OPTIMASI *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA* (RAPD) PADA KARAKTERISASI MOLEKULAR MAJA (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) DI KABUPATEN DAN KOTA MOJOKERTO

SKIRPSI

UIN SUNAN AMPEL
S U R A B A Y A

Disusun Oleh :

LATIFATOEL CHILMI
NIM : H71216032

PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL
SURABAYA
2020

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Latifatoel Chilmi

NIM : H71216032

Progam Studi : Biologi

Angkatan : 2016

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul "OPTIMASI *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA* (RAPD) PADA KARAKTERISASI MOLEKULAR MAJA (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) DI KABUPATEN DAN KOTA MOJOKERTO". Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya akan bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 5 Agustus 2020

Yang menyatakan,

METERAI TEMPEL

0C29EAHF544504480

6000

ENAM RIBU RUPIAH

(Latifatoel Chilmi)

NIM. H71216032

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi oleh

NAMA : LATIFATOEL CHILMI

NIM : H71216032

JUDUL : OPTIMASI *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA* (RAPD) PADA KARAKTERISASI MOLEKULAR MAJA (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) DI KABUPATEN DAN KOTA MOJOKERTO

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 5 Agustus 2020

Dosen Pembimbing 1	**Dosen Pembimbing 2**
(Saiku Rokhim, M. KKK.)	**(Yuanita Rachmawati, M.Sc.)**
NIP. 198612212014031001	**NIP. 198808192019032009**

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Latifatoel Chilmi ini telah di pertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 5 Agustus 2020

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I

Saiku Rokhim, M. KKK.
NIP. 198612212014031001

Penguji II

Yuanita Rachmawati, M.Sc.
NIP. 198808192019032009

Penguji III

Esti Tyastirin, M. KM.
NIP. 198706242014032001

Penguji IV

Ita Ainun Jariyah, M. Pd.
NIP. 198612052019032012

Mengetahui,
Plt Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Ampel Surabaya

Dr. Hj. Evi Fatimatur Rusydiyah, M.Ag.
NIP. 197312272005012003

KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN
Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Latifatoel Chilmi
NIM : H71216032
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI/ BIOLOGI
E-mail address : latifatoelc@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :
■ Sekripsi ☐ Tesis ☐ Desertasi ☐ Lain-lain (.....)
yang berjudul :
OPTIMASI *RANDOM APLIFIED POLYMORPHIC DNA* (RAPD) PADA KARAKTERISASI MOLEKULAR MAJA (*Aegle marmelos* (L.) Corr) DI KABUPATEN DAN KOTA MOJOKERTO

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Ekslusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara ***fulltext*** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 5 Agustus 2020
Penulis

(Latifatoel Chilmi)

OPTIMASI *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA* (RAPD) PADA KARAKTERISASI MOLEKULAR MAJA (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) DI KABUPATEN DAN KOTA MOJOKERTO

ABSTRAK

Maja (*Aegle marmelos* L.) merupakan tanaman dengan kearifan lokal berawal dari sebuah cerita di Kerajaan Majapahit. Hingga saat ini mudah ditemukan dan dijumpai di kawasan Mojokerto. Maja dianggap memiliki manfaat sebagai obat-obatan tradisional, akan tetapi termasuk tanaman yang paling diabaikan dan kurang perawatan. Status maja masuk kategori spesies *Rare, Endangered and Threatened* (RET) sehingga data publikasi maja sangat minim. Upaya yang dapat dilakukan untuk mencegah kepunahan maja adalah konservasi genetik salah satunya menggunakan penanda molekular *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hasil optimasi berdasarkan penanda RAPD pada sampel daun maja. Penelitian ini bersifat observasional deskriptif kualitatif dengan jumlah sampel 15 diambil dari kecamatan yang berbeda-beda. Metode penelitian ini yaitu berdasarkan analisis RAPD menggunakan primer OPA 1-10. Tahapan analisis yaitu isolasi dan spektrofotomeri, amplifikasi PCR, running elektroforesis serta visualisasi *gel documentation*. Hasil keseluruhan optimasi, primer dapat mengamplifikasi pada progam PCR 94°C: 5 m, 94°C: 1 m, 36°C: 1,5 m, 72°C: 2 m, 72°C: 7 m di sampel 2 dan 13 pengenceran. Simpulan penelitian ini memberikan informasi bahwa metode RAPD menunjukkan sampel daun maja tidak dapat teramplifikasi oleh primer OPA 1-10. Hal ini disebabkan karena tidak adanya kecocokan antara sekuens primer OPA 1-10 dengan sekuens whole genom daun maja. Primer yang paling baik digunakan pada penelitian ini adalah OPA 4, OPA 8, dan OPA 10 karena masing-masing menghasilkan band monomorfik.

Kata Kunci : Maja, Optimasi, Molekular, RAPD, Primer

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

OPTIMIZATION OF *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA* (RAPD) ON MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MAJA (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) IN MOJOKERTO

ABSTRACT

Maja (*Aegle marmelos* L.) is a plant with local wisdom originating from a story in the Majapahit Kingdom. Until now, it is easy to find and find in the Mojokerto area. Maja is considered to have benefits as a traditional medicine, but is one of the most neglected and under-treated plants. Teenage status is included in the *Rare, Endangered and Threatened* (RET) species category so that the publication data of the teen is very minimal. Efforts that can be made to prevent the extinction of maja are genetic conservation, one of which is using the molecular marker Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). The purpose of this study was to determine the optimization results based on RAPD markers in maja leaf samples. This research is a qualitative descriptive observational study with a total sample of 15 taken from different districts. This research method is based on RAPD analysis using OPA 1-10 primers. The analysis stages were isolation and spectrophotomy, PCR amplification, running electrophoresis and visualization of the gel documentation. Overall results of optimization, primers can amplify on PCR programs 94°C: 5 m, 94°C: 1 m, 36°C: 1.5 m, 72°C: 2 m, 72°C: 7 m in samples 2 and 13 dilutions. The conclusion of this study provides information that the RAPD method shows the maja leaf sample cannot be amplified by OPA 1-10 primers. This is due to the absence of a match between the primary sequences of OPA 1-10 and the whole genome sequences of maja leaves. The best primers to use in this study are OPA 4, OPA 8, and OPA 10 because each produces a monomorphic band.

Keywords: Maja, Morphology, Molecular, RAPD, Primary

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR ISI

Halaman Judul i
Lembar Persetujuan Pembimbing ii
Lembar Pengesahan iii
Pernyataan Keaslian iv
Pernyataan Publikasi v
Pedoman Transliterasi vi
Motto vii
Halaman Persembahan viii
Kata Pengantar x
Abstrak xiii
Abstract xiv
Daftar Isi xv
Daftar Tabel xvii
Daftar Gambar xviii
Daftar Lampiran xx
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1. Latar Belakang 1
1.2. Rumusan Masalah 5
1.3. Tujuan 5
1.4. Manfaat 5
1.5. Batasan Penelitian 6
BAB II KAJIAN PUSTAKA 7
2.1. Buah Maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr) 7
2.1.1. Klasifikasi 7
2.1.2. Morfologi 8
2.1.3. Kandungan 12
2.1.4. Manfaat 14
2.2. *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) 8
2.2.1. Polimorfisme 17
2.2.2. Monomorfisme 19

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

2.3. Molekular 20
2.3.1. Isolasi DNA 20
2.3.2. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) 21
2.3.3. Elektroforesis 23
BAB III METODE PENELITIAN 26
3.1. Rancangan Penelitian 26
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian 26
3.3. Alat dan Bahan Penelitian 26
3.4. Prosedur Penelitian 27
3.4.1. Pengumpulan sampel 27
3.4.2. Isolasi DNA 28
3.4.3. Spektrofotometri 29
3.4.4. Amplifikasi dan visualisasi DNA 30
3.4.5. Elektroforesis 30
3.5. Analisis Data 31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 32
4.1. Pengambilan Sampel 32
4.2. Isolasi Daun Maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr) 39
4.3. Visualisasi PCR dengan *Gel Documentation* 42
BAB V PENUTUP 60
5.1. Simpulan 60
5.2. Saran 60
DAFTAR PUSTAKA 61
LAMPIRAN 67

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 *Grand Chart* jadwal pelaksanaan penelitian 26
Tabel 3.2 Urutan sekuens primer OPA 01-10 27
Tabel 3.3 Komposisi Reaksi PCR 30
Tabel 4.1. Data lokasi pengambilan sampel daun maja 32
Tabel 4.2. Keterangan diameter buah maja 34
Tabel 4.3. Hasil konsentrasi DNA daun *Aegle marmelos* L. 41
Tabel 4.4. Progam PCR 45
Tabel 4.5. Progam PCR 47
Tabel 4.6. Progam PCR 48
Tabel 4.7. Progam PCR 49
Tabel 4.8. Hasil konsentrasi DNA daun *Aegle marmelos* L. sampling kedua 51
Tabel 4.9. Progam PCR 52
Tabel 4.10. Progam PCR 54
Tabel 4.11. Hasil konsentrasi pengencaran sampel lama dan baru 56
Tabel 4.12. Progam PCR 56
Tabel 4.13. Progam PCR 58

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Buah Maja dengan tempurungnya (kiri) dan daging buah 7
Gambar 2.2. Buah Maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr) 8
Gambar 2.3. Pohon buah maja (*Aegle marmelos* (L.)..... 9
Gambar 2.4. Bentuk bagian-bagian daun 10
Gambar 2.5. Bentuk ujung daun 11
Gambar 2.6. Bentuk pangkal daun 11
Gambar 2.7. Struktur molekul senyawa saponin 13
Gambar 2.8. Struktur molekul senyawa tanin 14
Gambar 2.9. Contoh hasil *band* polimorfisme 17
Gambar 2.10. *Termocycler machine* PCR 21
Gambar 2.11. Susunan DNA 22
Gambar 2.12. Amplifikasi DNA siklus PCR 22
Gambar 2.13. Alat Elektroforesis Horizontal 25
Gambar 3.1. Peta Kota/Kabupaten Mojokerto untuk sampling 28
Gambar 4.1. Penampang pohon maja tajuk menjulang..... 33
Gambar 4.2. Ukuran buah maja di 4 Kecamatan 33
Gambar 4.3. Bagian tempurung maja yang sudah besar 34
Gambar 4.4. Buah maja yang dibelah dengan dibenturkan 35
Gambar 4.5. Buah maja yang berjatuhan dan dibirakan tanpa perawatan 36
Gambar 4.6. Ujung daun tanaman maja 38
Gambar 4.7. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 1 42
Gambar 4.8. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 2 43
Gambar 4.9. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 3 43
Gambar 4.10. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 4 43
Gambar 4.11. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 5 44
Gambar 4.12. Hasil visualisasi sampel 1 primer OPA 1-10 45
Gambar 4.13. Hasil visualisasi sampel 7 primer OPA 1-10 46
Gambar 4.14. Hasil visualisasi elektroforesis sampel 1-12 tanpa primer 46
Gambar 4.15. Hasil visualisasi sampel 6 primer OPA 1-10 optimasi suhu 48

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Gambar 4.16. Hasil visualisasi sampel 12 primer OPA 1-10 optimasi suhu 48
Gambar 4.17. Hasil visualisasi sampel 5 primer OPA 1-10 optimasi suhu 49
Gambar 4.18. Hasil visualisasi sampel 5 primer OPA 3, OPA 4, OPA 5 50
Gambar 4.19. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 3 mastermix..... 50
Gambar 4.20. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 4 mastermix 50
Gambar 4.21. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 5 mastermix 51
Gambar 4.22. Hasil visualisasi sampel 6 primer OPA 1-10 optimasi suhu 53
Gambar 4.23. Hasil visualisasi sampel 12 primer OPA 1-10 optimasi suhu 53
Gambar 4.24. Hasil visualisasi sampel 13 primer OPA 1-10 optimasi suhu 54
Gambar 4.25. Hasil visualisasi sampel 6 primer OPA 1-10 optimasi suhu 54
Gambar 4.26. Hasil visualisasi sampel 12 primer OPA 1-10 optimasi suhu 55
Gambar 4.27. Hasil visualisasi sampel 13 primer OPA 1-10 optimasi suhu 55
Gambar 4.28. Hasil visualisasi sampel 14 primer OPA 1-10 optimasi suhu 55
Gambar 4.29. Hasil visualisasi sampel 15 primer OPA 1-10 optimasi suhu 56
Gambar 4.30. Hasil visualisasi sampel 13 yang diencerkan, primer OPA 1-10 .. 57
Gambar 4.31. Hasil visualisasi sampel 2 yang diencerkan, primer OPA 1-10 57
Gambar 4.32. Hasil visualisasi pengulangan sampel 2 optimasi suhu 58
Gambar 4.33. Hasil visualisasi sampel 1 optimasi suhu 59
Gambar 4.34. Hasil visualisasi sampel 7 optimasi suhu 59

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Proses Sampling dan Isolasi Daun Maja 67

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB I
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tanaman maja memiliki nama ilmiah *Aegle marmelos* L., memiliki buah berbentuk bola berdiameter 5-12 cm dengan kulit luar berwarna hijau dan bertekstur keras (Batutah, 2017). Daun tanaman maja mengalami peluruhan pada saat masak di musim kemarau. Pertumbuhannya mencapai ketinggian hingga 20 m dengan tajuk yang menjulang ke atas dan kayu sangat keras. Memiliki bunga berbau harum hingga aroma dapat tercium dari jarak jauh (Hariana, 2008). Pohon ini mampu berbuah pada usia 5 tahun yang berproduksi maksimal hingga umur 15 tahun. Buah yang dihasilkan satu pohon mampu mencapai 200-400 buah (Rismayani, 2013). Persebaran tanaman maja didaerah dataran tinggi hingga ketinggian ± 500 mdpl dengan lahan kondisi basah seperti rawa-rawa, saat musim dingin suhu -7°C atau musim kemarau pada suhu 49°C. Tanaman maja dikenal banyak sebutan di Indonesia daerah seperti di Jawa (Mojo atau Mojo Legi), di Bali (Bila), di Melayu (Bilak atau Bel), di Madura (Maos) dan di Alor Nusa Tenggara (Kabila). Selain di Indonesia, di wilayah Asia Tenggara dan Asia Selatan dapat ditemukan adanya tanaman maja ini (Fatmawati, 2015).

