



STUDI DNA *BARCODING* *Diospyros* spp. KAWASAN MALESIA

IRVAN FADLI WANDA



**BIOLOGI TUMBUHAN
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2021**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Studi DNA *Barcoding Diospyros* spp. Kawasan Malesia” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum 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 di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Juli 2021

Irvan Fadli Wanda
NIM G353190071



RINGKASAN

IRVAN FADLI WANDA. Studi DNA *Barcoding Diospyros* spp. Kawasan Malesia. Dibimbing oleh TATIK CHIKMAWATI dan NINA RATNA DJUITA.

Diospyros spp. di kawasan Malesia memiliki keanekaragaman yang tinggi dan berpotensi sebagai komoditi ekonomi. Namun, banyak *Diospyros* spp. yang belum teridentifikasi dan kurang tepat dalam identifikasi serta penamaannya sehingga keanekaragaman tersebut perlu dikonfirmasi. Identifikasi hingga tingkat jenis pada marga *Diospyros* spp. sulit dilakukan karena keberadaan organ generatif (bunga dan buah) jarang ditemukan sedangkan organ generatif merupakan ciri pembeda yang biasa digunakan untuk identifikasi jenis dari marga *Diospyros* spp. Pendekatan DNA *barcoding* pada daun dapat digunakan dalam identifikasi jenis spesimen hidup *Diospyros* spp. di kawasan Malesia. Tujuan dari penelitian ini untuk memberikan informasi mengenai keanekaragaman *Diospyros* spp. di kawasan Malesia melalui pendekatan DNA *barcoding* dan mengungkapkan informasi filogeni *Diospyros* spp. di kawasan Malesia.

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2020 hingga Februari 2021 di Laboratorium Molekuler Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya, LIPI. Sampel *Diospyros* spp. diambil dari koleksi Kebun Raya Bogor. Prosedur pengamatan DNA *barcoding* meliputi empat tahap utama yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi, visualisasi DNA dan produk PCR, serta *sekuensing*. Primer *barcoding* yang digunakan berasal dari plastida *trnL-F intergenic spacer* (IGS). Data sekuen DNA *barcoding* dianalisis menggunakan perangkat lunak BioEdit untuk proses konstruksi konsensus sekuen. Selanjutnya dilakukan *data mining* melalui BLAST secara online untuk identifikasi kemiripan sekuen berdasarkan database yang terdapat di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Multiple alignment sequences* melalui *multiple sequence comparison by log-expectation* (MUSCLE) dan konstruksi pohon filogenetik dengan metode Maksimum Parsimoni (MP) dan algoritma *Tree-Bisection-Regrafting* (TBR) yang dilakukan menggunakan perangkat lunak MEGA X dengan *pairwise deletion option* dan *bootstrap* 1000x. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan 20 aksesori *Diospyros* spp yang disekuensing, 40 aksesori sekuen *Diospyros* spp. hasil BLAST dan empat outgroup berasal dari database NCBI.

Keanekaragaman *Diospyros* spp. di kawasan Malesia telah diungkapkan terhadap 20 aksesori yang mewakili 18 jenis *Diospyros*. melalui pendekatan DNA *barcoding* dengan menggunakan primer *trnL-F* IGS. Sepuluh jenis *Diospyros* merupakan informasi sekuen baru yang dipublikasikan di Kawasan Malesia. Berdasarkan lokasi asal aksesori, *Diospyros* paling banyak ditemukan di Pulau Jawa (6 aksesori) dan Sulawesi (5 aksesori), sedangkan yang paling sedikit ditemukan di Pulau Sumatra dan Filipina, masing-masing satu aksesori. Validasi pada 20 aksesori *Diospyros* dengan data sekuen pada *GenBank* menunjukkan adanya hubungan kekerabatan dengan 44 jenis *Diospyros* lainnya di dunia. Rata-rata frekuensi nukleotida pada sekuen *trnL-F* IGS dalam *Diospyros* spp. adalah 34,7 % (T), 21,0 % (C), 29,2 % (A), dan 15,0 % (G). Analisis filogenetik menggunakan metode maksimum parsimoni dan 1000 ulangan *bootstrap* pada 68 DNA sekuen (64



Diospyros spp. dan empat outgroup) menghasilkan satu pohon filogeni yang kokoh dengan nilai *consistency index* (CI) 0,82 dan *retention index* (RI) 0,89.

