

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Syzygium merupakan genus tumbuhan berkayu dengan jumlah spesies terbanyak di kawasan Asia Tenggara yang diperkirakan mencakup sekitar 1000 spesies, namun informasi mengenai genus ini masih sangat terbatas di wilayah *Wallacea*, yaitu zona transisi biogeografis yang signifikan antara kawasan kontinental Asia dan Australia, seperti halnya pada daerah kepulauan Maluku dan Nusa Tenggara dimana keanekaragaman spesies *Syzygium* di Sulawesi belum pernah mengalami proses revisi taksonomi maupun kajian monografis secara menyeluruh. Akibatnya, hingga saat ini belum tersedia data dasar yang memadai terkait komposisi spesies yang terdapat di wilayah tersebut (Brambach dkk., 2017).

Permasalahan terbatasnya data keanekaragaman ini mempunyai implikasi serius terhadap pemahaman ekologi dan konservasi dalam waktu jangka panjang. Keanekaragaman hayati sebagai salah satu komponen penting dalam mendukung keberlanjutan ekosistem, dimana variasi genetik dalam suatu spesies menjadi komponen utama dalam menentukan kapasitas adaptif dan respon evolusioner terhadap perubahan lingkungan (Frankham, 2022). Oleh sebab itu, pemahaman terhadap keragaman genetik dan struktur populasi suatu spesies menjadi sangat penting sebagai dasar untuk pengelolaan sumber daya genetik secara berkelanjutan, khususnya pada wilayah *Wallacea* yang masih minim kajian.

Spesies *Syzygium* yang mempunyai potensi belum terdokumentasi secara menyeluruh salah satunya adalah *Syzygium nervosum*. Spesies ini menunjukkan bahwa tingkat keragaman genetik yang signifikan dan belum terdokumentasi secara komprehensif, namun kompleksitas morfologi dan variasi fenotipik antarpopulasi yang dipengaruhi oleh interaksi antara faktor genetik dan lingkungan yang menimbulkan tantangan serius dalam upaya identifikasi dan karakterisasi yang akurat (Chika dkk., 2024). Permasalahan ini semakin penting untuk diperhatikan dan diselesaikan, mengingat potensi ekologis dan ekonomi *S.nervosum* yang hingga kini belum tereksplorasi dengan optimal.

Pentingnya kajian genetik terhadap *S.nervosum* tidak hanya bertujuan untuk dokumentasi ilmiah, tetapi juga berkaitan erat dengan pengembangan strategi konservasi dan pemanfaatan spesies tersebut. Sebagai salah satu tanaman tropis, *S. nervosum* memiliki nilai penting yang tidak hanya dijadikan sebagai sumber pangan dan tanaman obat, tetapi juga dalam menjaga stabilitas ekosistem hutan. Namun, keterbatasan informasi mengenai basis genetik dan hubungan kekerabatan antar populasi menjadi kendala dalam pengembangan program pemuliaan, pelestarian dan pengembangan varietas unggul (Mudaningrat dkk., 2023). Oleh karena itu, diperlukan pendekatan ilmiah yang dapat mengungkap struktur genetik secara lebih mendalam dan bebas dari pengaruh lingkungan.

Metode yang dinilai efektif untuk mengevaluasi keragaman genetik dengan penggunaan teknik berbasis DNA yaitu dengan melalui pendekatan molekuler. Diantara berbagai metode yang tersedia, *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) menjadi salah satu pilihan utama karena ketersediaan primer yang

mudah diperoleh dan banyak digunakan dalam analisis genetik. Teknik ini memanfaatkan primer acak untuk mengamplifikasi fragmen DNA. Metode ini dinilai efisien dan praktis dalam studi keragaman genetik tanaman, termasuk pada spesies yang belum banyak diteliti.

