

**IDENTIFIKASI *Flacourtia* sp. KOLEKSI KEBUN RAYA
BOGOR MENGGUNAKAN *DNA BARCODING* SEKUEN *rbcL*
DAN *matK***

SKRIPSI

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



Disusun oleh:

AMIDATUR ROHMANIYAH

NIM: 1908016045

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG**

2023

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Amidatur Rohmaniyah

NIM : 1908016045

Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

**IDENTIFIKASI *Flacourtia* sp. KOLEKSI KEBUN RAYA
BOGOR MENGGUNAKAN *DNA BARCODING* SEKUEN
rbcL DAN *matK***

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

Semarang, 27 April 2023

Pembuat Pernyataan

Amidatur Rohmaniyah

1908016045



KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
Jl. Prof. Dr. Hamka Ngaliyan, Semarang
Telp. (024)7601295

PENGESAHAN

Judul : Identifikasi *Flacourtia* sp. Koleksi Kebun
Raya Bogor Menggunakan *DNA Barcoding*
Sekuen *rbcL* dan *matK*

Penulis : Amidatur Rohmaniyah
NIM : 1908016045
Jurusan : S1 Biologi

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

Semarang, 27 April 2023

DEWAN PENGUJI

Penguji I	Penguji II
 Dr. Baiq Farhatul Wahidah, M. Si. NIP. 197502222009122001	 Irfan Martiansyah, M. Si. NIP. 198503032019021002
Penguji III	Penguji IV
 Dr. Lianah, M. Pd. NIP. 1959031331981032001	 Amalia Sari Mukaromah, M. Sc. NIP. 198709112018012001
Pembimbing I	Pembimbing II
 Dr. Baiq Farhatul Wahidah, M. Si. NIP. 197502222009122002	 Irfan Martiansyah, M. Si. NIP. 198503032019021002

iii

NOTA DINAS

Semarang, 27 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 *Flacourtia* sp. Koleksi Kebun
Raya Bogor Menggunakan *DNA Barcoding*
Sekuen *rbcL* dan *matK*

Penulis : Amidatur Rohmaniyah

NIM : 1908016045

Program studi : S1 Biologi

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

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Pembimbing I

Dr. Baiq Farhatul Wahidah, M. Si.
NIP. 197502222009122002

NOTA DINAS

Semarang, 27 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 *Flacourtia* sp. Koleksi Kebun
Raya Bogor Menggunakan *DNA Barcoding*
Sekuen *rbcL* dan *matK*

Penulis : Amidatur Rohmaniyah

NIM : 1908016045

Program studi : S1 Biologi

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

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Pembimbing II

Irfan Martiansyah, M. Si.
NIP. 198503032019021002

MOTTO HIDUP

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”- Q.S. Ar-Rad (11)

ABSTRAK

Flacourtia merupakan salah satu tumbuhan yang termasuk dalam famili Salicaceae. Terdapat 4 spesies *Flacourtia* koleksi Kebun Raya Bogor antara lain: *F. indica* (2), *F. inermis* (5), *F. jangomas* (6), *F. rukam* (13), namun terdapat satu genus yang belum teridentifikasi sampai ke tingkat spesies, yaitu *Flacourtia* sp. dengan nomor koleksi II.O.IV.A.18 asal Sulawesi Tengah. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi sampel *Flacourtia* sp. menggunakan pendekatan molekuler DNA barcode *rbcL* dan *matK*. Tahapan penelitian meliputi pengambilan sampel, ekstraksi DNA, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), elektroforesis, visualisasi DNA, sekuensing DNA dan analisis data hasil sekuensing. Analisis data dilakukan dengan merekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining* dengan parameter *Jukes cantor + Gamma (rbcL)* dan *Tamura 3-parameter (matK)*. Dari hasil penelitian, identifikasi molekuler menggunakan sekuen *rbcL* dan *matK* menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. termasuk ke dalam genus *Scolopia*. Sedangkan, identifikasi spesies menggunakan pengamatan secara morfologi dan herbarium mampu menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. merupakan spesies *Scolopia luzonensis*.

Kata kunci: Flacourtia, identifikasi molekuler, karakterisasi sekuen, Scolopia

ABSTRACT

Flacourtia is a plant that belongs to the family Salicaceae. There are 4 species of *Flacourtia* in the Bogor Botanical Garden collection among others; *F. indica* (2), *F. inermis* (5), *F. jangomas* (6), *F. rukam* (13), but there is one genus that has not been identified down to the species level, namely *Flacourtia* sp. with collection number II.O.IV.A.18 from Central Sulawesi. This study aims to identify samples of *Flacourtia* sp. using a molecular approach to DNA barcodes *rbcL* and *matK*. The stages of the research included sampling, DNA extraction, PCR (Polymerase Chain Reaction), electrophoresis, DNA sequencing and data analysis of the results of the sequencing. Data analysis was performed by reconstructing trees using the Neighbor Joining method with Jukes cantor + Gamma (*rbcL*) and Tamura 3-parameter (*matK*). From the research results, molecular identification using *rbcL* and *matK* sequences showed that the *Flacourtia* sp. belongs to the genus *Scolopia*. Meanwhile, species identification using morphological and herbarium observations was able to show that the *Flacourtia* sp. is a species of *Scolopia luzonensis*.

Keywords: *Flacourtia*, molecular identification, sequence characterization, *Scolopia*

TRANSLITERASI ARAB-LATIN

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

ا	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 dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Identifikasi *Flacourtia* sp. Koleksi Kebun Raya Bogor Menggunakan *DNA Barcoding* Sekuen *rbcL* dan *matK*”** guna memenuhi persyaratan kelulusan. Shalawat dan salam semoga tetap tercurahkan kepada khotamul anbiya’ wal mursalin, Nabi Muhammad SAW yang penuh kemuliaan. Semoga *kita* tergolong ke dalam umatnya yang mendapatkan syafa’at di hari akhir.

Penulis menyadari kelemahan serta keterbatasan yang ada sehingga dalam menyelesaikan skripsi ini memperoleh bantuan dari berbagai pihak, dalam kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Imam Taufiq, M.A. selaku Rektor UIN Walisongo Semarang;
2. Bapak Dr. H. Ismail, M. Ag. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang;
3. Ibu Baiq Farhatul Wahidah, M. Si. selaku Ketua Program Studi Biologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang dan juga selaku pembimbing I

yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama penelitian dan penulisan skripsi;

4. Bapak Irfan Martiansyah, M. Si. selaku Pembimbing II di Kebun Raya Bogor-Pusat Riset Konservasi Tumbuhan, Kebun Raya dan Kehutanan-BRIN yang telah begitu banyak memberikan ilmu, ide, bimbingan serta arahan selama penelitian dan penulisan skripsi;
5. Ibu Asri Febriana, M.Si. selaku dosen wali yang selalu memberikan semangat, bimbingan dan arahan selama perkuliahan;
6. Ibu dan Bapak dosen, pegawai, dan civitas akademik UIN Walisongo Semarang yang telah memberikan bantuan kepada penulis selama perkuliahan
7. Orangtua saya, Bapak Fahrudin dan Ibu Nasripah serta adik saya tercinta Amin Hajul Falak yang setiap hari memberikan perhatian, kasih sayang, do'a, semangat serta dukungan dari segi moril maupun materil;
8. Teman-teman penulis di kelas (*Chrom Kingdom*), Chusnul, Laila, Izza, Ica, Vivi yang telah kebersamai dalam mencari ilmu di UIN Walisongo;
9. Keluarga UKM-F Risalah, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Walisongo yang telah memberikan pengalaman berharga selama perkuliahan;

10. Adik Tingkat saya di program studi Biologi Winda dan Shofi yang telah membantu saya dalam pengambilan sampel lagi;
11. Diffa Dhiyaul Auliya dan Sri Mentari yang berkenan meminjamkan laptopnya kepada saya, untuk menulis skripsi ini;
12. Seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam berbagai hal sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dari isi maupun susunannya. Semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi penulis serta para pembaca guna meningkatkan pengetahuan kita.

Semarang, 27 April 2023

Penulis

Amidatur Rohmaniyah

1908016045

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN	iii
PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
NOTA DINAS	iv
MOTTO HIDUP	vi
ABSTRAK	vii
TRANSLITERASI ARAB-LATIN	ix
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
A. <i>Flacourtia</i> sp.	7
B. Isolasi DNA	10
C. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	12
D. Elektroforesis	14
E. <i>DNA Barcoding</i>	15
F. Gen <i>rbcl</i>	18
G. Gen <i>matK</i>	20
H. Sekuensing DNA	22

I.	Pemanfaatan Tumbuhan dalam Al-Qur'an.....	23
J.	Kajian yang Relevan	25
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....		28
A.	Waktu dan Tempat Penelitian	28
B.	Alat dan Bahan	29
C.	Cara Kerja.....	31
D.	Alur Kerja	41
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		42
A.	Deskripsi Hasil Penelitian.....	42
1.	Hasil Isolasi dan Amplifikasi DNA.....	42
2.	Hasil analisis sekuensing	43
3.	Pengamatan secara morfologi	64
B.	Pembahasan Hasil Penelitian	71
BAB V PENUTUP		80
A.	Simpulan.....	80
B.	Saran.....	81
DAFTAR PUSTAKA		82
LAMPIRAN		88
DAFTAR RIWAYAT HIDUP		97

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Data sampel	29
Tabel 3.2	Bahan yang digunakan	30
Tabel 3.3	Primer yang digunakan	30
Tabel 3.4	Ciri morfologi <i>Flacourtia</i> sp.	32
Tabel 3.5	Reagen PCR Mix	36
Tabel 3.6	Reagen PCR Mix untuk perbanyak sampel	38
Tabel 4.1	Hasil BLAST sekuen <i>rbcL</i> yang diambil	47
Tabel 4.2	Komposisi sekuen nukleotida <i>Flacourtia</i> sp. region <i>rbcL</i>	48
Tabel 4.3	Jarak genetik (<i>rbcL</i>)	57
Tabel 4.4	Hasil BLAST sekuen <i>matK</i> yang diambil	58
Tabel 4.5	Komposisi sekuen nukleotida <i>Flacourtia</i> sp. region <i>matK</i>	60
Tabel 4.6	Jarak genetik (<i>matK</i>)	62
Tabel 4.7	Karakter morfologi <i>Flacourtia</i> sp.	65
Tabel 4.8	Perbandingan morfologi sampel	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Daun muda <i>Flacourtia</i> , dan bunga <i>Flacourtia</i>	7
Gambar 2.2	Region <i>barcode</i> pada kingdom Plantae	18
Gambar 2.3	Diagram sekuen <i>rbcl</i>	20
Gambar 2.4	Diagram sekuen <i>matK</i>	21
Gambar 3.1	Peta lokasi pengambilan sampel	28
Gambar 3.2	Alur kerja penelitian	41
Gambar 4.1	Visualisasi DNA sampel <i>Flacourtia</i> sp. menggunakan sekuen <i>rbcl</i>	42
Gambar 4.2	Visualisasi DNA sampel <i>Flacourtia</i> sp. menggunakan sekuen <i>matK</i>	43
Gambar 4.3	Elektroforegram sampel <i>Flacourtia</i> sp. menggunakan region <i>rbcl</i> (<i>forward</i>)	44
Gambar 4.4	Elektroforegram sampel <i>Flacourtia</i> sp. Menggunakan region <i>rbcl</i> (<i>reverse</i>)	45
Gambar 4.5	Pohon filogenetik <i>Flacourtia</i> sp. menggunakan region <i>rbcl</i> dengan parameter <i>Jukes cantor + Gamma</i>	54
Gambar 4.6	Elektroforegram sampel <i>Flacourtia</i> sp. menggunakan region <i>matK</i> (<i>forward</i>)	56
Gambar 4.7	Elektroforegram sampel <i>Flacourtia</i> sp. menggunakan region <i>matK</i> (<i>reverse</i>)	56
Gambar 4.8	Pohon filogenetik <i>Flacourtia</i> sp. Menggunakan region <i>matK</i> dengan parameter <i>Tamura 3-Parameter</i>	64
Gambar 4.9	Morfologi <i>Flacourtia</i> sp. Nomor koleksi II.O.IV.A.18	67
Gambar 4.10	Herbarium <i>S. spinosa</i> & <i>S. luzonensis</i> & sampel <i>Flacourtia</i> sp.	70

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Sekuen <i>Flacourtia</i> sp.	88
Gambar	Hasil <i>aligment</i> (sekuen <i>rbcl</i>)	93
lampiran 2		
Gambar	Hasil <i>aligment</i> (sekuen <i>matK</i>)	93
lampiran 3		
Gambar	Hasil BLAST di NCBI (sekuen <i>rbcl</i>)	94
lampiran 4		
Gambar	Hasil BLAST di NCBI (sekuen <i>matK</i>)	94
lampiran 5		
Gambar	Pencarian model parameter (sekuen <i>rbcl</i>)	95
lampiran 6		
Gambar	Pencarian model parameter (sekuen <i>matK</i>)	95
lampiran 7		
Gambar	Dokumentasi penelitian	96
lampiran 8		

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara beriklim tropis yang kaya akan keanekaragaman sumber daya genetik. Salah satu kekayaan sumber daya genetik yang dimiliki berupa keanekaragaman tumbuhan (Verheij dan Coronel, 1992). Beraneka ragam tumbuhan yang ada di Indonesia memiliki banyak manfaat sehingga digunakan oleh masyarakat untuk berbagai hal, seperti tanaman obat, konsumsi dan sebagainya (Herlina *et al.*, 2019). Beberapa macam tumbuhan bermanfaat untuk kelangsungan hidup manusia karena dapat menghasilkan senyawa tertentu seperti *Flacourtia rukam*, salah satunya berasal dari genus *Flacourtia*. Beberapa spesies dari genus *Flacourtia* telah dimanfaatkan masyarakat sebagai antioksidan (*Flacourtia rukam*) (Inas *et al.*, 2019) dan buah konsumsi serta obat tradisional (*Flacourtia inermis*) (Sitti, 2018).

Tumbuhan *Flacourtia* merupakan tumbuhan yang bersifat *autotrofik* (mampu menguraikan bahan anorganik menjadi organik) yang dapat ditemukan di India Selatan, Malaysia, Indonesia, Filipina dan

sebagainya (Alakolanga *et al.*, 2015). *Flacourtia* berasal dari Angola, Aldabra, Bangladesh, Assam, Benin, Kalimantan, Botswana, Kepulauan Bismarck, Burkina, Kamboja, Kamerun, Provinsi Tanjung, Kepulauan Caroline, Repu Afrika Tengah, Etiopia, Chad China Selatan-Tengah, Senegal, Cina Tenggara, Komoro, Kongo, Himalaya Timur, Thailand, Fiji, Burundi, Ghana, Guinea-Bissau, Hainan, India, Pantai Gading, Pulau Nicobar, Jawa, Sulawesi, Sumatera, Kenya, Kwazulu, Togo, Kepulauan Laccadive, Gabon, Laos, Uganda, Kepulauan Sunda kecil, Nugini, Madagaskar, Malawi, Malaya, Pulau Solomon, Mali, Maluku, Mozambik, Namibia, Nepal, Papua nugini, Niue, Pakistan, Filipina, Myanmar, Rwanda, Samoa, Sierra Leone, Somalia, Sri Lanka, Sudan, Tanzania, Tonga, Vietnam, Zambia, Zimbabwe. Dan dikenalkan pada wilayah Bahamas, Republika Dominika, Hawaii, Jamaikan, Mauritius, Kaledonia Baru, Puerto Rico, Queensland, Taiwan, Venezuela (POWO, 2019).

International Union for Conservation of Nature (IUCN) telah mengkategorikan beberapa genus *Flacourtia* ke dalam status *Least Concern* (LC) atau berada dalam keadaan stabil (IUCN, 2021). Meskipun masih tergolong LC, diperkirakan tumbuhan tersebut

mengalami penurunan tumbuh. Hal ini dikarenakan pengalihfungsian lahan dan pembakaran hutan secara liar. Hal inilah yang menjadikan upaya konservasi perlu dilakukan supaya menjaga kelestarian tumbuhan (Basuki *et al.*, 2013).

Terdapat beberapa spesies *Flacourtia* di Kebun Raya Bogor, meliputi; *Flacourtia indica* (Burm.f.) Merr. (2), *Flacourtia inermis* Roxb. (5), *Flacourtia jangomas* (Lour.) Raeusch. (6), *Flacourtia rukam* Zoll. & Moritzi (13). Namun, terdapat satu genus yang belum teridentifikasi sampai ke tingkat spesies, yaitu *Flacourtia* sp. dengan nomor koleksi II.O.IV.A.18 asal Sulawesi Tengah. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ramdhani Arfan (2022) yang melakukan penelitian “Keragaman Genetik *Flacourtia rukam* Zoll & Moritzi Koleksi Kebun Raya Bogor Berdasarkan Karakter Morfologi dan Marka Molekuler ISSR” mengungkapkan bahwa spesies *Flacourtia* sp. dengan nomor koleksi II.O.IV.A.18 bukan bagian *Flacourtia rukam*. Sehingga diperlukan proses identifikasi untuk mengungkap spesies *Flacourtia* sp. yang terdapat di Vak. II.O.IV.A.18.

Kegiatan identifikasi dapat dilakukan menggunakan beberapa pendekatan seperti sitologi,

anatomi, morfologi, dan molekuler (Izza *et al.*, 2018). Identifikasi morfologi memerlukan kelengkapan organ generatif dan organ vegetatif, sedangkan data dilapangan hanya tersedia organ vegetatifnya saja. Sehingga dibutuhkan identifikasi molekuler.

Identifikasi molekuler umumnya menggunakan sumber DNA, yang dapat digunakan dalam metode *DNA Barcoding* (Rahayu dan Jannah, 2019). *DNA barcoding* memiliki kelebihan yaitu tersedia data yang objektif dan format digital, sehingga siapapun dapat mengakses data tersebut (Seprianto, 2017). *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) merekomendasikan dua gen plastid, yaitu *rbcL* dan *matK* sebagai barcode standar (Hollingsworth *et al.*, 2009). Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Akilabindu (2019), dia merekomendasikan penggunaan region *rbcL* dan *matK* untuk proses identifikasi genus *Flacourtia*. Gen *matK* dan *rbcL* memiliki kelebihan yaitu mampu diaplikasikan untuk membedakan sampai tingkat spesies (Barthet, 2006).

