PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON
Volume 5, Nomor 2, Juni 2019 ISSN: 2407-8050
Halaman: 286-293 DOI: 10.13057/psnmbi/m050225

Keragaman genetik pakoba: Studi pendahuluan keanekaragaman pakoba

Pakoba genetic diversity: A preliminary study of pakoba diversity

EUIS F. S. PANGEMANAN♥, JOHNY S. TASIRIN♥♥, FABIOLA B. SAROINSONG♥♥♥
Program Sudi Ilmu Kehutanan, Fakultas Pertanian, Universitas Sam Ratulangi. Jl. Kampus Unsrat, Kleak, Manado 95115, Sulawesi Utara.
♥email: euisfspangemanan@gmail.com, ♥♥ jtasirin@gmail.com, ♥♥♥ fabiolasaroinsong@ymail.com

Manuskrip diterima: 7 September 2018. Revisi disetujui: 30 Desember 2018.

Abstrak. *Pangemanan EFS, Tasirin JS, Saroinsong FB. 2018. Keragaman genetik pakoba: studi pendahuluan keanekaragaman pakoba. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 5: 286-293.* Pakoba (*Syzygium* sp.) adalah jenis tumbuhan dari family Myrtaceae dalam ordo Myrtales. Populasi alami pakoba saat ini semakin sulit ditemukan. Meskipun dikalangan masyarakat, telah dikenal beberapa jenis pakoba seperti pakoba merah, pakoba putih dan pakoba hutan, namun demikian tumbuhan pakoba belum banyak diteliti secarailmiah. Upaya konservasi untuk melindungi kepunahan jenis ini perlu dilakukan. Deskripsi morfologi serta analisis keragaman genetik pada pakoba diharapkan dapat memberikan pemahaman lebih jauh tentang tumbuhan ini untuk membantu upaya konservasinya. Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat keragaman genetik pakoba dengan menggunakan gen matK. Ekstraksi DNA menggunakan Genomic DNA Mini Kit Plant (Geneaid), amplifikasi DNA menggunakan Kit PCR 5x FirePol Master Mix (Solis Biodyne) dan sepasang primer universal yaitu matK-3F-r. Sampel yang digunakan berasal dari beberapa sumber/lokasi dimana tumbuhan dapat ditemukan yaitu Kima (pakoba A: SUA), Manado (pakoba B: SUB), dan Tangkoko Batu Angus (pakoba C: SUC). Hasil penelitian ini menunjukan dari 3 sekuens hanya pakoba C yang berbeda dibandingkan dengan pakoba A dan B, sedangkan pakoba A sama dengan pakoba B. Perbedaannya hanya empat nukleotida saja, tapi hasil identifikasinya sama dengan *Syzygium sandwicense* (99%). Untuk itu perlu dibandingkan karakter morfologinya guna mengetahui keragaman pakoba. Hasil penelitian ini selanjutnya dapat digunakan untuk pendekatan penamaan yang benar dari nama ilmiah pakoba.

Kata kunci: Biodiversitas, pakoba, *Syzygium*

Abstract. *Pangemanan EFS, Tasirin JS, Saroinsong FB. 2018. Pakoba genetic diversity: Preliminary study of pakoba diversity. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 5: 286-293.* Pakoba (*Syzygium* sp.) is a kind of plant belongs to Family Myrtaceae in Orde Myrtales. Nowadays, the natural population of pakoba is rare to be found. Although among the public, it has been known some kind of pakoba like red pakoba, white pakoba, and *pakoba hutan*, however, pakoba plant has not much been studied scientifically. Conservation efforts to protect the extinction of this type need to be done. Morphological description and analysis of genetic diversity on pakoba are expected could provide further understanding of this plant to help its conservation efforts. The aim of this research was to find the genetic diversity of pakoba by using the matK gene. DNA extraction used Genomic DNA Mini Kit Plant (Geneaid), amplification of DNA used Kit PCR 5x FirePol Master Mix (Solis Biodyne) and a universal prime pair namely matK-3F-r. The used samples were from several sources/locations where pakoba plant could be found, namely in Kima (pakoba A, SUA), Manado (pakoba B, SUB) and Tangkoko Batu Angus (pakoba C, SUC). The results of this study showed that from the 3 sequences, only pakoba C was different from pakoba A and B, while pakoba A is the same with pakoba B. The difference only four nucleotides, but the identification results showed a strong similarity with *Syzygium* sandwicense (99%). Based on this result, it is necessary to compare their morphology characters to find out the diversity of pakoba. Furthermore, the results of this research can be used as a correctly naming approaching the pakoba scientific name.

