



ANALISIS FILOGENI MOLEKULER TANAMAN PALA (*Myristica sp*) DARI TAHUNA MENGGUNAKAN *gen rbcL* DNA KLOROPLAS

Marselino Ingkiriwang, Rudi A. Repi, dan Fanny N. Nanlohy
Biologi FMIPA Universitas Negeri Manado
sukmadocuments@gmail.com

ABSTRAK. Pala (*Myristica sp*) merupakan tanaman yang berasal dari kepulauan Banda, Maluku. Daging buah Pala dapat diolah menjadi manisan atau asinan, biji dan fulinya dapat dimanfaatkan dalam bidang industri. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kedudukan species dan pohon filogeni Pala dari Tahuna berdasarkan barcode molekuler tumbuhan *gen rbcL* (*the rubisco large subunit*), DNA kloroplas. *rbcL* berukuran lebih dari 1400 bp. Hasil penelusuran BLAST dari situs NCBI menunjukkan bahwa Pala dari Tahuna tepatnya dari desa Mahena dan desa Kulur masih kekerabatan dengan *Myristica fragrans* dengan tingkat kemiripan 99%. Dari kedudukan pohon Filogeni tumbuhan Pala yang ada di Tahuna menunjukkan bahwa Pala ini lebih dekat kekerabatannya dengan *Mauloutchia chapelieri*, *Horsfieldia amygdalina*, *Staudtia kamerunensis*, *Virola michelii*, *Virola kwatae*, *Myristica fragrans*, *Compsonaura atopa*, *Compsonaura capitellata*, *Virola sebifera*, *Horsfieldia amygdalina*, *Coelocaryon preussii*.

Kata Kunci: *Myristica sp*, Pala, DNA Kloroplas, *gen rbcL*

ABSTRACT. Nutmeg (*Myristica sp*) is a plant that comes from the Banda Island, Maluku. Its fruit pulp can be processed into preserves or pickles, its beans and mace can be utilized in the industrial field. This study aims to get the position in species and the tree of phylogeny Nutmeg from Tahuna based on molecular barcodes plant *rbcL* (*the Rubisco large subunit*) gene, chloroplast DNA. *rbcL* have a measurement of more than 1400 bp. The results of BLAST from the NCBI website indicates that the Nutmeg of Tahuna especially from Mahena village and Kulur village still have kinship with *Myristica fragrans* with 99% similarity level. From the position of the tree phylogeny of Nutmeg in Tahuna shows that Nutmeg is more closely related to *Mauloutchia chapelieri*, *Horsfieldia amygdalina*, *Staudtia kamerunensis*, *Virola michelii*, *Virola kwatae*, *Myristica fragrans*, *Compsonaura atopa*, *Compsonaura capitellata*, *Virola sebifera*, *Horsfieldia amygdalina*, *Coelocaryon preussii*.

Keywords: *Myristica sp*, Nutmeg, DNA Chloroplast, *gene rbcL*

PENDAHULUAN

Pala (*Myristica sp*) merupakan salah satu jenis tumbuhan berupa pohon yang berasal dari kepulauan Banda, Maluku, sehingga dikenal sebagai tanaman asli Indonesia (DE GUZMAN dan SIEMONSMA, 1999; SASIKUMAR *et al.*, 1999). Daging buah Pala dapat diolah menjadi manisan atau asinan, biji dan fulinya dapat dimanfaatkan dalam bidang industri untuk pembuatan sosis, bumbu, makanan kaleng, pengawatan ikan dan makanan lainnya. Disamping itu minyak pala hasil penyulingan bisa digunakan sebagai bahan baku dalam industri sabun, parfum, makanan, minuman, obat-obatan dan sebagainya (Nagja, 2015).

Tumbuhan pala terbagi atas beberapa jenis, seperti: *Myristica succadewa* BL yang banyak hidup di daerah Ternate. Pala jenis ini sering disebut dengan Pala Patani. Jenis pala yang kedua adalah *Myristica Speciosa* Warb atau yang lebih dikenal dengan nama Pala Hutan, bahkan ada pula yang menyebutnya Pala Bacan. Jenis Pala yang ketiga adalah *Myristica Schefferi* Warb dan sering disebut dengan Pala Gosoriwonin atau Pala Onin. Jenis pala yang keempat adalah *Myristica fragrans* Houtt atau yang lebih dikenal dengan sebutan Pala Banda. Jenis Pala yang kelima adalah *Myristica Argantea* Warb atau yang lebih dikenal dengan pala Papua. Jenis pala yang keenam adalah *Myristica tingens* BL atau yang lebih dikenal dengan sebutan Pala Tertia. Dan jenis pala yang ketujuh adalah *Myristica sylvetris* Houtt atau yang lebih dikenal dengan sebutan Pala Burung (Juwahir, 2015).