Urgensi penelitian ini semakin menguat dalam konteks keanekaragaman hayati. Informasi keragaman genetik tanaman diperlukan untuk pelestarian dan pengembangan budidaya *S.nervosum* juga sangat penting untuk pemulia sebagai data awal untuk melakukan perakitan varietas unggul. Namun informasi mengenai keragaman genetik *S.nervosum* di areal Hutan Pendidikan masih sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis dan keragaman genetik *S.nervosum* dengan menggunakan penanda RAPD. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi genetik *S.nervosum* dengan mendukung upaya pengembangan strategi pemuliaan tanaman, konservasi dan pelestarian keanekaragaman hayati, khususnya pada komoditas buah tropis seperti jambu air merah.

1.2 Landasan Teori

Syzygium adalah salah satu genus yang berasal dari suku Myrtaceae dengan jumlah spesies yang sangat beragam, mencakup lebih dari 1193 spesies termasuk *Syzygium nervosum* yang tersebar di kawasan tropis dan subtropis, mulai dari Afrika hingga India, melintasi Asia Tenggara dan meluas ke Hawaii di Samudra Pasifik, dengan titik pusat keanekaragaman di Indonesia (Low dkk., 2021). Tumbuhan ini dikenal mempunyai ciri morfologi yang khas dibandingkan tanaman lain, dengan permukaan daun yang licin dan mengandung kelenjar minyak yang berfungsi sebagai penghasil minyak atsiri, hal tersebut dapat disimpulkan bahwa *Syzygium* memiliki nilai ekonomi, baik sebagai bahan pangan, obat-obatan maupun rempah-rempah (Sinaga dkk., 2025). Spesies ini mempunyai tinggi pohon hingga 15 m, bercabang banyak dengan kulit batang berwarna coklat dan memiliki habitat yang cukup luas, yang dapat tumbuh di dataran rendah dan biasanya hidup di sekitar pinggiran anak sungai atau dekat anak sungai dengan ketinggian 200-600 m di atas permukaan laut. Jenis ini juga cukup banyak ditemui pada Hutan Pendidikan Unhas di sepanjang tepi sungai (Restu dkk., 2023).

Syzygium menjadi salah satu genus yang sulit untuk diklasifikasikan, hal ini terjadi karena karakter morfologi yang dimiliki spesies ini relatif sedikit walaupun secara konsisten menyambungkan suatu spesies ke dalam kelompok spesies tertentu dengan baik (Roslim dan Fitriani, 2021). Tingginya keragaman genetik pada *Syzygium*, khususnya jambu air ini dapat disebabkan dari salah satu faktor yaitu penyerbukan silang yang dapat terjadi secara alami maupun akibat manusia (Anggraheni, 2019). Kompleksitas pengelompokan genus ini juga disebabkan oleh tumpang tindihnya penamaan, yang mengakibatkan terjadinya revisi secara menyeluruh pada genus *Eugenia* menjadi *Syzygium*.

Salah satu spesies dari genus ini adalah *Syzygium nervosum* yang memiliki nama lokal yaitu jambu *je'ne*, jambu hutan dan jambu air merah. Spesies ini memiliki banyak nama latin *Syzygium nervosum* dengan nama lain *Cleistocalyx nervosum*, *Cleistocalyx operculatus*, dan *Eugenia operculata* (Restu dkk., 2024). Jambu air merah (*Syzygium nervosum*) merupakan tumbuhan buah tropis dari famili *Myrtaceae* yang termasuk pada golongan buah non klimakterik, dimana

golongan ini merupakan golongan buah-buahan yang tidak mengalami pematangan lanjutan secara signifikan setelah panen, contoh lain dari buah non klimakterik seperti *Syzygium aqueum*, *Syzygium Cumini*, *Syzygium samarangense*, *Citrus spp*, *Ananas comosus*, dan lainnya. Tumbuhan ini dikenal mempunyai berbagai kultivar, aktivitas biologis yang beragam dan kandungan metabolit sekunder yang tinggi seperti flavonoid, tanin, dan polifenol yang berkontribusi pada sifat antioksidan, antiinflamasi dan potensi farmakologis lainnya (Chika dkk., 2024). Kandungan bioaktif yang beragam ini selain menjadi nilai tambah pada pengembangan produk herbal ataupun fungsional, tetapi juga menjadi indikator adanya diversitas genetik yang signifikan di antara populasi *S.nervosum*.

