

**IDENTIFIKASI *Diospyros* sp. (Ebenaceae) ASAL  
SUMATRA KOLEKSI KEBUN RAYA BOGOR  
BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI DAN  
MOLEKULER**

**SKRIPSI**

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



Oleh: **LAILATUZ ZAHRO**

NIM: 1908016058

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI UNIVERSITAS ISLAM  
NEGRI WALISONGO SEMARANG  
**2023**

## PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Lailatuz Zahro

NIM : 1908016058

Program Studi: Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

**Identifikasi *Diospyros* sp. (Ebenaceae) Asal Sumatra  
Koleksi Kebun Raya Bogor Berdasarkan Karakter  
Morfologi dan Molekuler**

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

Semarang, 10 April 2023

Pembuatan Pernyataan



Lailatuz Zahro

1908016058



KEMENTERIAN AGAMA RI  
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 : Identifikasi *Diospyros* sp. (Ebenaceae) Asal  
Sumatra Koleksi Kebun Raya Bogor  
Berdasarkan Karakter Morfologi dan  
Molekuler

Penulis : Lailatuz Zahro

Nim : 1908016058

Program Studi: Biologi

Telah diujikan dalam Sidang Munaqosyah oleh Dewan Penguji  
Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang dan  
dapat diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar  
sarjana dalam ilmu Biologi

Semarang, 26 April 2023

**Dewan Penguji**

Penguji I

Arnia Sari Mukaromah, M.Sc.  
NIP. 198709112018012001

Penguji II

Irvan Fadli Wanda, M.Si.  
NIP. 198905022015021005

Penguji III

Dr. Lianah, M.Pd.  
NIP. 195903131981032007

Penguji IV

Hafidha Asni Akmalia, M.Sc.  
NIP. 198708212019032013

Pembimbing I

Arnia Sari Mukaromah, M.Sc.  
NIP. 198709112018012001

Pembimbing II

Irvan Fadli Wanda, M.Si.  
NIP. 198905022015021005



## NOTA DINAS

Semarang, 05 April 2023

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 : Identifikasi *Diospyros* sp. (Ebenaceae) Asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler

Nama : Lailatuz Zahro

NIM : 1908016058

Program Studi: Biologi

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

Wassalamu'alaikum wr.wb

Pembimbing I

  
Arnia Sari Mukaromah, M.Sc  
NIP. 198709112018012001

## NOTA DINAS

Semarang, 10 April 2023

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 : Identifikasi *Diospyros* sp. (Ebenaceae) asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor berdasarkan karakter morfologi dan molekuler

Nama : Lailatuz Zahro

NIM : 1908016058

Program Studi: Biologi

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

Wassalamu'alaikum wr.wb

Pembimbing II



Irvan Fadli Wanda, M.Si.  
NIP. 198905022015021005

## **MOTTO HIDUP**

“Tidak Semua Hal Dalam Hidup Akan Selalu Mudah, Namun  
Kita Akan Tumbuh Lebih Kuat Dari Hal-Hal Yang Tidak  
Mudah”

## Abstrak

*Diospyros* merupakan genus tumbuhan yang terdaftar dalam IUCN *Red List of Threatened Species* sebagai tumbuhan terancam (*threatened*) dan rentan (*vulnerable*) serta harus dilindungi berdasarkan Peraturan Menteri Kehutanan Nomor:P.57/MENHUT-II/2008. Koleksi *Diospyros* sp. yang belum banyak teridentifikasi di Kebun Raya Bogor berasal dari wilayah Sumatra dan diduga berpotensi sebagai jenis baru. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor berdasarkan pendekatan secara morfologi dan molekuler. Tahapan penelitian yang dilakukan berupa pengambilan sampel, pengamatan karakter morfologi, ekstraksi DNA menggunakan KIT GeneJET *Plant Genomic DNA Purification Mini Kit* K0971 (Thermo scientific), amplifikasi menggunakan *region* ITS, elektroforesis, visualisasi hasil elektroforesis, dan analisis data hasil sekuensing.

Hasil pendekatan morfologi menunjukkan sampel LZ05 memiliki ciri khusus yang sama dengan dengan *Diospyros ferrea* (Wild.) Bakh. dan sampel LZ08 memiliki ciri khusus yang sama dengan *Diospyros sumatrana* Miq. *var. decipiens* (Clarke) Bakh. asal Malay penn. Hasil pendekatan molekuler menunjukkan karakter sekuen sampel LZ05 memiliki panjang 616 bp dan sampel LZ08 memiliki panjang 877 bp. Analisis filogenetik menunjukkan sampel LZ05 berkerabat dekat dengan *Diospyros stigrosa* dengan nilai bootstrap 98% dan sampel LZ08 berkerabat dekat dengan *Diospyros philippensis*, *Diospyros rubra* dan *Diospyros maclurei* dengan nilai bootstrap 99%. Karakteristik sekuen ITS sampel LZ05&LZ08 mengandung banyak basa C dan G sesuai dengan komposisi nukleotida sekuen ITS. Hasil pendekatan secara morfologi lebih meyakinkan dibanding pendekatan secara molekuler. Hal ini dikarenakan kurangnya data pembanding di *genbank* NCBI sehingga pendekatan molekuler tidak memenuhi syarat dalam identifikasi.

Kata kunci: *Diospyros* sp., DNA *Barcoding*, Identifikasi, Karakter Morfologi.



## Abstract

*Diospyros* is a plant genus registered on the IUCN Red List of Threatened Species as threatened and vulnerable and must be protected based on Minister of Forestry Regulation Number: P.57/MENHUT-II/2008. Collection of *Diospyros* sp. which has not been identified in the Bogor Botanical Gardens originates from the Sumatra region and is suspected as a potential new species. This study aims to identify *Diospyros* sp. from Sumatra, the collection of the Bogor Botanical Gardens based on morphological and molecular approaches. The stages of the research were sampling, observation of morphological characters, DNA extraction using the GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit K0971 (Thermo Scientific), amplification using the ITS region, electrophoresis, visualization of electrophoretic results, and analysis of sequencing data.

The results of the morphological approach showed that the LZ05 sample had the same special characteristics as *Diospyros ferrea* (Wild.) Bakh. and sample LZ08 has the same special characteristics as *Diospyros sumatrana* Miq. var. *decipiens* (Clarke) Bakh. from Malay Penn. The results of the molecular approach show that the character sequence of sample LZ05 has a length of 616 bp and sample LZ08 has a length of 877 bp. Phylogenetic analysis showed that sample LZ05 is closely related to *Diospyros stigrosa* with a bootstrap value of 98% and sample LZ08 is closely related to *Diospyros philippensis*, *Diospyros rubra* and *Diospyros maclurei* with a bootstrap value of 99%. Characteristics of the ITS sequence of samples LZ05&LZ08 contain many C and G bases according to the nucleotide composition of the ITS sequence. The results of the morphological approach are more convincing than the molecular approach. This is due to the lack of comparative data in the NCBI GenBank so the molecular approach does not meet the requirements for identification.

Keywords: *Diospyros* sp., DNA *Barcoding*, Identification, Morphological Characte

## TRANSLITERASI ARAB-LATIN

Penulisan skripsi ini mengikuti pedoman transliterasi huruf arab latin SKB (Sesuai Keputusan Bersama) Menteri Agama dan Menteri Pendidikan dan Menteri Kebudayaan R.I. Nomor: 158 tahun 1987 dan Nomor: 0543b/U/1987 sebagai berikut:

أ	A	ط	T
ب	B	ظ	Z
ت	T	ع	'
ث	S	غ	G
ج	J	ف	F
ح	H	ق	Q
خ	KH	ك	K
د	D	ل	L
ذ	Z	م	M
ر	R	ن	N
ز	Z	و	W
س	S	ه	H
ش	SY	ء	'
ص	S	ي	Y
ض	D		

Keterangan penulisan kata sandang (Al-) dalam teks ditulis menyesuaikan rujukan.

## KATA PENGANTAR

Segala puji kepada Allah Subhanahu Wata'ala atas rahmat, hidayah serta karunia-Nya. Shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada baginda Rasulullah SAW. Berkat limpahan dan rahmat-Nya penulis mampu penulisan naskah Skripsi dengan judul "Identifikasi *Diospyros* sp. (Ebenaceae) asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor berdasarkan karakter morfologi dan molekuler" yang dimaksudkan untuk memenuhi syarat memperoleh gelar Sarjana Sains di Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang

Penulis menyadari bahwa penyelesaian skripsi ini tidak lepas dari berbagai pihak yang telah memberikan nasihat, bimbingan, arahan, serta dukungan dan do'a. Oleh sebab itu, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Kedua Orang Tua, Ayahanda tercinta (Bapak Zaedi) dan Ibunda tercinta (Ibu Komariyah) yang selalu memberikan do'a, nasihat, dukungan, semangat dan kasih sayang kepada penulis sehingga penulis dapat mengatasi dan menyelesaikan permasalahan yang muncul dalam perkuliahan dan penulisan skripsi;
2. Prof. Dr. Imam Taufiq, M.Ag., Rektor Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang;

3. Dr. Ismail, M.Ag., Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang;
4. Ibu Baiq Farhatul Wahidah, M.Si, Ketua Program Studi Biologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang;
5. Ibu Arnia Sari Mukaromah, M.Sc, Dosen Pembimbing I yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, mengarahkan, memberikan kritik, saran, dan motivasi kepada penulis guna terselesaikannya skripsi ini;
6. Bapak Irvan Fadli Wanda, M.Si. Dosen Pembimbing II yang telah meluangkan waktu untuk memberikan ide, mengoreksi, membimbing, memberikan kritik, saran, dan motivasi kepada penulis selama proses penelitian dan penulisan skripsi ini;
7. Bapak Dr. Yan Rianto, M.Eng. selaku Deputy Bidang Infrastruktur Riset dan Inovasi, Badan Riset dan Inovasi Nasional yang telah megizinkan penulis melakukan penelitan di laboratorium Teub;
8. Bapak Andang Syaifudin M.Si. selaku dosen wali yang selalu memberikan bimbingan dan arahan selama perkuliahan;
9. Seluruh staff di laboratorium Treub, Pusat Riset Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya, Badan Riset dan Inovasi Nasional, bapa Muhammad Rifqi Hariri, M.Si., Bapak Prima Wahyu Kusuma Hutabarat, M.Sc., Bapak

Irfan Martiansyah, M.Si., yang telah memberikan bantuan selama penelitian;

10. Ibu Asri Febriana M.Si selaku dosen yang selalu memberikan bimbingan dan arahan selama proses penelitian dan penulisan skripsi;
  11. Nur Izza Navida, Amidatur Rohmaniyah, Chusnul Chotimah yang telah menemani, mendukung dan memberikan banyak motivasi dari awal perkuliahan hingga akhir penulisan skripsi;
  12. Annisa Ade lyonna, Eka Sasmita, Merdita Rizqia N.M., Ashimatul Maula yang telah memberikan dukungan dan dorongan dalam penulisan skripsi;
  13. Temen seperjuangan molekuler Syifara Chika, Tiara Dwi Melina dan Jauharotun Nafisah yang telah menjadi teman diskusi;
  14. Teman satu angkatan Biologi 19B yang telah yang telah kebersamai dalam masa perkuliahan;
  15. Kepada pemilik NIM 19104070054 yang telah berkontribusi dalam proses penulisan skripsi;
  16. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu yang telah mendukung demi terselesainya skripsi ini.
- Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Semoga

skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulsi dan semua orang.  
*Aminn.*

Semarang, 10 April 2023

Penulis

Lailatuz Zahro

1908016058

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL.....</b>	<b>i</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>NOTA DINAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>MOTTO HIDUP .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstrak.....</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>ix</b>
<b>TRANSLITERASI ARAB-LATIN .....</b>	<b>xi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xix</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xx</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Daftar Gambar Lampiran.....</b>	<b>xxii</b>
<b>Daftar Tabel Lampiran .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Rumusan Masalah .....	5
C. Tujuan Penelitian .....	6
D. Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB II LANDASAN PUSTAKA .....</b>	<b>9</b>
A. Kajian Teori .....	9
1. Tumbuhan <i>Diospyros</i> .....	9
2. Konservasi Genetik .....	15



3.	DNA <i>Barcoding</i> .....	16
4.	<i>Region</i> Internal Transcribed Spacer (ITS) .....	19
5.	Keanekaragaman Tumbuhan dalam Islam.....	21
B.	Kajian Penelitian Yang Relevan .....	23
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>		<b>27</b>
A.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	27
B.	Alat dan Bahan .....	28
C.	Metode.....	29
D.	Analisis Data.....	38
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>40</b>
A.	Deskripsi Hasil Penelitian.....	40
1.	Karakter Morfologi <i>Diospyros</i> sp.....	40
2.	Verifikasi dan Amplifikasi DNA <i>Diospyros</i> sp. ....	46
3.	Elektroforegram Sekuen <i>Diospyros</i> sp. ....	48
4.	Hasil BLASTn <i>Diospyros</i> sp.....	49
5.	Analisis Filogenetik.....	53
6.	<i>Automatic Barcode Gap Discovery</i> (ABGD) <i>Diospyros</i> sp. sekuen ITS .....	55
B.	Pembahasan Hasil Penelitian .....	58
1.	Morfologi Sampel LZ05 & LZ08, <i>D.ferrea</i> (Wild.) Bakh dan <i>D. sumatrana</i> Miq. <i>var. decipiens</i> (Clarke) Bakh.....	58
2.	Verifikasi dan Amplifikasi <i>Diospyros</i> sp. Asal Sumatra Koleksi Kebun Raya Bogor .....	59
3.	Elektroforegram Sekuen <i>Diospyros</i> sp. ....	60
4.	Hasil BLASTn <i>Diospyros</i> sp.....	63
5.	Analisis Filogenetik.....	64

6. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) <i>Diospyros</i> sp. sekuen ITS.....	67
C. Keterbatasan Penelitian .....	70
<b>BAB V SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>71</b>
A. Simpulan.....	71
B. Saran.....	72
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>73</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>87</b>
<b>RIWAYAT HIDUP .....</b>	<b>105</b>

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b>	Tumbuhan <i>Diospyros</i> sp.....	11
<b>Gambar 2.2</b>	Buah dan Biji <i>Diospyros discolor</i> .....	11
<b>Gambar 2.3</b>	Peta Persebaran Tumbuhan <i>Diospyros</i> .....	12
<b>Gambar 2.4</b>	Teknik DNA <i>barcoding</i> .....	17
<b>Gambar 2.5</b>	Sekuen daerah Internal Transcribed Spacer.....	20
<b>Gambar 3.1</b>	Peta Lokasi Penelitian. ....	27
<b>Gambar 4.1</b>	Herbarium <i>Diospyros</i> sp. A: sampel <i>Diospyros</i> LZ05; B: <i>D. ferrea</i> (Wild.) Bakh.....	43
<b>Gambar 4.2</b>	Herbarium <i>Diospyros</i> sp. A: sampel <i>Diospyros</i> LZ08; B: <i>D.sumatrana</i> Miq. var. <i>decipiens</i> (Clarke) Bakh.....	43
<b>Gambar 4.3</b>	Verifikasi hasil ekstraksi <i>Diospyros</i> sp.....	46
<b>Gambar 4.4</b>	Hasil visualisasi produk PCR <i>Diospyros</i> sp.....	47
<b>Gambar 4.5</b>	Hasil visualisasi produk PCR <i>Diospyros</i> sp.....	47
<b>Gambar 4.6</b>	Elektroforegram parsial hasil sekuensing sampel <i>Diospyros</i> sp. LZ05 .....	49
<b>Gambar 4.7</b>	Elektroforegram parsial hasil sekuensing sampel <i>Diospyros</i> sp. LZ08. ....	49
<b>Gambar 4.8</b>	Pohon Filogenik <i>Diospyros</i> sp.....	54
<b>Gambar 4.9</b>	Divergensi intraspesifik pengelompokan spesies menggunakan ABGD .....	55
<b>Gambar 4.10</b>	Histogram <i>Automatic Barcode Gap Discovery</i> (ABGD).....	56

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Data Sampel .....	30
Tabel 3. 2 Parameter Pengamatan Morfologi.....	31
Tabel 4.1 Hasil Karakter Morfologi <i>Diospyros</i> sp. ....	41
Tabel 4.2 Perbandingan Sampel LZ05 & 08.....	44
Tabel 4.3 Perbandingan Jumlah Organisasi Sekuen ITS .....	50
Tabel 4.4 Hasil BLAST Sekuen sampel <i>Diospyros</i> sp. LZ08 .....	51
Tabel 4. 5 Hasil BLAST Sekuen sampel <i>Diospyros</i> sp. LZ08 ....	51
Tabel 4. 6 Komposisi Basa Nitrogen Sampel <i>Diospyros</i> sp.....	52
Tabel 4. 7 Pengelompokan sekuen menggunakan ABGD .....	56
Tabel 4. 8 Jarak genetik sekuen <i>Diospyros</i> sp.....	57

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 3</b> Sekuen sampel <i>Diospyros</i> LZ05.....	91
<b>Lampiran 4</b> Sekuen sampel <i>Diospyros</i> LZ08.....	93
<b>Lampiran 5</b> Sekuen hasil contig <i>Diospyros</i> sp. LZ08 .....	95

## Daftar Gambar Lampiran

<b>Gambar Lampiran 1</b> Dokumentasi Penelitian.....	88
<b>Gambar Lampiran 8</b> Hasil alignment sekuen sampel, 8 sekuen hasil BLAST dan 1 outgrup Euclea .....	100
<b>Gambar Lampiran 9</b> Bagian <i>Gap conserve</i> dan <i>variasi</i> hasil alignment sekuen sampel, 8 sekuen hasil BLAST dan 1 outgrup Euclea.....	104

### Daftar Tabel Lampiran

<b>Tabel Lampiran 2</b> Perbandingan Ciri Khusus Karakter morfologi .....	89
<b>Tabel Lampiran 6</b> Tabel hasil BLASTn di NCBI sampel <i>Diospyros</i> sp. LZ05.....	96
<b>Tabel Lampiran 7</b> Tabel hasil BLASTn di NCBI sampel <i>Diospyros</i> sp. LZ08.....	99

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang Masalah**

Negara Indonesia termasuk dalam sepuluh daftar negara megabiodiversitas tertinggi setelah Brazil. Tingginya keanekaragaman hayati di Indonesia disebabkan oleh beberapa faktor seperti siklus iklim yang stabil, geografis yang terletak diantara pusat biota Australia-Asia, dan banyaknya jumlah pulau kecil hingga besar (Efendi dkk., 2013). Salah satu keanekaragaman hayati yang berpotensi dimanfaatkan berasal dari marga *Diospyros* (suku: Ebenaceae). Tumbuhan *Diospyros* memiliki ciri berupa habitus pohon berbunga, percabangan monopodial, batang hitam bercorak, tipe daun tunggal, tidak bergetah, umumnya terdapat bintik hitam kembar di bagian belakang daun (*gland*) (Santoso, 2002). Tumbuhan ini menghasilkan banyak manfaat, mulai dari akar, batang, daun, bunga, buah, dan biji. Beberapa *Diospyros* spp. mempunyai buah yang bisa dimakan yaitu buah kesemek (*D. kakii*) dan merupakan penghasil kayu berkualitas tinggi yaitu kayu eboni (*D. celebica*) (Kurniawan dan Bayu, 2010). Selain itu, masyarakat Indonesia banyak memanfaatkan tumbuhan *Diospyros* sebagai bahan konstruksi dan sumber ekonomi. Tumbuhan yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat



tanpa adanya pemeliharaan lanjutan berpotensi mengalami kepunahan. Proses kepunahan dapat terjadi bahkan sebelum jenis tumbuhan tersebut teridentifikasi namanya. Beberapa jenis *Diospyros* terdaftar dalam IUCN *Red List of Threatened Species* sebagai kategori tumbuhan terancam (*threatened*) dan rentan (*vulnerable*) serta harus dilindungi berdasarkan Peraturan Menteri Kehutanan Nomor:P.57/MENHUT-II/2008. Oleh karena itu, upaya konservasi terhadap *Diospyros* spp. perlu dilakukan untuk mengantisipasi kepunahan. Salah satu upaya konservasi yang dapat dilakukan adalah inventarisasi dan identifikasi jenis-jenis tumbuhan *Diospyros* (Andila dan Peneng, 2017).

Marga *Diospyros* spp. yang tersebar di daerah tropis dan subtropis kawasan Asia Pasifik berhasil di inventarisasi dengan jumlah sekitar 300-500 jenis (Wanda, Djuita, & Chikmawati, 2021). Pusat keragaman *Diospyros* spp. terdapat di benua Asia dan Indo-Pasifik, khususnya di kawasan Malesiana yang dilaporkan memiliki sekitar 167 jenis *Disopyros* spp. (APG IV 2016). Beberapa *Diospyros* spp. telah dikonservasi secara *ex-situ* dan *in-situ* seperti di Kebun Raya ataupun Taman Nasional (Wanda, Djuita, & Chikmawati, 2021). Kebun Raya Bogor merupakan salah satu tempat konservasi *ex-situ* yang mengkonservasi 32 jenis tumbuhan *Diospyros* dan sebanyak 41 nomor koleksi

tumbuhan *Diospyros* masih belum teridentifikasi jenisnya. Nomor koleksi *Diospyros* sp. yang belum banyak teridentifikasi di Kebun Raya Bogor berasal dari wilayah Sumatra dan diduga berpotensi sebagai jenis baru. Informasi mengenai jenis *Diospyros* spp. asal Sumatra juga masih belum terdata dengan baik dari segi klasifikasi, bahkan publikasi mengenai identifikasi *Diospyros* spp. asal Sumatra belum pernah ditemukan dan dilakukan.

Identifikasi *Diospyros* sp. dapat dilakukan secara morfologi dan molekuler. Identifikasi morfologi bisa dilakukan ketika organ vegetatif dan generatif *Diospyros* sp. tersedia lengkap. Namun, beberapa *Diospyros* spp. koleksi Kebun Raya Bogor secara morfologi sulit diidentifikasi karena organ generatif tidak tersedia, sehingga proses identifikasi morfologi hanya dapat dilakukan berdasarkan bagian vegetatif seperti batang dan daun. Hal ini menjadikan proses identifikasi karakter morfologi membutuhkan waktu yang sangat lama. Selain itu, karakter *dioceous* pada *Diospyros* spp. dan variasi *interspecies* *Diospyros* spp. yang kompleks menyebabkan sulitnya proses identifikasi morfologi *Diospyros* sp. hingga tingkat jenis.