Informasi keragaman tanaman maupun jenis varietas pala yang disebutkan tadi masih terbatas. Informasi tersebut penting agar dapat dilakukan konservasi representasi keragaman yang ada sebagai bahan dasar pemuliaan tanaman untuk pengembangan varietas unggul baru. Konservasi plasma nutfah pala juga diperlukan untuk mencegah terjadinya erosi genetik akibat berbagai tindakan manusia di lokasi tumbuh plasma

nutfah pala, yaitu salah satunya dengan DNA *barcode*.

DNA barcode adalah indentifikasi dengan menggunakan pendekatan molekuler yaitu berdasarkan potongan DNA pendek (Hebert *dkk.* 2003). Suatu organisme dapat diidentifikasi dan dibedakan oleh DNA *barcode* mulai dari tahap spesies hingga sub spesies. Serta dapat digunakan untuk pendataan terhadap keragaman jenis dan identifikasi taksonomi (Lahaye *dkk.* 2008). Keunggulan dari teknik ini yaitu untuk mengidentifikasi dan karakterisasi berbagai spesies yang tidak dapat dibedakan secara morfologi (Tudge 2000). Selain itu, teknik ini juga digunakan untuk mengidentifikasi suatu organisme meskipun DNA dari organisme itu tidak dalam bentuk utuh atau murni, bahkan DNANYA sudah mengalami degradasi (Hajibabaei 2006). Pada hewan, DNA mikondria dijadikan dasar untuk penyusunan barcode DNA, sedangkan pada tanaman oleh karena jumlah dan variasi sekuen mitokondrianya relatif kecil, maka DNA plastida (kloroplas) dijadikan dasar sebagai bahan membuat barcode DNA.

Penggunaan dua gen plastid yaitu *rbcL* dan *matK* direkomendasikan oleh The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) sebagai *barcode* standar untuk tumbuhan dan COI untuk hewan (Hollingsworth *dkk.* 2009). Sehingga pada saat ini, gen *rbcL* dan *matK* sudah dipergunakan sebagai penanda DNA untuk spesies tumbuhan (Hebert *dkk.* 2003; Hajibabaei *dkk.*). Dibandngkan dengan gen kromosomal (gen inti), DNA kloroplas memiliki laju evolusi 1-10x lebih cepat (Avisa *dkk.* 1987).

Karakterisasi sifat dengan membaca struktur tumbuhan menggunakan DNA kloroplas merupakan cara determinasi yang paling akurat untuk menilai sifat dan klasifikasi tumbuhan itu sendiri. Identifikasi dan karakterisasi keragaman genetic pada tumbuhan pala penting untuk dilakukan karena merupakan langkah awal dalam program pemuliaan. Agar tanaman pala yang

ada dapat diketahui jenis dan karakteristiknya apakah di daerah itu masih sejenis ataukah sudah berbeda.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biologi jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengatahuan Alam Universitas Negeri Manado pada bulan September 2015.

Alat dan Bahan

Alat

Alat dan Bahan yang digunakan meliputi plastik kedap udara, peralatan ekstraksi DNA, *micropipet*, tabung microsentrifuse, *Dry Block Thermostat*, *vortex*, sentrifuge, *freezer*, Nanospektrofotometer, *Qiaxcel Advanced*, *Real Time PCR – Rotor Gene Q Series*, *PCR Kit*, dan *ABI 3500 Genetic Analyzer*.

Bahan

Bahan yang digunakan yaitu berupa sampel daun pala (*Myristica sp*), Kit Genomic DNA Mini Kit (Plant), Gel Agarose, primer *rbcLa_f* dan *rbcLa_rev*. *Top Taq Master MixKit* QIAGEN.

Prosedur Penelitian

Koleksi Sampel untuk Analisis Molekuler

Daun dari masing-masing sampel diambil, disimpan dalam plastik kedap udara untuk keperluan ekstraksi DNA.

