

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	i
KATA PENGANTAR.....	ii
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1. Tanaman Kayu Putih.....	4
2.2. Identifikasi Molekuler Tanaman Kayu Putih.....	5
2.3. Isolasi DNA Metode Doyle & Doyle.....	8
2.4. <i>Internal Transcribed Spacer</i> (ITS).....	10
2.5. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS).....	11
2.6. Ekstraksi Minyak Kayu Putih.....	12
2.7. Hipotesis.....	15
III. METODE PENELITIAN.....	16
3.1. Waktu dan Tempat.....	16
3.2. Alat dan Bahan.....	16
3.2.1. Alat.....	16
3.2.2. Bahan.....	16
3.3. Cara Kerja.....	17
3.3.1. Identifikasi Morfologi.....	17
3.3.2. Isolasi DNA (Metode Doyle & Doyle).....	17
3.3.3. Pengukuran Konsentrasi DNA.....	18
3.3.4. Amplifikasi PCR.....	19
3.3.5. Elektroforesis.....	20
3.3.6. Visualisasi DNA.....	21
3.3.7. Analisis Hasil Sekuensing DNA.....	21
3.3.8. Analisis Filogenetik.....	22
3.3.9. Ekstraksi Minyak Atsiri Kayu Putih.....	22
3.3.10. Analisis GC-MS.....	23
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
4.1. Morfologi Kayu Putih.....	24
4.2. Isolasi DNA Kayu Putih.....	28
4.3. Amplifikasi Daerah ITS pada DNA Kayu Putih.....	29

4.4. Analisis Sekuens Kayu Putih.....	31
4.5. Analisis Filogenetik Kayu Putih.....	32
4.6. Analisis GC-MS Minyak Kayu Putih.....	35
4.7. Hubungan antara Data Morfologi, Identifikasi Molekuler dan Analisis GC-MS pada Kayu Putih Boyolali.....	41
V. SIMPULAN DAN SARAN	44
5.1. Simpulan.....	44
5.2. Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA	45
UCAPAN TERIMA KASIH.....	50
LAMPIRAN.....	52
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Habitus Kayu Putih dan Penampang Daun Kayu Putih.....	6
Gambar 2.2. Diagram Skema Proses DNA Barcoding Sampel Daun Tanaman untuk Identifikasi Molekuler	7
Gambar 2.3. Protokol Isolasi DNA Tanaman dengan CTAB	10
Gambar 2.4. Daerah Marka <i>Internal Transcribed Spacer</i>	11
Gambar 2.5. Skema Sistem GC-MS.....	13
Gambar 2.6. Skema Penyulingan Daun Minyak Kayu Putih.....	14
Gambar 4.1.1. Daun, Kulit Batang, dan Bunga Kayu Putih Boyolali.....	25
Gambar 4.1.2. (a) Kayu Putih Boyolali (b) <i>Melaleuca cajuputi</i> (c) <i>Melaleuca leucadendra</i>	26
Gambar 4.3. Hasil elektroforesis DNA Kayu Putih Boyolali dengan Gel Agarosa 1%...	30
Gambar 4.5. Pohon Filogenetik Kayu Putih Boyolali Berdasarkan Gen ITS	34
Gambar 4.6. Kromatogram Hasil Analisis GC-MS	37
Gambar L.1.1. Dokumentasi Pengambilan Daun Kayu Putih Boyolali.....	53
Gambar L.1.2. Proses Isolasi DNA	53
Gambar L.1.3. Pensejajaran Sekuens dengan MEGA.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Komposisi PCR Mix	18
Tabel 2. Tahapan, suhu, dan waktu proses amplifikasi DNA Kayu Putih Boyolali.....	19
Tabel 3. Morfologi Kayu Putih Boyolali dengan <i>M. cajuputi</i> dan <i>M. leucadendra</i>	25
Tabel 4. Hasil Uji Kuantitatif DNA Kayu Putih	26
Tabel 5. Jarak Genetik Spesies Kayu Putih.....	31
Tabel 6. Hasil Analisis GC-MS Minyak Kayu Putih Boyolali	35
Tabel 7. Senyawa-Senyawa Kimia yang Teridentifikasi	36

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tanaman kayu putih merupakan salah satu komoditas hasil hutan bukan kayu di Indonesia yang dapat menghasilkan minyak atsiri. Minyak atsiri kayu putih banyak dimanfaatkan sebagai sumber bahan produk industri farmasi dan aromaterapi. Minyak atsiri kayu putih mengandung senyawa 1,8-cineole (*eucalyptol*) yang memiliki berbagai macam khasiat untuk kesehatan. Kandungan 1,8-cineole dalam kayu putih diketahui memiliki aktivitas biologis seperti antibakteri, antiinflamasi, dan antioksidan (Sudrajat, 2020). Minyak kayu putih dimanfaatkan dalam industri farmasi yaitu untuk mengatasi infeksi saluran pernafasan, analgesik, dan juga dapat digunakan untuk mengurangi kecemasan.

