

TESIS

KERAGAMAN GENETIK SPESIES ENDEMIK POOTI (*Hopea gregaria*) DENGAN PENANDA MOLEKULER DI TAHURA NIPA-NIPA DAN HUTAN LINDUNG NANGA-NANGA SULAWESI TENGGARA

GENETIC DIVERSITY OF ENDEMIC SPECIES OF POOTI (*Hopea gregaria*) BY MOLECULAR IDENTIFICATION IN TAHURA NIPA-NIPA AND NANGA-NANGA PROTECTED FOREST SULAWESI TENGGARA

ANNISA NURISLAMI

M012211006



PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEHUTANAN

FAKULTAS KEHUTANAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

KERAGAMAN GENETIK SPESIES ENDEMIK POOTI (*Hopea gregaria*) DENGAN PENANDA MOLEKULER DI TAHURA NIPA-NIPA DAN HUTAN LINDUNG NANGA-NANGA SULAWESI TENGGARA

GENETIC DIVERSITY OF ENDEMIC SPECIES OF POOTI (*Hopea gregaria*) BY MOLECULAR IDENTIFICATION IN TAHURA NIPA-NIPA AND NANGA-NANGA PROTECTED FOREST SULAWESI TENGGARA

ANNISA NURISLAMI

M012211006



MASTER OF FOREST SCIENCE STUDY PROGRAMME

FACULTY OF FORESTRY

HASANUDDIN UNIVERSITY

MAKASSAR

2024

**GENETIC DIVERSITY OF ENDEMIC SPECIES OF POOTI
(*Hopea gregaria*) BY MOLECULAR IDENTIFICATION IN
TAHURA NIPA-NIPA AND NANGA-NANGA PROTECTED
FOREST SULAWESI TENGGARA**

ANNISA NURISLAMI

M012211006



MASTER OF FOREST SCIENCE STUDY PROGRAMME

FACULTY OF FORESTRY

HASANUDDIN UNIVERSITY

MAKASSAR

2024

KERAGAMAN GENETIK SPESIES ENDEMIK POOTI (*Hopea gregaria*) DENGAN PENANDA MOLEKULER DI TAHURA NIPA-NIPA DAN HUTAN LINDUNG NANGA-NANGA SULAWESI TENGGARA

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi

Magister Ilmu Kehutanan

Disusun dan diajukan oleh

ANNISA NURISLAMI

M012211006

kepada

FAKULTAS KEHUTANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR

2024

TESIS

**KERAGAMAN GENETIK SPESIES ENDEMIK POOTI (*Hopea gregaria*)
DENGAN PENANDA MOLEKULER DI TAHURA NIPA-NIPA DAN
HUTAN LINDUNG NANGA-NANGA SULAWESI TENGGARA**

Disusun dan diajukan oleh:

**ANNISA NURISLAMI
NIM : M012211006**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam
rangka Penyelesaian Studi Program Ilmu Kehutanan Fakultas Kehutanan
Universitas Hasanuddin
pada tanggal 15 Maret 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping


**Prof. Dr. Ir. Muh. Restu, M.P
NIP. 19650904199203 1 003**


**Dr. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P
NIP. 198202092015042002**

Ketua Program Studi S2
Ilmu Kehutanan

Dekan Fakultas Kehutanan
Universitas Hasanuddin


**Ir. Mukrimin S. Hut., MP., Ph.D., IPU
NIP.197802092008121001**


**Dr. A. Mujetahid M. S. Hut., M.P.
NIP. 196902081997021002**

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Keragaman Genetik Spesies Endemik Pooti (*Hopea Gregaria*) dengan Penanda Molekuler di Tahura Nipa-Nipa dan Hutan Lindung Nanga-Nanga Sulawesi Tenggara" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Prof. Dr. Ir. Muh. Restu, M.P sebagai Pembimbing Utama dan Dr. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal (IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Volume 1277, Halaman 012038, dan DOI 10.1088/1755-1315/1277/1/012038) sebagai artikel dengan judul "POLYMORPHISM *Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) PRIMERS FOR GENETIC DIVERSITY FOR POOTI PLANTS (Hopea gregaria)*".

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 17 Maret 2024



Annisa Nurislami

PRAKATA

Puji Syukur penulis panjatkan kehadiran **Allah SWT** berkat limpahan rahmat, petunjuk, hidayah, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyelesaikan tesis ini dengan judul **“Keragaman Genetik Spesies Endemik Pooti (*Hopea Gregaria*) dengan Penanda Molekuler di Tahura Nipa-Nipa dan Hutan Lindung Nanga-Nanga Sulawesi Tenggara”**.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan tesis ini banyak kekurangan yang disebabkan oleh keterbatasan penulis. Namun adanya bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Dengan segala kerendahan hati penulis persembahkan kepada Ayahanda tercinta Bapak **Serma Muhammad Hamsa**, Ibunda yang kusayangi Ibu **Ira Surlanti**, dan nenek tercinta **Indo Sakka** yang senantiasa mendoakan, memberikan perhatian, kasih sayang, nasehat, dan semangat kepada penulis. Serta adik-adikku tercinta **Akyar Resky Nur Sahrian** dan **Aisyah Ayudia Azzahra** terima kasih atas doa, dukungan, dan kasih sayang yang telah diberikan selama ini. Tak lupa pula penulis ucapkan terima kasih kepada Paman tercinta **Lettu Inf. Mustaking, S. Sos.** yang telah memberikan dukungan kepada penulis agar melanjutkan studi dan sudah menganggap penulis seperti anaknya sendiri.