Keywords: Biodiversity**,** pakoba, *Syzygium*

PENDAHULUAN

Keberlangsungan keanekaragaman hayati suatu tumbuhan sangatlah bergantung dari tingkat kesadaran manusia, baik dalam skala lokal maupun global. Rendahnya kesadaran akan ketergantungan hidup manusia terhadap sumber daya hayati menyebabkan rendahnya penghargaan terhadap keanekaragaman flora dan fauna selama ini, yang menyebabkan terjadinya peningkatan perusakan habitat dan eksploitasi berlebihan terhadap sumberdaya hayati yang ada. Kegiatan-kegiatan tersebut menjadi ancaman bagi kelangsungan sumber daya hayati yang ada. Upaya konservasi yang dilakukan tidak akan mendapatkan hasil seperti yang diharapkan tanpa dukungan dan peran serta aktif dari segenap lapisan masyarakat.

Sulawesi Utara merupakan salah satu daerah yang terkenal akan kekayaan alamnya, baik flora maupun fauna, antara lain pakoba. Pakoba adalah jenis tumbuhan dari family Myrtaceae dalam ordo Myrtales. Banyak literature yang mengulas tentang pakoba hanya memberi nama *Syzygium* sp. (Walean et al. 2018). Ada beberapa jenis

dalam genus *Syzygium* yang memiliki ciri berdekatan dan sering dipertukarkan nama ilmiahnya yakni (i) *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp., dan (ii) *Syzygium cumini* (L) Skeels. (Sudiyono 2014) (iii) *Syzygium luzonense* (Merr.) Merr. (Hidayah et al. 2017) Ada juga tulisan-tulisan lain yang menyebutkan pakoba dengan nama ilmiah *Trichalsia minahasae*. (Rizda 2016)

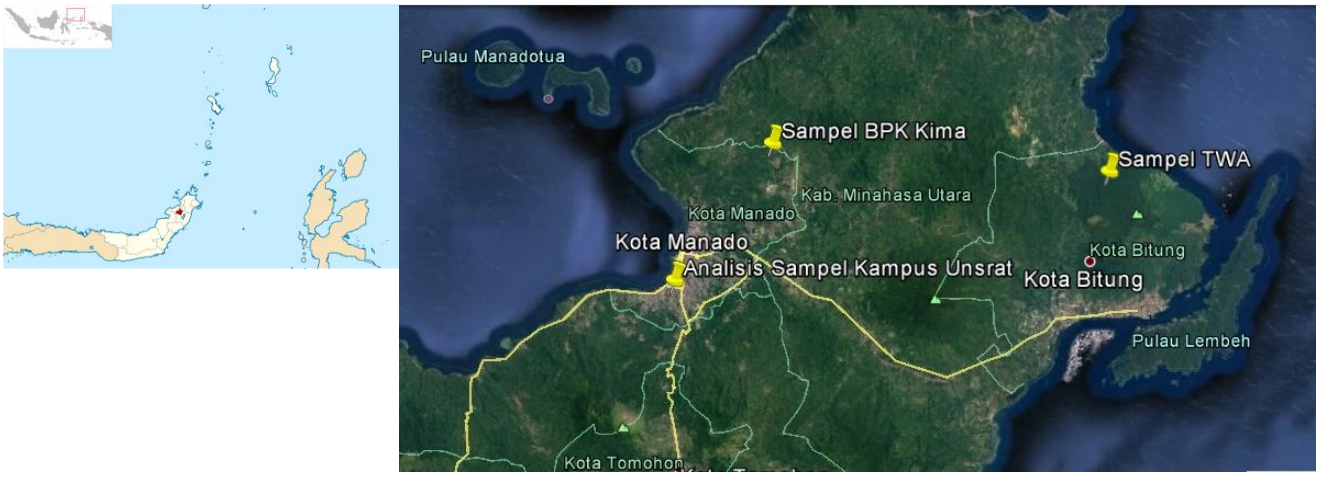
Pakoba sering disebut untuk pakowa atau pakewa di Minahasa. Bahkan salah satu anak suku Minahasa disebut tompakewa (tou-pakewa) yang berdiam di Minahasa bagian selatan. Buah pakoba memiliki rasa yang sangat asam dengan cita rasa unik sehingga sering dijadikan panganan komersil, seperti manisan maupun rujak dan asinan. Tidak hanya itu, buah dari tanaman ini juga diolah menjadi manisan, jus, dodol, dan makanan tradisional lainnya. Masyarakat Sulawesi Utara juga memanfaatkan daun pakoba sebagai obat tradisional untuk menurunkan kadar gula darah, kulit batang dan daun pakoba secara bersama-sama digunakan sebagai obat asam urat dan pemulihan wanita sehabis melahirkan (Hidayah et al. 2017) Kayu pakoba dimanfaatkan untuk bahan bangunan. Kualitas kayu tumbuhan ini tidak terlalu baik tetapi sifat tumbuhnya yang cepat dan ukuran batang yang besar membuat batang pakoba menjadi salah satu kayu favorit penebang kayu dan tukang bangunan di Minahasa. (Nurrani dan Tabba 2012) Masih dalam Nurani dan Tabba (2012), disebutkan bahwa masyarakat juga memanfaatkan kayu pakoba yang digolongkan ke dalam kelas kuat III ini sebagai bahan baku kayu pertukangan dan bahan dasar pembuatan perahu oleh masyarakat pesisir. Sayangnya sebagai akibat dari pemanfaatan yang tinggi, penebangan yang berlebihan dan kurangnya upaya konservasi berakibat menurunnya populasi pakoba di alam sehingga terancam mengalami kelangkaan. Kondisi ini diperparah dengan belum adanya teknik budidaya yang diterapkan pada tumbuhan ini.