Produksi minyak kayu putih Indonesia terdapat banyak di Pulau Jawa. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik, hasil produksi daun kayu putih di pulau Jawa pada tahun 2023 mencapai 32.935,83 ton dibandingkan dengan daerah Maluku dan Papua yang hanya mencapai 90 ton (BPS, 2023). Beberapa daerah penghasil kayu putih di Pulau Jawa diantaranya adalah Telawa, Gundih, Surakarta, Banyumas Barat, Tuban, Madura, Nganjuk, Purwakarta, Indramayu, dan Kuningan (Rimbawanto *et al.*, 2021). Kayu putih yang dibudidayakan di Pulau Jawa umumnya dikelola oleh Perhutani dalam kawasan hutan produksi untuk memenuhi kebutuhan industri minyak atsiri nasional.

Salah satu rumah penghasil minyak kayu putih di Pulau Jawa diketahui terdapat di wilayah Kemusu, Kabupaten Boyolali yang bernama Kelompok Tani Hutan (KTH) Wono Lestari II. KTH Wono Lestari II berada dibawah naungan Perhutani

telah mendapatkan Izin Pemanfaatan Hutan Perhutanan Sosial (IPHPS) untuk mendorong pengembangan usaha minyak kayu putih. KTH Wono Lestari II dapat menghasilkan 200 ton daun kayu putih dalam 5 bulan dengan satu kali penyulingan dapat mengekstraksi satu ton daun dan menghasilkan sekitar 7 kg minyak atsiri. Minyak kayu putih Boyolali memiliki keunggulan yaitu memiliki hasil produksi minyak kayu putih murni tanpa pencampuran dengan bahan lain berbeda dengan praktik umum dalam industri minyak kayu putih. Dokumen SNI 3954:2024 menyebutkan bahwa industri minyak kayu putih biasanya menggunakan campuran dari minyak *Eucalyptus globulus* untuk memenuhi kebutuhan pasar. Kayu putih Boyolali menghasilkan minyak kayu putih dengan kualitas murni sehingga berpotensi sebagai produk unggulan.

Produksi minyak kayu putih Boyolali tanpa pencampuran dengan bahan lain membuktikan bahwa kayu putih Boyolali berpotensi menghasilkan produk yang berkualitas namun spesies yang dibudidayakan belum teridentifikasi secara spesifik khususnya secara molekuler. Perhutani sebagai salah satu pengelola hutan di Indonesia umumnya membudidayakan tanaman kayu putih spesies *Melaleuca cajuputi* dan *Melaleuca leucadendra* namun untuk kayu putih dari Boyolali belum pernah dipastikan identitasnya secara ilmiah. Identifikasi morfologi seringkali kurang akurat pada tanaman dengan variasi genetik tinggi seperti genus *Melaleuca* sehingga diperlukan identifikasi secara molekuler untuk mengetahui identitas spesies lebih tepat. Profil kimia dari minyak kayu putih juga dapat membantu untuk mengidentifikasi spesies tetapi profil kimia kayu putih Boyolali juga belum pernah diteliti. Dokumen SNI 3954:2024 juga menjelaskan bahwa kayu putih yang termasuk

dalam kelas mutu utama harus memiliki kandungan senyawa 1,8-cineole sebesar 55 – 60% sedangkan kandungan senyawa 1,8-cineole dalam minyak kayu putih Boyolali belum diketahui. Berdasarkan latar belakang tersebut, identitas genetik tanaman dan analisis profil kimia minyak kayu putih Boyolali perlu dilakukan penelitian untuk menentukan identitas spesies kayu putih Boyolali sebagai dasar dalam meningkatkan daya saing produk di tingkat nasional maupun internasional.

1.2. Rumusan Masalah

- 1.2.1. Bagaimana identitas molekuler tanaman kayu putih Boyolali berdasarkan marka *Internal Transcribed Spacer* (ITS)?
- 1.2.2. Apa saja profil kimia yang terdapat pada minyak atsiri hasil ekstraksi daun kayu putih Boyolali berdasarkan analisis GC-MS?