Penghormatan dan terima kasih yang sedalam-dalamnya penulis persembahkan kepada:

1. Bapak **Prof. Dr. Ir. Muh. Restu, M.P.**, dan Ibu **Dr. Siti Halimah Larekeng, S.P., M.P.**, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing serta memberikan arahan dalam penelitian hingga tesis ini selesai.
2. Bapak **Prof. Dr. Ir. Ngakan Putu Oka, M.Sc.**, Bapak **Ir. Mukrimin, S.Hut, M.P., PhD., IPU.** dan Ibu **Dr. Ir. Sitti Nuraeni, M.P.**, selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun hingga tesis ini selesai serta seluruh staf pengajar yang telah mencurahkan ilmunya selama penulis menempuh pendidikan di Universitas Hasanuddin.
3. Bapak **Dr. Faisal Danu Tuheteru, S.Hut., M.Si.**, dan Bapak **Albasri, S. Hut., M. Hut.**, dan rekan-rekan **Fakultas Kehutanan dan Ilmu Lingkungan Universitas Haluoleo** yang telah menyediakan waktu dan tenaganya untuk turun ke lapangan saat pengambilan sampel yang dilakukan di dua lokasi yaitu Tahura Nipa-Nipa Kendari dan Hutan Lindung Nanga-Nanga.
4. Rekan-rekan **Atisa Muslimin, S. Hut., M. Hut., Nurul Musdalifah, S. Hut, M. Hut., Muh. Yusril Suryamsyah, S. Hut.**, dan **Syamsumarlin, S. Hut.**, yang selalu bersedia menemani, dan membantu penulis dari penelitian hingga tesis ini selesai. Terima kasih atas kebersamaan, kerjasama, dan semangat yang telah kalian berikan.
5. Kepada **semua pihak** yang turut membantu dalam penelitian ini namun tidak disebutkan satu persatu khususnya kepada rekan-rekan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon.

Penulis berharap semoga hasil penelitian yang tertuang dalam tesis ini dapat memberikan manfaat bagi para pembacanya.

Makassar, Maret 2024

Annisa Nurislami

ABSTRAK

ANNISA NURISLAMI. Keragaman Genetik Spesies Endemik Pooti (*Hopea Gregaria*) dengan Penanda Molekuler di Tahura Nipa-Nipa dan Hutan Lindung Nanga-Nanga Sulawesi Tenggara (dibimbing oleh Muhammad Restu dan Siti Halimah Larekeng).

Pooti (*Hopea gregaria*) merupakan salah satu pohon endemik yang berada di Sulawesi Tenggara dan telah dilaporkan oleh pihak IUCN pada tahun 1998 masuk dalam kategori terancam punah. Salah satu cara untuk mempertahankan spesies tersebut dari kepunahan yaitu dengan cara melakukan pemuliaan tanaman melalui keragaman genetik. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan primer ISSR yang dapat digunakan untuk kajian analisis molekuler dan menganalisis keragaman genetik *Hopea gregaria* berdasarkan marka ISSR. Tahapan penelitian terdiri dari pengambilan sampel daun di Tahura Nipa-Nipa Kendari dan Hutan Lindung Nanga-Nanga sebanyak 50 sampel daun, Isolasi DNA menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*), seleksi primer ISSR yang dilanjutkan dengan analisis keragaman genetik menggunakan perangkat lunak Darwin 6.5. Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer yang dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik pooti adalah primer UBC 810, UBC 813, UBC 823, UBC 827, UBC 830, UBC 814, dan UBC 822. Sampel yang berasal dari Tahura Nipa-Nipa Kendari dan Hutan Lindung Nanga-Nanga memiliki nilai Heterozigositas (H_e) tergolong tinggi yaitu 0.5.

ABSTRACT

ANNISA NURISLAMI. Genetic Diversity of Pooti (*Hopea Gregaria*) Endemic Species with Molecular Markers in Tahura Nipa-Nipa and Nanga-Nanga Protected Forest, Southeast Sulawesi (supervised by Muhammad Restu and Siti Halimah Larekeng).

Pooti (*Hopea gregaria*) is one of the endemic trees in Southeast Sulawesi and has been reported by the IUCN in 1998 as endangered. One way to defend the species from extinction is by conducting plant breeding through genetic diversity. This study aims to determine ISSR primers that can be used for molecular analysis studies and analyze the genetic diversity of *Hopea gregaria* based on ISSR markers. The research stages consisted of leaf sampling in Tahura Nipa-Nipa Kendari and Nanga-Nanga Protection Forest as many as 50 leaf samples, DNA isolation using the CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) method, ISSR primer selection followed by genetic diversity analysis using Darwin 6.5 software. The results showed that the primers that can be used for pooti genetic diversity analysis are primers UBC 810, UBC 813, UBC 823, UBC 827, UBC 830, UBC 814, and UBC 822. Samples from Tahura Nipa-Nipa Kendari and Nanga-Nanga Protected Forest have a high Heterozygosity (H_e) value of 0.5.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KESANGGUPAN	
HALAMAN PENGESAHAN	v
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	vi
PRAKATA	vii
ABSTRAK	x
<i>ABSTRACT</i>	<i>xi</i>
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Kegunaan Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Deskripsi Pooti (<i>Hopea gregaria</i>)	5
B. Keragaman Genetik	10
C. Penanda Genetik	12
D. Penanda ISSR	14
E. Uji Kualitas DNA dan Uji Kuantitas DNA	15
F. Tahura Nipa-Nipa	18
G. Hutan Lindung Nanga-Nanga	19
H. Kerangka Pikir Penelitian	21
III. METODE PENELITIAN	23
A. Waktu dan Tempat Penelitian	23
B. Alat dan Bahan	23
C. Prosedur Penelitian	24
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
A. Uji Kualitas DNA	33
B. Uji Kuantitas DNA	34

C. Seleksi Primer dan Analisis Polimorfisme	35
D. Analisis Keragaman Genetik	38
V. PENUTUP	46
A. Kesimpulan	46
B. Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	53

DAFTAR TABEL

No. Urut	Halaman
Tabel 1. Nama Primer dan Sekuen Primer ISSR	29
Tabel 2. Hasil Uji Kuantitas DNA	35
Tabel 3. Nama Primer ISSR Hasil Amplifikasi pada Pooti	36
Tabel 4. Nilai Heterozigot dan Nilai PIC	38

DAFTAR GAMBAR

No. Urut	Halaman
Gambar 1. Pohon Pooti	7
Gambar 2. Batang Pohon Pooti	7
Gambar 3. Daun Pooti Tampak Depan dan Belakang	8
Gambar 4. Kerangka Pikir Penelitian	22
Gambar 5. Peta Lokasi Penelitian di Tahura Nipa-Nipa dan Hutan Lindung Nanga-Nanga, Kota Kendari, Sulawesi Tenggara	23
Gambar 6. Prosedur penelitian secara umum untuk analisis keragaman genetik <i>Hopea gregaria</i> dengan teknik ISSR	32
Gambar 7. Hasil Uji Kualitas DNA	33
Gambar 8. Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR Primer UBC 810 dan UBC 813	37
Gambar 9. Hasil Dendogram dari Taman Hutan Raya Nipa-Nipa dan Hutan Lindung Nanga-Nanga Menggunakan Penanda ISSR	41