Allah menciptakan tumbuhan beraneka jenis dengan keunikan tersendiri yang menjadi pembeda antara satu sama lain sebagai bukti kuasa-Nya. Bukti kekuasaan Allah salah satunya mengeluarkan benda mati dari benda hidup seperti susu yang diproduksi hewan mamalia dan mengeluarkan benda hidup dari benda mati. Allah menghidupkan benda hidup dari benda mati salah satu contohnya adalah dihidupkan tumbuhan dari tanah dengan bantuan dzat Yang di kehendaki-Nya. Seperti yang telah termaktub dalam al-Qur’an surah Fatir (35) ayat 27 sebagai berikut :

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ ثَمَرَٰتٍ مُّخْتَلِفًا أَلْوَٰنُهَا.....

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Artinya :"*Tidakkah engkau melihat bahwa Allah menurunkan air dari langit lalu dengan air itu Kami hasilkan buah-buahan yang beraneka macam jenisnya.....*" (Q.S. Fatir (35) : 27).

Tanaman maja merupakan tanaman dengan kearifan lokal dimana menurut sejarah buah dari tanaman ini memiliki rasa pahit yang berawal dari sebuah cerita saat sebidang tanah diterima Raden Wijaya sebelum menjadi pemimpin Kerajaan Majapahit, dibangunlah kerajaan besar. Bertepatan itu prajuritnya memakan buah maja yang pahit. Praduga dari Raden Wijaya adalah bahwa prajurit Majapahit tersebut telah memakan buah maja yang masih muda (Abdullah, 2018).

Flora khas adalah sebuah tanaman yang menjadi identitas suatu wilayah, baik Kabupaten, Kota, Provinsi bahkan hingga Negara. Mojokerto merupakan Kota/Kabupaten yang menggunakan spesies tanaman maja (*Aegle marmelos* L.) sebagai flora khas sejak masa kerajaan Majapahit hingga saat ini. Menurut para Arkeologi, Mojokerto adalah pusat dari pemerintahan Kerajaan Majapahit, dimana asal kata tersebut dari dua kata yaitu maja dan pahit. Nama maja dalam penamaan Kerajaan Majapahit tersebut menunjukkan tanaman maja hingga saat ini mudah ditemukan dan dijumpai di daerah kawasan Mojokerto (Anwar, 2009). Lambang negara Majapahit bersimbol buah maja dengan latar belakang pola batik gringsing berwarna merah (Mulyani, 1993).

Rohmah *et al* (2018) menyatakan, bukti bahwa tanaman maja mempunyai hubungan tinggi dengan Majapahit adalah perkebunan yang berada di museum Trowulan dengan jumlah banyak yang dapat ditemui. Menurut Vinolia (2014) persebaran maja di Mojokerto, Kecamatan Trowulan, khususnya situs candi Bajang Ratu banyak ditemukan dengan jumlah 36 individu. Penyebab kepadatan ini karena faktor abiotik seperti angin, yang berpengaruh menerbangkan biji dari tempat satu dan jatuh ditempat yang sesuai, maka akan tumbuh individu baru. Vinolia (2014) juga menyatakan bahwa populasi tanaman maja dengan persebaran di Mojokerto memiliki sosiabilitas hidup kurang dari 200 individu dalam situs candi atau berkisaran 154 pohon dengan luas wilayah yang berbeda-beda, akan tetapi dengan jumlah demikian masih

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dapat berkembang dari setiap tunas yang ada di sekitar wilayah. Total tumbuhan maja di tanam hampir di seluruh lokasi situs Trowulan.

Status tanaman maja di Banglore, India masuk kategori spesies yang *Rare, Endangered and Threatened* (RET) dalam *The Foundation for Revitalization of Local Health Traditions* (FRLHT) (Venudevan dan Srimathi, 2014). Neeraj *et al* (2017) menyatakan dalam penelitiannya bahwa *Aegle marmelos* L. dianggap sebagai tanaman bernutrisi atau tanaman obat-obatan. Tanaman ini merupakan salah satu tanaman buah yang paling diabaikan dan kurang dimanfaatkan. Selain memiliki nutrisi dan sebagai obat bagi manusia, hanya sedikit perhatian yang telah diberikan dalam hal penanaman, penelitian, dan pengembangan. Karena basis genetiknya tersedia di seluruh dunia, sehingga perlu dilestarikan dan dieksplorasi. Kala *et al* (2006) menyatakan bahwa pohon maja tersebut membutuhkan progam aforestasi yang disertai dengan pengembangan varietas baru dan teknik penggandaan massal pada benih yang terbatas. Berdasarkan hasil konservasi di kawasan Mojokerto, Masyarakat sekitar menyebutkan bahwa tanaman maja sudah sangat susah ditemui baik di kawasan Kabupaten maupun Kota.

Upaya yang dilakukan untuk mencegah kepunahan maja salah satunya konservasi genetik. Konservasi genetik diperlukan untuk mempertahankan keanekaragaman hayati dari tanaman maja serta diharapkan dapat menyimpan *gene* atau *gene complexs* dengan kemungkinan di masa yang akan datang memiliki sifat adaptasi baik dan bernilai ekonomis. Mempertahankan basis genetik yang luas sangat diperlukan bahkan harus dipertahankan. Karena bukan hanya sebagai pertahanan sifat yang telah ada tetapi untuk mendapatkan sifat baru yang diinginkan serta memiliki kemampuan adaptasi pada lingkungan lain (Wright, 1976). Angka keragaman genetik suatu spesies yang terancam punah tergantung pada jumlah populasi dan tingkat isolasi. Keragaman genetik kecil dapat menghilang dari populasi terisolasi dalam beberapa generasi, sedangkan pada populasi besar, populasi akan terus menerus tidak kehilangan sejumlah besar keragaman dalam jangka ribuan tahun. Pergeseran genetik pada populasi kecil terjadi lebih cepat sehingga mengakibatkan penurunan keragaman genetik (Konservasi Biodiversitas Raja Ampat, 2015).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Berbagai makhluk hidup baik hewan maupun tumbuhan telah diberikan dalam keadaan baik untuk diambil manfaatnya dan dirawat dengan penuh kasih sayang. Akan tetapi manfaat yang telah diambil harus bersifat lestari, yaitu pemanfaatan secara efisien, efektif dan mempertimbangkan jangka panjang pada spesies tersebut. Allah meneyerukan kepada hamba-hambanya yang diutus sebagi khalifah di muka bumi untuk menjaga serta melestarikan alam dan isinya. Larangan untuk berbuat kerusakan di muka bumi menjadi garis keras manusia agar tidak sampai dilanggar. Karena Allah telah menyediakan alam besarta isinya dengan keseimbangan ekosistem ilmiah. Seperti yang telah termaktub dalam al-Qur'an surat Al-A'raf (7) ayat 56 sebagai berikut :

وَلَا تُفْسِدُوا فِي ٱلْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَٱدْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا ۚ إِنَّ رَحْمَتَ ٱللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ ٱلْمُحْسِنِينَ ۝٥٦

Artinya : "*dan janganlah kamu berbuat kerusakan di bumi setelah (diciptakan) dengan baik. Berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut dan penuh harap. Sesungguhnya rahmat Allah sangat dekat dengan orang yang berbuat kebaikan*". (Q.S. Al-A'raf (7) : 56)

Kemajuan ilmu di bidang biologi molekular, memungkinkan suatu populasi keragaman genetik dapat diamati hingga tingkat DNA. Marka molekular dapat digunakan untuk mengevaluasi kekerabatan dan keragaman pada tingkat genetik (Setyowati, 2013). Banyak marka molekular yang digunakan oleh peneliti, seperti RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), dan RAPD (*Random Amplified Polymorphyc DNA*) (Sudiono *et al*., 2004; Bani *et al*., 2017; Handayani *et al*., 2006).

Marka molekular ini tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Studi kekerabatan dan keragaman genetik pada spesies dengan genom yang belum diketahui, dapat dianalisis menggunakan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Tingey *et al*., 1994). Analisis dengan RAPD mampu menghasilkan keragaman lebih tinggi jika dibandingkan dengan analisis *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) dan isozim (Liu dan Furnier, 1993). Metode RAPD merupakan teknik baru untuk identifikasi sejumlah besar polimorfisme DNA pada genom dengan efisien dan cepat. Tipe polimorfisme tersebut

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

membuat RAPD cocok untuk studi keragaman genetik, peta genetik, hubungan kekerabatan, maupun sidik jari DNA pada kasus forensik (Anggereini, 2008).

Studi karakterisasi pada tanaman maja dapat menggunakan penanda molekular *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) yang suatu saat nanti hasilnya dapat digunakan sebagai database RAPD dari tanaman maja. Banyak penelitian menjadikan tanaman maja sebagai objek yang dikaji, namun hanya dari segi populasi, kegunaan, maupun ekonomis. Minimnya data publikasi penggunaan buah maja dalam bidang molekular sangat memungkinkan untuk dilakukan penelitian, salah satunya menggunakan penanda molekular RAPD.

Berdasarkan latar belakang diatas maka penulis bermaksud untuk menggunakan daun maja sebagai objek penelitian dalam bidang molekular berdasarkan penanda *Random Amplified Polymorphyc DNA* (RAPD) untuk menganalisis genom yang terdapat pada tanaman. Karena perlu dicari bukti empiris mengenai karakterisasi molekular berdasarkan penanda RAPD pada sampel daun maja (*Aegle marmelos* L.) yang diperoleh dari kawasan Kabupaten dan Kota Mojokerto.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana optimasi RAPD pada sampel daun maja (*Aegle marmelos* L.) yang diperoleh dari kawasan Kabupaten dan Kota Mojokerto?

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil optimasi RAPD pada sampel daun maja (*Aegle marmelos* L.) yang diperoleh dari kawasan Kabupaten dan Kota Mojokerto.

1.4. Manfaat

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini, diharapkan akan memberikan manfaat pada beberapa pihak terkait, berupa :

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

a. Database tanaman maja (*Aegle marmelos* L.) berdasarkan penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) serta menjadi referensi baru bagi peneliti lain.
b. Informasi variasi genetik tentang konservasi tanaman maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) di wilayah Kabupaten dan Kota Mojokerto bagi para calon pendidik.

1.5. Batasan Penelitian

Bahasan penelitian ini agar materi tidak keluar dari masalah maka penulis fokus pada beberapa masalah antara lain:

a. Mendeteksi pola pita DNA polimorfisme menggunakan penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).
b. Keragaman genetik dilihat dengan pita DNA yang dihasilkan menggunakan primer OPA 1-10.
c. Wilayah yang digunakan sampling adalah 15 kecamatan di kawasan Kabupaten dan Kota Mojokerto.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1. Maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr)

Maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr) merupakan tanaman Famili Rutaceae atau tumbuhan jeruk-jerukan. Penyebaran secara luas dari tumbuhan ini adalah wilayah Asia Selatan dan Asia Tenggara antara lain : Malaysia, India, Bangladesh, Burma, Pakistan, Srilanka, Thailand dan termasuk Indonesia. Pohon maja dapat tumbuh di lahan kering dengan kondisi basah seperti rawa-rawa musim kemarau pada suhu 49°C atau saat musim dingin suhu -7°C (Fatmawati, 2015). Perkembangbiakan maja adalah secara generatif (biji) dan vegetatif (cangkok) (Rismayani, 2013).