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini memiliki tujuan untuk mengidentifikasi *Flacourtia* sp. koleksi Kebun Raya Bogor menggunakan pendekatan

molekuler *DNA Barcode rbcL* dan *matK* agar dapat diketahui hingga tingkat spesies.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana karakteristik sekuen DNA pada gen *rbcL* dari *Flacourtia* sp.?
2. Bagaimana karakteristik sekuen DNA pada gen *matK* dari *Flacourtia* sp.?
3. Bagaimana hasil identifikasi *Flacourtia* sp. menggunakan gen *rbcL* dan *matK*?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui karakteristik sekuen DNA pada gen *rbcL* dari *Flacourtia* sp.
2. Mengetahui karakteristik sekuen DNA pada gen *matK* dari *Flacourtia* sp.
3. Mengetahui hasil identifikasi *Flacourtia* sp. menggunakan gen *rbcL* dan *matK*

D. Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini antara lain;

1. Manfaat teoritis

- Menambahkan referensi dan wawasan mengenai *Flacourtia* sp. dan sekuen *matK*, *rbcL*
- Menambahkan informasi mengenai klasifikasi dari *Flacourtia* sp. menggunakan sekuen *matK* dan *rbcL*
- Menambahkan data molekuler di *GenBank* (NCBI)
- Sebagai referensi untuk penelitian lanjutan

2. Manfaat Praktis

- Memperoleh informasi mengenai morfologi genus *Flacourtia* dan *DNA Barcoding* sekuen *rbcL* dan *matK*
- Menambah skill lapangan dan laboratorium
- Salah satu bentuk upaya konservasi tumbuhan
- Menyadarkan masyarakat mengenai pelestarian tumbuhan

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. *Flacourtia* sp.

Flacourtia merupakan salah satu tumbuhan yang masuk dalam famili Salicaceae. Genus dalam *Flacourtia* terdiri atas 15 jenis, yang merupakan endemik dari Asia dan Afrika tropis maupun subtropis. Nama *Flacourtia* sendiri diberikan untuk tumbuhan ini untuk menghormati dan mengenang Gubernur Madagaskar yaitu *Etienne de Flacourt* (Sasi *et al.*, 2018). Gambar *Flacourtia* sp. ditunjukkan pada Gambar 2.1 dibawah ini;



Gambar 2.1 A. Daun muda *Flacourtia*,
B. Bunga *Flacourtia* (Sumber: POWO, 2019)

Adapun klasifikasi dari *Flacourtia* sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Violales
Famili : Salicaceae
Genus : *Flacourtia*

(Plantamor, 2019)

Flacourtia merupakan tumbuhan perdu yang memiliki ciri morfologi cabangnya umumnya berduri, daun *petiolate*, sebagian besar berbentuk *crenate*, bunga terdiri dari sepal sebanyak 4-7, sedikit menyatu dibagian pangkal, bunga jantan memiliki cakram ekstrastaminal, memiliki benang sari kurang lebih 15, ovariumnya belum sempurna, bunga betina dengan cakram yang *crenulata*, memiliki bakal biji 2 perlokulus, bersifat persisten, bunga berbentuk *dioecious*, buahnya berdaging dengan 4-16 biji yang biasanya berpasangan satu dengan yang lain. Bijinya berbentuk bulat telur, kotiledonnya berbentuk bulat (POWO, 2019).

Flacourtia merupakan tumbuhan yang berasal dari Angola, Aldabra, Bangladesh, Benin, Kalimantan, Botswana, Assam, Burkina Faso, Kamboja, Kamerun, Provinsi Cape, Pulau Nicobar, Kepulauan Caroline, Republik Afrika Tengah, Zambia, China Selatan-Tengah, Cina Tenggara, Komoro, Kongo, Himalaya Timur, Fiji, Gabon, Uganda, Ghana, Nugini, Guinea-Bissau, Burundi, Kepulauan Bismarck, Hainan, India, Gabon, Pantai Gading, Jawa, Sulawesi, Sumatera, Kenya, KwaZulu, Kepulauan Laccadive, Laos, Togo, Kepulauan Sunda kecil, Madagaskar, Sudan, Etiopia, Malawi, Thailand, Malaya, Mali, Maluku, Mozambik, Myanmar, Namibia, Nepal, Tanzania, Papua nugini, Niue, Pakistan, Filipina, Rwanda, Samoa, Senegal, Sierra Leone, Pulau Solomon, Somalia, Sri Lanka, Tonga, Vietnam, Zimbabwe. Dan dikenalkan pada wilayah Bahamas, Republika Dominika, Hawaii, Jamaikan, Mauritius, Kaledonia Baru, Puerto Rico, Queensland, Taiwan, Venezuela (POWO, 2019).

Kandungan dalam buah *Flacourtia* sangat banyak, seperti pada Rukam manis (*Flacourtia jangomas*) yang mengandung senyawa fitokimia seperti *alkaloid*, *glikosida*, *steroid*, dan *flavonoid*, sehingga dapat digunakan sebagai tanaman obat, namun jenis ini

masih kurang dimanfaatkan. Bahkan, karena nilai ekonominya yang rendah, pohon rukam manis ini sering ditebang oleh masyarakat dan diganti dengan tanaman lain yang bernilai ekonomi lebih tinggi (Talukder *et al.*, 2012). Buah tome-tome (*Flacourtia inermis*) juga memiliki khasiat yang luar biasa. Kandungan air pada buah tome-tome merah sebesar 82,55%. Kandungan lemak sebesar 5,6% dan kandungan vitamin C sebesar 148 mg/100 gram. Hal ini menunjukkan bahwa buah tersebut memiliki potensi penting sebagai sumber vitamin C. Karena kandungan aktifnya berupa vitamin C tersebut, sehingga buah ini dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan (Salmiyah *et al.*, 2017).

B. Isolasi DNA

Ekstraksi DNA merupakan salah satu teknik untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel yang dilakukan melalui proses penghancuran dinding sel, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa serta penghilangan protein dan RNA, serta presipitasi DNA. Tujuan dari ekstraksi DNA yaitu untuk memisahkan DNA dari materi lain seperti protein, RNA, dan lemak (Dewi, 2020). Lisis sel cenderung merusak dinding dan membran sel tumbuhan sehingga memungkinkan

bagian dalam sel keluar (Holme dan Peck, 1998). Langkah selanjutnya adalah memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lipid dan polisakarida (Muladno, 2010). Tahap terakhir yaitu pemurnian DNA. tahapan ini memiliki tujuan agar residu dapat hilang sehingga diperoleh DNA yang murni.

Terdapat tiga tahapan penting dalam ekstraksi DNA, antara lain; lisis sel, pemisahan DNA dari zat padat seperti protein dan purifikasi DNA. dengan ketiga tahapan tersebut, DNA dapat dipisahkan dari komponen sel lainnya seperti RNA, lemak dan protein (Langga *et al.*, 2012).

Metode konvensional dalam ekstraksi DNA seperti penggunaan *phenolchloroform* untuk ekstraksi, dirasa kurang efisien karena dibutuhkan waktu pengerjaan yang lebih lama (± 18 jam) serta dibutuhkan penambahan bahan-bahan kimia yang banyak (Sambrook *et al.*, 1989). Seiring dengan teknologi yang mengalami perkembangan, proses isolasi DNA juga telah dikembangkan dan dimodifikasi agar lebih efektif. Salah satu bentuk modifikasi ekstraksi DNA adalah waktu proses pengerjaan yang lebih singkat (± 2 jam) karena penggunaan *kit* yang sudah berisi campuran bahan untuk ekstraksi (Rosy *et al.*, 2018).

C. Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik biologi molekuler yang digunakan untuk mereplikasi DNA dengan bantuan enzim *Taq Polymerase*. Komponen utama yang diperlukan dalam PCR adalah 1.) DNA *template*, yaitu fragmen DNA yang kemudian direplikasi, 2.) *Deoksiribonukleotida trifosfat* (dNTP), yang terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 3.) *Oligonukleotida primer*, yaitu urutan *oligonukleotida* pendek (15-20 basa nukleotida) yang digunakan untuk inisiasi sintesis rantai DNA, 4.) Enzim DNA *polymerase*, yaitu enzim yang memfasilitasi sintesis yang dikatalis oleh rantai DNA, serta komponen lain yaitu senyawa *buffer* (Triwibowo, 2006).

Terdapat tiga tahapan penting dalam PCR, antara lain *denaturasi*, *annealing* dan *ekstensi*. *Denaturasi* adalah proses dimana untai ganda DNA dipisahkan menjadi untai tunggal karena suhu yang terlalu tinggi. Proses *pra-denaturasi* dilakukan pada suhu 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan tahap denaturasi selama 1 menit menggunakan suhu 94°C. Kemudian fase dilanjutkan dengan *annealing*. *Annealing* adalah langkah dimana primer melekat pada cetakan DNA. Dibutuhkan suhu yang optimum agar primer dapat

menempel pada DNA *template*. Pada tahap *annealing* dibutuhkan suhu 35°C selama 3 menit. Kemudian dilanjutkan dengan *ekstensi*, yaitu proses pemanjangan primer yang menempel pada DNA *template*, dibutuhkan suhu 72°C selama 2 menit. Tahapan *denaturasi*, *annealing*, dan *ekstensi* biasanya dilakukan sebanyak 35 siklus. Sedangkan pada saat *post-ekstensi* dibutuhkan suhu 72°C selama 7 menit. Salah satu keberhasilan amplifikasi DNA ini didasarkan pada optimasi pada saat melakukan PCR (Watson *et al.*, 1992).

Optimasi PCR dibutuhkan untuk memperoleh karakter yang diinginkan. Suhu yang optimum sangat menentukan keberhasilan pada tahap *annealing*, hal ini dikarenakan proses pelekatan primer pada untai DNA yang telah terbuka dibutuhkan suhu yang optimal. Apabila suhu terlalu tinggi, maka tidak akan terjadi penempelan primer sehingga proses amplifikasi dikatakan gagal. Apabila suhu terlalu rendah, primer akan menempel pada sisi lain genom sehingga spesifitas DNA yang dihasilkan akan rendah (Rybicky, 1996).

D. Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik pemisahan yang menggunakan medan listrik elektroda untuk memisahkan senyawa yang bermuatan berupa *kation* dan *anion*. Media pemisahan yang dibutuhkan berupa fase diam, yaitu gel agarosa yang dicampur dengan larutan *buffer* untuk menjaga keasaman sampel selama proses pemisahan. Hasil dari teknik elektroforesis yaitu rekam jejak berupa pita-pita pemisahan senyawa. Komponen yang dibutuhkan antara lain larutan elektrolit (fase gerak) dan media pemisah (fase diam). Larutan elektrolit berfungsi untuk memisahkan komponen, umumnya berupa larutan *buffer* yang nilai pHnya disesuaikan dengan sifat senyawa yang akan dipisahkan. Sedangkan media pemisah dapat berupa gel poliakrilamid, gel agarosa, gel kanji. Komponen penting seperti elektroda dan baterai juga dibutuhkan. Elektroda bertindak sebagai penghubung arus listrik dengan media pemisah sedangkan, baterai atau arus listrik sebagai sumber energi pada rangkaian perangkat (Ridwan, 2018).

E. DNA Barcoding

DNA Barcoding adalah metode untuk mengidentifikasi spesies tanpa karakteristik morfologi dengan cepat dan akurat (Hebert *et al.*, 2003). *DNA Barcoding* menggunakan nukleotida berbeda yang terletak dilokus gen tertentu yang dapat dengan mudah digandakan dan dibedakan dari spesies lain dengan menentukan perbedaan antara makhluk hidup (Maloukh *et al.*, 2017). *DNA Barcoding* juga dapat digunakan untuk mengklasifikasikan makhluk hidup yang fungsinya sama seperti pada IPC (*Universal Product Code*) yang terdapat pada suatu produk dalam supermarket (Blaster, 2003).

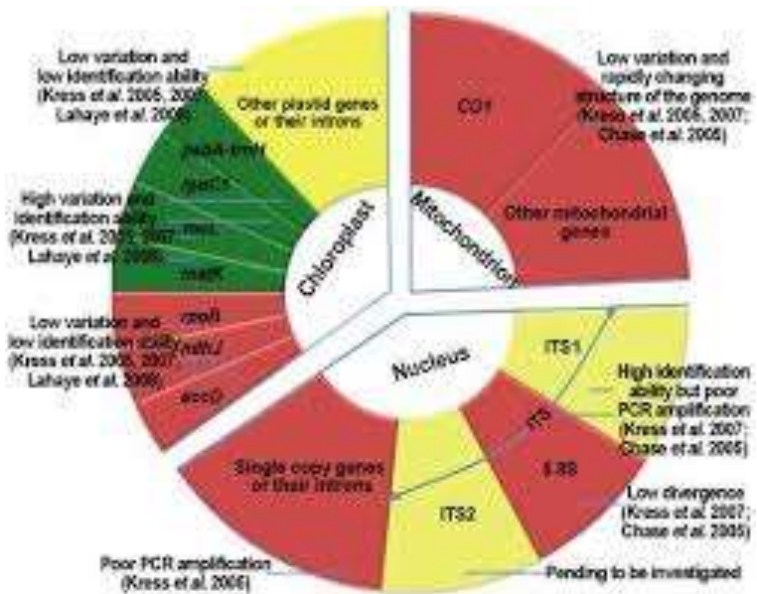
DNA Barcoding dikenalkan pertama kali pada kalangan ilmuwan oleh Hebert dari *Guelph University*, di Kanada. Ia kemudian mempresentasikan jurnal mereka yang memiliki judul "*Biological Identification Through DNA Barcodes*" dengan menggunakan gen *CO1* (*Cythromoe C Oxidase 1*) sebagai alat bantu untuk taksonomi. Paul Hebert dan timnya menggunakan invertebrata dari kelas *Lepidoptera* sebagai sampel yang akan diidentifikasi kemudian membuat inventaris *barcode* molekuler.

DNA Barcoding banyak digunakan dalam bidang biologi seperti ekologi, biomedis, epidemiologi, evolusi, konservasi, dan bioindustri. *DNA Barcoding* telah lama menjadi alat yang dikenal untuk mengidentifikasi makhluk hidup secara akurat bahkan Ketika kondisi fisik spesies tidak sempurna, mengidentifikasi spesies yang tidak diketahui (Lin *et al.*, 2011), mengetahui kualitas air, mengidentifikasi serbuk sari yang dikumpulkan dari penyerbuk, melakukan monitoring terhadap penjualan hewan dan tumbuhan langka serta dilindungi, mengetahui spesies tanaman obat, serta memeriksa produk kesehatan herbal (Lo dan Shaw, 2018).

DNA Barcode dapat dikatakan ideal apabila memiliki sekuens pendek dengan panjang berkisar antara 400-800 bp yang telah terstandarisasi secara internasional guna mengidentifikasi seluruh organisme hidup (Sawolaimen *et al.*, 2005). Selain itu, lokus gen yang digunakan harus menunjukkan tingkat kesamaan yang tinggi antara individu dari spesies yang sama, tetapi berbeda dalam setiap spesies. Daerah gen yang digunakan harus memiliki informasi filogenetik yang cukup untuk menempatkan spesies yang tidak diketahui dalam kelompok taksonomi yang sesuai.

Selain itu, wilayah gen harus sangat kuat dan dapat dengan mudah digandakan dan sekuensing dengan mudah (Valentini *et al.*, 2008).

DNA Barcode memiliki urutan DNA *ortologis*, memiliki keragaman yang cukup untuk membedakan spesies, dan dapat menjelaskan rendahnya keragaman individu yang termasuk dalam spesies yang sama. *DNA Barcode* dapat diperoleh dari kloroplas (cpDNA), nukleus (nDNA), serta mitokondria (mtDNA). Sekuen DNA tersebut memiliki ciri yang berbeda dan spesifik. *DNA Barcode* yang berasal dari inti dapat dibedakan menjadi *ITS*, 18S, 26S, sedangkan *DNA Barcode* yang berasal dari kloroplas meliputi *rbcL*, *ndhF*, *atpB*, *matK*, *rpl16* (Kres *et al.*, 2007). Gambar skema *DNA Barcode* ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Region *barcode* pada kingdom Plantae (Chen *et al.*, 2010)

F. Gen *rbcl*

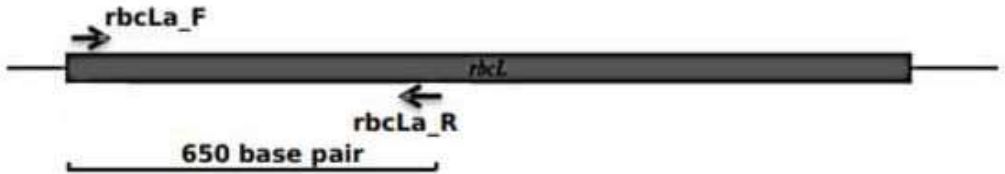
Sumber utama barcode DNA pada tanaman adalah plastida, karena substitusi nukleotidanya relatif rendah pada mitokondria tanaman (Maia *et al.*, 2012). Gen *rbcl* (*Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase large*) atau yang sering disebut sebagai gen RuBisCO dan gen *matK* (*maturase K*) telah ditetapkan oleh *3rd World DNA Barcode* sebagai sekuen utama dalam *DNA Barcoding* pada tumbuhan. Gen *rbcl* digunakan untuk mengidentifikasi tanaman darat

karena mempunyai tingkat universalitas yang tinggi dan mudah diamplifikasi (Newmaster *et al.*, 2006). Kelebihan dari gen *rbcL* yaitu memiliki tingkat keberhasilan yang tinggi untuk sekuensing dua arah menggunakan primer *reverse* dan *forward* sehingga disebut sebagai lokus terstandarisasi (Basith, 2015).

Pierce (2002) menjelaskan bahwa *Ribulose-1-5-Biphosphate Carboxylase-oxygenase* (RuBisCO) adalah protein kunci yang dikode oleh cpDNA, yang memiliki peran dalam proses fiksasi karbon selama fotosintesis berlangsung. Pada tanaman hijau, *sekitar* 50% protein dibuat oleh RuBisCO. RuBisCo diduga protein yang memiliki jumlah paling banyak di dunia. Protein kompleks RuBisCO terdiri dari delapan protein identic dengan subunit besar dan subunit kecil. cpDNA dikodekan oleh subunit kecil, sedangkan DNA nukleus dikode oleh protein subunit kecil.

Gen *rbcL* memiliki panjang berkisar antara 1400 bp sehingga menyediakan karakter yang banyak untuk bahan kajian filogenetik (CBOL, 2009). Diduga bahwa RuBisCO yang mengkode gen *rbcL* menyebabkan sekuen gen *rbcL* memiliki tingkat mutasi yang rendah dibandingkan dengan *barcode* lainnya, sehingga gen *rbcL* memiliki tingkat kemiripan yang sangat tinggi.

Tingkat mutasi yang rendah ini memberikan keuntungan untuk studi mendalam tentang variasi genetik dan filogenetik interspesies (Cumming *et al.*, 2003). Skema gen *rbcL* ditunjukkan pada Gambar 2.3.