Identifikasi secara molekuler dibutuhkan untuk melengkapi, mempermudah dan mempercepat proses identifikasi *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya

Bogor dengan nilai akurasi yang relatif lebih tinggi (Prehadi dkk., 2015). Identifikasi *Diospyros* spp. secara molekuler dapat menggunakan penanda DNA yang lokasinya berada didalam kloroplas (cNA), mitokondria (mDNA) dan inti sel (nDNA). Beberapa penanda DNA yang digunakan untuk identifikasi *Diospyros* spp. adalah penanda pada bagian tertentu seperti pada kloroplas berupa Gen *Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit (rbcL)*, *ndhF*, *atpB*, *psbA-trnH* dan Gen *Maturase K (matK)*; dan pada bagian inti dapat menggunakan *Internal Transcribed Spacer (ITS)* *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*, *Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1)*, 18S, dan 16S (Jannah dkk., 2021).

*Internal Transcribed Spacer (ITS)* diduga dapat digunakan untuk identifikasi tumbuhan *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor hingga ke tingkat jenis berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan terhadap takson lain (McCullooug dkk., 1998). Identifikasi tumbuhan tingkat jenis secara molekuler seringkali menggunakan primer *Internal Transcribed Spacer (ITS)* yang merupakan penanda pada inti sel dengan nilai akurasi 92,7% ( Ali dkk., 2014; Chen dkk., 2010; Buys dkk., 2016). Primer ITS digunakan karena memiliki banyak kelebihan seperti jumlah salinannya lebih banyak, merupakan primer

*universal* sehingga lebih mudah untuk dianalisis, dapat membedakan antara inter dan intra spesies, dan hasil amplifikasi yang dihasilkan lebih informatif (Hidayat dkk., 2008). Pada penelitian Tang dkk., (2014) berhasil melakukan identifikasi tumbuhan *Diospyros* sp. di provinsi Zhejiang Selatan, China berdasarkan penanda barcode ITS. Hasil penelitian tersebut menunjukkan penanda ITS mampu memisahkan spesies dari marga *Diospyros* berdasarkan posisi filogenetik.

Penelitian identifikasi *Diospyros* sp. dilakukan untuk melihat keberhasilan pendekatan molekuler dan morfologi dalam mengidentifikasi *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor yang sebelumnya belum pernah dilakukan. Penelitian ini mampu memberikan informasi terkait kajian *Diospyros* sp. berdasarkan morfologi, rekonstruksi pohon filogenetik, dan identifikasi identitas jenis *Diospyros* sp. tersebut. Hal ini merupakan salah satu bagian dari upaya konservasi tumbuhan *Diospyros* sp. yang ada di Indonesia.

## **B. Rumusan Masalah**

Rumusan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana karakteristik morfologi *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor?

2. Bagaimana karakteristik sekuen *Internal Transcribed Spacer* pada *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor?
3. Bagaimana kekerabatan filogenetik *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor berdasarkan sekuen *Internal Transcribed Spacer* dibandingkan dengan data di NCBI?

### **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini antara lain:

1. Mendeskripsikan karakteristik morfologi *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor;
2. Menganalisis karakteristik sekuen *Internal Transcribed Spacer* pada *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor;
3. Menganalisis kekerabatan filogenetik *Diospyros* sp. berdasarkan sekuen *Internal Transcribed Spacer* dibandingkan dengan data di NCBI.

### **D. Manfaat Penelitian**

Berdasarkan tujuan dari penelitian, diharapkan penelitian ini memiliki manfaat seperti:

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini bermanfaat dalam menambahkan kajian dan wawasan mengenai karakteristik *Diospyros* sp. dan sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS).

Menambahkan informasi mengenai klasifikasi dan kekerabatan dari tumbuhan *Diospyros* berdasarkan sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Menyediakan data molekuler dan data global di *GenBank* (NCBI).

## 2. Manfaat Praktis

### a. Bagi penulis

Manfaat penelitian ini bagi penulis adalah untuk dalam memperdalam ilmu pengetahuan di bidang genetika dan molekuler tumbuhan, menambah keterampilan lapangan dan laboratorium yang berkaitan dengan molekuler tumbuhan, serta menerapkan ilmu yang berhubungan dengan bioinformatika dan evolusi.

### b. Bagi masyarakat

Manfaat penelitian bagi masyarakat adalah membantu penamaan tumbuhan sehingga tidak terjadi kekeliruan dalam pemanfaatan tumbuhan *Diospyros* spp. dan menyadarkan masyarakat dalam pembudidayaan tanaman langka, sehingga masyarakat tidak terlalu berlebihan dalam memanfaatkan tumbuhan *Diospyros* spp.

### c. Bagi institusi UIN Walisongo

Manfaat penelitian bagi institusi UIN Walisongo Semarang adalah upaya kontribusi dalam tercapainya visi dan misi UIN Walisongo yang berbasis Universitas

Islam riset terdepan berbasis kesatuan dan ilmu pengetahuan.

d. Bagi kebun raya bogor

Manfaat penelitian bagi Kebun Raya Bogor sebagai upaya konservasi tumbuhan yang ada di Indonesia dan mendukung proses identifikasi tumbuhan koleksi Kebun Raya Bogor.

## BAB II

### LANDASAN PUSTAKA

#### A. Kajian Teori

##### 1. Tumbuhan *Diospyros*

###### a) Klasifikasi

*Diospyros* merupakan salah satu marga terbesar dari suku Ebenaceae yang berkerabat dekat dengan marga *Euclea*, *Royena* dan *Lissocarpa*. Lebih dari 500 jenis *Diospyros* spp. yang ada didunia tersebar di kawasan tropis dan sub tropis Asia Afrika. Jumlah persebaran *Diospyros* spp. paling banyak ditemukan di kawasan Asia tenggara seperti Malaysia, Filipina, dan Indonesia (Rana, 2020).

Adapun klasifikasi dari *Diospyros* sp. sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Subkingdom: Viridiplantae

Division : Tracheoophyta

Subdivision : Spermatophytina

Class : Magnoliopsida

Subclass : Asteranae

Ordo : Ericales

Famili : Ebenaceae

Genus : *Diospyros*

Spesies : *Diospyros discolor* (POWO, 2023)



b) Habitus

Tumbuhan *Diospyros* mempunyai ciri tertentu seperti habitus yang disajikan pada Gambar 2.1 berupa pohon berbunga, tinggi pohon sekitar 1 m – 40 m, percabangan monopodial, tumbuhan berumah dua, batang kuat dan berwarna hitam, kulit batang memiliki corak alur, tipe daun tunggal, terletak secara berseling, tidak bergetah, tidak memiliki stipula, *axila* pada cabang muda atau terkadang timbul dari kayu tua dan lateral, bertepi rata dengan percabangan yang menyirip, dan umumnya bagian belakang daun terdapat bintik hitam kembar (*gland*) (Santoso, 2002) tipe biji rekalsitan atau tidak bisa disimpan dalam waktu lama, *ovary superior*, biji berwarna agak gelap, dalam 1 buah berisi 1- 100 biji, tipe biji rekalsitran yang harus cepat ditanam ketika sudah berkecambah, bentuk buah (lonjong, bulat, membulat), ukuran buah 1-4 inci, tekstur buah lembek dan sebagian besar dapat dimakan seperti yang disajikan pada gambar 2.2 (Hiern, 1873). Tumbuhan dari genus *Diospyros* yang tersaji pada Gambar 2.1 umumnya berbentuk pohon ataupun perdu yang berbunga. Ciri khas pada pohon ini ada pada kayu hitam yang memiliki kualitas tinggi dan buahnya yang bisa dimakan (Hendramono dan Allo,

2008). Namun, tidak semua buah dari jenis tumbuhan *Diospyros* dapat dimakan, terdapat juga yang beracun seperti buah dari jenis *Diospyros toxicaria* (Hiern, 1873). Kulit batang dari jenis *Diospyros physocalycina* juga mengandung racun yang biasa digunakan untuk berburu ikan (Suryawan, Ady., Kinho, J., dan Mayasari 2011)



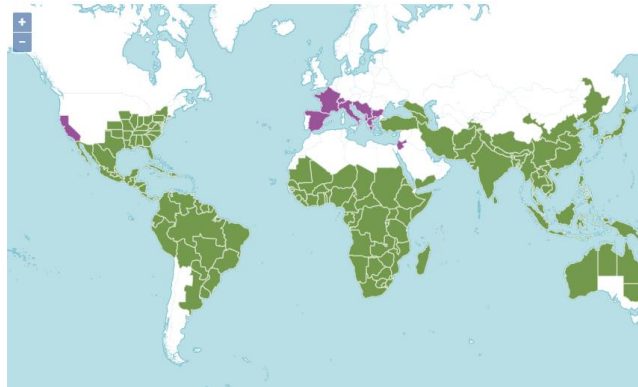
Gambar 2.1 Tumbuhan *Diospyros* sp. (Dokumentasi penelitian, 2021)



Gambar 2.2 Buah dan Biji *Diospyros discolor*(Hestiati, dkk., 2019)

### c) Persebaran

Tumbuhan *Diospyros* pada kawasan Malesiana paling banyak tersebar di pulau-pulau Filipina dan wilayah Indonesia seperti Sumatra, Sulawesi, Kalimantan dan Papua seperti yang disajikan pada Gambar 2.3 (Ariati dkk., 2019). *Diospyros ferrea* merupakan jenis yang paling banyak tersebar di wilayah Indonesia seperti Maluku, Sulawesi, Nusa Tenggara, seluruh Jawa dan jenis yang penyebarannya hanya ada di Sulawesi yaitu *Diospyros celebica* (Alrasyid 2002).



Gambar 2. 3 Peta Persebaran Tumbuhan *Diospyros* (POWO, 2023)

Terdapat 10 jenis tumbuhan *Diospyros* yang ditemukan pada wilayah Sulawesi Utara yaitu *D. buxifolia*, *D. Celebica*, *D. javanica*, *D. macrophylla*, *D.*

*hebecarpa*, *D. minahassae*, *D. maritima*, *D. rumphii*, *D. khortalsiana*, dan *Diospyros* sp. yang tersebar dan dikelola oleh kawasan konservasi Taman Nasional Bogani Nani Wartabone dan BKSDA Sulawesi Utara.

d) Ekologi

Tumbuhan *Diospyros* memiliki tingkat pertumbuhan yang cukup lambat dan dapat hidup di berbagai jenis tanah seperti pasir, tanah berkapur, tanah berbatu, hingga tanah liat yang tidak terlalu tergenang air dan berbagai macam jenis tanah lain seperti podsolik ataupun altopsol. Namun, pertumbuhan *Diospyros* sp. tetap membutuhkan kualitas tanah dengan daya serap yang baik (Wihermanto 2003). Tumbuhan *Diospyros* dapat hidup di curah hujan 1230 - 2750 mm/tahun, dengan ketinggian 50 - 400 m di atas permukaan laut dengan maksimum ketinggian 600 m di atas permukaan laut. Jenis marga *Diospyros* seringkali ditemukan pada hutan alam atau primer dan perbukitan hujan tropika, jarang sekali ditemukan di kawasan hutan sekunder. *Diospyros* umumnya tumbuh mengelompok (*clumping*) dan menjadi komponen utama dari vegetasi hutan pertumbuhannya. Jenis *Diospyros* yang sering ditemukan dengan pola

pertumbuhan tersebut adalah *Diospyros celebica* (Steup 1935)

e) Manfaat dan Kandungan Fitokimia

Tumbuhan *Diospyros* memiliki banyak manfaat yang dapat digunakan oleh masyarakat seperti contoh pada buah *Diospyros perfida* Bakh. dimanfaatkan oleh masyarakat Kalimantan sebagai racun alami untuk ikan, kulit batang dari jenis *Diospyros physocalycina* menghasilkan racun alami untuk berburu ikan (Suryawan dkk., 2011), Buah bisbul yang berasal dari jenis *Diospyros discolor* mengandung senyawa flavonoid dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan (Arrisujaya dkk., 2019), batang pohon dari jenis *Diospyros celebica* Bakh. dapat dijadikan sebagai perabotan rumah tangga ataupun furniture rumah tangga (Martawijaya dkk, 2005 dalam Agung dkk, 2021), terdapat juga *Diospyros kaki* L yang banyak dibudayakan dan menghasilkan buah terbaik yaitu buah kesemek, spesies lain yang dapat menghasilkan buah yang dapat dikonsumsi seperti *D. blancoi*, *D lotus*, *D. malabarica*, *D. mespiliformis*, *D. digyna*, *D. glandulosa*, *D. decandra*, *D. rhodocalyx*. Jenis *Diospyros* yang menghasilkan kayu yaitu *D. mespiliformis*, *D. ebenum*, *D.*

*dendo*, *D. celebica*, dan *D. melanoxylon* (Aji, Palupi, & Budiayati, 2016).

## **2. Konservasi Genetik**

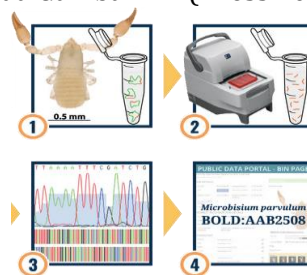
Konservasi genetik merupakan suatu upaya dalam menanggung eksistensi spesies dan habitat agar tetap stabil dalam berinteraksi dengan perubahan lingkungannya (Sulistyawati, Widyatmoko & Nurtjahjaningsih, 2014). Tujuan dari konservasi genetik sendiri adalah untuk melindungi keanekaragaman secara maksimal, sehingga spesies makhluk hidup mampu beradaptasi dan berevolusi (Widyatmoko dan Shiraishi, 2013). Berkembangnya teknologi genetika molekuler akan memberikan perubahan ilmu dari konservasi genetik menjadi konservasi genomik (Byrne, 2018). Kegiatan konservasi genetik sangat membutuhkan kontribusi genetika molekuler, karena pada bidang genetika memiliki keterkaitan antara struktur dengan aktivitas materi genetik dalam makhluk hidup, terutama pada gen-gen pengatur sifat. Sehingga, genetika molekuler mempunyai peran penting dalam mengumpulkan berbagai macam informasi mengenai strategi penyusunan genetik dengan metode yang lebih efektif dan efisien. Penerapan genetika molekuler bertujuan untuk memperoleh berbagai macam informasi genetik dari spesies yang dilindungi, sehingga

keberadaannya dapat dipertahankan (Nurtjahjaningsih, Haryanti & Indrioko, 2015).

### **3. DNA *Barcoding***

DNA *barcoding* merupakan salah satu teknik pengidentifikasian organisme berdasarkan dengan sekuen gen pendek yang telah terstandarisasi. Menurut Hebert dkk., (2003) sekuen DNA pendek dapat mengidentifikasi spesies secara tepat, cepat dan akurat. Sehingga dapat membantu mengidentifikasi keanekaragaman hayati, filogeni dan evolusi. DNA *barcoding* memiliki keunggulan yaitu lebih murah dan lebih cepat dibandingkan metode berbasis DNA yang lainnya seperti *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Microsatellites* (SSRs), *Single Nucleotide Polymorphisms*, *Multi-locus Fingerprints*, dan *Allozymes* (Protein-Electrophoresis). Diantara semua keunggulan, DNA *barcoding* ini sangat diandalkan keabilitas dan kecepatannya dalam proses autentikasi produk profitabel. Berdasarkan keunggulannya tersebut DeSalle dan Goldstein (2019) melaporkan penggunaan DNA *barcoding* telah banyak dilakukan sekitar 2 tahun yang lalu dari tahun 2004-2018. Hal ini ditandai dari banyaknya jumlah artikel yang terbit yaitu sekitar 3.756 artikel.

DNA *barcoding* mampu memberikan solusi terkait identifikasi spesies yang dilakukan secara konvensional. Namun, bukan berarti taksonomi konvensional menjadi tidak penting, sebaliknya, DNA *barcoding* dijadikan sebagai pendekatan (tools) baru bagi seorang ahli taksonomi untuk melengkapi proses identifikasi dengan cepat (Waldchen, Rzanny, & Seeland, 2018). Teknik ini disebut juga sebagai taksonomi modern yang menggabungkan sekuen DNA dengan karakter morfologi untuk identifikasi dan klasifikasi spesies (Kowalska, Pniewski, & Latała, 2019). Teknik DNA *barcoding* di bagi menjadi 4 bagian yaitu: ekstraksi DNA sampel, menentukan dan memperbanyak wilayah target DNA menggunakan PCR, pengurutan produk hasil PCR, dan penyesuaian hasil urutan dengan spesies yang sudah teridentifikasi pada pusat informasi (Database) seperti yang disajikan pada Gambar 2.4 (Kress 2012).



Gambar 2. 4 Teknik DNA *barcoding* (Kress 2012)

Karakteristik yang harus dimiliki oleh DNA *barcode* yaitu sekuen DNA bersifat ortolog, variabilitas harus rendah



untuk membedakan individu yang masih dalam satu spesies dan variabilitas harus cukup untuk membedakan tingkat spesies. Selain itu, dalam pemilihan metode DNA *barcode* juga harus memperhatikan beberapa hal seperti bersifat homolog, harus ada dalam semua taksa yang akan dibandingkan, memiliki pengetahuan mengenai gen dan wilayah genom untuk mengembangkan primer yang akan digunakan, antara tingkat evolusi gen dengan tingkat takson harus sesuai dengan yang diteliti, dan mudah dialignment (Virgilio, Jordaens, & Breman, 2012).

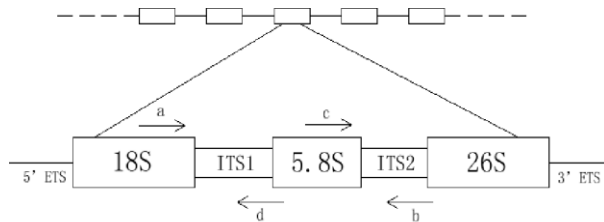
Pada penggunaan DNA *barcoding* harus memperhatikan pemilihan marka *barcoding* dan primer *universal* yang akan digunakan. Sumber DNA yang digunakan untuk DNA *barcoding* digolongkan berdasarkan lokasinya seperti mitokondria (mDNA), inti sel (nDNA), dan kloroplas (cpDNA). Terdapat beberapa *region* yang digunakan untuk pengidentifikasian DNA secara spesifik, seperti spesifikasi *region* mitokondria biasanya digunakan *Cytochrome c oxidase I* (CO1) dan *Cytochrome b* (Cyt b). *Region* tersebut tidak disarankan untuk mengidentifikasi mitokondria pada tumbuhan, hal ini dikarenakan tumbuhan memiliki mutasi yang lebih rendah dibanding hewan sehingga hasil dari variasi nya juga rendah. Sedangkan spesifikasi *region* yang disarankan untuk tumbuhan pada

kloroplas yaitu Gen *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)*, *ndhF*, *atpB*, *psbA-trnH* dan Gen *maturase K (matK)*; spesifikasi pada *region* inti dapat menggunakan *Internal Transcribed Spacer (ITS)*, *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*, *Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1)*, 18S, dan 16S (Jannah dkk., 2021). Terdapat dua syarat dalam penggunaan penanda DNA *barcoding* yaitu variabilitas interspesies tinggi dan variasi intraspesies yang rendah (2%) (Kowalsk, Pniewski, & Latała, 2019).

#### **4. Region Internal Transcribed Spacer (ITS)**

Gen ITS biasa digunakan dalam penelitian tumbuhan ditingkat spesies dengan melihat daerah *non coding* dan digunakan untuk mengidentifikasi DNA tumbuhan yang letaknya di inti sel dengan primer *universal* (Ali dkk., 2014).

Sekuen daerah ITS memiliki tingkat variasi lebih tinggi dan merupakan daerah evolusioner. Dalam urutan nukleotida sekuen ITS terdapat daerah *coding* dan *non-coding*. ITS 1 dan ITS 2 merupakan daerah *non coding* yang letaknya berada diantara daerah *coding* yaitu rRNA 18S, rRNA 5.8S dan 26S (Articus 2004).



Gambar 2. 5 Sekuen daerah Internal Transcribed Spacer (Liu dkk., 2014)

Daerah *non-coding* yaitu ITS 1 dan ITS 2 memiliki panjang sekitar 600 – 900 bp. Sedangkan daerah *coding* seperti rRNA 5.8S memiliki panjang sekitar 2600 bp dan 26S memiliki panjang sekitar 3300 bp. Daerah pengkode merupakan suatu urutan yang sangat terkonveksi dalam menyimpulkan hubungan filogenetik dalam filum utama, sedangkan daerah *non-coding* sangat bervariasi dan memiliki potensi besar untuk mempelajari hubungan antara genera atau spesies yang terkait erat karena laju evolusi yang lebih cepat (Ai dkk., 2010)

*Internal Transcribed Spacer* pada bidang evolusi biasa digunakan sebagai pembanding di tingkat genus hingga spesies, mampu menjawab beberapa masalah filogenetik serta mampu memahami keanekaragaman pada tumbuhan. ITS memiliki beberapa kelebihan seperti mudah diamplifikasi, ukurannya yang relative kecil (600 - 900 bp)(Ekasari, Retnoningsih, & Widiанти, 2012), tingkat

perbanyakannya lebih tinggi, banyak salinan gen rRNA, serta disetiap komponennya terdapat derajat konservasi, dan derajat variasi yang dimiliki tinggi bahkan antar spesies terkait erat karena adanya penyisipan atau penghapusan sekuen. Selain itu, daerah ITS juga sangat bagus dijadikan sebagai salah satu kandidat DNA *barcoding*. Hal ini dikarenakan sekuen ITS mampu dijadikan sebagai penanda filogenetik karena dapat membentuk kelompok secara khusus, gambar yang dihasilkan lebih informatif, dan seringkali digunakan dalam rekonstruksi pohon filogenetik dari tingkat genus hingga spesies (Chen dkk., 2010). Menurut Aprilianingsih (2021) penanda DNA *barcoding* ITS mampu mendeskriminasi kedudukan *Homalomena pexa* dengan nilai akurasi 97%. Hal ini didukung oleh penelitian Mahmudah (2021) yang membuktikan penanda ITS dapat digunakan dalam konfirmasi spesies dari suku Costaceae.