Gambar 2.1 Buah Maja dengan tempurungnya (kiri)
dan daging buah maja (kanan)
Sumber : Fatmawati, 2015

2.1.1. Klasifikasi

Kedudukan tanaman maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr) dalam taksonomi atau sistematika penamaan tumbuhan menurut (USDA, 2017) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Sapindales
Famili	: Rutaceae
Genus	: *Aegle*
Spesies	: *Aegle marmelos* (L.) Correa

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Gambar 2.2 Buah Maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr)
Sumber : Hananto, 2018

Tanaman ini mempunyai nama yang beragam dalam berbagai bahasa, seperti di Indonesia *Aegle marmelos* (L.) Corr di daerah Jawa dikenal dengan nama Maja, Modjo atau Mojo Legi, hingga Majapahit, di Bali dikenal dengan sebutan Bila, di Melayu dikenal dengan sebutan Bilak atau Bel, di Madura dikenal dengan nama Maos dan di Alor Nusa Tenggara (Kabila). Buah maja dalam bahasa Inggris disebut *wood aple*, *bael fruit*, atau *bel fruit* (Fatmawati, 2015). Sedangkan di Asia Selatan tanaman ini dikenal dengan sebutan *Bael*, *Bergiri*, *Beli*, dan *Sirphal*. Di Negara India, Bangladesh, Pakistan, dan Srilanka, buah maja adalah perangkat pernikahan yang penting karena dianggap dari penjelmaan Hyang Syiwa (Rismayani, 2013).

2.1.2. Morfologi

Pohon maja (*Aegle marmelos* L.) adalah tanaman perdu, yang memiliki kulit buah berwarna hijau dan tertekstur keras pada tempurungnya. Pohon ini tumbuh didaerah dataran rendah hingga dataran tinggi ± 500 mdpl yang berupa habitus. Ketinggian pohon maja mencapai 20 m dengan kayu sangat keras dan tajuk menjulang. Bentuk batang buah maja adalah silindris. Terkadang pada batang tua melintir satu sama lain, permukaan kasar dan berwarna coklat kotor (Rismayani, 2013). Batang buah maja berkayu (*ligosus*), bercabang,

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

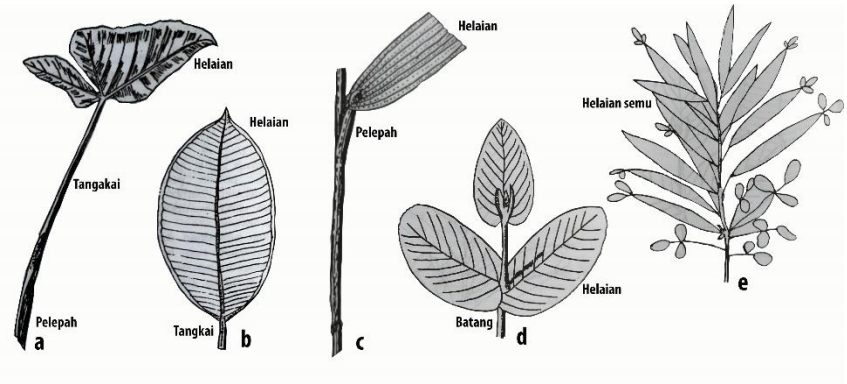
bulat, berduri, dan berwarna putih kekuningan (Badan POM RI, 2008).

Gambar 2.3 Pohon maja (*Aegle marmelos* L.)
Sumber : Mangkoko, 2017

Daun tanaman maja beranak dan berseling, memiliki tangkai yang panjang dan beringgit yang mampu bertitik tembus cahaya. Dahannya berduri banyak tumbuh di bagian ranting daun dengan panjang 1-3 cm (Utami, 2008). Keadaan daun tanaman maja sedikit lebih lebar dari tanaman kawista dan asam keranji, yaitu tanaman yang sering disebut bentuk tajuknya sama dengan tanaman maja (Rismayani, 2013).

Menurut Tjitrosoepomo (2009), daun memiliki bagian-bagian yang terdiri dari upih/pelepah daun (*vagina*), tangkai daun (*petiolus*) dan helaian daun (*lamina*). Tumbuhan yang memiliki daun lengkap disebut **daun lengkap.** Akan tetapi, tidak semua daun memiliki ketiga bagian tersebut sehingga dinamakan **daun tidak lengkap**. Ada beberapa kemungkinan susunan daun yang tidak lengkap (1) daun bertangkai, terdiri dari tangkai dan helaian saja, (2) daun berupih dan berpelepah, terdiri dari upih dan helaian daun, (3) daun duduk (*sessilis*), terdiri dari helaian saja tanapa upih dan tangkai, sehingga helaian melekat atau duduk pada batang, (4) *Filodia*, terdiri dari tangkai saja. Tangkai menjadi pipih dan terlihat seperti helaian daun, sehingga dinamakan helaian daun palsu/semu (Tjitrosoepomo, 2009).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

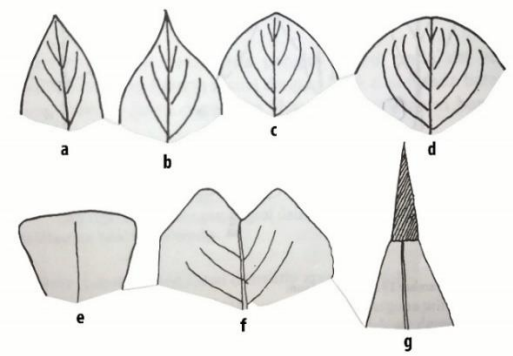


Gambar 2.4. Bentuk bagian-bagian daun
a. daun lengkap
b. daun bertangkai
c. daun berupih
d. daun duduk
e. folidia
Sumber : Tjitrosoepomo, 2009

Bentuk ujung daun dapat memperlihatkan bentuk yang bervariasi. Ujung daun memiliki bentuk runcing/*acutus*, meruncing/*acuminatus*, tumpul/obtusus, membulat/*rotundatus*, rompang/*truncatus*, terbelah/*retusus*, atau berduri/*mucronatusi* seperti yang terlihat pada gambar 2.5.

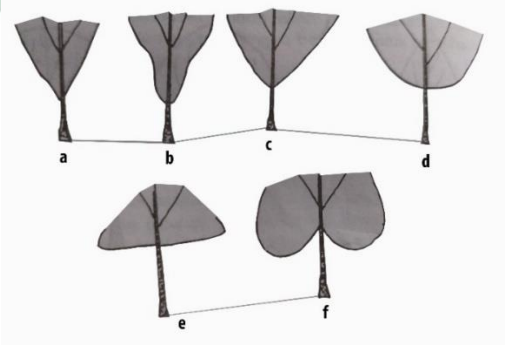
Dalam bukunya Tjitrosoepomo (2009), dikatakan ujung daun runcing apabila kedua tepi daun bertemu diujung membentuk sudut lancip (<90°). Sedangkan ujung daun yang meruncing, tepi daunnya akan membentuk sudut <90° hingga runcing tetapi memanjang. Namun, jika ujung daun membentuk sudut tumpul (>90°) maka dikatakan ujung daun tumpul. Daun yang tidak dapat membentuk sudut dengan permukaan ujung daun seperti busur berbentuk bulat, ginjal dan jorong memiliki ujung daun yang membulat. Ujung daun rompang apabila ujung daun seperti garis yang rata. Bagian ujung daun yang melekuk ke bagian dalam disebut ujung daun yang terbelah. Ujung daun yang runcing membentuk duri sehingga disebut ujung daun berduri.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 2.5. Bentuk ujung daun
a. ujung daun runcing
b.ujung daun meruncing
c. ujung daun tumpul
d. ujung daun membulat
e. ujung daun rompang
f. ujung daun terbelah
g. ujung daun berduri
Sumber : Tjitrosoepomo, 2009

Tepi daun dari kedua sisi kiri dan kanan pangkal ada kalanya dapat bertemu dan berlekatan satu sama lain sehingga pangkal daun dapat dibedakan menjadi beberapa macam. Sebenarnya tepi daun tidak pernah bertemuakan tetapi terpisahkan oleh pangkal ibu tulang/ujung tangkai daun. bertemunya pangkal daun dapat membentuk runcing/*acutus*, meruncing/*acuminatus*, tumpul/*obtusus*, membulat/rotundatus, rompang/*truncatus*, berlekuk/*amarginatus* (Tjitrosoepomo, 2009). Bentuk pangkal daun tersebut terlihat pada gambar 4.6.



Gambar 2.6. Bentuk pangkal daun
a. runcing
b. meruncing
c. tumpul
d. membulat
e. rompang/rata
f. berlekuk
Sumber : Tjitrosoepomo (2009).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tanaman maja memiliki bunga berbentuk tandan keluar dari *axilla*, *calyx* berbentuk segitiga, bunga bergerombol dengan warna kehijau-hijauan sampai putih dan berbau harum (Hariana, 2008). Karena bau buah maja sangat harum, hingga ketika tanaman ini berbunga, aroma wanginya dapat tercium dari jarak jauh (Rismayani, 2013).

Menurut Tjitrosoepomo (2009), tumbuhan berbiji dua / dikotil, sejatinya memiliki batang yang lebih besar di bagian bawah dan semakin mengecil pada bagian ujung. Sehingga dapat dipandang berbentuk kerucut yang amat memanjang pada batangnya. Batang tumbuhan dapat dibedakan menjadi :

a. Batang basah (*herbacus*), batang yang berair dan lunak.
b. Batang berkayu (*lignosus*), batang yang kuat dan keras.
c. Batang rumput (*calmus*), batang yang mempunyai ruas-ruas nyata, berongga dan tidak keras.
d. Batang mendong (*calamus*), seperti batang rumput namun mempunyai ruas-ruas yang lebih panjang.

Awal tumbuhan maja berbuah adalah pada usia 5 tahun dan produksi maksimal setelah usia 15 tahun. Produksi buah maja dalam satu pohon dapat mengahsilkan 200 – 400 butih buah. Proses pemasakan buah maja biasanya terjadi di musim kemarau dengan bersamaan meluruhnya daun. Bentuk buah maja agak bulat menyerupai bola volly dengan diameter sekitar 5 -12 cm dengan daging berbau harum berwarna putih serta berasa manis (Fatmawati, 2015). Kulit buah mengayu dan keras serta dalam satu buah dengan biji 6 – 10 yang berada di dalam daging jernih (Batutah, 2017).

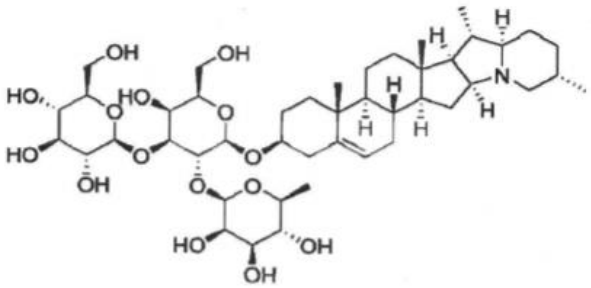
2.1.3. Kandungan

Buah maja mengandung beberapa bahan kimia yang diantaranya, minyak terbang yang mengandung linonen dan zat lemak. Selain itu buah maja pada dagingnya mengandung 2-*furocoumariris-psoralen* dan *marmelosin* (C_{13} H_{12} O_2). Bagian

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

daunnya mengandung *α-limonene, 56%-α-δ-phellanzene, sineol, citonellol, citiol,* o-(3,3-*dimethylallyl*)-*harfordinol*, 5% *cumin aldehyde*, *alkaloids*, n-2-*ethoxy*-2-(4-*methoxyphenyl*) *ethylcinnamide*, n-2-methoxy-2-(4-3,3-dymethyalloxy) phennyl dan n-2-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-ethylcinnamamide (Fatmawati, 2015).