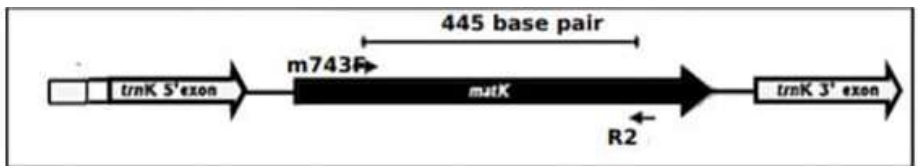
Gambar 2.3 Diagram sekuen *rbcL* (Dong *et al.*, 2013 dan Khew dan Chia, 2011)

G. Gen *matK*

Gen *matK* (*maturase K*) memiliki karakteristik panjang sekuennya sekitar 1500 bp. Gen *matK* terletak pada intron gen kloroplas *trnL*. Gen *matK* digunakan secara efektif untuk mempelajari dan membangun hubungan filogenetik baik secara intraspesifik maupun interspesifik diantara tumbuhan berbunga bahkan seluruh angiospermae. Karena gen *matK* memiliki lebih banyak substitusi nukleotida, dibandingkan dengan gen lain, mutasi, insersi dan delesi, telah diadopsi secara luas sebagai dasar sistematika angiospermae (Suositi dan Widodo, 2010).

Gen *matK* memiliki keunggulan berupa ukuran gen yang ideal, laju substitusi yang tinggi, serta variasi

kadar asam nukleat yang luas untuk digunakan dalam proses identifikasi tanaman pada tingkat famili hingga spesies (Selvaraj *et al.*, 2008). Penelitian terkait proses identifikasi tumbuhan dari gen *matK* hingga ke tingkat spesies telah dilakukan juga dengan spesies anggrek langka yaitu, pada genus *Paphiopedilum*. Berdasarkan penelitian tersebut, selain untuk proses identifikasi, gen *matK* juga dapat digunakan untuk analisis kekerabatan intarspesies jeni-jenis hibrid dari *Paphiopedilum* (Kumar *et al.*, 2016). Proses identifikasi spesies menggunakan gen *matK* menunjukkan hasil amplifikasi yang tinggi yaitu sebesar 85% dan sekuensing sebesar 69% sehingga sangat direkomendasikan untuk penggunaan proses amplifikasi beragam jenis tanaman (Kress *et al.*, 2009). Skema gen *matK* ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Diagram sekuen *matK* (Batisia *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2016)

H. Sekuensing DNA

DNA sekuensing merupakan metode analitik yang difungsikan untuk membaca informasi genetic dari sekuens DNA (Rosenberg, 2017). DNA sekuensing pertama kali dikembangkan oleh *Frederick Sanger* beserta timnya. Pada waktu mereka membuat metode *sekuens dideoxy* yang mendasarkan pada pola perpanjangan untai DNA oleh enzim DNA polimerase. Kemudian dikembangkan lagi oleh *Maxam* dan *Gilbert* dengan melakukan pendegradasian fragmen DNA secara kimiawi (Pierce, 2016). Pada akhirnya, model sekuensing DNA Sanger yang banyak digunakan karena memiliki beberapa kelebihan seperti lebih mudah dalam pengaplikasiannya serta teknisnya lebih cepat (Graham dan Hill, 2001).

Sekuensing DNA model Sanger didasarkan pada proses replikasi. Metode ini menggunakan substrat khusus untuk melakukan sintesis DNA. DNA biasanya disintesis dari *deoxyribonucleotide triphosphate* (dNTPs), namun pada metode ini, DNA disintesis menggunakan *dideoxyribonucleoside triphosphate* (ddNTP) (Pierce, 2016). Diperlukan beberapa komponen seperti DNA template, primer, campuran ddNTP yang terdiri atas ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP

dan enzim polimerase pada metode *Sanger* ini (Graham dan Hill, 2001).

Metode sekuensing *Sanger* juga biasa dikenal sebagai *Cycle Sequencing* dikarenakan reaksi yang ditimbulkan dengan metode siklus pada *thermocycler*. Sampel yang telah tercampur dengan komponen lain akan dimasukkan ke dalam *thermocycler* guna pemanasan campuran pada suhu 90°C, sehingga akan terjadi peristiwa denaturasi. Kemudian, suhu diturunkan agar primer menempel pada DNA *template*. Suhu kemudian disesuaikan untuk proses sintesis replikasi DNA oleh DNA polimerase sama ddNTP saling bergabung (Clark, 2019). Hasil akhir dari reaksi adalah banyak potongan DNA dengan Panjang untai yang berbeda. Untai DNA yang dihasilkan sesuai dengan campuran ddNTP, Ketika dNTP dicampur dengan ddATP, DNA diakhiri dengan nukleotida A. Ketika dNTP dicampur dengan ddNTP, DNA diakhiri dengan nukleotida T (Dewi, 2012).

I. Pemanfaatan Tumbuhan dalam Al-Qur'an

Allah SWT telah berfirman dalam Q. S. Abasa ayat 24-32 yaitu;

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ (٦٤) أَنَا صَبَبْنَا الْمَاءَ صَبًّا (٢٥) ثُمَّ شَقَقْنَا الْأَرْضَ شَقًّا (٢٦)
 فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا (٢٧) وَعِنَبًا وَقَضْبًا (٢٨) وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا (٢٩) وَحَدَائِقَ غُلْبًا (٣٠)
 وَفُجَّهًا وَأَبًّا (٣١) مَتَاعًا لَكُمْ وَلِأَنْعَمَكُمُ (٣٢)

Artinya: “24. Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya, 25. Sesungguhnya Kami benar-benar telah mencurahkan air (dari langit), 26. Kemudian Kami belah bumi dengan sebaik-baiknya, 27. Lalu Kami tumbuhkan biji-bijian di bumi itu, 28. Anggur dan sayur-sayuran, 29. Zaitun dan kurma, 30. Kebun-kebun (yang) lebat, 31. dan buah-buahan serta rumput-rumputan, 32. Untuk kesenanganmu dan untuk binatang-binatang ternakmu” (QS. Abasa [80]: 24-32).

Berdasarkan terjemahan ayat tersebut, perlu diketahui bahwa Allah SWT telah memerintahkan kita sebagai umat manusia untuk senantiasa memperhatikan apa yang kita makan dan minum. Salah satu sumber makanan yang Allah berikan yaitu berasal dari tumbuhan, dimana dari dalam tanah tersebut Allah telah menurunkan hujan sehingga tanaman tersebut dapat tumbuh dengan subur sehingga memberikan manfaat bagi umat manusia. Dari tumbuhan tersebut muncullah biji-bijian, bibit, buah yang memberikan kegembiraan bagi umat manusia. Seperti halnya, *Flacourtia* atau kerukup yang memiliki

banyak manfaat seperti kaya akan vitamin, mampu menurunkan berat badan, baik kesehatan untuk tulang, sehingga tanaman ini dapat dijadikan sebagai tanaman obat yang berguna untuk masyarakat umum.

J. Kajian yang Relevan

Penelitian terkait dengan identifikasi *Flacourtia* sp. menggunakan sekuen *rbcL* dan *matK* dilakukan oleh Akilabindu pada tahun 2019 dengan judul studi “*Genomic Analysis of Chloroplast matK and rbcL Gene From Flacourtia ineris Roxb. For Plant DNA Barcoding*”. Dari penelitian tersebut menjelaskan bahwa *Flacourtia inermis* Roxb. menunjukkan nilai hubungan kekerabatan 99,20% dengan *Flacourtia jangomas* menggunakan sekuen *matK*. Sedangkan, *Flacourtia inermis* Roxb. menunjukkan nilai hubungan kekerabatan 100% dengan *Flacourtia jangomas* menggunakan sekuen *rbcL*. Dari studi ini, Akilabindu merekomendasikan penggunaan sekuen *rbcL* dan *matK* untuk melakukan proses identifikasi genus *Flacourtia*.

Penelitian dari Sitti Salmiyah dan A. Bahruddin pada tahun 2018 mengenai “Fitokimia dan Antioksidan pada Buah Tome-Tome (*Flacourtia inermis*)”.

Berdasarkan penelitian ini, diketahui bahwa buah tome-tome memiliki kandungan vitamin C yang cukup tinggi, hal ini mengindikasikan adanya aktivitas antioksidan pada buah tome-tome. Selain itu, berdasarkan pengujian aktivitas antioksidan, dengan kandungan senyawa metabolit tersebut, buah tome-tome memiliki aktivitas antioksidan yang cukup baik dengan nilai IC50 10,94 ppm.

Penelitian dari Cicik Suriani *et al.* pada tahun 2021 dengan judul studi “*DNA Barcoding of Andaliman (Zanthoxylum acanthopodium DC) from North Sumatra Province of Indonesia Using maturase K Gene*”. Dari penelitian ini, hasil konstruksi pohon filogenetik menunjukkan adanya pengelompokan aksesi antara spesies *Z. acanthopodium* terpisah dari spesies lain dari genus *Zanthoxylum* serta famili *Rutaceae*. Hasilnya menunjukkan bahwa region *matK* dapat digunakan secara efektif untuk mengidentifikasi dari tingkat familis sampai ke tingkat spesies.

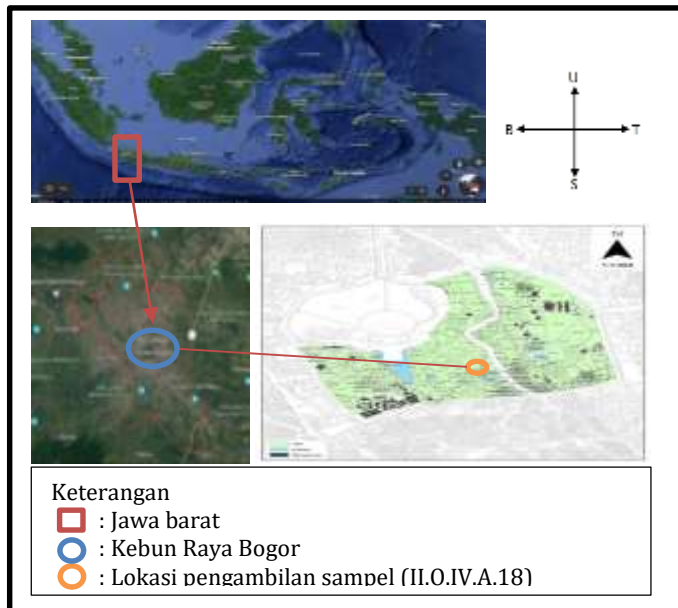
Keterbaruan dari penelitian ini, yaitu referensi atau informasi mengenai spesies yang dianalisis masih sangat minim, sehingga nantinya sangat membantu penambahan informasi mengenai genus *Flacourtia*. Selain itu, penggunaan sekuen *rbcL* dan *matK* untuk

mengidentifikasi genus *Flacourtia* sampai ke tingkat jenis belum pernah dilakukan oleh penelitian terdahulu.

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2022- Maret 2023 di Laboratorium Treub, Pusat Riset Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya-BRIN, yang terletak di Jln. Ir. H. Juanda No. 13. Paedang, Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor, Jawa Barat. Serta dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang.



Gambar 3.1 Peta lokasi pengambilan sampel

B. Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain: *microtube* ukuran 1,5 mL, rak tube, tip (warna biru, kuning, dan putih), mikropipet [biru (100-1000 μ l), kuning (10-100 μ l), putih (0,5-2 μ l), abu-abu (1-10 μ l)], Vortex (*VWR-Digital Vortex Mixer*), Heatblock (*VWR-Digital Heatblock*), centrifuge (*Gyrozen Mini*), PCR-Thermal Cycler TaKaRa, Elektroforesis-Mupid dan Nyxtechnik, Microwave SHARP, Gel Doc (*BIO-RAD EZ Imager*), spindown (*EMS-myfuge*), spin column, mortar dan *pastle*, gel tray (cetakan elektroforesis), UV tray, pipet serologi, *bulb pipet*, kulkas atau lemari pendingin, gelas ukur 100 mL (Pyrex), Erlenmeyer 125 mL (Pyrex), spatula, gunting, komputer, dan neraca analitik precisa-XT 220A.

Bahan yang dibutuhkan untuk proses isolasi DNA, amplifikasi dan elektroforesis tersaji dalam Tabel 3.1

Tabel 3.1 Data sampel

No.	Nama spesies	Kode sampel	Lokasi tumbuhan	Asal koleksi
1.	<i>Flacourtia</i> sp.	AR21	II.O.IV.A.18	Sulawesi Tengah

Tabel 3.2 Bahan yang digunakan

No.	Tahapan	Bahan
1.	Ekstraksi DNA	Daun <i>Flacourtia</i> sp., pasir silika, kloroform, dan Plant Genomic DNA kit (TIANGEN)
2.	Amplifikasi	DNA template <i>Flacourtia</i> sp., 2x DreamTaq Green PCR Master Mix, Sequence <i>rbcl forward</i> dan <i>reverse</i> , sequence <i>matK forward</i> dan <i>reverse</i> , ddH ₂ O
3.	Elektroforesis	Serbuk gel agarosa (Thermoscientific R0491), TAE (Thermoscientific 50X HB49), GelRed (Biotium 41003), marker (Thermoscientific SM0311 1 kb DNA ladder)

Tabel 3.3 Primer yang digunakan

No.	Primer	Sekuen nukleotida 5'-3'
1.	<i>rbcl</i> (aF) <i>forward</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC (CBOL, 2009)
2.	<i>rbcl</i> (aR) <i>reverse</i>	GTAAAATCAAGTCCACCRGC (CBOL, 2009)
3.	<i>matK</i> (FKIM F) <i>forward</i>	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC (Kim, 2010)
4.	<i>matK</i> (FKIM R) <i>reverse</i>	CGTACAGTACTTTTTGTGTTTACGAG (Kim, 2010)

C. Cara Kerja

1. Pengambilan sampel

Sampel *Flacourtia* sp. diambil dari koleksi tumbuhan di vak. II.O.IV.A.18 Kebun Raya Bogor. Bagian tanaman yang digunakan untuk ekstraksi DNA yaitu bagian daun dari *Flacourtia* sp. Daun yang dipilih yaitu tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, hal ini dikarenakan akan memudahkan dalam proses penggerusan sampel daun sehingga DNA daun bisa lebih mudah diperoleh. Setelah itu, dan dimasukkan ke dalam kantong teh, diberi label lalu disimpan dalam toples yang berisi *silica gel*.

Pengamatan ciri morfologi dilakukan dengan mengambil sebanyak tiga tangkai tumbuhan. Masing-masing tangkai diberi label yang bertuliskan kode tumbuhan, nama spesies, tanggal pengambilan sampel dan nomor koleksi tumbuhan. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam plastik bening sesuai ukuran sampel tumbuhan.

2. Pengamatan ciri morfologi *Flacourtia* sp.

Pengamatan ciri morfologi yang dilakukan pada sampel *Flacourtia* sp. menggunakan parameter bagian organ vegetatif berupa batang dan daun. Adapun ciri morfologi yang diamati bersifat data

kualitatif sesuai Tabel 3.4. Buku acuan yang dipakai untuk melakukan pengamatan morfologi yaitu “*The Kew Plant Glossary*” dari Henk Benti.

Tabel 3.4 Ciri morfologi *Flacourtia* sp.

No.	Ciri Morfologi	Sifat Ciri (<i>Flacourtia</i> sp.)
1.	Lebar daun	
2.	Tipe daun	
3.	Bangun daun	
4.	Pangkal daun	
5.	Ujung daun	
6.	Tepi daun	
7.	Tulang daun	
8.	Posisi daun	
9.	Pembagian daun	
10.	Permukaan abaksial	
11.	Warna abaksial	
12.	Permukaan adaksial	
13.	Warna adaksial	
14.	Secondary vein	
15.	Jumlah pasang secondary vein	
16.	Habitus	
17.	Permukaan batang	
18.	Warna batang	
19.	Tinggi tanaman	
20.	Bentuk petiol	
21.	Warna petiol	

3. Isolasi DNA

a. Penggerusan Sampel

Daun *Flacourtia* sp. dipotong menjadi potongan kecil. Daun dimasukkan dalam mortar dan sebanyak 1 sendok spatula pasir silika ditambahkan ke dalam mortar. Sampel digerus menggunakan *pastle* sesuai arah jarum jam. Sebanyak 0,1 g sampel yang telah halus dimasukkan ke dalam *microtube* ukuran 1,5 mL untuk dijadikan sampel dan dimasukkan ke dalam *microtube* ukuran 2 mL untuk dijadikan stok, kemudian masing-masing sampel diberikan label.

b. Ekstraksi DNA

Sampel dihaluskan dengan nitrogen cair/pasir kuarsa. Sebanyak 700 μ l *pre-heated* GP1 ditambahkan ke dalam *microtube* yang berisi sampel. Sampel divortex selama 10-20 detik. Sampel diinkubasi selama 20 menit menggunakan suhu 65°C dan dihomogenkan sesekali. Sebanyak 700 μ l kloroform dan dihomogenkan sesekali. Sampel disentrifugasi selama 5 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tube 2 mL yang baru.

Sebanyak 700 μ l *buffer GP2* ditambahkan ke dalam tube, dan dihomogenkan. Setengah dari supernatan (700 μ l) dimasukkan ke dalam *spin column*. Sampel disentrifugasi selama 30 detik. Larutan yang ada dalam *collection tube* dibuang. Sisa supernatan dimasukkan, dan disentrifugasi dan dibuang larutan yang ada dalam *collection tube*. Sebanyak 500 μ l *buffer GD* ditambahkan ke dalam tube dan disentrifugasi selama 30 detik. Larutan yang ada dalam *collection tube*nya. *Spin column* dimasukkan ke dalam *collection tube*. Sebanyak 600 μ l PW ditambahkan ke dalam *spin column* dan disentrifugasi selama 30 detik, kemudian dibuang larutan yang ada dalam *collection tube*. Sebanyak 600 μ l PW ke dalam *spin column*, disentrifugasi selama 30 detik dan dibuang larutan yang ada dalam *collection tube*. *Spin column* dimasukkan ke dalam *collection tube*, disentrifugasi selama 2 menit dan dibuang larutan yang ada dalam *collection tube*. Tutup tube dibuka, dan didiamkan dalam suhu ruang untuk mengeringkan hasilnya. Hasil yang ada dalam *spin column* dimasukkan ke dalam

microtube 1,5 mL yang baru. Sebanyak 50-200 µl *elution buffer* ditambahkan ke dalam sampel. Sampel diinkubasi selama 2-5 menit dalam suhu ruang dan disentrifugasi selama 2 menit.