DAFTAR LAMPIRAN

No. Urut	Halaman
Lampiran 1. Peta Lokasi Penelitian Sebaran Sampel Hutan Lindung Nanga-Nanga	64
Lampiran 2. Peta Lokasi Penelitian Sebaran Sampel Tahura Nipa-Nipa .	65
Lampiran 3. Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR Primer UBC 810 dan UBC 813	66
Lampiran 4. Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR Primer UBC 823	66
Lampiran 5. Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR Primer UBC 827 dan UBC 830	67
Lampiran 6. Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR Primer UBC 814	67
Lampiran 7. Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR Primer UBC 822	68
Lampiran 8. Elektroforegram Hasil Amplifikasi PCR Primer UBC 827 dan UBC 830	68
Lampiran 9. Tabel Jarak Genetik	69

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang memiliki iklim tropis sehingga menjadikan negara ini sebagai pusat keanekaragaman hayati terbesar kedua di dunia. Diantara semua pulau besar di Indonesia, pulau Sulawesi menjadi salah satu pulau yang memiliki keanekaragaman hayati, unik dan endemisme yang tinggi. Hal ini terjadi karena belum pernah terintegrasi sepenuhnya dengan benua tetangganya di Asia dan Australia, sehingga menjadi pulau dengan jenis flora dan fauna yang memiliki karakter unik tersendiri (Sutrisna *et al.*, 2018).

Spesies tanaman endemik terancam punah dan memiliki persebaran yang sempit telah dilaporkan oleh pihak IUCN pada tahun 1998 yaitu pohon pooti yang terdapat di Sulawesi Tenggara. Pooti (*Hopea gregaria*) merupakan pohon yang termasuk dalam famili Dipterocarpaceae yang rata-rata ukurannya bisa mencapai 35 m meski diduga juga dapat ditemukan di Pulau Aru (Maluku) dan Yapen (Papua) (Danu Tuheteru & Made Suardi Sanjaya, 2019). Salah satu cara untuk mempertahankan spesies tersebut dari kepunahan yaitu dengan cara melakukan pemuliaan tanaman.

Kegiatan pemuliaan tanaman memerlukan kontribusi genetika molekuler. Genetika molekuler adalah cabang genetika yang mempelajari struktur dan aktivitas materi genetik suatu organisme, termasuk gen yang mengontrol karakteristik organisme. Keragaman genetik dapat diketahui dengan menganalisis parameter morfologi. Namun karena sifat morfologi

sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Kumar *et al.*, 2017), sehingga dibutuhkan parameter lain seperti menggunakan marka molekuler untuk memperoleh informasi genetik tanpa dipengaruhi oleh faktor lingkungan.

Informasi genetik tentang tumbuhan hutan dapat diperoleh dengan menggunakan berbagai penanda seperti penanda morfologi, biokimia, penanda molekuler, dan pendekatan sekuensing. Penanda molekuler memiliki kelebihan karena sifat polimorfik, kodominan, perilaku netral selektif, pengujian yang mudah dan cepat, reproduktifitas tinggi dan pertukaran data yang mudah antar laboratorium (Chinnappareddy *et al.*, 2013).

Analisis genetik diperlukan sebagai penanda pemuliaan tanaman dan memberikan informasi tingkat keragaman genetik yang mencerminkan sumber daya genetik yang diperlukan untuk tindakan konservasi. Teknik molekuler merupakan teknik yang efektif dan dapat dikombinasikan dengan penanda lainnya (Qiao *et al.*, 2022). Keragaman genetik adalah tingkatan biodiversitas yang mengacu pada jumlah total variasi genetik diantara semua spesies yang terdapat pada sebagian atau seluruh permukaan bumi yang dapat dihuni di bumi. Informasi mengenai keragaman genetik sangat diperlukan untuk mendukung upaya pemuliaan tanaman. Penanda molekuler yang telah digunakan pada beberapa tanaman perkebunan dan tanaman hutan antara lain RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Makmur *et al.*, 2020; Saranya & Ravi, 2018), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Cai *et al.*, 2020; S. H. Larekeng *et al.*, 2018), SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Carneiro *et al.*, 2011; Guo *et*

al., 2022; Restu *et al.*, 2017), dan ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (Akzad *et al.*, 2021; Ardiyani *et al.*, 2014).

Inter simple sequence repeats (ISSR) merupakan penanda molekuler yang telah banyak digunakan dalam studi keragaman genetik antar aksesori maupun kultivar pada beberapa spesies. ISSR memiliki keunggulan dibandingkan dengan penanda molekuler dominan lainnya yaitu menghasilkan polimorfisme fragmen DNA lebih tinggi, terpercaya, keterulangan (*reproducibility*) lebih tinggi dibandingkan penanda molekuler RAPD, annealing temperature primer tinggi dan desain primer berdasarkan area mikrosatelit (Almeida Pereira, 2017; Li dan Ge, 2001). ISSR berbeda dengan penanda molekuler SSR karena merupakan penanda molekuler dominan dan tidak membutuhkan informasi awal sekuens untuk desain sekuens primer (Sousa *et al.*, 2015).

Studi keragaman genetik khusus pada pooti belum pernah dilakukan, sehingga informasi genetik jenis ini belum tersedia. Penelitian keragaman genetik dengan penggunaan penanda molekuler ini sangat membantu proses pemuliaan karena pohon *Hopea gregaria* bersifat endemik dan terancam punah.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana tingkat kemampuan primer ISSR dalam mengamplifikasi DNA pada spesies endemik *Hopea gregaria* di Taman Hutan Raya (Tahura) Nipa-Nipa Kendari dan Hutan Lindung Nanga-Nanga?

2. Bagaimana tingkat keragaman genetik spesies endemik *Hopea gregaria* dari tegakan *Hopea gregaria* di Taman Hutan Raya (Tahura) Nipa-Nipa Kendari dan Hutan Lindung Nanga-Nanga menggunakan marka ISSR?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Menentukan primer ISSR yang dapat digunakan untuk kajian analisis molekuler spesies endemik *Hopea gregaria*
2. Menganalisis keragaman genetik *Hopea gregaria* berdasarkan marka ISSR di Tahura Nipa-Nipa Kendari dan Hutan Lindung Nanga-Nanga.