1.3. Tujuan Penelitian

- 1.3.1. Mengetahui identitas molekuler tanaman kayu putih Boyolali berdasarkan wilayah *Internal Transcribed Space* (ITS)
- 1.3.2. Mengetahui profil kimia tanaman kayu putih Boyolali berdasarkan analisis GC-MS

1.4. Manfaat Penelitian

Identifikasi molekuler berdasarkan daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dilakukan untuk mengidentifikasi spesies kayu putih Boyolali secara molekuler

berdasarkan informasi genetik. Analisis GC-MS dilakukan untuk mengetahui profil kimia dari minyak kayu putih Boyolali. Pemahaman identitas molekuler kayu putih Boyolali dan profil kimia dari minyak kayu putih Boyolali dapat menjadi dasar ilmiah untuk meningkatkan mutu produk minyak kayu putih sehingga dapat bersaing dalam produksi minyak atsiri secara nasional maupun internasional.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Kayu Putih

Tanaman kayu putih termasuk ke dalam tanaman obat yang berasal dari famili Myrtaceae. Kayu putih tumbuh secara alami di bagian barat garis Wallace dan sekitar 30 spesies tumbuh secara alami di wilayah tropis (Rimbawanto *et al.*, 2021). Daun kayu putih banyak mengandung minyak atsiri. Minyak kayu putih dimanfaatkan untuk mengobati beberapa penyakit seperti sesak nafas, batuk, nyeri sendi, menyegarkan nafas, merawat luka, dan juga dapat mencegah gigitan serangga. Minyak kayu putih dapat diekstrak melalui proses penyulingan karena bersifat volatil. Minyak yang dihasilkan biasanya berwarna kuning pucat dengan aroma terapeutik yang kuat (Yogananta *et al.*, 2023).

Kayu putih termasuk ke dalam tumbuhan berbatang tunggal dan tingginya dapat mencapai 24 – 40 meter dengan diameter 1,2 meter. Kayu putih memiliki daun berwarna hijau dan batang dengan kulit berwarna putih keabu-abuan. Daunnya berbentuk oval dengan permukaan berbulu dan berwarna hijau gelap atau abu-abu kecoklatan, dan dipenuhi oleh kelenjar minyak dan memiliki bau khas kayu putih. Kayu putih termasuk ke dalam tanaman hemafrodit dengan bentuk bunganya seperti sikat botol. Bunga kayu putih memiliki lima petal berwarna putih dan pistil berwarna putih-kekuningan. Buahnya berbentuk kapsul dengan jumlah biji sebanyak 10 – 30 biji per kapsul. Biji kayu putih yang terfertilisasi berbentuk solid dan berwarna coklat kehitaman sementara buah yang belum terfertilisasi berwarna coklat terang dan bentuknya lebih datar (Rimbawanto *et al.*, 2021). Habitus dan daun tanaman

kayu putih dapat dilihat pada gambar 2.1. Klasifikasi tanaman kayu putih menurut ITIS (2025) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Filum : Tracheophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Myrtales
Famili : Myrtaceae
Genus : *Melaleuca*

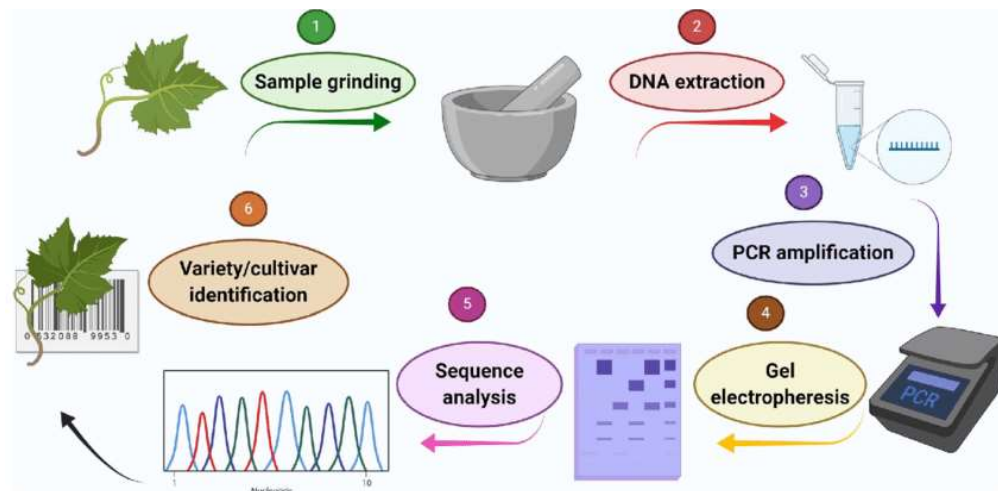


Gambar 2.1. Habitus Kayu Putih dan Daun Kayu Putih (Patramurti *et al.*, 2020)