Upaya konservasi keanekaragaman suatu tumbuhan dapat dilakukan pada habitat asalnya ataupun dilakukan diluar lingkungan asalnya kondisi tertentu. Lingkungan merupakan suatu faktor yang menentukan apakah suatu tumbuhan dapat bertahan dan berlanjut ke generasi berikutnya. Identifikasi keanekaragaman suatu spesies dapat dilakukan dengan berbagai cara. Penggunaan cara konvensional dengan memanfaatkan deskripsi morfologi membutuhkan waktu yang cukup panjang, mengingat karakter bunga dan buah tergantung pada waktu berbunga tumbuhan tersebut. Penggunaan identifikasi keaneka-ragaman berbasiskan penanda molekuler merupakan salah satu cara yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah, walaupun membutuhkan teknologi dan biaya yang lebih tinggi dibandingkan identifikasi secara konvensional. Salah satu penanda molekuler yang saat ini digunakan untuk mengungkapkan taksonomi yaitu kode batang DNA (DNA *barcoding*). DNA *barcoding* merupakan urutan sekuens pendek DNA yang dapat menunjukkan variasi genetik dalam suatu spesies (Chippindale et al. 1999).

BAHAN DAN METODE

Lokasi penelitian

Sampel diambil dari berbagai lokasi, dan sesudah membandingkan morfologi daun, maka digunakan sampel yang berasal dari 3 lokasi yaitu SUA dari Kima, Minahasa Utara (1º33’43.51” N124º54’16.56”E), SUB dari Manado (1º27’25.96” N124º49’46.80”E), SUC dari Tangkoko Batu Angus, Bitung (1º32’57.70”N, 125º09’48.83”W). Ketiga lokasi ini terletak pada daerah administratif yang berbeda di Sulawesi Utara.



Gambar 1. Lokasi penelitian di Kima, Minahasa Utara (SUA), Manado (SUB), dan TWA Tangkoko Batuangus, Bitung (SUC). Ketiganya di Provinsi Sulawesi Utara

Cara kerja

Material yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat: alat gelas, hot plate, tabung Eppendorf, tabung PCR, mikropipet, termoblok, mikrosentrifuse, PCR, elektroforesis, UV-transiluminator dan freezer. Bahan yang digunakan antara lain daun pakoba (sampel SUA, SUB dan SUC)**,** InnuPREP Plant DNA kit, primer forward matK-1RKIM-f dan primer reverse matK-3FKIM-r, master mix untuk PCR *GoTaq® Green Master Mix* (Promega), agarosa (Merck), akuades, etidium bromida (Merck) dan bufer Tris-borat-EDTA (TBE, Promega).

Survey awal dilakukan untuk mengumpulkan informasi keberadaan pakoba. Dari informasi tersebut, dilakukan koleksi daun pakoba, dan berdasarkan pengamatan awal morfologi daun pakoba tersebut, didapatkan 3 sampel pakoba yaitu pakoba A (SUA) dari Kima, pakoba B (SUB) dari Manado, dan pakoba C (SUC) dari Tangkoko Batuangus