Ekstraksi dan Purifikasi DNA total

Potong jaringan sampel 50 mg sampel segar. Hancurkan sampel menjadi serbuk kemudian pindahkan pada tabung mikrosentrifuse 1,5 ml. Tambahkan 400 µl buffer GP1 atau Buffer GPX1 dan 5 µl Rnase A pada sampel dalam tabung kemudian divortex, lalu inkubasi pada suhu 60⁰ C selama 10 menit, selama inkubasi tabung digoyang/kocok kecil setiap 5 menit Dalam waktu ini, *pre-heat elution buffer* (200 µl per

sampel) pada suhu 60⁰ C. Tambahkan 100 µl buffer GP2 dan campurkan dengan *vortex* kemudian inkubasi menggunakan es (gunakan papan es yang ada di referigrator) selama 3 menit. Letakkan filter kolom dalam *collection tube* 2 ml baru kemudian pindahkan campuran dalam filter kolom. Sentrifuse selama 1 menit pada 1000 g kemudian angkat filter kolom. Pindahkan dengan hati-hati supernatan dari *colection tube* pada tabung microsentrifuse 1,5 ml yang baru.

Tambahkan 1,5 volume buffer GP3 kemudian *vortex* cepat selama 5 detik (e.g. tambahkan 750 µl pada 500 µl lysate). Letakkan GD kolom pada tabung *collection tube* 2 ml, Pindahkan 700 µl campuran (dan semua sisa presipitasi) pada GD Kolom. Sentrifuse pada 14-16000 g selama 2 menit. Angkat GD kolom dan letakkan balik pada tabung *collection tube* 2 ml. Tambahkan sisa campuran pada GD kolom kemudian sentrifuse pada 14-16000 g selama 2 menit. Angkat GD kolom dan letakkan balik pada tabung *collection tube* 2 ml. Tambahkan 400 µl *buffer* W1 pada GD kolom kemudian sentrifuse pada 14-16000 g selama 30 detik. Angkat GD kolom dan letakkan balik pada tabung *collection tube* 2 ml. Tambahkan 600 µl *Wash buffer* pada GD kolom. Sentrifuse pada 14-16000 g selama 30 detik. Angkat GD kolom dan letakkan balik pada tabung *collection tube* 2 ml. Sentrifuse selama 3 menit pada 14-16000 g untuk mendapatkan matrix kolom yang kering. Pindahkan GD kolom kering pada tabung mikrosentrifuse 1,5 baru. Tambahkan 100 µl *pre-heated elution buffer* (TE) pada bagian tengah dari kolom *matrix*. Biarkan selama 3- 5 menit untuk memastikan *elution buffer* (TE) diserap sempurna. Sentrifuse pada 14-16000 g selama 30 detik untuk purifikasi DNA.

Analisis Kemurnian dan Konsentrasi DNA Total

Konsentrasi / kemurnian DNA diperoleh dengan teknik spektrofotometri

menggunakan alat nanospektrofotometer. Kemurnian DNA dapat dilihat dengan nilai rasio A260/A280 anantara 1,8-2,0nm. Apabila >2,0= terkontaminasi dengan RNA.

Amplifikasi Gen Target menggunakan Metode PCR

Amplifikasi gen target (*rbcL*) dilakukan dengan metode PCR (*Polymerize Chain Reaction*) menggunakan *Real Time PCR – Rotor Gene Q Series*. Sampel yang telah terdapat *pure* DNA, terlebih dahulu ditambah dengan *Top Taq Master Mix Kit* QIAGEN sebanyak 25 µl. Kemudian sampel dimasukkan dalam *Rotor Gene Q Series cube*, dan dijalankan dengan *Rotor Gene Q Series Software 2.0.3*. Kondisi PCR: tahap Inisiasi 94⁰ C selama 3 menit, tahap *Cycling* (*Denaturasi, Annealing, dan Elongasi*) pada suhu 54⁰C, dan *final extension* pada 72⁰C selama 5 menit. Jumlah siklus sebanyak 35 kali

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan PCR Kit. PCR Master Mix (*rbcL* maupun *trnL-F*) dibuat dengan skala 25 µl untuk masing-masing sampel, terdiri dari 17,375 µl distilled deionized water, 2,5 µl 10xBuffer, 2 µl dNTP, 1 µl primer(F) 10 µM, 1 µl primer(Rev) 10 µM, 0,125 µl Ex – Taq dan 1 µl sampel.