## **5. Keanekaragaman Tumbuhan dalam Islam**

Islam telah menjelaskan di dalam AL-Qur'an bahwasannya Allah SWT telah menciptakan berbagai macam jenis tumbuhan di bumi dengan ciri khasnya masing-masing. Adanya keanekaragaman tumbuhan yang ada di bumi merupakan salah satu bukti kekuasaan-NYA. Pembahasan mengenai tumbuhan terdapat didalam surah Ar-Rad ayat 4 Allah Berfirman:

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَوِّرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزُرْعٌ وَنَخِيلٌ  
 صِنَوَانٌ وَغَيْرِ صِنَوَانٍ يُسْقَى بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفُضِلٌ بَعْضُهَا عَلَى بَعْضٍ فِي  
 الْأَكْلِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْلَمُونَ

Artinya: *Dan di bumi terdapat bagian-bagian yang berdampingan, kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman, pohon kurma yang bercabang, dan yang tidak bercabang; disirami dengan air yang sama, tetapi Kami lebihkan tanaman yang satu dari yang lainnya dalam hal rasanya. Sungguh, pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang-orang yang mengerti* (Qur'an Kemenag. 2022)

Surah Ar-Rad ayat 4 menerangkan bahwa Allah SWT telah menciptakan sesuatu secara berdampingan. Kata berdampingan pada ayat tersebut merujuk pada berbagai macam tanah yang ada di bumi. Contoh pada bagian tanah yang baik (subur) dapat menumbuhkan beranekaragam tanaman yang dapat dimanfaatkan oleh manusia, sedangkan pada tanah yang asin dan berpasir tidak dapat menumbuhkan berbagai macam tanaman (Katsir dan Ibnu 2004). Menurut pendapat Ibnu Abbas, Mujahid, & Sa'id bin Jubair ayat ini mengandung beberapa bukti keanekaragaman tumbuhan yang diciptakan oleh Allah seperti pada potongan ayat yang memiliki arti berbagai macam tanaman, kebun anggur, serta pohon kurma yang bercabang dan tidak bercabang (Katsir dan Ibnu 2004). Salah satu keaneragaman tumbuhan yang terdapat di Indonesia adalah tumbuhan *Diospyros*. Kandungan ayat Al-

Qur'an di atas memberikan gambaran kepada kita untuk memperhatikan keanekaragaman yang sudah diberikan sebagai wujud rasa syukur. Salah satu bentuk rasa syukur dan peduli atas nikmat yang diberikan oleh Allah SWT. dengan melakukan identifikasi tumbuhan *Diospyros* sp.

## **B. Kajian Penelitian Yang Relevan**

Kajian penelitian yang relevan digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- 1) Discriminant Analysis of "Jinzaoshi" from Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.; Ebenaceae): A Comparative Study Conducted Based on Morphological as well as ITS and *matk* Sequence Analyses. Penelitian yang dilakukan oleh Tang dkk (2014) berhasil mengkonfirmasi tumbuhan "Jinzaoshi" asal China yang dikatakan mirip dengan kultivar *Diospyros kaki* Thunb berdasarkan penanda ITS dan *matK*. Hasil analisis filogenetik filogenetik menggunakan metode NJ dan ML menunjukkan bahwa tumbuhan "Jinzaoshi" tidak mengelompok dengan *Diospyros kaki* Thunb. yang mungkin tergolong dalam spesies baru dari marga *Diospyros* (Ebenaceae).
- 2) Polymorphism of Simple Sequence Repeat *Regions* of Sulawesi Ebony (*Diosphyros celebica* Bakh.) in

Experimental Forest of Hasanuddin University Provenance.

Penelitian Larekeng, Restu, & Gusmiaty (2016) mengevaluasi kemampuan penanda mikrosatelit suku Ebenaceae untuk mengamplifikasi DNA Ebony dan untuk menentukan suhu *annealing* PCR yang sesuai. Hasil visualisasi alel menunjukkan sembilan dari 17 SSR primer mampu mengamplifikasi DNA Ebony dengan suhu *annealing* sekitar 53<sup>o</sup>-56<sup>o</sup> C. sehingga, sembarang primer tersebut direkomendasikan sebagai studi masa depan dalam keragaman genetik serta analisis pola penyebaran serbuk sari.

- 3) Variasi Fenotip dan Genotip Eboni (*Diospyros Celebica* Bakh.) pada Hutan Alam dan Hutan Tanaman Di Sulawesi Tengah dan Sulawesi Barat.

Pada penelitian Wahyuningsih, Muslimi & Yusran (2017) dilakukan identifikasi molekuler untuk menentukan keragaman fenotipe dan genotipe antar populasi kayu hitam (*Diospyros celebica* Bakh.) di hutan di Sulawesi khususnya dari Sulawesi Tengah dan Sulawesi Barat. Hasil penelitian menunjukkan sembilan sampel daun yang diambil pada berbagai populasi eboni memperlihatkan kenampakan pola pita yang khas pada fragmen DNA yang berasal dari daerah Lende

4) Molecular Phylogenetics and Evolution.

Pada penelitian Duangjai dkk, (2009) dilakukan Identifikasi kekerabatan *Diospyros* berdasarkan pohon filogenik menggunakan urutan DNA dari delapan daerah plastid (*rbcL*, *atpB*, *matK*, *ndhF*, *trnK intron*, *trnL intron*, *trnL-trnF spacer*, and *trnS-trnG spacer*). Hasil penelitian ini mengkonfirmasi *monophyly Diospyros* dan memberikan gambaran yang lebih jelas hubungan dalam genus dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Bukti dari analisis filogenetik menunjukkan bahwa *Diospyros* menjajah kaledonia baru beberapa kali. Empat garis keturunan *Diospyros* di kaledonia baru juga berbeda dalam tingkat versifikasinya. Data molekuler menunjukkan bahwa satu garis keturunan adalah paleoendemik yang berasal dari spesies Australia purba. Tiga garis keturunan lainnya lebih dekat dengan beberapa spesies Asia Tenggara, dua di antaranya adalah neoendemik, dan satu telah menyebar dengan cepat baru-baru ini.

5) Molecular phylogenetics of Malesian *Diospyros* (Ebenaceae) based *trnL-F spacer sequences*.

Penelitian Wanda, Djuita, & Chikmawati (2021) telah berhasil menungkapkan informasi filogenetik serta keanekaragaman spesies *Diospyros* melalui DNA



*barcoding* terhadap 20 jenis *Diospyros* aksesori koleksi Kebun Raya Bogor, 40 *Diospyros* aksesori, dan empat aksesori outgroup yang diperoleh dari database NCBI. Primer barcode DNA yang digunakan berasal dari plastid (*trnL-trnF Intergenic Spacer*).

Penelitian ini memiliki beberapa perbedaan dengan penelitian sebelumnya, seperti: tempat pengambilan sampel yang berbeda; nomor aksesori sampel yang digunakan berbeda; penelitian mengenai sampel *Diospyros* spp. yang berasal dari wilayah Sumatra belum pernah dilakukan; metode identifikasi penelitian sebelumnya hanya menggunakan pendekatan DNA *barcoding*, namun pada penelitian ini menggabungkan pendekatan secara morfologi dan molekuler berupa DNA *barcoding*; metode penelitian DNA *barcoding* sebelumnya menggunakan 8 primer berupa *rbcL*, *atpB*, *matK*, *ndhF*, *trnK intron*, *trnL intron*, *trnL-trnF spacer*, and *trnS-trnG spacer*, sedangkan pada penelitian ini menggunakan primer *Internal Transcribed Spacer (ITS)*.

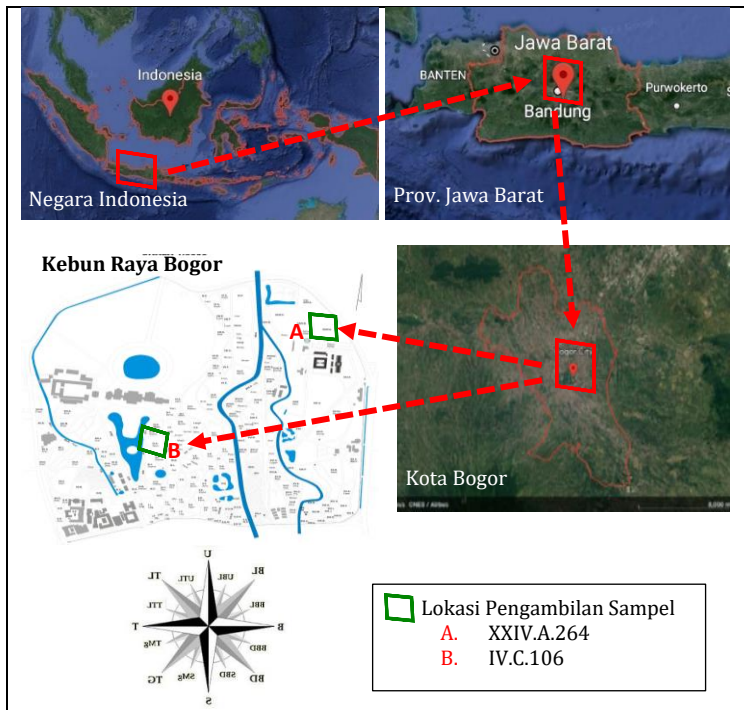
Berdasarkan perbedaan tersebut, Penelitian mengenai Identifikasi *Diospyros* sp. Asal Sumatra Koleksi Kebun Raya Bogor Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler merupakan suatu penelitian baru yang sebelumnya belum pernah dilakukan.

### BAB III

## METODE PENELITIAN

### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 3 Januari - 25 Februari 2022 di Laboratorium Treub, Pusat Riset Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya-BRIN. Analisis data dilakukan pada Oktober 2022 - Februari 2023 di Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang dan di Herbarium Bogoriense (BO)-BRIN.



Gambar 3.1 Peta Lokasi Penelitian.

## B. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang digunakan dalam kegiatan ini adalah timbangan analitik (Precisa), spatula, erlenmeyer 125 ml (Iwaki), gelas ukur 100 ml (Pyrex), gelas beker (Pyrex), microwave (Sharp), cetakan & sisir cetakan agarose, mortar dan pestle, gunting, alat tulis, plastik, label gantung, gunting dahan, kantong teh, kamera, plastik koleksi ukuran 40 x 60, *RHS Colour Chart*, pisau, plastik *zip lock*, *PCR-Thermal Cycler* (Takara), mikropipet (Eppendorf) ukuran 0,1  $\mu\text{L}$  -2  $\mu\text{L}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  - 2,5  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ -20  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ -100  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ -1000  $\mu\text{L}$ . *microtube* ukuran 0,2 mL, 1,5 mL, 2 mL. *microtip* AXYGENTR-222-C, TR-222 Y, *blue tip* 1000 (onemed), vortex (VWR-Digital Vortex Mixer), spindown (EMS-Myfuge), *heatblock* (VWR-Digital Heatblok), *sentrifuge* (Spectravuge 24D-labnet), elektroforesis (Mupid & NyxTeknik), GelDoc (Bio-RED EZ imager), *UV Tray*, PCU Komputer, kulkas (LG), *frezeer* (LG), rak *microtube*, pipet serologi (20 mL), dan bulp pipet.

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam kegiatan ini adalah pasir kuarsa, PCR Mix (2x Mytaq HS Red Mix), marker (Thermoscientific SM0311 1 kb DNA *Ladder*), *Water*

*Double-distilled water* (ddH<sub>2</sub>O) (Promega), silica gel, aluminium foil, *gel agarosa* 1% (Thermoscientific), *Buffer Tris-acetate* EDTA (TAE) 1X (Ultra Pure Grade), primer *rbcl forward* (5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC -3') dan *reverse* (5'- GTA AAA TCA AGT CCA CCRCG -3') (CBOL, 2009), primer ITS konsentrasi 5 µM *forward* (5'- ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G -3') dan *reverse* (5'- TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C-3') (Sun dkk., 1994), *GelRed™ Nucleid Acid* 10,000<sup>x</sup> *In Water* (Biotium 41003), *GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit* K0971 (Thermo scientific), dan Etanol absolut (Merck).

### C. Metode

#### 1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel tanaman *Diospyros* sp. dilakukan di kawasan Kebun Raya Bogor di vak XXIV.A.264 dan IV.C.106 yang disajikan pada Gambar 3.1. Langkah awal, tangkai tumbuhan yang berisi empat sampai delapan daun diambil dari masing-masing sampel pada Tabel 3.3 dan tiga helai daun digunakan sebagai sampel DNA. Daun dimasukkan dalam kantong teh, diberi label kemudian disimpan dalam toples yang berisi *silica gel*. Tangkai daun yang sudah diambil diberi label gantung berisi kode tanaman, nama tumbuhan, tanggal pengambilan dan nomor vak. tanaman,

kemudian dimasukkan ke dalam plastik sampel berukuran 40 x 60.

Tabel 3.1 Data Sampel

No.	Nama Tumbuhan	Kode sampel	Lokasi Tumbuhan	Asal koleksi
1.	<i>Diospyros</i> sp.	LZ 05	XXIV.A.264	Sumatra
2.	<i>Diospyros</i> sp.	LZ 08	IV.C.106	Sumatra Barat

## 2. Pembuatan dan Pengamatan Karakteristik Morfologi *Diospyros* sp.

Pengamatan karakteristik morfologi dilakukan dengan langkah awal tiga tangkai tumbuhan yang berisi empat hingga delapan daun diambil dari masing-masing sampel *Diospyros* LZ 05 dan LZ 08. Setiap tangkai diberi label, didokumentasikan menggunakan kain hitam dan diberi penggaris sebagai alat kalibrasi. Sampel yang sudah didokumentasikan dibuat herbarium, langkah awal pembuatan herbarium yaitu sampel diletakan diatas koran dan ditutup, setiap sampel dibuat tiga spesimen herbarium yang diletakan pada koran berbeda sebagai ulangan. Setiap spesimen diberi tanda diatas koran. Semua sampel yang sudah dibungkus koran ditumpuk menggunakan kardus dan diletakan diantara dua sasak kemudian diikat. Sampel dimasukkan ke dalam oven selama tiga hari dengan suhu

60<sup>0</sup> C. setelah semua sampel kering, dilakukan pengamatan morfologi secara kualitatif dan kuantitatif.

Pengamatan morfologi secara kuantitatif digunakan parameter organ generatif seperti batang, petiol, dan daun. Alat kalibrasi yang digunakan untuk pengukuran adalah penggaris. Panjang daun diukur dari ujung hingga pangkal daun, lebar daun diukur dari tepi kanan hingga kiri daun (bagian terlebar), dan rasio daun diukur mulai dari bagian terlebar daun hingga ke pangkal daun. Sedangkan, bagian batang diukur berdasarkan perkiraan tinggi seseorang.

Pengamatan morfologi secara kualitatif mengacu pada buku "*Manual of Life Architecture*" karya Ellis dkk., (2009), "*Clasification of The Architecture of Dicotyledonous Leaves*" karya Hickey (1973) dan "*The Kew Plant Glossary*" karya . RHS *Colour Chart* digunakan dalam proses pengamatan warna pada semua bagian tumbuhan. Parameter utama pengamatan morfologi terdapat pada Tabel 3.2.

Tabel 3. 2 Parameter Pengamatan Morfologi

No	Ciri morfologi	Sifat Ciri <i>Diospyros</i> sp.	
		XXIV.A.264	IV.C.106
1.	Habitus <b>Batang</b>		
2.	Percabangan		
3.	Warna		

Tabel 3.2 Lanjutan

No	Ciri morfologi	Sifat Ciri <i>Diospyros</i> sp.	
		XXIV.A.264	IV.C.106
4.	Corak/ alur		
	<b>Daun</b>		
5.	Tipe		
6.	Bentuk		
7.	Ujung		
8.	Pangkal		
9.	Tepi		
10.	Letak		
11.	Warna Adaksial Daun Dewasa		
12.	Warna Abaksial Daun Dewasa		
13.	Warna Adaksial Daun Muda		
14.	Warna Abaksial Daun Muda		
15.	Permukaan Atas		
16.	Permukaan Bawah		
17.	Warna Tangkai Daun		
18.	Petiol daun		
19.	Gland		
20.	Letak Trikoma		

Tabel 3.2 Lanjutan

No	Ciri morfologi	Sifat Ciri <i>Diospyros</i> sp.	
		XXIV.A.264	IV.C.106
<b>Tulang Daun</b>			
21.	Warna		
22.	Vena Sekunder		
23.	Warna		
24.	Vena Sekunder		
25.	Vena tersier		
26.	Tinggi Tumbuhan		
27.	Panjang daun		
28.	Lebar daun		
29.	Panjang petiol		
30.	Rasio Panjang Lebar Daun		

### 3. Ekstraksi DNA

Pada tahap penggerusan sampel yaitu satu helai daun dipotong kecil-kecil dengan gunting untuk memudahkan penggerusan. Pasir kuarsa ditambahkan sebanyak 1 spatula untuk memudahkan penggerusan dengan mortar & pestle. Setiap proses pemotongan sampel, gunting di sterilisasikan menggunakan alkohol dan setiap penggerusan sampel digunakan mortar dan pestle yang berbeda. Sampel yang sudah halus dimasukkan ke dalam 2 buah *tube* 2 mL. *Tube*



pertama digunakan sebagai sampel dan *tube* 2 mL kedua sebagai stock. Setiap *tube* diberi kode tanaman.

Ekstraksi dilakukan menggunakan KIT berupa GeneJET *Plant Genomic DNA Purification Mini Kit* K0971 (Thermo scientific). Tahap pertama ekstraksi adalah *Buffer A* ditambahkan sebanyak 350  $\mu$ L ke dalam setiap sampel lalu divortex. *Buffer B* ditambahkan sebanyak 50  $\mu$ L dan RNase ditambahkan sebanyak 20  $\mu$ L, lalu divortek kembali. Setiap sampel diinkubasi dalam *heatblock* dengan suhu 60<sup>o</sup> selama 20 menit dan di *inverting* setiap 5 menit sekali. Larutan presipitasi ditambahkan sebanyak 130  $\mu$ L, di *inverting*, dan diinkubasi di *freezer* selama 5 menit. Sampel disentifugasi selama 7 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Supernatan hasil sentrifugasi diambil 400  $\mu$ L dan dipindahkan ke dalam *tube* 2 mL baru. Larutan *gDNA Binding Solution* ditambahkan sebanyak 400  $\mu$ L dan ethanol 96% ditambahkan sebanyak 400  $\mu$ L ke dalam *tube* yang sudah berisi supernatan. Sehingga larutan total didalam *tube* adalah 1.200  $\mu$ L. Setengah dari larutan total (600  $\mu$ L) dimasukkan ke dalam *spin column*, disentifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm kemudian *flow-through* dibuang. Setengah larutan total (600  $\mu$ L) dimasukkan ke dalam *spin column*, disentifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm kemudian *flow-through* dibuang.

Larutan *wash buffer* I ditambahkan sebanyak 500  $\mu\text{L}$  ke dalam *spincolumn*, disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm kemudian *flow-through* dibuang. Larutan *wash buffer* II ditambahkan sebanyak 500  $\mu\text{L}$  ke dalam *spincolumn*, disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 13.000 rpm, *flow-through* dan *tube* dibuang, *filter column* dipindahkan ke *tube* 1,5 mL. Larutan *Elution Buffer* ditambahkan sebanyak 100  $\mu\text{L}$ , diamkan selama 5 menit disuhu ruang, disentrifugasi 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, *filter column* dibuang. Hasil ekstraksi DNA berupa larutan yang terdapat didalam tube 1,5 mL.

#### 4. Verifikasi Hasil Ekstraksi DNA Menggunakan Sekuen *rbcl*

Tahap amplifikasi menggunakan *region rbcl* dilakukan untuk konfirmasi keberadaan DNA hasil ekstraksi pada tahap sebelumnya, terdiri dari *region PCR Mix* dalam *microtube* berukuran 1,5 mL sebanyak 13  $\mu\text{L}$  dengan komposisi enam  $\mu\text{L}$  *PCR Mix* (Taq polymerase), satu  $\mu\text{L}$  primer *rbcl forward* (5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC -3'), satu  $\mu\text{L}$  primer *rbcl reverse* (5'- GTA AAA TCA AGT CCA CCRCG -3'), dan tiga  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, dan masing-masing sampel DNA ditambahkan sebanyak dua  $\mu\text{L}$ , di spindown sekitar 5-10 detik. *Region PCR Mix* dimasukkan ke dalam mesin *Thermal Cycler* untuk proses amplifikasi DNA selama

1.30 jam. Volume disesuaikan dengan larutan total yaitu 13  $\mu\text{L}$ . Amplifikasi *region rbcL* dimulai dengan pra denaturasi dengan suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama 1:30 detik, kemudian diulang ke 35 siklus yaitu: denaturasi dengan suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama 15 detik, *annealing* dengan suhu  $52^{\circ}\text{C}$  selama 15 detik dan elongasi dengan suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 20 detik. Kemudian tahap *post* elongasi selama 4 menit dengan suhu  $72^{\circ}\text{C}$  dan simpan disuhu  $4^{\circ}\text{C}$  (CBOL, 2009).

#### 5. Amplifikasi Sekuen ITS

Tahap amplifikasi sekuen ITS terdiri dari *region PCR Mix* yang disiapkan dalam *microtube* berukuran 1,5 mL sebanyak 50  $\mu\text{L}$  dengan komposisi 25  $\mu\text{L}$  PCR Mix (*Taq polymerase*), dua  $\mu\text{L}$  *primer ITS forward* (5'- ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G -3'), dua  $\mu\text{L}$  *primer ITS reverse* (5'- TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C-3'), 11  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, dan masing-masing sampel DNA ditambahkan sebanyak 10  $\mu\text{L}$ , dispindown selama lima detik. *Region PCR Mix* dimasukkan ke dalam mesin *Thermal Cycler* untuk proses amplifikasi selama 1.20 jam. Volume disesuaikan larutan total didalam *tube* yaitu 50  $\mu\text{L}$ . Amplifikasi *Region ITS* dimulai dari pra denaturasi dengan suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama satu menit, kemudian diulang ke 35 siklus yaitu: *denaturasi* dengan suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 15 detik, *annealing* dengan suhu  $58^{\circ}\text{C}$  selama 15 detik dan elongasi dengan suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama

10 detik. kemudian masuk tahap *post* elongasi selama lima menit dengan suhu 72°C dan simpan disuhu 4°C (Sun dkk., 1994).

