

**ANALISIS KERAGAMAN GENETIK SIRIH HIJAU
(*Piper betle* L.) BERBAGAI AKSESI DENGAN MARKA
Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP)**

SYAFIRA RIZQI ESKASALAM



**DEPARTEMEN BIOKIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2019**

PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA*

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi berjudul Analisis Keragaman Genetik Sirih Hijau Berbagai Aksesori dengan Marka *Sequence Related Amplified Polymorphism* (SRAP) adalah benar-benar hasil karya saya sendiri dengan bimbingan dosen dan belum pernah digunakan sebagai karya ilmiah pada perguruan tinggi atau lembaga manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini.

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

Bogor, Mei 2019

Syafira Rizqi E
NIM G84150018

ABSTRAK

SYAFIRA RIZQI ESKASALAM. Analisis Keragaman Genetik Sirih Hijau (*Piper betle* L) berbagai Aksesori dengan Marka *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP). Dibimbing oleh HUSNAWATI dan I MADE ARTIKA

Indonesia kaya akan sumber bahan obat dan obat tradisional. Pemanfaatan tanaman obat telah berlangsung lama tetapi penggunaannya belum terdokumentasi dengan baik. Sirih hijau termasuk tanaman obat yang dapat ditemukan di berbagai tempat, memiliki banyak manfaat dan mudah dibudidayakan. Keragaman genetik sirih hijau dianalisis menggunakan marka molekular *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP), dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Tujuan penelitian ini yaitu menganalisis keragaman genetik sirih hijau berbagai aksesori dengan marka SRAP. Isolasi DNA dilakukan dengan *Plant Genomic DNA Purification Mini Kit*, dengan penambahan HEPES. Hasil amplifikasi DNA diterjemahkan ke dalam data biner lalu dianalisis dengan NTsys 2.0 dan Popgene 3.2. Keragaman genetik sirih hijau pada 7 aksesori yang berasal dari provinsi Kaltim-Kaltara, Sulsel dan Sulteng menghasilkan nilai keragaman genetik yang rendah, yaitu pada kisaran 0-0.39. Aksesori dari Kaltim-Kaltara memiliki jarak genetik terbesar dengan aksesori lainnya yang berasal dari Sulsel dan Sulteng. Jarak genetik terdekat terdapat antara aksesori Tolage dan Tialo dari provinsi Sulteng.

Kata kunci : jarak genetik, keragaman genetik, PCR, sirih hijau, SRAP

ABSTRACT

SYAFIRA RIZQI ESKASALAM. Genetic Diversity Analysis of *Piper betle* L from Various Accession with *Sequence-Related Amplified Polymorphism Markers* (SRAP). Supervised by HUSNAWATI dan I MADE ARTIKA

Indonesia is rich in sources of medicinal ingredients and traditional medicines. The use of medicinal plants lasted thousands of years. However, its use has not been well documented. Green betel is one of medicinal plants that can be found in various places, has many benefits and easily cultivated. Genetic diversity of green betel was analyzed by DNA molecular markers *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP), using *Polymerase Chain Reaction* (PCR). The purpose of this study was to analyze the genetic diversity of various green betel accessions using SRAP markers. DNA was isolated with *Plant Genomic DNA Purification Mini Kit*, with the addition of HEPES. DNA isolation measured with a nanodrop spectrophotometer. Then, results of amplification with PCR were translated into binary data. Data analysis was done with NTsys 2.0 and Popgene 3.2. The genetic diversity of green betel in 7 accessions originating from East Kalimantan, North Kalimantan, South Sulawesi and Central Sulawesi produced low genetic diversity values, which ranged from 0-0.39. Accession from East-North Kalimantan has the largest genetic distance with other accessions from South Sulawesi and Southeast Sulawesi. The closest genetic distance is between Tolage and Tialo accessions, from Central Sulawesi province.

Keywords : genetic distance, genetic diversity, green betel, PCR, SRAP

ANALISIS KERAGAMAN GENETIK SIRIH HIJAU
(*Piper betle* L.) BERBAGAI AKSESI DENGAN MARKA
Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP)

SYAFIRA RIZQI ESKASALAM

Skripsi
sebagai salah satu syarat memperoleh gelar
Sarjana Sains
pada
Departemen Biokimia

**DEPARTEMEN BIOKIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2019**

Judul : Analisis Keragaman Genetik Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Berbagai Aksesori dengan Marka *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP)
Nama : Syafira Rizqi Eskasalam
NIM : G84150018

Disetujui oleh



dr Husnawati, MSi
Pembimbing I



Dr Ir I Made Artika, MAppSc
Pembimbing II



Diketahui oleh



Dr Syamsul Falah, SHut MSi
Ketua Departemen

Tanggal Lulus : 15 JUL 2019

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas rahmat dan karunia-Nya skripsi dengan judul “Analisis Keragaman Genetik Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Berbagai Aksesori dengan Marka *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP)” dapat diselesaikan dengan baik. Penelitian ini dilaksanakan dalam rangka memenuhi syarat tugas akhir di Departemen Biokimia. Penelitian ini merupakan bagian dari RISTOJA 2018, proyek dari B2P2TOOT, Kementerian Kesehatan RI.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Ibu dr.Husnawati, MSi selaku dosen pembimbing I dan Bapak Dr Ir I Made Artika, MAppSc selaku pembimbing II atas bimbingan dan arahannya dalam penyusunan usulan penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dadang selaku staf peneliti di Balai Besar Biogen yang telah banyak membantu. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada kedua orang tua, keluarga atas doa dan dorongan semangat untuk kelancaran penelitian ini. Tidak lupa ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada teman-teman biokimia terutama dengan Tim DNA (Sharah dan Arya) dan teman kos Blacklist (Febri, Afra, Dewi dan Fera) yang memberikan dukungan baik secara mental maupun material. Semoga penelitian ini mampu memberikan informasi dan manfaat bagi semua pihak yang memerlukan.

Bogor, Mei 2019

Syafira Rizqi Eskasalam

DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR TABEL	viii
PENDAHULUAN	1
METODE	2
Waktu dan Tempat	2
Alat dan Bahan	2
Prosedur	3
HASIL	6
DNA Sirih Hijau	6
Kuantitas DNA Sirih Hijau	7
<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	8
Pemilihan Primer	8
PCR Sampel Sirih Hijau	8
Data	10
Filogenik dan Kesamaan Genetik	10
Keragaman genetik	11
PEMBAHASAN	12
DNA Sirih Hijau	12
Kuantitas DNA Sirih Hijau	14
<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	14
Pemilihan Primer	15
PCR Sampel Sirih Hijau	15
Data	15
Filogenik dan Kesamaan Genetik	15
Keragaman Genetik	17
SIMPULAN DAN SARAN	19
Simpulan	19
Saran	19
DAFTAR PUSTAKA	20
LAMPIRAN	27
RIWAYAT HIDUP	310

DAFTAR GAMBAR

1	Elektroforegram DNA hasil isolasi (a) dari Kit (b) STE (c) HEPES	7
2	Seleksi primer hasil PCR (a) Primer 1-8, (b) Primer 9-16	8
3	Elektroforegram DNA sirih pada kombinasi (a-h). Primer 9-16	9
4	Dendogram 22 aksesii <i>Piper betle</i> L dengan marka SRAP	10
5	PCA dua dimensi 7 aksesii sirih hijau dengan marka SRAP	11
6	PCA tiga dimensi 7 aksesii sirih hijau dengan marka SRAP	11
7	Dendogram yang menunjukkan jarak keragaman genetik tujuh aksesii	12

DAFTAR LAMPIRAN

1	Bagan alir penelitian	27
2	Volume yang ditambahkan	27
3	Kombinasi primer	28
4	Indeks similaritas Dice	29

DAFTAR TABEL

1	Sampel dan aksesii sampel <i>Piper betle</i> L.	3
2	Primer yang digunakan	5
3	Konsentrasi DNA sirih hijau	7
4	Variasi Genetik daun sirih hijau 7 aksesii berdasarkan marka SRAP	9
5	Struktur genetika populasi	11
6	Nilai jarak genetik pada 7 populasi <i>Piper betle</i> L. dengan marka SRAP	12
7	Keadaan Geografis dan Lingkungan pada Tujuh Populasi Sirih Hijau	19

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara dengan tingkat biodiversitas yang tinggi. Keanekaragaman hayati, yang meliputi gen, spesies dan makhluk hidup tersebut meliputi tumbuhan dan hewan yang tersebar di seluruh wilayah Indonesia (Nugroho *et al.* 2015). Keanekaragaman genetik pada suatu spesies dapat digunakan untuk menggambarkan daya adaptasi, seleksi genotip, sidik jari genetik serta manajemen plasma nutfah (Subositi dan Mujahid 2013). Keanekaragaman makhluk hidup dipengaruhi oleh kombinasi banyak hal dan dipicu oleh perbedaan kecepatan spesiasi, tingkat kepunahan, dan migrasi yang terjadi di suatu tempat. Keanekaragaman genetik juga dapat terjadi karena adanya mutasi atau pun rekombinasi (Gumasty *et al.* 2012).

Indonesia kaya akan sumber bahan obat alam dan obat tradisional. Pemanfaatan tanaman obat telah berlangsung ribuan tahun yang lalu. Akan tetapi, penggunaannya belum terdokumentasi dengan baik (Widjaja *et al.* 2014). Indonesia diperkirakan menyimpan potensi tumbuhan obat sebanyak 30.000 jenis, diantaranya 940 jenis telah dinyatakan berkhasiat obat. Jumlah tersebut mewakili 90% dari tanaman obat yang terdapat di wilayah Asia (Salim dan Munadi 2017). Dengan adanya ancaman pada konservasi hutan, maka diperlukan analisis variasi genetiknya (Nurrani 2013). Data mengenai keragaman genetik sangat diperlukan untuk perlindungan, pembuatan kebijakan serta sumber penelitian. Riset Tumbuhan Obat dan Jamu (RISTOJA) merupakan penelitian untuk menghasilkan data basis keragaman tumbuhan Indonesia. RISTOJA digunakan untuk mengumpulkan data tentang tanaman obat pada berbagai aksesori yang ada di Indonesia. Aksesori merupakan koleksi tanaman tertentu yang dapat berupa tanaman lokal atau tanaman yang sudah dibudidayakan yang sesuai dengan lingkungan tumbuhnya (Framansyah 2014). Karakteristik geografis dan lingkungan yang berbeda pada tiap-tiap pulau akan membuat perbedaan-perbedaan pada genetik (Kusuma *et al.* 2016).

Salah satu tanaman obat yang paling banyak dimanfaatkan yaitu sirih hijau (*Piper betle* L). Sirih merupakan tanaman obat yang banyak tumbuh di sepanjang Asia tropis hingga Afrika Timur. Tanaman sirih juga dapat ditemukan di Indonesia, seperti di Jawa, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Maluku dan Papua (Gultom *et al.* 2017). Tanaman ini banyak dibudidayakan karena memiliki banyak manfaat. Sirih juga merupakan tanaman yang mudah dikembangbiakkan (Zuraidah 2015). Masyarakat Indonesia telah menggunakan daun sirih hijau dalam pengobatan tradisional untuk menguatkan gigi dan antiseptik (Utami 2015). Daun sirih hijau merupakan salah satu dari 13 jenis tanaman yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi (Kusuma *et al.* 2017).

Keragaman genetik dapat dianalisis menggunakan marka morfologi dan molekuler (Sari 2016; Naipospos *et al.* 2014). Analisis keragaman genetik yang menggunakan marka molekuler DNA sebagai alat bantu seleksi lebih menguntungkan daripada menggunakan seleksi secara fenotip. Marka molekuler DNA dapat menggambarkan keragaman karakter antar individu lebih tinggi (Langga *et al.* 2012). Marka molekuler dapat digunakan untuk menganalisis hubungan kekerabatan dan menunjukkan adanya polimorfisme dalam suatu spesies. Marka molekuler mempunyai tingkat polimorfisme yang tinggi, jumlah

yang tidak terbatas, tidak dipengaruhi oleh lingkungan (Anggraeni *et al.* 2008; Yono *et al.* 2017).