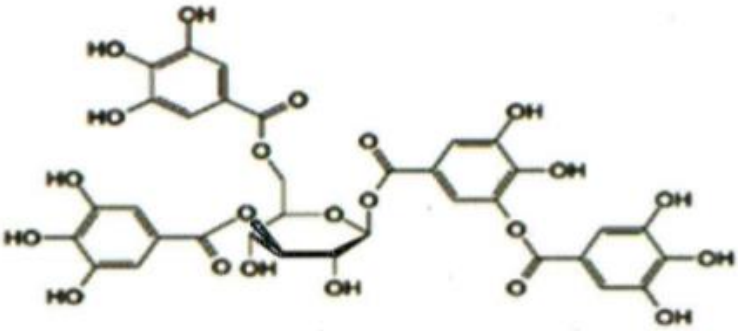
Bagian buah juga mengandung marmelosin, pektin, saponin, minyak atsiri dan tanin. Saponin triterpenoid tersusun dari inti triterpenoid dengan molekul karbohidrat. Jika senyawa tersebut di hidrolisis akan menghasilkan aglikon yang disebut sapogenin. Penyebab rasa pahit padaa buah maja adalah molekul yang dimiliki. Selain itu dapat berbusa apabila dicampur dengan air, memiliki sifat inflamatori, memiliki sifat eksudatif dan memiliki sifat haemolisis (membentuk sel darah merah) (Rismayani, 2013). Sifat antibiotik terdapat pada bagian akar, daun dan buah yang dapat digunakan untuk mengobati gigitan ular. Bagian akarnya mengandung psoralen, anthotoxin, o-methylscopoletin, scopoletin, haplonine, decursinal dan aegelinol (Hariana, 2008).



Gambar 2.7. Struktur molekul senyawa saponin
Sumber : Rismayani, 2013

Senyawa tanin merupakan senyawa yang memiliki rasa pahit dan dengan protein akan bereaksi. Alkaloid dan asam amino yang mengandung banyak gugus karboksil dan hidroksil untuk membentuk ikatan kompleks kuat pada protein dan makromolekul lainnya. Sehingga menyebabkan rasa buah maja sangat pahit dan tidak disenangi oleh hama tanaman berupa serangga (Rismayani, 2013).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 2.8. Struktur molekul senyawa tanin
Sumber : Rismayani, 2013

2.1.4. Manfaat

Buah maja dapat diolah menjadi minuman tradisional bernama "sharbat", terbuat dari daging buah maja yang dihaluskan, di campur air, gula atau sirup dan es. Sayuran popular dari buah maja adalah bagian pucuk maja. Terdapat dalam ilmu pengobatan tradisional di India (Ayurvedic), maja digunakan sebagai obat gangguan pencernaan dan obat penurun demam pada bagian akarnya (Rismayani, 2013). Selain itu kulit batang dan akar tanaman maja dapat digunakan sebagai obat nyeri jantung, sedatif dan stomakikum. Bagian daun bermanfaat untuk mengobati luka basah, kudis, bisul, eksim, abortif, radang selaput lendir hidung dan demam. Pemanfaatan secara umum buah maja ialah untuk diare dan disentri, sedangkan kulit buahnya sebagai pengharum (Hariana, 2008).

Tanaman maja juga bermanfaat sebagi bahan pestisida nabati untuk tanaman yang sedang diserang hama, dengan cara disemprotkan pada tanaman. Menurut Rismayani (2013), menyatakan bahwa hasil penelitian menunjukkan populasi hama penggerek buah kakao (*Canoporpha cramerella*) dapat terusir, karena esktrak buah maja mempunyai bau yang menyengat dan rasa pahit selain itu sistem pencernaan serangga tersebut akan terganggu.

Menurut Merapi (2018) menyatakan bahwa selembar daun maja yang telah dicuci bersih dan dihaluskan hingga menjadi jus

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dengan penambahan madu asli secukupnya dapat berguna untuk melawan penderita hipertensi. Untuk melawan rasa mual dan muntah dapat memanfaatkan bagian buah maja yang masih mentah dan segar. Buah maja yang telah dikeringkan tanpa biji dan digiling menjadi bubuk dapat digunakan sebagai penghambat diare.

2.2. *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)

RAPD adalah teknik berbasis PCR yang menggunakna primer acak tunggal yang digunakan untuk menentukan urutan sekuens. Polimorfisme diamati serta dinilai sebagai tanda ada tidaknya fragmen yang berkaitan dengan variasi urutan, bertujuan untuk menyisipkan, mengahapus atau mengganti nukleotida. Teknik RAPD telah banyak digunakan dengan tujuan identifikasi dengan banyak tanaman (McGregor *et al*., 2000). RAPD dalam mempelajari keragaman genetik, hubungan anatar kekerabatan, dan identifikasi varietas merupakan marka molekular yang lebih cepat dibanding *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) dan *Restriction Fragment Lenght Polymorphisme* atau (RFLP) (Randriani *et al*., 2012).

RAPD merupakan salah satu metode yang digunakan pada menyediakan karakteristik *fingerprints* dan produksi dari genom kompleks tanpa informasi sekuen sebelumnya. Informasi genetik yang disediakan dari metode RAPD dalam bentuk pola pita kaakteristik. Jarak pita DNA informatif pada RAPD sebagian besar antara 300-3000 bp. Metode RAPD sangat penting dalam bidang pemuliaan tanaman yang mampu menganalisis keragaman genetik dengan baik dari tumbuhan dan pola hubungan kekerabatan mampu disajikan dalam proses analisis genetik (Purnomo dan Ferniah, 2018). Variasi genetik berbasis RAPD dinilai berdasarkan metode PCR melaui amplifikasi DNA genom dengan berubah-ubahnya urutan nukleotida. Penanda RAPD dapat dideteksi polimorfisme tingkat tinggi dan mampu menghasilkan penanda genetik dengan kualitass baik (Ashraf *et al*., 2014).

Prosedur metode ini membutuhkan sampel DNA yang sedikit (0,5-5 ng), tidak membutuhkan radioisotop serta dalam pelaksanaannya tidak memerlukan keahlian rumit (Ashraf *et al*., 2014). Pemilihan penanda RAPD karena

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

beberapa keuntungan yang sangat mendukung seperti kesederhanaan dan sifatnya rendah, sistem yang cepat, efektif dan relatif murah untuk memperlajari hubungan genetik tanaman. Penanda RAPD juga dapat digunakan pada studi populasi alami atau keragaman genetik spesies dan studi identifikasis genotip (Purnomo dan Ferniah, 2018). Namun, teknologi RAPD memiliki beberapa keterbatasan, diantaranya :

1. Marka RAPD pada umumnya dominan, sehingga konten informasi yang lebih rendah dibanding *co*-dominan penanda dalam analisis populasi F2.
2. Keadaan marka RAPD telah banyak dipertanyakan di beberapa penelitian yang merubah sebagian kecil dalam kondisi reaksi bisa secara signifikan mengubah jumlah dan intensitas penguaat produk fiksasi (McGregor *et al*., 2000).

RAPD sangat bermanfaat untuk menghasilkan penanda molekular. Primer yang menempel berukuran kecil pada daerah penempelan primer tersebar secara acak di sepanjang DNA genom. Polimorfisme di daerah tersebut menghasilkan amplifikasi yang berbeda dan penanda molekul menggunakan hasil dari larik DNA, karena pola tersebut mempunyai karakteristik tertentu. Primer dipilih pada awal karena variabel utama yang akan menentukan apa dan berapa banyak variasi genetik yang diidentifikasi. Amplifikasi DNA dengan PCR menghasilkan banyak salinan segmen DNA. Mekanisme tersebut menggunakan primer identik dengan ukuran pendek (oligonukleotida) yang merupakan primer mengenali urutan-urutan nukleotida yang selanjutnya disebut **lokus RAPD** (Welsh and Mc Celland, 1990).

Pemanfaatan penanda molekul di bidang perbaikan tanaman telah sukses di masa lalu. Karena setiap penanda molekul mengikuti pola pewarisan mendelian, sangat mudah bagi para ilmuwan tanaman untuk menggunakannya dalam memilik tanaman. Sehingga penanda molekul yang ditandai dengan sifat tertentu digunakan dalam pemilihan genotip dengan menghilangkan segala pengaruh lingkungan (Holla *et al*., 2014).

Menurut Anggereini (2008) Analisis RAPD banyak diaplikasikan dalam membantu memecahkan masalah taksonomi dan biologi populasi organisme. RAPD dapat digunakan untuk beberapa hal sebagai berikut :

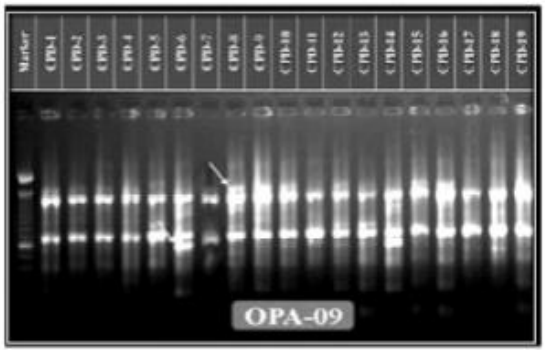
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

a. Pendeteksian polimorfisme pada parasitoid
b. Pola pewarisan dengan marker RAPD
c. Pemeriksaan asal populasi
d. Pemetaan genom lokal dan global suatu spesies
e. Asal geografi serangga hama
f. Diagnosis spesies yang saling berhubungan
g. Enentukan berapa banyak spesies yang dikumpulkan di suatu daerah
h. Membantu mengenal karakter morfologi dari bermacam-macam spesies
i. Membantu menetapkan suatu spesies
j. Mengidentifikasi suatu keragaman genetic suatu organisme
k. Konstruksi peta genetic atau organisme

Selama menggunakan penanda molekular RAPD akan ada proses molekular yang dilakukan, salah satunya elektroforesis. Terdapat pola pita DNA hasil elektroforesis sebanyak dua yaitu pola polimorfik dan monomorfik.

2.2.1. Polimorfisme

Polimorfisme adalah variasi urutan DNA dalam suatu pupulasi spesies. Pada polimorfisme tidak terdapat alel tunggal yang dianggap urutan standar. Akan disebut sebagai polimorfisme apabila variasi memiliki nilai 1% atau lebih dalam populasi tersebut. Fungsi yang sebenanya adalah menjaga variasi bentuk suatu populasi pada lingkungan yang yang bermacam-macam (Sripichai, 2007).



Gambar 2.9. Contoh hasil *band* polimorfisme
Sumber : (Paramar, *et al.*, 2015).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Paramar *et al.,* 2015 melakukan penelitian dalam keragaman genetik populasi mikroba dengan fungsi kataboliknya menggunakan RAPD-PCR dan untuk identifikasi bakteri squencing amplified 16S rRNA. Pada (Gambar 2.5) terlihat bahwa total band polymorfisme sebanyak 5, presentase polimorfisme 88.9 %, nilai informasi penanda genetik / *Polymorphic Information Content* (PIC) berkisar antara 0,67. Masing-masing primer menghasilkan jumlah pita DNA yang berbeda. Pita yang muncul mempunyai ukuran intensitas pita dan basa yang bervariasi. Sebaran situs penempelan primer pada genom, kemurnian dan konsentrasi genom dalam reaksi merupakan faktor yang mempengaruhi perbedaan intensitas pita DNA. sebaran situs yang homolog pada genom mempengaruhi banyak pita yang dihasilkan pada setiap primer (Williams *et al*., 1990).

Williams *et al.,* (1990) menyatakan dalam penelitiaanya bahwa penggunaan primer tunggal dapat digunakan untuk memperkuat DNA yang terdispersi lokus polimorfik. Hal tersebut dikarenakan primer pendek daari urutan nukleotida mampu memperkuat kualitas segmen DNA genom dari berbagai spesies. Polimorfisme yang terdeteksi adalah sebagai penanda melalui gel agarosa yang telah di beri EtBr (etidium bromida). Selama proses penggunaan primer nukleotida urutan acak sebagai akses segmen acak dari DNA genom polimorfisme, penanda yang banyak digunakan adalah penanda RAPD untuk membedakan dari ASP (*Amplified Sequence Polimorfisme*).

Banyak teknik untuk mengevaluasi variabilitas genetik tanaman, seperti morfologi, biokimia hingga penanda molekular. Penanda molekular berbasis DNA yang digunakan untuk mendeteksi DNA polimorfisme pada tingkat lokus spesifik dan juga pada tingkat genom keseluruhan. Menurut Petrovicova *et al.,* (2014) menyatakan, mengenai hal tersebut, teknik analisis RAPD berpeluang digunakan untuk mengkarakterisasi variasi genetik pada tanaman.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Polimorfisme genetik adalah struktur genetik bervariasi dalam suatu populasi yang mewakili keanekaragaman hayati paling besar. Polimorfisme genetik dapat memberikan gambaran apakah kehidupan suatu populasi tersebutu terancam punah atau tidak (Rell *et al*., 2013). Suatu populasi dengan polimorfisme genetik yang rendah cenderung kehidupan jangka panjang terancam, sehingga diperlukan langkah penyelamatan populasi kedepan dapat diambil dengan tepat (Wandia *et al*., 2009).