4. Verifikasi hasil ekstraksi DNA menggunakan primer *rbcl*

Reagen PCR Mix yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam *microtube* ukuran 2 mL yang telah diberi sebelumnya. Reagen tersebut di *spin down* selama 5 detik. Reagen yang telah dihomogenkan kemudian diletakkan pada mesin *Thermal Cycler*. Amplifikasi menggunakan gen *rbcl* dimulai dengan *denaturasi* awal pada suhu 94°C selama 1 menit lebih 30 detik, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus, yaitu *denaturasi* selama 15 detik menggunakan suhu 94°C, *annealing* dengan suhu 52°C selama 15 detik, kemudian *ekstensi* selama 20 detik pada suhu 72°C. Kemudian dilanjutkan dengan *post-ekstensi* selama 4 menit. Amplifikasi gen *rbcl* dilakukan dengan menggunakan 2 pasangan primer. Reagen PCR Mix dapat dilihat pada Tabel 3.5.

Tabel 3.5 Reagen PCR Mix

No.	Komponen	Volume reagen (μ l)
1.	PCR PreMix (MyTaq HS Red Mix, 2x)	6 μ l
2.	ddH ₂ O	3 μ l
3.	DNA <i>template</i>	2 μ l
4.	Primer <i>rbcL</i> (<i>Forward</i> & <i>Reverse</i>)	Masing-masing 1 μ l
Jumlah Total		13 μl

5. Visualisasi DNA

Sebanyak 0,8 gram serbuk agarosa ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 125 mL. Sebanyak 80 mL TAE 1X ditambahkan ke dalam erlenmeyer. Larutan agarosa dihomogenkan. Larutan dimasukkan ke dalam *microwave* selama 1 menit lebih 30 detik, kemudian didiamkan selama 1 menit. Sebanyak Gel red 1 μ l ditambahkan kemudian dihomogenkan sebentar. Agarose dituangkan ke dalam cetakan elektroforesis yang telah diberi sisir elektroforesis. Agarosa didiamkan hingga mengeras. Gel dikeluarkan dari cetakan elektroforesis dan sisir. Gel agarosa dimasukkan ke dalam elektroforesis yang sudah diberikan TAE. Sebanyak 5 μ l reagen dari PCR, DNA *ladder* (1 kb) dimasukkan ke dalam sumuran. Elektroforesis dijalankan selama 45 menit dengan tegangan 100 Volt. Gel diangkat dan

diletakkan ke dalam UV *tray* untuk divisualisasi menggunakan *Gel-Doc tipe BIO-RAD EZ Imager*. Dalam komputer yang telah disambungkan *Gel-Doc* akan terlihat pita yang terbentuk atau visualisasi DNA.

6. Amplifikasi sekuen *rbcL*

Sampel *Flacourtia* sp. hasil ekstraksi yang telah terverifikasi adanya DNA, kemudian dilakukan perbanyakkan sampel menggunakan sekuen *rbcL* dan *matK*. Reagen PCR Mix yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam *microtube* ukuran 2 mL yang telah diberi sebelumnya. Reagen tersebut di *spin down* selama 5 detik. Reagen yang telah dihomogenkan kemudian diletakkan pada mesin *Thermal Cycler*. Amplifikasi menggunakan gen *rbcL* dimulai dengan *denaturasi* awal pada suhu 94°C selama 1 menit lebih 30 detik, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus, yaitu *denaturasi* selama 15 detik menggunakan suhu 94°C, *annealing* dengan suhu 52°C selama 15 detik, kemudian *ekstensi* selama 20 detik pada suhu 72°C. Kemudian dilanjutkan dengan *post-ekstensi* selama 4 menit. Amplifikasi gen *rbcL* dilakukan dengan

menggunakan 2 pasangan primer. Reagen PCR Mix dapat dilihat pada Tabel 3.6.

Tabel 3.6 Reagen PCR Mix untuk perbanyak sampel

No.	Komponen	Volume reagen (μ l)
1.	PCR PreMix (MyTaq HS Red Mix, 2x)	25 μ l
2.	ddH ₂ O	11 μ l
3.	DNA <i>template</i>	10 μ l
4.	Primer <i>rbcl</i> & <i>matK</i> (<i>Forward</i> & <i>Reverse</i>)	Masing-masing 2 μ l
Jumlah Total		50 μl

7. Amplifikasi sekuen *matK*

Reagen PCR Mix yang telah disiapkan kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* ukuran 0,2 mL yang telah diberi sebelumnya. Reagen tersebut di *spin down* selama 5 detik. Reagen yang telah dihomogenkan kemudian diletakkan pada mesin *Thermal Cycler*. Amplifikasi menggunakan gen *matK* dimulai dengan *denaturasi* awal pada suhu 94°C selama 1 menit lebih 30 detik, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus, yaitu *denaturasi* selama 15 detik menggunakan suhu 94°C, *annealing* dengan suhu 54°C selama 15 detik, kemudian *ekstensi* selama 20 detik pada suhu 72°C. Kemudian dilanjutkan dengan *post-ekstensi* selama

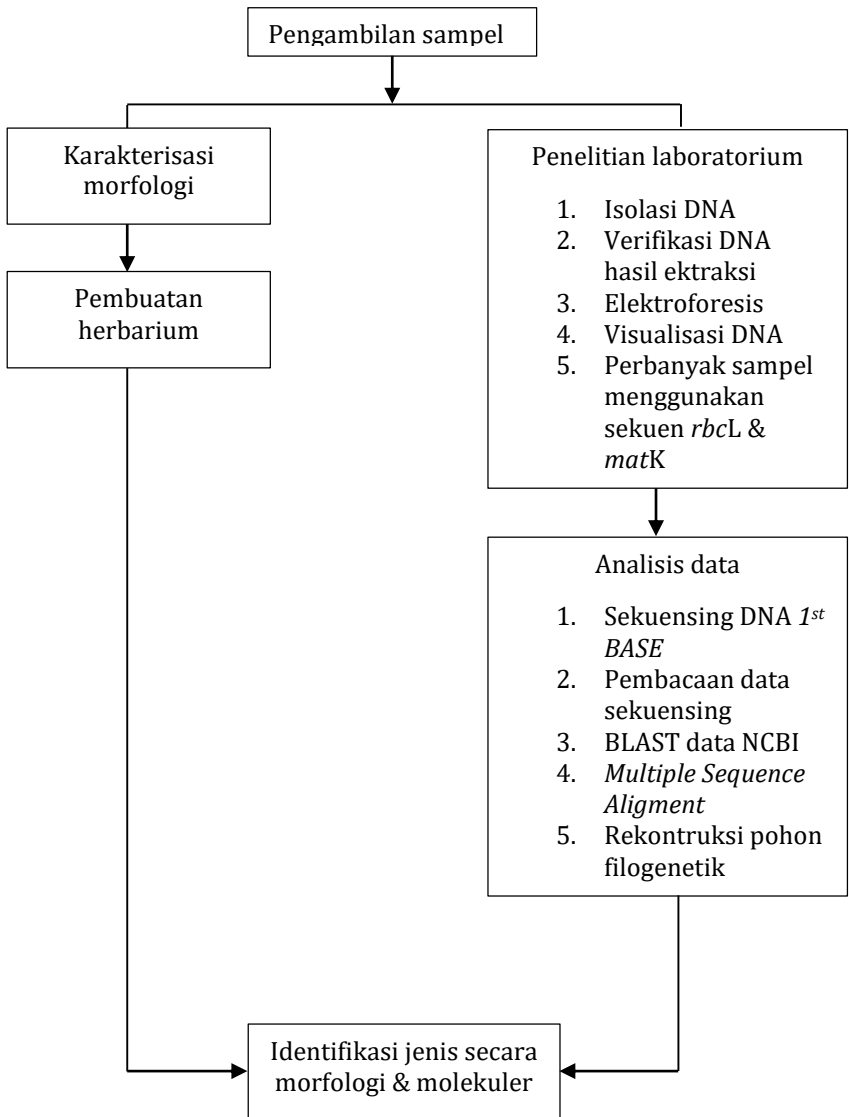
4 menit. Amplifikasi gen *rbcL* dilakukan dengan menggunakan 2 pasangan primer.

8. Analisis data

Pengerjaan DNA sekuensing dalam penelitian ini dilakukan oleh jasa Laboratorium *First Base (1st Base)* Singapura. Sekuen DNA yang telah diperoleh dalam bentuk elektroforegram berupa grafik hasil pembacaan basa nukleotida dalam format .ab1. Perbedaan basa ditunjukkan dengan perbedaan warna yang tertera mewakili setiap jenis basa. Setiap *peak* yang terbentuk kemudian diterjemahkan menjadi basa Adenin (A), Guanin (G), Sitosin (C), dan Timin (T). Langkah awal dari proses *contig* adalah dengan melakukan pemotongan (*trimming*) dari sekuens *forward* maupun *reverse*, pada bagian ujung setiap sekuens sebanyak 20 sekuens nukleotida yang memiliki kualitas *peak* yang kurang baik dan belum stabil. Setelah dipotong, sekuens DNA amplicon *rbcL* dan *matK* digabungkan sehingga dihasilkan satu buah sekuens utuh dari masing-masing sekuens *forward* dan *reverse*. Pensejajaran dilakukan menggunakan *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis X (MEGA X)* dan BioEdit versi 7.2.6.1. Hasil dianalisis

menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk mencari urutan dengan kemiripan sekuens DNA tertinggi. Tingkat kesamaannya yaitu 80-100% menunjukkan bahwa spesies yang diperoleh adalah berdekatan atau sama. Hasil pensejajaran sekuens DNA region *rbcL* dan *matK* kemudian direkonstruksi pohon filogenetik menggunakan distance methode dengan metode *Neighbor-Joining* (NJ). Analisis pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan analisis *bootstrap* sebanyak 1000x ulangan. Parameter yang digunakan untuk analisis yaitu *Jukes cantor + Gamma* (sekuen *rbcL*) dan *Tamura 3-parameter* (*matK*).

D. Alur Kerja



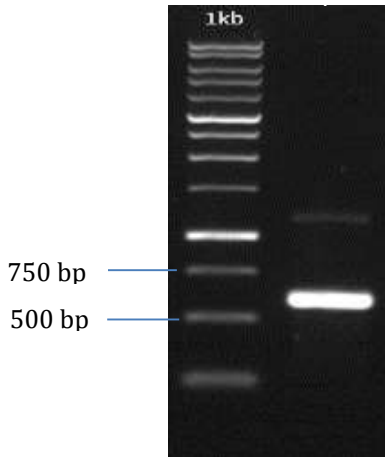
Gambar 3.2 Alur kerja penelitian

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Deskripsi Hasil Penelitian

1. Hasil Isolasi dan Amplifikasi DNA *Flacourtia* sp.

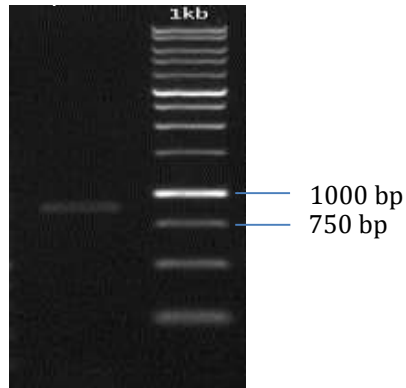
Isolasi DNA *Flacourtia* sp. koleksi Kebun Raya Bogor dengan nomor koleksi II.O.IV.A.18 dilakukan menggunakan protokol Plant Genomic DNA Kit (Tiangen). Amplifikasi sampel *Flacourtia* sp. menggunakan sekuen *rbcL* berhasil dilakukan, ditunjukkan dengan adanya pita DNA pada hasil visualisasi (Gambar 4.1). Rentang DNA hasil visualisasi sudah sesuai target, yaitu 560 bp.



Gambar 4.1 Visualisasi DNA sampel *Flacourtia* sp. menggunakan sekuen *rbcL*; M: Ladder 1kb

Amplifikasi sampel *Flacourtia* sp. menggunakan sekuen *matK* berhasil dilakukan, ditunjukkan dengan adanya pita DNA

pada hasil visualisasi (Gambar 4.2). Rentang DNA hasil visualisasi sudah sesuai target, yaitu ± 800 bp. Hasil visualisasi produk PCR sampel *Flacourtia* sp. menggunakan sekuen *rbcl* dan *matK* memperlihatkan pita DNA yang cukup tebal.



Gambar 4.2 Visualisasi DNA sampel *Flacourtia* sp. menggunakan sekuen *matK*; M: Ladder 1kb

2. Hasil analisis sekuensing

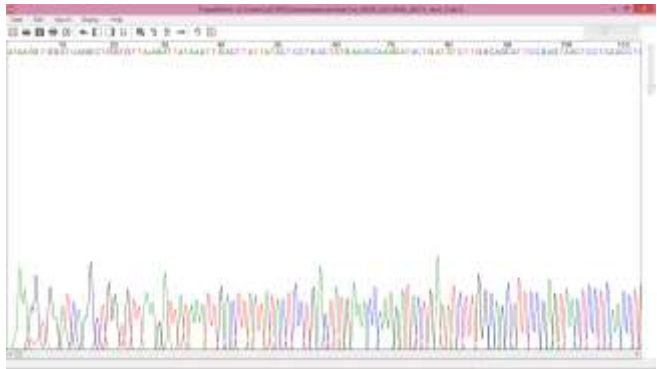
2.1 Region *rbcl*

2.1.1 Elektroforegram sekuen *Flacourtia* sp.

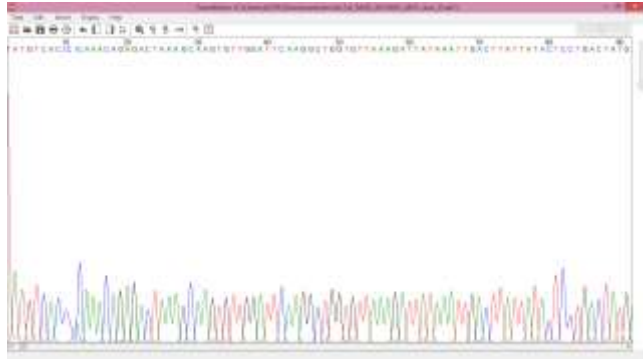
Hasil sekuensing sampel *Flacourtia* sp. didapatkan dalam bentuk file dengan format .ab1 yang terdiri dari 2 pembacaan arah primer *forward* dan *reverse* secara terpisah. Data dari file tersebut berupa grafik elektroforegram. Warna garis pada elektroforegram disesuaikan dengan jenis

nukleotida seperti warna merah (T), warna biru (C), warna hijau (A), dan warna hitam (G).

Elektroforegram pada sampel *Flacourtia* sp. menggunakan region *rbcL* dikatakan bagus karena memiliki puncak yang cukup tinggi dan tidak saling tumpang tindih. Setiap sekuen memiliki panjang yang beragam. Sekuen *forward* pada sampel *Flacourtia* sp. menggunakan region *rbcL* memiliki panjang 575 bp. Sedangkan, sekuen *reverse* memiliki panjang 573 bp. Gambar elektroforegram region *rbcL* dapat dilihat pada gambar 4.3 dan 4.4.



Gambar 4.3 Elektroforegram sampel *Flacourtia* sp. menggunakan region *rbcL* (*forward*), Ket. Warna Merah (T), Biru (C), Hijau (A), Hitam (G)



Gambar 4.4 Elektroforegram sampel *Flacourtia* sp. menggunakan region *rbcL* (*reverse*), Ket. Warna Merah (T), Biru (C), Hijau (A), Hitam (G)

2.1.2 Homologi species dengan analisis BLAST

Hasil BLAST menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. memiliki kemiripan dengan 18 genus dari famili Salicaceae. Genus tersebut diantaranya; *Scolopia*, *Dovyalis*, *Xylosma*, *Homalium*, *Flacourtia*, *Trimeria*, *Oncoba*, *Azara*, *Ludia*, *Pleuranthodendron*, *Chrysobalanus*, *Banara*, *Bennettiodendron*, *Olmediella*, *Polionthyrasis*, *Abatia*, *Tisonia*, *Carrierra*.

Sebanyak 19 sekuen hasil BLASTn dipilih dari total 100 sekuen yang muncul. Hasil BLASTn diambil berdasarkan pada persentase *Percent identity*, nilai *E-Value*, dan *Query Cover*. Hasil BLAST *Flacourtia* sp. menggunakan sekuen *rbcL* terpilih disajikan pada Tabel 4.1 (hal. 47).

Dari hasil BLASTn, diketahui bahwa genus yang memiliki kemiripan tertinggi dengan sampel *Flacourtia* sp. yaitu genus *Scolopia*. Hal ini dikarenakan genus *Scolopia* memiliki nilai *Percent Identity* tertinggi yaitu 99,47%, nilai *E-Value* 0.0, dan persentase *Query Cover* 97-100%.