Analisis keragaman genetik dilakukan dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), yang dapat memperbanyak sekuen nukleotida dengan menggunakan mesin PCR secara *in vitro*. PCR memiliki sensitivitas, memberikan hasil dalam waktu yang singkat, dapat digunakan untuk mengidentifikasi secara detail hingga tingkat spesies (Popping *et al.* 2010). Analisis keragaman genetik dengan metode PCR lebih mudah dilakukan karena tidak memerlukan hal-hal seperti enzim restriksi, hibridisasi dengan suatu pelacak tertentu, pemindahan fragmen-fragmen DNA dari gel ke suatu membran dan dapat dilakukan terhadap jumlah sampel DNA yang sedikit (Abdelmigid 2012).

Berbagai macam teknik marka molekular dapat digunakan untuk identifikasi, karakterisasi dan analisis keragaman genetik seperti RAPD, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SSR dan ISSR. Marka molekular yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP). SRAP merupakan marka molekular sederhana dan efisien yang dapat digunakan untuk pembentukan peta gen, *gene tagging*, analisis sidik jari gen dan cDNA serta pemetaan berdasarkan kloning. SRAP memiliki beberapa keunggulan, antara lain sistem yang sederhana, memiliki tingkat *throughput* yang wajar, mendekati beberapa *co-dominant markers*, menargetkan *open reading frame* (ORFs) dan memudahkan isolasi untuk sekuensing (Zhao *et al.* 2009). SRAP sangat efektif digunakan untuk menganalisis keragaman genetik (Shaye *et al.* 2018).

Sirih hijau merupakan tanaman obat yang sering dimanfaatkan oleh masyarakat. Akan tetapi, data mengenai DNA tumbuhan sirih hijau belum terdata dengan baik sehingga perlu dilakukan analisis untuk melihat keragaman informasi genetik dari berbagai aksesori. Tujuan dari penelitian ini yaitu menganalisis keragaman genetik tanaman sirih berbagai aksesori dengan menggunakan marka *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP). Hipotesis penelitian ini yaitu sampel memiliki polimorfisme yang tinggi. Dengan demikian, diduga memiliki tingkat keragaman genetik yang tinggi. Penelitian ini bermanfaat dalam mewujudkan perlindungan, pelestarian, dan pemanfaatan tumbuhan obat di setiap etnis di Indonesia.

METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan November 2018 hingga Mei 2019. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Lantai V, Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan gelas, timbangan, mortar, pestel, plastik ziplock, *freezer*, nano drop spektrofotometer, *microwave*, mikropipet, cetakan agarosa, tangki elektroforesis, sentrifus Kitman,

UV transiluminator, PCR BioRAD 100, alat elektroforesis dan stopwatch. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791*, agarosa, *safe DNA dye*, TBE, *DreamTaq Green PCR MasterMix K1081*, generuler DNA ladder 1 kb dan 100 bp, *loading dye*, etanol, dan akuabides.

Prosedur

Preparasi sampel (B2P2TOOT 2018)

Sampel daun kering ditimbang sebanyak 0.04 – 0.05 gram tiap aksesori dan dimasukkan ke dalam plastik ziplock serta diberi identitas. Sampel disimpan ke *freezer -20°C* selama semalam atau pada *ultra low temperature freezer* selama 1 jam. Adapun daftar sampel dan aksesori yang digunakan tercantum dalam Tabel 1.

Tabel 1 Sampel dan aksesori sampel *Piper betle* L.

No	Provinsi	Etnis	Nama Lokal	Kode
1	Kaltim-Kaltara	Bajau	Sirih	PB KI A
2	Sulawesi Selatan	Duri	Baulo	PB LS A
3	Sulawesi Tengah	Saluan	Timpono	PB LT I
4	Sulawesi Tengah	Bungku	Korobite	PB LT J
5	Sulawesi Tengah	Tolage	Siri	PB LT H
6	Sulawesi Tengah	Balesang	Sirih	PB LT D
7	Sulawesi Tengah	Tialo	Doloe	PB LT G

Isolasi DNA

Isolasi DNA berdasarkan metode dari *Plant DNA Purification Main Protocol Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791*. Sampel digerus dengan menggunakan mortar dan pestel yang telah didinginkan. Sampel digerus dengan menggunakan nitrogen cair sampai halus lalu diambil menggunakan spatula yang telah disterilisasi menggunakan etanol 70% dan dimasukkan ke dalam tabung 1.5 mL mikrosentrifus. Buffer lisis A sebanyak 350 μ L dan 10 μ L proteinase K ditambahkan lalu tabung mikrosentrifus divorteks selama 10 hingga 20 detik.

Sebanyak 50 μ L buffer lisis B dan 20 μ L RNase A ditambahkan ke dalam tabung mikrosentrifus, lalu divorteks selama satu menit. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65 °C selama 10 menit dan dikocok secara berkala. Sebanyak 130 μ L *precipitation solution* ditambahkan lalu tabung dibalikkan 2-3 kali dan diinkubasi pada es selama 5 menit. Sampel kemudian disentrifus dengan kecepatan 20000 g (13500 rpm) selama 5 menit. Sebanyak 500 μ L supernatan diambil dan ditransfer ke dalam tabung mikrosentrifus yang baru.

Sebanyak 400 μ L *Plant gDNA binding solution* dan 400 μ L etanol 96-100% ditambahkan lalu dihomogenkan dengan dikocok. Setengah dari campuran tersebut (sekitar 600-700 μ L) dipindahkan ke *spin coloum*, lalu disentrifus pada kecepatan 6000 g (8000 rpm) selama 1 menit. Larutan pada bawah tabung koleksi kemudian dibuang dan sisa larutan campuran dimasukkan ke *spin coloumn*.

Larutan di tabung koleksi kemudian dibuang lalu sebanyak 500 μ L *wash buffer* I dimasukkan ke dalam kolom, dan disentrifus dengan kecepatan 8000 g (10000 rpm) selama 1 menit. Larutan di tabung koleksi dibuang kembali dan sebanyak 500 μ L *wash buffer* II ditambahkan ke dalam kolom. Kemudian

disentrifus dengan kecepatan 20000 g (13500 rpm) selama 3 menit. Tabung koleksi kemudian dikosongkan dan kolom disentrifus kembali selama 2 menit dengan kecepatan 10000 g (7000 rpm). Kolom kemudian dipindahkan ke tabung mikrosentrifus 1.5 mL steril.

Sebanyak 100 μ L buffer elusi ditambahkan ke tengah membran kolom dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 8000 g (10000 rpm) selama 1 menit. Sebanyak 100 μ L elusi buffer ditambahkan kembali, dengan menggunakan tabung elusi yang berbeda atau sama kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Lalu disentrifus dengan kecepatan 8000 g (10000 rpm) selama 1 menit. Hasil DNA yang telah dimurnikan dapat langsung digunakan atau disimpan dalam suhu -20°C .

Isolasi DNA dengan penambahan larutan STE (Sheperd dan McLay 2011). Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791*. Sampel digerus dengan menggunakan nitrogen cair dan dimasukkan ke dalam tabung 1.5 mL mikrosentrifus. Kemudian ditambahkan 1 mL STE (sukrosa 0.25 M, Tris 0.03 M, dan 0.05 EDTA) lalu divorteks dan disentrifugasi pada 2000 g selama 10 menit. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan 1 mL larutan STE dan divorteks lalu disentrifus kembali pada 2000 g selama 10 menit. Supernatan kemudian dibuang dan tahapan selanjutnya mengikuti metode dari *Plant DNA Purification Main Protocol Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791*.

Isolasi DNA dengan penambahan larutan HEPES (Sheperd dan McLay 2011). Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791*. Sampel digerus dengan menggunakan mortar dan pestel yang telah didinginkan. Sampel digerus dengan menggunakan nitrogen cair sampai halus lalu diambil menggunakan spatula yang telah disterilisasi menggunakan etanol 70% dan dimasukkan ke dalam tabung 1.5 mL mikrosentrifus. Kemudian ditambahkan 1 mL HEPES (0.7 g asam askorbat dalam 100 mL merkaptotanol) lalu divorteks dan disentrifugasi pada 3000 g selama 5 menit. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan 1 mL larutan HEPES dan divorteks lalu disentrifus kembali pada 3000 g selama 5 menit. Tahap selanjutnya mengikuti metode dari *Plant DNA Purification Main Protocol Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791*.

Kuantifikasi DNA (Desjardins dan Conklin 2010)

DNA genom hasil isolasi diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (λ 260/280). Sebanyak 2 μ l DNA genom hasil isolasi dipipet dengan mikropipet kemudian diletakkan pada Nano Drop 2000 spektrofotometer *Thermo Scientific*.

Elektroforesis DNA genom (Sambrook dan Russel 2001)

Pembuatan Agarosa 1%. Agarosa ditimbang sebanyak 0.3 gram dan dilarutkan dalam 30 mL TBE 1x. Agarosa dipanaskan ke dalam *microwave* hingga homogen (bening) lalu ditambahkan 2 μ L *PeqDye* dan dihomogenkan. Agarosa cair dituang ke dalam cetakan atau *tray* yang telah dipasang sisiran atau *comb*. Sisiran diangkat setelah agarosa menjadi padat.

Running elektroforesis. Sebanyak 5 μ L DNA genom dihomogenkan dengan 1 μ L *loading dye*, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran agarosa. Ladder 1 Kb digunakan pada ujung sebelah kiri atau kanan DNA genom. Running sampel dilakukan selama 30 menit pada 100 Volt.

Visualisasi dan dokumentasi. Visualisasi sampel dilakukan dengan menggunakan *Gel Documentation System* dan kemudian didokumentasikan.

Amplifikasi DNA (Li dan Quiros 2001 dengan modifikasi)

Amplifikasi DNA dilakukan dengan primer SRAP, dengan empat primer *forward* (Me1-Me4) dan empat primer *reverse* (Em1-Em4) pada Tabel 2. Kedua jenis primer tersebut dikombinasikan menjadi enam belas kombinasi pada Tabel 3, tetapi hanya delapan kombinasi primer yang akan digunakan dalam analisis. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin PCR Biorad 100.

Skrining primer SRAP. Skrining primer SRAP dilakukan dengan cara menguji sampel individu dari masing-masing aksesori tanaman obat dan diujikan dengan menggunakan primer SRAP. Seleksi primer dipilih berdasarkan kemampuan amplifikasi primer menghasilkan fragmen DNA pada semua aksesori, jelas dan polimorfisme tinggi.

Amplifikasi Sampel. Amplifikasi DNA menggunakan primer SRAP dilakukan berdasarkan metode Li dan Quiros (2001) yang dimodifikasi. Komposisi *cocktail* PCR dibuat sebanyak 15 μ L dengan komposisi template DNA dengan konsentrasi sebesar 20-25 ng/ μ L, primer *reverse* (20 μ M) sebanyak 0.7 μ L, primer *forward* (20 μ M) sebanyak 0.7 μ L, PCR *master mix Green Taq* sebanyak 7.5 μ L, air bebas nuklease menyesuaikan tiap sampel, yang dapat dilihat dalam Tabel 4. Selanjutnya, PCR akan direaksikan dengan beberapa tahap. Tahap pertama adalah fase pre-denaturasi pada suhu 94°C selama lima menit. Tahap kedua adalah fase denaturasi pada suhu 94 °C selama tiga puluh detik. Tahap ketiga adalah fase penempelan dengan metode *touchdown* pada suhu 50-33 °C selama tiga puluh detik dan tahap keempat adalah fase ekstensi pada suhu 72 °C selama satu menit. Tahap kedua sampai keempat akan dilakukan sebanyak tujuh belas kali siklus. Tahap kelima adalah fase denaturasi pada suhu 94 °C selama tiga puluh detik. Tahap keenam adalah fase penempelan pada suhu 45 °C selama tiga puluh detik. Tahap ketujuh adalah fase ekstensi pada suhu 72 °C selama satu menit. Tahap kelima sampai ketujuh akan dilakukan sebanyak 35 kali siklus. Tahap kedelapan adalah fase ekstensi final pada suhu 72 °C selama delapan menit. Tahap terakhir yaitu *holding temperature* pada suhu 4 °C selama lima belas menit.