Polimorfisme genetik kemungkinan merupakan karena hal kebetulan atau terjadi karena sesuatu eksternal (Smith, 2009).Variabilitas yang melekat pada polimorfiseme DNA dapat digunakan untuk mengahsilkan sutau karakteristik DNA pada suatu individu. Melalui polimorfisme DNA banyak memberikan pendekatan sebagai perbandingan jaringan (Trent, 2012).

2.2.2. Monomorfisme

Monomorfisme adalah suatu keadaan dimana beberapa fenotip berbeda dalam suatu populasi spesies atau suatu bentuk yang muncul lebih dari satu. Monomorfik adalah salah satu cara macam pola dari pita hasil DNA elektroforesis. Lokus dapat dikatakan bersifat monomorfik jika mempunyai alel satu bentuk dalam suatu poppulasi atau tidak mempunyai variasi. Spesies yang memiliki alel sama pada suatu lokus dikatakan homozigot pada genotip yang dimilikinya.

Menurut Holla *et al*., (2014) Penanda monomorfik paling sering dihilangkan dari penyelidikan lebih lanjut dengan asumsi bahwa mereka tidak informatif. Aplikon yang diurutkan dari enam penanda termasuk empat penanda monomorfik mengungkapkan bahwa variasi nukleotida terdapat penanda monomorfik OsZIP4a, OsZIP5b, OsYSL2b dan OsNramp. Pada variasi nukleotida mengungkapkan bahwa OsZIP5b, penanda monomorfik di agarosa mengandung perubahan nukleotida yang secara signifikan terkait dengan kandungan seng biji-bijian.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Sehingga penanda monomorfik menunjukkan sama informatif dengan penanda polimorfik dan tidak boleh dihilangkan dari penelitian.

2.3. Molekular

2.3.1. Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan tahap awal dari berbagai teknologi berbasis analisa DNA. Langkah pertama dalam isolasi DNA adalah ekstraksi atau dilisiskan dengan tujuan untuk memecah dinding sel dan membran inti, dilanjutkan pemisahan DNA dari komponen sel lain. Sebelum ekstraksi dimulai, preparasi alat dan bahan perlu disiapkan. Molekul DNA yang sel-sel protein yang terbungkus melindungi DNA di dalam lingkungan sel dapat menghalangi kemampuan DNA, sehingga perlu adanya pemisahan molekul DNA dari materi sel lain sebelum diuji. Tahapan ekstraksi DNA terdiri dari penghilangan protein dan RNA (*sel digestion*), presipitasi DNA dan pemanenan DNA (Zein dan Dewi, 2013).

Proses ekstrak dilakukan dengan homogenasi ditambahkan larutan *buffer* untuk mencegah DNA rusak. Senyawa yang biasa digunakan proses maksimalitas hasil isolat DNA murni ditambahkan fenol, isoamil alkohol dan kloroform. Setelah dilakukan ekstraksi, maka dilakukan presipitasi DNA menggunakan etanol absolut atau isopropanol. Selain DNA, etanol dingin mengakibatkan semua bahan ikut larut kedalam, sehingga ketika proses sentrifugasi, maka DNA akan memisah dan mengendap dari bagian senyawa lain. Untuk melakukan analisis lanjutan seperti proses PCR, kloning, skuensing, maka DNA harus bersih dari kontaminasi dan memiliki kemurniaan tinggi dengaan nilai berat molekut yang tinggi pula (Fatchiyah *et al*., 2011).

Proses selanjutnya yaitu pemisahan DNA dari komponen sel lain atau kontaminan yang tidak diinginkan termasuk debris sel dengan cara sentrifugasi. Kontaminan yang ditemukan didominasi oleh polisakarida yang dapat mengganggu proses selaanjutnya yaitu PCR, dimana

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

aktivitas *Taq* polimerase jadi terhambat atau kontaminan lain seperti polifenol berbentuk oksidasi yang akan megikat DNA secara kovalen (Fatchiyah *et al*., 2011).

2.3.2. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan suatu teknik penggandaan potongan DNA secra *in vitro* pad daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Primer sebagai pembatas daerah penggandaan adalah DNA untai tunggal yang urutannya komplemen dengan template DNA. Tanpa memasukkan primer kedalam sel (*in vivo*), PCR kemungkinan terjadi perbanyakan DNA antara kedua primer hanya dalam tabung reaksi. Proses PCR membutuhkan DNA *doublehelix* berfungsi sebagai *template* yang mengandung DNA target (yang akan di amplifikasi) untuk pembentukan molekul DNA baru, enzim DNA polimerase, deoksinukleosida trifosfat (dNTP) dan sepasang primer oligonukleotida (Zein dan Dewi, 2013).

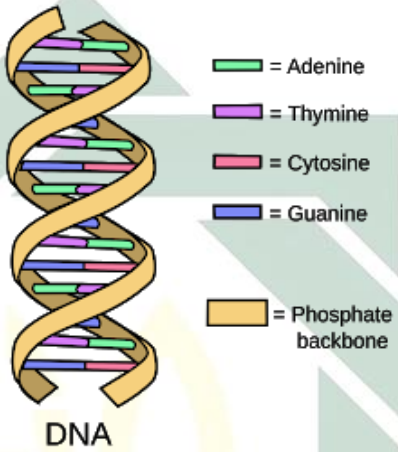
Gambar 2.10. *Termocycler machine* PCR
Sumber : Dok. Pribadi, 2019

Pada kondisi tertentu, kedua primer akan mengenali dan berikatan dengaan untaian DNA komplemennya yang terletak pada awal dan akhir fragmen DNA target, sehingga kedua primer tersebut akan menyediakan gugus hidroksil bebas pada karbon 3’. Setelah kedua primer menempel pada *template* DNA, DNA polimerase mengkatalis proses pemanjangan kedua primer dengan menambahkan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

oligonukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida *template*. DNA polimerase hanya akan menambahkan dNTP yang komplemen dengan nukleotida yang terdapat pada rantai DNA *template* (Zein dan Dewi, 2013).

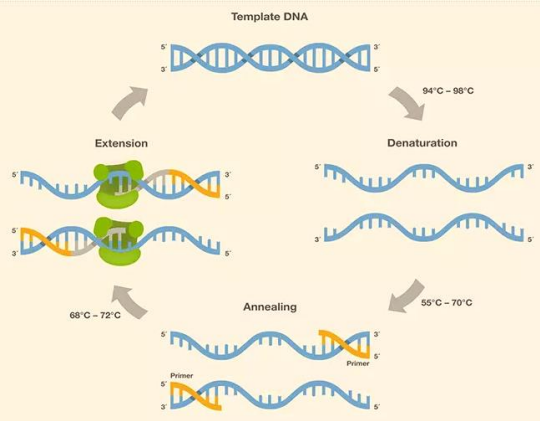
DNA merupakan makromolekul polinukleotida yang tersusun atas polimer nukleotida yang berulaang-ulang, tersusun rangkap, membentuk DNA heliks ganda dan berpilin ganda.



Gambar 2.11. Susunan DNA
Sumber : Kualita, 2017

Setiap nukleotida terdiri dari tiga gugus molekul, antara lain : gugus 5 karbon (2-deoksiribosa), gugus fosfat serta basa nitrogen yang terdiri dari golongan Purin yaitu Adenin = A dan Guanin = G, serta golongan pirimidin, yaitu sitosisn = S dan timin = T. DNA selalu dalam bentuk utas ganda yang saling berpasangan atau komplemen, yaitu Adenin = A berpasangan dengan Timin = D, Guanin berpasangan dengan sitosi (Zein dan Dewi, 2013).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 2.12. Amplifikasi DNA siklus PCR
Sumber : Ding, 2019

2.3.3. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu proses pergerakan molekul bermuatan listrik. Molekul bermuatan bergerak dari kutub negatif (-) menuju kutub positif (+) dengan kecepatan pergerakan molekul tergantung bentuk, muatan dan ukuran. Oleh karena itu, elektroforesis dapat digunakan untuk memisahkan makromolekul (asam nukleat dan protein). Posisi molekul yang memisah pada gel dapat terdeteksi dengaan pewarna atau autoradiografi,atau dapat dilakukan kuantifikasi dengan densitometer (Fatchiyah *et al*., 2011). Teknik elektroforesis menggunakan medium yang terbuat dari listrik (Zein dan Dewi, 2013). Protein memiliki gugus amino positif dan gugus karboksil aktif yang merupakan molekul amfoter. Sehingga protein dapat mengion, baik pada pH asam maupun pH basa. Protein bersifat sebagai kation (bermuatan negatif) akan bergerak menuju katoda (bermuatan negatif) saat kondisi pH rendah. Nilai diantara kedua pH tersebut dinamakan titik isoelektrik (*isoelectric point* atau *pI*). Titik isoelektrik adalah nilai pH saat kondisi protein tidak bermuatan. Pada pH demikian, proteolisis menghasilkan jumlah muatan negatif yang sebanding dengan jumlah muatan positif yang diperoleh dari penangkapan proton. Sedangkan yang tidak bermuatan tidak dapat bergerak pada medan listrik. Sebagian besar protein mempunyai pH ≤ 8,0. Sehingga pH *buffer* elektroforesis

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

antara 8-9 akan menyebabkan protein bermuatan negatif dan akan bergerak ke anoda (Fatchiya *et al*., 2011).

Metode standar untuk identifikasi, pemisahan dan purifikasi fragmen DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa. Menguji kualitatif isolat DNA dapat dilakukan anggapengukuran dengan elektroforesis gel agarosa untuk mengukur kualitas kemurnia DNA/RNA, dimana konsentrasi gel agarosa digunakan berbanding tebalikdengan panjang pendeknya pita DNA. Semakin pendek urutan basa DNA maka konsentraasi gel semakin tinggi. Migrasi elektroforesis tersebut dipengaruhi konfirmasi molekul DNA dan faktor ukururan, konsentrsi agarosa, suhu dan arus listrik. Alat identifikasi yang digunakan adalah pewarna etidium bromida (EtBr) untuk mengukur semikualitatif fragmen DNA yang terpisah dalam gel. Untai ganda DNA akan mengikat EtBr yang mengandung zat fluoresen, sehingga pita DNA pada gel agarosa akan berpendar. Ikatan antara DNA dan EtBr dapat terlihat hanya dengaan sinar UV level medium, dengaan panjang gelombang λ sekitar 300 nm (Fatchiyah *et al*., 2011).

Pada mulanya teknik ini menggunakan media cair, akan tetapi tidak dapat memisahkan DNA, karena faktor yang dominan mempengaruhi laju pergerakan di dalam cairan adalah bentuk dari sebuah molekul dan muatan listrik itu sendiri. Kebanyakan molekul DNA memiliki bentuk yang *linier* dan meskipun muatan molekul DNA tergantung pada panjangnya akan tetapi perbedaan dalam muatan tidak dapat memisahkan secara efektif di dalam sebuah cairan. Sehingga diperlukan media berupa gel untuk memisahkan molekul DNA dengan laju perpindahan yang lebih ditentukan panjang molekulnya (Zein dan Dewi, 2013).

Staining gel merupakan suatu zat kimia yang digunakan pada proses elektroforesis yang dikenal dengan Elektroforesis Gel Agarosa (*Agarosa Gel Electrophoresis/ AGE*) dengan visualisasi menggunakan *ethidium bromide*, dan Elektroforesis Gel Polyacrilamide (*Polyacrilamide Gel Electrophoresis/ PAGE*) dengan visualisasi

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

menggunakan *silver staining.* Kedua cara elektroforesis ini banyak digunakan dalam visualisasi produk ekstraksi DNA, produk PCR, atau pemotongan enzim (Sulandari dan Zein, 2012). Alat elektroforesis merunut prinsipnya dibagia menjadi dua, yaitu elektroforesis horizontal dan elektroforesis vertikal.