D. Kegunaan Penelitian

Primer yang berhasil digunakan pada sampel *Hopea gregaria* diharapkan dapat menjadi sumbangan bagi kegiatan pemuliaan pohon untuk mendapatkan sifat unggulan yaitu melalui analisis keragaman genetik. Keragaman genetik yang tinggi direkomendasikan sebagai sumber genetik dan untuk pembangunan kebun benih yang bahan tanamannya bermutu tinggi.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Deskripsi Pooti (*Hopea gregaria*)

1. Klasifikasi

Klasifikasi Pooti adalah sebagai berikut (*International Union Of Conservation Nature*) (IUCN, 2020):

Kingdom	: Plantae
Phylum	: Tracheophyta
Classis	: Magnoliopsida
Ordo	: Malvales
Family	: Dipterocarpaceae
Genus	: <i>Hopea</i>
Species	: <i>Hopea gregaria</i> .

Pooti (*Hopea g.*) merupakan pohon berukuran sedang yang tingginya mencapai 35 m. Jenis ini mempunyai persebaran yang sempit dan hanya terdapat di Sulawesi Tenggara dalam famili Dipterocarpaceae. Spesies ini telah dilaporkan terancam punah oleh IUCN sejak tahun 1998 (Albasri, Faisal Danu Tuheteru, 2019).

Dipterocarpaceae menjadi salah satu pohon hutan yang mendominasi hutan hujan tropis Indonesia. Terdapat beberapa tipe hutan yang terdiri dari hutan-hutan Dipterocarpaceae dataran rendah yang berada di Indonesia (Maria *et al.*, 2016). Secara ekologis, spesies Dipterocarpaceae mempunyai beberapa faktor pembatas pertumbuhan dan persebarannya. Faktor yang paling menentukan adalah tanah, iklim dan ketinggian tempat (Purwaningsih, 1970).

Famili Dipterocarpaceae merupakan pohon besar dengan tajuk yang sangat khas dengan banir yang beragam (hampir semua genus mempunyai banir yang berbeda-beda). Variasi kulit batang pada famili Dipterocarpaceae sangat banyak, misalnya pada kulit batang famili Dipterocarpaceae banyak mengandung lentisel, namun pada jenis *Vatica* dan *Cotylelobium*, kulit batang biasanya cukup halus dengan garis-garis mendatar hampir menutupi batangnya. Resin Dipterocarpaceae biasanya berwarna putih, kuning, coklat, atau hitam (Fajri, 2008). Jenis Dipterocarpaceae tidak dapat tumbuh di atas ketinggian 1.500 meter di atas permukaan laut, karena semakin tinggi ketinggian maka semakin sedikit jenis Dipterocarpaceae yang dapat ditemukan (Purwaningsih, 2004).

Jenis dari famili Dipterocarpaceae umumnya berupa pohon yang tumbuh lambat dan menjulang tinggi (*emergent trees*) yang kayunya digunakan sebagai bahan bangunan. Eksploitasi secara berlebihan terhadap spesies ini telah mengakibatkan penurunan populasi secara signifikan, dan pemulihan spesies ini di hutan primer akan memakan waktu yang sangat lama. Karena nilai ekonominya yang tinggi, spesies Dipterocarpaceae mendominasi perdagangan kayu internasional, khususnya di Asia Tenggara (Raya *et al.*, 2018).

2. Morfologi



Gambar 1. Pohon Pooti

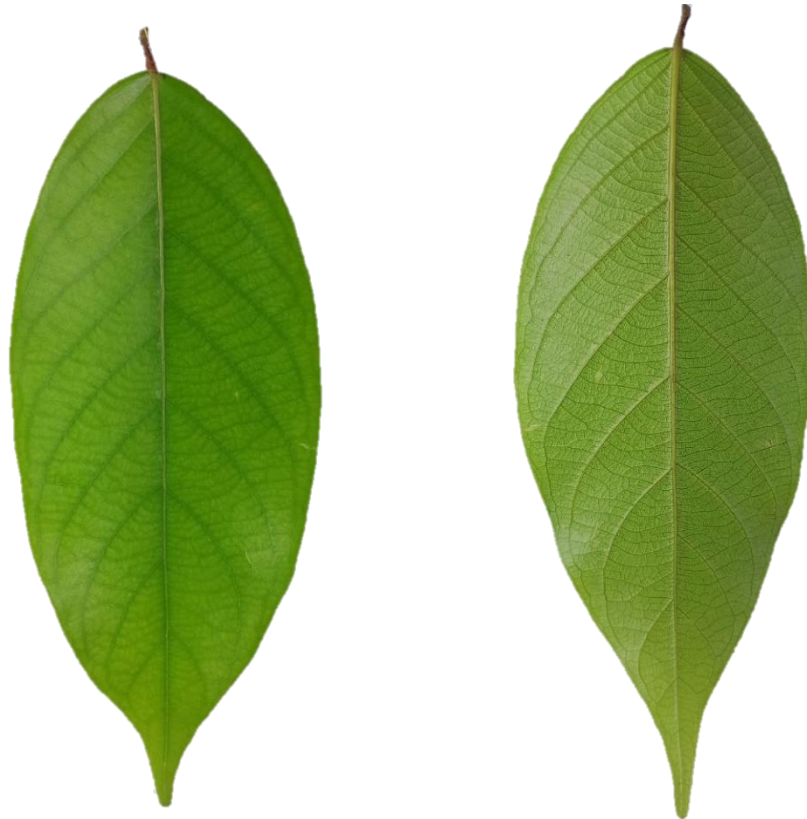
a. Batang



Gambar 2. Batang Pohon Pooti

Bentuk batang silindris berbanir papan, permukaan kulit bersisik, warna kulit batang kehitaman berbercak putih, kulit dalam berwarna kekuningan, batang bergetah bening keputihan, ketebalan kulit batang 0,4 cm (Albasri *et al.*, 2020).