Kompleksitas fenotipik yang dimiliki *S.nervosum* seperti bentuk daun, warna batang, warna buah dan ukuran tajuk menjadi faktor yang membuat sulit untuk diidentifikasi secara konvensional jika hanya dengan pendekatan morfologi, sehingga hal tersebut dapat menjadi keterbatasan. Hamouda (2019) menyatakan bahwa mengidentifikasi sifat tanaman menggunakan teknologi yang lebih modern dapat memberikan informasi lebih detail. Pendekatan secara molekuler memberikan solusi yang lebih objektif karena mampu menghasilkan keragaman genetik dan karakterisasi yang jelas dari genetik berdasarkan DNA antar fenotip yang tidak dapat diklasifikasikan melalui observasi morfologi saja.

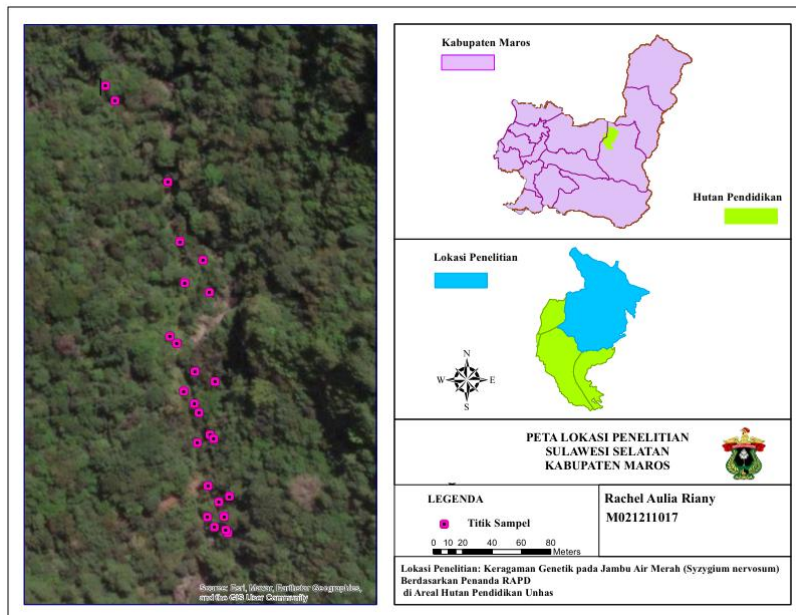
Salah satu metode molekuler yang banyak digunakan yaitu RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). RAPD merupakan salah satu metode studi keragaman genetik yang banyak digunakan. Keuntungan dari penanda ini hanya membutuhkan kuantitas DNA mulai dari yang terkecil dan mudah, hal ini dikarenakan tidak perlunya proses radiaktif, blotting dan hibridisasi, selain itu dengan cepat dapat mendeteksi polimorfisme pada sejumlah lokus (Jonah dkk., 2011 dalam Fitriyanti dkk., 2023).

Penanda RAPD telah banyak digunakan dalam analisis dengan berbagai tujuan. Salah satunya untuk inventarisasi tumbuhan famili Myrtaceae (Rahma dkk., 2023), melihat keragaman genetik dan hubungan *Syzygium alternifolium* di India (Sasikala dan Kkshamma., 2015), dan untuk mendeteksi variasi antar dan intra tingkat yang dikumpulkan dari 3 zona berbeda di India (Khan dkk., 2010).

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan bulan Mei 2025. Lokasi pengambilan sampel di Hutan pendidikan Unhas, Maros, dan analisis keragaman genetik dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan pemuliaan pohon, Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin, Makassar.