Tabel 4.1 Hasil BLAST sekuen *rbcl* yang diambil

No.	Nama spesies	Query Cover	E-value	Percent Identity	Accession Number
1.	<i>Scolopia saeva</i>	100%	0.0	99.47%	MN078143.1
2.	<i>Scolopia chinensis</i>	100%	0.0	99.47%	MN078144.1
3.	<i>Scolopia branuii</i>	99%	0.0	99.47%	KF496663.1
4.	<i>Scolopia oldhamii</i>	98%	0.0	99.46%	MF623368.1
5.	<i>Scolopia stolzii</i>	97%	0.0	99.64%	JX572960.1
6.	<i>Flacourtia indica</i>	99%	0.0	99.11%	AB2333933.1
7.	<i>Flacourtia jangomas</i>	99%	0.0	99.11%	AF206768.1
8.	<i>Flacourtia indica</i>	100%	0.0	99.11%	MG262341.1
9.	<i>Flacourtia indica</i>	100%	0.0	99.11%	NC_037410.1
10.	<i>Flacourtia jangomas</i>	100%	0.0	99.11%	MK572740.1
11.	<i>Flacourtia jangomas</i>	100%	0.0	99.11%	NC_046687.1
12.	<i>Flacourtia indica</i>	100%	0.0	98.94%	MN078145.1
13.	<i>Flacourtia indica</i>	100%	0.0	98.94%	GU135218.1
14.	<i>Flacourtia indica</i>	99%	0.0	98.93%	MH549859.1
15.	<i>Flacourtia indica</i>	97%	0.0	98.91%	JF26544.1
16.	<i>Flacourtia rukam</i>	100%	0.0	99.11%	NC_045859.1
17.	<i>Flacourtia rukam</i>	100%	0.0	99.11%	MK281365.1
18.	<i>Flacourtia inermis</i>	100%	0.0	99.11%	MN078138.1
19.	<i>Homalium cochinchinensis</i>	100%	0.0	99.11%	MN078140.1

2.1.3 Komposisi Nukleotida

Produk hasil dari sekuensing dianalisis dan dibuat *contig* menggunakan aplikasi MEGA X. Sekuen kemudian dilakukan karakterisasi untuk melihat komposisi dari nukleotida sekuen yang dianalisis. Nukleotida terdiri dari beberapa basa nitrogen meliputi; adenin (A), guanin (G), timin/urasil (T/U), sitosin (C). Komposisi sekuen nukleotida *Flacourtia* sp. terdiri dari basa nitrogen dengan persentase yang berbeda-beda. Komposisi sekuen nukleotida *Flacourtia* sp. menggunakan region *rbcl* meliputi; T: 29,1%, C: 20,9%, A: 27,3%, G: 22,7%. Komposisi nukleotida *Flacourtia* sp. disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Komposisi sekuen nukleotida *Flacourtia* sp. region *rbcl*

Nama spesies	T (U)	C	A	G	Total
<i>Flacourtia</i> sp.	29,1	20,9	27,3	22,7	564
<i>Scolopia chinensis</i>	28,7	20,9	27,7	22,7	564
<i>Scolopia saeva</i>	28,7	20,9	27,7	22,7	564
<i>Scolopia braunii</i>	29,0	21,2	27,2	22,6	562
<i>Flacourtia jangomas</i>	28,7	21,1	27,3	22,9	564

Tabel 4.2 Lanjutan

Nama spesies	T(U)	C	A	G	Total
<i>Flacourtia jangomas</i>	28,7	21,1	27,3	22,9	564
<i>Flacourtia rukam</i>	28,7	21,3	27,1	22,9	564
<i>Flacourtia rukam</i>	28,7	21,3	27,1	22,9	564
<i>Flacourtia inermis</i>	28,7	21,3	27,1	22,9	564
<i>Flacourtia indica</i>	28,7	21,1	27,3	22,9	564
<i>Flacourtia indica</i>	28,9	21,1	27,3	22,9	564
<i>Scolopia stolzii</i>	29,2	20,9	27,2	22,6	552
<i>Flacourtia indica</i>	29,3	21,0	27,0	22,9	564
<i>Flacourtia indica</i>	28,9	20,9	27,3	22,8	561
<i>Flacourtia jangomas</i>	28,9	21,0	27,3	22,8	561
<i>Scolopia oldhamii</i>	29,1	20,8	27,5	22,6	553
<i>Flacourtia indica</i>	29,3	20,9	27,0	22,7	559
<i>Flacourtia indica</i>	29,1	20,8	26,6	22,8	552
<i>Homalium cochinchinense</i>	28,9	21,1	27,1	22,7	564

2.1.4 Jarak genetik

Analisis *DNA barcoding* dilanjutkan dengan penentuan nilai jarak genetik yang menunjukkan variasi antar nilai jarak genetik. Pada Tabel 4.3

menunjukkan nilai jarak genetik pada 20 sekuen yang dianalisis. Hasil perhitungan jarak genetik menggunakan sekuen *rbcL* memiliki nilai jarak genetik terjauh yaitu 0,011 (*Flacourtia indica*), sedangkan nilai jarak genetik terdekat yaitu 0,003 (*Scolopia stolzii*).

Tabel 4.3 Jarak genetik (*rbcl*)

Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>Flacourtia</i> sp.																				
<i>S. chinensis</i>	0,005																			
<i>S. saeva</i>	0,005	0,000																		
<i>S. braunii</i>	0,005	0,003	0,003																	
<i>F. jangomas</i>	0,009	0,007	0,007	0,011																
<i>F. jangomas</i>	0,009	0,007	0,007	0,011	0,000															
<i>F. rukam</i>	0,009	0,007	0,007	0,011	0,003	0,003														
<i>F. rukam</i>	0,009	0,007	0,007	0,011	0,003	0,003	0,000													
<i>F. inermis</i>	0,009	0,007	0,007	0,011	0,003	0,003	0,000	0,000												
<i>F. indica</i>	0,009	0,007	0,007	0,011	0,000	0,000	0,003	0,003	0,003											
<i>F. indica</i>	0,009	0,007	0,007	0,011	0,000	0,000	0,003	0,003	0,003	0,000										
<i>F. indica</i>	0,011	0,009	0,009	0,012	0,001	0,001	0,005	0,005	0,005	0,001	0,001									
<i>S. stolzii</i>	0,003	0,001	0,001	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007								
<i>F. indica</i>	0,011	0,012	0,012	0,012	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,011							
<i>F. indica</i>	0,009	0,007	0,007	0,011	0,000	0,000	0,003	0,003	0,003	0,000	0,000	0,001	0,005	0,005						
<i>F. jangomas</i>	0,009	0,007	0,007	0,011	0,000	0,000	0,003	0,003	0,003	0,000	0,000	0,001	0,005	0,005	0,000					

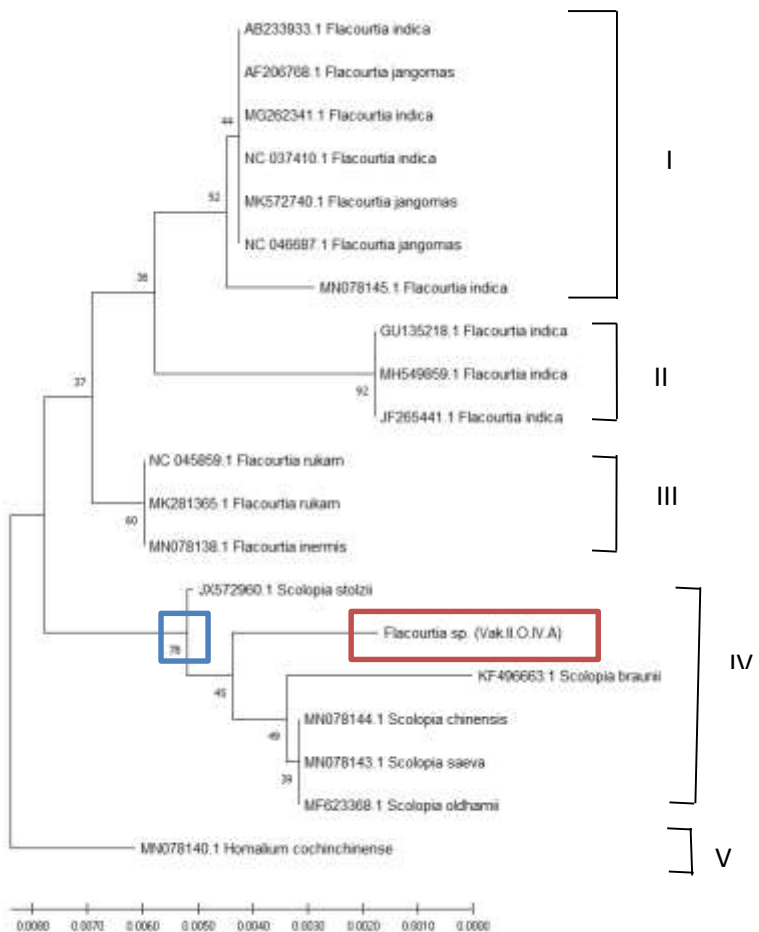
Tabel 4.3 Lanjutan

Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>S. oldhamii</i>	0,005	0,000	0,000	0,003	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,009	0,001	0,012	0,007	0,007				
<i>F. indica</i>	0,011	0,012	0,012	0,012	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,011	0,000	0,005	0,005	0,012			
<i>F. indica</i> <i>H.</i> <i>cochinchinense</i>	0,011	0,012	0,012	0,012	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,011	0,000	0,005	0,005	0,012	0,000		
	0,009	0,007	0,007	0,011	0,007	0,007	0,003	0,003	0,003	0,007	0,007	0,005	0,005	0,009	0,007	0,007	0,007	0,009	0,009	

2.1.5 Analisis Filogenetik

Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan metode *Neighbor Joining* dengan parameter *Jukes cantor + Gamma*. Hasil pohon filogenetik disajikan pada Gambar 4.5 (hal.54).

Hasil konstruksi pohon filogenetik menunjukkan terbentuknya 5 klada. Klada I terdiri dari *Flacourtia indica* dan *Flacourtia jangomas*. Klada II terdiri dari tiga spesimen *Flacourtia indica*. Klada III terdiri dari dua spesimen *Flacourtia rukam* dan satu spesimen *Flacourtia inermis*. Klada IV terdiri dari spesies *Scolopia braunii*, *Scolopia saeva*, *Scolopia chinensis*, *Scolopia oldhamii* dan sampel *Flacourtia* sp. Klada V terdiri dari spesies *Homalium chochinense*, yang sekaligus menjadi outgrup dalam hasil pohon filogenetik. Dari hasil rekonstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. berada pada satu klada yang sama dengan genus *Scolopia* yang ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* sebanyak 78%.



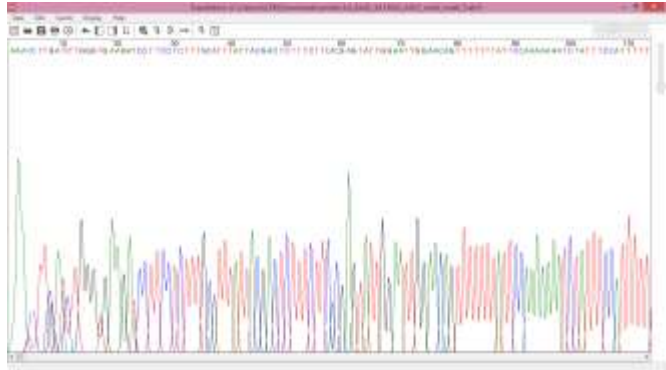
Gambar 4.5 Pohon filogenetik *Flacourtia* sp. menggunakan region *rbcL* dengan parameter *Jukes cantor + Gamma*

2.2 Region *matK*

2.2.1 Elektroforegram sekuen *Flacourtia* sp.

Hasil sekuensing sampel *Flacourtia* sp. didapatkan dalam bentuk file dengan format .ab1 yang terdiri dari 2 pembacaan arah primer *forward* dan *reverse* secara terpisah. Data dari file tersebut berupa grafik elektroforegram. Warna garis pada elektroforegram disesuaikan dengan jenis nukleotida seperti warna merah (T), warna biru (C), warna hijau (A), dan warna hitam (G).

Elektroforegram pada sampel *Flacourtia* sp. menggunakan sekuen *matK* dikatakan bagus karena memiliki puncak yang cukup tinggi dan tidak saling tumpang tindih. Setiap sekuen memiliki panjang yang beragam. Sekuen *forward* pada sampel *Flacourtia* sp. menggunakan region *matK* memiliki panjang 845 bp. Sedangkan, sekuen *reverse* memiliki panjang 845 bp. Gambar elektroforegram region *matK* dapat dilihat pada gambar 4.6 dan 4.7.



Gambar 4.6 Elektroforegram sekuen *Flacourtia* sp. menggunakan region *matK* (*forward*), Ket. Warna Merah (T), Biru (C), Hijau (A), Hitam (G)



Gambar 4.7 Elektroforegram sekuen *Flacourtia* sp. menggunakan region *matK* (*reverse*), Ket. Warna Merah (T), Biru (C), Hijau (A), Hitam (G)

2.2.2 Homologi spesies dengan analisis BLAST

Hasil BLAST menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. memiliki kemiripan dengan 21 genus dari famili Salicaceae. Genus tersebut diantaranya;

Scolopia, Xylosma, Flacourtia, Dovyalis, Prockia, Banara, Homalium, Ludia, Hasseltia, Idesia, Azara, Salicaceae, Carrierra, Oncoba, Bennettiodendron, Olmediella, Abatia, Itoa, Poliothyrasis.

Sebanyak 14 sekuen hasil BLASTn dipilih dari total 100 sekuen yang muncul. Hasil BLASTn diambil berdasarkan pada persentase *Percent identity*, nilai *E-Value*, dan *Query Cover*. Hasil BLAST *Flacourtia* sp. menggunakan sekuen *matK* terpilih disajikan pada Tabel 4.4 (hal.58).

Dari hasil BLASTn, diketahui bahwa genus yang memiliki kemiripan tertinggi dengan sampel *Flacourtia* sp. yaitu genus *Scolopia*. Hal ini dikarenakan genus *Scolopia* memiliki nilai *Percent Identity* tertinggi yaitu 99,16%, nilai *E-Value* 0.0, dan persentase *Query Cover* 89-99%.

Tabel 4.4 Hasil BLAST sekuen *matK* yang diambil

No.	Nama spesies	Query Cover	E-value	Percent Identity	Accession Number
1.	<i>Scolopia saeva</i>	100%	0.0	99.47%	MN078143.1
2.	<i>Scolopia chinensis</i>	100%	0.0	99.47%	MN078144.1
3.	<i>Scolopia spinosa</i>	96%	0.0	99.01%	AB2333833.1
4.	<i>Scolopia oldhamii</i>	98%	0.0	99.46%	MF623368.1
5.	<i>Scolopia stolzii</i>	97%	0.0	99.64%	JX572960.1
6.	<i>Flacourtia indica</i>	100%	0.0	99.11%	MG262341.1
7.	<i>Flacourtia indica</i>	100%	0.0	99.11%	NC_037410.1
8.	<i>Flacourtia jangomas</i>	100%	0.0	99.11%	MK572740.1
9.	<i>Flacourtia jangomas</i>	100%	0.0	99.11%	NC_046687.1
10.	<i>Flacourtia indica</i>	100%	0.0	98.94%	MN078145.1
11.	<i>Flacourtia rukam</i>	100%	0.0	99.11%	NC_045859.1
12.	<i>Flacourtia rukam</i>	100%	0.0	99.11%	MK281365.1
13.	<i>Flacourtia inermis</i>	100%	0.0	99.11%	MN078138.1
14.	<i>Homalium cochinchinensis</i>	99%	0.0	96.34%	MK123970.1

2.2.3 Komposisi nukleotida

Produk hasil dari sekuensing dianalisis dan dibuat *contig* menggunakan aplikasi MEGA X. Sekuen kemudian dilakukan karakterisasi untuk melihat komposisi dari nukleotida sekuen yang dianalisis. Nukleotida terdiri dari beberapa basa nitrogen meliputi; adenin (A), guanin (G), timin/urasil (T/U), sitosin (C). Komposisi sekuen nukleotida *Flacourtia* sp. terdiri dari basa nitrogen dengan persentase yang berbeda-beda. Komposisi sekuen nukleotida *Flacourtia* sp. menggunakan region *matK* meliputi; T: 36,5%, C: 17,6%, A:31,1%, G: 14,8%. Komposisi nukleotida *Flacourtia* sp. disajikan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Komposisi sekuen nukleotida *Flacourtia* sp. region *matK*

Nama spesies	T (U)	C	A	G	Total
<i>Flacourtia</i> sp.	36,5	17,6	31,1	14,8	839
<i>Scolopia saeva</i>	30,9	14,9	36,6	17,6	835
<i>Scolopia chinensis</i>	30,8	14,9	36,6	17,7	835
<i>Scolopia oldhamii</i>	36,6	17,6	36,6	14,7	828
<i>Flacurtia inermis</i>	30,8	15,1	31,0	18,0	835
<i>Flacourtia rukam</i>	30,7	15,3	36,2	18,0	835
<i>Flacourtia rukam</i>	30,7	15,3	36,0	18,0	835
<i>Flacourtia indica</i>	30,7	15,2	36,0	17,6	835
<i>Scolopia spinosa</i>	36,4	17,8	36,5	14,9	808
<i>Flacourtia jangomas</i>	30,7	15,2	30,9	17,5	835
<i>Flacourtia jangomas</i>	30,7	15,2	36,6	17,5	835
<i>Flacourtia indica</i>	30,7	15,1	36,8	17,5	835
<i>Flacourtia indica</i>	30,7	15,1	36,8	17,5	835
<i>Homalium cochinchinense</i>	30,9	14,9	36,5	17,7	847
<i>Scolopia stolzii</i>	36,7	16,6	31,8	14,9	765

2.2.4 Jarak genetik

Analisis *DNA barcoding* dilanjutkan dengan penentuan nilai jarak genetik yang menunjukkan variasi antar nilai jarak genetik. Pada Tabel 4.6 menunjukkan nilai jarak genetik pada 15 sekuen yang dianalisis. Hasil perhitungan jarak genetik menggunakan sekuen *matK* memiliki nilai jarak genetik terjauh yaitu 1,079 (*Homalium cochinchinensis*), sedangkan nilai jarak genetik terdekat yaitu 0,009 (*Scolopia spinosa*).

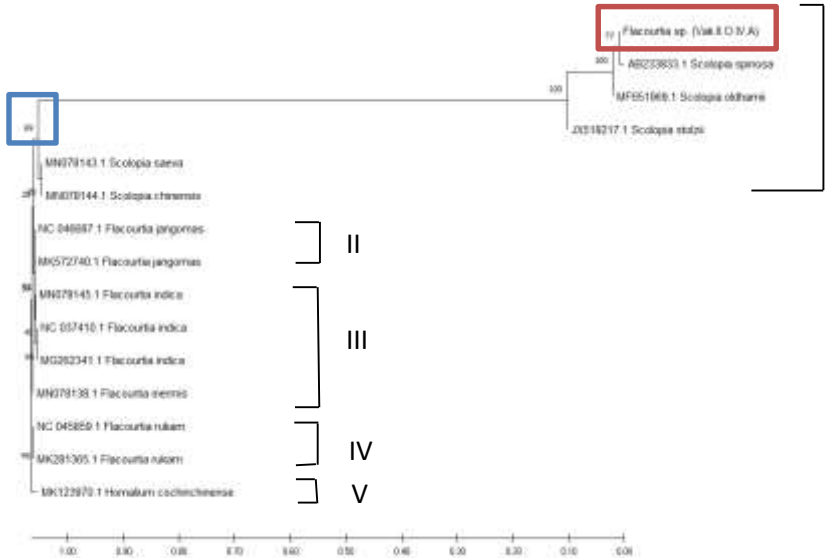
Tabel 4.6 Jarak genetik (*matK*)

Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Flacourtia</i> sp.															
<i>S. saeva</i>	1,042														
<i>S. chinensis</i>	1,046	0,001													
<i>S. oldhamii</i>	0,016	1,030	1,034												
<i>F. inermis</i>	1,054	0,014	0,015	1,042											
<i>F. rukam</i>	1,055	0,017	0,019	1,043	0,004										
<i>F. rukam</i>	1,055	0,017	0,019	1,043	0,004	0,000									
<i>F. indica</i>	1,049	0,019	0,020	1,037	0,005	0,008	0,008								
<i>S. spinosa</i>	0,009	1,056	1,060	0,011	1,069	1,069	1,069	1,063							
<i>F. jangomas</i>	1,043	0,020	0,021	1,031	0,007	0,009	0,009	0,001	1,057						
<i>F. jangomas</i>	1,043	0,020	0,021	1,031	0,007	0,009	0,009	0,001	1,057	0,000					
<i>F. indica</i>	1,062	0,021	0,022	1,050	0,008	0,010	0,010	0,002	1,077	0,003	0,003				
<i>F. indica</i>	1,062	0,021	0,022	1,050	0,008	0,010	0,010	0,002	1,077	0,003	0,003	0,000			
<i>H. cochinchinense</i>	1,079	0,021	0,022	1,066	0,013	0,013	0,013	0,014	1,079	0,015	0,015	0,016	0,016		
<i>S. stolzii</i>	0,041	0,907	0,910	0,040	0,917	0,917	0,917	0,912	0,045	0,907	0,907	0,923	0,923	0,937	

2.2.5 Analisis Filogenetik

Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan metode *Neighbor Joining* dengan parameter *Tamura 3-Parameter*. Hasil pohon filogenetik disajikan pada Gambar 4.8 (hal.64).

