>Syzygium nervosum</i>	7
15.	<i>Syzygium korthalsianum</i>	1
16.	<i>Syzygium aemulum</i>	1
17.	<i>Syzygium fastigiatum</i>	2
18.	<i>Syzygium longipes</i>	1
19.	<i>Syzygium balsameum</i>	1
20.	<i>Badula insularis</i>	1
21.	<i>Syzygium glabratum</i>	1
22.	<i>Syzygium laxiflorum</i>	4
23.	<i>Syzygium cymosum</i>	3
24.	<i>Syzygium chloranthum</i>	4
25.	<i>Syzygium obovatum</i>	2
26.	<i>Syzygium lineatum</i>	5
27.	<i>Syzygium aromaticum</i>	2

No.	Nama Ilmiah	Jumlah (sekuen)
28.	<i>Syzygium scalarinerve</i>	2
29.	<i>Syzygium minimum</i>	3
30.	<i>Syzygium tamilnadensis</i>	1
31.	<i>Syzygium yunnanense</i>	1
32.	<i>Syzygium racemosum</i>	2
33.	<i>Syzygium pseudoformosum</i>	1
34.	<i>Syzygium fastigiatum</i>	1
35.	<i>Syzygium claviflorum</i>	1
36.	<i>Syzygium grande</i>	3
37.	<i>Syzygium australe</i>	1
38.	<i>Syzygium floribundum</i>	1
39.	<i>Syzygium caryophyllatum</i>	1
40.	<i>Syzygium confertum</i>	1
41.	<i>Syzygium championii</i>	1
42.	<i>Syzygium tereticornis</i>	1
43.	<i>Syzygium acuminatissimum</i>	8
44.	<i>Syzygium urceolatum</i>	1
45.	<i>Terminalia bellirica</i>	1
	Jumlah	100

Tabel Lampiran 3. Daftar sekuen genus *Syzygium* hasil BLAST yang digunakan pada pohon filogenetik

No.	Nama Ilmiah	Query Cover	E Value	Percent Identity	Accession
1.	<i>Syzygium megacarpum</i>	100%	0.0	98.51%	KR532628.1
2.	<i>Syzygium polypetaloides</i>	100%	0.0	98.76%	KR532634.1
3.	<i>Syzygium austroyunnanense</i>	100%	0.0	96.53%	KR532610.1
4.	<i>Syzygium balsameum</i>	100%	2e-180	95.31%	KR532621.1
5.	<i>Syzygium oblatum</i>	100%	8e-179	95.06%	KR532633.1
6.	<i>Syzygium aqueum</i>	92%	0.0	98.91%	OK052940.1
7.	<i>Syzygium jambos</i>	97%	0.0	96.95%	KC815991.1
8.	<i>Syzygium samarangense</i> cultivar Yinnidaye	97%	0.0	98.98%	KC815988.1
9.	<i>Syzygium samarangense</i> cultivar Nongke	97%	0.0	99.24%	KC815987.1
10.	<i>Syzygium samarangense</i> cultivar Yeshengzhong	97%	0.0	99.49%	KC815990.1
11.	<i>Syzygium australe</i>	95%	0.0	97.66%	KM064931.1
12.	<i>Syzygium travancoricum</i>	93%	0.0	97.88%	ON597488.1
13.	<i>Syzygium floribundum</i>	95%	5e-176	95.89%	KM064818.1

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

1. Nama Lengkap : Syifara Chika
2. Tempat & Tgl. Lahir : Grobogan, 23 Juli 2001
3. Alamat Rumah : Lk. Kranggan no. 90 Kec.
Wirosari Kab. Grobogan
4. E-mail : syifarachika7@gmail.com

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Negeri 2 Wirosari
2. SMP Negeri 1 Wirosari
3. SMA Negeri 1 Wirosari
4. Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang

C. Publikasi Ilmiah

1. **Chika, S.**, Kurniawati, F., & Rahmani, T. P. D. (2021, November). *Kajian budidaya tanaman anggrek Dendrobium sp. menggunakan teknik kultur meristem serta pengaruh penambahan berbagai ekstrak terhadap pertumbuhannya*. In Prosiding Seminar Nasional Biologi (Vol. 7, No. 1, pp. 434-441).
2. Purnomo, E., & **Chika, S.** (2022). *Potensi Keragaman Ikan di Waduk Kedung Ombo sebagai*

Penyedia Kebutuhan Pangan Berkelanjutan. Jurnal Biogenerasi, 7(1), 99-107.

3. **Chika, S.** (2022, November). *Konsepsi Pelaksanaan Konservasi Lumpur Bledug Kuwu dan Potensinya dalam Pembuatan Natrium Klorida di Kabupaten Grobogan*. In Prosiding SNPBS (Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Saintek) (pp. 213-218).
4. **Chika, S.,** Ismaini, L., & Armanda, D. T. *Explant Sterilization Technique Castanopsis argentea (Blume) A. DC. with the addition of Ascorbic Acid and Sodium Hypochlorite (NaOCl) In Vitro*. Berkala Ilmiah Biologi, 13(2), 32-41.