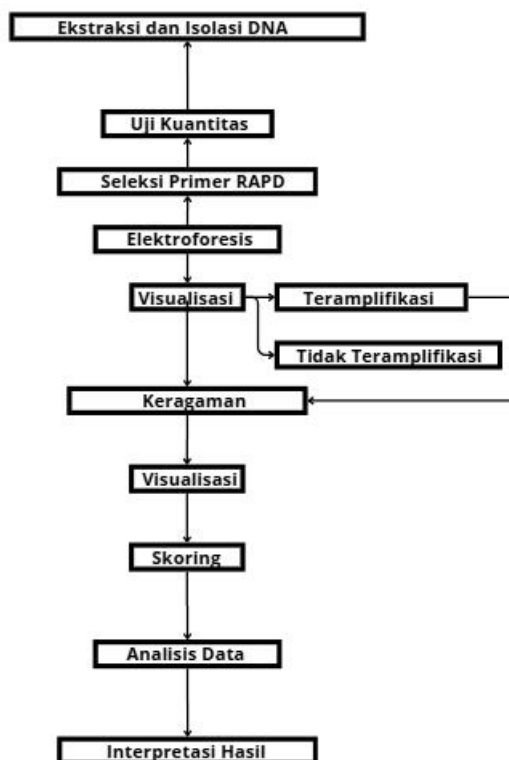
Gambar 1. Titik Lokasi Pengambilan Sampel

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah galah, coolbox, handphone, vortex, centrifuge, waterbath, mortar, pestle, microwave, cetakan agar, gunting, mesin PCR, mikropipet, freezer, Qubit 3.0 Fluorometer, mesin elektroforesis, gelas erlenmeyer, timbangan analitik, dan spatula.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, sampel daun spesies *Syzygium Nervosum*. Plastik sampel, ATK, silica gel, amplop sampel, aquades, alkohol, primer RAPD, tube 2 ml, tube PCR, tube qubit, tip, reagen qubit, red safe, leader, PCR mix, DDH₂O, agarose, dan plant Genomic DNA Mini KIT (Geneaid).**2.3**

2.3 Alur Penelitian



Gambar 2. Bagan Alur Penelitian

2.4 Prosedur Penelitian

Kegiatan penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu, pengambilan sampel, ekstraksi dan isolasi DNA, uji kuantitas dan kualitas DNA, seleksi primer, amplifikasi DNA, separasi hasil amplifikasi DNA, dan analisis keragaman genetik.

2.4.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 sampel dalam 1 tegakan yang berlokasi di Hutan Pendidikan Universitas Hasanuddin, kegiatan penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yaitu memilih jenis sampel tanaman yang dimana pada penelitian ini akan menggunakan daun sebagai eksplan, karena daun mengandung DNA yang tinggi sehingga dapat menghasilkan kuantitas hasil ekstraksi yang lebih tinggi. Daun yang dipilih tidaklah terlalu muda dan tidak terlalu tua, karena bagian tersebutlah yang disebut dengan daun sehat dalam kata lain tidak memiliki tanda penyakit sehingga mudah di ekstrask secara teknik, sedangkan jika menggunakan daun terlalu muda memiliki banyak sel yang belum berkembang dan berfungsi dengan baik, selain itu daun yang terlalu tua memiliki beberapa sel yang telah mati dan tidak berfungsi dengan baik (Khafid dkk., 2021).

2.4.2 Ekstraksi dan Isolasi DNA

Isolasi DNA genom dilakukan dengan menggunakan metode KIT. Daun digerus menggunakan mortal hingga halus kemudian ditimbang seberat 0.1g. Proses ekstraksi dan isolasi dilakukan sebagai berikut:

1. Setiap sampel dari jaringan daun segar (tanpa tulang daun) dipotong dan ditimbang seberat 100 mg. Jaringan ini kemudian di gerus hingga menjadi bubuk.
2. Larutan Buffer GPX1 sebanyak 400 μ l ditambahkan ke dalam tube 2 ml setelah sampel menjadi bubuk, kemudian *vortex* hingga menyatu.
3. Tube diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Dalam proses ini, *tube* 2 ml di*vortex* setiap 10 menit dengan bersamaan dimasukan *elution* ke *waterbath* untuk dihangatkan.
4. *Buffer* GP2 sebanyak 100 μ l ditambahkan ke dalam *tube* yang berisi larutan, setelah itu *tube* di*vortex* dan diinkubasi selama 10 menit di dalam *freezer*.
5. *Tube* di sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 10.000 G.
6. Supernatan yang telah di sentrifugasi dipindahkan ke *tube* 2 ml baru dengan *filter column* (putih) di atasnya dan kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 10.000 G. Selanjutnya *column* (putih) tersebut dibuang. Tambahkan 1,5 *buffer* GP3 sebanyak 750 μ l dan dihomogenkan dengan cara dibolak balik.
7. *Column* (hijau) diletakan pada *tube* 2 ml baru dengan memindahkan larutan sebanyak 700 μ l ke dalam *column* (hijau) dan disentrifugasi selama 2 menit, kemudian larutan pada *tube* di buang dan proses tersebut di ulang sampai larutan habis.
8. Larutan *buffer* W1 sebanyak 400 μ l ditambahkan ke GD *column* (hijau). Sentrifugasi selama 1 menit pada 10.000 G, setelah itu larutan pada *tube* dibuang.
9. *Column* (hijau) diberi 600 μ l larutan *buffer wash* dan disentrifugasi selama 1 menit pada 10.000 G, selanjutnya larutan pada *tube* dibuang.
10. Sentrifugasi kering *column* (hijau) selama 3 menit pada kecepatan 10.000 G
11. *Column* (hijau) dimasukan ke *tube* 2 ml baru dan ditambahkan 100 μ l *buffer elution* yang telah dihangatkan). *Tube* didiamkan pada suhu ruang selama 3-5 menit, selanjutnya disentrifugasi selama 1 menit pada 10.000 G.

12. *Column* (hijau) dibuang hingga diperoleh larutan murni dan ditambahkan 3µl *RNAse* pada DNA. Larutan DNA disimpan di *freezer* dengan kode *DNA master*.

2.4.3 Uji Kuantitas

Uji kualitas DNA dilakukan menggunakan metode elektroforesis horizontal dengan konsentrasi agar 0,8% dalam buffer TAE 1x. Uji kuantitas DNA menggunakan alat *Qubit 3.0 Fluorometer* metode *board range*. Proses uji kualitas dan kuantitas DNA dilakukan sebagai berikut:

Uji Kuantitas

1. Membuat *qubit working* dengan mencampurkan dsDNA reagent sebanyak 1 µl x jumlah sampel dan *qubit buffer* sebanyak 199 µl x jumlah sampel.
2. Memasukkan DNA master kedalam tube *qubit* sebanyak 1 µl, kemudian ditambahkan *qubit working* sebanyak 199 µl.
3. Menguji sampel kemudian didiamkan selama 2 menit ditempat yang gelap.
4. Menguji sampel pada *Qubit 3.0 Fluorometer*.

2.4.4 Seleksi Primer

Primer berfungsi untuk mengawali reaksi replikasi DNA pada reaksi PCR. Primer yang dipilih yaitu primer yang dapat mengeluarkan pita, baik dari kejelasan visualisasi pita ataupun kemudahan dalam melakukan skoring akan menjadi pertimbangan untuk menjadi primer spesifik (Larekeng dkk, 2015). Kondisi optimal serta tingkat variasi pita yang didapatkan dari setiap primer, membutuhkan beberapa primer yang berbeda pada kondisi yang sama, dan menggunakan sampel DNA yang berbeda. Primer-primer yang diseleksi dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Table 1. Nama Primer dan Sequence Primer RAPD

No	Primer	Sequence	Suhu (°C)
1	OPA 11	5'-CAA TCG CCG T-3'	32
2	OPG 06	5'-GTC CCT ACC C-3'	32
3	PLR 13	5'-GGA CGA CAA G-3'	32
4	PLW 04	5'-CAG AAG CGG A-3'	32
5	PLC 14	5'-TGC GTG CTT G-3'	32
6	PLB 10	5'-CTG CTG GGA C-3'	34
7	M147	5'-GTG CGT CCT C-3'	34
8	M29	5'-CCG GCC TTA C-3'	34
9	PLD 08	5'-GTG TGC CCC A-3'	34
10	OPD 03	5'-GTC GCC GTC A-3'	40,8