Semua *Diospyros* spp. yang dianalisa membentuk satu kelompok monofiletik dan selanjutnya terbagi menjadi tujuh klada. Ketujuh klada ini memperbarui data filogenetik *Diospyros* di Kawasan Malesia. Hipotesis kedekatan biogeografi mendukung hasil filogenetik. Distribusi jenis dalam klada ditentukan berdasarkan kemiripan basa nukleotida dan juga dapat dikelompokkan berdasarkan sebaran dari *Diospyros* tersebut: Kawasan Malesia (klada I dan V), Kawasan Malesia-Kaledonia (klada III dan IV), Kosmopolit hampir di semua *bioregion* (klada II, VI dan VII).

Kata kunci: *eboni*, filogeni, Malesia

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



SUMMARY

IRVAN FADLI WANDA. Barcoding DNA Study of *Diospyros* spp. in Malesian Region. Supervised by TATIK CHIKMAWATI and NINA RATNA DJUITA.

Diospyros spp. in the Malesian region has a high diversity and potential as an economic commodity. However, many *Diospyros* spp. have not been identified and inaccurate in its identification and naming so that this diversity needs to be confirmed. Identification to species level in the genus *Diospyros* spp. is difficult to be done because generative organs (flowers and fruit) are rarely found, even though the generative organs are a distinguishing feature commonly used to identify species from the genus *Diospyros*. The leaf barcoding DNA approach can be used to identify the live specimens of *Diospyros* spp. in the Malesian region. This study aims to provide information about *Diospyros* diversity in the Malesian region through a barcoding DNA approach and disclosing phylogeny information of *Diospyros* spp. in the Malesian region.

The research was conducted in May 2020 to February 2021 at the Molecular Laboratory of the Research Center for Plant Conservation and Botanic Gardens, LIPI. Sample *Diospyros* spp. was taken from the collection of the Bogor Botanical Gardens. The barcoding DNA observation procedure included four main stages: DNA extraction, amplification, visualization of DNA and PCR products, and sequencing. The barcoding primer used comes from plastids (*trnL-F intergenic spacer*) genome. Barcoding DNA sequence data were analyzed using BioEdit software for the consensus sequence construction process. Furthermore, online data mining of BLAST was carried out to identify similar sequences based on the database available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), multiple alignment sequences through Multiple Sequence Comparison by Log-expectation (MUSCLE) and construction of phylogenetic trees using the Maximum Parsimony (MP) method and the Tree-Bisection-Regrafting (TBR) algorithm which was carried out using MEGA X software with pairwise deletion option and 1000x bootstrap. Phylogenetic tree construction using 20 sequenced *Diospyros* spp. accessions, 40 BLAST accessions of *Diospyros* spp. sequences and four outgroups collected from the NCBI database.

The diversity of *Diospyros* spp. in the Malesian region has been disclosed on 20 accessions representing 18 species of *Diospyros* spp. through a barcoding DNA approach using *trnL-F intergenic spacer* primers. Ten sequences of *Diospyros* species from the Malesian Region are new sequence information published. Based on the origin of the accessions, *Diospyros* were mostly found in Java (6 accessions) and Sulawesi (5 accessions), while the least was found in Sumatra and the Philippines, each one accession. Validation of 20 *Diospyros* accessions using sequence data on GenBank showed that they had a kinship to 44 other *Diospyros* species in the world. The mean nucleotide frequencies *trnL-F intergenic spacer* sequence in *Diospyros* spp. were 34.7% (T), 21.0% (C), 29.2% (A), and 15.0% (G). Phylogenetic analysis using the maximum parsimony method with 1000 bootstrap replications on 68 DNA sequences (64 *Diospyros* spp. and four outgroups) resulted a robust tree with a consistency index (CI) of 0.82 and a retention index (RI) of 0.89.