Tabel 2 Primer yang digunakan

No	Nama primer	Sekuens
1	PRM Forward Me 1	TGA GTC CAA ACC GGA TA
2	PRM Forward Me 2	TGA GTC CAA ACC GGA GC
3	PRM Forward Me 3	TGA GTC CAA ACC GGA AT
4	PRM Forward Me 4	TGA GTC CAA ACC GGA GC
5	PRM Reverse Em 1	GAC TGC GTA CGA ATT AAT
6	PRM Reverse Em 2	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
7	PRM Reverse Em 3	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
8	PRM Reverse Em 4	GAC TGC GTA CGA ATT TGA

Elektroforesis Produk PCR dengan agarosa (Sambrook dan Russel 2001)

Pembuatan agarosa 2.5%. Agarosa ditimbang sebanyak 2.5 gram dan dilarutkan dalam 100 mL TBE 1x. Agarosa dipanaskan ke dalam microwave hingga homogen (bening) lalu ditambahkan 2.5 μ L *PeqDye*, lalu dihomogenkan. Agarosa cair lalu dituang ke dalam cetakan atau *tray* yang telah dipasang dengan sisiran atau *comb*. Sisiran diangkat setelah agarosa padat.

Running elektroforesis. Tangki elektroforesis disiapkan dan dituang TBE 1x sesuai ukuran tangki. Sebanyak 5 μ L DNA genom dihomogenkan dengan 1 μ L *loading dye*, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran agarosa. Ladder 100 bp digunakan pada ujung sebelah kiri atay kanan DNA genom. Running sampel dilakukan selama 100 menit pada 50 Volt. Setelah selesai elektroforesis, agar direndam pada larutan EtBr selama 10 menit lalu direndam dengan air selama 10 menit. Sampel kemudian divisualisasi dengan menggunakan *Gel Documentation System Biorad 100*.

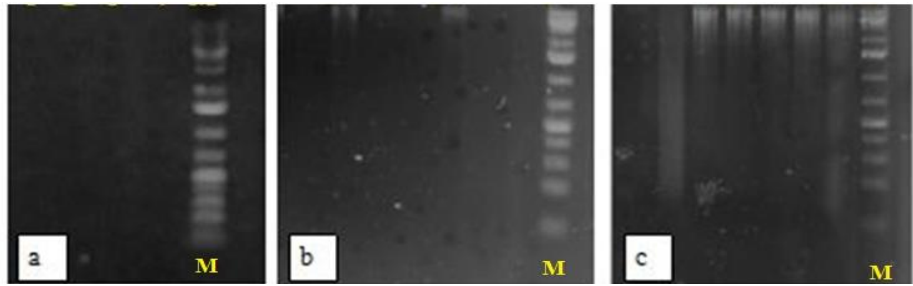
Analisis Data (Jiang dan Liu 2011)

Fragmen DNA yang dihasilkan dari masing-masing aksesi tiap primer dihitung ukuran panjang basa fragmen. Ada tidaknya fragmen DNA pada masing-masing aksesi diberi skor yang berbeda. Apabila terdapat fragmen maka diberi skor 1 dan apabila tidak terdapat fragmen diberi skor 0. Indeks similaritas dihitung dengan menggunakan rumus indeks similaritas Dice. Analisis kelompok dari konstruksi dendrogram dilakukan dengan menggunakan metode *Unweighted Pair Grup Method Using Arithmetic Method* (UPGMA), yang kemudian diolah menggunakan program komputer NTSys 2.1. Analisis keragaman genetik dalam suatu populasi dapat diamati dengan parameter genetik seperti jumlah alel (N_a), jumlah alel efektif (N_e), nilai indeks informasi Shannon (I), dan keragaman genetik Nei (h). Analisis tersebut dilakukan dengan menggunakan aplikasi Popgene 3.2.

HASIL

DNA Sirih Hijau

Hasil dari isolasi DNA daun sirih hijau dapat diketahui secara kualitatif dengan melihat hasil elektroforesis gel agarosa dan didapatkan pita DNA yang berdasarkan ukuran molekul seperti pada Gambar 1. Hasil isolasi DNA daun sirih hijau juga dapat diketahui secara kuantitatif dengan melihat konsentrasi DNA dan rasio kemurnian DNA yang tercantum dalam Tabel 4. Isolasi dengan metode dari kit tidak menghasilkan pita yang menunjukkan bahwa isolasi belum berhasil. Isolasi dengan penambahan larutan STE (Sukrosa, Tris, EDTA) dan HEPES (asam askorbat dalam merkaptoetanol menghasilkan terbentuknya pita saat elektroforesis. Akan tetapi, pita yang dihasilkan dari isolasi dengan penambahan larutan HEPES lebih terlihat jelas daripada isolasi dengan penambahan larutan STE. Pita yang *smear* dapat menunjukkan masih adanya kontaminan seperti RNA maupun debris sel seperti protein dan polisakarida.



Gambar 1 Elektrofogram DNA hasil isolasi (a) dengan metode dari kit (b) penambahan larutan STE, (c) penambahan larutan HEPES

Kuantitas DNA Sirih Hijau

Hasil isolasi dari kit pada Tabel 3 menunjukkan nilai konsentrasi yang tinggi. Konsentrasi isolasi DNA dengan penambahan larutan STE menghasilkan nilai konsentrasi yang rendah, bahkan bernilai negatif. Rasio kemurnian DNA yang diperoleh dari hasil isolasi dengan metode kit dan penambahan larutan HEPES berada pada nilai di bawah 1.8 dan di atas 2.0, sedangkan rasio kemurnian DNA hasil isolasi dengan penambahan larutan HEPES sebagian besar berada pada rentang 1.8-2.0, kecuali pada sampel nomor 22, 11 dan 19 dengan rasio 1.72, 1.78 dan 2.01. Berdasarkan muncul tidaknya pita, dan konsentrasi DNA serta rasio kemurnian DNA, hasil isolasi dengan penambahan larutan HEPES lebih baik daripada hasil isolasi dengan metode dari kit maupun dengan penambahan larutan STE.

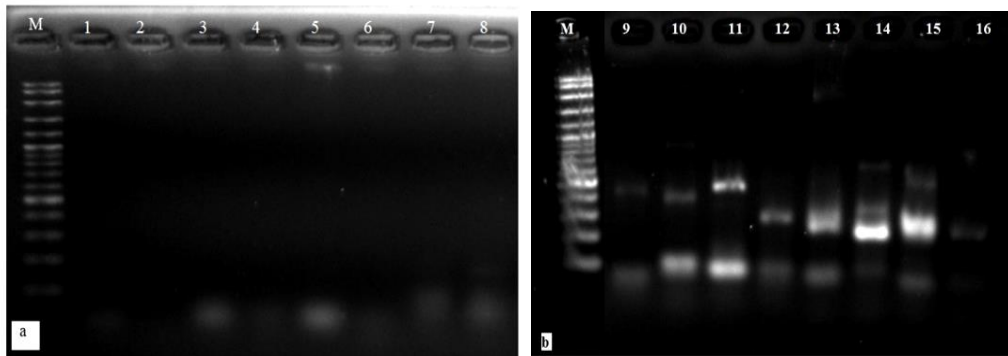
Tabel 3 Konsentrasi DNA sirih hijau

Aksesi	Kode sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)			Kemurnian		
		Kit	STE	HEPES	Kit	STE	HEPES
Balesang	20	167.46	-6.6	40.9	1.46	1.30	1.90
	21	167.18	-8.1	49.1	1.47	1.49	1.90
Tialo	22	166.48	-3.3	11.4	1.46	1.54	1.72
Bajau	1	168.50		39.7	1.47		1.93
	2	168.48		45.2	1.46		1.86
	3	168.44		48.6	1.51		1.88
	4	168.46		52.9	1.50		1.90
	5	167.66		45.4	1.51		1.93
Duri	6	175		64.1	1.37		1.87
	7	175		87.8	1.38		1.86
	8	175		65.7	1.38		1.83
	9	175		51.1	1.41		1.92
	10	175		49.3	1.39		1.88
Saluan	11			110.8			1.78
	12			69.0			1.88
Bungku	13			29.8			1.99
	14			27.4			1.98
	15			27.2			1.97
	16			28.3			1.90
	17			34.9			1.92
Tolage	18			12.1			1.99
	19			23.9			2.01

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Pemilihan Primer

Seleksi dari 16 primer (Lampiran 3) dipilih berdasarkan kemampuan amplifikasi primer menghasilkan fragmen DNA pada semua aksesori, jelas dan polimorfisme tinggi. Hasil skrining 16 kombinasi primer yang terdapat pada Gambar 2 menunjukkan bahwa kombinasi primer nomor 9 hingga 16 menghasilkan fragmen DNA yang lebih jelas dan polimorfisme yang lebih tinggi. Primer tersebut kemudian digunakan untuk analisis PCR pada semua aksesori.

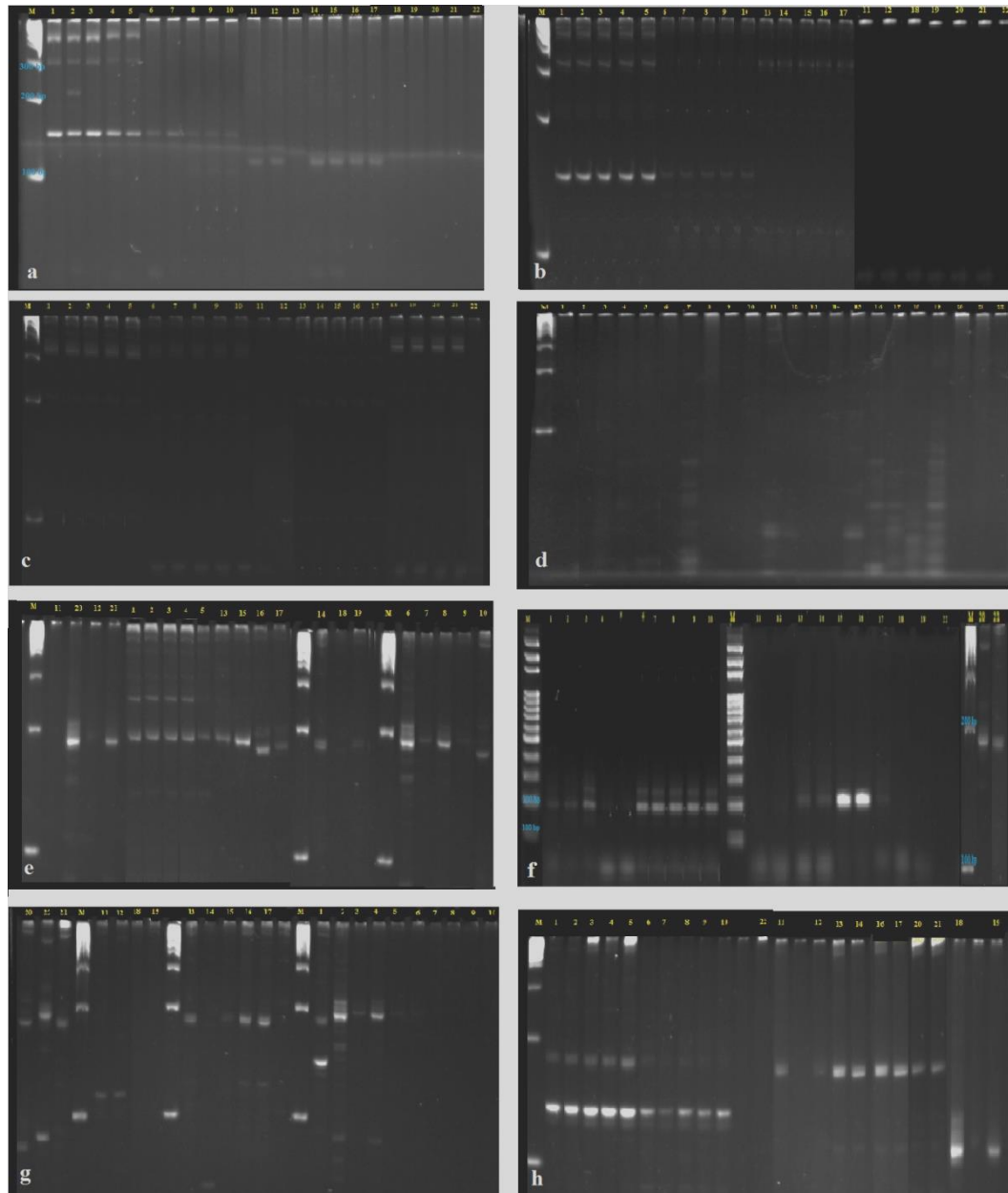


Gambar 2 Seleksi primer hasil PCR (a) Primer 1 – 8, (b) Primer 9 – 16

PCR Sampel Sirih Hijau

Dari total 8 primer yang digunakan pada analisis keragaman genetik sirih hijau menghasilkan sebanyak 59 lokus yang berpola polimorfik. Sebanyak 48 dari 59 lokus termasuk pita polimorfik, sedangkan 11 lokus termasuk pita monomorfik. Keseluruhan pita polimorfik yang dihasilkan dari delapan primer tersebut sebesar 81.35%. Dari delapan primer yang digunakan, hanya satu yang menghasilkan 100% pola pita polimorfik, yaitu pada primer ke-16. Primer yang menghasilkan jumlah lokus terbanyak yaitu primer 15, dengan 11 lokus sedangkan primer yang menghasilkan jumlah lokus paling sedikit yaitu primer 12 dengan 4 lokus. Pita hasil amplifikasi dari 22 sampel sirih hijau tercantum pada Gambar 3.

