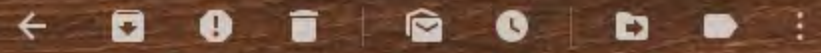




Telusuri email



Tulis



494 dari 2.415 < > ✎ ⚙

- Kotak Masuk 15
- Berbintang
- Ditunda
- Penting
- Terkirim

- Tri +
- satrya gusty Mengirim pesan

Jurnal trnL 📧 Kotak Masuk x



**Fitmawati Sofyan** 2 Sep 2016 15.57 ☆  
 Dear Pak Tri, Berikut saya lampirkan hasil revisi tulisan trnL. Mohon dibaca kembali. Tolong kirimkan Bab ISSR biar kita revisi bersama. Salam, Dr. Fitmawati, M. S

**Tri Harsono** <triharsonounimed@gmail.com> 5 Sep 2016 14.18 ☆ ↩ ⋮  
 ke ekoprasetya.biologi ▾

----- Pesan terusan -----  
 Dari: **Fitmawati Sofyan** <fitmawati2008@yahoo.com>  
 Tanggal: 2 September 2016 15.57  
 Subjek: Jurnal trnL  
 Kepada: Tri Harsono <triharsonounimed@gmail.com>





Telusuri email

Tulis

- Kotak Masuk 15
- Berbintang
- Ditunda
- Penting
- Terkirim
- Draf 11
- Kategori
- Sosial 1
- Update 2
- Forum
- Promosi 9
- Travel
- Tri +
- satrya gusty Mengirim pesan

### Fwd: Online first publication – BIODIVERSITAS 18 (1), Jan 2017

Kotak Masuk x



**Managing Editor**

Kam, 17 Nov 2016 10.22

Dear Sirs and Ma'ams, Kindly find the following links to download your mss: TOC: <http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D1801.htm> PDF: <http://doi.org/10.13057/bi>



**Fitmawati Sofyan** <fitmawati2008@yahoo.com>

Kam, 24 Nov 2016 15.13

ke Nursahara, saya

Inggris > Esti [Terjemahkan pesan](#)

[Nonaktifkan untuk: Inggris](#)

[Dikirim dari Yahoo Mail di Android](#)

Pada Kam, 17 Nov 2016 pada 10:22, Managing Editor <[unsjournals@gmail.com](mailto:unsjournals@gmail.com)> menulis:

Dear Sirs and Ma'ams,

Kindly find the following links to download your mss:  
TOC: <http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D1801.htm>  
PDF: <http://doi.org/10.13057/biodiv/d180108>

Ps. Herewith, also attached manuscript in PDF format. Please distribute to the colleagues (20-30s) to increase the potential citation. Now, Biodiversitas is listed in Scimago JR, see this link: [here](#)



Telusuri email

Tulis

- Kotak Masuk 15
- Berbintang
- Ditunda
- Penting
- Terkirim
- Draf 11
- Kategori
- Sosial 1
- Update 2
- Forum
- Promosi 9
- Travel
- Tri +

satrya gusty Mengirim pesan

Pada Kam, 17 Nov 2016 pada 10:22, Managing Editor <unsjournals@gmail.com> menulis:

Dear Sirs and Ma'ams,

Kindly find the following links to download your mss:  
TOC: <http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D1801.htm>  
PDF: <http://doi.org/10.13057/biodiv/d180108>

Ps. Herewith, also attached manuscript in PDF format. Please distribute to the colleagues (20-30s) to increase the potential citation. Now, Biodiversitas is listed in Scimago JR, see this link: [here](#)

Thank you,  
Best Regards,

**Ahmad Dwi Setyawan**

Managing Editor,  
- Biodiversitas, Journal of Biological Diversity ([biodiversitas.mipa.uns.ac.id](http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id)) (SCOPUS, DOAJ)  
- Nusantara Bioscience ([biosains.mipa.uns.ac.id/nusbi\\_oscience.htm](http://biosains.mipa.uns.ac.id/nusbi_oscience.htm)) (DOAJ)



426 dari 2.415

152. TRI HARSONO.pdf



# Biodiversitas & Nusantara Biosci.

Buka dengan

## INVOICE

for AUTHOR

**Society for Indonesian Biodiversity**  
 Jl. Ir. Sutami 36 A Surakarta 57126  
 Tel./Fax. 0271-663375, email: unsjournals@gmail.com  
<http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/>  
<http://biosains.mipa.uns.ac.id/nusbioscience.htm>

DATE	12/11/2016
INVOICE #	152
CUSTOMER ID	152
DUE DATE	18/11/2016

### BILL TO

**TRI HARSONO**

Graduate Program, Departement of Biology,  
 Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Sumatera Utara.  
 Jl. Bioteknologi, No. 1, Kampus USU, Medan, 20155, North Sumatra, Indonesia.  
 email: triharsonounimed@gmail.com

**Title:**

Phylogenetic analysis of Indonesian gandaria (Bouea) using molecular markers of cpDNA trnL-F intergenic spacer

DESCRIPTION	TAXED	AMOUNT (IDR)
Payment for manuscript publication		3.500.000,00
Payment for English translation/improvements		2.000.000,00
Cost reduction for manuscript presented in the SIB scientific meeting	X	(1.400.000,00)

## Phylogenetic analysis of Indonesian *gandaria* (*Bouea*) using molecular markers of cpDNA *trnL-F* intergenic spacer

TRI HARSONO<sup>1,4\*</sup>, NURSAHARA PASARIBU<sup>2</sup>, SOBIR<sup>3</sup>, FITMAWATI<sup>4</sup>, EKO PRASETYA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program, Departement of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Sumatera Utara. Jl. Bioteknologi, No. 1, Kampus USU, Medan, 20155, North Sumatra, Indonesia. Tel.: +62-....., Fax.: +62-....., \*email: triharsonounimed@gmail.com

<sup>2</sup>Departement of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Sumatera Utara. Jl. Bioteknologi, No. 1, Kampus USU, Medan 20155, North Sumatra, Indonesia.

<sup>3</sup>Center for Tropical Horticulture Studies, Institut Pertanian Bogor. Jl. Raya Pajajaran, Kampus IPB Baranangsiang, Bogor 16141, West Java, Indonesia.

<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Riau. Jl. H.R. Soebrantas, Km 12.5, Panam, Kampus Unri Binawidya, Pekanbaru 28293, Riau, Indonesia.

<sup>5</sup>Departement of Biology, Universitas Negeri Medan. Jl. Willem Iskandar, Pasar V, Medan Estate, Medan 20221, North Sumatra, Indonesia

Manuscript received: 5 September 2016. Revision accepted: xxx November 2016.

**Abstract.** Harsono T, Pasaribu N, Sobir, Fitmawati, Prasetya E. 2017. Phylogenetic analysis of Indonesian *gandaria* (*Bouea*) using molecular markers of cpDNA *trnL-F* intergenic spacer. *Biodiversitas* 18: xxxx. Genus *Bouea* is a member of the Family Anacardiaceae which is widespread in Malesia region. Genus *Bouea* consists of two types, namely, *B. oppositifolia* (Roxb.) Adelb. and *B. macrophylla* Griffit. This study aims to uncover the genetic diversity of *Bouea* in Indonesia based on molecular markers of cpDNA *trnL-F* intergenic spacer. The samples of genetic material analyzed are 7 accessions of *B. oppositifolia* and 8 accessions of *B. macrophylla* coming from the collection of the Bogor Botanical Gardens and the field exploration activity in Sumatra, Java, Kalimantan and Ambon, and *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* are also used as an out-group comparator. Based on phylogenetic analysis using the maximum parsimony and neighbor-joining method, genus *Bouea* is a monophyletic group or is derived from the same ancestor. *Bouea* derived from Gunung Tua, North Sumatra, has the longest branch and showed up earlier than the other sample so it can be considered that the ancestor of genus *Bouea*. *B. oppositifolia* has branches longer and show up early so it can be considered the ancestor of *B. macrophylla*. Both types of genera *Bouea* grouped separately in the phylogenetic tree and supports grouping types in genera *Bouea*. The results of phylogenetic tree construction do not indicate a geographical grouping of accession. Based on the phylogenetic tree, genus *Bouea* has a closer kinship with *Anacardium occidentale* compared with *Mangifera indica*. The results showed that the markers cpDNA *trnL-F* intergenic spacer effectively used to determine kinship in genus *Bouea*.