2.2. Identifikasi Molekuler Tanaman Kayu Putih

Identifikasi molekuler adalah suatu pendekatan yang menggunakan urutan DNA untuk membedakan spesies dengan lebih akurat. Identifikasi secara morfologi terkadang tidak tepat untuk mengidentifikasi spesies pada tanaman sehingga identifikasi secara molekuler menggunakan *barcode* DNA dapat menjadi solusi efektif. Beberapa tanaman dalam satu famili tumbuhan memiliki kemiripan secara

fisik tetapi urutan DNA dan senyawa metabolitnya berbeda sehingga diperlukan analisis molekuler untuk memastikan keaslian spesies tanaman (Sharma & Deb, 2024). Kayu putih merupakan tanaman dengan keragaman genetik yang cukup tinggi. Identifikasi molekuler pada kayu putih dilakukan untuk membantu menentukan identitas tanaman kayu putih berdasarkan informasi genetik. Identifikasi molekuler pada tanaman kayu putih dilakukan melalui beberapa tahapan meliputi isolasi DNA, amplifikasi DNA dengan PCR, elektroforesis, analisis sekuensing dengan BLAST, dan analisis filogenetik (Faradilla *et al.*, 2017).



Gambar 2.2. Diagram Skema Proses DNA Barcoding Sampel Daun Tanaman untuk Identifikasi Molekuler (Azizi *et al.*, 2021)

DNA tanaman dapat diekstraksi dari berbagai macam organ tanaman seperti daun, umbi, akar, dan batang. Bagian tanaman yang lebih sering digunakan untuk proses ekstraksi DNA adalah bagian daun muda karena lebih mudah dihancurkan. Daun muda juga tersusun dari sel-sel yang masih tumbuh aktif dan kandungan metabolit sekundernya sedikit sehingga lebih mudah untuk proses ekstraksi DNA (Heikrujam *et al.*, 2020).

Sampel DNA hasil ekstraksi kemudian diamplifikasi atau diperbanyak dengan alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Alat PCR dapat mengamplifikasi sekuens DNA dalam jumlah jutaan kali dalam beberapa jam sesuai dengan pernyataan Maksum *et al.* (2017) bahwa PCR dapat mengamplifikasi DNA dengan memanfaatkan cara replikasi DNA menggunakan enzim polimerase dan perubahan fisik DNA terhadap suhu. Tahapan dalam PCR meliputi tiga siklus yaitu denaturasi, annealing atau penempelan primer pada *template* DNA, dan elongasi atau perpanjangan. Suhu annealing dapat berbeda-beda tergantung pada sifat primer yang digunakan. Suhu annealing dapat dihitung berdasarkan Temperature melting (T_m) sesuai dengan penjelasan Setyawati & Zubaidah (2021) bahwa suhu annealing dihitung berdasarkan $(T_m - 5)^\circ\text{C}$ sampai dengan $(T_m + 5)^\circ\text{C}$. Tanaman biasanya menggunakan suhu annealing yang berada di kisaran $50 - 60^\circ\text{C}$.

Hasil amplifikasi DNA kemudian divisualisasikan menggunakan metode gel elektroforesis. Elektroforesis digunakan untuk mengukur sekuens DNA kayu putih yang berhasil diamplifikasi. Maksum *et al.* (2017) menjelaskan bahwa elektroforesis dapat menunjukkan posisi fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda yang dapat dilihat menggunakan penyinaran ultraviolet. Elektroforesis menggunakan medan listrik sehingga DNA yang bermuatan negatif dapat bermigrasi ke kutub bermuatan positif. Migrasi molekul DNA bergantung pada gel yang digunakan. Gel pada elektroforesis biasanya terbuat dari agarosa atau poliakrilamida yang dapat membentuk pori-pori kompleks untuk dilalui oleh molekul DNA.