Visualisasi pita DNA sirih hijau menghasilkan data polimorfisme yang tercantum pada Tabel 4. Analisis keragaman genetik dilakukan dengan memberi skor pita DNA yang dihasilkan dari amplifikasi marka SRAP sehingga membentuk data biner. Hasil amplifikasi PCR dengan marka SRAP menunjukkan ukuran pita pada rentang 80 – 3000 bp.



Gambar 3 Elektroforegram DNA sirih pada kombinasi (a-h). Primer 9-16

Tabel 4 Variasi Genetik daun sirih hijau 7 aksesii berdasarkan marka SRAP

No	Primer	Berat molekul	Lokus	Pita polimorfik		Pita monomorfik
				Jumlah	%	
1	9	90-3000	8	6	75.00	2
2	10	90-3000	7	5	71.43	2
3	11	90-3000	7	5	71.43	2
4	12	80-3000	4	3	75.00	1
5	13	120-3000	10	8	80.00	2
6	14	90-500	5	4	80.00	1
7	15	90-600	11	10	90.91	1
8	16	90-3000	7	7	100.00	0
Total lokus			59	48		11
Persentase					81.35	18.65

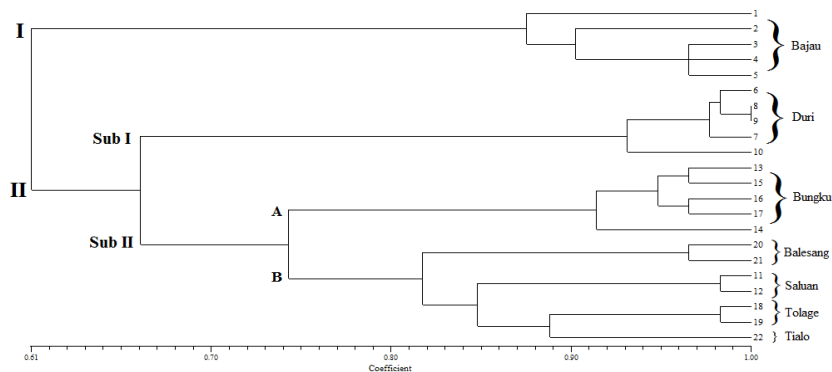
Data

Filogenik dan Kesamaan Genetik

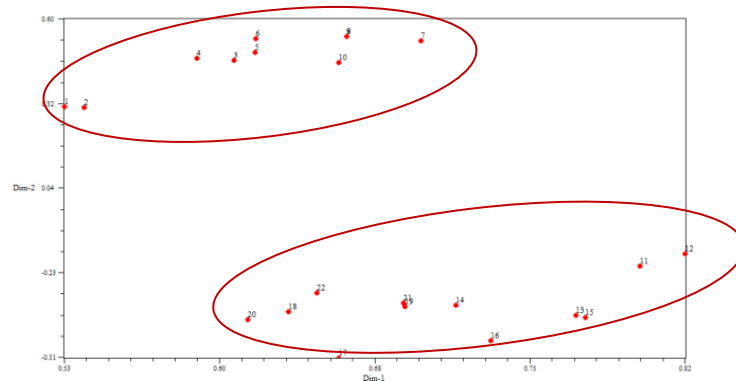
Analisis data dilakukan dengan menggunakan NTSys. Profil pita diterjemahkan ke dalam data biner. Pita yang muncul diberi kode 1 (ada) sedangkan yang tidak muncul diberi kode 0 (tidak ada) (Lampiran 4). Analisis keragaman genetik dianalisis dengan menggunakan metode UPGMA. Matriks jarak genetik antar sampel dihitung menggunakan metode *SimQual* dan akan menghasilkan indeks similaritas Dice, yang tercantum pada Lampiran 5. Matriks kemiripan genetik dengan menggunakan metode *Unweighted Pair Group Method Arithmetic* (UPGMA) tersebut akan diperoleh pengelompokan genotip dengan terbentuknya dendrogram kekerabatan antar semua sampel sirih hijau.

Keanekaragaman genetik 7 aksesori sirih hijau menggunakan 8 primer SRAP dapat dilihat pada Gambar 4 dengan koefisien kemiripan berkisar 61 – 100% atau dengan nilai keragaman sebesar 0 – 39%. Presentase kemiripan tersebut menunjukkan pengelompokan menjadi 2 klaster besar. Klaster I hanya terdapat sampel dari satu aksesori, yaitu dari Bajau (Kaltim-Kaltara) yang terpisah dengan aksesori lainnya. Kelompok 2 terbagi menjadi 2 subklaster dengan kemiripan sebesar 67% yaitu I dan II. Subklaster I hanya terdapat sampel dari aksesori Duri (Sulsel). Sub II terbagi menjadi 2 bagian dengan kemiripan sebesar 74% yaitu bagian A dan bagian B. Bagian A hanya terdiri satu aksesori yaitu Bungku, sedangkan bagian B terdiri dari beberapa aksesori yaitu Balesang, Saluan, Tolage dan Tialo (Sulteng).

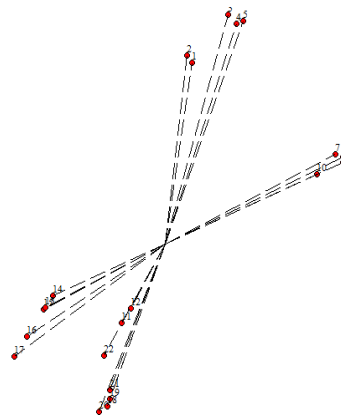
Analisis keanekaragaman genetik sirih hijau dengan marka SRAP dilakukan analisis lebih lanjut dengan menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA), yang dapat digunakan untuk mengukur pola struktur populasi dan mendukung dendrogram yang diperoleh. Analisis PCA dua dimensi pada Gambar 5 menghasilkan dua kelompok utama yaitu kelompok I dan kelompok 2 dengan nilai keragaman kumulatif 45.57%. Akan tetapi, hasil PCA dua dimensi sedikit berbeda dengan hasil dendrogram, yang mana aksesori Duri (Sulsel) berada pada klaster yang sama dengan aksesori Bajau (Kaltim-Kaltara). Hasil tersebut mengelompokkan kesamaan genetik secara lebih umum. Analisis PCA tiga dimensi pada Gambar 6 menghasilkan 4 bagian. PCA tiga dimensi menunjukkan hasil pembagian struktur populasi sirih hijau secara lebih detail. Hasil tersebut mendukung hasil dendrogram yang diperoleh, yang mana pembagian klaster terdiri dari klaster besar I, klaster II subklaster I, klaster II subklaster II A, dan klaster II subklaster II B.



Gambar 4 Dendrogram 22 aksesori *Piper betle* L dengan marka SRAP



Gambar 5 PCA dua dimensi 7 aksesii sirih hijau dengan marka SRAP



Gambar 6 PCA tiga dimensi 7 aksesii sirih hijau dengan marka SRAP

Keragaman Genetik

Analisis struktur genetika 7 populasi pada Tabel 5 menghasilkan rerata jumlah alel yang teramati adalah 1.052 dengan nilai terendah 1.00 dan nilai tertinggi 1.1695. Jumlah alel efektif berkisar antara 1.0 – 1.334 dengan rerata sebesar 1.04. Nilai indeks informasi Shannon berkisar antara 0 – 0.0732. Nilai keragaman genetik (h) 7 populasi sirih hijau berkisar antara 0 – 0.1053. Nilai indeks informasi Shannon dan nilai keragaman genetik populasi Bajau lebih tinggi dari populasi lainnya.

Tabel 5 Struktur genetika populasi

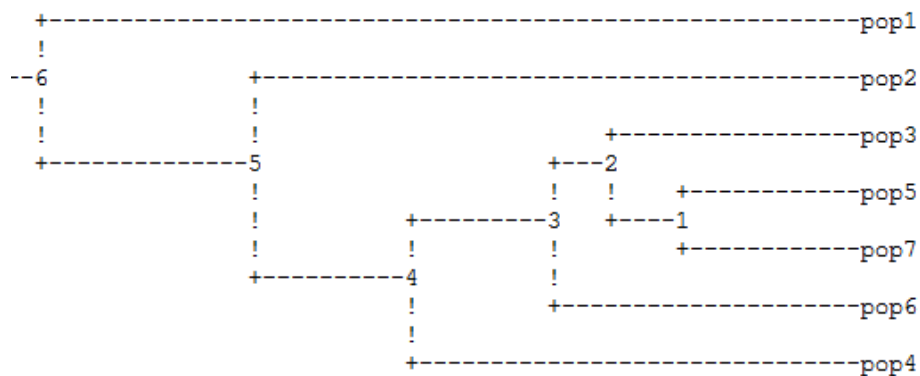
No	Populasi	Jumlah Sampel	N_a	N_e	I	h
1	Bajau	5	1.1695	1.1334	0.0732	0.1053
2	Duri	5	1.0847	1.0475	0.0298	0.0453
3	Saluan	2	1.0169	1.0169	0.0085	0.0117
4	Bungku	5	1.0508	1.0316	0.0190	0.0284
5	Tolage	2	1.0169	1.0169	0.0085	0.0117
6	Balesang	2	1.0339	1.0339	0.0169	0.0235
7	Tialo	1	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Rata-rata			1.0532	1.0400	0.0223	0.0323
SD			0.0582	0.0438	0.0243	0.0353

Keterangan : N_a = jumlah alel teramati, N_e = jumlah alel efektif, I = nilai indeks informasi Shannon, h = heterozigositas harapan (keragaman gen) N_e

Nilai jarak genetik pada Tabel 6 di antara 7 populasi berada pada kisaran 0.1125 – 0.6241. Jarak genetik tertinggi terdapat antara populasi 1 (Bajau) dan populasi 5 (Tolage) sebesar 0.6241. Hal tersebut menunjukkan jauhnya kekerabatan diantara kedua populasi tersebut. Jarak genetik terdekat sebagaimana yang tercantum dalam Gambar 7 terdapat pada populasi 5 (Tolage) dan populasi 7 (Tialo) yaitu sebesar 0.1125. Hal tersebut menunjukkan bahwa kedua populasi tersebut berkerabat dekat, atau adanya kemungkinan bahwa kedua populasi tersebut berasal dari sumber yang sama.

Tabel 6 Nilai jarak genetik pada 7 populasi *Piper betle* L. dengan marka SRAP

Populasi	1	2	3	4	5	6	7
1	***						
2	0.3974	***					
3	0.4490	0.2854	***				
4	0.3861	0.4376	0.2114	***			
5	0.6241	0.3568	0.1570	0.3142	***		
6	0.5590	0.3550	0.2146	0.2662	0.1428	***	
7	0.5738	0.3988	0.1513	0.3068	0.1125	0.2188	***



Gambar 7 Dendrogram yang menunjukkan jarak keragaman genetik antara tujuh populasi *Piper betle* L.

PEMBAHASAN

DNA Sirih Hijau

Isolasi yang dilakukan dengan menggunakan metode *Plant DNA Purification Main Protocol Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791* belum berhasil. Hal tersebut ditunjukkan dengan tidak munculnya pita pada saat elektroforesis gel (Gambar 1a). Isolasi DNA dari *Piper betle* L cukup sulit karena adanya kandungan polifenol dan polisakarida yang tinggi dalam jaringan daun sirih (Aiello 2012). Adanya polifenol yang memengaruhi agen oksidasi pada tanaman tropis, dapat menyebabkan penurunan jumlah dan kemurnian dengan mengikat secara kovalen dengan DNA (Vanijaya

2011). Adanya polifenol dapat merusak DNA dan mengakibatkan adanya pencoklatan DNA (Hussain *et al.* 2015). Tingginya polisakarida dapat membentuk ikatan kompleks dengan asam nukleat menjadi massa gelatin yang secara fisik dapat menghambat enzim modifikasi DNA seperti enzim restriksi endonuklease, DNA polimerase, ligase dan yang lainnya (Shepherd 2010). Ekstraksi dan purifikasi DNA dipengaruhi oleh proses penghomogenan jaringan tanaman, komposisi larutan buffer pada saat penggerusan dan atau jaringan tanaman dan pengilangan senyawa polisakarida untuk tanaman tahunan (Nugroho *et al.* 2016).