**Keywords:** *Bouea*, cpDNA, *gandaria*, phylogenetic, *trnL-F* intergenic spacer



Telusuri email

Tulis

- Kotak Masuk 15
- Berbintang
- Ditunda
- Penting
- Terkirim
- Draf 11
- Kategori
- Sosial 1
- Update 2
- Forum
- Promosi 9
- Travel
- Tri +

satrya gusty Mengirim pesan

**Managing Editor** Sab, 12 Nov 2016 17.14  
 Dear Sir, Kindly find attached file invoice for publication of your manuscript as well as uncorrected proof. The corrected proof is waited for the next 7 days.

**Tri Harsono** Sel, 15 Nov 2016 15.40  
 Dear Mr. Ahmad Dwi Setyawan dan Ms. Dewi Nur Pratiwi Mohon maaf, jika masih memungkinkan, saya kirimkan kembali perbaikan revisi naskah jurnalnya. S...

**Tri Harsono** <triharsonounimed@gmail.com> Sel, 15 Nov 2016 15.43  
 ke Managing

Dear Mr. Ahmad Dwi Setyawan dan Ms. Dewi Nur Pratiwi  
 Mohon maaf, jika masih memungkinkan, saya kirimkan kembali perbaikan revisi naskah jurnalnya. Sedikit ada perbaikan pada afiliasi dan alamat author serta penomoran author.

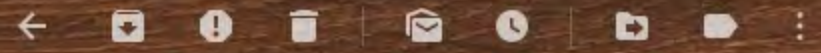




Telusuri email



Tulis



427 dari 2.415 < > [edit] [settings]

- Kotak Masuk 15
- Berbintang
- Ditunda
- Penting
- Terkirim
- Draf 11
- Kategori
- Sosial 1
- Update 2
- Forum
- Promosi 9
- Travel
- Tri +

### Transfer dana Biodiversitas a.n. Tri Harsono Kotak Masuk x



**Tri Harsono**

Kam, 17 Nov 2016 10.17 ☆

Buk Dwi saya khabarkan bahwa dananya dah saya transfer ke rekening ibu Trimakasih tuk semua kebaikannya wasalam



**Dewi Nur Pratiwi** <dewinp11@gmail.com>

Min, 20 Nov 2016 17.23 ☆ ↩ ⋮

ke saya ▾

Indonesia > Esti [Terjemahkan pesan](#)

[Nonaktifkan untuk: Indonesia x](#)

Baik Pak, Terima Kasih.

Salam,  
dewi NP



[Balas](#) [Teruskan](#)



**ANALISIS FILOGENETIKA BOUEA (*BOUEA*)  
INDONESIA MENGGUNAKAN MARKA MOLEKULER  
*cpDNA trnL-F.INTERGENIK SPACER***

Tri Harsono<sup>1\*</sup>, Nursahara Pasaribu<sup>2</sup>, Sobir<sup>3</sup>, and Fitmawati<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Post-graduate student of Plant Biology, North Sumatra University, Medan*

<sup>2</sup> *Biology Departement, North Sumatra University-Medan*

<sup>3</sup> *Center For Tropical Horticultural (PKHT)-Bogor Agricultural University-Bogor*

<sup>4</sup> *Biology Department, Riau University-Pekanbaru*

**Abstract**

Penelitian ini bertujuan mengungkap data keanekaragaman genetik, pohon filogeni, arah evolusi dan persebaran tetua *Bouea* Indonesia berdasarkan penanda *cpDNA trn L-F Intergenik spacer*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pusat Kajian Hortikultura Tropik (PKHT) IPB-Bogor dan Laboratorium Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Unimed. Sampel yang digunakan adalah koleksi segar *Bouea* yang ada di Kebun Raya Bogor, dilengkapi dengan koleksi segar dari beberapa lokasi di Sumatra, Jawa, Kalimantan, Ambon. Isolasi DNA berdasarkan prosedur kerja Doyle & Doyle tahun 1987 yang dilanjutkan dengan uji kuantitas dan kualitas DNA menggunakan metode elektroforesis. Amplifikasi DNA menggunakan pasangan primer *cpDNA forward* 5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3' dan *cpDNA reverse* 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'. Pencirian dilakukan berdasarkan pengamatan pita DNA pada setiap sampel. Setiap pita merupakan fragmen DNA yang diukur berdasarkan 1 KB ladder. Data sekuen DNA *Bouea* diedit, dijajarkan dan dirunut (alignment) menggunakan program BioEdit 7.0.0.1. Analisis maksimum parsimoni dan maksimum likelihood menggunakan PAUP versi 4.0b8 dengan bootstrap diulang 1000 kali. Kladogram dihasilkan dari analisis Neighbour Joining menggunakan program Phylip 3.67. Pengelompokan disusun berdasarkan ciri fragmen DNA yang dapat diamplifikasi pada tiap aksesori. Hubungan kekerabatan antar aksesori diketahui dari analisis similaritas menggunakan program NTSys PC versi 2.02. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa : (1) *B. oppositifolia* asal Gunung Tua (GT), Sumatera Utara memiliki ruas terpanjang dan muncul lebih awal dan diduga merupakan tetua bersama dari *B. oppositifolia*, (2) Sekuen *trnL-F* pada genus *Bouea* tidak terpengaruh letak geografi. (3). Sebanyak 6 aksesori pada *B. macrophylla* dan 7 aksesori pada *B. oppositifolia* bersama-sama membentuk 2 cabang utama dan tidak terkelompok secara geografi. (3). Dalam garis evolusi yang sama terjadi pemisahan antara *B. macrophylla* dan *B. oppositifolia* yang sekaligus mendukung pengelompokan jenis dalam marga *Bouea*.

**Key Words** : *Bouea*, *cpDNA trn L-F intergenik spacer*, kladogram, filogenetik



## 1. PENDAHULUAN

*Bouea* merupakan tumbuhan asli Indonesia yang tersebar di Sumatra, Jawa, Kalimantan dan Maluku. Tumbuhan ini juga ditemukan di semenanjung Malaysia dan Thailand. *Bouea* tumbuh di daerah beriklim tropis basah. Secara alami, flora identitas provinsi Jawa Barat ini tumbuh di dataran rendah hingga ketinggian 300 meter dpl, namun *Bouea* terbudidaya mampu tumbuh dengan baik hingga ketinggian 850 meter dpl (Rifai, 1992). Laporan lain menyebutkan bahwa *Bouea* merupakan tanaman endemik khas Maluku (Rehatta, 2005; Papolaya, 2007).

Hou (1978) melaporkan, marga *Bouea* mencakup 2 jenis yaitu *Bouea oppositifolia* (Roxb.) Adelb. dan *Bouea macrophylla* Griffith. Berdasarkan pengamatan spesimen herbarium dan spesimen segar, Harsono (2013) melaporkan bahwa variasi morfologi daun dan buah yang terdapat dalam *Bouea oppositifolia* (Roxb.) Adelb. dan *Bouea macrophylla* Griffith masih cukup lebar, sehingga membutuhkan pendekatan lain di luar morfologi untuk mengungkap keanekaragaman yang ada di dalam marga *Bouea*.