Hasil konstruksi pohon filogenetik menunjukkan terbentuknya V klada. Klada I terdiri dari sampel *Flacourtia* sp., *Scolopia spinosa*, *Scolopia oldhamii*, *Scolopia stolzii*, *Scolopia saeva*, *Scolopia chinensis*. Klada II terdiri dari dua spesimen *Flacourtia jangomas*. Klada III terdiri dari tiga spesimen *Flacourtia indica* dan satu spesimen *Flacourtia inermis*. Klada IV terdiri dari dua spesimen *Flacourtia rukam*. Klada V terdiri dari spesies *Homalium cochinchinense*, yang sekaligus sebagai *outgrup* dalam hasil pohon filogenetik. Dari hasil rekonstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. berada pada satu klada yang sama dengan genus *Scolopia* yang ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* sebanyak 69%.



Gambar 4.8 Pohon filogenetik *Flacourtia sp.* menggunakan region *matK* dengan metode Tamura 3-Parameter

3. Pengamatan secara morfologi

Flacourtia sp. yang terdapat di vak. II.O.IV.A.18 memiliki ciri morfologi berupa habitus pohon dengan tinggi pohon ± 15 meter. Batangnya berwarna *Moderate olive brown N199A* dan memiliki lentisel. Pada percabangannya memiliki petiol berbentuk cannel yang berwarna coklat. Bangun daun dari *Flacourtia sp.* berbentuk *lanceolate*, tipe daunnya tunggal, tepi daunnya *serrate*, ujung daunnya *caudate*, pangkal daunnya *cuneate*, susunan tulang daunnya berseling. Warna permukaan abaksial daun *Flacourtia sp.* yaitu *Strong yellow 144A*, dan

warna adaksialnya *Moderate olive green 146A*. Karakter morfologi dari *Flacourtia* sp. yang terdapat di Vak. II.O.IV.A.18 disajikan pada Tabel 4.7.

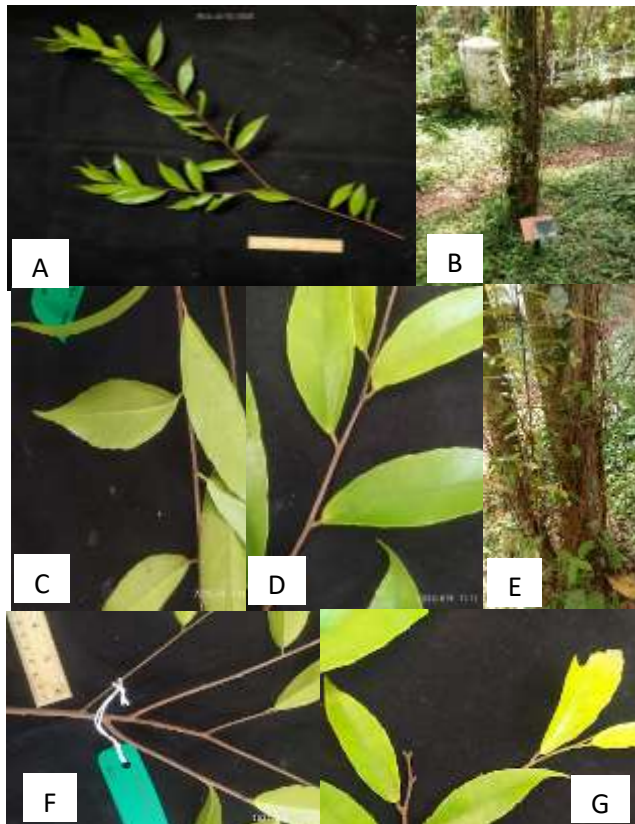
Tabel 4.7 Karakter Morfologi *Flacourtia* sp.

No.	Parameter	Deskripsi
1.	Panjang helai daun	10 cm
2.	Lebar daun	3 cm
3.	Panjang petiol	1 cm
4.	Rasio Panjang	4,5 cm
5.	Tipe daun	Tunggal
6.	Bangun daun	<i>Lanceolate</i>
7.	Pangkal daun	<i>Cuneate</i>
8.	Ujung daun	<i>Caudate</i>
9.	Tepi daun	<i>Serrate</i>
10.	Tulang daun	<i>Brochidodromous</i>
11.	Posisi daun	<i>Descending</i>
12.	Pembagian daun	<i>Imparipinnate</i>
13.	Permukaan abaksial	<i>Glaborous</i>
14.	Warna abaksial	<i>Strong yellow 144 A</i>
15.	Permukaan adaksial	Licin
16.	Warna adaksial	<i>Moderate olive green 146 A</i>
17.	Secondary vein	Berseling
18.	Jumlah pasang secondary vein	6 pasang

Tabel 4.7 Lanjutan

No.	Parameter	Deskripsi
19.	Habitus	Pohon
20.	Permukaan batang	Terdapat lentisel
21.	Warna batang	<i>Moderate olive brown</i> <i>N199 A</i>
22.	Tinggi tanaman	15 meter
23.	Bentuk petiol	<i>Cannel</i>
24.	Warna petiol	Coklat

Adapun morfologi dari *Flacourtia* sp. yang terdapat di Vak. II.O.IV.A.18 disajikan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Morfologi *Flacourtia* sp. nomor koleksi II.O.IV.A.18 (a) daun (b) habitus (c) permukaan abaksial (d) permukaan adaksial (e) batang (f) percabangan (g) pangkal dan ujung daun (Sumber: dokumentasi pribadi, 2021)

Berdasarkan identifikasi secara molekuler, sampel *Flacourtia* sp. termasuk ke dalam genus *Scolopia*. Spesies *Scolopia* yang memiliki distribusi di wilayah Sulawesi yaitu *Scolopia spinosa* dan *Scolopia luzonensis*. Kemudian, dilakukan perbandingan antara sampel *Flacourtia* sp. dengan genus *Scolopia*, genus *Flacourtia*, *Scolopia spinosa* dan *Scolopia luzonensis*. Perbedaan karakter morfologi sampel *Flacourtia* sp. dengan beberapa spesies lain disajikan pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Perbandingan morfologi sampel

Karakter	<i>Scolopia</i>	<i>Flacourtia</i>	<i>Scolopia spinosa</i>	<i>Scolopia luzonensis</i>	<i>Flacourtia sp.</i>
Perawakan	Pohon atau semak	Pohon atau semak	Pohon atau semak	Pohon	Pohon
Tata daun	<i>Alternate</i>	<i>Alternate</i>	<i>Alternate</i>	<i>Alternate</i>	<i>Alternate</i>
Stipula	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada
Petiol	Ada	Ada	Ada	Ada	Ada
Tekstur daun	Berurat menyirip	Berurat	Kasar	Berurat menyirip	Berurat menyirip
Tepi daun	Bergerigi	Bergerigi	<i>Repand</i>	Bergerigi	Bergerigi
Bentuk daun	Oblong sampai <i>lanceolate</i>	Oblong sampai <i>lanceolate</i>	Bulat telur	Lanset	Lanset

Pengamatan menggunakan herbarium perlu dilakukan, karena untuk membandingkan sampel yang dianalisis dengan spesimen herbarium spesies yang diduga. Adapun gambar spesimen herbarium *Scolopia spinosa*, *Scolopia luzonensis*, dan *Flacourtia sp.* disajikan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Herbarium (a) *Scolopia spinosa*, (b) *Scolopia luzonensis*, (c) sampel *Flacourtia sp.*
(Warb, 1893; GBIF,2017)

B. Pembahasan Hasil Penelitian

DNA *Flacourtia* sp. yang telah diekstraksi menggunakan *Plant Genomic DNA kit* (Tiangen) berhasil terisolasi. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa sekuen DNA telah teramplifikasi dengan baik, hal ini ditandai dengan terbentuknya pita DNA yang cukup tebal, namun masih terdapat smear. Terbentuknya pita DNA yang cukup tebal menandakan bahwa konsentrasi DNA hasil ekstraksi cukup tinggi. Smear yang terlihat pada hasil visualisasi menandakan adanya kontaminan atau pengotor seperti protein, komponen sel yang belum terdegradasi dengan baik, dan adanya sisa pelarut pada saat proses ekstraksi yang masih terbawa (Iqbal & Kurniawati, 2016).

Elektroforegram sekuen *reverse* dan *forward* sampel *Flacourtia* sp. memiliki panjang yang berbeda-beda. Sampel *Flacourtia* sp. yang disekuensing menggunakan region *rbcl* memiliki panjang sekuen *forward* 575 bp, sedangkan sekuen *reversenya* memiliki panjang 573 bp. Sampel *Flacourtia* sp. yang disekuensing menggunakan region *matK* memiliki panjang sekuen *forward* dan *reverse* 845 bp. Elektroforegram sampel *Flacourtia* sp. menggunakan region *rbcl* dan *matK* memiliki kualitas DNA yang baik. Hal ini ditandai dengan elektroforegram yang memiliki puncak yang tinggi dan kurva grafik tidak saling tumpang tindih, kecuali pada bagian ujung

awal dan ujung akhir. Kurva grafik yang saling tumpang tindih dibagian ujung awal dan ujung akhir tidak terlalu mempengaruhi analisis lanjutan sampel yang dianalisis (Taariwuan *et al.*, 2021).

Hasil BLASTn sampel *Flacourtia* sp. menggunakan region *rbcL* dan *matK* menunjukkan sampel memiliki kemiripan tertinggi dengan *Scolopia saeva* (MN078143.1) yang memiliki nilai *percent identity* 99,47%, nilai *e-Value* 0.0, dan *Query cover* 100%. *Query cover* menandakan seberapa besar (%) kesamaan panjang sekuen nukleotida sampel dengan yang ada di database. Semakin tinggi nilai persentase *Query cover* maka semakin tinggi tingkat kesamaannya (Mukhopadhyay *et al.*, 2018). Nilai *E-Value* (*Expectation Value*) merupakan nilai hipotesis atau pendugaan yang memberikan tanda signifikansi kesamaan sekuen sampel dengan sekuen yang ada di database. Nilai *E-Value* yang mendekati nilai 0, menunjukkan bahwa sampel semakin mirip dengan sekuen dari database. *Percent Identity* merupakan angka yang menunjukkan seberapa besar tingkat kemiripan sekuen sampel dengan sekuen yang terdapat di database (Clavarie dan Notradame, 2007).

Komposisi sekuen nukleotida *Flacourtia* sp. menggunakan region *rbcL* adalah T: 29,1%, C: 20,9%, A: 27,3%, G: 22,7%. Sedangkan, komposisi sekuen nukleotida *Flacourtia* sp. menggunakan region *matK* adalah T: 36,5%, C: 17,6%,

A:31,1%, G: 14,8%. Dari Tabel 4.2 (hal.48) dan 4.5 (hal.60) menunjukkan bahwa presentase basa AT lebih tinggi dibandingkan dengan presentase CG. Hal ini dikarenakan komposisi nukleotida pada kloroplas sebagian besar tersusun atas basa nitrogen Adenin (A) dan Timin (T). Analisis komposisi nukleotida diperlukan untuk mengetahui tingkat keprimitifan makhluk hidup melalui laju evolusi dan laju mutasi. Genom yang memiliki jumlah nukleotida Guanin (G) dan Cytosin (C) lebih tinggi memiliki tingkat densitas gen, laju mutasi dan level rekombinasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan genom yang jumlah G dan C lebih rendah (Niu *et al*, 2017). Presentase Guanin dan Sitosin yang rendah juga menunjukkan bahwa spesies tersebut lebih primitif (Hapsari, 2015).

Perhitungan nilai jarak genetik menguatkan analisis filogenetik serta untuk menjelaskan status tiap spesies pada suatu takson (Jarulis *et al*, 2021). Jarak genetik yang memiliki nilai >3% menunjukkan bahwa spesies yang dibandingkan merupakan spesies yang jauh berbeda dan tidak termasuk dalam takson yang dianalisis (Hebert *et al.*, 2003). Umumnya, nilai jarak genetik antar populasi yang sama memiliki nilai <1 atau <2% (Xiong, 2006).

Nilai jarak genetik berbanding terbalik dengan dekatnya kekerabatan antar spesies. Semakin tinggi nilai jarak genetik,

maka semakin jauh hubungan kekerabatan antar spesies. Sebaliknya, semakin rendah nilai jarak genetik maka semakin dekat hubungan kekerabatan antarspesies yang dianalisis. Hasil perhitungan jarak genetik menggunakan region *rbcl* menunjukkan bahwa nilai jarak genetik terdekat dimiliki oleh *Scolopia stolzii* yaitu 0,003 dan nilai jarak genetik terjauh dimiliki oleh *Flacourtia indica* yaitu 0,011. Sedangkan, hasil perhitungan jarak genetik menggunakan region *matK* menunjukkan bahwa nilai jarak genetik terdekat dimiliki oleh *Scolopia spinosa* yaitu 0,009 dan nilai jarak genetik terjauh dimiliki oleh *Homalium cochinchinense* yaitu 1,079.

Analisis pohon filogenetik sampel *Flacourtia* sp. region *rbcl* menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan parameter *Jukes cantor + Gamma* serta diulangi dengan nilai *bootstrap* sebanyak 1000x. Sedangkan, analisis pohon filogenetik sampel *Flacourtia* sp. region *matK* menggunakan metode *Neighbor-Joining* dengan parameter *Tamura 3-Parameter* serta diulangi dengan nilai *bootstrap* sebanyak 1000x. Metode yang digunakan dalam rekonstruksi pohon filogenetik yaitu *Neighbor-Joining* (NJ). *Neighbor-Joining* merupakan salah satu metode rekonstruksi pohon filogenetik yang mempertimbangkan jarak evolusioner yang diwakili oleh panjang cabang yang terbentuk. *Neighbor-Joining* umum digunakan karena menghasilkan pohon yang relatif lebih

akurat dan komputasinya lebih cepat (Kumar, 2000). Metode ini memperhitungkan nilai jarak evolusioner dan jarak filogenetik antar taksa yang mengasumsikan bahwa setiap percabangan memiliki laju evolusi yang berbeda (Hills, 1996). Metode ini tidak membangun kluster namun menghitung jarak ke nodus internal secara langsung (Hills, 2018).

Pemilihan model parameter pada saat rekonstruksi pohon filogenetik region *rbcL* merekomendasikan parameter *Jukes cantor + gamma*, sehingga parameter ini dipakai untuk rekonstruksi pohon filogenetik region *rbcL*. Parameter *Jukes cantor* merupakan parameter yang mempertimbangkan perbedaan dalam laju transisi dan transversi (Tamura, 1992). Sedangkan, pemilihan model parameter pada saat rekonstruksi pohon filogenetik region *matK* merekomendasikan parameter *Tamura 3-parameter*, sehingga parameter ini dipakai untuk rekonstruksi pohon filogenetik region *matK*. *Tamura 3-Parameter* merupakan parameter yang mempertimbangkan perbedaan dalam laju transisi dan transversi (Tamura, 1992).

Hasil konstruksi pohon filogenetik menggunakan region *rbcL* menunjukkan terbentuknya V klada. Klada I terdiri dari *Flacourtia indica* dan *Flacourtia jangomas*. Klada II terdiri dari tiga spesimen *Flacourtia indica*. Klada III terdiri dari dua spesimen *Flacourtia rukam* dan satu spesimen *Flacourtia*

inermis. Klada IV terdiri dari spesies *Scolopia braunii*, *Scolopia saeva*, *Scolopia chinensis*, *Scolopia oldhamii* dan sampel *Flacourtia* sp. Klada V terdiri dari spesies *Homalium cochinchinense*, yang sekaligus menjadi *outgroup* dalam hasil pohon filogenetik. Dari hasil rekonstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. berada pada satu klada yang sama dengan genus *Scolopia* yang ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* sebanyak 78%.

Hasil konstruksi pohon filogenetik menggunakan region *matK* menunjukkan terbentuknya V klada. Klada I terdiri dari sampel *Flacourtia* sp., *Scolopia spinosa*, *Scolopia oldhamii*, *Scolopia stolzii*, *Scolopia saeva*, *Scolopia chinensis*. Klada II terdiri dari dua spesimen *Flacourtia jangomas*. Klada III terdiri dari tiga spesimen *Flacourtia indica* dan satu spesimen *Flacourtia inermis*. Klada IV terdiri dari dua spesimen *Flacourtia rukam*. Klada V terdiri dari spesies *Homalium cochinchinense*, yang sekaligus sebagai *outgroup* dalam hasil pohon filogenetik. Dari hasil rekonstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. berada pada satu klada yang sama dengan genus *Scolopia* yang ditunjukkan dengan nilai *bootstrap* sebanyak 69%. Nilai *bootstrap* merupakan nilai yang digunakan untuk menguji seberapa baik set data model yang kita gunakan. Apabila nilai *bootstrap*

rendah, maka analisis sekuen tidak dapat diandalkan untuk mendapatkan pohon filogenetik (Muzzazinah, 2017).

Out group yang dipilih pada rekonstruksi pohon filogenetik yaitu *Homalium cochinchinense*. *Out group* dibutuhkan dalam pembuatan pohon filogenetik karena bertujuan untuk mengetahui karakter *primitif* dan karakter *derivate* dari kelompok *in group* serta digunakan untuk menentukan titik awal pembentukan sebuah pohon filogenetik (Muzzazinah, 2017).

Identifikasi molekuler menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. termasuk ke dalam genus *Scolopia*. Spesies *Scolopia* yang memiliki distribusi di wilayah Sulawesi yaitu *Scolopia spinosa* dan *Scolopia luzonensis*. Berdasarkan morfologi sampel *Flacourtia* sp. memiliki ciri khusus berupa habitus pohon, tipe daun tunggal, bangun daun *lanceolate*, tepi daun *serrate*, ujung daun *caudate*, pangkal daun *cuneate*, serta memiliki daun muda yang berwarna hijau kemerahan. Hasil perbandingan morfologi sampel *Flacourtia* sp. dengan *Scolopia spinosa* memiliki banyak perbedaan. *Scolopia spinosa* memiliki ciri khusus berupa habitus pohon atau semak, tepi daun *repand*, bangun daun bundar telur, ujung daun *acuminate*, dan pangkal daun *asymmetrical*. Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa sampel *Flacourtia* sp. bukan spesies *Scolopia spinosa*.