b. Daun



Gambar 3. Daun Pooti Tampak Depan dan Belakang

Bentuk daun lanset (*lanceolate*) biasanya berbentuk bundar telur (*ovate*), tipe daun tunggal. Kedudukan daun berseling, tepi daun rata, ujung daun meruncing (*acuminate*), pangkal helai daun membulat (*rounded*), permukaan bawah daun sedikit bergelombang. Permukaan atas daun rata, urat daun primer nampak jelas pada permukaan daun, urat daun sekunder \pm 6-9 pasang, warna hijau tua pada permukaan daun,

warna hijau muda pada bawah daun sedikit mengkilap. Pertulangan daun menyirip berseling, ukuran tangkai daun $\pm 0,3$ cm, lebar daun $\pm 4-6$ cm, panjang daun $\pm 8-12$ cm (Albasri *et al.*, 2020).

c. Penyebaran dan Habitat

Pooti tersebar di Sulawesi Tenggara tepatnya di hutan pohara (Hakim *et al.*, 2006) dan Tahura Nipa-Nipa (Tuheteru *et al.*, 2020). Kayu pooti digunakan sebagai giam (balau) dan pohon ini menghasilkan resin berwarna putih atau kuning untuk konsumsi lokal (Soerianegara & Lemmens, 1994). Kulit batang pohon pooti mengandung senyawa kimia hopeafenol yang sangat aktif terhadap sel murin leukimia (Hakim *et al.*, 2006).

Umumnya jenis-jenis dari famili Dipterocarpaceae memiliki periode pembungaan dan berbuah dengan interval waktu yang lama hingga mencapai 2-5 tahun (Ghazoul, 2016). Periode pembungaan dan masa pembuahan jenis pooti belum diketahui dengan pasti. Pooti tidak berbuah setiap tahun sehingga menjadi kendala dalam perbanyakan generatif. Perbanyakan bibit pooti secara vegetatif, dilakukan dengan cara setek pucuk, merupakan salah satu teknik alternatif dalam pengadaan bibit beberapa spesies dari family Dipterocarpaceae (Wulandari, Subiakto dan Novan, 2015; Hardiwinoto, Riyanti, Widiyatno, Adriana, Winarni, Nurjanto dan Priyo, 2016).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Albasri, Faisal Danu Tuheteru, 2019) di sekitar sungai Lahundape Tahura Nipa-Nipa Kota Kendari menunjukkan bahwa jumlah individu *Hopea gregaria* yang

ditemukan sebanyak 57 individu pada tingkat pohon, 96 individu pada tingkat tiang, 72 individu pada tingkat pancang dan 106 individu pada tingkat semai. Tingginya jumlah individu pada tingkat semai disebabkan karena kurangnya persaingan tumbuhan bawah dalam memperebutkan unsur hara yang ada di dalam tanah dan juga cahaya matahari dalam proses fotosintesis.

B. Keragaman Genetik

Keragaman genetik adalah tingkatan biodiversitas yang mengacu pada jumlah total variasi genetik diantara semua spesies yang terdapat pada sebagian atau seluruh permukaan bumi yang dapat dihuni di bumi. Informasi mengenai keragaman genetik sangat diperlukan untuk mendukung upaya pemuliaan tanaman. Upaya seleksi memerlukan keragaman genetik yang luas untuk merakit tanaman unggul (Ardiyani *et al.*, 2014).

Keanekaragaman genetik dapat didefinisikan sebagai perbedaan genetik antar individu yang memberikan suatu populasi kemampuan untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan. Variasi dalam keanekaragaman genetik suatu tanaman dapat menjadi informasi dalam pengembangan tanaman tersebut. Pengetahuan tentang sifat-sifat keanekaragaman suatu tanaman sangat diperlukan untuk mempermudah pemuliaan tanaman. Analisis keragaman genetik plasma nutfah memberikan informasi yang sangat berharga untuk memetakan dendrogram, mencari sifat alel baru, dan budidaya tanaman (Zargar *et al.*, 2014).

Keragaman genetik penting bagi tanaman karena memungkinkan mereka beradaptasi terhadap perubahan lingkungan sekitarnya. Informasi tentang keanekaragaman genetik tanaman pada tingkat individu, spesies dan populasi harus dipertimbangkan sebagai dasar pertimbangan ketika mengembangkan strategi konservasi, seleksi, pengelolaan dan pemanfaatan sumber daya genetik secara berkelanjutan. Penilaian keragaman genetik tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan penanda DNA morfologi, biokimia, dan molekuler DNA (Zulfahmi, 2013).

Evaluasi morfologi keragaman genetik tanaman dilakukan dengan uji progeni, uji provenan, dan pengujian lainnya dengan mengamati penampilan fenotipik tanaman. Pengujian ini dilakukan pada lingkungan yang berbeda dengan fokus utama adalah ciri kualitatif dan kuantitatif yang bernilai ekonomi serta ciri yang secara biologi penting seperti kemampuan hidup (*survive*), sifat toleran terhadap stres lingkungan, sifat produksi dan resistensi terhadap hama dan penyakit. Ciri-ciri tersebut bersifat poligenik dan ekspresinya dipengaruhi oleh lingkungan. Studi secara tradisional yang menggunakan metode genetik kuantitatif dan menilai keragaman dan distribusi keragaman terbagi dalam beberapa kelas pengaruh, seperti pengaruh fenotipe, genotipe, lingkungan dan interaksi lingkungan. Penentuan keragaman genetik tanaman secara konvensional ini membutuhkan waktu yang lama, relatif mahal, dipengaruhi oleh lingkungan, dan menghasilkan keragaman yang diperoleh terbatas dan tidak konsisten (Zulfahmi *et al.*, 2013).

Pengetahuan keragaman genetik suatu spesies dalam suatu populasi merupakan langkah penting dalam upaya konservasi sumber daya genetik. Upaya konservasi dan pemuliaan tanaman memerlukan informasi tentang keragaman genetik yang digunakan oleh pemulia tanaman untuk meningkatkan produksi tanaman dan mengkonservasi tanaman yang keberadaannya terancam punah (Boer, 2007).

Pertumbuhan tanaman dipengaruhi oleh faktor genetik dan faktor lingkungan. Laju pertumbuhan dapat ditingkatkan dengan strategi pemuliaan. Sifat tanaman yang didominasi oleh faktor genetik mungkin lebih terlihat pada lingkungan tertentu dibandingkan lingkungan lain. Perbedaan genetik terhadap ketahanan frost tidak akan nampak apabila tanaman ditanam di daerah bebas frost, tetapi hal ini akan menjadi penting apabila tanaman yang sama ditanam di daerah temperatur rendah selama musim pertumbuhan (Maimunah, 2015).