Penanda morfologi umum digunakan untuk mengungkap keanekaragaman suatu jenis tanaman, namun karena memiliki plastisitas yang tinggi diperlukan penanda lain yang lebih mantap dan stabil seperti penanda molekuler. Kestabilan penanda molekuler ini selain digunakan untuk mendukung keanekaragaman morfologi juga dapat digunakan untuk mengungkap keanekaragaman genetik dan hubungan adanya menduga kekerabatan antar jenis. Data keanekaragaman genetik yang lebih stabil dapat dipergunakan untuk berbagai kegiatan seperti pemuliaan, pengelolaan dan konservasi plasma nutfah.

Para ahli berbeda pendapat tentang wilayah asal usul marga *Bouea*. Rudini (1990) menetapkan *Bouea* sebagai maskot Jawa Barat, karena dianggap tumbuhan asli bernilai budaya bagi suku Sunda. Rifai (1992) menyatakan *Bouea* berasal dari Sumatra bagian Utara, sedangkan Rehatta (2005) dan Papolaya (2007) menyatakan *Bouea* merupakan jenis endemik di Maluku. Harsono (2012) melaporkan bahwa suku Dayak di pedalaman Kalimantan juga memanfaatkan tumbuhan ini untuk berbagai aktifitas kehidupan. Untuk menjawab

permasalahan ini diperlukan analisis filogenetik yang dapat menjelaskan tentang asal usul, tetua dan perjalanan evolusi marga *Bouea* Indonesia. Informasi hubungan kekerabatan *Bouea* bermakna untuk memprediksi tetua bersama dari *Bouea* Indonesia.

Analisis filogenetik selain membutuhkan penanda morfologi juga penanda molekuler yang lebih konservatif (tidak mudah berubah) seperti penanda *cpDNA trnL-F Intergenic spacer*. Penanda ini sering digunakan para ahli karena mudah diisolasi dan dipurifikasi, dikarakterisasi dan dikloning dan sangat konservatif dengan laju evolusi yang rendah, sehingga dapat digunakan untuk rekonstruksi filogeni antar taksa pada tingkatan famili tumbuhan berbunga (Clegg dan Durbin, 1990; Kajita *et al*, 1998).

Penggunaan penanda molekuler kloroplas (*cpDNA*) untuk mengungkap keanekaragaman, menelusuri hubungan kekerabatan berdasarkan evolusinya dan memperjelas kedudukan marga *Bouea* Indonesia belum pernah dilakukan. Penanda ini bermanfaat untuk mendukung data molekuler *Bouea* yang sudah ada sebelumnya, sekaligus untuk memahami evolusi *Bouea* berdasarkan sekuen DNA kloroplasnya. Informasi evolusi *Bouea* bermakna untuk memprediksi tetua bersama dari *Bouea* yang ada di Indonesia saat ini. Penanda *cpDNA* telah banyak digunakan untuk studi filogeni tanaman lainnya. Misalnya *Morus* oleh Weiguo *et al*. (2005), *Cucumis* spp. oleh Chung *et al*. (2006). *cpDNA* sering digunakan sebagai penanda karena mudah diisolasi dan dipurifikasi, dikarakterisasi, dan dikloning, dan sangat konservatif dengan laju evolusi yang rendah, sehingga dapat digunakan untuk rekonstruksi filogeni antar taksa pada tingkat famili tumbuhan berbunga (Clegg & Durbin 1990, Kajita *et al*. 1998).

Tujuan Penelitian ini untuk (1). mendapatkan data keragaman genetik marga Indonesia berdasarkan penanda *cpDNA trnL-F Intergenic spacer* (2). Menghasilkan pohon filogeni dari marga *Bouea* Indonesia guna mendapatkan arah evolusi dan persebaran tetua *Bouea* Indonesia.

## 2. METODE PENELITIAN

### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Oktober 2015 di Pusat Kajian

Hortikultura Tropika (PKHT-IPB) dan Laboratorium Molekuler, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Medan.

## B. Bahan dan Metode

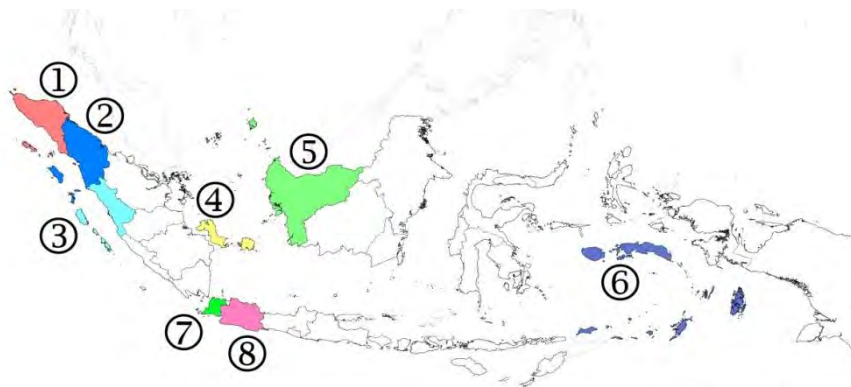
### 1. Bahan

Sampel *B. macrophylla* dan *B. oppositifolia* diperoleh dari berbagai wilayah di Indonesia yang mewakili 7 wilayah yang dianalisis pada penelitian ini

yaitu Ambon, Banten, Aceh, Sumatera Barat, Kalimantan Barat, Bangka Belitung, Sumatera Utara, dan aksesori dari Kebun Raya Bogor. Sampel yang digunakan berupa sampel daun segar dengan *outgroup* yang digunakan merupakan kerabat dekatnya yaitu *Mangifera indica* dan *Anacardium occidentale*. Aksesori *Bouea* yang digunakan dalam analisis disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Sampel *Bouea* dan *outgroup* yang digunakan untuk analisis filogenetik

No	Asal Aksesori	Kode	Jenis <i>Bouea</i>	Jumlah
1	Aceh	SN	<i>B. macrophylla</i>	1
2	Sumatera Utara	GT, SP	<i>B. macrophylla</i>	2
3	Sumatera Barat	BS	<i>B. macrophylla</i>	1
4	Bangka Belitung	BL	<i>B. oppositifolia</i>	1
5	Kalimantan Barat	KB	<i>B. macrophylla</i>	1
6	Ambon	AM	<i>B. macrophylla</i>	1
7	Banten	BA	<i>B. macrophylla</i>	1
8	Kebun Raya Bogor	KR1, 2, 3, 5	<i>B. oppositifolia</i>	4
9	Kebun Raya Bogor	KR4	<i>B. macrophylla</i>	1
10	Kebun Raya Bogor	MI	<i>M. indica</i>	1
11	Kebun Raya Bogor	AO	<i>A. occidentale</i>	1
<b>Total</b>				<b>13</b>



Gambar 2.1. Wilayah pengambilan sampel (1) Lhoksukon, Aceh, (2) Sipiongot dan Gunung Tua, Sumatera Utara, (3) Batu Sangkar, Sumatera Barat, (4) Bangka Belitung, (5) Kalimantan barat, (6) Ambon, Maluku, (7) Banten, dan (8) Kebun Raya Bogor.

### 2. Metode Penelitian

#### a. Isolasi DNA

Isolasi DNA mengikuti prosedur CTAB (Doyle & Doyle 1987) dengan modifikasi. Sebanyak 0,15 g sampel daun digerus menggunakan mortar steril dengan tambahan *buffer* ekstraksi 0,6-0,8 ml (10% CTAB; 0,5 M EDTA(pH 8,0); 1 M Tris-Hcl (pH 8,0); 5 M Nacl; 1%  $\beta$ -mercaptoethanol). Larutan

dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam dan diberi penambahan 0,7 ml *buffer* purifikasi (kloroform:Isoamil Alkohol=24:1 v/v), dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung effendorf steril 2 ml dan ditambahkan 500  $\mu$ l 2-propanol dingin untuk kemudian di Inkubasi selama 1

malam didalam *freezer*. Larutan kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 11.000 rpm. Fase cair dibuang sedangkan fase padat/pelet dikering-anginkan dan disimpan dalam larutan TE 100 µl (1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M EDTA pH 8,0; dan aquades).