#### 6. Elektroforesis dan Visualisasi DNA

Teknik elektroforesis diperlukan *gel agarosa* dengan konsentrasi 1%, sehingga dibutuhkan serbuk agar sebanyak 0,8 gr yang dilarutkan dengan TAE 1X 80 mL, larutan dihomogenkan, Bagian mulut erlenmeyer ditutup menggunakan *aluminium foil*, diberi lubang. Larutan agar dimasukan ke *microwave* selama satu hingga dua menit sampai bubuk agar larut. Setelah selesai, *gel red* ditambahkan sebanyak 1 µL ke dalam agar, dihomogenkan, lalu larutan agar dimasukkan ke dalam cetakan. Penuangan larutan agar dilakukan satu arah sehingga pepadatan agar bisa merata. Setelah mengeras, cetakan sisir diangkat dan gel agar dipindahkan ke alat elektroforesis. Pastikan gel agar yang dimasukkan ke alat elektroforesis terendam TAE 1X.

DNA *ladder* 1 kb dimasukkan ke dalam sumur pertama sebanyak 2 µL, sampel DNA dimasukkan sebanyak 5 µL ke dalam masing-masing sumur, alat elektroforesis dinyalakan dan waktu diatur 45 menit dengan tegangan 100 Vol. Setelah selesai, gel diangkat dan pastikan tidak ada larutan TAE 1X yang terbawa. Gel dipindahkan ke atas layar *UV Tray*

dengan didorong secara perlahan dari cetaknya. Pastikan tidak ada gelembung di bawah gel dan posisi gel disesuaikan. Visualisasi DNA hasil elektroforesis dengan *UV Tray* tersebut dimasukkan ke dalam *GelDoc* (Bio-RED EZ imager). Kemudian hasil visualisasi DNA dapat dilihat di layar computer.

#### 7. Sekuensing

Sekuensing dilakukan dengan mengirimkan produk PCR kepada pihak 1<sup>st</sup> Base Singapura, melalui PT. Genetika Science Indonesia.

#### **D. Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis menggunakan aplikasi berupa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA11) (Kumar dkk., 2018). Data awal yang didapat setelah melakukan sekuensing adalah sekuen DNA berbentuk kromatogram *forward & reverse*. Sekuen DNA *forward & reverse* dimasukan dan dicek kromatogram nya terlebih dahulu, bagian ujung depan dan belakang sekuen *forward & reverse* dipotong (*trimming*) sebanyak 20 basa nitrogen. Sampel disejajarkan (*alignment*) menggunakan *ClustalW*, dibuat *contig* dengan melihat perbedaan basa nitrogen antara *forward* dan *reverse*. Hasil *contig* dianalisis menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) di website *genbank* NCBI (National Center for

Biotechnology Information (nih.gov). Hasil BLAST dari masing-masing sampel akan muncul 100 sekuen dan diambil lima sekuen terbaik dari setiap sampel berdasarkan nilai *perc. Ident*, *E-value*, dan *Quary Cover* tertinggi. Data hasil BLASTn diunduh dan di disejajarkan (*alignment*) dengan sampel menggunakan *ClustalW* pada aplikasi MEGA. Rekontruksi pohon dilakukan menggunakan neighbour joining (NJ) dan Kimura-2 parameter dengan nilai bootstrap 1000 kali.

Data selanjutnya dianalisis menggunakan situs website *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) [https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/ab\\_gdweb.html](https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/ab_gdweb.html). File fasta hasil Alignment dimasukkan pada halaman awal. Pengaturan pada nilai Pmax diubah menjadi 0,03 dan gunakan distance kimura.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Deskripsi Hasil Penelitian

##### 1. Karakter Morfologi *Diospyros* sp.

Persamaan karakter morfologi *Diospyros* sp. LZ05 & LZ08 merupakan ciri dari genus *Diospyros* berupa habitus pohon, percabangan pohon monopodial, tipe daun tunggal, letak daun berseling dan tepi daun rata. Karakter khusus sampel LZ05 berupa adanya kelenjar (*gland*) di bagian abaksial daun, vena sekunder *Brochidodromous*, memiliki trikoma di bagian ranting, petiol dan abaksial daun. Sedangkan, karakter khusus sampel LZ08 berupa trikoma yang terletak pada bagian tangkai dan petiol daun, vena sekunder *Brochidodromous* dan tegas, vena tersier *Alternate percurrent* dan ujung daun meruncing panjang yang disajikan pada Tabel 4.1.

Perbandingan karakter morfologi secara langsung antara sampel LZ05&LZ08 dengan semua koleksi *Diospyros* spp. di Herbarium Bogoriense menunjukkan terdapat 14 persamaan karakter morfologi. Persamaan tersebut dimiliki oleh sampel LZ05 dengan *Diospyros ferrea* (Wild.) Bakh. dan sampel LZ08 dengan *Diospyros sumatrana* Miq. var. *decipiens* (Clarke) Bakh. asal Malay penn. yang disajikan pada Tabel 4.2. dan herbarium pembanding disajikan pada

Gambar 4.1 dan 4.2. Dokumentasi perbandingan karakter khusus morfologi *Diospyros* sp. XXIV.A.264 dan IV.C.106 disajikan pada Tabel Lampiran 2.

Tabel 4.1 Hasil Karakter Morfologi *Diospyros* sp.

No	Ciri Morfologi	<i>Diospyros</i> sp.	
		XXIV.A.264 (LZ05)	IV.C.106 (LZ08)
1.	Habitus <b>Batang</b>	Pohon	Pohon
2.	Percabangan	Monopodial	Monopodial
3.	Warna	Dark Greyish Reddish Brown	Brownish Grey B
4.	Corak/ alur	Coklat kehitaman	Coklat
	<b>Daun</b>		
5.	Tipe	Tunggal	Tunggal
6.	Bentuk	Lanceolate	Ob lanceolate
7.	Ujung	Meruncing	Meruncing
8.	Pangkal	<i>Obtus</i>	<i>Attenuate</i>
9.	Tepi	Rata	Rata
10.	Letak	Berseling ( <i>Alternate</i> )	Berseling ( <i>Alternate</i> )
11.	Warna Adaksial Daun Dewasa	Dark Yellowish Green A	Greyish Olive Green A
12.	Warna Abaksial Daun Dewasa	moderat Yellow Green C	Moderat Yellow Green B
13.	Warna Adaksial Daun Muda	Strong Yellow Green A	stong yellow green A 144
14.	Warna Abaksial Daun Muda	Strong Yello Green B	stong yellow green C 143
15.	Permukaan Atas	Licin	Licin



Tabel 4.1 Lanjutan

	Ciri Morfologi	<i>Diospyros</i> sp.	
		XXIV.A.264 (LZ05)	IV.C.106 (LZ08)
16.	Permukaan Bawah	Ber trikoma	Halus
17.	Warna Tangkai Daun	Dark Greyish Yellowish Brown	Moderat Olive Brown
18.	Petiol daun	<i>porrect</i>	<i>porrect</i>
19.	Kelenjar ( <i>Gland</i> )	Bintik Hitam	Tidak ada
20.	Letak Trikoma	Bagian abaksial daun, ranting, tangkai & petiol daun	Tangkai, petiol
21.	Warna	coklat	coklat
22.	Vena Sekunder	Tidak tegas	Tegas
23.	Jumlah Vena Sekunder	5-8 pasang	5-7 pasang
24.	Ujung Vena Sekunder	<i>Brochidodromous</i>	<i>Brochidodromous</i>
25.	Vena Tersier	<i>Random reticulate</i>	<i>Alternate percurrent</i>
26.	Tinggi pohon	± 6 M	± 8 M
27.	Panjang daun	6 – 8,8 cm	11 – 15 cm
28.	Lebar daun	2- 3,5 cm	3,5–4,4 cm
29.	Panjang petiol	0,3 – 0,4 cm	0,4 – 06 cm
30.	Rasio Panjang Lebar Daun	3 – 4,1 cm	6 – 8 cm



Gambar 4. 1 Herbarium *Diospyros* sp. A: sampel *Diospyros* LZ05; B: *D. ferrea* (Wild.) Bakh



Gambar 4. 2 Herbarium *Diospyros* sp. A: sampel *Diospyros* LZ08; B: *D. sumatrana* Miq. var. *decipiens* (Clarke) Bakh

Tabel 4.2 Perbandingan Sampel LZ05 & 08, *D.sumatrana* Miq. var. *decipiens* (Clarke) Bakh. dan *D. ferrea* (Wild.) Bakh

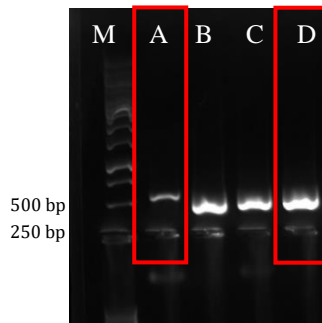
<b>Ciri morfologi</b>	<b>Sampel LZ05</b>	<b><i>D. ferrea</i> (Wild.) Bakh</b>	<b>LZ08</b>	<b><i>D.sumatrana</i> Miq. var. <i>decipiens</i> (Clarke) Bakh</b>
Tipe daun	Tunggal	Tunggal	Tunggal	Tunggal
Letak daun	Berseling	Berseling	Berseling	Berseling
Bentuk daun	<i>Lanceolate</i>	<i>Lanceolate</i>	<i>Oblanceolate</i>	<i>Oblanceolate</i>
Ujung daun	Meruncing	Meruncing	Meruncing	Meruncing
Pangkal daun	<i>Obtus</i>	<i>Obtus</i>	<i>Attenuate</i>	<i>Attenuate</i>
Tepi daun	Rata	Rata	Rata	Rata
Permukaan adaksial daun	Licin	Licin	Licin	Licin
Permukaan abaksial daun	Ber trikoma	Ber trikoma	Halus	Halus
Kelenjar ( <i>Gland</i> ) Trikoma	Ada Bagian abaksial daun, ranting, tangkai, petiol daun, dan daun muda	Ada Bagian abaksial daun, ranting, tangkai, petiol daun, dan daun muda	Tidak ada Tangkai, petiol, dan daun muda	Tidak ada Tangkai, petiol, dan daun muda
Jumlah Vena Sekunder	5-8 pasang	5-8 pasang	5-7 pasang	5-7 pasang

Tabel 4.2 Lanjutan

<b>Ciri Morfologi</b>	<b>Sampel LZ05</b>	<b><i>D. ferrea</i> (Wild.) Bakh</b>	<b>LZ08</b>	<b><i>D.sumatrana</i> Miq. <i>var. decipiens</i> (Clarke) Bakh</b>
Alur Vena Sekunder	Tidak tegas	Tegas	Tegas	Tegas
Ujung Vena Sekunder	<i>Brochidodromous</i>	<i>Brochidodromous</i>	<i>Brochidodromous</i>	<i>Brochidodromous</i>
Vena Tersier	Random reticulate	Random reticulate	Alternate percurrent	Alternate percurrent
Panjang petiol	0,3 - 0,4 cm	0,3 - 0,5 cm	0,4 - 06 cm	0,3 - 05 cm

## 2. Verifikasi dan Amplifikasi DNA *Diospyros* sp.

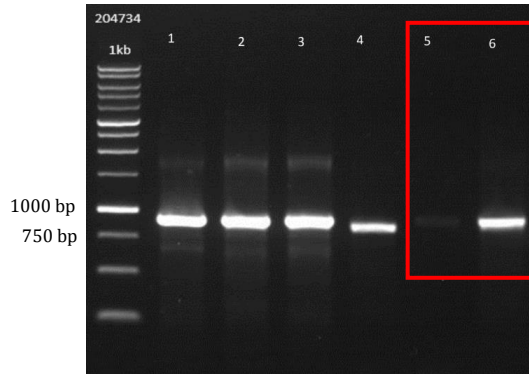
Ekstraksi DNA *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor dilakukan sesuai protokol GeneJET *Plant Genomic DNA Purification Mini Kit* K0971 (Thermo scientific). Verifikasi hasil ekstraksi menggunakan primer *rbcL* menunjukkan terdapat pita DNA sesuai target yaitu di rentang 400-500 bp yang disajikan pada Gambar 4.1 Hal ini menunjukkan bahwa kedua sampel berhasil diekstraksi menggunakan KIT GeneJET.



Gambar 4.3 Verifikasi hasil ekstraksi *Diospyros* sp.; M: Marker; A; Sampel. LZ05; D: Sampel. LZ08

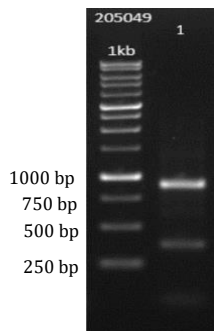
Amplifikasi sampel *Diospyros* sp. LZ05 & LZ08 menggunakan pasangan primer ITS berhasil dilakukan yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA pada hasil visualisasi. Rentang pita DNA hasil visualisasi sudah sesuai target, yaitu  $\pm 800$  bp yang disajikan pada Gambar 4.2 Pita sampel LZ05 terlihat sangat tipis dan tidak memenuhi standar untuk proses sekuensing. Sehingga perlu dilakukan proses

amplifikasi dan sekuensing ulang ke 1<sup>st</sup> BASE DNA Sequencing Services, Singapura.



Gambar 4.4 Hasil visualisasi produk PCR *Diospyros* sp.; 5: Sampel *Diospyros* sp. LZ05; 6: Sampel *Diospyros* sp. LZ08

Visualisasi sampel LZ05 menunjukkan terdapat pita DNA *multiband* disertai dengan *excess* primer. Pita DNA yang dipilih untuk tahap sekuensing yaitu pita DNA dengan rentang  $\pm 800$  bp yang disajikan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.5 Hasil visualisasi produk PCR *Diospyros* sp.; M: Ladder 1kb; L5: Sampel *Diospyros* sp. LZ05

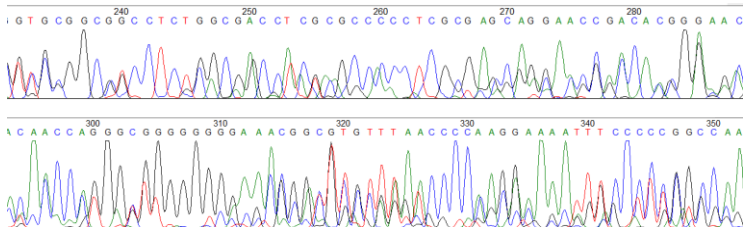
### 3. Elektroforegram Sekuen *Diospyros* sp.

Data hasil sekuensing diterima dalam format AB1 sebanyak dua *file* berupa *file* sekuen *forward* dan sekuen *reverse*. Data dari setiap file berupa elektroforegram yang terdiri dari empat warna pada setiap puncak-puncak kromatogram yang senada dengan jenis nukleotida seperti warna biru (Deoksitidilate /C), warna merah (Deoksitimidilate/T), warna hitam (Deoksiguanilate /G), dan warna hijau (Deoksiadenilate /A).

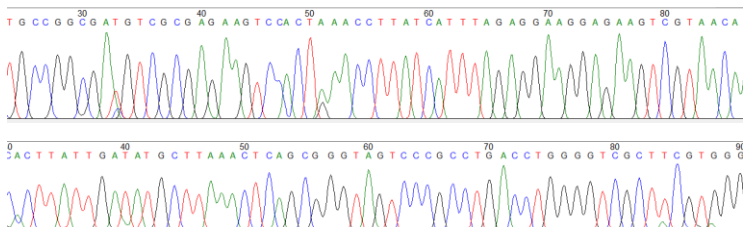
Elektroforegram pada sampel *Diospyros* sp. LZ05 tidak terlalu bagus karena terlalu banyak *peak* tumpang tindih yang disajikan pada Gambar 4.4 Elektroforegram pada sampel *Diospyros* sp. LZ08 bagus karena puncak yang dihasilkan jelas serta saling terpisah antara puncak satu dengan puncak lain (tidak tumpang tindih) yang disajikan pada Gambar 4.5.

Setiap sekuen pada sampel memiliki panjang yang berbeda-beda, pada sampel *Diospyros* sp. LZ05 memiliki panjang *forward* 616 bp dan *reverse* 682 bp yang disajikan pada Lampiran 3. Sampel *Diospyros* sp. LZ05 memiliki sekuen *reverse* yang tidak bagus sehingga proses analisis selanjutnya hanya dapat menggunakan sekuen *forward* (tidak ada *contig*). Pada sampel *Diospyros* sp. LZ08 memiliki panjang *forward* 885 bp dan *reverse* 885 bp yang disajikan

pada Lampiran 4, hasil dicontig *Diospyros* sp. LZ08 memiliki panjang 877 bp yang disajikan pada Lampiran 5.



Gambar 4.6 Elektroforegram parsial hasil sekuensing sampel *Diospyros* sp. LZ05. Atas (*forward*); Bawah (*reverse*); Biru: Deoksitidilate (C); Merah: Deoksitimidilate (T); Hitam: Deoksguanilate (G); Hijau: Deoksiadenilate (A)



Gambar 4.7 Elektroforegram parsial hasil sekuensing sampel *Diospyros* sp. LZ08. Atas (*forward*); Bawah (*reverse*); Biru: Deoksitidilate (C); Merah: Deoksitimidilate (T); Hitam: Deoksguanilate (G); Hijau: Deoksiadenilate (A)

#### 4. Hasil BLASTn *Diospyros* sp.

Analisis menggunakan metode BLAST pada program *Nucleotide* BLAST (BLASTn) menunjukkan sampel *Diospyros* sp. LZ05 memiliki kemiripan dengan tiga spesies *Diospyros* dan 15 genus lain yang disajikan pada Tabel



Lampiran 6. Sedangkan sampel *Diospyros* sp. LZ 08 memiliki kemiripan dengan 23 spesies dari genus *Diospyros* yang disajikan pada Tabel Lampiran 7.

Sebanyak tiga sekuen hasil BLASTn dari LZ05 dan lima sekuen dari LZ08 diambil untuk proses *aligment* dan pembuatan pohon filogenetik. Hasil BLASTn diambil berdasarkan nilai *perc. Ident*, *E-value*, dan *Quary Cover* tertinggi yang disajikan pada Tabel 4.4 dan Tabel 4.5.

Proses pensejajaran (*Aligment*) sampel *Diospyros* sp. (LZ05 & LZ08), delapan sekuen hasil BLASTn, dan satu *outgrup* menggunakan program *ClustalW* disajikan pada Tabel Lampiran 9. Terdapat conserve sebanyak 396 dan variasi sebanyak 511 dari 11 sekuen yang disajikan pada Tabel Lampiran 10. Berdasarkan hasil perbandingan organisasi sekuen sampel LZ05 & LZ08 dengan *Diospyros stigrosa* menunjukkan terdapat lebih banyak variasi pada bagian ITS 1 dan ITS 2 yang disajikan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Perbandingan Jumlah Organisasi Sekuen ITS

	18S	ITS1	5.8 s	ITS2	2.6S
<i>Conserve</i>	104	154	125	206	89
<i>Variasi</i>	59	110	6	66	4

Tabel 4.4 Hasil BLAST Sekuen sampel *Diospyros* sp. LZ05 yang diambil

No.	Deskripsi	Max score	Total score	Query cover	E Value	Percent Identity	Eccession
1.	<i>D.howii</i>	346	346	85%	3e-90	79.52%	KU378689.1
2.	<i>D.xishuangbannaensis</i>	342	342	85%	4e-89	79.60%	KU378828.1
3.	<i>D.stigrosa</i>	267	267	26%	2e-66	98.04%	MF171071.1 _:1648-2649

Tabel 4. 5 Hasil BLAST Sekuen sampel *Diospyros* sp. LZ08 yang diambil

No.	Deskripsi	Max score	Total score	Query cover	E Value	Percent Identity	Eccession
1.	<i>D.strigrosa</i>	660	660	100%	0.0	80.85%	MF171071.1 ; 1620-2509
2.	<i>D. philippensis</i>	592	592	82%	5e-164	81.88%	KU378787.1
3.	<i>D.rubra</i>	580	580	82%	1e-160	81.77%	KU378750.1
4.	<i>D.rhombifolia</i>	580	580	82%	1e-160	82.00%	KU878686.1
5.	<i>D.maclurei</i>	571	571	82%	7e-158	51.56%	KU378746.1

Jumlah komposisi nukleotida hasil *alignment* menunjukkan sampel LZ05 tidak memiliki kesamaan dengan spesies hasil BLAST. Jumlah komposisi nukleotida sampel LZ08 memiliki kesamaan dengan *Diospyros strigosa* pada nukleotida G yaitu sebanyak 31.7%, Namun, terdapat perbedaan pada komposisi nukleotida A sebanyak 1,8%, C sebanyak 4.5% dan T(U) sebanyak 2.5%. Rata-rata persentase komposisi nukleotida banyak mengandung nukleotida C sebesar 34.7% dan G sebesar 32.1% yang disajikan pada Tabel 4.6 dan Tabel 4.3.