Visualisasi Amplikon Gen *rbcL*

Produk PCR dilakukan pembacaan pita-pita DNA-nya menggunakan *QIAxcel Advanced*. Sampel yang menunjukkan adanya pita DNA pada panjang pasangan basa tertentu siap untuk di lanjutkan dengan proses sekuensing.

Sekuensing

Setelah dielektroforesis, maka dilanjutkan dengan proses sekuensing untuk menentukan urutan basa nukleotida yang terdapat pada DNA yang mengandung gen target yang telah di amplifikasi dengan metode PCR. Proses ini dilakukan di Laboratorium *First Base*, Singapura.

Analisis Data

Data penelitian mulai dari ekstraksi dan purifikasi DNA, amplifikasi gen *rbcL*, visualisasi amplikon dan elektroforesis dianalisis deskriptif berdasarkan output alat yang digunakan dalam bentuk grafik, elektrogram dan angka. Untuk hasil sekuensing yaitu dalam bentuk file *ABI Pro seq*. dibaca dengan software biologi molekuler: *Geneous 9,0* (Kearse *dkk*, 2012) dan *Mega 7*. Analisis pensejajaran sekuens dilakukan pada gene bank situs NCBI. Konstruksi filogeni menggunakan program *Mega 7* dan konstruksi filogeni on line pada situs NCBI (www.ncbi.gov.nih).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

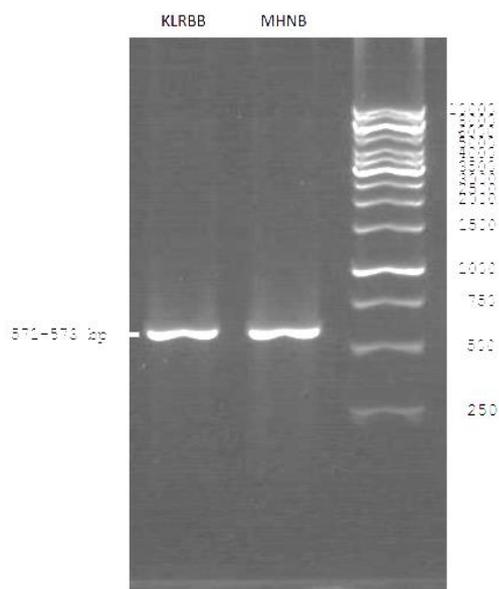
Sampel yang digunakan diambil dari daerah Tahuna tepatnya dari desa Mahena dan Kulur. Organ tumbuhan yang diambil adalah daun. Bagian daun pala dipilih untuk digunakan dalam ekstraksi DNA karena di dalam DNA Kloroplas di mana terdapat gen *rbcL* (*Ribulose-bisphosphate carboxylase*). Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan kit *Genomic DNA mini kit plant* (Geneaid). Hasil ekstraksi DNA berupa DNA total atau DNA genom di mana ekstraksi DNA tersebut dianalisis kemurnian dan konsentrasinya dengan nanospektrofotometer, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi dan kemurnian DNA total daun Pala

No.	Asal sampel	Konsentrasi (1µg/ml)	Kemurnian (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
1	Mahena (MHNB)	24,50	1,86
2	Kulur (KLRB)	22,18	1,68

Untuk mendapatkan fragmen DNA target, yaitu gen *rbcL* maka DNA hasil ekstraksi, di amplifikasi dengan metode PCR

menggunakan *Master Cycles Pro S* (Eppendorf). Hasil amplifikasi fragmen DNA target dapat disajikan pada Gambar 4.3. yang divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel agar rose 0.8%. Gen *rbcL* tervisualisasi dalam gel agar rose pada 700 bp dengan berpatokan pada marker leader dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Visualisasi Gen *rbcL* untuk sampel KLRB dan MHNBB

Sekuen produk PCR dari fragmen DNA yaitu gen *rbcL* dari Pala yang diperoleh, menghasilkan kromatogram yang berkualitas tinggi atau High Quality (HQ). Nilai HQ% kromatogram yang terbaca dalam Geneous 9,0, yaitu 89,2% dan 90,2% dengan panjang *sequen* tervisualisasi pada KLRB 573 bp dan MHNBB 571 bp.