**b. Amplifikasi dan visualisasi sekuen *trnL-F intergenic spacer***

Sekuen *intergenic spacer trnL-F* diamplifikasi dengan pasangan primer cpDNA *forward* 5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3' dan cpDNA *reverse* 5'-ATTTGAACTGGTGACACG-AG-3' (Small *et al.* 2005) dengan total volume reaksi 25 µl (2,5 µl DNA *template*; 2,5 µl primer *forward*; 2,5 primer *reverse*; 5µldistilled water, 12,5 µl PCR mix (FastStart PCR Master Mic Roche). Amplifikasi daerahDNA *trnL-F intergenic spacer* menggunakan mesin PCR *Thermalcycler* (Qiagen) dengan kondisi *predenaturasi* selama 5 menit pada suhu 97°C diikuti 40 siklus dengan kondisi reaksi *denaturasi* pada suhu 94°C selama 5 menit, *annealing* pada suhu 52°C, dan *extension* pada suhu 72 °C selama 1 menit, kemudian proses PCR akhiri dengan *post-extension* pada suhu 72 °C selama 5 menit. Produk PCR divisualisasi meng-gunakan gel agarose 1% (1 gram agarose ditambah 100 ml buffer TBE) ditambah dengan 4 µl SYBR ® Safe DNA Gel Stain. sebanyak 6 µl produk PCR ditambah dengan 1 µl *loading dye* di *running* bersama marker 100 bp DNA *ladder* menggunakan mesin elektroforesis

dengan fase gerak berupa buffer TBE 1X pada tegangan 100 volt selama 45 menit. Visualisasi pita yang muncul menggunakan *gel documentation*. Produk PCR dengan pita yang terlihat selanjutnya akan dikirim ke 1<sup>st</sup> *Base DNA Sequencing Service* untuk di sekuensing.

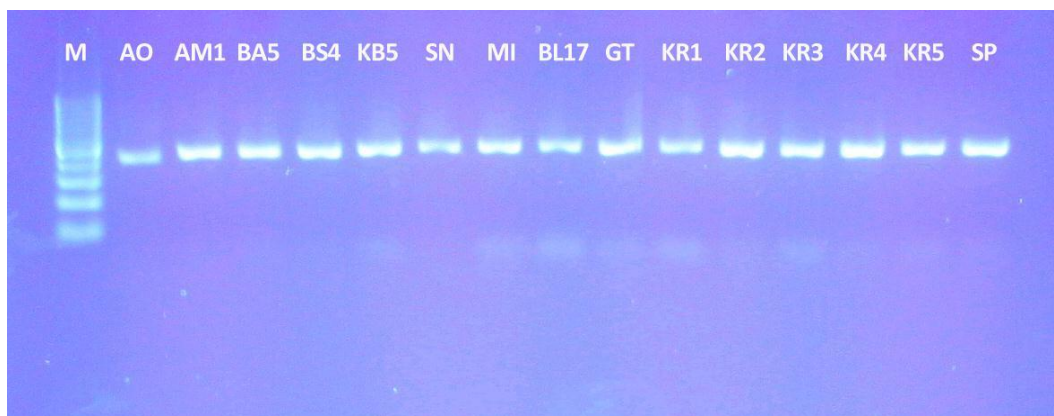
**c. Analisis Data**

Data hasil *sequencing* sampel sekuen *trnL-F* dianalisis dengan program BioEdit 7.0.1 untuk menenukan sekuen konsensus berdasarkan sekuen konservatif dan program MEGA 6.06 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) untuk membangun kladogram. Hasil *sequencing* akan di *alignment* menggunakan program Clustal W yang terdapat pada MEGA 6.06 dan kemudian kladogram akan dibangun berdasarkan hasil *alignment* data sekuen. Dengan bantuan program MEGA, *alignment* data dapat dilakukan dan berdasarkan hasil *alignment* hubungan evolusi dapat diprediksi. Program MEGA juga memilii kemampuan untuk menghitung matriks jarak evolusi dan memiliki program untuk analisis statistik.

**3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

**A. Visualisasi Hasil PCR**

Visualisasi hasil PCR menggunakan agarose 1% menunjukkan *single band* yang berarti sekuen *trnL-F* berhasil diamplifikasi dengan primer cpDNA *forward* dan cpDNA *reverse*. Gambar visualisasi hasil PCR disajikan pada Gambar 2.



Gambar 3.1. Visualisasi hasil PCR dengan agarose 1%; AO = *A. occidentale*, AM1 = Ambon (*B. macrophylla*), BA5 = Banten (*B. macrophylla*), BS4 = Batu Sangkar, Sumatera Barat (*B. macrophylla*), KB = Kalimantan Barat (*B. macrophylla*), SN = Lhoksukon, Aceh (*B. macrophylla*), MI = *Mangifera indica*, BL17 = Bangka Belitung (*B. oppositifolia*), GT = Gunung Tua, Sumatera Utara (*B. oppositifolia*), KR1, KR2, KR3, dan KR5 = Kebun Raya Bogor (*B. oppositifolia*), KR4 = Kebun Raya Bogor (*B. macrophylla*), SP = Sipiongot, Sumatera Utara (*B. oppositifolia*)

Hasil visualisasi terlihat cukup jelas sehingga produk PCR dapat dilanjutkan ke proses sekuensing. Proses sekuensing dilakukan dengan cara mengirimkan sampel ke 1<sup>st</sup> Base Singapore untuk kemudian disekuensing. Hasil sequencing berupa file .ab1 yang akan diolah menggunakan program Bioedit dan MEGA untuk memperoleh sekuen konsensus. Sekuen konsensus yang diperoleh kemudian dianalisis bioinformatik.

#### **B. Alignment hasil sequencing sekuen trnL-F pada Genus *Bouea* dan outgroup (*M. indica* dan *A. occidentale*)**

Hasil alignment sekuen *trnL-F* terdiri dari 483 karakter. Dari data tersebut terdapat 351 karakter konservatif, 8 karakter berpotensi *parsimony informative*, dan 108 karakter merupakan *variable sites* (Tabel 2). Hasil alignment pada Tabel 2 menunjukkan adanya *gap* pada sekuen yang disebabkan oleh adanya insersi dan delesi. Peristiwa ini mempengaruhi regulasi dalam ekspresi gen. Pada *ingroup* (*B. macrophylla* dan *B. oppositifolia*), delesi terjadi pada basa no. 1-12, 433, dan 467-483, insersi terjadi pada basa no. 3, 5, 16, 17, 35, 466, 467, 470, dan 471, sedangkan insersi delesi terjadi pada basa no. 3, 5, 467, 470, dan 471. Hasil alignment menunjukkan tingkat homologi yang sangat tinggi (98%) pada kedua spesies dari genus *Bouea*. Nilai ini lebih tinggi jika dibandingkan tingkat homologi 14 spesies famili *Anacardiaceae* pada daerah ITS-1 genom inti yaitu 75% (Hidayat & Pancoro, 2001). Rata-rata frekuensi nukleotida pada sekuen

*trnL-F* adalah 32,2% (T), 22,6% (C), 29,3% (A), dan 16% (G). Sekuen ini kaya akan T/A yaitu sebesar 61,1% sedangkan G/C sebesar 38,8% (Tabel 3). Hal ini sesuai dengan pernyataan Li (1997) yang menyatakan bahwa komposisi nukleotida yang paling banyak pada daerah nonkoding DNA kloroplas adalah Adenin dan Timin. Di sisi lain, rasio transisi/transversi cukup tinggi ( $R = 0,92$ ) dimana transisi/transversi rasio purin (0,004) dan transisi/transversi rasio pirimidin (0,258). Variasi muncul di antara spesies yang satu dengan spesies yang lain dalam genus yang sama maupun yang berbeda.