Tabel 4.6 Komposisi Nukleotida Sampel *Diospyros* sp. LZ05&LZ08, 8 Sekuen Hasil BLASTn dan 1 Outgroup

	T(U)	C	A	G	Total
Sampel LZ08	17.5	28.7	22.1	31.7	878
MF171071.1:1620-2509 <i>Diospyros strigosa</i>	13.6	33.2	20.8	32.4	891
MF171071.1:1648-2649 <i>Diospyros strigosa</i>	14.0	33.6	20.8	31.7	587
Sampel LZ05	15.1	33.9	22.6	28.5	576
KU378750.1:1-724 <i>Diospyros rubra</i>	11.2	38.3	16.6	33.9	725
KU378828.1:1-491 <i>Diospyros xishuangbannaensis</i>	14.7	34.6	20.6	30.1	491
KU378693.1:1-491 <i>Diospyros howii</i>	14.5	35.0	20.2	30.3	491
KU378787.1:1-727 <i>Diospyros philippensis</i>	11.8	36.7	17.6	33.8	727

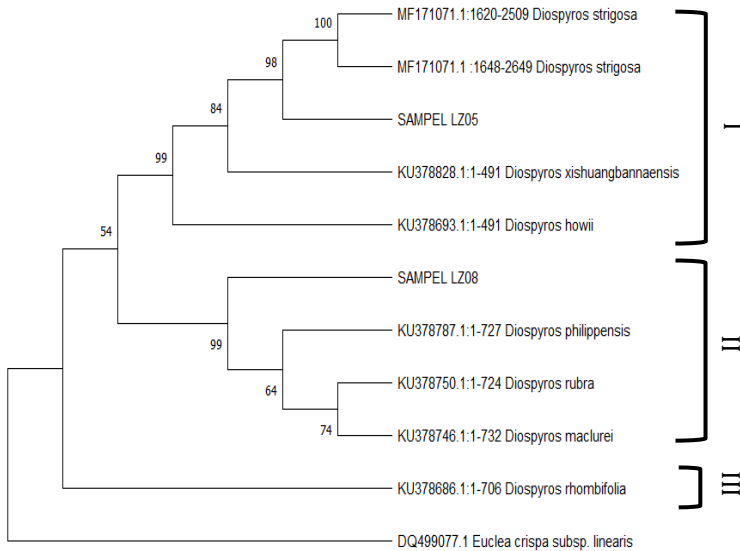
Tabel 4.6 Lanjutan

	T(U)	C	A	G	Total
KU378686.1:1-706 <i>Diospyros rhombifolia</i>	13.0	35.8	18.8	32.4	707
KU378746.1:1-732 <i>Diospyros maclurei</i>	11.5	37.4	17.1	34.0	732
DQ499077.1 <i>Euclea</i> <i>crispa subsp. Linearis</i>	13.2	35.9	18.5	32.4	638
Rata-rata	13.6	34.7	19.5	32.1	676.6

## 5. Analisis Filogenetik

Hasil *Aligment* selanjutnya dikonstruksikan dalam bentuk pohon filogenetik menggunakan metode statistik *Neighbor Joining* (NJ) dengan parameter *Kimura-2 parameter* model dan nilai *bootstrap* 1000 kali. Hasil pohon filogenetik dapat dilihat pada Gambar 4.6.

Pohon filogenetik menunjukkan terbentuknya III klada berupa, klada I yang terdiri dari *D. stigrosa*, *D. Stigrosa*, *D.xishuangbannaensis*, *D.howii* dan sampel LZ05. Klada II terdiri dari *D.philippensis*, *D.rubra*, *D.maclurei*, dan sampel LZ08. Klada III terdiri dari *D.rhombifolia*. Sampel LZ05 membentuk sub cabang dengan *Diospyros stigrosa* dengan nilai bootstrap 98% dan sampel LZ08 membentuk sub cabang dengan *Diospyros philippensis*, *Diospyros rubra* dan *Diospyros maclurei* dengan nilai bootstrap 99%.

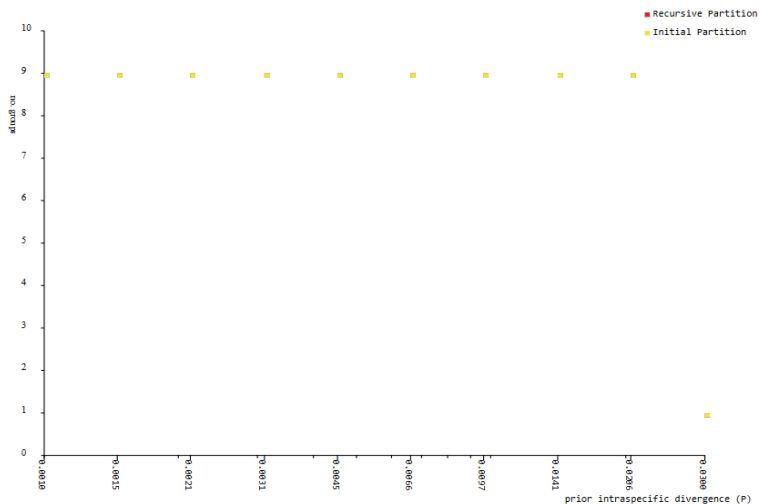


Gambar 4.8 Pohon Filogenik *Diospyros* sp. Berdasarkan metode *Neighbor Joining* parameter Kimura-2 parameter model dan nilai bootstrap 1000

Analisis DNA *barcoding* dilanjutkan dengan menentukan nilai jarak genetik menggunakan *pairwise distance* yang menunjukkan nilai jarak genetik bervariasi. Jarak genetik terendah dimiliki oleh sampel LZ05 dengan *Diospyros\_xishuangbannaensis* yaitu 0.255 dan sampel LZ08 dengan *Diospyros\_maclurei* yaitu 0.186. Nilai jarak genetik tertinggi sampel LZ05 dengan *Euclea\_crispa\_subsp.\_linearis* yaitu 0.499 dan sampel LZ08 dengan *Diospyros\_strigosa* yaitu 0.505 yang disajikan pada Tabel 4.8.

## 6. *Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) Diospyros sp. sekuen ITS*

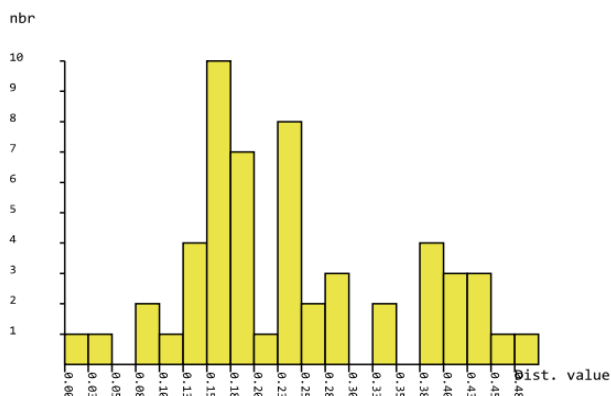
Data DNA *barcoding* diperkuat menggunakan *Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)*. Terdapat 3 *gap* yang dihasilkan pada histogram dengan rentang *distance value* dari 3%-48%. Hasil jarak divergensi terkecil sebesar 0.0100 dan jarak divergensi terbesar yaitu 0.0300. Hasil analisis menggunakan ABGD menunjukkan terbentuknya 9 group yang disajikan pada Gambar 4.7 dan Tabel 4.7. Sampel LZ05 masuk kedalam group kelima dan sampel LZ08 masuk ke dalam group pertama.



Gambar 4.9 Divergensi intraspesifik pengelompokan spesies menggunakan ABGD

Tabel 4. 7 Pengelompokan sekuen menggunakan *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD)

Group 1	Sampel LZ08
Group 2	MF171071.1:1620-2509 <i>Diospyros strigosa</i> MF171071.1 :1648-2649 <i>Diospyros strigosa</i>
Group 3	Sampel LZ05
Group 4	KU378750.1 <i>Diospyros rubra</i>
Group 5	KU378828.1:1-491 <i>Diospyros xishuangbannaensis</i> KU378693.1:1-491 <i>Diospyros howii</i>
Group 6	KU378787.1:1-727 <i>Diospyros philippensis</i>
Group 7	KU378686.1:1-706 <i>Diospyros rhombifolia</i>
Group 8	KU378746.1:1-732 <i>Diospyros maclurei</i>
Group 9	DQ499077.1 <i>Euclea crispa subsp. linearis</i>



Gambar 4.10 Histogram *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD)

Tabel 4. 8 Jarak genetik sekuen *Diospyros* sp. menggunakan model kimura-2 parameter

NO.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1.	MF171071.1:1620-2509_D.strigosa											
2.	MF171071.1_:1648-2649_D.strigosa	0.007										
3.	KU378750.1:1-724_D.rubra	0.436	0.198									
4.	KU378828.1:1-491_D.xishuangbannaensis	0.145	0.157	0.154								
5.	KU378693.1:1-491_D.howii	0.160	0.172	0.148	0.029							
6.	KU378787.1:1-727_D.philippensis	0.427	0.209	0.096	0.159	0.159						
7.	KU378686.1:1-706_D.rhombifolia	0.405	0.171	0.174	0.155	0.166	0.178					
8.	KU378746.1:1-732_Dmaclurei	0.431	0.185	0.083	0.145	0.145	0.111	0.183				
9.	SAMPEL_LZ08	0.505	0.241	0.186	0.235	0.229	0.189	0.238	0.185			
10.	SAMPEL_LZ05	0.334	0.344	0.398	0.255	0.258	0.400	0.419	0.383	0.433		
11.	DQ499077.1_Euclea_crispa_subsp_linearis	0.461	0.241	0.294	0.234	0.231	0.291	0.249	0.295	0.387	0.499	



## **B. Pembahasan Hasil Penelitian**

### **1. Morfologi Sampel LZ05 & LZ08, *D.ferrea* (Wild.) Bakh dan *D. sumatrana* Miq. var. *decipiens* (Clarke) Bakh.**

Berdasarkan morfologi sampel LZ05 dan LZ08 menunjukkan karakter khusus dari genus *Diospyros* berupa habitus pohon/perdu, tipe daun tunggal, letak daun berseling, tepi daun rata, dan beberapa jenis memiliki kelenjar (*gland*) pada bagian abaksial daun. Perbandingan morfologi yang digunakan hanya dari bagian daun karena tidak tersedianya organ generative. Namun, proses identifikasi tetap dapat dilakukan karena morfologi daun merupakan salah satu pusat taksonomi dan sistematika pada tanaman yang digunakan sebagai dasar pengenalan dan penyusunan pada klasifikasi tumbuhan (Viscosi dan Cardini, 2011).

Hasil perbandingan sampel LZ05 dengan *D.ferrea* (Wild.) Bakh menunjukkan bahwa kedua sampel memiliki kesamaan karakter khusus yang menjadikan mereka mirip yaitu letak trikoma, bagian vena sekunder daun *brochidodromous*, vena tersier tipe *random reticulate*, dan adanya kelenjar (*gland*) pada bagian abaksial yang tidak dimiliki oleh setiap spesies *Diospyros*.

Hasil perbandingan sampel LZ08 dengan *D. sumatrana* Miq. var. *decipiens* (Clarke) Bakh. menunjukkan bahwa

kedua sampel memiliki kesamaan karakter khusus yang menjadikan mereka mirip yaitu pada bagian alur vena sekunder yang tegas dengan tipe *brochidodromous* dan vena *tersier* berupa *alternate percurrent*. Pada penelitian Fujita (2006) menjelaskan bahwa setiap jenis tumbuhan memiliki pola vena yang berbeda-beda. Namun ukuran daun sampel LZ08 lebih besar dibandingkan dengan *D. sumatrana* Miq. var. *decipiens* (Clarke) Bakh. Hal ini dapat dikarenakan morfologi daun dan luas daun dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan seperti intensitas cahaya dan suhu (Salisbury dan Ross 1992).

## **2. Verifikasi dan Amplifikasi *Diospyros* sp. Asal Sumatra Koleksi Kebun Raya Bogor**

Verifikasi hasil ekstraksi menggunakan primer *rbcL* berhasil dilakukan yang ditandai dengan adanya pita DNA sesuai target yaitu 400-500 bp berdasarkan ukuran DNA *ladder* 1 kb (CBOL, 2009). Primer *rbcL* merupakan spesifikasi gen dalam kloroplas yang mengkode sub unit besar riboluse-1,5-bisphosphate carboxylase (RubisCo) dan sangat mudah diamplifikasi, sehingga bagus digunakan untuk memastikan keberhasilan proses ekstraksi (Hebert, dkk., 2003).

Hasil visualisasi produk PCR sampel *Diospyros* sp. LZ05 & LZ08 menggunakan ITS menunjukkan adanya pita DNA

yang sesuai target dari sekuen ITS yaitu 800 bp berdasarkan ukuran DNA *leadder* 1 kb (Chen, dkk 2010). Pita DNA sampel *Diospyros* sp. memiliki ketebalan yang berbeda-beda, pada sampel LZ05 terlihat adanya pita DNA tipis, sedangkan pada sampel LZ08 terlihat adanya pita DNA yang tebal dan terang. Secara kualitatif, pita DNA tipis menunjukkan bahwa konsentrasi DNA yang berhasil terekstraksi rendah, sedangkan pita DNA tebal dan terang menunjukkan konsentrasi DNA yang terekstraksi tinggi (Bernstein 2020).

Hasil amplifikasi sampel LZ05 menunjukkan adanya *excess* primer dikarenakan sisa-sisa primer yang tidak menempel, sehingga menghasilkan pita DNA yang *multiband*/tidak spesifik. Pita DNA yang dipakai untuk sekuensing berada pada rentang 800 bp karena sesuai dengan target dari sekuen ITS.

### **3. Elektroforegram Sekuen *Diospyros* sp.**

Elektroforegram berfungsi untuk melihat kualitas sekuen serta letak mutasi pada gen (Dale, 2010). Hasil elektroforegram sampel *Diospyros* sp. LZ05 terlihat kurang baik karena puncak grafik pendek serta tidak terpisah antara puncak satu dengan puncak lain (ganda). Kualitas elektroforegram pada sampel LZ08 terlihat sangat baik

karena puncak grafik yang tinggi serta saling terpisah antara puncak satu dengan puncak lain (Bangol., 2014).

Hasil sekuensing dengan adanya *noise* seperti pada sampel LZ05 dikarenakan adanya *multi template* sekuen yang mengganggu penentuan posisi basa pada DNA. Hal ini sesuai dengan Naipospos, Miftahudin & sobir (2014) yang menyatakan bahwa hasil suatu elektroforegram dapat dipengaruhi oleh *multiple template* dari suatu primer yang digunakan. *Multiple template* sendiri merupakan suatu sekuen atau plot yang dapat menghasilkan beberapa puncak pada setiap posisi basa nitrogen yang disebabkan oleh faktor primer ataupun kontaminan pada sampel.

Hasil elektroforegram pada LZ05 tidak dibuat contig karena elektroforegram bagian *reverse* tidak dapat digunakan, sehingga proses analisis selanjutnya hanya menggunakan sekuen bagian *forward* dengan panjang 616 bp. Sedangkan hasil contig dari sampel LZ08 memiliki panjang 877 bp. Pembuatan contig merupakan suatu pensejajaran dua arah (*bi-direksional*) yang memiliki keuntungan seperti dapat mencakup sekuen yang tidak dapat dibaca dan apabila terdapat kesalahan pada pembacaan sekuens DNA maka dapat dipastikan ulang dengan melihat sekuens komplementernya (Untu dkk., 2015).

Hasil contig sampel LZ08 dan sekuen *forward* LZ05 dianalisis menggunakan BLASTn pada pencarian similaritas sekuen (BLAST) yang menampilkan 100 spesies dengan kemiripan urutan basa nitrogen. Hasil BLAST tertinggi dari sekuen sampel LZ05 yaitu *D.howii* dengan nilai *max/total score* dan *Query cover* yang tinggi. Namun, nilai *percent identity* yang dimiliki hanya 79.52%. Hasil BLAST dengan nilai *percent identity* tertinggi yaitu 98.04% dan *E-value* terendah yaitu  $2e-66$  dimiliki oleh *D.stigrosa* (MF171071.1:1648-2649) dengan nilai *max/total score* dan *Query cover* yang rendah. Semakin rendah nilai persentase *max/total score* maka semakin sedikit kesamaan susunan basa nitrogen sekuen sampel dengan sekuen data *genbank* dan semakin rendah nilai *Query Cover* maka semakin pendek panjang sekuen yang sesuai dengan panjang sekuen di *genbank* (Kusumah, Revi & kurniawati, 2017).

Hasil BLAST tertinggi dari sekuen sampel LZ08 yaitu *D.stigrosa* dengan nilai *percent identity* 80.85% dan *E-value* 0.0. Hasil BLAST dengan nilai *percent identity* 80-100% sudah dapat menunjukkan tingkat kesamaan atau kedekatan dari suatu spesies. Semakin tinggi nilai *perc. Identity* maka semakin mirip karakter sekuen sampel dengan sekuen di *genbank* (Nurkholidah, 2019) dan

semakin rendah nilai *E-value* maka semakin signifikan kesamaannya (Nguyen dkk, 2015).

#### **4. Hasil BLASTn *Diospyros* sp.**

Sekuen hasil BLAST disejajarkan (*Alignment*) dengan kedua sampel dan 1 sekuen dari genus *Euclea* sebagai *outgrup* yang diambil dari GenBank NCBI berdasarkan *region* ITS. Proses pensejajaran (*Alignment*) menggunakan program *ClustalW* dilakukan untuk melihat kesamaan dari urutan basa nitrogen sampel *Diospyros* sp. dengan beberapa sekuen lain. Hasil pensejajaran dari 934 bp sekuen menunjukkan adanya *Gap* yang disajikan pada Tabel Lampiran 9. *Gap* yang muncul pada proses pensejajaran disebabkan adanya *conserve* dan *variasi* pada daerah ITS yang menandakan terdapat perubahan mutasi pada sekuen berupa insersi, delesi ataupun penyusunan ulang materi genetik (Dharmayanti, 2011). Pensejajaran sekuen menunjukkan terdapat *conserve* sebanyak 396 dan variasi sebanyak 511 dari delapan sekuen. Perbandingan variasi pada daerah 18S, ITS 1, 5.8S, ITS2 dan 2.6S menunjukkan bahwa variasi terbanyak berada pada daerah ITS1 dan ITS2. Hal ini sesuai dengan Aprilianingsih (2021) yang menyatakan bahwa banyak nya variasi pada daerah ITS dikarenakan ITS merupakan daerah dengan laju evolui yang cepat.

Analisis jumlah komposisi basa nitrogen bertujuan untuk mengetahui tingkat kemiripan makhluk hidup berdasarkan laju mutasi dan laju evolusi. Jumlah komposisi basa nitrogen sampel LZ05 tidak memiliki kesamaan dengan sampel pembanding. Sedangkan, jumlah komposisi basa nitrogen sampel LZ08 memiliki kesamaan dengan *Diospyros strigosa* berdasarkan basa G yaitu 31.7%. Analisis jumlah komposisi dan variasi basa nitrogen dapat dijadikan sebagai informasi untuk menentukan kesamaan genetik dan mendukung identifikasi atau kedekatan suatu spesies pada pengelompokan percabangan pohon filogenetik.

Rata-rata komposisi basa nitrogen menunjukkan bahwa basa nitrogen terbanyak terdapat pada basa C sebesar 34.7% dan basa G sebesar 32.1%. Hal ini sesuai dengan komposisi dari sekuen ITS yang mengandung banyak basa nitrogen C dan G dibanding dengan basa nitrogen lain (Aprilianingsih, 2021). Menurut penelitian Niu dkk., (2017) menjelaskan bahwa gen basa nitrogen C dan G yang tinggi memiliki laju mutasi, level rekombinasi dan densitas gen yang tinggi.

## **5. Analisis Filogenetik**

Analisis filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ) dan *Kimura-2 Parameter* (Kimura, 1980) dengan nilai *bootstrap* 1000 kali (Felsenstein, 1985)

menghasilkan panjang cabang yang berpengaruh pada posisi setiap sekuen, karena cabang pohon terbentuk berdasarkan tingkat variasi yang dipengaruhi oleh perubahan evolusi (William, Pearson & Gabriel Robins, 1999). Metode *Neighbor Joining* (NJ) memiliki kelebihan yaitu tingkat perhitungan yang cepat dan menghasilkan pohon yang lebih akurat (Kumar, dkk., 2018).

Pohon filogenetik menggunakan *Neighbor Joining* (NJ) menunjukkan jenis percabangan monofiletik yang artinya mereka berasal dari satu nenek moyang yang sama. Cabang hasil dari filogram menunjukkan adanya kemiripan basa nitrogen pada masing-masing sampel (Ubaidillah dan Sutrisno, 2009). Terdapat III klada yang terbentuk, klada I menunjukkan sampel LZ05 berkerabat dekat dengan *D. stigrosa* dengan nilai bootstrap 98%. Klada II menunjukkan sampel LZ08 berkerabat dekat dengan *D. philippensis*, *D. rubra* dan *D. maclurei* dengan nilai bootsrap 99%. Nilai *bootstrap* menunjukkan tingkat kepercayaan topologi pohon hasil dari rekontruksi (Ubaidillah dan Sutrisno, 2009). Pohon dengan nilai bootstrap  $\geq 95\%$  merupakan percabangan yang dapat dipercaya dan nilai bootsrap  $\leq 50\%$  merupakan percabangan yang tidak dapat dipercaya (Felsenstein, 1985).



Klada III terdiri dari satu spesies yaitu *D.rhombifolia* yang memisah dengan jenis *Diospyros* lain. Namun, *D.rhombifolia* masih memiliki hubungan kekerabatan dengan nilai bootstrap 54% dan percabangan yang panjang. Semakin panjang cabang yang terbentuk maka semakin besar perubahan evolusi yang terjadi, sehingga semakin jauh pula kekerabatannya (Zein dan Sulandari, 2009). *Outgroup* yang digunakan dalam pembuatan pohon berasal dari genus *Euclea*. Penambahan *outgroup* bertujuan untuk mengetahui karakter derivate dan primitif dari kelompok *ingroup* serta dapat menentukan titik awal pembentukan pohon filogenetik (Muzzazinah 2017).

Analisis pohon filogenetik diperkuat oleh perhitungan jarak genetik. Analisis jarak genetik adalah suatu perbedaan gen yang dihitung melalui kuantitas numerik (Saitou and Nei, 1987). Analisis jarak genetik menggunakan *pairwise distance* menunjukkan bahwa 8 sekuen *Diospyros* dan 1 *outgroup Euclea* memiliki nilai jarak genetik yang bervariasi. Nilai dugaan dari jarak genetik menentukan hubungan kekerabatan antar spesies, semakin dekat kekerabatannya maka semakin rendah nilai jarak genetik suatu spesies (Ingman, 2000)

Nilai jarak genetik terdekat dimiliki oleh LZ05 dengan dengan *Diospyros xishuangbannaensis* yaitu 0.255 dan

sampel LZ08 dengan *Diospyos maclurei* yaitu 0.185. Hal ini sesuai dengan kekerabatan hasil dari pohon filogenetik yang menunjukkan kedua sampel masih berada dalam satu klada yang sama. Sedangkan jarak genetic terjauh dimiliki oleh sampel LZ05 dengan *Euclea crispa subsp. linearis* yaitu 0.499 dan sampel LZ08 dengan *Diospyros\_strigosa* yaitu 0.505.