C. Penanda Genetik

Penanda DNA molekuler dapat dikelompokkan menjadi dua, di satu sisi penanda DNA non-PCR (teknik berbasis non-PCR) seperti RFLP dan di sisi lain penanda DNA berbasis PCR antara lain RAPD, AFLP, SSR, CAPS, SCAR, SSCP dan kode batang DNA (Fernandez *et al.*, 2002) . Marka mikrosatelit memiliki sepasang rangkaian primer untuk amplifikasi alel yang lebih stabil dan kuat. Penanda mikrosatelit bersifat kodominan dan menunjukkan tingkat keragaman genetik dan pembeda genotipe yang sangat tinggi, sehingga mampu membedakan genotipe antar varietas (Karakousis *et al.*, 2006).

Tahun 1987, teknologi PCR ditemukan oleh Mullis dan Faloona. Penanda molekuler DNA berkembang pesat dan digunakan dalam berbagai bidang, baik menggunakan primer acak yang tidak memerlukan informasi urutan DNA, maupun menggunakan primer acak yang memerlukan informasi urutan DNA. Hal ini dipengaruhi oleh kecepatan, efektivitas, dan tingkat keberhasilan dalam mendeteksi mutasi DNA tipe tinggi. Teknologi PCR semakin sederhana dan berkembang, biayanya relatif murah, kecepatannya tinggi, sampel pengujiannya sangat sedikit, metode ekstraksi dan amplifikasinya sederhana, dan sidik jari berbasis PCR dapat diterapkan pada semua jenis spesies (Zulfahmi *et al.*, 2013).

PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* yang bertujuan untuk menggandakan jumlah molekul DNA dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang saling melengkapi dengan molekul DNA cetakan menggunakan enzim DNA polimerase dan primer dalam *thermocycler* (Mullis dan Faloona, 1987). Empat komponen utama yang dibutuhkan untuk melakukan proses PCR adalah DNA cetakan (template), primer, DNA polimerase, dan dNTP. Menurut Newton dan Graham (1994), langkah-langkah dalam proses PCR meliputi: i) Denaturasi DNA, pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal (biasanya pada suhu 92 hingga 94°C), ii) langkah hibridisasi, pengikatan primer ke cetakan DNA biasanya bergantung pada suhu leleh primer yang digunakan), serta iii) tahap ekstensi, yaitu pemanjangan primer dengan melakukan polimerisasi nukleotida sehingga membentuk rantai DNA (biasanya pada suhu 72°C). Jumlah salinan DNA yang diperoleh dari proses amplifikasi

adalah $2n$, dimana n adalah jumlah siklus (Newton dan Graham, 1994). Teknik pelabelan berbasis PCR dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu i) menggunakan primer acak atau tidak memerlukan sekuens tertentu dan ii) menggunakan primer spesifik atau mempunyai target sekuens spesifik.

Penanda molekuler DNA yang ideal memiliki kriteria berikut: a) memiliki tingkat polimorfisme sedang hingga tinggi, b) terdistribusi secara merata ke seluruh genom, c) memberikan resolusi yang cukup untuk diferensiasi genetik, d) pewarisan kodominan (dapat membedakan antara homozigot dan heterozigot pada organisme diploid), e) aktivitas netral, f) kesederhanaan teknis, cepat dan murah, g) memerlukan sedikit sampel jaringan dan DNA, h) berkaitan erat dengan fenotipe, i) tidak memerlukan informasi tentang genom organisme. j) data dapat dengan mudah dipertukarkan antar laboratorium (Mondini *et al.*, 2009; Agarwal *et al.*, 2008; Weising *et al.*, 2005).

D. Penanda ISSR

Inter simple sequence repeats (ISSR) merupakan salah satu penanda molekuler yang telah banyak digunakan dalam penelitian karena memiliki kelebihan dibandingkan penanda molekuler lainnya terutama untuk studi keragaman genetik. ISSR menghasilkan polimorfisme fragmen DNA lebih tinggi, terpercaya dan reproduktibilitas bila dibandingkan dengan RAPD (Li dan Ge, 2001).

ISSR merupakan penanda molekuler dengan teknik yang cukup mudah dan sederhana, dapat mendeteksi polimorfisme pada lokus intera

mikrosatelit menggunakan primer yang didesain dari motif SSR dinukleotida maupun trinukleotida sehingga lebih stabil, polimorfisme dan reproduktibilitas tinggi (Ziekiewicz *et al.*, 1994). Penelitian keragaman genetik Dringo lebih banyak dilakukan di India menggunakan penanda molekuler RAPD (Giri *et al.*, 2012), ISSR (Kareem *et al.*, 2011) , DAMD dan ISSR (Rana *et al.*, 2013) .

Penanda molekuler ISSR memiliki beberapa kelebihan antara lain sederhana, cepat, efisien, mampu menghasilkan panjang produk amplifikasi antara 200 - 2.000 bp. Penanda ISSR tidak dipengaruhi musim dan lingkungan (Azrai, 2005), tidak memerlukan data sekuen terlebih dahulu, hanya membutuhkan 5 - 50 ng cetakan (template) DNA per reaksi, ISSR tersebar di seluruh genom, dapat menghasilkan pola polimorfisme lebih tinggi dari pada RAPD (Guo *et al.*, 2009), menghasilkan polimorfisme pada tingkat kultivar (Lu *et al.*, 2011), pada umumnya bersifat dominan meskipun kadang-kadang bersifat kodominan (Kumar, 2009), dan dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik dan analisis kekerabatan (Trojanowska dan Bolibok, 2004). Teknik ini sangat produktif karena penggunaan primer panjang, yang memungkinkan untuk suhu penempelan primer yang tinggi. ISSR ini menggabungkan keunggulan dari penanda AFLP dan SSR dengan kemudahan RAPD.