Amplikon yang berhasil diurutkan di laboratorium *First Base* Singapura diperoleh urutan basa nukleotida dari masing-masing sampel, merupakan hasil yang baik, hal ini menyatakan bahwa proses *sequencing* ini berhasil.

Adapun komposisi Nukleotida Tumbuhan Pala gen *rbcL* (%) disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Nukleotida Pala gen *rbcL* (%)

Nukleotida	KLRB	MHNBB
Adenin	26,7%	26,6%
Timin	28,3%	28,0%
Sitosin	21,6%	21,7%
Guanin	23,4%	23,6%

Analisis sekuen nukleotida diatas secara detail menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kandungan komposisi basa A-T dan G-C. Data dari masing – masing sampel ternyata mempunyai kandungan dengan persentase tinggi terdapat pada A-T dibandingkan dengan G-C, dengan komposisi basa dari KLRB A-T (55,0 %) dan G-C (45,0 %), serta MHNBB A-T (54,6 %) dan G-C (45,4 %).

Analisis homologi dilakukan dengan metode BLAST pada software Mega 7 dengan membandingkan sekuen nukleotida tumbuhan Pala dengan 100 data sekuen nukleotida yang menggunakan *gene marker rbcL* yang terdapat di Gen Bank NCBI secara *on-line*. Berikut 20 data sekuen gen *rbcL* yang memiliki tingkat kemiripan tertinggi (www.ncbi.nih.gov) dengan sampel terdapat pada Tabel 3.

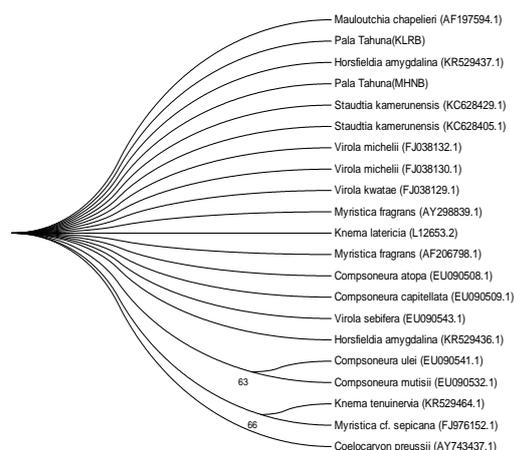
Kontruksi pohon filogenetik tumbuhan Pala dari Tahuna, menggunakan aplikasi Mega 7 dengan metode Maximum Likelihood, dari 21 data sekuen yang ada di Gen Bank NCBI dan data sekuen tumbuhan Pala yang ada di Tahuna.

Berdasarkan Gambar 2 konstruksi pohon filogeni ini didapatkan sekuen Tanaman Pala dari Tahuna menunjukkan bahwa pala yang terdapat di Tahuna masih belum bisa dipastikan berdasarkan gen *rbcL* apakah masih kekerabatan dengan *Myristica fragrans*.

Tabel 3. Dua puluh sekuen gen *rbcL* teratas hasil BLAST yang terdata pada gene bank NCBI

Species	Query cover	E value	% Iden tic	Accession Number
<i>Mauloutchia chapelieri</i>	97%	0.0	99%	AF197594.1

<i>Horsfieldia amygdalina</i> isolate G216	97%	0.0	99%	KR529437.1
<i>Staudtia kamerunensis</i> is voucher PM4941	97%	0.0	99%	KC628429.1
<i>Staudtia kamerunensis</i> is voucher PM5269	97%	0.0	99%	KC628405.1
<i>Virola michelii</i> voucher NL110149	97%	0.0	99%	FJ038132.1
<i>Virola michelii</i> voucher NL110074	97%	0.0	99%	FJ038130.1
<i>Virola kwatae</i> voucher NL110070	97%	0.0	99%	FJ038129.1
<i>Myristica fragrans</i>	97%	0.0	99%	AY298839.1
<i>Knema latericia</i>	97%	0.0	99%	L12653.2
<i>Myristica fragrans</i>	97%	0.0	99%	AF206798.1
<i>Knema tenuinervia</i> isolate J616	97%	0.0	99%	KR529477.1
<i>Knema globularia</i> isolate J385	97%	0.0	99%	KR529464.1
<i>Myristica cf. sepicana</i> GW2419	97%	0.0	99%	FJ976152.1
<i>Compsonera atopa</i> isolate 1374	97%	0.0	99%	EU090508.1
<i>Compsonera capitellata</i> isolate 835	97%	0.0	99%	EU090509.1
<i>Virola sebifera</i> isolate 779	97%	0.0	99%	EU090543.1
<i>Coelocaryon preussii</i>	97%	0.0	99%	AY743437.1
<i>Horsfieldia amygdalina</i> isolate G111	95%	0.0	99%	KR529436.1
<i>Compsonera ulei</i> isolate 6192	97%	0.0	99%	EU090541.1
<i>Compsonera mutisii</i> isolate 914	97%	0.0	99%	EU090532.1