Isolasi DNA total pakoba. Isolasi DNA total tanaman pakoba dilakukan berdasarkan prosedur manual dari InnuPrep Plant DNA Kit yang dimodifikasi**.** untuk memaksimalkan ekstraksi DNA kloroplas yaitu dengan meningkatkan waktu lisis sel dari 30 menit menjadi satu jam dalam suhu 60°C. (Kolondam et al. 2013)**.** Sampel daun dikoleksi dan dipreservasi dalam freezer sebelum digunakan. Setelah itu dilakukan ekstraksi DNA Total menggunakan Plant Genomic DNA Mini Kit (Geneaid). Satu spesimen daun dipotong dengan scalpel steril (3 mm x 3 mm) dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml kemudian ditambahkan 400 µl Buffer GPX1, diinversi lima kali kemudian diinkubasi selama 3 jam pada suhu 60ºC menggunakan termoblok. Setelah itu Buffer GP2 ditambahkan sebanyak 100 µl, tabung diinversikan, diinkubasi dalam es (1 menit), dan kemudian disentrfugasi 10.000 rpm (1 menit). Supernatan dituang ke dalam tabung mikro baru, ditambahkan buffer GP3 sebanyak 750 µl dan kemudian tabung diinversikan. Sampel (600 µl) dimasukkan ke dalam spin filter (GD Column) yang telah dipasang tabung penampung (collection tube) dan disentrifugasi seperti sebelumnya. Filtrat dibuang dan tabung penampung dipasang kembali. Langkah ini diulangi sekali lagi untuk sisa sampel. Sebanyak 400 µl Buffer W1 dipipet ke dalam kolom dan kemudian disentrifugasi. Filtrat dibuang dan tabung penampung dipasang kembali. Sebanyak 750 µl Wash Buffer di pipet ke dalam kolom dan disentrifugasi. Filtrat dibuang dan tabung penampung dipasang kembali. Untuk mengeringkan filter, tabung kosong kembali disentrifugasi selama 2 menit (15.000 rpm) dan kemudian filtrat beserta tabung penampung dibuang. Spin filter dipindahkan ke dalam tabung mikro baru, dikeringanginkan selama 2 menit, ditambahkan 100 µl Elution Buffer, didiamkan selama 2 menit dan kemudian disentrifugasi. Spin filter dibuang dan DNA disimpan dalam freezer

Reaksi PCR dalam penelitian ini menggunakan 5X Ready-to-Load Master Mix (Solis Biodyne). Dalam setiap reaksi 50 µl memiliki 1.25 Unit Taq DNA polimerase, 0,2 mM masing-masing dNTPs, 1,5 mM MgCl2, 0,2 mM masing-masing primer, dan kira-kira 0,6 µg DNA total sampel. Untuk primer digunakan primer universal yaitu rbcLaF (5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-3') dan rbcLaR (5'-GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG-3') untuk amplifikasi gen rbcL (Kress dan Erickson 2007) serta untuk gen matK digunakan matK-3F (5'-CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G-3') dan matK-1R (5'ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3'). Pengaturan suhu thermocycler dimulai dengan denaturasi awal pada 95ºC selama 2 menit kemudian dilanjutkan 35 siklus [95ºC 30 detik, XºC 30 detik, dan 72ºC 1 menit]. Suhu X untuk perlekatan primer (annealing) yang disarankan Stoeckle et al. (2011) adalah 55ºC untuk rbcL dan 52ºC untuk matK. DNA hasil PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% dan sisanya dikirim untuk sekuensing ke penyedia jasa sekuensing bersama primer. Proses sekuensing dilakukan sebanyak dua kali dengan arah yang berbeda (forward dan reverse) sesuai primer yang ada.

Analisis data

Kromatogram DNA hasil sekuensing disunting menggunakan perangkat lunak Geneious v5.6 (Drummond et al. 2012). Identifikasi sampel tanaman menggunakan BOLD (Barcode of Life Database) Systems (www.boldsystems.org) (Ratnasingham and Hebert 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Dari survey di beberapa daerah untuk mendapatkan tanaman pakoba, dengan didasarkan pada pengamatan awal terhadap morfologi daun, didapatkan 3 jenis pakoba (SUA, SUB dan SUC) untuk diamati.

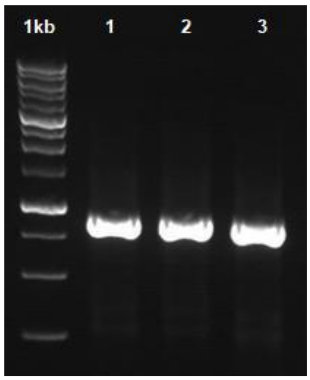
Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan dari 3 sekuens hanya pakoba C yang berbeda dibandingkan dengan pakoba A dan B, sedangkan pakoba A sama dengan pakoba B. Hasil isolasi DNA total ketiga sampel pakoba (SUA, SUB, SUC) yang berasal dari tiga lokasi berbeda, yaitu Kima (Minahasa Utara), Manado, dan Tangkoko Batu Angus (Bitung).

Gambar 2 menunjukkan gen fragmen matK telah berhasil diperkuat dari sampel dengan menggunakan primer universal. Pita yang telah diperkuat tersebut diamati dengan elektroforesis sel agarose. Kromatogram dari fragmen yang dihasilkan panjangnya. 834 pb. Hasil isolasi DNA daun memperlihatkan dua lapisan yaitu berwarna putih bening (DNA) dan warna sedikit hijau (klorofil). Hal ini menandakan bahwa DNA terisolasi Innuprep plant DNA kit dengan baik.