Tahapan identifikasi molekuler selanjutnya adalah analisis sekuens DNA yang dilakukan untuk menentukan urutan basa nitrogen. Sekuens DNA yang ditemukan

4.4. Analisis Sekuens Kayu Putih.....	31
4.5. Analisis Filogenetik Kayu Putih.....	32
4.6. Analisis GC-MS Minyak Kayu Putih.....	35
4.7. Hubungan antara Data Morfologi, Identifikasi Molekuler dan Analisis GC-MS pada Kayu Putih Boyolali.....	41
V. SIMPULAN DAN SARAN	44
5.1. Simpulan.....	44
5.2. Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA	45
UCAPAN TERIMA KASIH.....	50
LAMPIRAN.....	52
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Habitus Kayu Putih dan Penampang Daun Kayu Putih.....	6
Gambar 2.2. Diagram Skema Proses DNA Barcoding Sampel Daun Tanaman untuk Identifikasi Molekuler	7
Gambar 2.3. Protokol Isolasi DNA Tanaman dengan CTAB	10
Gambar 2.4. Daerah Marka <i>Internal Transcribed Spacer</i>	11
Gambar 2.5. Skema Sistem GC-MS.....	13
Gambar 2.6. Skema Penyulingan Daun Minyak Kayu Putih.....	14
Gambar 4.1.1. Daun, Kulit Batang, dan Bunga Kayu Putih Boyolali.....	25
Gambar 4.1.2. (a) Kayu Putih Boyolali (b) <i>Melaleuca cajuputi</i> (c) <i>Melaleuca leucadendra</i>	26
Gambar 4.3. Hasil elektroforesis DNA Kayu Putih Boyolali dengan Gel Agarosa 1%...	30
Gambar 4.5. Pohon Filogenetik Kayu Putih Boyolali Berdasarkan Gen ITS	34
Gambar 4.6. Kromatogram Hasil Analisis GC-MS	37
Gambar L.1.1. Dokumentasi Pengambilan Daun Kayu Putih Boyolali.....	53
Gambar L.1.2. Proses Isolasi DNA	53
Gambar L.1.3. Pensejajaran Sekuens dengan MEGA.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Komposisi PCR Mix	18
Tabel 2. Tahapan, suhu, dan waktu proses amplifikasi DNA Kayu Putih Boyolali.....	19
Tabel 3. Morfologi Kayu Putih Boyolali dengan <i>M. cajuputi</i> dan <i>M. leucadendra</i>	25
Tabel 4. Hasil Uji Kuantitatif DNA Kayu Putih	26
Tabel 5. Jarak Genetik Spesies Kayu Putih.....	31
Tabel 6. Hasil Analisis GC-MS Minyak Kayu Putih Boyolali	35
Tabel 7. Senyawa-Senyawa Kimia yang Teridentifikasi	36

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tanaman kayu putih merupakan salah satu komoditas hasil hutan bukan kayu di Indonesia yang dapat menghasilkan minyak atsiri. Minyak atsiri kayu putih banyak dimanfaatkan sebagai sumber bahan produk industri farmasi dan aromaterapi. Minyak atsiri kayu putih mengandung senyawa 1,8-cineole (*eucalyptol*) yang memiliki berbagai macam khasiat untuk kesehatan. Kandungan 1,8-cineole dalam kayu putih diketahui memiliki aktivitas biologis seperti antibakteri, antiinflamasi, dan antioksidan (Sudrajat, 2020). Minyak kayu putih dimanfaatkan dalam industri farmasi yaitu untuk mengatasi infeksi saluran pernafasan, analgesik, dan juga dapat digunakan untuk mengurangi kecemasan.

Produksi minyak kayu putih Indonesia terdapat banyak di Pulau Jawa. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik, hasil produksi daun kayu putih di pulau Jawa pada tahun 2023 mencapai 32.935,83 ton dibandingkan dengan daerah Maluku dan Papua yang hanya mencapai 90 ton (BPS, 2023). Beberapa daerah penghasil kayu putih di Pulau Jawa diantaranya adalah Telawa, Gundih, Surakarta, Banyumas Barat, Tuban, Madura, Nganjuk, Purwakarta, Indramayu, dan Kuningan (Rimbawanto *et al.*, 2021). Kayu putih yang dibudidayakan di Pulau Jawa umumnya dikelola oleh Perhutani dalam kawasan hutan produksi untuk memenuhi kebutuhan industri minyak atsiri nasional.