Gambar 2. Rekonstruksi Filogeni pala berdasarkan gen rbcL

Pembahasan

Penggunaan DNA barcode untuk identifikasi atau untuk karakterisasi gen sudah sangat populer seiring dengan berkembangnya teknologi di bidang molekuler dan bioinformatika. Salah satunya dengan teknik *sequencing* yang dapat membaca urutan nukleotida suatu gen produk hasil PCR serta dikembangkannya aplikasi bioinformatika dalam mengelolah produk hasil *sequencing* salah satunya aplikasi geneouis. Hasil *sequencing* yang baik dapat diketahui dengan menggunakan aplikasi ini. Apabila hasil kromatogram hasil *sequencing* di bawah 30% maka penelitian tidak dapat dilanjutkan untuk analisis nukleotida ataupun untuk melakukan pensejajaran pada lembaga penyedia gen bank. Dari data yang diperoleh dengan menggunakan aplikasi geneouis untuk membaca hasil *sequencing* diperoleh bahwa hasil PCR atau *sequencing* semuanya berkualitas baik yaitu diatas 70 %.

DNA berbagai spesies memiliki komposisi basa nukleotida yang khas. Dari data hasil analisis nukleotida menggunakan aplikasi geneouis diperoleh basa adenine dan timin memiliki presentase lebih banyak dibandingkan dengan basa lainnya (Tabel 2.). Hal ini menunjukkan bahwa tanaman Pala termasuk dalam spesies dengan kandungan adenin dan timin yang tinggi. Menurut

Lehninger (1990) berdasarkan komposisi basa nukleotida, spesies dibedakan menjadi dua yaitu spesies yang memiliki kandungan adenin dan timin tinggi serta spesies yang memiliki kandungan guanine dan sitosin tinggi.

Masing-masing basa nukleotida dihubungkan dengan ikatan hidrogen. Terdapat tiga ikatan hidrogen yang dapat terbentuk di antara G dan C tetapi hanya dua yang terbentuk di antara A dan T. Komposisi pasangan basa menyebabkan adanya perbedaan titik lebur DNA. Semakin tinggi kandungan pasangan basa G dan C, semakin tinggi titik lebur DNA. Hal ini disebabkan karena pasangan G dan C lebih stabil dan memerlukan lebih banyak energy panas untuk menguraikannya dibandingkan dengan pasangan A dan C. Hal ini terjadi karena pasangan basa G dan C memiliki tiga ikatan hidrogen, sedangkan pasangan A dan T hanya memiliki dua ikatan hidrogen (Lehninger, 1990).

Tahap berikutnya adalah BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), tahap ini untuk mengidentifikasi dan membandingkan antar spesies tanaman Pala lain yang tersimpan dalam database NCBI yang berkerabat dekat dengan *Myristica sp.* hasil isolasi yang termirip dengan sampel yang ada didapatkan berdasarkan sampel-sampel yang pernah diteliti sebelumnya dan tersimpan dalam database NCBI berdasarkan *fragmen* yang sama.

Analisis filogenetik sekuen tanaman Pala dilakukan dengan membandingkan dengan sekuen tanaman Pala lain dari *genbank*.

Jumlah sekuen yang dianalisis yaitu 21 sekuen yang terdiri atas 2 sekuen sampel tanaman Pala dari Tahuna, sehingga dapat terbentuk pohon filogenetik berdasarkan perbandingan sekuen. Perbandingan sekuen dari tanaman Pala dapat diketahui dengan melakukan penyejajaran seluruh sekuens yang akan dianalisis dengan spesies pembanding dengan metode Crustal W, hal ini dilakukan dengan tujuan untuk

menentukan tingkat homologi dari urutan basa DNA sampel yang dianalisis.