Ekstraksi DNA dengan menggunakan penambahan larutan STE dan buffer HEPES bertujuan untuk menghilangkan polisakarida (Mitsui *et al.* 2017). Selain itu, jumlah dan kemurnian DNA hasil isolasi dengan penambahan HEPES lebih baik. Larutan STE terdiri dari sukrosa 0.25 M, Tris 0.03 M, dan 0.05 EDTA (Sheperd dan McLay 2010). EDTA termasuk salah satu agen pengkelat, yang dapat digunakan untuk menginaktivasi enzim DNase dan enzim nuklease dengan mengikat ion magnesium yang berperan sebagai kofaktor enzim DNase (Corkill dan Rapley 2008). Buffer Tris HCl akan menyeimbangkan pH agar asam nukleat dapat terekstraksi. DNA tersebut akan masuk ke dalam larutan buffer tersebut (Liana 2017). Sukrosa digunakan untuk memecahkan atau melisiskan dinding sel sehingga menciptakan tekanan osmotik yang akan menyebabkan dinding rusak dan sel-sel di dalamnya dilepaskan oleh enzim proteolitik (Minkov *et al.* 2013).

Larutan HEPES terdiri dari asam askorbat yang dilarutkan dalam merkaptoetanol. Asam askorbat termasuk ke dalam agen pereduksi. Penambahan asam askorbat berfungsi mencegah oksidasi senyawa fenolik dan adsorpsi oleh molekul DNA (Anuradha *et al.* 2013). Penggunaan merkaptoetanol bertujuan menghilangkan kandungan polifenol dalam sel tanaman. Merkaptoetanol akan membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa polifenol yang kemudian akan memisahkannya dari DNA. Merkaptoetanol juga dapat mendenaturasi protein yang mengontaminasi DNA (Nugroho *et al.* 2016). Walker dan Rapley 2008). Polifenol dihilangkan agar kualitas atau kemurnian DNA yang diperoleh baik. Selain itu, polifenol juga perlu dihilangkan karena dapat menghambat reaksi enzim *Taq polymerase* saat proses amplifikasi (Moyo *et al.* 2008).

Hasil isolasi DNA tersebut kemudian diukur secara kualitatif dengan menggunakan elektroforesis. Elektroforesis merupakan suatu metode yang digunakan untuk analisis, identifikasi dan purifikasi fragmen DNA. Kerja elektroforesis didasarkan pada migrasi atau perpindahan partikel-partikel yang bermuatan. Molekul DNA dengan ukuran kecil lebih mudah melewati pori gel agarosa, sedangkan yang berukuran besar lebih susah (Prayoga dan Wardani 2015). Adanya pita menunjukkan adanya DNA yang terisolasi. Hasil isolasi pada Gambar 1a menunjukkan tidak adanya pita yang terbentuk. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolasi DNA belum berhasil.

Hasil yang diperoleh pada Gambar 1b dan 1c, pita DNA hasil isolasi dengan penambahan larutan HEPES lebih terlihat jelas daripada hasil isolasi dengan penambahan STE. Hasil isolasi dengan penambahan larutan STE dan HEPES menunjukkan adanya pita yang terbentuk. Akan tetapi, pita yang dihasilkan dengan metode penambahan HEPES lebih tebal dan terlihat jelas daripada pita yang dihasilkan dengan metode penambahan STE. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh belum murninya hasil isolasi dan rendahnya konsentrasi DNA hasil isolasi dengan penambahan STE. Menurut Harahap

(2017), konsentrasi DNA yang terlalu rendah akan menghasilkan pita DNA yang tipis atau bahkan tidak terlihat. Hasil isolasi dengan penambahan HEPES lebih baik daripada isolasi dengan penambahan STE. Hal tersebut dapat disebabkan oleh HEPES, yang merupakan *good buffer* bereaksi dengan DNA lebih sedikit daripada larutan yang mengandung Tris seperti halnya STE (Ferreira *et al.* 2015).

Kuantitas DNA Sirih Hijau

Hasil isolasi DNA kemudian diukur konsentrasinya dengan menggunakan nano drop spektrofotometri. Nukleotida, ssDNA dan dsDNA akan menunjukkan absorbansi total pada panjang gelombang (λ) 260 nm. Sampel dikatakan murni apabila berada dalam skala 2.0 hingga 2.2 pada rasio 260 dan 230 nm (Gardenia dan Koesharyani 2011). Isolasi DNA dapat dikatakan murni apabila rasio A260/280 berada pada kisaran 1.8 hingga 2.0 (Murtiyaningsih 2017). Hasil DNA yang diperoleh pada Tabel 3 bervariasi dari 1.39 hingga 2.01. Hal tersebut menunjukkan terdapat beberapa sampel yang belum murni. Nilai rasio di bawah 1.8 menunjukkan adanya kontaminasi protein sedangkan rasio di atas 2.00 menunjukkan adanya kontaminasi RNA (Liana 2017). Konsentrasi DNA hasil isolasi berdasarkan Tabel 3, diperoleh hasil yang bervariasi dari -8.1 hingga 175 ng/ μ l. Rasio kemurnian dari hasil isolasi dengan metode kit dan dengan penambahan larutan STE memiliki rasio kurang dari 1.8. Hal tersebut disebabkan oleh masih adanya kontaminan seperti polisakarida dan senyawa fenolik (Desjardins dan Conklin 2010). Konsentrasi terbesar dihasilkan dari sampel dengan metode dari kit. Akan tetapi, karena tidak adanya pita saat elektroforesis dan rasio kemurnian yang belum murni maka hasil isolasi dari metode kit dan penambahan STE tidak digunakan untuk analisis selanjutnya berupa PCR.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Analisis keragaman genetik dari tanaman sirih dapat dideteksi dengan menggunakan marka molekuler *Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP)*. SRAP merupakan marka molekuler yang ditemukan lebih akhir daripada marka molekuler seperti RFLP, AFLP, RAPD, SSR dan ISSR. Adanya fragmen atau lokus spesifik pada beberapa kultivar atau aksesori menunjukkan adanya insersi atau delesi pada DNA genotip (Noormohammadi *et al.* 2011). SRAP mampu mengelompokkan beberapa aksesori menjadi satu kluster berdasarkan lokasi asal sampel atau tempat tumbuh (Shafie *et al.* 2011).

Penentuan keragaman genetik produk PCR-SRAP ditentukan melalui skoring berdasarkan muncul tidaknya pita DNA. Pita yang muncul pada gel diasumsikan sebagai alel SRAP. Keragaman alel SRAP ditentukan dari perbedaan migrasi alel pada gel masing-masing sampel (Aneja *et al.* 2013). Keragaman antar populasi dapat dilihat dengan melihat perbedaan pola pita (polimorfisme) DNA. Polimorfisme (keragaman genetik) adalah banyaknya fragmen DNA yang berbeda berdasarkan ukuran, karena adanya marka-marka yang tersebar pada seluruh genom (Sijapati 2008). Hasil produk amplifikasi PCR kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa atau akrilamid, yang kemudian divisualisasikan dengan bantuan sinar *UV transilluminator* atau *Gel Documentation System*. Dengan metode elektroforesis, pita-pita DNA akan terpisahkan berdasarkan

perbedaan berat molekul. Pita DNA dengan berat molekul lebih ringan akan berjalan lebih cepat (Vivikanda 2014).

Pemilihan Primer

Analisis keragaman genetik *Piper betle* L. yang dilakukan dengan menggunakan marka SRAP menghasilkan hasil optimasi pada Gambar 2. Berdasarkan hasil optimasi primer, dari 16 primer dipilih 8 primer yang menghasilkan pita polimorfisme yang lebih banyak. Pita polimorfik tersebut menunjukkan adanya sekuens DNA hasil isolasi yang komplemen dengan primer. Tidak adanya amplifikasi pada beberapa primer dapat disebabkan oleh primer yang tidak komplemen dengan sekuens pada DNA template (Sulistyaaati dan Widyatmoko 2017). Primer yang tidak menghasilkan pita menunjukkan bahwa primer tersebut tidak mempunyai sekuens yang homolog dengan DNA template (Syafaruddin dan Nasution 2012).

PCR Sampel Sirih Hijau

Hasil produk PCR dengan 8 primer SRAP (Gambar 3) menghasilkan sebanyak 59 lokus yang berpola polimorfik (Tabel 4). Persentase pita polimorfik yang dihasilkan sebesar 81.35%. Primer yang menghasilkan 100% pola pita polimorfik yaitu primer 16. Primer yang menghasilkan jumlah lokus terbanyak yaitu primer 15 yang berjumlah 11 lokus, sedangkan primer yang menghasilkan jumlah lokus paling sedikit yaitu primer 12 dengan 4 lokus. Adanya pita tersebut menunjukkan bahwa primer SRAP yang digunakan mempunyai kesamaan dengan DNA template hasil isolasi sirih hijau. Banyak sedikitnya lokus yang dihasilkan bergantung pada banyaknya sekuens DNA primer yang homolog dengan sekuens DNA sampel (Syafaruddin dan Nasution 2012).

Data

Filogenik dan Kesamaan Genetik

Pohon filogenetik merupakan diagram yang menunjukkan susunan hubungan kekerabatan (Fatmarischa *et al.* 2014). Filogenetik dapat digunakan untuk mengelompokkan suatu kelompok genotip. Dendogram filogeni akan merupakan data keragaman genetik pada berbagai kelompok (Nugroho *et al.* 2015). Penentuan keragaman genetik produk PCR-SRAP ditentukan melalui skoring berdasarkan muncul tidaknya pita DNA saat elektroforesis. Berdasarkan ada atau tidaknya pita, profil pita diterjemahkan ke dalam data biner. Pita yang muncul diberi kode 1 (ada) sedangkan yang tidak muncul diberi kode 0 (tidak ada) (Aneja *et al.* 2013). Hasil skoring kemudian dianalisis dengan menggunakan program NTSys. Dendogram dibuat dengan menggunakan metode UPGMA dan PCA dibuat dengan menggunakan metode SIMINT (Sari 2016).

Jarak genetik antar matriks tercantum pada Lampiran 5. Dari matriks tersebut kemudian dianalisis dengan metode UPGMA, yang menghasilkan dendogram pada Gambar 4. Analisis keragaman genetik dengan marka SRAP menunjukkan nilai kemiripan sebesar 0.61 – 1.0. atau nilai keragaman sebesar 0-0.39. Hal tersebut menunjukkan bahwa keragaman genetik sirih hijau termasuk dalam kategori rendah. Nilai keragaman genetik pada individu terbagi menjadi tiga kategori yaitu kategori rendah berkisar dari 0.1 – 0.4, kategori sedang

berkisar 0.5 – 0.7, dan terakhir terdapat kategori tinggi berkisar 0.8 – 1.0 (Sulistiyawati dan Widyatmoko 2017). Semakin kecil nilai keragaman maka semakin dekat kekerabatan yang diuji (Vika *et al.* 2015). Menurut Indhirawati *et al.* (2015), semakin kecil nilai koefisien kemiripan genetik (mendekati 0) maka hubungan kekerabatan antar aksesori akan semakin jauh atau semakin besar jarak genetiknya (mendekati 1). Kemiripan antar sampel yang tinggi menunjukkan kondisi tempat tumbuh sampel tersebut sama atau menyerupai (Shafie *et al.* 2011).

Hasil dendogram menunjukkan adanya pengelompokan yang terbagi menjadi 2 klaster besar. Klaster I hanya terdapat sampel dari satu aksesori, yaitu dari Bajau (Kaltim-Kaltara) yang terpisah dengan aksesori lainnya. Kelompok 2 terbagi menjadi 2 subklaster dengan kemiripan sebesar 67% yaitu I dan II. Subklaster I hanya terdapat sampel dari aksesori Duri (Sulsel). Sub II terbagi menjadi 2 bagian dengan kemiripan sebesar 74% yaitu bagian A dan bagian B. Bagian A hanya terdiri satu aksesori yaitu Bungku, sedangkan bagian B terdiri dari beberapa aksesori yaitu Balesang, Saluan, Tolage dan Tialo (Sulteng). Nilai koefisien kemiripan genetik terendah atau nilai keragaman genetik terbesar (0.39) ditemukan antara aksesori Bajau (Kaltim-Kaltara) dengan aksesori lainnya yang berasal dari Sulteng dan Sulsel, sedangkan koefisien kemiripan genetik terbesar (100%) atau nilai keragaman genetik terkecil yaitu antara sampel nomor 8 dan nomor 9, yang berasal dari aksesori yang sama, yaitu Duri (Sulsel). Tingginya nilai kemiripan menunjukkan bahwa keragaman genetik sirih hijau pada 7 populasi rendah polimorfisme.