Variasi urutan sekuen yang terdapat pada *cpDNA* umumnya disebabkan oleh mutasi nukleotida tunggal yang mempresentasikan mutasi yang telah terjadi dalam jangka waktu yang sangat lama (Fitmawati & Hartana, 2010). Perbedaan panjang sekuen *trnL-F* terjadi akibat mutasi pada beberapa wilayah tertentu (Borsch *et al.*, 2003), meskipun jumlah perubahan pada sekuen ini sangat kecil jika dibandingkan dengan perubahan pada genom inti, tetapi mampu memberikan informasi penting dalam menggambarkan proses evolusi karena *cpDNA* diwariskan secara uniparental atau *maternal* dimana perubahan yang terjadi pada satu nukleotida berlangsung dalam jangka waktu yang sangat lama (Hancock 2003), berbeda dengan perubahan basa nukleotida yang terjadi pada DNA inti yang merupakan hasil rekombinasi kedua induknya.

Tabel 3.1. Hasil Alignment sekuen trnL-F dari enam *B. macrophylla* (BM), tujuh *B. oppositifolia* (BO), *A. occidentale* (AO), dan *M. indica* (MI)

Sampel	5	15	25	35	45
BM AM1	TTTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BM BA5	-TTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BM BS4	TTTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BM KB5	TTTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BM KR4	-----	---CCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BM SN	TTTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BO BL12	TTGGTTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BO GT	-----	---CCCTTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BO KR1	-TTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BO KR2	-TTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BO KR3	TTTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BO KR5	-TTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
BO SP	--TGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
AO	-TTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAAATCC	CCCCAAAAAG	GGCCCATTTA
MI	-TTGGTTCAA	GTCCTCTAT	CCCCAA----	---TAAAAAG	G--TGATTTT
	55	65	75	85	95
BM AM1	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BM BA5	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BM BS4	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BM KB5	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BM KR4	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BM SN	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BO BL12	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BO GT	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BO KR1	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BO KR2	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BO KR3	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BO KR5	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
BO SP	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
AO	ACTCCCTAAC	GATTTATCCT	ATGTT-----	-----AGTG	GTTCC-----
MI	ACTTCCTAAA	TATTTATCCT	CCTTTTTTTTT	TTCATCAGCG	ATTCAGTTCA
	105	115	125	135	145
BM AM1	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BM BA5	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BM BS4	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BM KB5	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BM KR4	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BM SN	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BO BL12	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BO GT	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BO KR1	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BO KR2	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BO KR3	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BO KR5	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
BO SP	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTT-----
AO	----AATTTT	GTTATGTTTC	TCATTCATCC	TACTCTTTTC	CATTTACAAA
MI	AACAAAATTC	ACTATCTTTT	TCATTCATCC	CACTCTTTTC	CAACA-CAAA
	155	165	175	185	195
BM AM1	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BM BA5	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BM BS4	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BM KB5	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BM KR4	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BM SN	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BO BL12	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA

BO GT	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BO KR1	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BO KR2	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BO KR3	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BO KR5	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
BO SP	-GTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	TACACAAGTC	GTGTGGTATA
AO	CGTATCCGAG	CAGAATTTTT	TCTCTTATCA	CACACAAGTC	GTGTGGTATA
MI	TGTATCCGAA	CTAAAAAT---	CCTTGGATCT	TATCCCAAT-	-TTCGATAGA

	205	215	225	235	245
BM AM1	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BM BA5	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BM BS4	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BM KB5	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BM KR4	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BM SN	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BO BL12	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BO GT	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BO KR1	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BO KR2	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BO KR3	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BO KR5	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
BO SP	TAGGATACAC	GTAGAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
AO	TAGGATACAC	GTACAAATGA	ACACTTTGGA	GCAAGGAATC	TCCATG--TG
MI	TACAATACCT	CTACAAATAA	ACATATAGGG	GAAAAATTATT	TCATTATTG

	255	265	275	285	295
BM AM1	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BM BA5	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BM BS4	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BM KB5	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BM KR4	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BM SN	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BO BL12	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BO GT	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BO KR1	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BO KR2	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BO KR3	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BO KR5	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
BO SP	AATGATTCAC	AATCCATCTC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
AO	AATGATTCAC	AATCCATATC	ATTGCTCATA	CTGAAACTTA	CAAAGTCTTC
MI	AATCATTAC	AGTCCATATC	ATTATCCTTA	CGCTTACTAG	TAAAAT----

	305	315	325	335	345
BM AM1	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BM BA5	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BM BS4	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BM KB5	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BM KR4	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BM SN	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BO BL12	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BO GT	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BO KR1	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BO KR2	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BO KR3	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BO KR5	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
BO SP	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACTG
AO	TTTTTGAATA	TTCAAGAAAT	GCAATTTCCC	GTCCAAGACT	TTTAATACGG
MI	-TTTTGACTA	TTT-----	----TTTATA	GTCC-----	-----

355	365	375	385	395
-----	-----	-----	-----	-----

BM AM1	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BM BA5	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BM BS4	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BM KB5	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BM KR4	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BM SN	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BO BL12	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BO GT	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BO KR1	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BO KR2	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BO KR3	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BO KR5	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
BO SP	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATCGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
AO	AATTGCGTCT	TTTTTAATTG	ACATAGACCC	AACCCATCTA	GTAAAAATGAA
MI	-----	-CTTTAATTG	ACATAGACAC	AAACACTATA	CCAGTAT---

	405	415	425	435	445
BM AM1	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BM BA5	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BM BS4	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BM KB5	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BM KR4	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BM SN	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CAAGCTGGTA	GAGCAGAGGA
BO BL12	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BO GT	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BO KR1	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BO KR2	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BO KR3	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BO KR5	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
BO SP	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
AO	AATGATGCGT	CGGTAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GCTGGTA	GAGCAGAGGA
MI	---GATGCAG	GGGAAATGGT	CGGGATAGCT	CA-GTTGGTA	GAGCAGAGGA
	455	465	475		
BM AM1	CTGAAAATCC	TCGTGTCACC	AGTTCAAATA	AA-	
BM BA5	CTGAAAATCC	TCGTGTCACC	AGTTCAAATA	A--	
BM BS4	CTGAAAATCC	TCGTGTCACA	GGTTCAAATA	AAA	
BM KB5	CTGAAAATCC	TCGTGTCACC	AGTTCAAATA	A--	
BM KR4	CTGAAAATCC	TCGTGCA---	-----	---	
BM SN	CTGAAAATCC	TCGTGTCACA	GGTTCAAATA	AAA	
BO BL12	CTGAAAATCC	TCGTGTCACA	GGTTCAAATA	AAA	
BO GT	CTGAAAATCC	TCGTGC----	-----	---	
BO KR1	CTGAAAATCC	TCGTGTCACC	GGTTCAAATA	AA-	
BO KR2	CTGAAAATCC	TCGTGTCACC	AGTTCAAATA	AA-	
BO KR3	CTGAAAATCC	TCGTGTCACC	AGTTCAAATA	AA-	
BO KR5	CTGAAAATCC	TCGTGTCACC	AGTTCAAATA	AA-	
BO SP	CTGAAAATCC	TCGTGTCACC	AGTTCAAATA	AA-	
AO	CTGAAAATCC	TCGTGTCACC	AGTTCAAATA	A--	
MI	CTGAAAATCC	TCGTGTCACC	GGTTCAAAA-	---	

Tabel 3.2. Variasi panjang, AT content, dan GC content pada sekuen trnL-F pada Genus *Bouea*