@Hak_cipta IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

All *Diospyros* spp. analyzed form a monophyletic group and are further divided into seven clades. The clades update the phylogenetic data of *Diospyros* in the Malesian Region. The biogeographic proximity hypothesis supports the phylogenetic results. Thus, this study supports that the distribution of species in clades is determined based on the similarity of nucleotide bases as well as the distribution of *Diospyros* : Malesian region (clades I and V), Malesian-Caledonian region (clade III and IV), cosmopolitan in almost all bioregions (Clade II, VI, and VII).

Keywords: ebony, Malesia, phylogeny

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





@Hak cipta milik IPB University

IPB University

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2021
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.





STUDI DNA *BARCODING* *Diospyros* spp. KAWASAN MALESIA

IRVAN FADLI WANDA

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains pada
Program Studi Biologi Tumbuhan

**BIOLOGI TUMBUHAN
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2021**



@Hak cipta milik IPB University

Penguji Luar Komisi pada Ujian Tesis: Dr. Ir. Miftahudin, M.Si

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Judul Tesis : Studi DNA *Barcoding Diospyros* spp. Kawasan Malesia
Nama : Irvan Fadli Wanda
NIM : G353190071

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Ir. Tatik Chikmawati, M.Si.



Pembimbing 2:
Dr. Nina Ratna Djuita S.Si., M.Si.



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Dr. Ir. Aris Tjahjoleksono, DEA



Dekan Sekolah Pascasarjana :
Prof. Dr. Ir. Anas Miftah Fauzi, M.Eng



Tanggal Ujian: 21 Juli 2021

Tanggal Lulus: 07 AUG 2021

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Mei 2020 sampai bulan Februari 2021 ini ialah Sistematika Tumbuhan, dengan judul “Studi DNA *Barcoding Diospyros* spp. Kawasan Malesia”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Ir. Tatik Chikmawati, M.Si dan Dr. Nina Ratna Djuita, S.Si., M.Si. yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Penulis juga menyampaikan terima kasih pada Dr. Ir. Miftahudin, M.Si. dan Dr. Ir. Aris Tjahjoleksono, DEA yang telah memberikan saran dan masukan untuk perbaikan penulisan.

Terima kasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada Kepala Puslit Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya (KTKR) -LIPI Dr. R. Hendrian, M.Sc yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh sekolah pascasarjana S2 pada program studi Biologi Tumbuhan IPB; Koordinator Pengelolaan Penelitian Konservasi Tumbuhan Puslit KTKR-LIPI Arief Hidayat, M.Si, Kepala Laboratorium Treub Puslit KTKR-LIPI Dr. rer.hort. Reni Lestari, M.Sc serta Ketua program studi Biologi Tumbuhan yang telah memfasilitasi penulis dari awal kegiatan perkuliahan hingga penyelesaian studi penulis. Terima kasih juga disampaikan kepada Kemenristek/BRIN atas Beasiswa Program Gelar Sainstek yang telah membiayai pendidikan dan penelitian penulis selama dua tahun di Program Studi Biologi Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor.

Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada M. Rifqi Hariri, M.Si. beserta Pak Kusrandi yang telah membantu selama pengumpulan data. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada ayah, ibu, istri dan anak yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Juli 2021