Tabel 1. Perbandingan hasil sekuens DNA pakoba A, B dan C

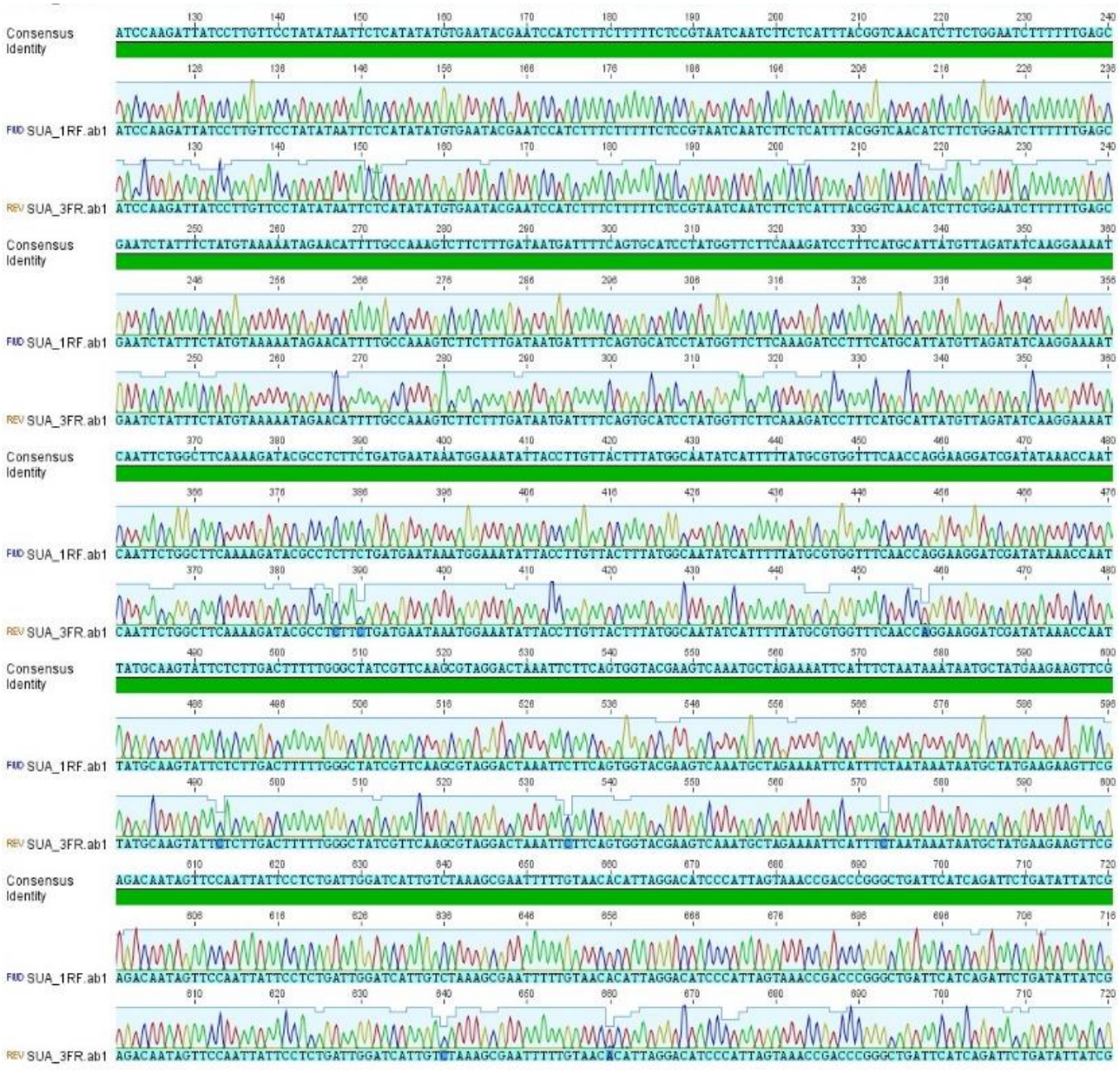
Sampel	SUA	SUB	SUC
SUA	100%	100%	99.5%
SUB	100%	100%	99.5%
SUC	99.5%	99.5%	100%