Selanjutnya hasil penyejajaran sekuen DNA *rbcL* dianalisis menggunakan program MEGA 7.0 untuk merekonstruksi pohon filogenetik. Data dianalisis menggunakan metode *maximum likelihood*, dengan rekonstruksi pohon Phylogeninya dapat dilihat pada Gambar 2. dari gambar ternyata Tanaman Pala yang ada di Tahuna, tepatnya di desa Mahena dan desa Kulur masih kekerabatan dalam tingkat genus dengan *Mauloutchia chapelieri*, *Horsfieldia amygdalina*, *Staudtia kamerunensis*, *Virola michelii*, *Virola kwatae*, *Myristica fragrans*, *Compsonaura atopa*, *Compsonaura capitellata*, *Virola sebifera*, *Horsfieldia amygdalina*, *Coelocaryon preussii*, sedangkan *Compsonaura ulei*, *Compsonaura mutisii*, *Knema tenuinervia*, *Myristica cf. sepicana* ini sudah jauh kekerabatannya dengan sampel yang ada.

Dari data ini, ternyata kemampuan diskriminasi (*discrimination power*) barcode oleh gen *rbcL* lemah, hal ini telah diperkirakan oleh beberapa publikasi ilmiah yang menggunakan gen ini untuk barcode (Lahaye, *dkk* 2008). Seperti juga dalam penelitian saudara Mario Walean dalam Tesis-nya yang berjudul “DNA Barcode dan Uji Antilithiasis Ekstrak Etanol Kulit Batang Pakoba (*Syzygium sp.*)”, dalam penentuan barcode DNA-nya saudara Mario menggunakan gen *rbcL* dan *matK*. Ternyata hasil yang didapatkan adalah gen *rbcL* hanya dapat membedakan pada tingkatan genus saja, sedangkan gen *matK* dapat membedakan pada tingkat spesies secara akurat.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa berdasarkan analisis gen *rbcL* (*the rubisco large subunit*) DNA Kloroplas Tumbuhan Pala yang ada di Tahuna menunjukkan bahwa Tanaman Pala dari Tahuna masih kekerabatan dengan *Myristica*

fragrans dengan tingkat kemiripan 99%. Dari kedudukan pohon Filogeni tumbuhan Pala yang ada di Tahuna menunjukkan bahwa Pala ini lebih dekat kekerabatannya dengan *Mauloutchia chapelieri*, *Horsfieldia amygdalina*, *Staudtia kamerunensis*, *Virola michelii*, *Virola kwatae*, *Myristica fragrans*, *Compsonaura atopa*, *Compsonaura capitellata*, *Virola sebifera*, *Horsfieldia amygdalina*, *Coelocaryon preussii*.

Tudge, C. (2000). *The Variety Of Life*. New York: Oxford University Press.

DAFTAR PUSTAKA

- Avisa J. C., Arnol, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lemb, E., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Sauder, C. A. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Ann Rev Ecol Syst* 18:89-52
- De Guzman, C. C. & J. S. Siemonsma, (1999). Plant Resources of South East Asia No. 13: Spices. *PROSEA*. 400 p.
- Hajibabaei, M. (2006). *A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded*. J Compilation Blackwell Publishing. 6: 959-964
- Hebert, P. D. N., Cywinska, N. A., Ball, S. L. & de Waard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 270: 313-321
- Juwahir. (2015). Ciri-ciri dan habitat buah pala. <http://www.bibitpala.com/2015/12/ciri-ciri-dan-habitat-buah-pala.html>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., et al. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.*; 28:1647-1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199 [PMC free article] [PubMed]
- Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoid, S., Barraclough, T. G, & Savolainen, V. (2008). DNA barcode the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 105(8): 2923-2928
- Nagja, Tripatih, K. Vimal, & A. Sanjeev. (2015). *Myristica Fragrans: A Comprehensive Review*. *International Jurnal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 8 ISSN-0975-1491
- Sasikumar, B., Krishnamoorthy, B., Johnson, K.G., Saji, K.V., Ravindran, P.N., & Peter, K.V., (1999). Biodiversity and conservation of major spices in India. *Plant Genet. Resour. Newslet.* 118,19-26