E. Uji Kualitas DNA dan Uji Kuantitas DNA

Pengujian kualitas DNA merupakan metode standar untuk mengidentifikasi, memisahkan, dan memurnikan fragmen DNA

menggunakan elektroforesis gel agarosa. Kelebihan elektroforesis gel agarosa horizontal menggunakan komparator DNA Lambda adalah penentuan jumlah total DNA yang dihasilkan tidak dipengaruhi oleh kontaminan DNA. DNA yang dihitung adalah DNA yang berada di bagian atas sumur. Dibandingkan dengan alat pengujian lain seperti spektrofotometer, alat ini menghitung jumlah total DNA, termasuk DNA yang rusak dan patah. Elektroforesis horizontal tidak menunjukkan kemurnian DNA, namun kualitas DNA dapat ditentukan dari hasil pendaran yang menunjukkan apakah DNA mengandung kontaminan. Hal ini dapat dilihat dengan munculnya latar belakang yang smear disepanjang jalur pergerakan pita genom DNA. Kualitas yang baik mengacu pada DNA yang bersih dan tidak terkontaminasi oleh komponen-komponen lain dari sel. Menurut Utami (2012), kualitas DNA yang baik dapat dilihat dari tingginya intensitas pita yang dihasilkan dan rendahnya intensitas smear.

Menurut Fatchiyah (2011), kontaminan DNA yang umum ditemukan adalah polisakarida yang dapat mengganggu proses lanjutan seperti PCR, menghambat aktivitas *Taq* polimerasi atau kontaminan lainnya, khususnya polifenol, dalam bentuk teroksidasi, berikatan secara kovalen dengan DNA. Komponen-komponen yang terkait selama proses ekstraksi dijaga kondisinya agar tetap dingin. Sebagai bahan dasar proses PCR, DNA yang digunakan harus bebas dari kontaminan (kemurnian tinggi).

Proses pengambilan dan penyimpanan sampel yang kurang baik dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi. Kesalahan teknik

pengambilan supernatan mengakibatkan kontaminasi dari proses lisis buffer serta proses digesti DNA yang mungkin tidak sempurna karena selama inkubasi, sampel tersebut tidak digoyang (*shaking*) sehingga pada saat pengambilan fenol, sebagian protein tidak ikut terikat dan tetap berikatan dengan DNA dalam sampel. Konsentrasi DNA yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat menyebabkan proses amplifikasi DNA tidak berjalan dengan baik. Konsentrasi yang memerlukan pengenceran DNA dan jika terlalu rendah, dilakukan ekstraksi ulang. Konsentrasi DNA yang telah diperoleh diseragamkan dengan melakukan pengenceran, pengenceran DNA dilakukan agar pada tahap PCR primer dapat menempel pada pita DNA sehingga dapat teramplifikasi baik.

Kualitas DNA juga merupakan komponen yang cukup berpengaruh dalam amplifikasi DNA pada proses PCR, DNA dengan kualitas yang baik merupakan DNA yang tidak mengalami kontaminasi dari komponen-komponen lain dari sel. DNA yang memiliki kualitas baik ialah DNA yang bersih dan tidak terkontaminasi seperti yang dijelaskan diatas bahwa, kontaminasi oleh fenol dan bahan organik lainnya dapat dilihat dengan munculnya latar belakang yang *smear* disepanjang jalur pergerakan pita genom DNA. Restu (2012), mengungkapkan bahwa setiap jenis tanaman memiliki kandungan senyawa sekunder yang berbeda-beda sehingga membutuhkan ekstraksi yang optimum. Teknik ekstraksi yang tepat sangat menentukan kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan.

F. Tahura Nipa-Nipa

Tahura Nipa-Nipa merupakan kawasan hutan konservasi yang ditetapkan oleh pemerintah sebagai kawasan konservasi berdasarkan SK Menhut No. 289/KPTS II/95 tanggal 12 Juni 1995 seluas 7.877,5 Ha yang terletak di Kota Kendari dan Kabupaten Konawe. Tahura Nipa-Nipa terletak pada ketinggian 25 hingga 500 m (dpl) dan memiliki topografi landai berbukit hingga pegunungan. Kelerengan bervariasi antara 15% sampai 40%, jenis tanah podsolik merah kuning, tipe iklim D, dan curah hujan tahunan rata-rata 1.900 mm. Musim kemarau terjadi pada bulan Agustus hingga Oktober. Suhu berkisar antara 19°C hingga 33°C dan kelembapan 83% (Flamin *et al.*, 2013).

Kawasan Tahura dikelola dengan tujuan untuk terjaminnya kelestarian fungsi kawasan hutan dan ekosistemnya serta menjaga tumbuhan, satwa, sumber daya alam kawasan Tahura serta optimalnya manfaat Tahura untuk wisata alam, penelitian, pendidikan, ilmu pengetahuan, menunjang budidaya dan budaya bagi kesejahteraan masyarakat (Rustam, 2013).

Tipe ekosistem hutan meliputi hutan dataran rendah dan hutan pegunungan rendah. Potensi flora dan fauna kawasan Tahura Nipa-Nipa terdiri dari berbagai jenis vegetasi dan jenis dengan komposisi tumbuhan yang berbeda-beda. Potensi flora dan fauna tersebut terdiri dari berbagai jenis vegetasi dan berbagai satwa yang menghuni kawasan Tahura Nipa-Nipa, termasuk jenis Anoa yang merupakan satwa yang dilindungi (Flamin *et al.*, 2013).

Tahura Nipa-Nipa memiliki tipe vegetasi hutan tropika dataran rendah dan pegunungan rendah yang tidak termasuk kedalam family Dipterocarpaceae. Jenis-jenis pohon yang ditemukan pada kawasan Tahura Nipa-Nipa antara lain : damar (*Shorea* sp), bolongita (*Tetrameles nudiflora*), ponto (*Buchanania arbirences*), kuma (*Drypentes longifolia*), bintangur (*Calophyllum* sp), kayu besi (*Metrocyderos petiolata*), eha (*Castanopsis buruana*), bolo-bolo (*Adenandra celebica*), bolo-bolo putih (*Theo lanceolata*), waru (*Hibiscus tiliaceus*), kayu puta (*Barringtonia racemosa*), berbagai jenis palem (*Nongella* sp, *Pinanga caesia* dan *Licuala* sp) serta rotan (*Daemonorops* sp), rotan batang (*Calamus zollingeri*), rotan lambing (*Calamus ornatur var. Celebicus*) dan pooti (*Hopea gregaria*). Satwa liar yang berhabitat di dalam kawasan, antara lain: anoa, rusa, kuskus, musang sulawesi, rangkong, kesturi sulawesi, elang laut (*Haliastur leucogaster*), dan beberapa jenis kupu-kupu (Flamin *et al.*, 2013).