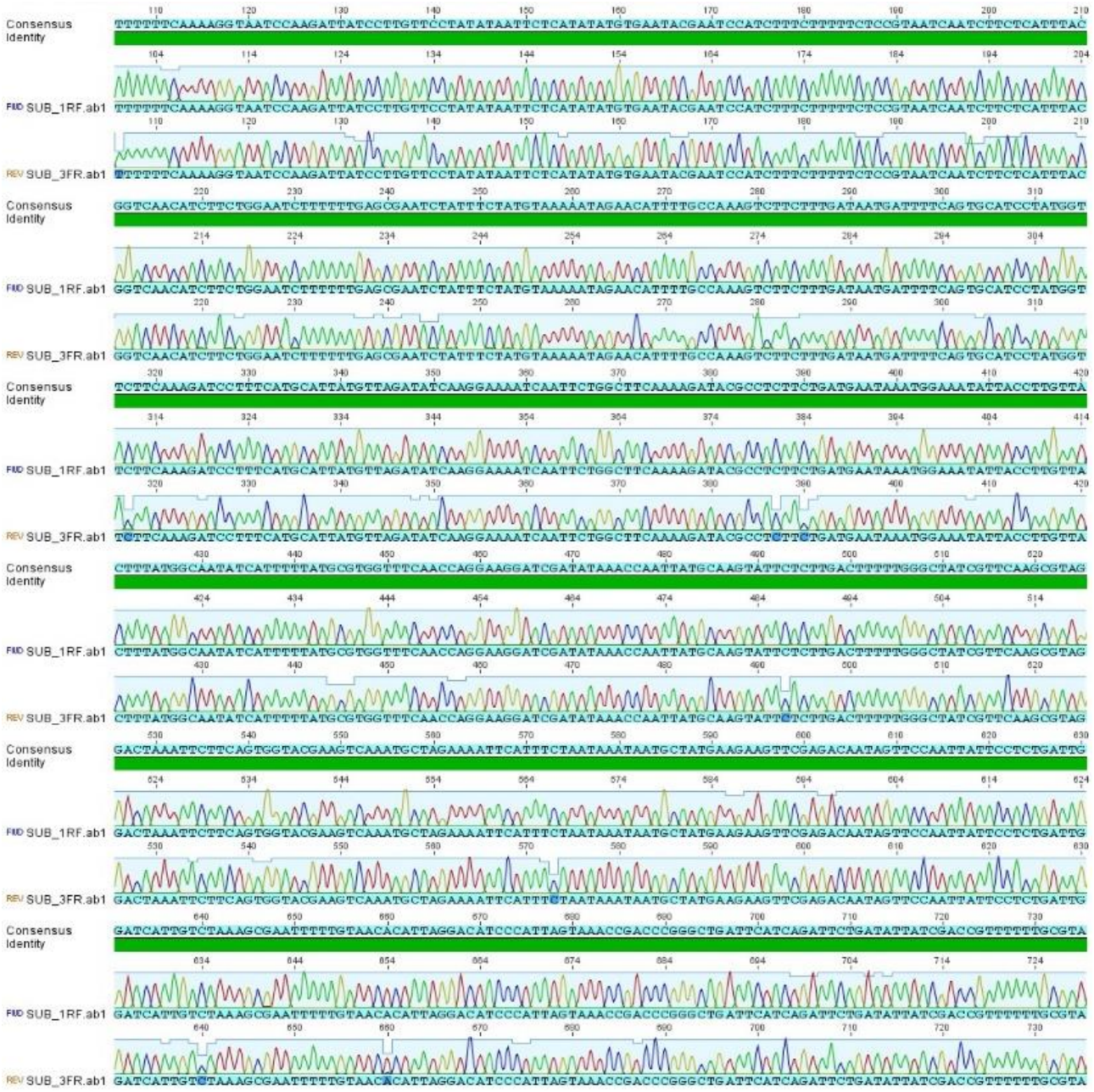
Gambar 2. Elektroforegram hasil PCR (I kb: marker DNA *ladder*, 1: sampel pakoba A (SUA), 2: sampel pakoba B (SUB), 3: sampel pakoba C (SUC)

Berdasarkan Tabel 1, Nampak bahwa kedekatan hubungan antara SUA dengan SUB adalah 100%, sedangkan SUA dan SUC berbeda sangat sedikit, yaitu hanya 0,5%, begitu juga antara SUB dengan SUC, peredaannya hanya 0,5%.