Sampel	T	C	A	G	Total (bp)	%AT	%GC
<i>B. macrophylla</i> (BA5)	32,2	22,6	28,8	16,4	451,0	61,0	39,0
<i>B. macrophylla</i> (AM1)	32,4	22,9	28,5	16,2	445,0	60,9	39,1
<i>B. macrophylla</i> (BS4)	31,9	22,2	29,4	16,4	445,0	61,3	38,7
<i>B. macrophylla</i> (KB5)	32,3	22,6	29,0	16,2	452,0	61,3	38,7
<i>B. macrophylla</i> (KR4)	32,2	22,8	28,9	16,2	426,0	61,0	39,0
<i>B. macrophylla</i> (SN)	32,1	22,2	29,5	16,3	455,0	61,5	38,5
<i>B. oppositifolia</i> (BL12)	32,2	22,5	29,1	16,3	454,0	61,2	38,8

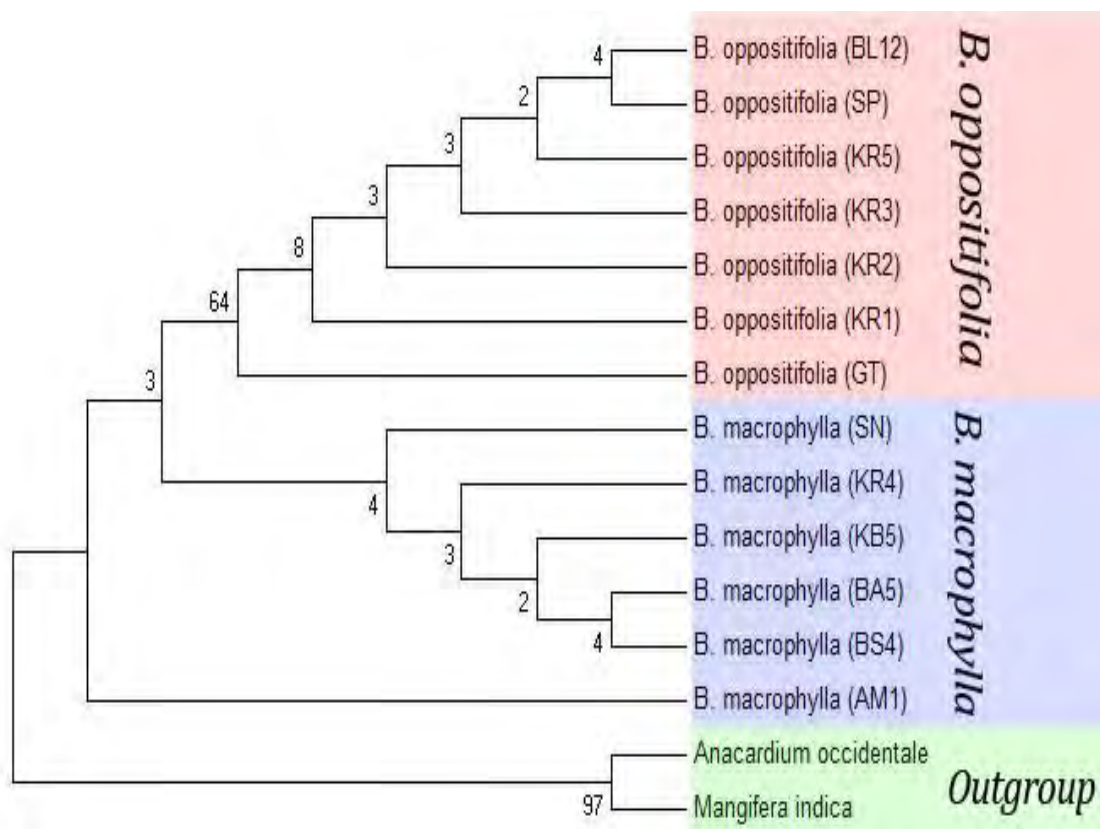
<i>B. oppositifolia</i> (GT)	32,1	23,1	28,5	16,3	424,0	60,6	39,4
<i>B. oppositifolia</i> (KR1)	32,1	22,8	28,8	16,4	452,0	60,8	39,2
<i>B. oppositifolia</i> (KR2)	32,1	22,8	29,0	16,2	452,0	61,1	38,9
<i>B. oppositifolia</i> (KR3)	32,2	22,7	28,9	16,1	453,0	61,1	38,9
<i>B. oppositifolia</i> (KR5)	32,1	22,8	29,0	16,2	452,0	61,1	38,9
<i>B. oppositifolia</i> (SP)	31,9	22,8	29,0	16,2	451,0	61,0	39,0
<i>Anacardium occidentale</i>	31,3	22,5	30,2	16,0	457,0	61,5	38,5
<i>Mangifera indica</i>	33,7	21,5	32,0	12,8	413,0	65,6	34,4
<b>Rata-rata</b>	<b>32,2</b>	<b>22,6</b>	<b>29,2</b>	<b>16,0</b>	<b>445,5</b>	<b>61,4</b>	<b>38,6</b>

### C. Pembahasan

#### 1) Analisis filogenetik sekuen *trnL-F* DNA kloroplas pada Marga *Bouea*

Pohon filogenetik yang disajikan pada Gambar 1 dibangun dengan metode *Maximum*

*Parsimony* dan 1000x *bootstrap*. Metode *Neighbour Joining* (NJ) juga dilakukan untuk melihat perbedaan jarak genetik dan menganalisis similaritas antar sampel (Gambar 3.2).



Gambar 3.2. Pohon filogenetik sekuen *trnL-F* dari *Bouea* dan outgroup (*A. occidentale* dan *M. indica*) hasil rekonstruksi dengan menggunakan metode *Maximum parsimony* berdasarkan *kimura-2-parameter* model. Percabangan dianalisis dengan nilai bootstrap >50% dari 1000 ulangan.

Analisis pohon filogenetik menyingkap jawaban penting tentang sifat leluhur. Kelompok *ingroup* dari genus *Bouea* terpisah dari kelompok *outgroup* dengan nilai bootstrap 100%. Pemisahan ini menunjukkan bahwa sekuen *trnL-F Intergenic Spacer* adalah benar sekuen dari genus *Bouea*. Pohon *ingroup* yang dihasilkan merupakan pohon monofiletik dengan 3 kelompok utama. Kelompok pertama