#### **6. Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) *Diospyros* sp. sekuen ITS**

*Analisis Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) dapat menentukan letak celah (*gap*) pada sekuen berdasarkan jarak intraspesifik dan interspesifik, sehingga dapat terbentuk suatu pengelompokan sekuen berdasarkan celah *barcode* (Puillandre, dkk., 2012). Nilai  $P_{max}$  0,03 atau 3% yang digunakan dalam analisis sekuen menunjukkan nilai *threshold* dalam menentukan spesies yang sama (Octavia, 2022). Hal ini sesuai dengan Magoga, Fontaneto & montagna (2021) yang telah menjelaskan mengenai nilai minimal yang digunakan untuk determinasi tingkat jenis dalam batasan jarak yaitu sebesar 3% atau 0.03.

Berdasarkan batasan jarak sebesar 3% menunjukkan adanya tiga *gap* yang terbentuk. Nilai jarak pada histogram yang terbentuk menunjukkan jumlah sekuen pada jarak tersebut. Jarak sekuen yang terbentuk memiliki rentang 3%

- 48% yang meliputi dua sekuen DNA memiliki jarak 3%, dua sekuen DNA memiliki jarak 5%, terdapat lima sekuen yang memiliki jarak 18%, dan terdapat lima sekuen yang memiliki jarak 30%. Semua sekuen tidak memiliki jarak sebesar 8%, 33% & 38%.

Sumbu X pada gambar divergensi menunjukkan jumlah group yang terbentuk dari pengelompokan sekuen dan sumbu Y menunjukkan nilai perbedaan jarak genetik. Partisi awal yang digunakan dianggap lebih stabil dan biasanya lebih baik mewakili kelompok yang didefinisikan oleh ahli taksonomi (Liu, dkk., 2014). Partisi awal yang digunakan untuk mengelompokkan sekuen berasal dari nilai divergensi terendah yaitu 0.0100. Hal ini dikarenakan nilai divergensi rendah dianggap sebagai divergensi intraspesifik, sedangkan divergensi yang lebih tinggi merupakan divergensi interspesifik (Puillandre, dkk., 2012).

Hasil pengelompokan sekuen menunjukkan bahwa sampel tidak mengelompok dengan spesies hasil BLAST, dimana LZ05 berada pada *group* 3 dan LZ08 berada pada *group* 1. Hal ini menunjukkan bahwa sekuen sampel terpecah menjadi kelompok spesies yang berbeda selama deliminasi spesies dan sekuen pembanding yang

mengelompok merupakan spesies yang sama (Puillandre, dkk., 2012).

Identifikasi sampel *Diospyros* sp. LZ05&LZ08 asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor mengutamakan data morfologi dan menjadikan data molekuler sebagai pelengkap. Hal ini dikarenakan kurangnya data di *genbank* sehingga pendekatan molekuler tidak memenuhi syarat dalam identifikasi sampel LZ05&LZ08 hingga ke tingkat jenis. Pendekatan molekuler hanya dapat digunakan untuk mempercepat proses identifikasi dan menunjukkan hubungan kekerabatan yang lebih jelas dibanding karakter morfologi (Kubicek and Harman, 1989).

Proses identifikasi secara morfologi dapat dilakukan untuk menentukan jenis dari sampel LZ05&LZ08 meski tidak tersedianya organ generative, karena kedua sampel tersebut memiliki karakter khusus berupa adanya trikoma, letak trikoma, pola vena, dan juga adanya kelenjar (*gland*) seperti pada sampel LZ05. Perbandingan antara sampel LZ05&LZ08 dengan semua koleksi lengkap *Diopyros* spp. di Herbarium Bogoriense menunjukkan bahwa sampel LZ05 memiliki karakter morfologi dan ciri khusus yang mirip dengan *Diospyros ferrea* (Wild.) Bakh. Sampel LZ08 memiliki karakter morfologi dan ciri khusus yang mirip

dengan *Diospyros sumatrana* Miq. var. *decipiens* (Clarke) Bakh. asal Malay penn.

### **C. Keterbatasan Penelitian**

Keterbatasan pada penelitian ini dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan bagi peneliti selanjutnya agar didapatkan hasil penelitian yang lebih baik, berikut beberapa keterbatasan pada penelitian ini antara lain:

1. Pendekatan secara morfologi hanya menggunakan ciri khusus pada bagian vegetatif tanpa adanya organ generative, sehingga proses identifikasi hingga ke tingkat jenis sulit dilakukan;
2. Kurangnya data sekuen *Diospyros* spp. menggunakan region ITS di *genbank* NCBI sehingga pendekatan molekuler tidak memenuhi syarat dalam identifikasi hingga ke tingkat jenis.

## BAB V

### SIMPULAN DAN SARAN

#### A. Simpulan

Berdasarkan penelitian dan analisis hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor memiliki karakter morfologi berupa habitus pohon/perdu, tipe daun tunggal, letak daun berseling, tepi daun rata, dan beberapa jenis memiliki kelenjar (gland) pada bagian abaksial daun. *Diospyros* sp. asal Sumatra dengan nomor koleksi XXIV.A.264 (LZ05) memiliki karakter morfologi khusus yang mirip dengan *Diospyros ferrea* (Wild.) Bakh. dan *Diospyros* sp. asal Sumatra dengan nomor koleksi IV.C.106 (LZ08) memiliki karakter morfologi khusus yang mirip dengan *Diospyros sumatrana* Miq. *Var. decipiens* (Clarke) Bakh. asal Malay penn.
2. Karakteristik sekuen *Internal Transcribed Spacer* pada *Diospyros* sp. asal Sumatra koleksi Kebun Raya Bogor memiliki rata-rata komposisi basa nitrogen terbanyak pada basa C sebesar 34.7 % dan basa G sebesar 32,1%. *Diospyros* sp. asal Sumatra dengan nomor koleksi XXIV.A.264 (LZ05) memiliki karakteristik sekuen dengan panjang 616 bp dan *Diospyros* sp. asal Sumatra

dengan nomor koleksi IV.C.106 (LZ08) memiliki karakteristik sekuen dengan panjang 877 bp yang tidak jauh berbeda dari rata-rata sekuen ITS.

3. Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa sampel LZ05 berkerabat dekat dengan *Diospyros stigrosa* dan sampel LZ08 berkerabat dekat dengan *Diospyros philippensis*, *Diospyros rubra* dan *Diospyros maclurei*.

## **B. Saran**

Berdasarkan keterbatasan penelitian dan analisis hasil penelitian ini, terdapat saran dari peneliti untuk diberikan kepada peneliti selanjutnya, antara lain:

1. Penggunaan sekuen region lain (seperti *trnL-trnF* dan *psbA-trnH*) juga perlu dilakukan untuk mengetahui perbandingan keefektifan barcode dalam identifikasi *Diospyros* sp. secara molekuler
2. Pendekatan secara morfologi akan lebih efektif jika terdapat bagian generative dari tumbuhan *Diospyros* sp. untuk proses identifikasi.
3. Perlu mengupayakan penambahan jumlah database sekuen ITS *Diospyros* spp. sebagai pembanding penelitian selanjutnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agung., Agung, A., Kemala, A., Pebryani, R., Dewi. 2021. "Sulawesi ' S Luxurious Tree : Perancangan Analogi Pohon Eboni Dalam Busana Bergaya Edgy." *Journal of Fashion Design* 1 (2): 22–30.
- AI, L., Chen, S.H., Zhang, Y.N., Zhou, X.N., Li, H., Chen, M.X., GUO, and J.X. J., Cai, Y.C., Zhu, X.Q., Chen. 2010. "Sequences of Internal Transcribed Spacers and Two Mitochondrial Genes: Effective Genetic Markers for *Metorchis orientalis*." *J. Anim* 9 (18): 2371 – 2376. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3923/javaa.2010.2371.2376>.
- Aji, T.G., Palupi, N.E., Budiyati, E. 2016. *INDO-HITS (Indonesian Horticultural Innovation, Technology and Science) : Sumber Daya Genetik Tanaman Buah Subtropika Potensial*. Cetakan 1. bogor: PT Penerbit IPB Pres.
- Ali, M.A., Gyulai, G., Hidvegi, N., Kerti, B., AlHemaid, F.M.A., Pandey, A.K., L. J. 2014. "The Changing Epitome of Species Identification – DNA Barcoding." *Saudi Journal of Biological Sciences* 2 (1): 204–231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016%2Fj.sjbs.2014.03.003>.
- Alrasyid, H. 2002. "Kajian Budidaya Pohon Eboni." *Berita Biologi* 2 (6): 219–66.



<https://doi.org/https://dx.doi.org/10.14203/beritabiologi.v6i2.1484>.

- Andila, P. P., & Peneng, I.N. 2017. "Menguak Potensi Si Kayu Api (*Diospyros* sp. ) Penghasil Racun Ikan Alami Dari Hutan Jembrana Bali Barat." *Buletin Udayana Mengabdi* 16 (3): 20-14.
- APG IV. 2016. "An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants." *Botanical Journal of the Linnean Society* 181 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>.
- Aprilianingsih, R. 2021. "Aprilianingsih R. (2021). Karakterisasi Sekuen DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Pada *Homalomena Pexa*. Universitas Islam Negri Walisongo Semarang.
- Ariati, S.R., Astuti, R.S., Supriyatna, I., Yuswandi, A.Y., Setiawan, A., Saftaningsih, D., Pribadi, D.O. 2019. *An Alphabetical List of Plant Species Cultivated in The Bogor Botanic Gardens*. bogor: Center for Plant Conservation Botanic Garden, Bogor.
- Arrisujaya, Susanty, D., Kusumah, D., Ratna R. 2019. "Skrining Fitokimia Dan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Aseton Dan Etil Asetat Biji Buah Bisbul (*Diospyros Discolor*) Tumbuhan Endemik Bogor." *Cendekia Journal of Pharmacy* 3 (2): 130-36.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.31596/cjp.v3i2.46>.
- Articus, K. 2004. "Phylogenetic Studies in *Usnea* (Parmeliaceae) and Allied Genera." *Acta Universitatis Upsaliensis*.
- Bangol, I, L. I. Momuat, dan M. Kumaunang. 2014. "Barcode DNA Tumbuhan Pangi (*Pangium Edule*). Berdasarkan Gen MatK." *Jurnal Mipa Unsrat Online* 3 (2): 113-119.
- Bernstein, Matt. 2020. *PCR Troubleshooting-Part 1 "No Bands."* USA: Mindwesrt Scientific.
- Buys, M. H., Flint, H. J., Miller, E. M., Yao, H., Caird, and R. J. A. R., & Ganley. 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): 263-70. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpw017>.
- Byrne, M. 2018. "A Molecular Journey in Conservation Genetics." *Pacific Conservation Biology* 24: 235-243.
- CBOL Plant Working Group. 2009. "A DNA Barcode for Land Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 12794-97. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0905845106>.
- Chen, S., H Yao, J. Han., Liu C., Song J., Siji L., Zhu Y., Ma X., Gao T dan Pang X. 2010. "Validation of The ITS2 Region as A

- Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species." *PloS One* 5 (1).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>.
- Dale, J. W., and S. F. Park. 2010. "Molecular Genetics of Bacteria." *United Kingdom*.
- DeSalle, R., & Goldstein P. 2019. "Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding." *Frontiers in Ecology and Evolution* 7: 1-11.
- Dharmanti, I.N.L.P. 2011. "Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi." *WARTAZOA* 21 (1): 1-10.
- Duangjai, S., Samuel, R., Munzinger, J., Forest, F., Wallnöfer, B., Michael, H.J., Barfuss, G., Fischer, G., Mark W., Chase. 2009. "A Multi-Locus Plastid Phylogenetic Analysis of the Pantropical Genus *Diospyros* (Ebenaceae), with an Emphasis on the Radiation and Biogeographic Origins of the New Caledonian Endemic Species." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 602-620.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.021>.
- Efendi, Wawan, W., Hapsari, Fitroh, N.P., Nuraini, Zulaikhah. 2013. "Studi Inventarisasi Keanekaragaman Tumbuhan Paku Di Kawasan Wisata Coban Rondo Kabupaten Malang." *Cogito Ergo Sum* 2 (3): 173.
- Ekasari, T. W. D., Retnoningsih, A., & Widiyanti, T. 2012. "Pcr-

- Rflp Pada *Internal Transcribed Spacer* ( ITS ) Dna Ribosom." *Jurnal MIPA* 35 (1): 21–30.  
<https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.15294/ijmns.v35i1.2093>.
- Ellis, B., Daly, D. C., Hickey, L. J., Johnson, K. R., Mitchell, J. D., Wilf, P., & Wing, S. L. 2009. *Manual of Leaf Architecture*. New York: Cornell University Press.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1079/9781845935849.0000>.
- Felsenstein, J. 1985. "Confidence Limits On Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap." *Evolution* 39 (4): 783–91.
- Fujita, H., dan A. Mochizuki. 2006. "The Origin of the Diversity of Leaf Venation Pattern." *Developmental Dynamics* 2 (35): 2710 –2721.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball S.L., & DeWaard, J.R. 2003. "Biological Identifications Through DNA Barcodes." *Proc. Biol. Sci*, no. 230: 313–321.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1098%2Frspb.2002.2218>.
- Hendramono & Allo, M.K. 2008. "Konservasi Sumber Daya Genetika Eboni Di Sulawesi Selatan (Ebony Genetics Resources Conservation in South Sulawesi)." *Info Hutan* 5 (2): 177–87.
- Hestiati, E., Priatmodjo, D., Wisnubudi, G., Inkorena, G.,

- Sukartono, S. 2019. *Keanekaragaman HayatiTanaman Buah Langka Indonesia*. Lembaga Penerbit UNAS.
- Hidayat, T., Kusumawaty D., Kusdianti, Din Y., Agusthina M., dan Mariana D. 2008. "Analisis Filogenetik Molekuler Pada *Phyllanthus Niruri* L (Euphorbiaceae) Menggunakan Urutan Basa DNA Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS)." *J Matematika & Sains* 13 (1).
- Hiern, W.P. 1873. *A Monograph of Ebenaceae*. London.: Trans Cambridge Philos Soc.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S., & Gyllensten, U. 2000. "Mitochondrial Genome Variation and the Origin of Modern Humans." *Nature: National Academic Journal of Architecture* 408 (6813): 708–13. <https://doi.org/10.1038/35047064>.
- Jannah, M., Hariri, M. R., kasiamdari, R. S., & Handayani, N. S. N. 2021. "The Use of DNA Barcoding and Phylogenetic Analysis to Improve Identification off *Usnea* Spp. Based on ITS RDNA." *Journal Of Tropical Biodiversity and Biotechnology* 6 (1). <https://doi.org/https://doi.org/10.22146/jtbb.58635>.
- Katsir dan Ibnu. 2004. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 4 Penj. Abdul Ghofar E.M*. jakarta: Pustaka Imam Asyafi'i.
- Kimura, M. 1980. "A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through

- Comparative Studies of Nucleotide Sequences." *Journal of Molecular Evolution* 16 (2): 111–20.
- Kowalska, Z., Pniewski, F., & Latała, A. 2019. "DNA Barcoding– A New Device in Phycologist's Toolbox. *Ecohydrology & Hydrobiology*" 19 (3): 417–427. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2019.01.002>.
- Kress, W. J. & D. L. Erikson. 2012. "DNA Barcodes: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*" 858. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_1).
- Kubicek, C.P. and Harman, G.E. 1989. *Trichoderma and Gliocadium : Basic Biology. Taxonomy and Genetics*. Vol. 1. London : Taylor and Francis.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, & K. Tamura. 2018. "Mega X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms." *Mol. Bio. Evol.* 35 (6): 1547–49.
- Kurniawan dan Bayu P. 2010. *Mengenal Hewan Dan Tumbuhan Asli Indonesia*. Jakarta: cikal aksara.
- Kusumah, R. Yai Kunara, Lestia Revi, dan Fitrianingrum kurniawati. 2017. "Karakterisasi Molekuler Nucleopolyhedrovirus (NPV) *Hyposidra Talaca* Wlk. Di Perkebunan Teh Gunung Mas Bogor." *J. HPT Tropika* 17 (2): 147–55.
- Larekeng, S. H., Restu, M., Gusmiaty., Rismawati. 2016.

- “Polymorphism of Simple Sequence Repeat Regions of Sulawesi Ebony (*Diosphyros Celebica* Bakh.) in Experimental Forest of Hasanuddin University Provenance.” *Agrotech Journal ATJ* 1 (1): 38–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.31327/atj.v1i1.173>.
- Leo, J., Hickey. 1973. “Classification of the Architecture of Dicotyledonous Leaves.” *Amer. J. Bot* 60 (1): 17–33.
- Li, X., Zhang, L., Li, G., Qin, R., Liu, H. 2014. “Application of NrDNA-ITS Sequences in Plant Phylogeny and Evolution. Botanical Research” 3 (1): 32–40.
- Liu, X.F., Yang, C.H., Han, H.L., Ward, R.D., Zhang, A.B. 2014. “Identifying Species of Moths (Lepidoptera) from Baihua Mountain, Beijing, China, Using DNA Barcodes.” *Ecol Evol* 4: 87–2472.
- Magoga., Fontaneto, G., Montagna, D., Matteo. 2021. “Factors Affecting the Efficiency of Molecular Species Delimitation in a Species-Rich Insect Family.” *Molecular Ecology Resources* 21 (5): 1475–89. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13352>.
- Mahmudah, R. 2021. “Batasan Jenis *Costus Afer* Dan *Costus Lucanusianus* Berdasarkan Sekuen *Internal Transcribed Spacer*.” Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang.
- McCullooug, M.J., K.V Clemons, J.H McCusker, Dan D.A Stevens. 1998. “*Intergenic Transcribed Spacer* PCR Ribotyping for

- Differentiation of *Saccharomyces* Species and Interspecific Hybrids." *J. Clin Mikrobiol* 36.
- Muzzazinah. 2017. "Metode Filogenetik Pada Indigofera." In *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Biologi*, 25-40.
- Naipospos, N., Miftahudin., dan Sobi. 2014. "Identifikasi Morfologi Dan Marka Molekuler Terpaut Sifat Tidak Berbunga Jantan Pada Mutan Pisang Kepok (Identification of Morphological and Molecular Markers Related to Male Budless Trait On Kepok Banana Mutant)." *J. Hort.* 24 (1): 23-31.
- Nguyen, X.V., Höfler, S., Glasenapp, Y., Thangaradjou, T., Lucas, C., Papenbrock, J. 2015. "New Insights into DNA Barcoding of Seagrasses." *Syst Biodivers* 13 (5): 496-508.
- Niu, Z., Xue, Q., Wang, H., Xie, X., Zhu, S., Liu, W. & Ding, X. 2017. "Mutational Biases and GC-Biased Gene Conversion Affect GC Content in the Plastomes of *Dendrobium* Genus." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (11).
- Nurkholidah. 2019. "Karakterisasi Morfologi Dan Barkoding DNA *Globba Atrosanguinea* Teijsm. & Binn. (Zingiberaceae) Akses Kalimantan." Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Nurtjahjaningsih ILG, Haryanti T, Widyatmoko AYPBC, and Rimbawanto A. Indrioko S. 2015. "Keragaman Genetik



- Populasi *Calophyllum Inophyllum* Menggunakan Penanda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).” *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* 9 (2): 91–102. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20886/jpth.2015.9.2.103-115>.
- Octavia, D. 2022. “Determinasi *Globba* sp. (Zingiberaceae) Asal Sumatra Utara Koleksi Kebun Raya Bogor Menggunakan DNA Barcoding Region *Internal Transcribed Spacer*.” UIN Walisongo Semarang.
- POWO. 2023. “Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew.” Published on the Internet. 2023. <http://www.plantsoftheworldonline.org/>.
- Prehadi, P., Sembiring, A., Kurniasih, E. M., Rahmad, R., arafat, D., Subhan, B., and Madduppa, H. H. 2015. “DNA Barcoding and Phylogenetic Reconstruction of Shark Species Landed in Muncar Fisheries Landing Site in Comparison with Southern Java Fishing Port.” *Iodiversitas Journal of Biological Diversity* 16 (1). <https://doi.org/https://doi.org/10.13057/biodiv/d160107>.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G. J. M. E. 2012. “Automatic Barcode Gap Discovery for Primary Species Delimitation.” *Molecular Ecology Resources* 21 (8): 1864–77.

- Qur'an Kemenag. 2022. Surah Ar-Rad ayat 4. <https://quran.kemenag.go.id/quran/perayat/surah/6?from=1&to=165>
- Rana, S. S. 2020. "Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacology of Diospyros Species: A Review." *Journal of Medicinal Plants Research* 14 (22): 1299–1310.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. "The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees." *Mol. Biol* 4 (4): 406–25.
- Salisbury, F.B., And Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*. Wardsworth Publishing Company Belmont California.
- Santoso, B., Chairil, A. dan Sahara, N. 2002. "Pembudidayaan Pohon Eboni (*Diospyros Celebica* Bakh.)." *Berita Biologi* 6 (2): 277–82.
- Steup, F.K.M. 1935. *Het Ebbenhout in Den Dienstkring Manado*. tectona.
- Sulistyawati, P., Widyatmoko, A.Y.P.B.C., Nurtjahjaningsih, I.L.G. 2014. "Keragaman Genetik Anakan Shorea Leprosula Berdasarkan Penanda Mikrosatelit." *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* 8 (3): 171–183. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.20886/jpth.2014.8.3.171-183>.
- Sun, Y.D.Z., Skinner, G.H., Liang, S.H., Hulbert. 1994. "Phylogenetic Analysis of Sorghum and Related Taxa

- Using Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA." *Theoretical and Applied Genetics* 89 (1): 26–32. <https://doi.org/10.1007/BF00226978>.
- Suryawan, Ady., Kinho, J., dan Mayasari, A. 2011. *Potensi Permudaan Alami Jenis-Jenis Eboni (Diospyros spp.) Di Cagar Alam Tangkoko, Bitung, Sulawesi Utara*. Info BPK Manado.
- Tang, Hu, D., Zhang, Y., Yang, Q. Luo, Y., Zhengrong. 2014. "Discriminant Analysis of 'Jinzaoshi' from Persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb.; Ebenaceae): A Comparative Study Conducted Based on Morphological as Well as ITS and MatK Sequence Analyses." *Scientia Horticulturae* 168: 168–74. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.033>.
- Ubaidillah, R., Sutrisno, H. 2009. *Pengantar Biosistemik: Teori Dan Praktik*. Jakarta: LIPI Press.
- Untu., Rumengan, P., Inneke F.M., Ginting., Elvy, L. 2015. "Identifikasi Mikroba Yang Koeksis Dengan *Ascidia Lissoclinum Patella* Menggunakan Sekuens Gen 16S rRNA." *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis* 3 (2): 23. <https://doi.org/10.35800/jplt.3.2.2015.10110>.
- Virgilio, M., Jordaens, K., Breman, F. 2012. *Turning DNA Barcodes Into an Alternative Tool for Identification: African Fruit Flies as a Model (Poster)*. Consortium for the Barcode of Life (CBOL).