Gambar 2.13. Alat Elektroforesis Horizontal
Sumber : Dok. Pribadi, 2019

Melalui matriks gel, molekul DNA dilewatkan dengan aliran listrik sehingga akan trepisah sesuai berdasarkan ukuran. DNA mempunyai muatan negatif, jika pada aliran listrik akan mengalami migrasi menuju kutub positif melalui gel. Migrasi lambat dialami molekul yang berukuran besar karena kesulitan melewati pori-pori, berbeda dengan DNA berukuran lebih kecil. Fragmen DNA yang lebih kecil berat molekulnya akan berjalan lebih cepat dari molekul DNA yang lebih besar, sehingga molekul yang mempunyai panjang berbeda akan membentuk pita dalam gel. Semakin besar tegangan arus listrik, perpindahan molekul DNA akan semakin cepat dan semakin kecil tegangan arus listrik, perpindahan molekul DNA akan melambat (Zein dan Dewi, 2013).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah observasional deskriptif kualitatif dengan menyajikan data kualitatif dari hasil data yang telah dikumpulkan dan dianalisis. Melakukan uji observasional lapangan di laboratorium untuk mengetahui keragaman genetik. Penelitian ini menggunakan sampel daun maja dari Kabupaten dan Kota Mojokerto.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 13 bulan yaitu pada bulan Agustus 2019 sampai Agustus 2020. Sampel buah maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr) diambil dari 15 kecamatan yang berada di Kabupaten dan Kota Mojokerto. Isolasi DNA dan analisis dilakukan di Laboratorium *Genetics and Tissue Culture*, Laboratorium Integrasi, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabya.

Tabel 3.1. *Grand Chart* jadwal pelaksanaan penelitian

No	Kegiatan	Bulan												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	Pengajuan judul													
2	Penyusunan proposal penelitian													
3	Seminar proposal													
4	Penelitian di Lapangan													
2	Penelitian di Laboratorium													
8	Analisis data													
9	Penyusunan skripsi													
10	Seminar hasil penelitian													

3.3. Alat dan Bahan Penelitian

Alat pengambilan sampel daun maja menggunakan galah, jaring dan plastik ukuran ½ kg. Alat-alat yang digunakan untuk karakterisasi molekular adalah masker, gloves, minitube, mortar dan alu, mikropipet (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl), *white* tip, *yellow* tip, *blue* tip, erlenmeyer, gelas ukur, *waterbath*, *sentrifuge machine*, spektrofotometer Biodrop, *thermocycler* PCR

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

machine, mikrotube 1,5 ml, vortex, tissue, spin colomn, *gel documentation* dengan UV transluminator BioRad, *freezer*, dan kamera.

Sampel yang diteliti adalah daun maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr) diambil dari 15 kecamatan di Kota Mojokerto sebanyak 10 helai daun maja per kecamatan. Proses isolasi DNA dalam penelitian ini menggunakan KIT Thermo scientific. Bahan-bahan yang diperlukan adalah akuades, alkohol 70%, 350 µl Lysis Buffer A, 50 µl Lysis Buffer B, 20 Lysis Bufferl RNAse, 130 µl Presipitation Solution, 400 µl Plant gDNA Binding Solution, 400 µl etanol 96%, 500 µl wash Buffer, 100 µl Elution Buffer, agarosa, master mix 6,5 µl, *Nucleic Free Water* 3,5 µl, dan primer OPA 01-10 denga urutan sekuens sebagai berikut (Paramar *et al.*, 2015) :

Tabel 3.2 Urutan sekuens primer OPA 1-10

Primer	Sekuens	Panjang Nukleotida	GC %	Panjang Primer
OPA-01	5' CAGGCCCTTC-3'	10-mer	70 %	1500 bp
OPA-02	5' TGCCGAGCTG-3'	10-mer	70 %	(Paramar *et al.*,
OPA-03	5' AGTCAGCCAC-3'	10-mer	60 %	2015)
OPA-04	5' AATCGGGCTG-3'	10-mer	60 %	
OPA-05	5' AGGGGTCTTG-3'	10-mer	60 %	
OPA-06	5' GGTCCCTGAC-3'	10-mer	70 %	
OPA-07	5' CAATCGCCGT-3'	10-mer	60%	
OPA-09	5' GGGTAACGCC-3'	10-mer	70 %	
OPA-10	5' GTGATCGCAG-3'	10-mer	60 %	

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengumpulan sampel

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah *purposive sampling* yaitu dengan pengambilan daun maja (*Aegle marm/elos* (L.) Corr) di masing-masing kecamatan yang berada di Kabupaten/Kota Mojokerto. Daun maja yang masih segar diambil sebanyak 4-5 helai dari tumbuhannya. Daun yang telah di ambil dimasukkan ke plastik ditutup hingga rapat dan diberi label. Pengambilan dilakukan hanya satu pohon pada satu kawasan untuk mewakili satu kecamatan tersebut sehingga total sampel sama dengan jumlah kecamatan yang didatangi. Adapun lokasi kecamatan yang digunakan sampling adalah sebagai berikut :

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Gambar 3.1 Peta Kota/Kabupaten Mojokerto untuk sampling
Sumber : Iskandar, 2018

Keterangan :
1. Kecamatan Dawarblandong
2. Kecamatan Kemlagi
3. Kecamatan Jatis
4. Kecamatan Magersari
5. Kecamatan Prajurit Kulon
6. Kecamatan Sooko
7. Kecamatan Trowulan
8. Kecamatan Puri
9. Kecamatan Bangsal
10. Kecamatan Dlanggu
11. Kecamatan Kutorejo
12. Kecamatan Mojosari
13. Kecamatan Pungging
14. Kecamatan Pacet
15. Kecamatan Jatirejo

: Peta Kota Mojokerto
: Peta Kabupaten Mojokerto

3.4.2. Isolasi DNA

Sampel yang digunakan untuk analisis DNA adalah jaringan yang diambil dari 15 individu buah maja. Jaringan yang digunakan adalah bagian daun. DNA genomik total diisolasi dengan prosedur kerja sebagai berikut dengan menggunakan prosedur KIT isolasi DNA Promega :

Preparasi Jaringan

1. Sampel daun maja ditimbang sebanyak 40 mg.
2. Kemudian dihaluskan dengan ditambahkan ddH_2O 200 µl dan dimasukkan ke mini tube
3. Ditambahkan *Nucleic Lysis Solution* 600 µl.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Lisis dan Presipitasi Protein

1. Inkubasi pada suhu 65°C selama 15 *min*.
2. *RNAse solution* sebanyak 3 µl ditambahkan ke mini tube.
3. Inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 15 *min*.
4. Sampel didinginkan pada suhu ruang selama 5 *min*.
5. Ditambahkan *Protein Precipitation Solution* sebanyak 200 µl.
6. Vortex homogen selama 10 *sec.*
7. Sentrifuge dengan *speed* 13.000 – 16.000 *x* g *x* 3 *min*.

Pengendapan Protein dan DNA Rehydration

1. Dipindahkan supernatan pada tabung baru yang telah berisi isopropanol suhu ruang sebanyak 500 µl.
2. Diinversi.
3. Sentrifuge dengan *speed* 13.000 – 16.000 *x* g *x* 1 *min*.
4. Supernatan dibuang, dan ditambahkan *Ethanol* 70% suhu ruang sebanyak 500 µl.
5. Sentrifuge dengan *speed* 13.000 – 16.000 *x* g *x* 1 *min*.
6. *Ethanol* dibuang dan dikering anginkan beberapa saat.
7. Ditambahkan DNA Rehydration Solution sebanyak 100 µl.
8. Rehidrasi pada suhu 65°C selama 1 jam.

3.4.3. Spektrofotometri

DNA dari tiap sampel yang dianalisis menghasilkan konsentrasi dan memiliki kemurnian. Konsentrasi genom hasil isolasi diukur menggunakan Spektrofotometer Biodrop dengaan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Sampel DNA yang telah diisolasi akan di spektrofotometri. Langkah untuk mengukur konsentrasi DNA adalah sebagai berikut :

1. Larutan ddH_2O ditambahkan 3 µl pada lubang spektrofotometer.
2. Tekan tombol *measure*, saat konsentrasi terlihat pada angka 0 maka selanjutnya dibersihkan tetesan ddH_2O dengan tissue.
3. Hasil isolasi DNA diteteskan 3 µl pada lubang spektrofotometer

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

4. Tekan tombol *measure* hingga keluar konsentrasi kemurnian isolat DNA.

3.4.4. Amplifikasi dan visualisasi DNA

Proses amplifikasi RAPD dilakukan dengan volume total campuran reaksi PCR sebanyak 25 µl yang masing-masing terdiri dari campuran : (Abdul *et al*., 2009).

Tabel 3.3 Komposisi Reaksi PCR

Pereaksi	Volume (µl)
Buffer PCR	2,5 µl
Primer	1 µl
dNTPs	2 µl
Taq DNA Polimerase	2 µl
Air destilasi	16 µl
Total Volume	**35 µl**

Kesesuaian selama proses optimasi kondisi termal PCR tergantung pada konsentrasi masing-masing reagen. Untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi digunakan campuran reaksi PCR DNA templat sebagai kontrol negatif (Destiana *et al*., 2011).

3.4.5. Elektroforesis

Uji kualitas DNA menggunakan gel yang terbuat dengan komposisi melarutkan agarosa sebanyak 1% jumlah total larutan dengan ditambahkan 1x TBE hingga 1000.

1. Ditambahkan *fluorosave* (FS) sebanyak 1 µl saat agarosa masih cair per 20 ml larutan agarosa 1,5% sebagai pewarna.
2. Rendam secara *sub marine* dalam *running buffer* yaitu TAE, pada Gel agarose yang sudah beku, sebanyak dua.
3. Sampel DNA hasil PCR diisikan sebanyak 3 µl pada setiap sumuran dan 1 µl *loading dye* dan disatu sumur lain dimasukkan penanda berat molekul dengan 4 µl DNA *ledder* 1500bp.
4. Dialirkan listrik pada tangki elektroforesis setalah selesai mengisi lubang pada gel.
5. Arus negatif diberikan pada sisi yang berisi hasil amplifikasi.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

6. Dilakukan *Running* selama 30 menit pada voltase 100, bertepatan dengan standart berat molekul dari marker masing-masing pita RAPD yang dihasilkan.

3.5. Analisis Data

Berdasarkan data yang diperoleh, pengolahan data secara deskriptif kualitatif dengan melihat nilai absorbansi DNA panjang gelombang 260/280. Pengamplifikasian primer dilakukan dengan *running* PCR. Penentuan primer teramplifikasi dilakukan secara kualitatif berdasarkan adanya pita pada gel agarosa. Keberhasilan amplifikasi dielektroforesis dengan fase diam agarosa 2% yang telah diwarnai ethidium bromida dan divisualisasi menggunakan sinar UV.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian berjudul Optimasi *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) Pada Karakterisasi molekular Maja (*Aegle Marmelos* (L.) Corr.) di Kabupaten dan Kota Mojokerto dilakukan dalam dua tahap yaitu sampling di lapangan dan analisis molekular di Laboratorium basah. Sampling dilakukan di 15 Kecamatan yang ada di Kabupaten dan Kota Mojokerto. Tujuan dari sampling lapangan ini adalah untuk mendapatkan sampel daun buah maja langsung dari buah maja yang tersebar di wilayah batasan penelitian. Sedangkan analisis molekular bertujuan untuk mendapatkan Keragaman Genetik dari buah maja, yang dilakukan di Laboratorium Terintegrasi UIN Sunan Ampel Surabaya.