G. Hutan Lindung Nanga-Nanga

Sulawesi merupakan salah satu pulau besar di Indonesia dan secara biogeografis termasuk dalam wilayah Wallacea. Sulawesi Tenggara menjadi salah satu bagian dari wilayah Pulau Sulawesi dan mempunyai flora yang sangat tinggi dengan tipe vegetasi yang berbeda-beda (BKSDA Sultra, 2006). Salah satu kawasan hutan lindung di Sulawesi Tenggara adalah Hutan Lindung Nanga-nanga Papalia (Teras Komunitas, 2008).

Kawasan Hutan Lindung Nanga-nanga Papalia merupakan kawasan hutan yang berada di Kota Kendari. Secara hukum, Hutan Lindung

Nanga-nanga ditetapkan pada tanggal 1 September 1982 berdasarkan Surat Keputusan Menteri Kehutanan Nomor 639/Kepts/um/9/1982. Selanjutnya Kawasan Hutan Lindung Nanga-Nanga ditetapkan menjadi kawasan hutan tetap yang mempunyai fungsi hutan lindung dan hutan produksi, berdasarkan Keputusan Menteri Kehutanan No. 426/Kepts-II/1997 tanggal 30 Juli 1997. Keberadaannya tidak hanya menjadi ciri khas Kota Kendari, namun juga berperan sebagai kawasan resapan air (Departemen Kehutanan, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Rahardi (2014) di Kawasan Hutan Lindung Nanga-Nanga Papalia tersusun atas 53 jenis tumbuhan golongan pohon yang terkelompok dalam 27 famili dan terdistribusi menurut tingkat pertumbuhan semai, pancang, tiang dan pohon.

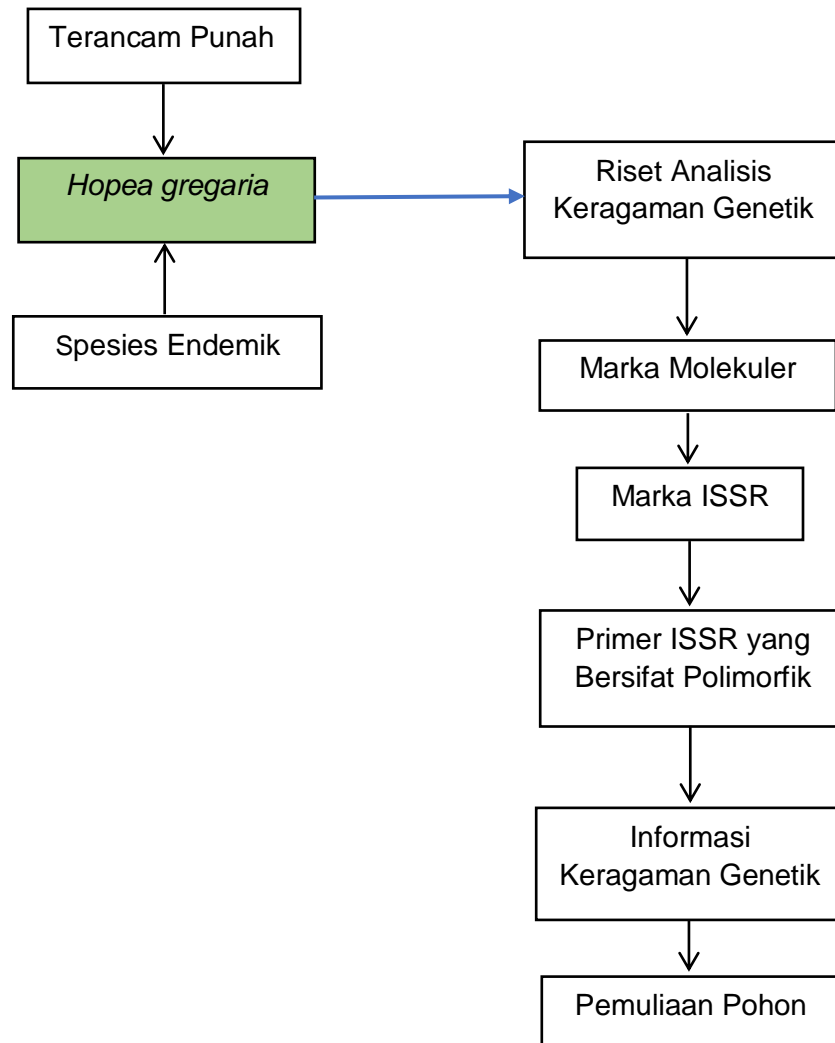
H. Kerangka Pikir

Pooti merupakan spesies endemik Sulawesi Tenggara dan termasuk kategori terancam punah dari famili Dipterocarpaceae, maka dari itu perlu dilakukan pengembangan informasi lebih lanjut untuk jenis pohon *Hopea g.* Pooti tumbuh di hutan alam Pohara dan salah satu jenis tanaman langka karena sulit ditemukan diluar Sulawesi Tenggara.

Besarnya keragaman genetik mencerminkan sumber genetik yang diperlukan untuk kegiatan pemuliaan tanaman. Molekuler merupakan teknik yang efektif dan telah diaplikasikan secara luas dalam program pemuliaan tanaman dan kegiatan yang berkaitan dengan konservasi sumber daya genetik. *Inter simple sequence repeats* (ISSR) merupakan salah satu penanda molekuler yang telah banyak digunakan dalam penelitian karena memiliki kelebihan dibandingkan penanda molekuler lainnya terutama untuk studi keragaman genetik. ISSR menghasilkan polimorfisme fragmen DNA lebih tinggi, terpercaya dan reproduktibilitas bila dibandingkan dengan RAPD (Li dan Ge, 2001).

Dalam rangka pemuliaan pohon spesies endemik *Hopea g.* maka perlu dilakukan pendekatan melalui keragaman genetik berbasis molekuler menggunakan penanda ISSR yang dilakukan di Tahura Nipa-Nipa Kendari dan Hutan Lindung Nanga-Nanga, Sulawesi Tenggara. Sehingga, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah primer ISSR yang digunakan untuk kajian analisis molekuler spesies endemik *Hopea gregaria* bisa teramplifikasi serta menganalisis keragaman genetik *Hopea*

gregaria berdasarkan marka ISSR di Tahura Nipa-Nipa Kendari dan Hutan Lindung Nanga-Nanga sebagai bentuk dukungan pemuliaan pohon.



Gambar 4. Kerangka Pikir Penelitian