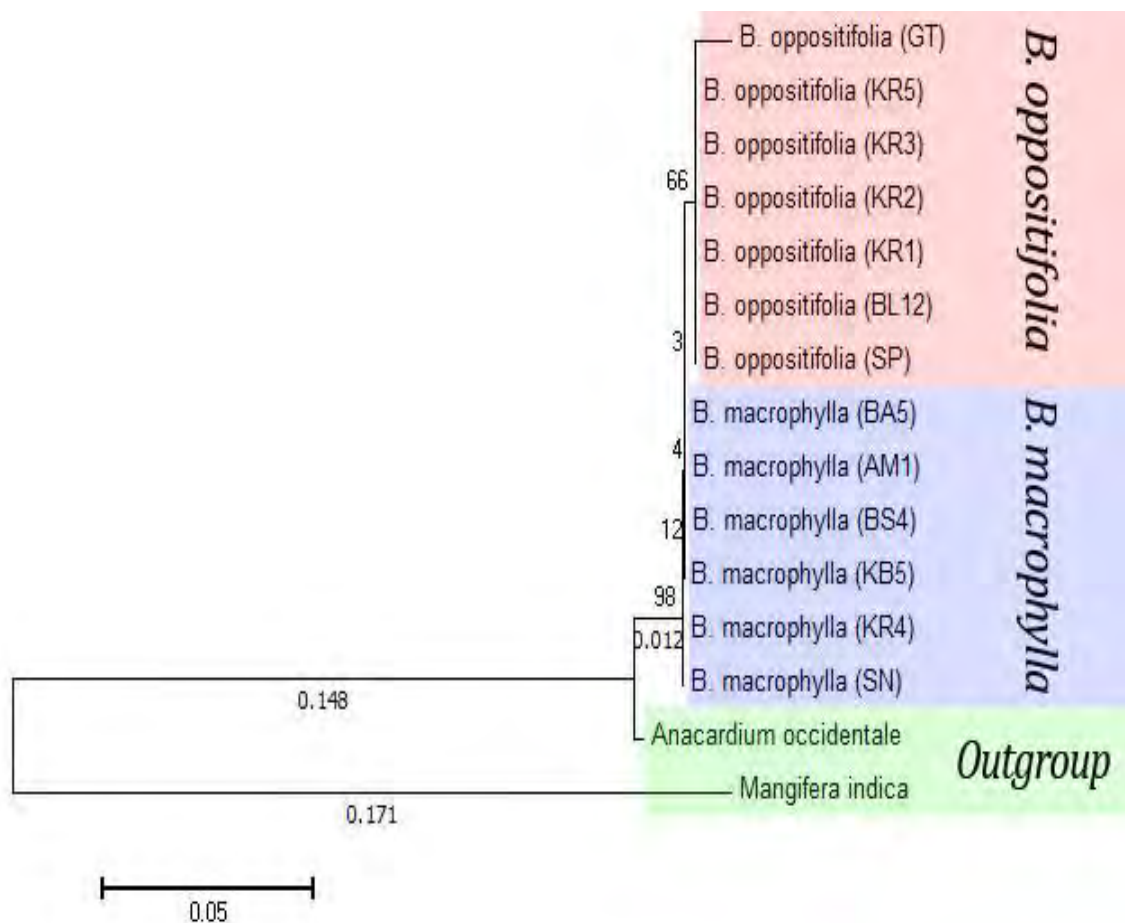
merupakan kelompok yang terdiri dari 1 spesies yaitu *B. oppositifolia* terdiri dari 7 aksesori. Kelompok kedua terdiri dari 1 spesies yaitu *B. macrophylla* terdiri dari 6 aksesori. Kelompok ketiga terdiri dari *outgroup* yaitu *M. indica* dan *A. occidentale* (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan pernyataan Taberlet *et al.* (1991) yang menyatakan bahwa DNA kloroplas baik digunakan untuk analisis kekerabatan antar



spesies namun belum dapat memisahkan dalam pengelompokan intraspecies. Pada Gambar 2 memperlihatkan bahwa *B. oppositifolia* dan *B. macrophylla* terpisah secara tegas percabangannya kecuali *B. macrophylla* aksesori asal Ambon (AM1) yang menunjukkan keunikan tersendiri dengan membentuk cabang terpisah dari kedua jenis *Bouea*. Hal ini diduga disebabkan oleh jauhnya letak geografis aksesori *Bouea*, yang memungkinkan terbentuknya relung ekologi yang berbeda dan spesifik, sehingga memungkinkan terjadinya perubahan yang signifikan pada sekuen basa nukleotida *trnL-F* DNA kloroplasnya.

Sebanyak 6 aksesori pada *B. macrophylla* dan 7 aksesori pada *B. oppositifolia* bersama-sama membentuk 2 cabang utama dan tidak terkelompok secara geografis. Analisis pohon filogenetik berdasarkan sekuen *trnL-F* memperlihatkan bahwa *B. oppositifolia* tidak berasal dari satu nenek moyang dari satu daerah.

Pola persebaran yang merata di berbagai tempat dapat menjelaskan bahwa *Bouea* merupakan tumbuhan asli Indonesia bagian barat. Tidak terdapatnya hubungan kekerabatan di antara mereka dimungkinkan karena lingkungan tempat tumbuh terisolasi, dan keadaan ini berasosiasi dengan faktor genetik yang mengakibatkan jauhnya jarak kekerabatan. Berbeda dengan *B. macrophylla* yang menyatu dalam satu klad dan memperlihatkan kekerabatan yang tinggi diantara anggota jenisnya. Hal ini dapat dijelaskan bahwa *B. macrophylla* berasal dari salah satu cabang yang diturunkan dari *B. oppositifolia*. Dalam hal ini *B. macrophylla* merupakan bentuk budidayanya. Hal ini juga didukung dengan karakter morfologi yang dimiliki *B. macrophylla* seperti ukuran buah, ukuran daun lebih besar dan warna lebih cerah yang merupakan karakter unggul dalam budidayanya.



Gambar 3.3. Pohon filogenetik sekuen *trnL-F* dari *Bouea* dan outgroup (*A. occidentale* dan *M. indica*) hasil rekonstruksi dengan menggunakan metode *Neighbour Joining*. Percabangan dianalisis dengan nilai bootstrap >50% dari 1000 ulangan.

Gambar 4 mengkonfirmasi bahwa *B. oppositifolia* yang berasal dari Gunung Tua memiliki ukuran klad yang lebih panjang. Berdasarkan analisis Neighbor Joining dapat dikatakan bahwa *B. oppositifolia* asal Gunung Tua lebih tua atau muncul lebih awal dibanding *B. oppositifolia* lainnya. Hal ini juga menggambarkan bahwa *B. oppositifolia* asal Gunung Tua merupakan cikal bakal atau nenek moyang dari *Bouea* yang ada di Sumatera. Pohon *neighbor joining* juga mengungkapkan bahwa jenis *B. oppositifolia* dengan jarak genetik yang panjang memiliki usia jenis yang lebih tua daripada jenis *B. macrophylla*. Genus *Bouea* memiliki kekerabatan yang lebih dekat dengan *A. occidentale* dibandingkan dengan *M. indica* yang dikenal memiliki kemiripan yang lebih baik dengan genus *Bouea*.

Keanekaragaman yang ditunjukkan oleh penanda *cpDNA* relatif berbeda dengan keanekaragaman yang ditunjukkan oleh penanda morfologi. Pola yang muncul dari penanda *cpDNA* tidak selalu berhubungan dengan pola yang dihasilkan dari penanda morfologi, dan demikian pula sebaliknya. Hal ini dimungkinkan karena ekspresi pada level morfologi adalah hasil dari rekombinasi dua induk dan faktor lingkungan. Selain itu sekuen gen yang terletak pada DNA kloroplas mengalami laju evolusi yang lebih rendah daripada DNA inti (Taberlet *et al.*, 1991). Daerah nonkoding memiliki tingkat mutasi yang tinggi sehingga variasi yang muncul lebih banyak dan lebih informatif jika dibandingkan dengan dengan daerah koding (Taberlet, *et al.*, 1991 ; Hamilton, 1999).

Tabel 3.3 menunjukkan Jarak genetik dan koefisien similaritas *B. oppositifolia*, *B. macrophylla*, dan 2 *outgroup* (*A. occidentale* dan *M. indica*). Koefisien similaritas tertinggi *B. oppositifolia* adalah 0,999 terdapat antara *B. oppositifolia* asal Kebun Raya Bogor (KR5) dengan *B. oppositifolia* asal Kebun Raya Bogor (KR2), sedangkan koefisien similaritas tertinggi *B. macrophylla* adalah 0,997 terdapat antara *B. macrophylla* asal Banten (BA5) dan Batu Sangkar, Sumatera Barat (BS4) dengan *B. macrophylla* asal Kalimantan Barat (KB5) serta asal Lhoksukon, Aceh (SN). Koefisien similaritas tertinggi antara *B. oppositifolia* dan *B. macrophylla* adalah 0,997 yaitu antara *B. macrophylla* asal Ambon (AM1) dengan *B. oppositifolia* asal Kebun Raya Bogor (KR3).

#### 4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa (1) Sebanyak 6 aksesori pada *B. macrophylla* dan 7 aksesori pada *B. oppositifolia* bersama-sama membentuk 2 cabang utama dan tidak terkelompok secara geografi, (2) *B. macrophylla* merupakan bentuk budidaya dari *B. oppositifolia*, (3) *B. oppositifolia* asal Gunung Tua (GT), Sumatera Utara memiliki ruas terpanjang dan diduga sebagai nenek moyang bersama dari *B. oppositifolia*.