Hasil perbandingan morfologi sampel *Flacourtia* sp. dengan *Scolopia luzonensis* menunjukkan bahwa keduanya memiliki kesamaan karakter khusus, berupa habitus pohon, tipe daun tunggal, bangun daun *lanceolate*, tepi daun *serrate*, ujung daun *caudate*, pangkal daun *cuneate*, serta memiliki daun muda yang berwarna hijau kemerahan. Tipe *secondary vein* dari keduanya juga memiliki kesamaan yaitu tipe *brochidodromous*. Berdasarkan kesamaan morfologi dari keduanya, dapat ditarik kesimpulan bahwa sampel *Flacourtia* sp. merupakan spesies *Scolopia luzonensis*.

Scolopia merupakan salah satu genus tumbuhan yang termasuk famili *Salicaceae*. *Scolopia luzonensis* memiliki taksonomi sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Phylum : Tracheophyta
Class : Magnoliopsida
Ordo : Malpighiales
Family : Salicaceae
Genus : *Scolopia*

(GBIF, 2017)

Scolopia merupakan salah satu genus yang termasuk dalam family *Salicaceae*. *Scolopia* memiliki banyak manfaat, seperti kayu *Scolopia delphinensis* yang digunakan untuk membuat papan, kayu *Scolopia erythrocarpa* yang digunakan

untuk konstruksi bangunan, kayu *Solopia hazomby* yang digunakan untuk papan dan ikatan rel kereta api (Wendy & George, 2016).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. asal Sulawesi koleksi Kebun Raya Bogor nomor koleksi II.O.IV.A.18 bukan bagian dari genus *Flacourtia* melainkan termasuk genus *Scolopia* dan merupakan spesies *Scolopia luzonensis*. Hal ini membuktikan bahwa pendekatan molekuler dengan sekuen *rbcL* dan *matK* yang dilengkapi dengan pengamatan morfologi dapat mengidentifikasi spesimen tumbuhan hingga ke tingkat spesies.

BAB V PENUTUP

A. Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Sekuen *Flacourtia* sp. menggunakan region *rbcL* dapat terkarakterisasi dengan Panjang sekuen hasil *contig* 564 bp. Presentase komposisi basa nukleotida diantaranya; T: 29,1%, C: 20,9%, A: 27,3%, G: 22,7%.
2. Sekuen *Flacourtia* sp. menggunakan region *matK* dapat terkarakterisasi dengan Panjang sekuen hasil *contig* 839 bp. Presentase komposisi basa nukleotida diantaranya; T: 36,5%, C: 17,6%, A:31,1%, G: 14,8%.
3. Identifikasi molekuler menggunakan sekuen *rbcL* dan *matK* menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. termasuk ke dalam genus *Scolopia*. Identifikasi morfologi menunjukkan bahwa sampel *Flacourtia* sp. merupakan spesies *Scolopia luzonensis*.

B. Saran

Adapun saran untuk penelitian lebih lanjut, yaitu;

1. Melakukan perbaikan nama plang spesies di Kebun Raya Bogor
2. Melakukan perbaikan registrasi spesies *Scolopia luzonensis* di Kebun Raya Bogor
3. Melakukan identifikasi menggunakan region yang lain untuk menambahkan database

DAFTAR PUSTAKA

- Barthet, M. M. 2006. *Expression and function of the chloroplast-encoded gene. matK*. Dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Basith, A. 2015. *Peluang Gen *rbcl* sebagai DNA Barcode Berbasis DNA Kloroplas untuk Mengungkap Keanekaragaman Genetik Padi Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) Lokal Indonesia*. Biologi, Sains, Lingkungan, dan Pembelajarannya. 938-941.
- Batista, J. A. N., K. S. Borges, M. W. F. de Faria, K. Proite, A. J. Ramalho, G. A. Salazar, C. Van den Berg. 2013. *Molecular Phylogenetics of The Species-Rich Genus *Habenaria* (Orchidaceae) In The New World Based On Nuclear and Plastid DNA Sequences*. Molecular Phylogenetics and Evolution. 67:95-109.
- Blaxter, M. 2003. *Molecular Systematics - Counting Angels with DNA*. Nature, 421: 122–124.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., and Leon C. 2010. *Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species*. PLoS One, 5(1): 1-8.
- 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: 12794-12797.
- Cumming, M. P., Nugent, J. M., Olmstead, R. G. and Palmer, J. D. 2003. *Phylogenetic Analysis Reveals Five Independent Transfer of the Chloroplast Gene *rbcl* to the Mitochondrial Genome in Angiosperms*. Curr Genet, 43: 131- 138.
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., and McGehee, M. R. 2019. *DNA Sequencing. Molecular Biology*. Elsevier, Inc.

- Claverie, J. M. dan C. Notredame. 2017. *Bioinformatics for Dummies 2nd edition*. Wiley Publishing, Inc. Indianapolis.
- Dewi, C.L.H. 2012. *Analisis Biomolekuler Gen Internal Transcribed Spacer (ITS) dalam Studi Filogenetik Zingiber loerzingii Valetton (Zingiberaceae)*. Skripsi. Departemen Biokimia FMIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Dharmayanti, I.N.L.P. 2011. *Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi*. *Wartazoa* 1 (21): 1-10.
- Felsenstein J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- GAW Alakolanga, N. Savitri K, Lalith J and Yoshinori F. 2015. *Antioxidant Property and α -glucosidase, α -amylase and lipase inhibiting activities of flacourtia inermis fruits: characterization of malic acid as an inhibitor of the enzymes*. *J. Food Sci Technol*, 52 (12), 8383-8388.
- Graham, C. A., and Hill, A. J. M. 2001. *DNA Sequencing Protocols. Springer Protocol*. 167: 1-12.
- Hapsari, L. 2015. *Keragaman dan Kekerbatan Genetik Pisang (Musa i.) di Jawa Timur berdasarkan Sekuen Daerah Internal Transcribed Spacer*. Universitas Brawijaya: Malang.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., and DeWaard, J. R. 2003. *Biological Identifications through DNA Barcodes*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 313–321.
- Hills, D. M., C. Moritz, and Mable, B. K. 1996. *Molecular Systematic*. Sinaeur Associates, Sunderland.
- Hills, D. M., C. Moritz, and Mable, B. K. 2018. *Molecular Systematic*. Sinaeur Associates, Sunderland.
- Holme DJ, Peck H. 1998. *Analytical Biochemistry*. Ed ke-3. Harlow (GB: Pearson Education Limited).

- Irmawati. 2003. *Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok Hatchery*. Thesis. Bogor: IPB.
- Iqbal, M., Buwono, I. & Kurniawati, N. 2016. *Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus (WSSV) Pada Udang Vaname (Litopenaeus vannamei) Isolasi DNA Metode Lysis Buffer*. Jurnal Perikanan Kelautan, VII (1).
- Jarulis, Muslim, C. Kamilah, S. N. Utama, A. F. Permana, Sari, M.M., Prayitno, A. H. , Jannah. 2021. *DNA Barcode of Enggano hill myna, Gracula religiosa enganensis (Aves: Sturnidae) based on mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I*. Biodiversitas, 22 (3); 1635-1643.
- Khew, G. S. W. dan T. F. Chia. 2011. *Parentage Determination of Vanda Miss Joaquim (Orchidaceae) Through Two Chloroplast Genes matK and rbcL*. AoB PLANTS.
- Kumar S, dan Nei M. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Kress, W. J. 2017. *Plant DNA Barcodes: Applications Today and in the Future*. Journal of Systematics and Evolution, 55(4): 291–307.
- Kumar, R., P. Mahadani, R. Kishore, A. L. Meitei dan D. R. Singh. 2016. *DNA Barcoding of Indian Orchids*. Technical Bulletin. Mo. 48.
- Langga IF., M Restu dan T Kuswinanti. 2012. *Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi Dna Tanaman Bitti (Vitex cofassus Reinw) Serta Analisis Keragaman Genetik Dengan Teknik RAPD-PCR* Jurnal Sains dan Teknologi Vol (12) : 3 : 265-276.
- Liu, J., Moller, M., Gao, L.M., Zhang, D.Q., and Li, D.Z. 2011. *DNA Barcoding for the Discrimination of Eurasian Yews (Taxus L., Taksaceae) and the Discovery of Cryptic Species*. Molecular Ecology Resources, 11: 89-100.

- Lo, Y. T., and Shaw, P. 2018. *DNA-Based Techniques for Authentication of Processed Food and Food Supplements*. Food Chemistry. 240: 767-774.
- Maloukh, L., Kumarappan, A., Jarrar, M., Salehi, J., El-wakil, H., and Lakshmi, T. V. R. 2017. *Discriminatory power of rbcL barcode locus for authentication of some of United Arab Emirates (UAE) native plants*. Biotech, 7(144); 1-7.
- Maia, V.H., da Mata, C. S., Franco, L. O., Cardoso, M. A., Cardoso, S. R. S., Hemerly, A. S., and Ferreira, P. C. G. 2012. *DNA Barcoding Bromeliaceae : Achievements and Pitfalls*. PLoS One, 7(1): 1-6.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor (ID): IPB Press.
- Mukhopadhyay, C.S., Choudhary, R. K. Iquebal, M. A. 2018. *Basic Applied Bioinformatics*. Jhon Wiley & Sons, Inc. USA.
- Muzzazinah. 2017. *Metode Filogenetik pada Indigofera. Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Biologi*. 25-40.
- Newmaster, S. G., Fazekas, A, J. and Ragupathy, S. 2006. *DNA Barcoding in Land Plants : Evaluation of rbcL in a Multigene Tiered Approach*. Canadian Journal of Botany, 84: 335-341.
- 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): 2307.
- Pierce, B. A. 2002. *Genetiks: A Conceptual Approach* . New York: W. H. Freeman and Company.
- Pierce, B. A. 2016. *Genetics, A Conceptual Approach*. W. H. Freeman & Company. New York.
- POWO.2019.*Flacourtia*.<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30036269-2> . diakses pada tanggal 16 September 2022.

- POWO.2019.*FlacourtiaComm*.<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30036269-2/images> .Diakses pada tanggal 16 Oktober 2022.
- Rahayu, D. W., dan Jannah M. 2019. *DNA Barcode Hewan dan Tumbuhan Indonesia*. Yayasan Inspirasi Ide Berdaya: Jakarta.
- Ricbicky, E. P. 1996. *PCR Primer Design and Reaction Optimisation. In Molecular Biology Techniques Manual*. Ed. V.E. Coyne, M. D. James, S. J. Reid & E. P. Rybicki. Dept. Of Microbiology. Univ. Cape Town.
- Ridwan, M. H. 2018. *Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika*. UIN Ar-Raniry. Banda Aceh.
- Rosy H., Hanifah B., Sukarno, Henny N., Raffqi R. 2018. *Ekstraksi DNA dari Daging Segar untuk Analisis dengan Metode Lopp-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rosenberg, E. 2017. *DNA Sequencing and PCR. It's in Your DNA*. Elsevier, Inc.
- Sambrook. J. F., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. USA: Cold Spring Laboratory Press.
- Sasi, S., Anjum, N., & Tripathi, Y.C. 2018. *Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological aspects of Flacourtia jangomas: a review*. Int J Pharm Pharm Sci, 10(3):9-15.
- Savolainen, V., Cowan, R.S., and Vogler, A.P. Roderick, G. K., and Lane, R. 2005. *Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA Barcoding*. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 360: 1850– 1811.
- Sitti. A., Fahmi A. H., Rif'atul, A. 2017. *Fisikokimia dan Kandungan Vitamin C pada Buah Tome-Tome (Flacourtia inermis) Kota Ternate*. Jurnal LINK. Vol. 13. No. 1. Politeknik Kesehatan Kemenkes Ternate.
- Talukder, C., Saha, S., Adhikari, S., Mondal, H. K., Islam, M. K., & Anisuzzman, M. 2012. *Evaluation of antioxidant,*

- analgesic and antidiarrhoeal activity of Flacourtia jangomas (Lour.) Raeusch. leaves. Pharmacologyonline, 3:20-28.*
- Tamura K. 1992. *Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases. Molecular Biology and Evolution 9:678-687.*
- Taariwuan, M., Ngangi, J., Mokosuli, Y., & Gedoan, S. 2021. *DNA Barcoding Dalugha (Cyrtosperma merkusii) di Kepulauan Talaud dan Minahasa Selatan Berdasarkan Gen rbcL (DNA. 11(2), 134-138.*
- Valentini, A., Pompanon, F., and Taberlet, P. 2008. *DNA Barcoding for ecologists. Trends in Ecology and Evolution, 24(2): 110-117.*
- Verheij, E.W.M. dan R.E Coronel, 1997. *Sumber daya Nabati Asia Tenggara 2. Penerjemah S. Danimihardja; H. Sutarno; N.W Utami Dan D.S.H. Hopsen. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.*
- Virgilio M, Jordaens K, Breman F. 2012. *Turning DNA Barcodes into an alternative tool for identification African fruits, files as a model (poster). Consorsium Barcode of Life (CBOL).*
- Watson. J. D., M. Gilman, Witkowski, J. Zohler, M. 1992. *Recombinant DNA. USA: Scientific American Books.*
- Warb. 1893. In: Engl. & Pflazernfam. *Scolopia luzonensis.*
- Warb. 1893. In: Engl. & Prantl, Naturl. Pflanzefarm. *Scolopia spinosa.*
- Wendy, L & George E. 2016. *A Synoptic Revision of the Malagasy Species of Scolopia Schreb. (Salicaceae, Scolopieae).* Missoun Botanical Garden.
- Xiong, J. 2006. *Essential Bioinformatics.* Cambridge University Press. New York.
- Yuwono, Triwibowo. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction.* Penerbit Andi: Yogyakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Sekuen *Flacourtia* sp.

>1st_BASE_4414564_AR21_rbcL_F

ATAAGGTGGATCAAGGCTGGGTGTAAAGATTATAAATTGACT
TATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGC
AGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCGGCCCGAGGAAG
CAGGGGCCGCGGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACA
ACTGTGTGGACCGATGGGCTTACTAGTCTTGATCGTTATAAAGG
ACGATGCTACGACATCGAGCCCCTTGCTGGAGAAGAAAATCAAT
TTATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTTGAAGAAGGT
TCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGG
GTTCAAAGCCCTACGCGCTCTACGTCTGGAGGATTTGCGAATCC
CCACTTCTTATACTAAAACTTTTCAAGGCCACCTCACGGCATC
CAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGCCCCCTATT
GGGCTGTAATAAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAATT
ACGGTAGAGCAGTTTATGAATGTCTACGTGGTGGACTGGATTTT
ACAA

>1st_BASE_4414565_AR21_rbcL_R

AATAATGCTCTAACCGTAATTCTTAGCGGATAACCCCAATTTAG
GTTTAATAGTACAGCCCAATAGGGGGCGACCATACTTGTTCAAT
TTATCTCTCTCAACTTGGATGCCGTGAGGTGGGCCTTGAAAAGT
TTTAGTATAAGAAGTGGGGATTTCGCAAATCCTCCAGACGTAGAG

CGCGTAGGGCTTTGAACCCAAATACATTACCCACAATGGAAGTA
AACATGTTAGTAACAGAACCTTCTTCAAAAAGGTCTAAGGGGT
AAGCTACATAAGCAATAAATTGATTTTCTTCTCCAGCAACGGGC
TCGATGTCGTAGCATCGTCCTTTATAACGATCAAGACTAGTAAG
CCCATCGGTCCACACAGTTGTCCATGTACCAGTAGAAGATTCAG
CAGCTACCGCGGCCCTGCTTCTCGGGCGGAACCTCCAGGTTGA
GGAGTACTCGGAATGCTGCCAAGATATCAGTATCTTTGGTTTC
ATAGTCAGGAGTATAATAAGTCAATTTATAATCTTTAACACCA
GCCTTGAATCCAACACTTGCTTTAGTCTCTGTTTGTGGGTGACA
TAA

>Sekuen *contig Flacourtia* sp. (Vak.II.O.IV.A) (*rbcL*)

GACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAGGCTGGTGTAAAGATTAT
AAATTGACTTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGA
TATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTCCGC
CCGAGGAAGCAGGGGCCGCGGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGT
ACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGGCTTACTAGTCTTGATCG
TTATAAAGGACGATGCTACGACATCGAGCCCCTTGCTGGAGAAG
AAAATCAATTTATTGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTT
GAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAA
TGTATTTGGGTTCAAAGCCCTACGCGCTCTACGTCTGGAGGATT
TGCGAATCCCCTTCTTATACTAAAACCTTTTCAAGGCCACCT
CACGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTC

GCCCCCTATTGGGCTGTACTATTTAAACCTAAATTGGGGTTATCC
GCTAAGAATTACGGTAGAGCAGTTTATGAATGTCTACG

>1st_BASE_4414562_AR21_matK_matK_F

AAACCTTGATCTTGGGTGAAGATCCTTCCTCTTTGCATTTATTA
CGACTCTTTCCTCACGAGTATTGGAATTGGAACAGTTTTTTTTAT
TCCAAAAAATCTATTTCCATTTTTGCAAAAAATAATCCAAGAT
TTTTCTTGTTCCATATAAATTCTCATGTATATGAATACGAGTCC
ATTTTCTTTTTTCTTCGTAATCAATCCTTTCATTTCCGATTAAC
ATTTTCTCAGGTCTTTCCTTGAGCGAATATATTTCTATGGAAAA
TAGAACATTTTGTGGAAGTCTTTACTAAGGATTTTCGGGACAGC
TTATGCTTGCTCAAGGATCCTTTCATACATTATGTTAGATATCA
AGGAAAATCCATTTTGGTCTCAAAGGATACGCCTCTTCTGATGA
AAAAATGGAAAGATTACCTTGTCAATTTATGTCAATGTCAATTTT
GATGTGTGCTTTCACCAAAAAAGATACATAAAAACCCATTATC
ATTATACAAGTATTCTTTCGCCTTATTAGGCTATCTTTC AAGTG
TACGACTAAACCTTTCAGTGGTACGGAGTCAAATGCTAGAAAAT
ACATTTCTAATAGAGAATACTATGAATAAACTCGATACAACAG
TTTCAATTATTCCTTTGATTGGATCATTAGAAAAAATGAAATT
TTGTAACGCAGTAGGACATCCCATTAGTAAACCGACCTGGGCCG
ATTTCTCGGATTCGGATATTATCGACCGATTTGTCTGTATATGC
AGAAATCTTTCATTATTATAGCGGATCCTCAAGAAAAAAGA
GTTTGTATCGAATAAAAATATATACTTCGACTTTCTTGTGTTAAA
ACTTTGGCTCGT