- Viscosi, V ., dan Cardini, A. 2011. *Leaf Morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A Simplified Protocol for Beginners*.
- Wahyuningsih, Muslimi, Yusran. 2017. "Variasi Fenotip Dan Genotip Eboni (*Diospyros Celebica* Bakh) Pada Hutan Alam Dan Hutan Tanaman Di Sulawesi Tengah Dan Sulawesi Barat." *Jurnal ForestSains* 15 (1): 7-13.
- Waldchen, J., Rzanny, M., Seeland, M., & Mäder, P. 2018. "Automated Plant Species Identification—Trends and Future Directions." *PLos Comput Biol* 14 (4). <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005993>.
- Wanda, I.F., Djuita, N.R., Chikmawati, T. 2021. "Molecular Phylogenetics of Malesian *Diospyros* (Ebenaceae) Based TrnL-F Spacer Sequences." *Biodiversitas* 22 (9): 4107-14. <https://doi.org/https://orcid.org/0000-0002-5983-8057>.
- Widyatmoko, Y.P.B.C., and Shiraishi, S. 2013. "Geographic Variation of Chloroplast DNA Haplotypes in *Acacia Aulacocarpa* A. Cunn. Ex Benth." *Indonesian Journal of Forestry Research* 10: 42-56. <https://doi.org/https://doi.org/10.20886/ijfr.2013.10.1.43-56>.
- Wihermanto. 2003. "Dispersi Asosiasi Dan Status Populasi

- Tumbuhan Terancam Punah Di Zona Submontana Taman Nasional Gunung Gede Pangrango." *Jurnal Biodiversitas* 5 (1): 17-22. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d050104>.
- William, R., Pearson., Robins, G., and Zhang, T. 1999. "Generalized Neighbor-Joining: More Reliable Phylogenetic Tree Reconstruction." *Molecular Biology Evolution* 16 (6): 806-16.
- Zein, M. S. A., & Sulandari, S. 2009. "Investigasi Asal Usul Ayam Indonesia Menggunakan Sekuens Hypervariable-1 D-Loop DNA Mitokondria." *Jurnal Veteriner* 10 (1): 41-49.

## **LAMPIRAN**

## Gambar Lampiran 1 Dokumentasi Penelitian

Proses pengambilan sampel



Proses penggerusan sampel



Proses ekstraksi sampel



Prose PCR





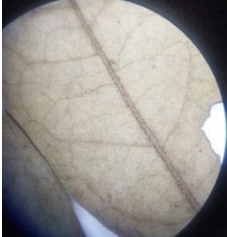



Pembuatan gel agarosa



Proses elektroforesis




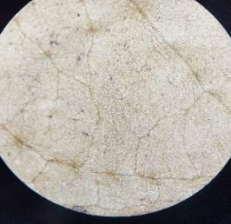
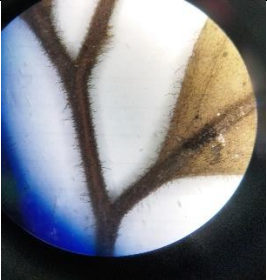
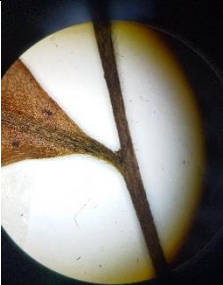
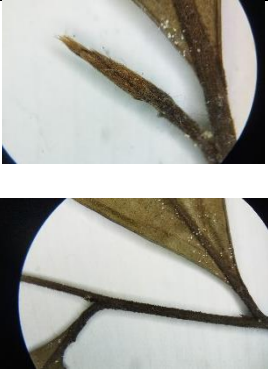



**Tabel Lampiran 2** Perbandingan Ciri Khusus Karakter morfologi sampel LZ05 dengan *D.ferrea* (Wild.) Bakh dan LZ08 dengan *D. sumatrana* Miq. var. *decipiens* (Clarke) Bakh

Parameter	XXIV.A.264 (LZ05)	<i>D.ferrea</i> (Wild.) Bakh	IV.C.106 (LZ08)	<i>D. sumatrana</i> Miq. var. <i>decipiens</i> (Clarke) Bakh
Kelenjar (Gland)			-	-
Secondary vein				



**Tabel Lampiran 3 Lanjutan**

Parameter	XXIV.A.264 (LZ05)	<i>D.ferrea</i> (Wild.) Bakh dan sampel LZ08	IV.C.106 (LZ08)	<i>D. sumatrana</i> Miq. var. <i>decipiens</i> (Clarke) Bakh
<i>Tersier vein</i>				
Trikoma				

**Lampiran 4** Sekuen sampel *Diospyros* LZ05 hasil sekuensing

>1st\_BASE\_4422295\_LZ05\_ITS\_F

ACCGAGCGGCGAAGTGGGCGGTTTCGCTGCCGGCGACGTCGCGAG  
AAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAAC  
AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTCGAGCCC  
TGCAAGAGCAGAACGACCCGCGAACACGTAACTCTACTCCGTGC  
CCGGCGGAGGGGGCGACCCTTCCCCGGCCACCCTCGTCGCGGGGG  
GCGCGGGCGGGTGC GGCGGCCTCTGGCGACCTCGCGCCCCCTCGC  
GAGCAGGAACCGACACGGGAACGGGACGCGCCAAGGAAAGACCA  
AGACACCCATAACGGCCGCGACCCCCCTACGGCCTTTAACGTGC  
GCCACATCCTTCACTTACGCAAAAAGACCGTCTCTCGCAGATAT  
GACGAATCTCGCATCGATGAATAACTGAGGTAAATGGCAAAATC  
CGGGGGACTTTTCAAAATTCGAAAACCATCGAGGCTTTAAACCC  
TTGTGCCGACGGAACCCATTCCGGGGAGGGAACCTCTGCGTGGG  
CCTCACGCCCCCGTTCGCCCCCCCCACCCCGCTTCGCCCCCCCCACG  
TGGACGGA AAAACTGGGGCCCCGGTGCCCAAGAAGGCCCC

>1st\_BASE\_4422296\_LZ05\_ITS\_R

TTAGGGA ACTCGTTAGTTTCTTCTTCTCCGCTTATTGATATGCT  
TAAACTCAGCGGGTAGTCCCGCCTGACCTGGGGTTCGCGTCGTGG  
GCGACGCGCGGGGGCGTCGCTCGGGGGGTCGCGGGGGGGGCACTC  
CCGTTCGATGAAGGGGCACTCCCCAAAACCGAAAGTTTGACAAC  
CACCACCGGCCCTGAACGCTGCCACCCGGATTCCCCTTTTTTTGGC  
CCAACGGGGCCCTTGCCGGCACCGGGGGCCAAC TTTCCGCCCCACC

CCCCCCCCCCTCCCCCTGGGGGAACAACCAGGGCGGGGGGGG  
AAACGGCGTGTTTAACCCCAAGGAAAATTTCCCCGGCCAAAAG  
GTTTTCGGGCCAAATTTGTTTTAAAAAACTCAAGGTTTCAGGGA  
ATTCTAAATTTACCCAAAATTTCTTTTTCCCTACTTTTTTCT  
TCAATGAAAAACCCAAAATTCCTTTGCGAAAACCTTTTTTGCT  
AAGATAAAAAACCCAACCCCGTCCCCCCTTTGCGGGGCTC  
CGGGCCNNTCTTTTTGTTTTATTTTTCTTTGGCGCTTCCCGCC  
CCGGTTTCCTTTTTCTTCGCGAGGGGCCACGAAAAGCCCGAA  
GACGCCCCACCCACGCTCGCCCCAAAGNNAGAGGCCCCCCGTA  
AAGGGACAGAACTACTCCT

**Lampiran 5** Sekuen sampel *Diospyros* LZ08 hasil sekuensing

>1st\_BASE\_4414554\_LZ08\_ITS\_F

TGAGCGGGAATTGGCCGGTTCGCTGCCGGCGATGTCGCGAGAAG  
TCCACTAAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAG  
GTTTCCGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTGTCGAGCCCCGC  
GATAGCAGAACGACCCGTGAACCAGTTATATGCACGCTCAGGAG  
GGGGCGACCCTTCCCGTCTCGCGGGGAGCTCGGACGCAGCCCCTC  
GGCCGCGCCGCTTTCGCCGTGACGAACAATGAACACTGGCGC  
TGGACGCTCCAAGGAATCGAAACGAACGGGCTGGCCCCGACCCT  
CGCGAAGTCGGGGGAGACGAGGCGACGCTTTATTTCGCGTTATGC  
AAAACGACTCTCAGTAATGGATATCTTAGCTCTCGCATCGATGA  
AGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCT  
GTGAACCATCAAGTCTTTGAACGCAAGTTGCACCCAAAGCCAGA  
CGCCGAGGGCACGTTTGCCTGGGCGTCACGCACGCCGTGGCCCCC  
CGCCCTGTGCCGCCCTACCCCAATTGGATGGAGGGCGCTCGCAC  
GGGCCGACGGGGGTGGAGTTTGGCCCCCTCATGCCCGGAGGGC  
GCGGTTGGCCGAAAAAGAGGGATCCGGGTGAGAGCGGTCACGGT  
CGGCGGTGGTTGTCGATTAGGCCTTCGTGTCTCGGCGAGTGCCC  
TCTCATAACGGGAATGCCCGCTCGAGACCCCGGAAGGGGGACG  
CCCCAGGGTGCCGCCACGAAGCGACCCAGGTCAGGCGGGACT  
ACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGTGCAGGAAAAGAAAC  
TAACCAGGATTTCCCTAGTAACGGCGAGCGAACGGGGGAAATTC  
TAAA

>1st\_BASE\_4414555\_LZ08\_ITS\_R

TANGGAACTGGGTAAAGTTTCTTTTCCTGCACTTATTGATATGC  
TTAAACTCAGCGGGTAGTCCCGCCTGACCTGGGGTCGCTTCGTG  
GGCGGCACCCTGGGGCGTCCCCCTTCCGGGGTCTCGAGCGGGGC  
ATTCCCGTTATGAGAGGGCACTCGCCGAGACACGAAGGCCTAAT  
CGACAACCACCGCCGACCGTGACCGTCTCACCCGGATCCCTCTT  
TTTCGGCCAACCGCGCCCTCGCGGGCATGAGGGGGCCAAACTCC  
ACCCCCGTCGGCCCGTGCAGCGCCCTCCATCCAATTGGGGTAG  
GGCGGCACAGGGCGGGGGCCACGGCGTGCGTGACGCCAGGCA  
AACGTGCCCTCGGCGTCTGGCTTTGGGTGCAACTTGCGTTCAA  
GACTTGATGGTTCACAGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGC  
ATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCTAAGATATCCATT  
ACTGAGAGTCGTTTTGCATAACGCGAATAAAGCGTCGCCTCGTC  
TCCCCGACTTCGCGAGGGTCGGGGCCAGCCCGTTCGTTTCGAT  
TCCTTGGAGCGTCCAGCGCCAGTGTTTCATTGTTTCGTCACGGGGA  
AGACGCGGCGCGGCCGAGGGGCTGCGTCCGAGCTCCCCGCGAGA  
CGGGAAGGGTCGCCCCCTCCTGAGCGTGATATAACTGGTTCAC  
GGGTGCTTCTGCTATCGCGGGGCTCGACAATGATCCTTCTGCAG  
GTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCTCCTTCTCTAAAT  
GATAAGGTTTAGTGACTTCTCGCGACATCGCCGGCAGCGAACC  
GGCCATATCGCCGCGATCCGAACAATTACCGACATNGAAATTC  
GTAA

**Lampiran 6** Sekuen hasil contig *Diospyros* sp. LZ08

&gt;LZ08 Hasil Contig

GAAGTGTTCCGATCGCGGCGATATGGCCGGTTCGCTGCCGGCGA  
TGTCGCGAGAAGTCCACTAAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGA  
AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATT  
GTCGAGCCCCGCGATAGCAGAACGACCCGTGAACCAGTTATATG  
CACGCTCAGGAGGGGGCGACCCTTCCCGTCTCGCGGGGAGCTCG  
GACGCAGCCCCTCGGCCGCGCCGCTTTCCCCGTGACGAACAAT  
GAACACTGGCGCTGGACGCTCCAAGGAATCGAAACGAACGGGCT  
GGCCCCGACCCTCGCGAAGTCGGGGGAGACGAGGCGACGCTTTA  
TTCGCGTTATGCAAAACGACTCTCAGTAATGGATATCTTAGCTC  
TCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAA  
TTGCAGAATCCTGTGAACCATCAAGTCTTTGAACGCAAGTTGCA  
CCCAAAGCCAGACGCCGAGGGCACGTTTGCCTGGGCGTCACGCA  
CGCCGTGGCCCCCGCCCTGTGCCGCCCTACCCCAATTGGATGGA  
GGGCGCTCGCACGGGCCGACGGGGGTGGAGTTTGGCCCCCTCAT  
GCCCCGAGGGCGCGGTTGGCCGAAAAAGAGGGATCCGGGTGAG  
AGCGGTCACGGTCGGCGGTGGTTGTTCGATTAGGCCTTCGTGTCT  
CGGCGAGTGCCCTCTCATAACGGGAATGCCCCGCTCGAGACCCC  
GGAAGGGGGACGCCCCAGGGTGCCGCCACGAAGCGACCCCAGG  
TCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGTGCA  
GGAAAAGAACTAACCAGGATTTCCCTAGTAACGGCGAG

**Tabel Lampiran 7** Tabel hasil BLASTn di NCBI sampel *Diospyros* sp. LZ05

No.	Nama Ilmiah	Jumlah (Sekuen)
1.	<i>Diospyros howii</i>	6
2.	<i>Diospyros Xishuangbannaensis</i>	2
3.	<i>Diospyros stigrosa</i>	1
4.	<i>Pelargonium minimum</i>	1
5.	<i>Codonopsis javanica</i>	1
6.	<i>Plukenetia loretensis</i>	1
7.	<i>Plukenetia brachybotrya</i>	1
8.	<i>Plukenetia stipellata</i>	4
9.	<i>Plukenetia volubilis</i>	4
10.	<i>Plukenetia lehmanniana</i>	1
11.	<i>Caryodendron orinocense</i>	1
12.	<i>Caryodendron grandifolium</i>	1
13.	<i>Tragia tenuifolia</i>	1
14.	<i>Tragia preussii</i>	1
15.	<i>Tragia cf. petiolaris</i>	1
16.	<i>Edmondia sesamoides</i>	1
17.	<i>Pelargonium odoratissimum</i>	1
18.	<i>Pelargonium ionidiflorum</i>	1
19.	<i>Pelargonium grossularioides</i>	1
20.	<i>Pelargonium exstipulatum</i>	1
21.	<i>Pelargonium cotyledonis</i>	1
22.	<i>Pelargonium album</i>	1
23.	<i>Pelargonium tragacanthoides</i>	1
24.	<i>Pelargonium fragrans</i>	1
25.	<i>Pelargonium griseum</i>	1
26.	<i>Pelargonium reniforme</i>	1
27.	<i>Osteopermum ecklonis</i>	1
28.	<i>Tanacetum vulgare</i>	1
29.	<i>Pelargonium xerophyton</i>	1
30.	<i>Pelargonium viscosissimum</i>	1
31.	<i>Pelargonium triste</i>	1
32.	<i>Pelargonium schizopetalum</i>	1
33.	<i>Pelargonium pulchellum</i>	1

## Lanjutan

No.	Nama Ilmiah	Jumlah (Sekuen)
34.	<i>Pelargonium pseudoglutinosum</i>	2
35.	<i>Pelargonium panduriforme</i>	1
36.	<i>Pelargonium nanum</i>	1
37.	<i>Pelargonium luridum</i>	1
38.	<i>Pelargonium limoneum</i>	1
39.	<i>Pelargonium laxum</i>	1
40.	<i>Pelargonium incrassatum</i>	1
41.	<i>Pelargonium hirtum</i>	1
42.	<i>Pelargonium glutinosum</i>	1
43.	<i>Pelargonium gibbosum</i>	1
44.	<i>Pelargonium vulgidum</i>	1
45.	<i>Pelargonium englerianum</i>	1
46.	<i>Pelargonium echinatum</i>	1
47.	<i>Pelargonium denticulatum</i>	1
48.	<i>Pelargonium cuculatum</i>	1
49.	<i>Pelargonium crispum</i>	1
50.	<i>Pelargonium citronellum</i>	1
51.	<i>Pelargonium camosum</i>	1
52.	<i>Pelargonium capitatum</i>	1
53.	<i>Pelargonium australe</i>	1
54.	<i>Pelargonium hirtipetalum</i>	1
55.	<i>Pelargonium radicatum</i>	1
56.	<i>Pelargonium radens</i>	1
57.	<i>Pelargonium littorale</i>	1
58.	<i>Pelargonium grandiflorum</i>	2
59.	<i>Pelargonium desertorum</i>	1
60.	<i>Pelargonium crassicaule</i>	1
61.	<i>Pelargonium klinghardtense</i>	1
62.	<i>Pelargonium gravaolens</i>	1
63.	<i>Pelargonium appendiculatum</i>	1
64.	<i>Pelargonium pillansii</i>	1
65.	<i>Pelargonium wuppertalense</i>	1
66.	<i>Pelargonium luridum</i>	1
67.	<i>Pelargonium aff. lobatum</i>	1



## Lanjutan

No.	Nama Ilmiah	Jumlah (Sekuen)
68.	<i>Pelargonium auritum</i>	1
69.	<i>Pelargonium sp.</i>	1
70.	<i>Valeriana officinalis</i>	1
71.	<i>Pelargonium pillansii</i>	1
72.	<i>Pelargonium wuppertalense</i>	1
73.	<i>Pelargonium luridum</i>	1
74.	<i>Pelargonium aff. lobatum</i>	1
75.	<i>Pelargonium auritum</i>	1
76.	<i>Pelargonium sp.</i>	1
77.	<i>Valeriana officinalis</i>	1
78.	<i>Pelargonium officinalis</i>	1
79.	<i>Valeriana excelsa subsp. sambucifolia</i>	1
80.	<i>Helichrysum italicum subsp. Picardi</i>	2
81.	<i>Pseudognaphalium sandwicensium var hawaiiense</i>	1
82.	<i>Pseudognaphalium luteoalbu</i>	1
83.	<i>Pseudognaphalium sp.</i>	4
84.	<i>Valeriana dioica</i>	1
85.	<i>Logfia minima</i>	1
86.	<i>Pennantia endlicheri</i>	1
87.	<i>Pennantia cunninghamii</i>	1
88.	<i>Pennantia corymbosa</i>	1
89.	<i>Pennantia baylisiana</i>	1
	Jumlah	100

**Tabel Lampiran 8** Tabel hasil BLASTn di NCBI sampel *Diospyros* sp. LZ08

No.	Nama Ilmiah	Jumlah (Sekuen)
1.	<i>Diospyros dumetorum</i>	5
2.	<i>Diospyros stigrosa</i>	1
3.	<i>Diospyros philippensis</i>	7
4.	<i>Diospyros rubra</i>	5
5.	<i>Diospyros rhombifolia</i>	15
6.	<i>Diospyros maclurei</i>	1
7.	<i>Diospyros discolor</i>	1
8.	<i>Diospyros cathayensis</i>	10
9.	<i>Diospyros mollis</i>	3
10.	<i>Diospyros xianguiensis</i>	4
11.	<i>Diospyros armata</i>	4
12.	<i>Diospyros morrisiana</i>	4
13.	<i>Diospyros punctilimba</i>	1
14.	<i>Diospyros susarticulata</i>	2
15.	<i>Diospyros miaoshanica</i>	8
16.	<i>Diospyros mun</i>	1
17.	<i>Diospyros hasseltii</i>	4
18.	<i>Diospyros tutcheri</i>	3
19.	<i>Diospyros susarticulata</i>	2
20.	<i>Diospyros howii</i>	6
21.	<i>Diospyros vaccinioides</i>	6
22.	<i>Diospyros siderophylla</i>	6
23.	<i>Diospyros ebum</i>	1
	Jumlah	100