Salah satu rumah penghasil minyak kayu putih di Pulau Jawa diketahui terdapat di wilayah Kemusu, Kabupaten Boyolali yang bernama Kelompok Tani Hutan (KTH) Wono Lestari II. KTH Wono Lestari II berada dibawah naungan Perhutani

telah mendapatkan Izin Pemanfaatan Hutan Perhutanan Sosial (IPHPS) untuk mendorong pengembangan usaha minyak kayu putih. KTH Wono Lestari II dapat menghasilkan 200 ton daun kayu putih dalam 5 bulan dengan satu kali penyulingan dapat mengekstraksi satu ton daun dan menghasilkan sekitar 7 kg minyak atsiri. Minyak kayu putih Boyolali memiliki keunggulan yaitu memiliki hasil produksi minyak kayu putih murni tanpa pencampuran dengan bahan lain berbeda dengan praktik umum dalam industri minyak kayu putih. Dokumen SNI 3954:2024 menyebutkan bahwa industri minyak kayu putih biasanya menggunakan campuran dari minyak *Eucalyptus globulus* untuk memenuhi kebutuhan pasar. Kayu putih Boyolali menghasilkan minyak kayu putih dengan kualitas murni sehingga berpotensi sebagai produk unggulan.

Produksi minyak kayu putih Boyolali tanpa pencampuran dengan bahan lain membuktikan bahwa kayu putih Boyolali berpotensi menghasilkan produk yang berkualitas namun spesies yang dibudidayakan belum teridentifikasi secara spesifik khususnya secara molekuler. Perhutani sebagai salah satu pengelola hutan di Indonesia umumnya membudidayakan tanaman kayu putih spesies *Melaleuca cajuputi* dan *Melaleuca leucadendra* namun untuk kayu putih dari Boyolali belum pernah dipastikan identitasnya secara ilmiah. Identifikasi morfologi seringkali kurang akurat pada tanaman dengan variasi genetik tinggi seperti genus *Melaleuca* sehingga diperlukan identifikasi secara molekuler untuk mengetahui identitas spesies lebih tepat. Profil kimia dari minyak kayu putih juga dapat membantu untuk mengidentifikasi spesies tetapi profil kimia kayu putih Boyolali juga belum pernah diteliti. Dokumen SNI 3954:2024 juga menjelaskan bahwa kayu putih yang termasuk

dalam kelas mutu utama harus memiliki kandungan senyawa 1,8-cineole sebesar 55 – 60% sedangkan kandungan senyawa 1,8-cineole dalam minyak kayu putih Boyolali belum diketahui. Berdasarkan latar belakang tersebut, identitas genetik tanaman dan analisis profil kimia minyak kayu putih Boyolali perlu dilakukan penelitian untuk menentukan identitas spesies kayu putih Boyolali sebagai dasar dalam meningkatkan daya saing produk di tingkat nasional maupun internasional.

1.2. Rumusan Masalah

- 1.2.1. Bagaimana identitas molekuler tanaman kayu putih Boyolali berdasarkan marka *Internal Transcribed Spacer* (ITS)?
- 1.2.2. Apa saja profil kimia yang terdapat pada minyak atsiri hasil ekstraksi daun kayu putih Boyolali berdasarkan analisis GC-MS?

1.3. Tujuan Penelitian

- 1.3.1. Mengetahui identitas molekuler tanaman kayu putih Boyolali berdasarkan wilayah *Internal Transcribed Space* (ITS)
- 1.3.2. Mengetahui profil kimia tanaman kayu putih Boyolali berdasarkan analisis GC-MS

1.4. Manfaat Penelitian

Identifikasi molekuler berdasarkan daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dilakukan untuk mengidentifikasi spesies kayu putih Boyolali secara molekuler

berdasarkan informasi genetik. Analisis GC-MS dilakukan untuk mengetahui profil kimia dari minyak kayu putih Boyolali. Pemahaman identitas molekuler kayu putih Boyolali dan profil kimia dari minyak kayu putih Boyolali dapat menjadi dasar ilmiah untuk meningkatkan mutu produk minyak kayu putih sehingga dapat bersaing dalam produksi minyak atsiri secara nasional maupun internasional.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Kayu Putih

Tanaman kayu putih termasuk ke dalam tanaman obat yang berasal dari famili Myrtaceae. Kayu putih tumbuh secara alami di bagian barat garis Wallace dan sekitar 30 spesies tumbuh secara alami di wilayah tropis (Rimbawanto *et al.*, 2021). Daun kayu putih banyak mengandung minyak atsiri. Minyak kayu putih dimanfaatkan untuk mengobati beberapa penyakit seperti sesak nafas, batuk, nyeri sendi, menyegarkan nafas, merawat luka, dan juga dapat mencegah gigitan serangga. Minyak kayu putih dapat diekstrak melalui proses penyulingan karena bersifat volatil. Minyak yang dihasilkan biasanya berwarna kuning pucat dengan aroma terapeutik yang kuat (Yogananta *et al.*, 2023).