4.1. Pengambilan Sampel

Proses pengambilan sampel dilakukan menggunakan metode *purposive sampling*. Menurut Purwanto dan Sulistyastuti (2007), *purposive sampling* merupakan metode pengambilan sampel dengan pentimbangan tertentu yang sesuai dengaan keperluan penelitian. Sampel dalam penelitian ini diambil dari 15 kecamatan yang ada di Kabupaten dan Kota Mojokerto, dimana setiap satu sampel yang diambil mewakili satu lokasi kecamatan. Titik lokasi sampling yang ditemukan adanya pohon maja terlihat dalam tabel 4.1. dibawah ini :

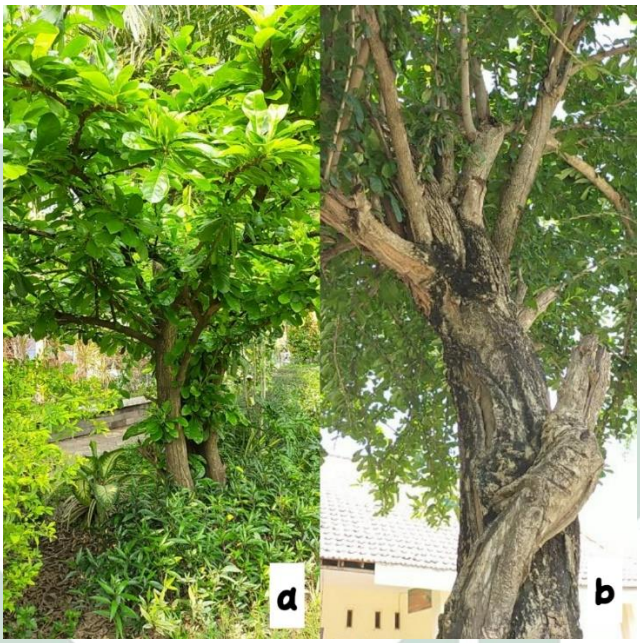
Tabel 4.1. Data lokasi pengambilan sampel daun maja

Kode Sampel	**Lokasi Pengambilan**	***Map Coordinates***	
		Lintang (DMS)	**Bujur (DMS)**
1	Kecamatan Mojosari	7º30'33" S	112º32'21" E
2	Kecamatan Pungging	7º31'30" S	112º35'1" E
3	Kecamatan Pacet	7º36'20" S	112º31'54" E
4	Kecamatan Kutorejo	7º33'13" S	112º31'22" E
5	Kecamatan Trowulan	7º33'38" S	112º22'48" E
6	Kecamatan Dawarblandong	7º18'23" S	112º25'47" E
7	Kecamatan Sooko	7º31'23" S	112º24'51" E
8	Kecamatan Puri	7º32'12" S	112º26'6" E
9	Kecamatan Bangsal	7º35'4" S	112º29'9" E
10	Kecamatan Dlanggu	7º34'24" S	112º28'25" E
11	Kecamatan Jatirejo	7º36'52" S	112º24'50" E
12	Kecamatan Kemlagi	7º23'10" S	112º23'2" E
13	Kecamatan Jetis	7º24'4" S	112º26'26" E
14	Kecamatan Prajurit Kulon	7º28'57" S	112º25'26" E
15	Kecamatan Magersari	7º28'57" S	112º25'26" E

(Dok. Pribadi, 2020)

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Dari wilayah tersebut, semua pohon maja dapat tumbuh pada kondisi tanah yang tidak terlalu basah atau bahkan kering sekalipun. Pohon maja yang memiliki daun lebih rindang, terlihat buahnya berukuran kecil. Sedangkan pohon yang memiliki daun sedikit memiliki buah yang berukuran besar dengan diameter mencapai 60 cm. Sesuai dengan penelitian Rismayani (2013) tanaman ini merupakan tanaman perdu berkayu (lignosus) sangat keras dan tajuk menjulang.



Gambar 4.1. a. Penampang pohon maja tajuk menjulang
b. penampakan batang pohon maja berkayu keras
Sumber : Dok.Pribadi, 2020

Ukuran buah maja jika di diameterkan memiliki nilai yang sangat besar, hal ini sesuai dengan penelitian Fatmawati (2015) menyamai ukuran bola volly. Seperti yang terlihat pada gambar 4.2. buah maja dibawah ini :

Gambar 4.2. Ukuran buah maja di 4 kecamatan
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

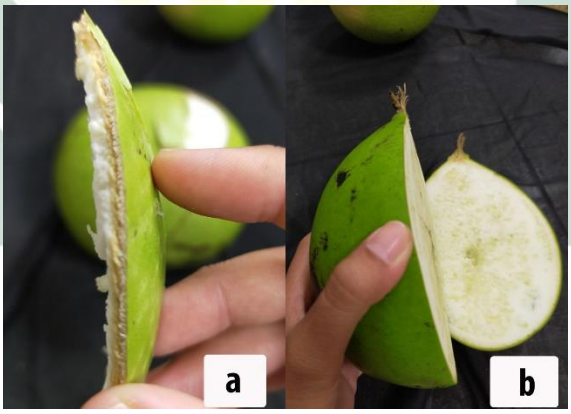
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Gambar 4.2. diatas buah maja di Kecamatan Dlanggu diambil dalam kondisi yang masih muda bertujuan untuk membedakan kekerasan dari termpurung buah dengan buah yang sudah berukuran besar di Kecamatan Pacet. Tempurung terlihat berwarna hijau cerah disertai dengan bercak-bercak kecoklatan di setiap buah. Ketebalan tempurungnya mencapai ½ cm seperti terlihat pada gambar 4.3. Semakin besar buah maja semakin keras tempurungnya dan mengayu sehingga untuk melihat keadaan daging bauh memerlukan benturan keras pada benda padat. Sedangkan saat buah masih keadaan kecil kulit buahnya masih halus dan untuk melihat daging buah hanya memerlukan bantuan pisau untuk mengirisnya. Besar kecil diameter buah maja ini dipengaruhi oleh usia masing-masing buah. Buah *Aegle marmelos* pada gambar 4.1. memiliki diameter yang dijelaskan dalam tabel 4.2. dibawah ini :

Tabel 4.2. Keterangan diameter buah maja

Kecamatan	Diameter
Pacet	60 cm
Jatirejo	52 cm
Mojosari	48 cm
Dlanggu	35 cm

(Dok. Pribadi, 2020)

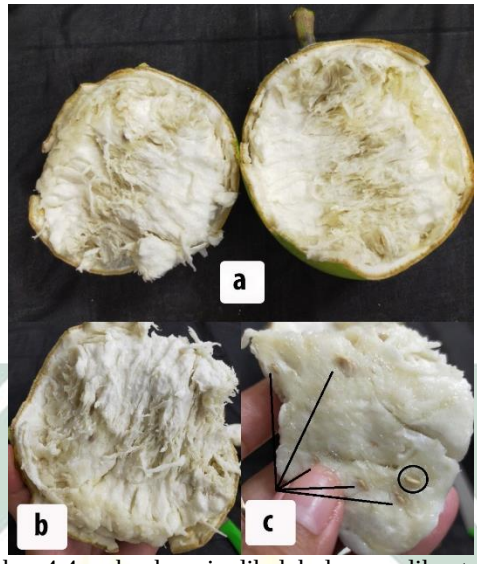


Gambar 4.3. a. Bagian tempurung buah maja yang sudah besar
b. bagian tempurung buah maja yang masih kecil
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

Daging buah maja berwarna putih tulang, biji berwarna kuning kecoklatan kecil-kecil dan tersusun menyebar disetiap sela-sela daging buah seperti pada gambar 4.4. Tekstur buah *Aegle marmelos* ini mirip kapas namun basah saat dipegang. Aroma yang dihasilkan cukup manis untuk dicium, akan tetapi berbanding terbalik dengan rasanya yang sangat pahit saat dicicipi. Perubahan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

daging buah juga dapat terlihat, saat daging buah dibiarkan beberapa saat terkontaminasi udara. Coklat sampai kehitaman. Samakin lama dibiarkan terbuka, maka perubahan akan semakin terlihat.



Gambar 4.4. a. buah maja dibelah dengan dibenturkan
b. daging buah maja seperti kapas
c. biji buah maja tersusun menyebar
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

Pohon Maja (*Aegle marmelos* L.) merupakan spesies yang masuk dalam kategori *Rare, Endangered and Threatened* (RET) di Banglore, India. Artinya pertumbuhan pohon ini sudah langka dan terancam punah (Venudevan dan Srimathi, 2014). Menurut *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) pada data terakhir 2001, *Aegle marmelos* L. memiliki status ancaman yang *Vulnurable* (rentan), dalam kawasan regional. Spesies yang telah dikategorikan dalam **rentan** kemungkinan terancam punah, kecuali dalam keadaan yang mengancam kelangsungan hidup dan reproduksinya meningkat (IUCN, 2009). Di India, keberadaan alami spesies ini terbatas pada daerah tropis yang menerima curah hujan tahunan rata-rata 500-2000 mm.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Gambar 4.5. Buah maja yang berjatuhan dan dibiarkan tanpa perawatan
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

Sementara itu, berdasarkan informasi masyarakat Kabupaten dan Kota Mojokerto, menyatakan bahwa pohon maja sudah sangat susah untuk ditemui. Selain populasinya yang jarang, edukasi mengenai manfaat tanaman maja tidak diketahui oleh masyarakat Mojokerto sehingga membuat tanaman ini tidak terhargai keberadaanya dan pelestariannya juga kurang baik. Seperti memanfaatkan bagian daun sebagai minuman tradisional sharbat, sebagai jus maja yang ditambahkan madu untuk menyembuhkan hipertensi, kulit batang dan akar dapat digunakan sebagai obat nyeri jantung, hingga pemanfaatan sebagai pestisida nabati bagi tanaman yang diserang hama. Hal ini tidak pernah dilakukan oleh masyarakat mojokerto. Fakta tersebut terlihat dari sekitar pohon, terdapat buah maja yang berjatuhan dan dibiarkan hingga membusuk ditempat, bahkan ada yang tersisa hanya bagian kulit Maja yang keras seperti pada gambar 4.5. Tempat yang menanam pohon maja sebagai upaya pelestarian di wilayah tersebut juga memeprlihatkan bahwa tidak ada perawatan khusus ataupun pemanfaatan buah maja sendiri untuk diolah menjadi buah yang lebih bermanfaat. Salah satu warga di Kecamatan Pungging menjelaskan bahwa pohon maja yang ditanam di pekarangan belakang rumahnya, digunakan sebagai pembatas wilayah antara tanah miliknya dengan tanah milik saudaranya.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tidak semua orang dapat mengetahui manfaat buah maja, sehingga jarang kebutuhan sederhana mampu terpenuhi oleh buah ini. Apabila buah maja memiliki rasa manis dan enak seperti buah-buah pada umumnya, maka seluruh makhluk Allah di muka bumi ini memperebutkan untuk bisa menikmati buah maja. Baik manusia maupun binatang. Sehingga orang yang menanam pohon maja dapat berbuat baik melalui manfaat buahnya. Pada kitab Bahreisy (1993) terdapat kumpulan hadist yang menjelaskan hal tersebut, salah satunya berisi makna tentang manfaat menanam tanaman seperti berikut ini:

عَنْ اَنَسِ بْنِ مَا لِكٍ قَالَ : قَالَ رَسُوْلُ اللّٰهِ ﷺ مَا مِنْ مُسْلِمٍ يَغْرِسُ غَرْسًا اَوْ يَزْرَعُ زَرْعًا فَيَأْكُلُ مِنْهُ طَيْرٌ اَوْ اِنْسَانٌ اَوْ بَهِيْمَةٌ اِلاَّ كَانَ لَهُ صَدَقَةٌ ۝

Artinya : *"Dari Annas bin Malik berkata : Rasulullah SAW. bersabda : Tiadalah bagi seorang Muslim yang menanam pohon atau menanam tanaman yang kemudian dimakan burung, manusia atau binatang kecuali baginya termasuk sedekah."* (H.R. Imam Bukhari, No 2321).

Pemanfaatan buah maja yang kurang maksimal oleh masyarakat Mojokerto merupakan hal yang sia-sia, karena Allah SWT. menciptakan seluruh makhluk hidup di bumi dengan segala manfaat didalamnya. Termasuk pada tumbuhan. Seperti yang telah disebutkan di dalam al-Qur'an Surah as-Syu'ara' (26) ayat 7-8 yang berbunyi :

اَوَلَمْ يَرَوْا اِلَى الْاَرْضِ كَمْ اَنْۢبَتْنَا فِيْهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيْمٍ ۝ اِنَّ فِيْ ذٰلِكَ لَاٰيَةً ۗ وَّمَا كَانَ اَكْثَرُهُمْ مُّؤْمِنِيْنَ ۝

Artinya : "*Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam (tumbuhan-tumbuhan) yang baik?. Sungguh, pada demikian itu terdapat tanda (kebesaran Allah), tetapi kebanyakan mereka tidak beriman*."

Adakah mereka akan terus mempertahankan pendustaan dan kekufuran serta tidak mengamati dan merenungi sebagian ciptaan Allah di bumi ini? sebenarnya, jika mereka bersedia mengamati dan merenungi hal tersebut, niscaya pentunjuk akan mereka dapatkan. Kami-lah yang mengeluarkan beraneka ragam tumbuh-tumbuhan dari bumi ini yang mendatangkan manfaat. Dan semua hanya dapat dilakukan oleh Tuhan Yang Maha Esa dan Maha Kuasa (Sihab, 2001).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tuhan semesta alam, Allah SWT. Maha Pemurah yang telah menciptakan tumbuhan, kemudian mencantumkan pelajaran mengenai tumbuhan ini dalam Kitab-Nya. Keajaiban tumbuh-tumbuhan ketika tumbuh adalah sebagai produsen makanan. Pada daur makanan, tumbuhanlah yang dapat menciptakan makanannya sendiri serta makanan untuk makhluk yang lain. Tumbuhan menyusun senyawa anorganik belum bisa mencukupi kebutuhan hewan dan manusia, menjadi senyawa organik seperti karbohidrat, lemak, protein, mineral serta vitamin yang sangat bisa mencukupi kebutuhan makanan manusia dan hewan (Maghfiroh, 2015).

Fungsi sebagai produsen makanan ini tidak bisa dilakukan oleh manusia maupun hewan. Keduanya hanya mengonsumsi tumbuhan, tidak dapat mensintesis senyawa sederhana yang mencukupi kebutuhan energi tubuh dan unsur pembangun untuk tubuh makhluk hidup lain (Maghfiroh, 2015).