## Gambar Lampiran 9 Hasil alignment sekuen sampel, 8 sekuen hasil BLAST dan 1 outgrup Euclea

	.... .... .... .... .... .... .... .... .... ....
	5 15 25 35 45 55
SAMPEL LZ0	GAAGTGTTCG GATCGCGGCG ATATGGCCGG TTCGCTGCCG GCGATGTCGC GAGAAGTCCA
MF171071.1	GAAGTGTTCG GATCGCGGCG ACGTGGGCGG TTCGCTGCCG GCGACGTCCG GAGAAGTCCA
MF171071.1	-----G TTCGCTGCCG GCGACGTCCG GAGAAGTCCA
SAMPEL LZ0	-----G TTCGCTGCCG GCGACGTCCG GAGAAGTCCA
KU378750.1	-----
KU378828.1	-----
KU378693.1	-----
KU378787.1	-----
KU378686.1	-----
KU378746.1	-----
DQ499077.1	-----
	.... .... .... .... .... .... .... ....
	65 75 85 95 105 115
SAMPEL LZ0	CTAAACCTTA TCATTTAGAG GAAGGAGAAG TCGTAACAAG GTTCCGTAG GTGAACCTGC
MF171071.1	CTGAACCTTA TCATTTAGAG GAAGGAGAAG TCGTAACAAG GTTCCGTAG GTGAACCTGC
MF171071.1	CTGAACCTTA TCATTTAGAG GAAGGAGAAG TCGTAACAAG GTTCCGTAG GTGAACCTGC
SAMPEL LZ0	CTGAACCTTA TCATTTAGAG GAAGGAGAAG TCGTAACAAG GTTCCGTAG GTGAACCTGC
KU378750.1	----- -TTCCGTAG GTGAACCTGC
KU378828.1	----- -TTCCGTAG GTGAACCTGC
KU378693.1	----- -TTCCGTAG GTGAACCTGC
KU378787.1	----- -TTCCGTAG GTGAACCTGC
KU378686.1	----- -TTCCGTAG GTGAACCTGC
KU378746.1	----- -TTCCGTAG GTGAACCTGC
DQ499077.1	----- -TTCCGTAG GTGAACCTGC
	.... .... .... .... .... .... .... ....
	125 135 145 155 165 175
SAMPEL LZ0	AGAAGGATCA TTGTCGAGCC CGCGGATA-- GCAGAACGAC CCGTGAACCA GTTATATGCA
MF171071.1	GGAAGGATCA TTGTCGAGCC CTGCAAGA-- GCAGAACGAC CCGGAACCT GTAACCTCAC
MF171071.1	GGAAGGATCA TTGTCGAGCC CTGCAAGA-- GCAGAACGAC CCGGAACCT GTAACCTCAC
SAMPEL LZ0	GGAAGGATCA TTGTCGAGCC CTGCAAGA-- GCAGAACGAC CCGGAACCT GTAACCTCAC
KU378750.1	GGAAGGATCA TTGTCGAGCC CGCGGAGACA GCAGGACGAC CCGGAACCA GTTATTCCAT
KU378828.1	GGAAGGATCA TTGTCGAGCC CTGCAAGA-- GCAGAACGAC CCGGAACCT GTAACCTCAC
KU378693.1	GGAAGGATCA TTGTCGAGCC CTGCAAGA-- GCAGAACGAC CCGGAACCT GTTACTCTAC
KU378787.1	GGAAGGATCA TTGTCGAGCC CGCGGATA-- GCAGGACGAC CCGGAACCA GTTACTCCAC
KU378686.1	GGAAGGATCA TTGTCGAGCC CTGCAAGA-- GCAGAACGAC CCGGAACCT GTAACCTCAC
KU378746.1	GGAAGGATCA TTGTCGAGCC CGCGGAAA-- GCAGAACGAC CCGGAACCA GTTAAGCCAA
DQ499077.1	----- --TCGAAC CTGCATC--- GCAGAACGAC CCGGAACCT GTATCTCTGC
	.... .... .... .... .... .... .... ....
	185 195 205 215 225 235
SAMPEL LZ0	CGCTCA---- --GGAGGGGG CGACCCCTT-- ---CCCGTC TCGC----- ---GGGGA
MF171071.1	GC-----C GGGAGGGGGC CGGCCCTCGG GCGTCCCTT CCCTGTCGG GGGCGCGCG
MF171071.1	GCGTGCCTGG GGGAGGGGGC CGGCCCTCGG GCGTCCCTT CCCTGTCGG GGGCGCGCG
SAMPEL LZ0	TCCGTGCCCG GCGAGGGGGG CGACCCCTCC CCGGCCACCC TCGT---CG CCGGGGGCGC
KU378750.1	--CCCG---- --GGAGGGGG CGGCCCTTG- GCGCCCCCGC CCGC-CGCG GG---GGGG
KU378828.1	TCTGTGCCTG GCGAAGGGGG CGACCCCTTC CCGGCCACCG TCGT---CG CCGGGGGCGC
KU378693.1	TCCGTGCCTG GCGAGGGGGG CGACCCCTCC CCGGCCACCG TCGC---CG CCGGGGGCGC
KU378787.1	AGTCCG---- --GGAGGGGG AGGCCCCCGT GCGCCCCCTT CCGTTCGCCG CCGCGGGGG
KU378686.1	--TCCG---- --GGGGGGGT GCCCCCTCCG GCGCGGGGGC GGCG----- TCGCG
KU378746.1	A-CCCG---- --GGAGGGGG CGGCCCTCGC GCCCCCTCC TCGT-CCCGC CCGCGGGGA
DQ499077.1	--TCTC---- --GGGGGTTG CGGCCCTCGC GTTGCCCCC GGC----- ---CGGG

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	245	255	265	275	285	295
SAMPEL LZ0	GCTCGGACGC	AGCCCTCTCG	CCGCGCCGCG	TCCTCCCC--	--GTGACGAA	CAATG--AAC
MF171071.1	ACCGGGCCTC	CCCCAAGAG	GC-AGCGCAG	CGTTCCCC--	--CGCGAAAA	CAACC--AAC
MF171071.1	GCGCGGCCTC	CCCCAAGAG	GC-AGCGCAG	CGTTCCCC--	--CGCGAAAA	CAACC--AAC
SAMPEL LZ0	GGCGGGGTGC	GGCGGCCTCT	GGCGACCTCG	CGCCCCCT--	--CGCGAGCAG	GAACC--GAC
KU378750.1	GCGCGGACGT	GGCCTCCCGG	CC-CGCACCG	CGCCCCCCCG	TCGCGACGAA	CAACG--AAC
KU378828.1	GCGCGGGCGC	GGCCTCTTCG	GGCGGCCCT	CGCCCCCT--	--CGCGACGAA	CAACG--AAC
KU378693.1	GAGCGGGGCG	GGCCTCTTCG	GGCGGCCTCT	CGCCCCCT--	--CGCGACGAA	CAACG--AAC
KU378787.1	GCGCGGGGCG	GGCCCTCTCG	CC-CGCTCG	CGTCCCC--	--CGCGACGAA	CAACG--AAC
KU378686.1	ACGCGGCCTC	GCGGCAACGT	AC-CGTTCG	CCCTCCCC--	--CGCGACGAA	CAACG--AAC
KU378746.1	GCGCGGACGC	GGCCCCCGG	CC-GGCCTCG	CGCCCCCT--	--CGCGACGAA	CAACG--AAC
DQ499077.1	GGGCG--CG	GTCGGGACCC	CC-TCGCGCG	CCCTCTTC--	--GGCGAAAA	CAACGCAAAC
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	305	315	325	335	345	355
SAMPEL LZ0	ACTGGCGCTG	GACGCTCCAA	GGAATC--GA	AACGAACG-G	GCTGGCC--CC	--GACCTCTCG
MF171071.1	AACGGCGCGG	GACGCGCCAA	GGAAAC--GA	AACGAACG-A	GCGGCCACCC	CGAACCCCGC
MF171071.1	AACGGCGCGG	GACGCGCCAA	GGAAAC--GA	AACGAACG-A	GCGGCCACCC	CGAACCCCGC
SAMPEL LZ0	ACCGGAAACG	GACGCGCCAA	GGAAAGACCA	AGACACCC-A	TAACGGC--CG	CGACCCCCC
KU378750.1	ACCGGCGCGG	GACGCGCCAA	GGAATC--GA	AACGAACG-G	GCTCGCC--CC	CGACCCCCGC
KU378828.1	ACCGGCGCGG	GACGCGCCAA	GGAAAAAGA	AACGAACG-A	GCGTGCC--CC	AGACCCCCGC
KU378693.1	ACCGGCGCGG	GACGCGCCAA	GGAAAAACA	AACGAACG-A	GCGCGCC--CC	AAACCCCCGT
KU378787.1	ACCGGCGCGG	GACGCGCCAA	GGAAAC--GA	AACGAACG-G	GCTCGCC--CC	CGACCCCCGC
KU378686.1	ACCGGCGCAA	GACGCGCCAA	GGAAAC--GA	AACGAACG-A	GCGCGCC--CC	CGACCCCCGC
KU378746.1	ACCGGCGCGG	GACGCGCCAA	GGAATC--GA	AACGAGCG-G	GCTCGCC--CC	--GACCCCCC
DQ499077.1	CCCGGCGCAA	GACGCGCCAA	GGAAAC--AG	AACGAACGGA	GCGCGCC--CC	CGACCCCCGC
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	365	375	385	395	405	415
SAMPEL LZ0	GAAGTCGGGG	GAGACGAGGC	GACGCTTAT	TCGCGT--TA	TGCAAAACGA	CTCTCAGTAA
MF171071.1	GA--CGGGC	GCGAGGGGGC	GCTGCCTTT	TCACTGTATCA	CGCAAAACGA	CTCTCGGCAA
MF171071.1	GA--CGGGC	GCGAGGGGGC	GCTGCCTTT	TCACTGTATCA	CGCAAAACGA	CTCTCGGCAA
SAMPEL LZ0	TA--CGGGC	TTTAACTGTC	GCCACATCCT	TACTION--TA	CGCAAAAAGA	CCGTCTCTCG
KU378750.1	GA--CGGGG	GAGACGGGGC	GACGCTCCAT	TCACCC--CA	CGTAAACGA	CTCTCGGCAA
KU378828.1	AA--CGGGC	GCGACGGGGC	ATCGCGTCTT	TACTION--TA	CGCAAAACGA	CTCTCGGCAA
KU378693.1	AA--CGGGC	GCGACGGGGC	GTCGCGTCTT	TACTION--TA	CGCAAAACGA	CTCTCGGCAA
KU378787.1	GA--CGGGG	GAGACGGGGC	GACGCTTAT	TCGACG--TA	CGCAAAACGA	CTCTCGGCAA
KU378686.1	AA--GGGGC	GCGACGGGGC	GTCGCGTAT	TCACTA--CG	TACAAACGA	CTCTCGGCAA
KU378746.1	GA--CGGGG	GAGACGGGGC	GACGCCTCG	TCACCG--TA	CGCAAAACGA	CTCTCGGCAA
DQ499077.1	TC--CGGGG	ACGAGGGGGC	GTCGYGTCTT	TCACGA--AC	CGCAAAACGA	CTCTCGGCAA
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	425	435	445	455	465	475
SAMPEL LZ0	TGGATATCTT	AGCTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TGGTGTGAAT
MF171071.1	CGGATATCTC	GGCTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TGGTGTGAAT
MF171071.1	CGGATATCTC	GGCTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TGGTGTGAAT
SAMPEL LZ0	CAGATATGAC	GAATCTCGCA	TCGATGAATA	ACTGAGGTAA	ATGGCAAAAT	CCGGGGGACT
KU378750.1	CGGATATCTC	GGCTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TGGTGTGAAT
KU378828.1	CGGATATCTC	GGCTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TGGTGTGAAT
KU378693.1	CGGATATCTT	GGCTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TGGTGTGAAT
KU378787.1	CGGATATCTC	GGCTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TGGTGTGAAT
KU378686.1	CGGATATCTC	GGCTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TGGTGTGAAT
KU378746.1	CGGATATCTC	GGCTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TGGTGTGAAT
DQ499077.1	CGGATATCTC	GGCTCTCGCA	TCGATGAAGA	ACGTAGCGAA	ATGCGATACT	TGGTGTGAAT

```

...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
 485      495      505      515      525      535
SAMPEL LZ0 TGCAGAATCC TGTGAACCAT CAAGTCTTTG AACGCAAGTT GCACCCAAAG CCAGACGGCC
MF171071.1 TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCATTGCGCC
MF171071.1 TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCATTGCGCC
SAMPEL LZ0 TTCAAATATC CGAAAACCAT CGAGGCTTTA AACCTTTGTG CCGAGCGAAG CCATTCCGGG
KU378750.1 TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCCGACGGCC
KU378828.1 TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCATTGCGCC
KU378693.1 TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCATTGCGCC
KU378787.1 TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCATTGCGCC
KU378686.1 TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCATTGCGCC
KU378746.1 TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCAGACGGCC
DQ499077.1 TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTCTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCAGTGGCC

...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
 545      555      565      575      585      595
SAMPEL LZ0 GAGGGCAGCT TTGCTGGGC GTCACGCACG CCGTGGCCCC CCGCCCTGTG CCGCCCTACC
MF171071.1 GAGGGCAGCT CTGCCTGGGC GTCACGCACG CCGTGGCCCC CCG-CCCG- -CGCTTCCC
MF171071.1 GAGGGCAGCT TTGCTGGGC GTCACGCACG CCGTGGCCCC CCGACCCCG- -CGCTTCCC
SAMPEL LZ0 GAGGGAACCT CTGCGTGGGC CTCACGCCCG CCGTGGCCCC CCCACCCG- -CTTCCGCC
KU378750.1 GAGGGCAGCT CTGCCTGGGC GTCACGCACG CCGTGGCCCC CCCGCCCG- -CGCCGCCG
KU378828.1 GAGGGCAGCT CTGCCTGGGC GTCACGCACG CCGTGGCCCC CCCACCCG- -CGTCTCCC
KU378693.1 GAGGGCAGCT CTGCCTGGGC GTCACGCACG CCGTGGCCCC CCCACCCG- -CGTCTCCC
KU378787.1 GAGGGCAGCT CTGCCTGGGC GTCACGCACG CCGTGGCCCC CC-ACCTCG- -CGTCCGAT
KU378686.1 GAGGGCAGCT CTGCCTGGGC GTCACGCACG CCGTGGCCCC CACGCCCG- -CGCCGCCG
KU378746.1 GAGGGCAGCT CTGCCTGGGC GTCACGCACG CCGTGGCCCC CCCGCCCG- -CGCCTCCC
DQ499077.1 GAGGGCAGCT CTGCCTGGGC GTCACGCACR CCGTGGCCCC CCAGTCCC- ---CCGCCG

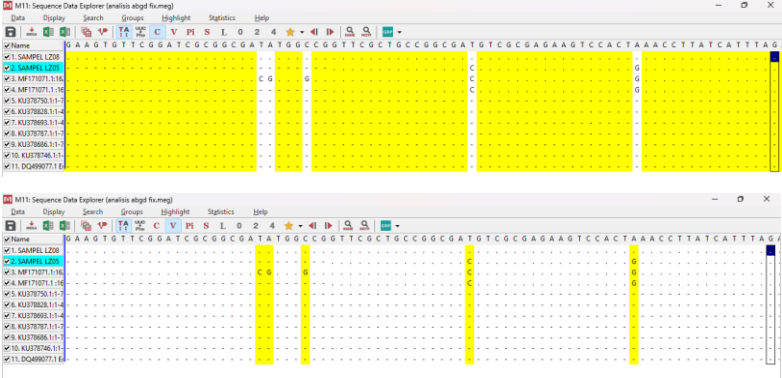
...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
 605      615      625      635      645      655
SAMPEL LZ0 CCAATTGGAT GGAGGGCGCT CGCACGGGCC GACGGGGGTG GAGTTTGGCC CCCTCATGCC
MF171071.1 TCC-CGG--- --GGACGGG CGCGCGCGCG GCGGGGCGGA AGTTGGCCCC CCGTGGCCCG
MF171071.1 TCCACGG--- --GGACGGG CGCGCGCGCG GCGCCCGG-- -----
SAMPEL LZ0 CCCACGT--- --GGACGGA AAACCTGGGG CC-----
KU378750.1 CCCCTCCGGG ---GGACGG CGCGGGGGTC GCGGGGGGCG GATCCTGGCC CCC-CGTGCC
KU378828.1 CCCACAG--- --GGACGG- -----
KU378693.1 CCCACAG--- --GGACGG- -----
KU378787.1 CCCCCCGG- ---GGACGGG CGCGCGGGGT GCCGGGGGCG GATTCTGGCC CCC-CGTGCC
KU378686.1 CCAGG----- --GGACGGG CGCGCGGG- GCGGGGGGCG GAACCTGGCC CCC-CGTGCC
KU378746.1 CCCGT----- --GGACGGG CGCGCGGGCC GCGGGGGGCG GACCTGGCC CCC-CGTGCC
DQ499077.1 AC----- ---GACGCG CGCG-GGA- GCGCGGGGCG GAAGTTGGCC CCC-CGTGCC

...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
 665      675      685      695      705      715
SAMPEL LZ0 CGC--GAGGG CGCGGTTGGC CGAAAAAGAG GG-ATCCGGG TGAGAGCGGT CACGGTCGGC
MF171071.1 GAGGACGCGG TCGGCCAAA AAGAGGGATC CCGTGGCAG CGGTCACGGC CGGTGGTGGT
MF171071.1 -----
SAMPEL LZ0 -----
KU378750.1 CGC--GAGGG CGCGGTCGGC CGAAAAAGAG GG-ACCCCGG TGGGAGCGGT CACGGCCGGC
KU378828.1 -----
KU378693.1 -----
KU378787.1 GAAAAGAGGG CGCGGTCGGC CGAAAAAGAG GG-ATCCCGG CGGGAGCGGT CACGGCCGGC
KU378686.1 CGC--GAGGG CGCGGTCGGC CTA AAAAGAG GG-ATCCCGG TGGCAGCGGT CACGGCCGGT
KU378746.1 CGC--GAGGG CGCGGTCGGC CGAAAAAGAG GG-ACCCCGG TGAGAGCGGT CATTGGCCGGT
DQ499077.1 GTC--CGCG CGCGGTCGGC CTA AAAAGAG GGATCTCCCGA CGACGACGGT CGCGCCGGT

```

	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	725            735            745            755            765            775
SAMPEL LZ0	-GGTGGTTGT CGATTAGGCC TTCGTGTCTC GGCGAGTGCC CTCTCATAAC GGGAAATGCC
MF171071.1	TGTCAAACCT TCGCGTCCCG GCGAGTGCCC TCCACCCGAT CGGAGCGCCC CCAGCGACCC
MF171071.1	-----
SAMPEL LZ0	-----
KU378750.1	-GGTGGTTGT CGAG---CC CTCGTGACCC GGCGAGTGCC CTCTCGCC-- GGGGAGCGCC
KU378828.1	-----
KU378693.1	-----
KU378787.1	-GGTGGTTGT CGAGAA-GCC TTCGCGTCCC GGCGAGTGCC CTCCCAGCG- CGGGAGCGCC
KU378686.1	TGGTGGTTGT CAA---ACC TTCGCGTCTT GGCGAGTGCC CTTTCACCG- ACGGGAGTGC
KU378746.1	-GGTGGTCTG CGAG---CC CTCGCGTCTC GGCCAGCGCC CTCTCGCCGG CGGGAGTGCC
DQ499077.1	-GGTGGTTGT CAAG---ACC CTCGCGTCTC GGCGAGTGCC GCGTCGTCG- CGGAAGTTCC
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	785            795            805            815            825            835
SAMPEL LZ0	CGCTCGAGAC CCC--GGAAG GGGG----- -ACGCCCCAG GGTGCCGCCCC ACGAA-----
MF171071.1	TCGAGCGAGC GAAAGCCCAT AACACGGGGG CGTCGCCCCG CCCACGAGCC GACCCAGGT
MF171071.1	-----
SAMPEL LZ0	-----
KU378750.1	CCC-CGCGAC CCC--AGTCG AGCG---TCG CCCCAGCAG GGCGCCGCCCC ACGAC-----
KU378828.1	-----
KU378693.1	-----
KU378787.1	CCC-AGCGAC CCT--GCCCG AGCG----- -ACGCCCCGA GGCGCCGCCCC ACGAC-----
KU378686.1	CCCCCGCGAC C-C--CCGAG AGCG----- -ACGCCCCAA GGCGCCGCCCC ACGAC-----
KU378746.1	CCCGCGCGAC CCTGAAGTCA GCCGGGGCGG CCTCTCCAG GACGCCGCCCC ACGACTCGAC
DQ499077.1	CTCGAGCAA GAC--CCTCG GGC----- -GAGGCGGGA AACCAAACCC ACC-C-----
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	845            855            865            875            885            895
SAMPEL LZ0	GCGACCCAG GTCAGGCGGG ACTACCCGCT GAGTTTAAAG ATATCAATAA GTGCAGGAAA
MF171071.1	CAGGCGGGAC TACCCGCTGA GTTTAAGCAT ATCAATAAGC GGAGGAAGAG AAACCTAACCA
MF171071.1	-----
SAMPEL LZ0	-----
KU378750.1	GCGACCCAG GTCAGGCGGG ACCACCCGCT GAGTTTAA--
KU378828.1	-----
KU378693.1	-----
KU378787.1	GCGACCCAG GTCAGGCGGG ACCACCCGCT GAGTTTAA--
KU378686.1	GCGACCCAG GTCAGGCGGG ACTACCCGCT GAGTTTAA--
KU378746.1	GCGATCTCAG GTCAGGCGGG ACTACCCGCT GAGTTTAA--
DQ499077.1	TCGCTCCCGA
	.... ....  .... ....  .... ....  ....
	905            915            925
SAMPEL LZ0	AGAAACTAAC CAGGATTTCCT CTAGTAACGG CGAG
MF171071.1	GGATTCCCTT AGTAACGGCG AG-----
MF171071.1	-----
SAMPEL LZ0	-----
KU378750.1	-----
KU378828.1	-----
KU378693.1	-----
KU378787.1	-----
KU378686.1	-----
KU378746.1	-----
DQ499077.1	-----

**Gambar Lampiran 10** Bagian *Gap conserve* dan variasi hasil alignment sekuen sampel, 8 sekuen hasil BLAST dan 1 outgrup Euclea



## RIWAYAT HIDUP

### A. Identitas Diri

1. Nama lengkap : Lailatuz Zahro
2. Tempat, tanggal lahir : Tegal, 07 februari 2002
3. Alamat : jl situnggul, gang anggrek,  
rt/19 rw/05 Ds. Pesarean Kec. Adiwirma Kab. Tegal
4. Hp : 085783918793
5. Email : lailatuzzahro02@gmail.com

### B. Riwayat Pendidikan

#### 1. Pendidikan formal

- a. TK Masyitoh Lewah Duwur lulus tahun 2007
- b. SD N 02 Lemah Duwur lulus tahun 2013
- c. MTS Nahdhatul Umam lulus tahun 2016
- d. MA Nahdhatul Umam lulus tahun 2019
- e. UIN Walisongo

#### 2. Pendidikan non formal

1. Madrasah Takhusus lil banat pekuncen
2. Pondok Pesantren Putri aisyah Kempek Gempol  
Cirebon