Analisis PCA dilakukan untuk mengidentifikasi dan mengelompokkan masing-masing individu berdasarkan data genetik (Jinyoung *et al.* 2017). Pengelompokan struktur individu dalam populasi dalam pola plot PCA tersebut menunjukkan adanya persamaan komponen utama dalam data genetik sampel, dengan marka sebagai acuan (McVean 2009). Hasil plot PCA dapat digunakan mendukung dendogram. Analisis PCA menghasilkan nilai keragaman sebesar 45.57%. dan 17.17% Hasil analisis PCA dua dimensi pada Gambar 5 menghasilkan dua kelompok utama yaitu kelompok I dan kelompok II. Hasil tersebut mendukung hasil dendogram tetepai secara lebih umum yang terbagi menjadi 2 klaster besar. Akan tetapi, terdapat sedikit perbedaan yang mana aksesori Duri (Sulsel) lebih berdekatan dengan aksesori Bajau (Kaltim-Kaltara). Adanya perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh komposisi tanah aksesori Bajau dan Duri yang hampir sama, yang tercantum pada Tabel 7. Oleh karena itu, terdapat kemungkinan dengan adanya persamaan nutrisi tanah pada kedua aksesori tersebut menyebabkan kemiripan pada genetik antara keduanya.

Analisis PCA tiga dimensi pada Gambar 6 menunjukkan adanya pembagian dan pengelompokan sampel dalam struktur populasi secara lebih detail. Plot PCA tiga dimensi membagi pengelompokan populasi menjadi 4 kelompok Hasil tersebut mendukung dengan pembagian dendogram yaitu klaster besar I (Bajau-Kaltim Kaltara), subklaster I (Duri-Sulsel) dan subklaster II A (Bungku-Sulteng) dan B (Balesang, Saluan, Tolage, dan Tialo- Sulteng). Keragaman pada tingkat spesies dapat disebabkan oleh faktor genetik dan lingkungan sedangkan keragaman genetik dalam suatu populasi dapat disebabkan oleh adanya perkawinan secara acak dan mutasi (Hartati dan Darsana 2015; Riupassa 2016).

Keragaman Genetik

Keragaman genetik dalam masing-masing populasi dapat dianalisis dengan menggunakan program Popgene. Analisis keragaman genetik dalam suatu populasi dapat diamati dengan parameter genetik seperti jumlah alel (N_a), jumlah alel efektif (N_e), nilai indeks informasi Shannon (I), dan keragaman genetik Nei (h). Jumlah alel (N_a) adalah jumlah alel yang teramati pada suatu populasi sedangkan jumlah alel efektif (N_e) merupakan pendugaan variabilitas alel yang muncul pada suatu populasi. Indeks Shannon kurang dari 1.5 menunjukkan tingkat keanekaragaman yang rendah, kisaran 1.5 – 3.5 sedang dan lebih dari 3.5 menunjukkan keanekaragaman yang tinggi (Santosa *et al.* 2008). Nilai keragaman genetik Nei berkisar antara 0 sampai dengan 1. Semakin mendekati 0, maka nilai keanekaragaman rendah dan semakin mendekati 1 maka nilai keanekaragaman tinggi (Arifin dan Mulliadi 2010).

Analisis struktur genetika 7 populasi pada Tabel 5 menghasilkan rerata jumlah alel yang teramati adalah 1.052 dengan nilai terendah 1.00 dan nilai tertinggi 1.1695. Jumlah alel efektif berkisar antara 1.0-1.1334 dengan rerata sebesar 1.04. Nilai indeks informasi Shannon tertinggi yaitu 0.0732 (aksesi Bajau) dan terendah yaitu 0 (aksesi Tialo). Nilai keragaman genetik (h) 7 populasi sirih hijau berkisar antara 0-0.1053. Berdasarkan nilai indeks informasi Shannon dan keragaman Nei, maka keragaman sirih hijau pada 7 populasi tersebut termasuk kategori rendah. Nilai indeks informasi Shannon dan nilai keragaman genetik populasi Bajau (Kaltim-Kaltara) lebih tinggi dari populasi lainnya. Tingginya keragaman genetik dalam populasi Bajau dapat disebabkan oleh adanya *gene flow*, yaitu transfer alel dari satu populasi ke populasi yang lain, mutasi dan keragaman geografis pada populasi tersebut (Kusuma *et al.* 2016; Wang *et al.* 2019).

Nilai jarak genetik pada Tabel 6 di antara 7 populasi berada pada kisaran 0.1125-0.6241. Jarak genetik tertinggi terdapat antara populasi 1 (Bajau-Kaltim Kaltara) dan populasi 5 (Tolage-Sulteng) sebesar 0.6241. Hal tersebut menunjukkan jauhnya kekerabatan diantara kedua populasi tersebut. Jarak genetik terdekat terdapat pada populasi 5 (Tolage-Sulteng) dan populasi 7 (Tialo-Sulteng) yaitu sebesar 0.1125. Hal tersebut menunjukkan bahwa kedua populasi tersebut berkerabat dekat, atau adanya kemungkinan bahwa kedua populasi tersebut berasal dari sumber yang sama.

Sampel yang digunakan merupakan sampel hasil eksplorasi dan pengetahuan lokal etnomedisin yang dilakukan oleh RISTOJA, pada provinsi Kalimantan Timur-Kalimantan Utara, Sulawesi Tengah dan Sulawesi Selatan. Adanya variasi genetik juga dapat dipengaruhi oleh proses pengambilan sampel. Pengambilan sampel ketika musim hujan atau musim kemarau diduga dapat memengaruhi genetik, yang mana berkaitan dengan nutrisi yang diperoleh pada tanaman tersebut. Praktik pertanian, kondisi pascapanen, penyimpanan, faktor usia tanaman, komposisi tanah akan menimbulkan variasi (Faller dan Falho 2010). Penelitian Milana *et al.* (2016) juga membuktikan bahwa perbedaan geografis daerah asal tanaman menyebabkan hasil kandungan dalam suatu tumbuhan yang berbeda. Berdasarkan hasil dendrogram, kluster I hanya terdiri dari sampel yang berasal dari aksesori Bajau, provinsi Kalimantan Timur-Kalimantan Utara. Kluster II terbagi menjadi dua sub kluster. Sub I hanya terdiri dari aksesori Duri, yang

berasal dari provinsi Sulawesi Selatan, sedangkan sub II terdiri dari berbagai aksesori, yang semuanya berasal dari provinsi Sulawesi Tengah.

Subklaster II terdiri dari sampel dengan berbagai aksesori yang berasal dari Sulawesi Tengah. Akan tetapi, subklaster ini masih terbagi-bagi lagi menjadi beberapa bagian. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh provinsi Sulawesi Tengah yang secara biogeografi terletak pada jantung *Wallacea*, sehingga memiliki potensi sumberdaya alam biologi yang unik dan kaya akan flora fauna (Pitopang dan Ramawangsa 2016). Subklaster II A hanya terdiri dari aksesori Bungku, yang terpisah dari aksesori lainnya yang sama-sama berasal dari provinsi Sulawesi Tengah. Pembagian kelompok tersebut dapat disebabkan oleh adanya aliran gen (*gene flow*) perbedaan kondisi geografis, kondisi lingkungan, adanya mutasi dan penyimpangan genetik (Sulistiyawati dan Widyatmoko 2017). Aliran gen adalah yang merupakan transfer alel dari satu populasi ke populasi yang lain (Wang *et al.* 2019). Kondisi lingkungan seperti ketinggian tempat, jenis tanah, iklim, cuaca, curah hujan dan kelembaban dapat memengaruhi genetik (Setiawati 2013). Karakteristik geografis dan lingkungan yang berbeda-beda antara Pulau Jawa, Sulawesi, Kalimantan dan Nusa Tenggara akan membuat perbedaan-perbedaan pada genetik (Kusuma *et al.* 2016; Wu *et al.* 2013).

Aksesori Bungku terpisah dengan aksesori lainnya diduga karena Bungku satu-satunya aksesori dengan curah hujan yang tinggi dengan iklim yang sangat basah (Suraji *et al.* 2015). Menurut Robert dan Smith (2000) terdapat korelasi antara iklim dengan susunan tumbuhan. Bungku juga memiliki kemiringan topografi yang lebih besar dari 40%, lebih besar dari aksesori lainnya yang hanya 8% (Suraji *et al.* 2015). Subklaster II B terdiri dari berbagai aksesori yang berasal dari Sulawesi Tengah. Secara geografis, aksesori Bungku dekat dengan Tolage. Aksesori Tialo dekat dengan Balesang. Saluan berada pada kepulauan tersendiri. Akan tetapi, berdasarkan pengelompokan menurut dendrogram, kekerabatan terdekat terjadi antara aksesori Tialo dan Tolage dengan koefisien kemiripan sebesar 0.89 atau nilai keragaman genetik sebesar 0.11. Hal tersebut dapat disebabkan oleh kesamaan jenis tanah diantara keduanya (inseptisol dan podsolik), curah hujan per tahun yang termasuk kategori rendah. Selain itu kelembaban relatif antara kedua aksesori tersebut relatif sama (RPJP 2005; Siswoyo 2009). Aksesori Saluan juga mempunyai curah hujan per tahun yang relatif rendah. Aksesori Balesang mempunyai kelembaban yang menyerupai dengan Saluan, yaitu berada pada kisaran 73-82% (RPJD 2015).

Kondisi lingkungan seperti bentuk topografi, curah hujan, jenis tanah, kelembaban dapat menyebabkan adanya keragaman genetik. Hal tersebut diduga karena adanya faktor ekspresi gen yang berkaitan dengan nutrigenomik (ilmu yang menjelaskan adanya hubungan antara faktor genetik dengan nutrisi). Adanya perbedaan kandungan nutrisi pada masing-masing lingkungan akan memengaruhi ekspresi gen dan protein serta produksi metabolit. Genom dapat berevolusi dalam menanggapi adanya perubahan rangsangan lingkungan seperti gizi. Perubahan kandungan nutrisi tersebut akan berdampak pada perubahan di tingkat genom, transkriptom (mRNA), protein, metabolom (metabolit) serta perubahan di tingkat fisiologis (Anggraeni 2016). Perbedaan nutrisi dan faktor lingkungan tersebut dapat menimbulkan terjadinya perbedaan fenotip dan morfologi. Pola hubungan kekerabatan merupakan hasil interaksi faktor genetik dan lingkungan (Setiawati 2013).

Tabel 7 Keadaan Geografis dan Lingkungan pada Tujuh Populasi Sirih Hijau (BMKG 2017; BPS 2017; Bappeda 2005; Suraji *et al.* 2015)

Aksesi	Topografi	Kelembaban	Curah hujan	Tanah
Bajau (Kaltim-Kaltara)	<500 m dpl, Kemiringan >40%	82-84	Tinggi	Sedimen, podsolik
Duri (Sulsel)	>1500 m dpl, Kemiringan 25-40%	82-85	Rendah	Sedimen, podsolik
Bungku (Sulteng)	100-200 m dpl, Kemiringan >40%	83-84	Tinggi	Podsolik, latosol, hidromof
Balesang (Sulteng)	±700 m	73-84	Rendah	Kambisol, podsolik
Saluan (Sulteng)	40-90 m dpl	75-82	Rendah	Podsolik, kambisol, inceptisol
Tolage (Sulteng)	>500 m	73-84	Rendah	Podsolik, inceptisol
Tialo (Sulteng)	0-2900 m	70-82	Rendah	Podsolik, inceptisol

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Keragaman genetik sirih hijau (*Piper betle* L) dengan marka *Sequence-Related Amplified Polymorphism* (SRAP) dari tujuh aksesi yang berada di provinsi Kalimantan Timur-Kalimantan Utara, Sulawesi Tengah dan Sulawesi Selatan termasuk dalam kategori rendah, yaitu pada rentang 0-0.39. Hal tersebut dapat disebabkan oleh letak geografis yang berdekatan dan kondisi geografis serta lingkungan yang hampir menyerupai. Aksesi dari Kalimantan Timur memiliki jarak terbesar dengan aksesi lainnya yang berasal dari Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tengah. Keragaman genetik dalam populasi Bajau, Kalimantan Timur-Kalimantan Utara lebih tinggi dari keragaman genetik populasi lainnya. Keragaman genetik terendah atau jarak genetik terdekat terdapat pada aksesi Tolage dan Tialo, dari provinsi Sulawesi Tengah.