Kayu putih termasuk ke dalam tumbuhan berbatang tunggal dan tingginya dapat mencapai 24 – 40 meter dengan diameter 1,2 meter. Kayu putih memiliki daun berwarna hijau dan batang dengan kulit berwarna putih keabu-abuan. Daunnya berbentuk oval dengan permukaan berbulu dan berwarna hijau gelap atau abu-abu kecoklatan, dan dipenuhi oleh kelenjar minyak dan memiliki bau khas kayu putih. Kayu putih termasuk ke dalam tanaman hemafrodit dengan bentuk bunganya seperti sikat botol. Bunga kayu putih memiliki lima petal berwarna putih dan pistil berwarna putih-kekuningan. Buahnya berbentuk kapsul dengan jumlah biji sebanyak 10 – 30 biji per kapsul. Biji kayu putih yang terfertilisasi berbentuk solid dan berwarna coklat kehitaman sementara buah yang belum terfertilisasi berwarna coklat terang dan bentuknya lebih datar (Rimbawanto *et al.*, 2021). Habitus dan daun tanaman

kayu putih dapat dilihat pada gambar 2.1. Klasifikasi tanaman kayu putih menurut ITIS (2025) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Filum : Tracheophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Myrtales
Famili : Myrtaceae
Genus : *Melaleuca*

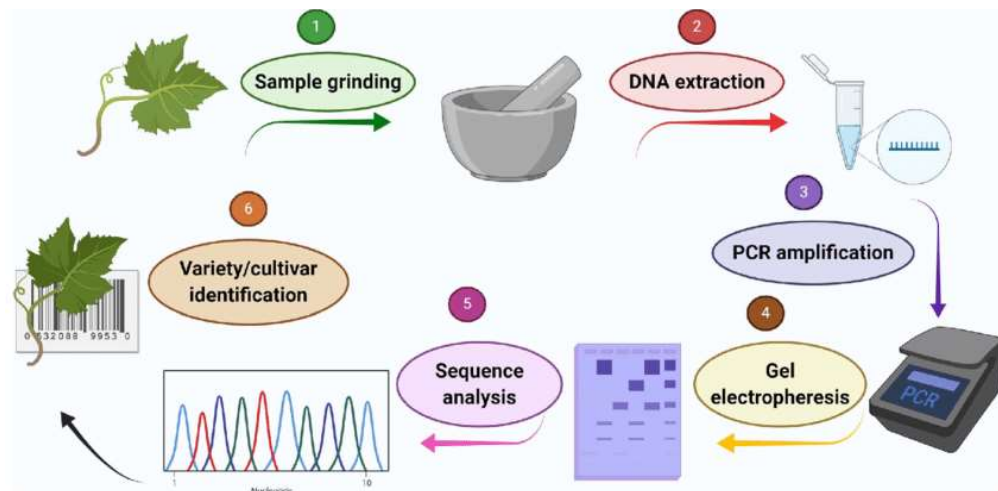


Gambar 2.1. Habitus Kayu Putih dan Daun Kayu Putih (Patramurti *et al.*, 2020)

2.2. Identifikasi Molekuler Tanaman Kayu Putih

Identifikasi molekuler adalah suatu pendekatan yang menggunakan urutan DNA untuk membedakan spesies dengan lebih akurat. Identifikasi secara morfologi terkadang tidak tepat untuk mengidentifikasi spesies pada tanaman sehingga identifikasi secara molekuler menggunakan *barcode* DNA dapat menjadi solusi efektif. Beberapa tanaman dalam satu famili tumbuhan memiliki kemiripan secara

fisik tetapi urutan DNA dan senyawa metabolitnya berbeda sehingga diperlukan analisis molekuler untuk memastikan keaslian spesies tanaman (Sharma & Deb, 2024). Kayu putih merupakan tanaman dengan keragaman genetik yang cukup tinggi. Identifikasi molekuler pada kayu putih dilakukan untuk membantu menentukan identitas tanaman kayu putih berdasarkan informasi genetik. Identifikasi molekuler pada tanaman kayu putih dilakukan melalui beberapa tahapan meliputi isolasi DNA, amplifikasi DNA dengan PCR, elektroforesis, analisis sekuensing dengan BLAST, dan analisis filogenetik (Faradilla *et al.*, 2017).