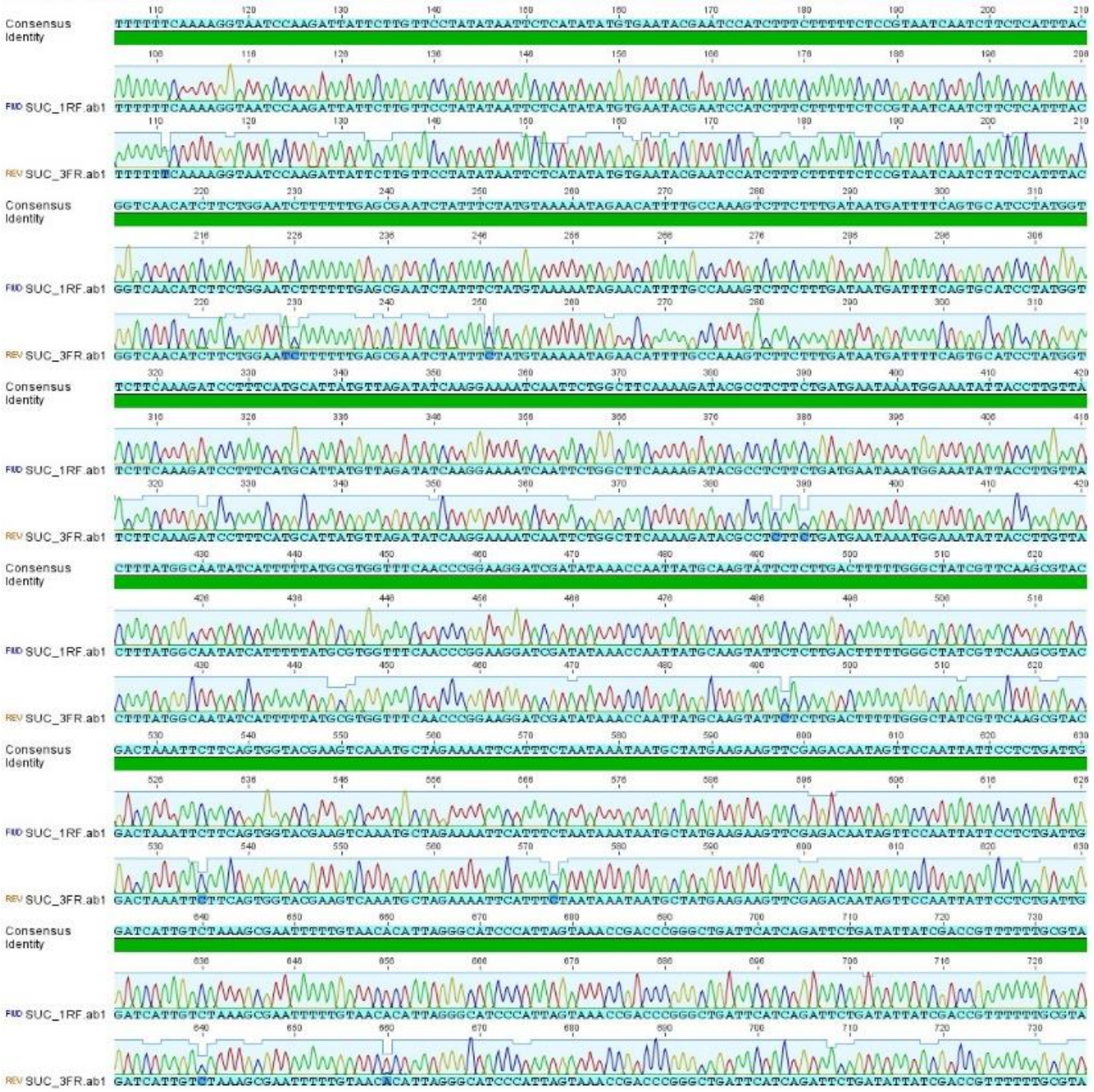
Gambar 3, 4 dan 5 masing-masing merupakan hasil sekuensing dari produk PCR gen matK yang menghasilkan kromatogram yang berkualitas tinggi, yang ditunjukkan dengan nilai High Quality (HQ%) kromatogram yang terbaca pada Geneious v5.6 yaitu > 90%. Gambar 3 adalah kromatogram hasil sekuensing sampel Pakoba A (SUA), gambar 4 kromatogram hasil sekuensing Pakoba B, dan gambar 5 adalah kromatogram hasil sekuensing Pakoba C.



Gambar 3. Kromatogram hasil sekuensing sampel Pakoba A (SUA)



Gambar 4. Kromatogram hasil sekuensing sampel Pakoba B (SUB)



Gambar 5. Kromatogram hasil sekuensing sampel Pakoba C (SUC)

Gambar 6. Urutan nukleotida barcode DNA *mat*K dan asam amino tanaman Pakoba. Baris bagian atas menunjukkan urutan nukleotida dan baris bagian bawah menunjukkan urutan asam amino

Gambar 6 menunjukkan tidak ada perbedaan antara SUA dengan SUB, sedangkan SUC berbeda dengan SUA maupun SUB, walaupun perbedaannya hanya empat nukleotida saja yaitu pada posisi ke-133, 458, 525 dan 668. Hasil identifikasi melalui BOLD (Barcode of Life Database) Systems (www.boldsystems.org) menunjukkan

bahwa sampel tanaman pakoba termasuk dalam genus *Syzygium*, karena urutan nukleotidanya mirip dengan genus *Syzygium* yang lain dengan tingkat kemiripan > 98%, bahkan kekerabatannya sangat dekat dengan *S. sandwicense* (99%). Berdasarkan hasil penelusuran dalam data *BOLD System*, belum ditemukan *barcode* DNA untuk tanaman pakoba (*Syzygium* sp.).