Saran

Perlu dilakukan analisis lebih lanjut mengenai sekuensing DNA hasil PCR sehingga dapat diketahui kecocokan sekuens ampikon dengan marka SRAP secara lebih detail. Selain itu, analisis keragaman sirih hijau dengan menggunakan marka seperti SRAP seperti RAPD, SSR, ISSR, RFLP, AFLP juga perlu dilakukan untuk mendapatkan dan membandingkan data genetik sirih hijau di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmigid HM. 2012. Efficiency of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) markers for genotype fingerprinting and genetic diversity studies in Canola (*Brassica napus*). *Afri J Biotech*. 11(24): 6409-6419.
- Aiello SE. 2012. *The Merck Etinary Manual*. New Jersey (US) : Merck Sharp & Dohme Corp.
- Aneja B, Yadav NR, Yadav RC, Kumar R. 2013. Sequence related amplified polymorphism (SRAP) analysis for genetic diversity and micronutrient content among gene pools in mungbean (*Vigna radiata* L.) Wilczek. *Physiol Mol Biol Plants*. 19(3): 399- 407.
- Anggraeni SR, Sudarsono, Soedharma D. 2008. Karakterisasi genetika rumput laut *Euchema* sp. dari tiga daerah di Indonesia. *J Bionatura*. 10(3): 196-208.
- Anggraeni AS. 2016. *Nutrigenomik, Jembatan Antara Ilmu Nutrisi dan Genetik*. Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam (ID): LIPI Press.
- Anuradha V, Praveena A, Sanjayan KP. 2013. Nutritive analysis of fresh and dry fruits of *Morinda tintoria*. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2(3):65-74.
- Arifin J, Mulliadi D. 2010. Pendugaan keseimbangan populasi heterozigositas menggunakan pola protein albumin darah pada populasi domba ekor tipis (*Javanese thin tailed*) di daerah Indramayu. *IJAVS*. 10(2): 65-72.
- Ayuningrum PI, Afrianto E, Mulyani Y. 2012. Keragaman genetik rumput laut dari Sukabumi, Jawa Barat berdasarkan metode RAPD PCR. *JTPK*. 3(4): 337-345.
- Baco S, Malaka R, Rahim L. 2013. Kesamaan genetik antar populasi sapi bali dan hasil silangannya dengan sapi simmental. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*; 2013 Sep 3-4; Medan. Medan (ID): Puslitbang.
- [B2P2TOOT] Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). 2018. *Protokol Analisis RISTOJA Lanjut 2018*. Jakarta (ID): Balitbangkes Kementerian Kesehatan RI.
- [Bappeda] Badan Perencanaan Pembangunan Daerah. 2005. *Rencana Pembangunan Jangka Panjang Daerah Kabupaten Parigi Moutong 2005-2025*. Sulawesi (ID) : Pemerintah Daerah Kabupaten Parigi Moutong.
- [BMKG] Badan Meteorologi, Klimatologi, dan Geofisika Kalimantan Timur, Kalimantan Utara, Sulawesi Tengah, Sulawesi Selatan. 2017. Data Curah Hujan Harian, Suhu Harian, Kelembaban Harian, dan Kecepatan Angin Harian Bulan Januari-Desember 2017.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2017. Iklim (Jumlah Curah Hujan, Hari Hujan, Kelembaban, Penyinaran Matahari). *Berita Resmi Statistik BPS*. <http://www.bps.go.id> [diakses pada 11 Mei 2019].

- Corkill G, Rapley R. 2008. *The Manipulation of Nucleic Acid : Basic Tools and Technique in Molecular Biomethods Handbook*. New York (US): Humana Press.
- Desjardins P, Conklin D. 2010. Nanodrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE*. 45(1): 1-4.
- Faller ALK, Fialho E. 2010. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *J Food Compos Anal*. 23(1): 561–568.
- Fatmarischa N, Sutopo, Johari S. 2014. Jarak genetik dan faktorpeubah pembeda Entok Jantan dan Betina melalui pendekatan analisis morfometrik. *JPI*. 16(1): 33-39.
- Ferreira CMH, Pinto ISS, Soares EV, Soares HMVM. 2015. Unsuitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions-a review. *RSC Advances*. 5(1): 30989-31003.
- Gardenia L, Koesharyani I. 2011. Metode isolasi *deoxyribo nucleic acid* bakteri dari organ ikan nila (*Oreochomis niloticus*) untuk diagnosa *Streptococcus* dengan teknik PCR. *J Ris Akuakultur*. 6(3): 469-477.
- Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEFC, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M. 2012. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 8(2): 88-97.
- Gumasty, Restu M, Pongtuluran I. 2012. Seleksi primer untuk analisis keragaman genetik jenis bitti (*Vitex coffasus*). *J Perennial*. 8(1): 25-29.
- Gultom FKB, Nababan TMS, Harizka T, Rahmatayah. 2017. Uji daya absorbansi etanol pada daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dengan metode spektrofotometri UV-Vis. *J Einstein*. 5(2): 1-6.
- Gusmiaty, Resu M, Larekeng SH. 2016. Polimorfisme marka RAPD untuk analisis keragaman genetik *Pinus merkusii* di hutan pendidikan Unhas. *J Natur Indonesia*. 16(2): 47-53.
- Hardiyanto NF, Devy, Martasari C. 2008. Identifikasi Kekkerabatan Genetik Klon-klon Bawang Putih Indonesia Menggunakan Isozim dan RAPD. *J Hort*. 18(4): 385-394.
- Indhirawati R, Purwantoro A, Basunanda P. 2015. Karakterisasi morfologi dan molekuler jagung berondong stroberi dan kuning (*Zea mays* L. Kelompok Everta). *Vegetalika*. 4(1): 102-104.
- Jiang Y, Liu JP. 2011. Evaluation of genetic diversity in *Piper* spp. using RAPD and SRAP markers. *GMR*. 10(4): 2934-2943.
- Jingade A, Kunjupillai V, Chirakara VN, Manjulal EJ. 2013. Plant Science A novel and efficient protocol for the isolation of genomic DNA from mulberry (*Morus* L.) H. *Food Agric*. 25 (2): 124-131.

- Jinyoung B, Younghun H, Ivan PG, Jonathan AB, Michael FS, Christopher IA. 2017. Ancestry inference using principal component analysis and spatial analysis : a distance-based analysis to account for population substructure. *BMC Genomics*. 18: 789.
- Joko T, Kusumandari N, Hartono S. 2011. Optimasi metode PCR untuk deteksi *Pectobacterium carotovorum* penyebab penyakit busuk lunak angrek. *JPTI*. 17(2): 54-60.
- Kumar NS, Gusubramanian G. 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its application. *Sci Vis*. 11(3): 116-124.
- Kusuma ABK, Bengen DG, Maduppa H, Subhan B, Arafat D. 2016. Keanekaragaman genetik karang lunak *Sarcophyton trocheliphorum* pada populasi laut Jawa, Nusa Tenggara dan Sulawesi. *J Enggano*. 1(1) : 89-96.
- Kusuma MS, Susilorini TE, Surjowardojo P. 2017. Pengaruh lama dan suhu penyimpanan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dengan aquades terhadap daya hambat bakteri *Streptococcus agalactiae* penyebab mastitis pada sapi perah. *J Ternak Tropica*. 18(2): 9-16.
- Langga IF, Restu M, Kuswinanti. 2012. Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi dna tanaman bitti (*Vitex cofassus Reinw*) serta analisis keragaman genetik dengan teknik RAPD-PCR. *J Sainteknologi*. 12(3): 265-276.
- Li XY, Li J, Zhao J, Yang F, Fu W, Liu SH, Wang DD, Yang YC, Wang RY. 2014. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) for studying diversity and population structure of plants and other living organisme: a protocol. *J Anim Plant Sci*. 24(6): 1478-1486.
- Liana HA. 2017. Isolasi DNA *Chlorella* sp. dengan metode CTAB dan identifikasi sekuen 18S rDNA [skripsi]. Malang (ID): UIN Maulana Malik Ibrahim.
- McVean G. 2009. A genealogical interpretation of principal components analysis. *PloS Genetics*. 5 (10): 1-10.
- Milana S, Yahya, Sitorus H, Ni'mah T, Marini. 2016. Hubungan kandungan hara tanah dengan produksi senyawa metabolit sekunder pada tanaman duku dan potensinya sebagai larvasida. *J Vektor Penyakit*. 10(1):11-18.
- Mitsui Y, Nagasawa J, Maeda Y, Setoguchi H. 2017. Characterization of new microsatellite loci in *Pieris amamioshimensis* (Ericaceae), a species nearly extinct in the wild. *Plant Species Biol*. 2(1):10-11.
- Murtiyaningsih H. 2017. Isolasi DNA genom dan identifikasi kekerabatan genetik nanas menggunakan RAPD. *Agritrop*. 15(1): 83-93.
- Naipospos Y, Miftahudin, Sobir. 2014. Identifikasi morfologi dan marka molekular terpaut sifat tidak berbunga jattan pada mutan pisang kepok. *J Hort*. 24(1): 23-31.
- Noormohammadi ZF, Shojaei-Jesvaghani, Sheidai M, Farahani, Alishah O. 2011. Inter simple sequence repeats (ISSR) and random amplified polymorphic

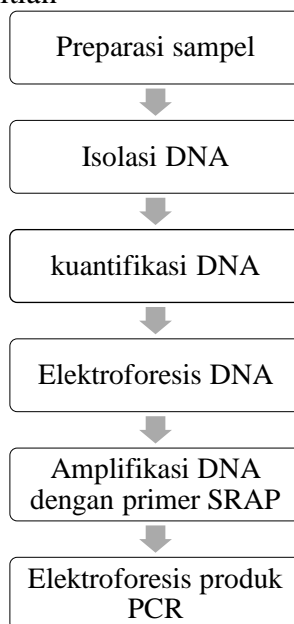
- DNA (RAPD) analyses of genetic diversity in Mehr cotton cultivar and its crossing progenies. *Afri J Biotech.* 10(56): 11839-11847.
- Nugroho K, Reflinur, Lestari P, Rosdianti, terryana RT, Kusmana, Tasma IM. 2015. Keragaman genetik empat belas aksesori kentang (*Solanum tuberosum* L.) berdasarkan marka SSR dan STS. *J Agrobiogen.* 11(2): 41-48.
- Nugroho R, Terryana RT, Rijzaani HA, Lestari P. 2016. Metode ekstraksi DNA pada *Jatropha* spp. tanpa menggunakan nitrogen cair. *J Littri.* 22(4): 159-166.
- Nurrani L. 2013. Pemanfaatan tradisional tumbuhan alam berkhasiat obat oleh masyarakat di sekitar cagar alam tangale. *Info BPK.* 3(1): 1-22.
- Pharmawatii M. 2009. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. (Proteaceae). *J Biol.* 13(1): 12-16.
- Pitopang R, Ramawangsa PA. 2016. Potensi Penelitian Etnobotani di Sulawesi Tengah Indonesia. *J Natur Sci.* 5(2): 111-131.
- Popping B, Amigo CD, Hoenicke K. 2010. *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists.* New Jersey (US): John Wiley & Sons Inc.
- Prayoga W, Wardani AK. 2015. PCR untuk deteksi *Salmoella* sp. : kajian pustaka. *JPA.* 3(2): 483-488.
- Purba YS, Martanti D. 2008. Keragaman genetik berdasarkan marka random amplified polymorphic DNA pada *Amorphophallus muelleri* Blume di Jawa. *Biodiversitas.* 9(4): 245-249.
- Riupassa PA. 2009. Perancangan primer oligonukleotida untuk polimerisasi in vitro gen sukrosa sintase. *Biosfera.* 26(3): 131-137.
- Riupassa AR. 2016. Keragaman genetik durian (*Durio* spp) berdasarkan marka Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) [Disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Salim Z, Munadi R. 2017. *Info Komoditi Tanaman Obat.* Jakarta (ID): Badan Pengkajian dan Pengembangan Perdagangan Kementerian Perdagangan Republik Indonesia.
- Sambrook J, Maniatis T. 2001. *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)* Vol. 2. New York (US): Spring Harbor Laboratory Press
- Santoso Y, Ramadhan EP, Rahman DA. 2008. Studi keanekaragaman mamalia pada beberapa tipe habitat di Stasiun Penelitian Pondok Ambung Taman Nasional Tanjung Puting Kalimantan Tengah. *Media Konservasi.* 13(3): 1-7.
- Sari V. 2016. Keragaman genetik bawang merah berdasarkan marka morfologi dan ISSR [tesis]. Bogor (ID): Magister Sains Biologi.
- Setiawati T. 2013. Diversitas genetik kerabat liar ubi jalar *Ipomea trifida* (HBK) G.Don berumbi asal Citatah Jawa Barat berdasarkan karakter kromosom. *IJAS.* 3(3): 84-89.