Gambar 2.2. Diagram Skema Proses DNA Barcoding Sampel Daun Tanaman untuk Identifikasi Molekuler (Azizi *et al.*, 2021)

DNA tanaman dapat diekstraksi dari berbagai macam organ tanaman seperti daun, umbi, akar, dan batang. Bagian tanaman yang lebih sering digunakan untuk proses ekstraksi DNA adalah bagian daun muda karena lebih mudah dihancurkan. Daun muda juga tersusun dari sel-sel yang masih tumbuh aktif dan kandungan metabolit sekundernya sedikit sehingga lebih mudah untuk proses ekstraksi DNA (Heikrujam *et al.*, 2020).

Sampel DNA hasil ekstraksi kemudian diamplifikasi atau diperbanyak dengan alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Alat PCR dapat mengamplifikasi sekuens DNA dalam jumlah jutaan kali dalam beberapa jam sesuai dengan pernyataan Maksum *et al.* (2017) bahwa PCR dapat mengamplifikasi DNA dengan memanfaatkan cara replikasi DNA menggunakan enzim polimerase dan perubahan fisik DNA terhadap suhu. Tahapan dalam PCR meliputi tiga siklus yaitu denaturasi, annealing atau penempelan primer pada *template* DNA, dan elongasi atau perpanjangan. Suhu annealing dapat berbeda-beda tergantung pada sifat primer yang digunakan. Suhu annealing dapat dihitung berdasarkan Temperature melting (T_m) sesuai dengan penjelasan Setyawati & Zubaidah (2021) bahwa suhu annealing dihitung berdasarkan $(T_m - 5)^\circ\text{C}$ sampai dengan $(T_m + 5)^\circ\text{C}$. Tanaman biasanya menggunakan suhu annealing yang berada di kisaran $50 - 60^\circ\text{C}$.

Hasil amplifikasi DNA kemudian divisualisasikan menggunakan metode gel elektroforesis. Elektroforesis digunakan untuk mengukur sekuens DNA kayu putih yang berhasil diamplifikasi. Maksum *et al.* (2017) menjelaskan bahwa elektroforesis dapat menunjukkan posisi fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda yang dapat dilihat menggunakan penyinaran ultraviolet. Elektroforesis menggunakan medan listrik sehingga DNA yang bermuatan negatif dapat bermigrasi ke kutub bermuatan positif. Migrasi molekul DNA bergantung pada gel yang digunakan. Gel pada elektroforesis biasanya terbuat dari agarosa atau poliakrilamida yang dapat membentuk pori-pori kompleks untuk dilalui oleh molekul DNA.

Tahapan identifikasi molekuler selanjutnya adalah analisis sekuens DNA yang dilakukan untuk menentukan urutan basa nitrogen. Sekuens DNA yang ditemukan

kemudian dibandingkan dengan data pada GenBank menggunakan program *Basic Local Alignment Tool* (BLAST). Kim *et al.* (2025) menjelaskan bahwa BLAST dapat menunjukkan sekuens pada database GenBank yang memiliki kemiripan tertinggi dengan sampel. Kecocokan spesies teratas pada BLAST ditentukan berdasarkan E value, query cover, dan *percent identity*. BLAST dapat mengidentifikasi hingga tingkat spesies.

2.3. Isolasi DNA Metode Doyle & Doyle

Molekul DNA dapat diisolasi dari berbagai organisme termasuk tumbuhan. Sampel DNA dapat ditemukan pada berbagai bagian sel seperti inti sel, mitokondria, dan pada tumbuhan DNA juga ditemukan di bagian kloroplas. Prosedur isolasi DNA pada dasarnya memiliki tiga tahapan utama yaitu proses lisis, separasi, dan presipitasi. Lisis merupakan proses pemecahan dinding dan membran sel untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel. Separasi merupakan tahapan pemisahan DNA dari residu seperti RNA dan protein. Presipitasi merupakan tahapan untuk pengendapan dan pemurnian DNA (Buchori *et al.*, 2023).

Metode isolasi DNA yang paling banyak digunakan adalah metode ekstraksi menggunakan *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) yang dipopulerkan oleh Jeff Doyle dan Jane Doyle dimana metode ini dapat mengekstraksi DNA lebih cepat, biayanya murah, dan hanya memerlukan jaringan dalam jumlah sedikit (Schenk *et al.*, 2022). Isolasi DNA metode Doyle & Doyle lebih sering digunakan untuk ekstraksi DNA pada tumbuhan karena dapat melisiskan dinding sel pada tumbuhan dan mengatasi kandungan senyawa lain yang menghambat tahapan isolasi DNA. Metode