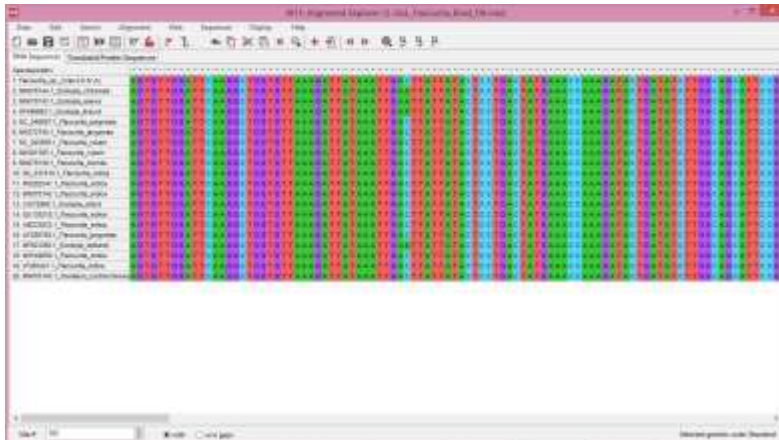
>1st_BASE_4414563_AR21_matK_matK_R

CCGTTTACCAGAAAGTCGAAGTATATATTTTTATTTCGATACAAAC
TCTTTTTTCTTGAGGATCCGCTATAATAATGAGAAAGATTTCTG
CATATACAGACAAATCGGTCGATAATATCCGAATCCGAGAAATC
GGCCCAGGTCGGTTTACTAATGGGATGTCCTACTGCGTTACAAA
ATTTTCATTTTTTCTAATGATCCAATCAAAGGAATAATTGAAACT
GTTGTATCGAGTTTATTCATAGTATTCTCTATTAGAAATGTATT
TTCTAGCATTTGACTCCGTACCACTGAAAGGTTTAGTCGTACAC
TTGAAAGATAGCCTAATAAGGCGAAAGAATACTTGTATAATGA
TAATGGGTTTTTATGTATCTTTTTTGGTTGAAAGCACACATCAA
AATGACATTGACATAAATTGACAAGGTAATCTTCCATTTTTTTC
ATCAGAAGAGGCGTATCCTTTGAGACCAAATGGATTTTCCTTG
ATATCTAACATAATGTATGAAAGGATCCTTGAGCAAGCATAAG
CTGTCCCGAAAATCCTTAGTAAAGACTTCGACAAAATGTTCTAT
TTTTCCATAGAAATATATTCGCTCAAGAAAGACCTGAGAAAAT
GTTAATCGGAAATGAAAGGATTGATTACGAAGAAAAAAGAAAA
TGGACTCGTATTCATATACATGAGAATTATATAGGAACAAGAA
AAATCTTGGATTATTTTTTGCAAAAATGGAAATAGATTTTTTT
GGAATAAAAAAAGTGTCCAATCCAATACTCGTGAAGAAAGA
GTCGTAATAAATGCAAAGAGGAAGGATCTTTCACCCAAGATCG
AAGGATTTGAACCAAGATTTTCAGATGGGGAAGTGGGTAA

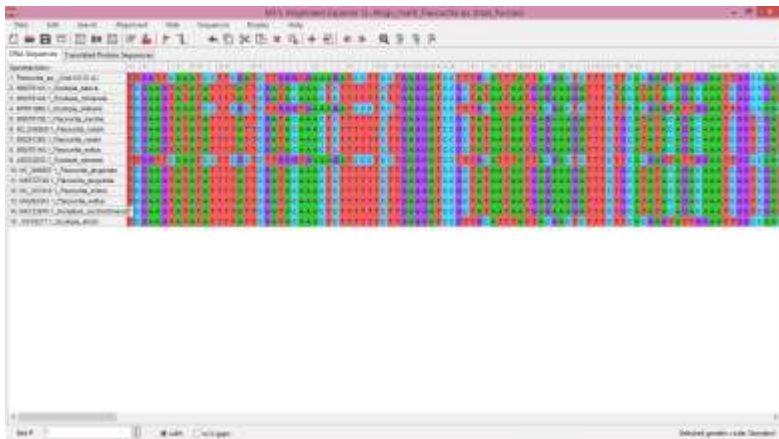
>Sekuen *contig Flacourtia* sp. (Vak.II.O.IV.A) (*matK*)

AATCTTGGTTCAAATCCTTCGATCTTGGGTGAAAGATCCTTCCT
CTTTGCATTTATTACGACTCTTTCTTCACGAGTATTGGAATTGG
AACAGTTTTTTTTATTCCAAAAAATCTATTTCCATTTTTGCAAA
AAATAATCCAAGATTTTTCTTGTTCTATATAATTCTCATGTAT
ATGAATACGAGTCCATTTTCTTTTTTCTTCGTAATCAATCCTTT
CATTTCCGATTAACATTTTCTCAGGTCTTTCTTGAGCGAATATA
TTTCTATGGAAAAATAGAACATTTTGTCGAAGTCTTTACTAAGG
ATTTTCGGGACAGCTTATGCTTGCTCAAGGATCCTTTCATACAT
TATGTTAGATATCAAGGAAAATCCATTTTGGTCTCAAAGGATAC
GCCTCTTCTGATGAAAAAATGGAAAGATTACCTTGTCATTTTAT
GTCAATGTCATTTTGATGTGTGCTTCAACCAAAAAAGATACAT
AAAAACCCATTATCATTATACAAGTATTCTTTCGCCTTATTAGG
CTATCTTTC AAGTGTACGACTAAACCTTTCAGTGGTACGGAGTC
AAATGCTAGAAAATACATTTCTAATAGAGAATACTATGAATAA
ACTCGATACAACAGTTTCAATTATTCTTTGATTGGATCATTAG
AAAAAATGAAATTTTGTAACGCAGTAGGACATCCATTAGTAA
ACCGACCTGGGCCGATTTCTCGGATTCGGATATTATCGACCGAT
TTGTCTGTATATGCAGAAATCTTCTCATTATTATAGCGGATCC
TCAAGAAAAAAGAGTTTGTATCGAATAAAAATATATACTTCGAC
TTTCTT

Gambar lampiran 2. Hasil *alignmt* (sekuen *rbcl*)



Gambar lampiran 3. Hasil *alignmt* (sekuen *matK*)



Gambar lampiran 6. Pencarian (sekuen *rbcl*)

MEGA-Capture Export Print Book For Substitution Models (B4)

File Edit View Help

Results

Table: Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIK	AICc	ML	I+J	I+Q	R	RA	RT	RC	RAI	RAQ	RTA	RTC	RTQ	RCR	RCQ	RTR	RTCQ	RTCQ	RTQR	RTCR	RTCQ		
JC+G	38	2133.244	1955.635	-9869.420	na	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	
JC	37	2136.703	1995.679	-9905.814	na	na	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	
JC+G4	38	2137.791	1952.325	-9873.023	0.49	0.25	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	
JC4	38	2140.384	1962.245	-9822.965	0.49	na	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	
TI2+G	40	2141.243	1949.491	-9844.094	na	0.05	0.50	0.251	0.251	0.219	0.219	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019
K2+G	39	2142.951	1957.925	-9856.613	na	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
TI2	38	2144.599	1859.111	-9904.416	na	na	0.50	0.251	0.251	0.219	0.219	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019
TI2+G4	41	2145.829	1945.726	-9817.038	0.49	0.05	0.50	0.251	0.251	0.219	0.219	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019
K2	38	2148.312	1993.939	-9859.953	na	na	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
K2+G4	40	2147.089	1954.301	-9874.004	0.49	0.05	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
TI24	40	2149.371	1955.903	-9878.055	0.49	na	0.50	0.251	0.251	0.219	0.219	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019	0.019	0.000	0.019
KI2H	38	2149.674	1984.219	-9922.070	0.49	na	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
TI2H+G	42	2150.198	1951.787	-9853.722	na	0.05	0.50	0.272	0.288	0.210	0.228	0.002	0.067	0.062	0.007	0.070	0.073	0.007	0.104	0.073	0.006	0.092	0.067	0.097	0.067
TI2H+G4	43	2151.580	1946.958	-9863.390	na	0.05	0.57	0.272	0.289	0.210	0.228	0.002	0.067	0.060	0.006	0.105	0.072	0.006	0.119	0.072	0.006	0.092	0.097	0.097	
HIY	41	2162.493	1982.354	-9903.023	na	na	0.50	0.272	0.289	0.210	0.228	0.002	0.067	0.062	0.007	0.070	0.073	0.007	0.105	0.073	0.006	0.092	0.097	0.097	
HIY+G4	43	2163.096	1846.994	-9813.200	0.49	0.05	0.55	0.272	0.288	0.210	0.228	0.003	0.067	0.060	0.007	0.070	0.073	0.007	0.104	0.073	0.006	0.090	0.097	0.097	
TI2H3	42	2164.944	1957.553	-9866.615	na	na	0.50	0.272	0.289	0.210	0.228	0.002	0.067	0.060	0.007	0.105	0.072	0.007	0.121	0.072	0.006	0.092	0.097	0.097	
HIY4	42	2165.127	1958.828	-9872.959	0.49	na	0.50	0.272	0.289	0.210	0.228	0.002	0.067	0.062	0.007	0.070	0.073	0.007	0.104	0.073	0.006	0.092	0.097	0.097	
TI2H3+G	44	2166.289	1844.273	-9777.960	0.49	0.05	0.57	0.272	0.289	0.210	0.228	0.001	0.066	0.060	0.006	0.105	0.072	0.006	0.115	0.072	0.006	0.091	0.096	0.096	
TI2H4	43	2169.544	1953.542	-9853.952	0.49	na	0.50	0.272	0.289	0.210	0.228	0.002	0.067	0.060	0.007	0.104	0.072	0.007	0.111	0.072	0.006	0.092	0.097	0.097	

Gambar lampiran 7. Pencarian parameter (sekuen *matK*)

MEGA-Capture Export Print Book For Substitution Models (B4)

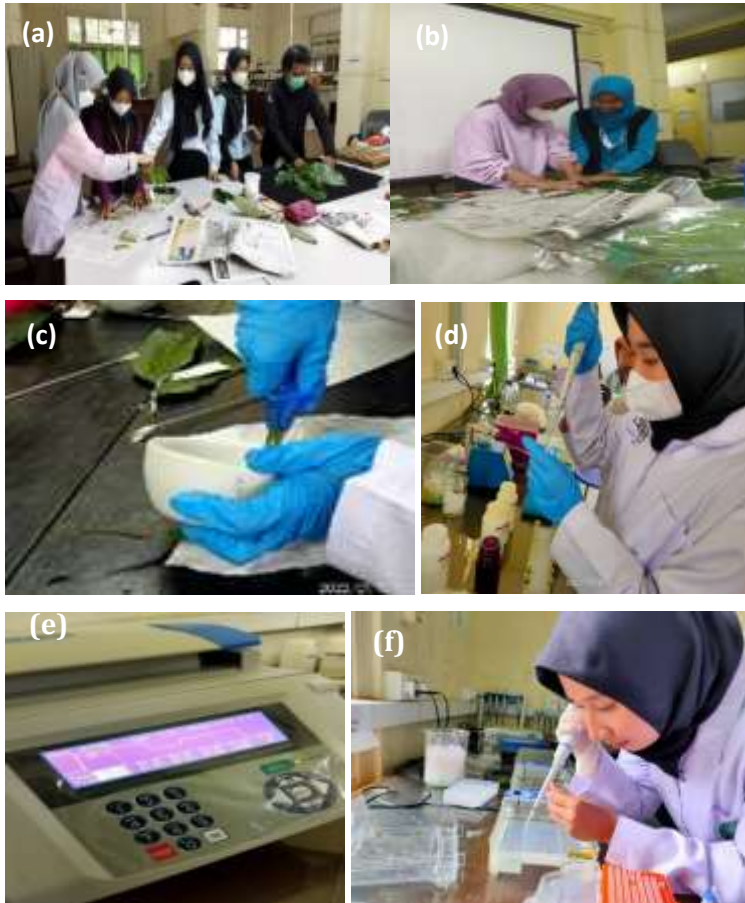
File Edit View Help

Results

Table: Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIK	AICc	ML	I+J	I+Q	R	RA	RT	RC	RAI	RAQ	RTA	RTC	RTQ	RCR	RCQ	RTR	RTCQ	RTCQ	RTQR	RTCR	RTCQ	
TI2	20	13360.491	12185.207	-6955.533	na	na	0.50	0.337	0.337	0.163	0.163	0.301	0.040	0.005	0.101	0.085	0.049	0.101	0.134	0.049	0.134	0.301	0.301	0.301
TI2+G	30	13369.615	12100.912	-6953.391	na	na	0.50	0.337	0.337	0.163	0.163	0.301	0.040	0.005	0.101	0.085	0.049	0.101	0.134	0.049	0.134	0.301	0.301	0.301
TI24	30	13380.915	12167.212	-6953.531	0.00	na	0.50	0.337	0.337	0.163	0.163	0.301	0.040	0.005	0.101	0.085	0.049	0.101	0.134	0.049	0.134	0.301	0.301	0.301
TI2+G4	31	13369.005	12107.894	-6952.902	0.00	21.92	0.50	0.337	0.337	0.163	0.163	0.302	0.040	0.005	0.102	0.085	0.049	0.102	0.134	0.049	0.134	0.302	0.302	0.302
HIY	31	13416.386	12198.208	-6962.053	na	na	0.50	0.351	0.322	0.157	0.169	0.097	0.047	0.007	0.100	0.062	0.051	0.106	0.129	0.051	0.130	0.097	0.097	
TI2H3	32	13418.953	12191.414	-6956.622	na	na	0.57	0.351	0.322	0.157	0.169	0.099	0.048	0.007	0.107	0.060	0.052	0.107	0.091	0.052	0.130	0.099	0.099	
HIY+G	32	13425.770	12103.231	-6962.030	na	109.45	0.50	0.351	0.322	0.157	0.169	0.097	0.047	0.007	0.106	0.062	0.051	0.106	0.129	0.051	0.140	0.097	0.097	
HIY4	32	13426.685	12109.126	-6962.478	0.00	na	0.50	0.351	0.322	0.157	0.169	0.097	0.047	0.007	0.106	0.063	0.051	0.106	0.129	0.051	0.140	0.097	0.097	
TI2H3+G	33	13428.314	12103.206	-6959.598	na	153.70	0.57	0.351	0.322	0.157	0.169	0.099	0.048	0.007	0.107	0.060	0.052	0.107	0.092	0.052	0.131	0.099	0.099	
TI2H4	33	13428.490	12193.533	-6956.676	0.00	na	0.57	0.351	0.322	0.157	0.169	0.099	0.048	0.007	0.107	0.060	0.052	0.107	0.092	0.052	0.130	0.099	0.099	
HIY+G4	33	13435.820	12190.882	-6956.341	0.00	73.21	0.50	0.351	0.322	0.157	0.169	0.097	0.047	0.005	0.105	0.063	0.051	0.105	0.129	0.051	0.140	0.097	0.097	
TI2H3+G4	34	13441.312	12198.937	-6960.072	0.00	108.65	0.55	0.351	0.322	0.157	0.169	0.100	0.049	0.007	0.109	0.066	0.052	0.106	0.077	0.052	0.130	0.100	0.100	
GTR	35	13445.299	12105.467	-6957.632	na	na	0.57	0.351	0.322	0.157	0.169	0.090	0.046	0.006	0.098	0.060	0.050	0.106	0.092	0.052	0.178	0.111	0.111	0.111
GTR+G	36	13452.801	12198.590	-6959.199	na	na	0.58	0.351	0.322	0.157	0.169	0.091	0.046	0.006	0.099	0.060	0.050	0.107	0.091	0.052	0.179	0.111	0.111	0.111
GTR4	36	13456.291	12103.072	-6956.429	0.00	na	0.50	0.351	0.322	0.157	0.169	0.093	0.046	0.006	0.101	0.058	0.050	0.108	0.070	0.052	0.179	0.110	0.110	0.110
GTR+G4	37	13463.977	12199.352	-6957.963	0.00	99.55	0.57	0.351	0.322	0.157	0.169	0.090	0.046	0.006	0.098	0.060	0.050	0.109	0.092	0.052	0.178	0.110	0.110	0.110
JC	27	13800.728	12700.282	-8029.090	na	na	0.50	0.250	0.250	0.250	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
K2	26	14005.085	13697.200	-8820.535	na	na	0.50	0.250	0.250	0.250	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
JC4	28	13809.549	12701.674	-8029.772	0.00	na	0.50	0.250	0.250	0.250	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003

Gambar lampiran 8. Dokumentasi Penelitian



Keterangan: (a) Karakterisasi morfologi (b) pembuatan herbarium (c) penggerusan sampel (d) ekstraksi DNA (e) proses PCR (f) elektroforesis

(Sumber: Dokumentasi penelitian, 2021)

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

A. Identitas diri

1. Nama Lengkap : Amidatur Rohmaniyah
2. Tempat,
Tanggal Lahir : Demak, 01 November
2001
3. Alamat Rumah : Desa Tempel, RT. 02/RW.
02, Kecamatan Wedung,
Kabupaten Demak
4. No. Handphone : 0895340070504
5. E-mail : amidaturrohmaniyah@gmail.com

B. Riwayat Pendidikan

1. Pendidikan Formal

- a. TK Setia Budi Demak
- b. SD N Tempel Demak
- c. SMP N 1 Wedung Demak
- d. MAN Demak
- e. S1 UIN Walisongo Semarang

2. Pendidikan Non Formal

- a. Madin Nahdhotus Syubban
- b. PP Roudhotul Qur'an Demak

C. Riwayat Organisasi

1. Pengurus Departemen Pendidikan dan Pengkaderan UKM Risalah, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo periode 2020 dan 2021
2. Koordinator Departemen Pendidikan dan Pengkaderan UKM Risalah, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang periode 2022
3. Pengurus Departemen Pendidikan dan Penalaran Himpunan Mahasiswa Jurusan Biologi periode 2021

D. Prestasi

1. 10 besar Peserta lomba LKTI tahun 2022 dengan judul “Proses Pembuatan Yogurt dengan Penambahan Tepung Cangkang Kerang Hijau (*Perna viridis*) sebagai Alternatif Sumber Kalsium untuk Tubuh”
2. Peserta lomba LKTI BIOS-Project tahun 2022 dengan judul “Konservasi Buah Juwet (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) Menggunakan DNA Barcoding *rbcL*”