#### 5. REFERENSI

- Adjie, B., Takamiya, M., Ohta, M., Ohsawa, T. A., Watano, Y. 2008. Molecular Phylogeny of the Lady Fern Genus *Athyrium* in Japan Based on Chloroplast *rbcL* and *trnL-trnF* Sequences. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 59 (2):79-95
- Alejandro GD, Razafimandimbison SG, Liede-Schumann S. 2005. Polyphyly of *Mussaenda* inferred from ITS and *trnT-F* data and its implications for generic limits in *Mussaendeae* (Rubiaceae). *Am J Bot* 92:544-557.
- Barfuss MHJ, Samuel R, Till W, Stuessy TF. 2005. Phylogenetic relationships in subfamily *Tillandsioideae* (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *Am J Bot* 92: 337-351.
- Borsch, T., K. W. Hilu, D. Quandt, V. Wilde, C. Neinhuis & W. Barthlott. 2003. Non-coding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *J. Evol. Biol.* 16: 558–576.
- Clegg MT, Durbin ML . 1990. Molecular approaches to study plant biosystematics. *Aust Syst Bot* 3:1-8.
- Clegg, M.T., Learn, G.H., Golenberg, E.M. 1991. *Molecular evolution of chloroplast DNA*. In: Selander RK, Clark AG, Whittam TS (eds) *Evolution at the Molecular Level*, Clegg MT, Learn GH, Golenberg EM: *Molecular evolution of chloroplast DNA*. In: Selander RK, Clark AG, Whittam TS (eds) *Evolution at the Molecular Level*, pp. 135-149
- Eiadthong, W., Yonemori, K., Kanzaki, S., dan Sugiura, A. 2000. Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis

- for Studying Genetic Relationships among *Mangifera* Species in Thailand. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125 (2) :160-164
- Fitmawati, & Hartana, A. 2010. Phylogenetic Study of *Mangifera laurina* and its Related Species Using cpDNA *trnL-F* Spacer Markers. *Hayati Journal of Biosciences* Vol. 17, No. 1, p. 9-14
- Hamilton MB (1999). Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol. Ecol.* 8: 521-523.
- Hancock, J.F. 2003. *Plant Evolution and The Origin of Crop Species*. Second Edition. CABI Publishing. CAB International. Wallingford.UK
- Harsono, T. 2013. Marga Bouea (*Anacardiaceae*) di Malesia. Makalah Seminar Nasional Biologi Tanggal 13 April 2013 di FMIPA USU
- Hou, D. 1975. *Anacardiaceae*. In: van Steenis, C.G.G.J. (Editor): *Flora Malesiana*, Series 1. Vol. 8. p. 468.
- Kajita, T., K. Kamiya, K. Nakamura.* 1998. Molecular phylogeny of *Dipterocarpaceae* in Southeast Asia based on nucleotide sequences of *matK*, *trnL* intron, and *trnL-F* IGS Region in cpDNA. *Mol Phylo Evol* 10:202-209. .
- Li, W.H., 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer & Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 402–408.
- Lim, T.K. 2012. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plant, Volume 1, Fruit*. Springer Science
- Norfaizal, G.M. dan Latiff, A. 2013. Leaf anatomical characteristics of *Bouea*, *Mangifera* and *Spondias*(*Anacardiaceae*) in Malaysia. *AIP Conference Proceeding* 1571, 394 (2013):394-403
- Pan, Y.,Gong, X., dan Yang, Y. 2008. Phylogenetic position of the genus *Dobinea*: Evidence from nucleotide sequences of the chloroplast gene *rbcl* and the nuclear ribosomal ITS region. *Journal of Systematics and Evolution* 46 (4) : 586-594
- Pell, S.K. 2004. *Molecular Systematics of The Cashew Family (Anacardiaceae)*. Dissertation. The Department of Biological Sciences. Louisiana State University
- Quandt, D. 2002. *Molecular evolution and phylogenetic utility of non-coding DNA: Addressing relationships among pleurocarpous mosses*. Ph.D. Thesis, University of Bonn, Bonn.
- Shaw J, EB Lickey, JT Beck, SB Farmer, W. Liu, J. Miller, KC Siripun, CT Winder, EE Schilling, RL Small. 2005. The tortoise and the hare ii: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92: 142-166
- Suparman, S., Pancoro, A., dan Hidayat, T. 2013. Phylogenetic Analysis of *Mangifera* Base on RBCL sequences, Chloroplast DNA. *Scientific Paper. Series B, Horticulture*, Vol. LVII:235-240
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*17: 1105-1109
- Tsai, L., Yu, Y., Hsieh, H., Wang, J., Linacre, A., Lee, J. C. 2006. Species Identification Using Sequences of the *trnL* Intron and the *trnL-trnF* IGS of Chloroplast Genome Among Popular Plants in Taiwan. *Forensic Science International* 164:193-200

Tabel 3.3. Jarak genetik dan koefisien similaritas *B. oppositifolia*, *B. macrophylla*, dan 2 outgroup (*A. occidentale* dan *M. indica*)

	BM AM1	BM BA5	BM BS4	BM KB5	BM KR4	BM SN	BO BL12	BO GT	BO KR1	BO KR2	BO KR3	BO KR5	BO SP	AO	MI
BM AM1	*****	0.995	0.993	0.997	0.933	0.991	0.986	0.929	0.993	0.995	0.997	0.995	0.993	0.969	0.600
BM BA5	0,000	*****	0.988	0.997	0.937	0.986	0.982	0.933	0.993	0.995	0.993	0.995	0.993	0.973	0.602
BM BS4	0,000	0,000	*****	0.991	0.931	0.997	0.993	0.927	0.991	0.988	0.991	0.988	0.986	0.963	0.598
BM KB5	0,000	0,000	0,000	*****	0.935	0.989	0.984	0.931	0.991	0.993	0.995	0.993	0.991	0.971	0.601
BM KR4	0,003	0,003	0,003	0,003	*****	0.929	0.929	0.992	0.933	0.933	0.931	0.933	0.935	0.912	0.554
BM SN	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	*****	0.991	0.925	0.989	0.986	0.989	0.986	0.984	0.960	0.597
BO BL12	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,003	*****	0.925	0.988	0.986	0.988	0.986	0.984	0.956	0.592
BO GT	0,008	0,008	0,008	0,008	0,006	0,008	0,011	*****	0.929	0.929	0.927	0.929	0.931	0.908	0.550
BO KR1	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,003	0,000	0,011	*****	0.997	0.995	0.997	0.995	0.967	0.601
BO KR2	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,003	0,000	0,011	0,000	*****	0.997	0,999	0.997	0.969	0.599
BO KR3	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,003	0,000	0,011	0,000	0,000	*****	0.997	0.995	0.967	0.597
BO KR5	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,003	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	*****	0.997	0.969	0.599
BO SP	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,003	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	*****	0.967	0.597
AO	0,014	0,014	0,014	0,014	0,017	0,014	0,017	0,023	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	*****	0.613
MI	0,330	0,330	0,330	0,330	0,335	0,330	0,334	0,344	0,334	0,334	0,334	0,334	0,334	0,322	*****

 Koefisien Similaritas  
 Jarak Genetik

Keterangan :

BM = *Bouea macrophylla*, BO = *Bouea oppositifolia*, AO = *Anacardium occidentale*, MI = *Mangifera indica*, AM1 = Ambon, BA5 = Banten, BS4 = Sumatera Barat, KB5= Kalimantan Barat, KR1-5 = Kebun Raya Bogor, SN= Lhoksukon, Aceh, BL12 = Bangka Belitung, GT = Gunung Tua, SP = Sipiongot