Berdasarkan hasil penelitian Irawan et al. (2018) kemungkinan besar tumbuhan pakoba dan jamblang berkerabat dekat, dan bahkan cenderung sebagai spesies yang sama atau merupakan subspesies. Perbandingan variasi genetik matK sampel menunjukkan perbedaan hanya 1 nukleotida antara jamblang dan pakoba, serta perbedaan 5-6 nukleotida antara keduanya dengan bombongan. Perbedaan nukleotida sekuens sampel dengan kerabatnya di GenBank yaitu 2-6 nukleotida. Nilai jarak genetik interspesies Syzygium termasuk rendah, yaitu 0.000-0.011. Menurut Tallei et al. (2016), semakin sedikit nilai jarak genetik antara dua organisme, semakin dekat pula hubungan kekerabatan keduanya. Sebagai catatan tambahan, jamblang selama ini dikenal dengan nama ilmiah *Syzigium cumini* sedangkan bombongan adalah sejenis buah yang dikenal dengani *Syzigium* sp.

Hasil penelitian ini selanjutnya dapat digunakan sebagai studi awal untuk mempelajari keanekaragaman pakoba serta pendekatan penamaan pakoba secara ilmiah dengan benar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu penelitian ini, sehingga penelitian ini bisa mendapatkan hasil selesai.

DAFTAR PUSTAKA

Chippindale PT, Dave VK, Whitmore DH, Robinson JV. 1999. Phylogenetic relationships of North American damselflies of the genus Ischnura (Odonata: Zygoptera: Coenagrionidae) based on sequences of three mitochondrial genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 11(1): 110-121.

Irawan, Presticilla D, Trina ET, Beivy JK. 2018. Analisis sekuens dan filogenetik beberapa tumbuhan *Syzygium* (Myrtaceae) di Sulawesi berdasarkan gen matK. Jurnal Ilmiah Sains (JIS) 16 (2) https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/JIS/article/view/14022.

Hidayah HN, Irawan A, Anggarini I. 2017. Serangan Ulat Jengkal (*Hyposidra talaca* Wlk.) pada bibit pakoba (*Syzygium luzonense* (Merr.) Merr.) di persemaian. Agrologia 6 (1): 37-43. https://www.researchgate.net/publication/326778762_Serangan_Ulat_Jengkal_Hyposidra_talaca_Wlk_Pada_Bibit_Pakoba_Syzygium_luzonense_Merr_Merr_Di_Persemaian.

Kolondam BJ, Lengkong E, Polii-Mandang J, Runtunuwu S, Pinaria A. 2013. Barcode DNA anthurium gelombang cinta (*Anthurium plowmanii*) berdasarkan gen rbcL dan matK. BIOSLOGOS 3(1): 17-25.

Nurrani L, Tabba S. 2012. Sifat fisis mekanis kayu pakoba dan penggunaannya sebagai jenis endemik lokal Sulawesi Utara. Proceeding Seminar dan Pameran hasil-hasil Penelitian Balai Penelitian Kehutanan Manado, 23-24 Oktober 2012. Hal 125-133.

Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. BOLD: The barcode of life data system. Mol Ecol Notes 7: 355-364.

Stoeckle YM, Gamble CC, Kirpekar R, Young G, Ahmed S, Little DP. 2011. Commercial teas higlight plant DNA barcode identification successes and obtacles. Sci Rep 1:42.

Sudiyono. 2014. Evaluasi tumbuhan dan satwa liar di Cagar Alam Gunung Ambang. Jurnal Wasian 1(2). http://www.forda-mof.org/files/Jurnal_Wasian_1.2.2014-5.Sudiyono.pdf.

Rizda. 2016. Teknik Budidaya Pakoba, Tanaman Hutan Berpotensi Obat. www.forda-mof.org/berita/post/2512.

Tallei TE, Rembet RE, Pelealu JJ, Kolondam BJ. 2016. Sequence variation and phylogenetic analysis of *Sansevieria trifasciata* (Asparagaceae). Biosci Res 13(1): 01-07.

Walean M, Rumondor R., Maliangkay HP, Melpin R. 2018. Pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit batang pakoba (*Syzygium* sp.) terhadap gambaran histopalogi ginjal tikus putih yang diinduksi etilen glikol. EJurnal Chem Prog 1 (1) https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/chemprog/article/view/20707