Irvan Fadli Wanda



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Taksonomi <i>Diospyros</i> spp.	4
2.2 Filogeni <i>Diospyros</i> spp.	6
2.3 Distribusi <i>Diospyros</i> spp.	7
2.4 Pemanfaatan <i>Diospyros</i> spp.	8
2.5 DNA <i>Barcoding</i> pada <i>Diospyros</i> spp.	8
III METODE	10
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	10
3.2 Pengoleksian Sampel	10
3.3 DNA <i>Barcoding</i>	10
3.4 Analisis data	12
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	13
4.1 Keanekaragaman <i>Diospyros</i> spp. di Kawasan Malesia Melalui Pendekatan DNA <i>Barcoding</i>	13
4.2 Filogeni <i>Diospyros</i> spp. di Kawasan Malesia	17
V SIMPULAN DAN SARAN	24
5.1 Simpulan	24
5.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	31
RIWAYAT HIDUP	38



DAFTAR TABEL

1	Sistem klasifikasi <i>Diospyros</i> spp. menurut para ahli; anak marga (<i>subgen.</i>) dan seksi (<i>sect.</i>) disusun secara alfabetis (Duangjai <i>et al.</i> 2006)	4
2	Sampel akses <i>Diospyros</i> dan <i>outgroup</i> yang digunakan	10
3	Hasil BLAST basa nukleotida sampel pada <i>GenBank</i>	15
4	Ringkasan karakteristik dan statistik analisis maksimum parsimoni untuk analisis filogenetik <i>Diospyros</i> di Kawasan Malesia	18
5	Situs variasi nukleotida <i>Diospyros</i> spp. Kawasan Malesia	22

DAFTAR GAMBAR

1	Ciri <i>Diospyros</i> spp. (A) Pohon dengan kulit batang bewarna keabu-abuan sampai hitam pada <i>D. celebica</i> . (B) Daun <i>coriaceous</i> dengan bagian pangkal daun runcing, tepi daun rata, ujung daun runcing pada <i>D. discolor</i> . (C) Bunga soliter dan berwarna putih pada <i>D. lolin</i> . (D) Buah tipe <i>berry</i> dan kelopak <i>persistent</i> pada <i>D. maritima</i> .	6
2	Pohon filogeni <i>Diospyros</i> spp. (dimodifikasikan dari Duangjai <i>et al.</i> (2006) <i>Am J Bot.</i> 93(12):1808–1827)	7
3	Sebaran <i>Diospyros</i> spp. (dimodifikasikan dari GBIF. (2019) <i>GBIF Backbone Taxon</i>)	7
4	Daerah sekuen <i>trnL-F IGS</i> pada genom kloroplas (dimodifikasikan dari Quandt <i>et al.</i> (2004) <i>Mol Syst Bryophyt.</i> (June 2015):13–37)	9
5	Sebaran asal akses <i>Diospyros</i> spp. Lingkaran merah=jumlah akses <i>Diospyros</i> yang disekuensing pada penelitian ini, lingkaran kuning=jumlah akses <i>Diospyros</i> yang berasal dari <i>GenBank</i> (dimodifikasikan dari BIG Republik Indonesia (2019) <i>Peta Rupabumi Digital Indonesia</i> . http://tanahair.indonesia.go.id/portal-web/)	13
6	Profil DNA produk PCR 20 jenis <i>Diospyros</i> dengan menggunakan gel agarose 0,8 %. 705-726=kode sampel 20 jenis <i>Diospyros</i> .	15
7	Frekuensi nukleotida pada sekuen <i>trnL-F IGS Diospyros</i> spp.	17
8	Pohon filogenetik berdasarkan data sekuen <i>trnL-F IGS</i> yang direkonstruksi menggunakan metode maksimum parsimoni. Percabangan dianalisis dengan bootstrap 1000 ulangan. Nilai <i>bootstrap</i> pada buku yang kurang dari 50% tidak ditampilkan. * = akses <i>Diospyros</i> spp. pada penelitian ini.	21

DAFTAR LAMPIRAN

1	Frekuensi nukleotida pada sekuen <i>trnL-F IGS Diospyros</i> spp.	32
2	Hasil <i>alignment</i> menggunakan MEGA X pada sekuen <i>trnL-F IGS</i> dari 68 jenis <i>Diospyros</i> spp. dan <i>outgroup</i>	34