- Shafie SB, Hasan SMZ, Zain AM, Shah RM. 2011. RAPD and ISSR markers for comparative analysis of genetic diversity in wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) from Negeri Sembilan, Malaysia. *J Med Plants Resc.* 5(18): 4426-4437.
- Shaye NA, Migdadi H, Charbaji A, Alsayegh S, Daoud S, Al-Anazi W, Alghamdi S. 2018. Genetic variation among saudi tomato (*solanum lycopersicum* L.) landraces studied using SDS-page and SRAP markers. *Saudi J Biol Sci.* 4(14): 1-9.
- Shepherd LD, McLay TGB. 2011. Two micro-scale protocols for the isolation of DNA from polysaccharide-rich plant tissue. *J Plant Res.* 124(1):311-314.
- Siswoyo S. 2009. Model pengembangan kota terpadu mandiri di kawasan transmigrasi Lore-Poso. *Teras.* 10(1): 16-26.
- Subositi D, Mujahid R. 2013. Karakterisasi genetik tempurung (*Sanchus arvenis* L.) berdasarkan marka molekular Sequence Related Amplified Polymorphism. *J Biol Indo.* 9(2): 167-174.
- Sulistiyawati P, Widyatmoko AYPBC. 2017. Keragaman genetik populasi kayu merah (*Pterocarpus indicus* Willd) menggunakan marka random amplified polymorphism DNA. *JPTH.* 11(1): 67-76.
- Suraji, Rasyid N, Kenyo AS, Wulandari DR, Saefudin M, Ashari M, Kuhaja T, Juliyanto E *et al.* 2015. *Profil Kawasan Konservasi Provinsi Sulawesi Tengah.* Morowali (ID): Direktorat Konservasi Kawasan dan Jenis Ikan Direktorat Jenderal Kelautan, Pesisir dan Pulau-Pulau Kecil Kementerian Kelautan dan Perikanan.
- Syafaruddin, Nasution MA. 2012. Keragaman 17 aksesi plasma nutfah kakao berdasarkan marka morfologi dan molekuler. *Bul Ristri.* 3(2): 177- 184.
- Utami DER, Krismayanti L, Yahdi. 2015. Pengaruh jenis sirih dan variasi konsentrasi ekstrak terhadap pertumbuhan jamur. *J Biota.* 7(2): 142-157.
- Vanijajiva. 2012. The application of ISSR markers in genetic variance detection among Durian (*Durio zibethinus* Murv) cultivar in the Nonthaburi province Thailand. *Procedia Engineering.* 32(2012): 153-159.
- Vika TO, Purwanto A, Wulandari. 2015. Keragaman genetik pad tanaman lili hujan (*Zephyranthes* spp.). *Vegetalika.* 4(2): 70-77.
- Vivikanda F. 2014. Deteksi DNA babi dan DNA sapi dengan menggunakan metode *insulated isothermal Polymerase Chain Reaction* (ii-PCR) [skripsi]. Jakarta (ID): UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Wang D, Shen B, Gong H. 2019. Genetic diversity of Simao pine in China revealed by SRAP markers. *Peer J.* 7(6):529-560.
- Widjaja EA, Rahayuningsih Y, Rahajoe JS, Ubaidillah R, Maryanto I, Walujo EB, Semiadi. 2014. *Kekinian Keanekaragaman Hayati Indonesia.* Kementrian Lingkungan Hidup dan Bappenas (ID): LIPI Press.
- Wu YB, Zheng LJ, Yi J, Wu JG, Chen TQ, Wu JZ. 2013. Quantitative and chemical fingerprint analysis for the quality evaluation of receptaculum

- Nelumbinis by RP-HPLC coupled with hierarchical clustering analysis. *Int J Mol Sci.* 14(1): 1999–2010.
- Yono D, Wahyu Y, Sobir, Mathius NT. 2017. Identifikasi penanda SSR yang berasosiasi dengan bobot tandan buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J Agron Indonesia.* 45(1): 79-85.
- Zhao W, Fang R, Pan Y, Yang Y, Chung JW, Chung IM, Park YJ. 2009. Analysis of genetic relationship of mulberry (*Morus L.*) germ plasm using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) marker. *Afri J Biotech.* 8(11): 2604-2610.
- Zuraidah. 2015. Pengujian ekstrak daun sirih (*Piper sp*) yang digunakan oleh para wanita di Gampong Dayah Bubur, Pidie dalam mengatasi kandidiasis akibat cendawan *Candida albican*. *Int J Child Gend Stud.* 1(2):109-119.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Bagan alir penelitian



Lampiran 2 Volume yang ditambahkan

Kode Sampel	Aksesi	Konsentrasi (ng/ μ L)	Kemurnian	Volume yang diambil (μ L)	Volume ddH ₂ O yang ditambahkan (μ L)
1	PB K1 A1	39.7	1.93	0.5	5.6
2*	PB K1 A2	45.2	1.86	2.0	4.1
3*	PB K1 A3	48.6	1.88	2.0	4.1
4*	PB K1 A4	52.9	1.90	2.0	4.1
5*	PB K1 A5	45.4	1.93	2.0	4.1
6*	PB LS A1	64.1	1.87	2.0	4.1
7*	PB LS A2	87.8	1.86	2.0	4.1
8*	PB LS A3	65.7	1.83	2.0	4.1
9*	PB LS A4	51.1	1.92	2.0	4.1
10*	PB LS A5	49.3	1.88	2.0	4.1
11*	PB LT I2	110.8	1.78	2.0	4.1
12*	PB LT I3	69	1.88	2.0	4.1
13	PB LT J1	29.8	1.99	0.6	5.5
14	PB LT J2	27.4	1.98	0.7	5.4
15	PB LT J3	27.2	1.97	0.7	5.4
16	PB LT J4	28.3	1.90	0.7	5.4
17	PB LT J5	34.9	1.92	0.6	5.5
18	PB LT H5	12.1	1.99	1.6	4.5
19	PB LT H4	23.9	2.01	0.8	5.3
20	PB LT D1	40.9	1.90	0.5	5.6
21	PB LT D2	49.1	1.90	0.5	4.5
22	PB LT G4	11.4	1.72	1.7	5.4

Keterangan : *dengan pengenceran (Konsentrasi akhir 10 ng/ μ l)

Lampiran 3 Kombinasi primer

No	Jenis Primer
1	PRM Forward Me 1 dan PRM Reverse Em 1
2	PRM Forward Me 1 dan PRM Reverse Em 2
3	PRM Forward Me 1 dan PRM Reverse Em 3
4	PRM Forward Me 1 dan PRM Reverse Em 4
5	PRM Forward Me 2 dan PRM Reverse Em 1
6	PRM Forward Me 2 dan PRM Reverse Em 2
7	PRM Forward Me 2 dan PRM Reverse Em 3
8	PRM Forward Me 2 dan PRM Reverse Em 4
9	PRM Forward Me 3 dan PRM Reverse Em 1
10	PRM Forward Me 3 dan PRM Reverse Em 2
11	PRM Forward Me 3 dan PRM Reverse Em 3
12	PRM Forward Me 3 dan PRM Reverse Em 4
13	PRM Forward Me 4 dan PRM Reverse Em 1
14	PRM Forward Me 4 dan PRM Reverse Em 2
15	PRM Forward Me 4 dan PRM Reverse Em 3
16	PRM Forward Me 4 dan PRM Reverse Em 4

Lampiran 4 Indeks similaritas Dice

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
1	1.00																							
2	0.88	1.00																						
3	0.89	0.91	1.00																					
4	0.86	0.91	0.97	1.00																				
5	0.86	0.88	0.97	0.97	1.00																			
6	0.57	0.56	0.64	0.64	0.68	1.00																		
7	0.61	0.59	0.64	0.64	0.64	0.68	1.00																	
8	0.59	0.58	0.66	0.66	0.69	0.98	0.98	1.00																
9	0.59	0.58	0.66	0.66	0.69	0.98	0.98	1.00	1.00															
10	0.59	0.58	0.66	0.66	0.69	0.91	0.95	0.93	0.93	1.00														
11	0.59	0.58	0.63	0.59	0.63	0.71	0.75	0.73	0.73	0.73	1.00													
12	0.61	0.59	0.64	0.61	0.64	0.73	0.76	0.75	0.75	0.75	0.98	1.00												
13	0.68	0.66	0.68	0.68	0.68	0.63	0.66	0.64	0.64	0.64	0.78	0.79	1.00											
14	0.63	0.64	0.69	0.66	0.66	0.66	0.61	0.64	0.63	0.63	0.79	0.81	0.91	1.00										
15	0.64	0.66	0.67	0.64	0.68	0.63	0.66	0.64	0.64	0.64	0.81	0.83	0.97	0.95	1.00									
16	0.64	0.63	0.64	0.61	0.64	0.59	0.63	0.61	0.61	0.64	0.78	0.79	0.96	0.91	0.97	1.00								
17	0.61	0.59	0.61	0.58	0.61	0.56	0.59	0.58	0.58	0.61	0.78	0.76	0.93	0.88	0.93	0.96	1.00							
18	0.47	0.49	0.51	0.54	0.54	0.66	0.69	0.68	0.68	0.68	0.84	0.83	0.73	0.71	0.73	0.69	0.69	1.00						
19	0.49	0.51	0.52	0.56	0.56	0.68	0.71	0.69	0.69	0.69	0.86	0.85	0.74	0.73	0.75	0.71	0.71	0.98	1.00					
20	0.56	0.51	0.49	0.52	0.52	0.64	0.68	0.66	0.66	0.69	0.79	0.78	0.75	0.66	0.71	0.75	0.75	0.85	0.86	1.00				
21	0.59	0.54	0.52	0.56	0.56	0.68	0.71	0.69	0.69	0.73	0.79	0.81	0.78	0.69	0.74	0.78	0.74	0.85	0.86	0.97	1.00			
22	0.49	0.58	0.56	0.59	0.59	0.64	0.68	0.66	0.66	0.66	0.86	0.85	0.75	0.73	0.75	0.71	0.71	0.88	0.89	0.79	0.79	1.00		

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Wonogiri, 09 Desember 1997 dari ayah Katiman dan ibu Sri Mulyani. Penulis merupakan anak pertama dari tiga bersaudara. Penulis menempuh pendidikan di SMAN 1 Wonogiri dan melanjutkan studi ke Institut Pertanian Bogor melalui jalur undangan SNMPTN dengan mayor Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam pada tahun 2015. Penulis menjadi penerima beasiswa PPA selama 3 semester.

Selama mengikuti perkuliahan, penulis pernah menjadi asisten praktikum Kimia pada Program Pendidikan Kompetensi Umum (PPKU) pada tahun ajaran semester ganjil 2016/2017 dan semester ganjil tahun ajaran 2017/2018. Penulis juga aktif dalam kepanitiaan seperti IPB *Social Health and Care* 2017, Lomba Karya Ilmiah Pelajar, IPB *Goes to School* Wonogiri, *International Seminar on Sciences* 2017 dan 2018. Penulis juga pernah mengikuti IPB *Goes to Field* (IGTF) 2017 dengan tema Kearifan Lokal. Penulis pernah tergabung ke dalam kelompok PKM-K yang menerima pendanaan dari Kemenristekdikti. Penulis juga pernah mengikuti kompetisi kelompok pada LKTIN Tracival Universitas Tirtayasa Banten 2018 dan LKTIN Pektin Universitas Mataram Lombok 2018.