Seleksi primer dengan memilih 6 sampel secara acak yang akan menjadi perwakilan seluruh sampel yang akan dimasukkan ke mesin PCR yang memiliki 12 gradien suhu, guna untuk melihat suhu keberapa sampel tersebut teramplifikasi. Satu kali reaksi PCR terdiri dari 3µl DNA *working*, 1µl Primer RAPD, 2,25µl DDH₂O, 6,25µ PCR mix, untuk setiap reaksi mempunyai total 12,5µl. Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR. Tahapan amplifikasi PCR ialah sebagai berikut:

1. Denaturasi awal, suhu 95°C selama 5 menit
2. Denaturasi siklus pertama, suhu 95°C selama 30 detik
3. Penempelan primer spesifik (suhu disesuaikan dengan masing-masing primer) selama 30 detik
4. Pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 1 menit
5. Pemanjangan akhir 72°C selama 10 menit
6. Penyimpanan 4°C

2.4.5 Elektroforesis Hasil PCR

Amplikon yang didapat, diuji kualitatif dengan melakukan elektroforesis dengan gel agarose sebanyak 2,25 gr dalam TAE 90ml dan 2 μ l *redsafe*. Sebanyak 4 μ l amplikon dimasukkan kedalam well gel agarose dengan jarak 1 well dari masing-masing sisi tempat sebagai ladder 100 bp, ladder 100bp dimasukkan sebanyak 4 μ l. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Proses Elektroforesis mengikuti petunjuk sebagai berikut:

1. Menimbang *Agarose* sebanyak 2,25 gr
2. Menambahkan larutan *buffer* TAE 90 ml kedalam beaker glass.
3. Memasukkan *agarose* kedalam *microwave* dan dipanaskan selama 2 menit.
4. Menambahkan larutan *redsafe* 2 μ l, kemudian dihomogenkan.
5. Menuangkan larutan kedalam cetakan agar
6. Menunggu hingga agar mengeras dan siap dipakai.
7. Memasukkan gel agarose kedalam tank.
8. Mengambil 4 μ l produk PCR menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam well gel agarose, beri jarak 1 well dari masing-masing sisi tempat sebagai tempat ladder 100 bp, ladder 100 bp dimasukkan sebanyak 4 μ l.
9. Menyalakan elektroforesis dengan jarak waktu waktu 30 menit dengan tegangan 100 v.
10. Memasukkan hasil dari pengujian kualitas dan PCR kemudian kedalam *geldoc* untuk dokumentasi gel

2.5 Analisis Data

Berdasarkan proses elektroforesis, pita-pita DNA akan terlihat pada gel agar. Setiap pita menunjukkan keberadaan alel pada lokus spesifik. Pengamatan ada tidaknya pita dilakukan secara visualisasi dengan memeriksa hasil foto elektroforegam. Untuk menganalisis keragaman genetik, primer yang dipilih adalah yang menghasilkan pita-pita yang mempunyai sifat polimorfik. Dalam analisis data elektroforesis, setiap pita DNA muncul dengan posisi tertentu yang dianggap mewakili satu lokus. Ketika pita DNA yang sama ditemukan pada beberapa sampel, hal ini menandakan lokus yang homolog. Data yang didapat kemudian menjadi format biner dengan memberi nilai 1 jika pita terdeteksi dan 0 jika pita tidak ada. Data kemudian ditabulasikan dan diolah menggunakan *software* Darwin 6.5 untuk melihat kekerabatan dan variasi genetik. Nilai heterozigositas dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Wallace, 2003 dalam Akzad, 2021):

$$\text{Heterozigot} : q_i = \left(\frac{\text{Individu yang tidak memiliki pita}}{\text{Jumlah seluruh sampel yang diamati}} \right)$$

$$p_i = 1 - q_i$$

$$H_e = 1 - (p_i^2 + q_i^2)$$

Keterangan:

q_i = Frekuensi alel nol

p_i = Frekuensi dominan alel

Nilai *Polymorphic information conten* (PIC) dihitung menggunakan rumus berikut (Guo, 2014):

$$PIC = 2 \cdot f_i(2 - f_i)$$

Keterangan:

PIC = *Polymorphic information conten*

f_i = Frekuensi alel