Sampel yang diambil adalah bagian daun. Alasan pemilihan organ daun dari tanaman ini karena secara teknik lebih mudah diekstrak dibandingkan organ lainnya seperti akar dan batang. Sedangkan tidak menggunakan bagian buah karena tanaman ini memiliki diameter buah yang relatif besar dan berkulit keras seperti tempurung kelapa. Daun tersebut yaitu daun yang masih muda, terdapat pada daun kedua, ketiga atau keempat dari ujung daun. Ini merupakan daun yang berumur relatif muda dibandingkan daun lainnya. Pemilihan daun muda ini bertujuan untuk mempermudah proses isolasi DNA. Karena daun muda bertekstur lunak sehingga mudah untuk dihaluskan.

Pengambilan daun maja dilakukan secara aseptis. Sampel diambil dan dimasukkan ke dalam plastik yang masih steril. Pemakaian plastik yang steril ini bertujuan untuk mengurangi kontaminasi sampel dengan bakteri dan juga mikroorganisme lain. Kemudian plastik di tutup dengan beberapa kali lipatan dan di berikan kertas label pada plastik bagian luar. Sampel yang telah diambil disimpamn di dalam freezer dan keesokan harinya dibersihkan dengan air mengalir kemudian dikering anginkan diatas tissue untuk meminimalisir kontaminan.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Gambar 4.6. Ujung daun tanaman maja
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

Daun buah maja termasuk daun tidak lengkap dan bertepi rata, karena daun hanya terdiri dari tangkai dan helaian. Bagian ujung daun (Apex Folii) tumpul *obtusus*, artinya tepi daun yang semula masih terlalu jauh dari ibu tulang, cepat ke suatu titik pertemuan hingga membentuk sudut yang tumpul (> dari 90°). Bagian pangkal daun (Basis Folii) runcing *acutus* (Tjitrosoepomo, 2009).

4.2. Isolasi Daun Maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr.)

Analisis daun maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) di laboratorium ini, diawali dengan proses ekstraksi DNA beserta serangkaian proses isolasi DNA. Tujuan dari isolasi ini adalah untuk mendapatkan DNA yang murni (Diredja, 2014). Metode ekstraksi yang digunakan adalah Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega. Dimana metode tersebut dikeluarkan oleh *Promega Corporation* beserta Kit ekstraksinya yang telah teruji hasil isolasi DNA-nya baik secara kuantitas maupun kualitas. Hasil isolasi DNA ini menghasilkan isolat DNA genom berkualitas baik dan berukuran besar.

Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega dirancang untuk isolasi DNA dari darah utuh segar serta jaringan dan sel lainnya. Artinya Kit ini bersifat universal yang dapat digunakan untuk sampel jaringan baik hewan maupun tumbuhan. Sampel yang dapat diterapkan pada kit Promega meliputi : tanaman jaringan daun, sel kultur jaringan mamalia, jaringan hewan, bakteri gram negatif, bakteri gram positif dan *yeast*. Kit ini terdiri dari cukup komponen untuk memurnikan DNA genom berdasarkan protokol yang disediakan, antara lain : *Cell Lysis Solution, Nucleic Lysis Solution, RNAse A*

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Solution, Protein Precipitation Solution, serta *DNA Rehydration Solution* (Promega, 2013).

Prosedur isolasi DNA umumnya menggunakan nitrogen cair saat penggerusan sampel jaringan tanaman. Fungsi dari nitrogen cair ini untuk membekukan jaringan agar lebih mudah dalam proses penggerusan. Akan tetapi penggunaan nitrogen cair tidak banyak mempengaruhi hasil isolasi DNA, sehingga nitrogen cair tidak mutlak digunakan (Ferniah dan Pujiyanto, 2013). Namun penelitian ini melakukan sampel daun maja secara mekanik, yaitu dengan penggerusan sampel menggunakan alu dan mortar serta penambahan ddH_2O sebanyak 200 µl disusul penambahan Nucleic Lysis Solution sebanyak 500 µl ke dalam tube. Permukaan mortar yang cekung dan luas dan terbuat dari porselin dengan permukaan bagian dalam kasar membuat mudah dan lebih dalam penggerusan. Proses tersebut menghasilkan bubur halus sehingga sel lisis dengan baik melalui cara mekanik (Ferniah dan Pujiyanto, 2013).

Isolasi DNA genom merupakan tahap awal dan sangat menentukan dalam bidang genetika molekular suatu spesies. Analisis genom tersebut dilakukan untuk beragam sampel dan setiap sampel dibutuhkan optimasi yang berbeda hingga diperoleh DNA baik berjumlah besar (Ferniah dan Pujiyanto, 2013). Langkah yang tidak mudah untuk dilakukan pada setiap sampel selama isolasi. Menurut Depkes RI (1991), daun buah maja mengandung senyawa tanin dan juga sapoin. Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dengan berat molekul 500-3000. Tanin yang berasal dari leguminosa berbentuk tanin yang terkondensasi (Fahey dan Berger, 1988). Tanin terkondensasi merupakan polimer senyawa flavanoid berikatan dengan karbon cathenic dan gallcothecin (Patra dan Saxena, 2010). Senyawa tersebut dapat menjadi kendala selama isolasi sebagai bahan kontaminan selama proses berlangsung. Terdapat tiga tahap penting dalam ekstraksi DNA yaitu perusakan dinding sel (lisis), memisahkan DNA dari bahan padat seperti protein atau selulosa, dan pemurnian DNA (Surzycki, 2000).

Sampel daun maja digunakan sebanyak 40 mg untuk isolasi. Setelah menghasilkan isolat murni dilakukan uji kuantitatif DNA menggunakan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Biodrop spectrophotometer untuk mengetahui konsentrasi DNA genom hasil isolasi. *Biodrop spectrophotometer* merupakan suatu alat yang digunakan untuk mengukur kemurnian sampel DNA bervolume rendah dengan *pathlenght* 0,5 mm yang artinya tanpa perlu melakukan kalibrasi. Konsentrasi dapat diperoleh dengan cepat menggunakan layar sentuh untuk memilih metode yang sudah diprogam dalam perangkat lunak terpasang. Volume sampel minimum yang dapat dipipet ke port sampel *bulit-in* adalah seanyak 0,5 µl (BioDrop, 2020). Pengukuran awal dilakukan dengan pemberian aquabides (ddH_2O) sebagai blanko, kemudian dibersihkan menggunakan *tissue* setelah bersih dimasukkan sampel DNA hasil isolasi. Kedua larutan tersebut, masing-masing diambil sebanyak 2 µl. Hasil data konsentrasi tiap sampel dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.3. Hasil Konsentrasi DNA daun *Aegle marmelos* L. menggunakan Kit Promega

Kode Sampel	Nama sampel	Konsentrasi (µg/ml)	Å260/Å280
1	Kecamatan Mojosari	4.440	1.858
2	Kecamatan Pungging	2.234	2.061
3	Kecamatan Pacet	5.097	1.795
4	Kecamatan Kutorejo	2.321	1.757
5	Kecamatan Trowulan	1.567	2.043
6	Kecamatan Dawarblandong	5.992	1.938
7	Kecamatan Sooko	4.681	1.814
8	Kecamatan Puri	6.990	1.774
9	Kecamatan Bangsal	5.796	1.732
10	Kecamatan Dlanggu	6.762	1.645
11	Kecamatan Jatirejo	4.957	1.798
12	Kecamatan Kemlagi	1.451	1.932
13	Kecamatan Jetis	3.814	1.648
14	Kecamatan Prajurit Kulon	1.628	1.754
15	Kecamatan Magersari	3.658	2.023

(Dok. Pribadi, 2020)

Tabel tersebut menunjukkan hasil bahwa konsentrasi DNA tertinggi ada pada sampel 8 yaitu 6.990 µg/ml dengan nilai absorbansi Å260/Å280 yaitu 1.774. Sedangkan konsentrasi DNA terendah ada pada sampel 12 yaitu 1.451 µg/ml dengan nilai absorbansi Å260/Å280 yaitu 1.932. Menurut Sambrook dan Russell (1989), menyatakan bahwa kemurnian DNA yang baik mempunyai nilai absorbansi Å260/Å280 sebesar 1.8-2.0. Jika dibandingkan dengan hasil tabel 4.2. rata-rata nilai absorbansi diatas 1.8 yaitu setengah seluruh sampel memiliki kemurnian yang baik, antara lain : sampel 1, sampel 2, sampel 5,

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

sampel 6, sampel 7, sampel 12 dan sampel 15. Sedangkan menurut Mulando (2010), hal ini terjadi karena penyerapan cahaya UV terjadi oleh pita DNA pada panjang gelombang 260 nm dan protein maupun senyawa lain yang merupakan kontaminan akan menyerap cahaya pada gelombang 280 nm.sehingga kemurnian isolat DNA dapat diukur dari perbandingan nilai antara absorbansi panjang gelombang 260 nm dan panjang gelombang 280 nm.

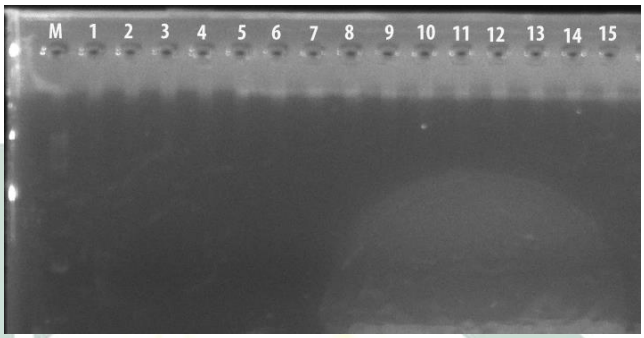
Kerena perbedaan wilayah pengambilan sampel daun maja, membuat hasil konsentrasi isolat DNA juga bervariasi. Akan tetapi ada hal lain yang mempengaruhi tinggi rendahnya konsentrasi DNA. Menurut Suhartini (2014) ada beberapa faktor yang mempengaruhi konsentrasi DNA yaitu *Pertama*, suhu inkubasi. Suhu inkubasi yang terlalu tinggi dapat merusak DNA, sedangkan apabila suhu terlalu rendah maka membran sel dan jaringannya tidak dapat hancur. *Kedua*, lama waktu inkubasi. Lama waktu yang diperlukan inkubasi juga menentukan hasil konsentrasi isolat DNA, karena apabila waktu inkubasi terlalu lama dapat merusak DNA dan apabila terlalu sebentar tidak dapat menghancurkan membran atau jaringan lainnya. Larutan *lysis buffer* yang dicampurkan pada sampel berfungsi sebagai penghancur jaringan dan membran sel bekerja optimal pada suhu yang tidak terlalu rendah. Pada penelitian ini suhu inkubasi yang digunakan adalah 65°C. Sedangkan menurut Ernawati (2009), faktor-faktor yang mempengaruhi kemurnian DNA adalah jenis bahan kimia berupa (fenol, PVP/Polivinilpirolidon dan NaCl), konsentrasi bahan kimia, serta perlakuan kondisi dingin untuk mencegah bekerjanya enzim restriksi endonuklease.

4.3. Visualisasi PCR dengan *Gel Documentation*

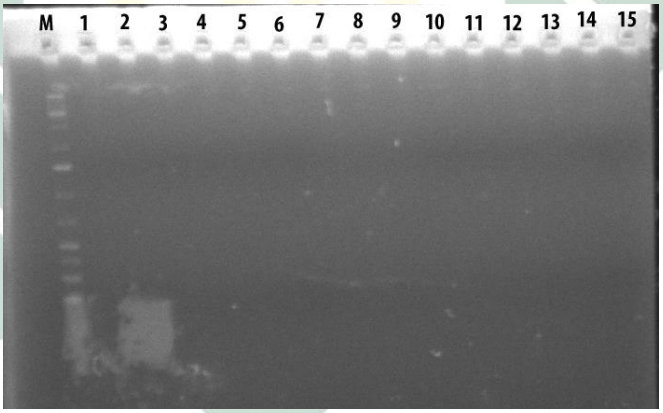
Primer PCR-RAPD Hasil purifikasi DNA total di imigrasikan dengan gel agarose 2%. Gel agarose 2 gram dilarutkan dalam 100 mL *buffer* TAE pengenceran 1x. Gel diwarna dengan pewarna Diamond dan Peq Green sebanyak 2 µL. Penggunaan kedua warna tersebut adalah untuk perbandingan hasil visualisasi. Sampel dituangkan pada sumuran 3 µL DNA isolat ditambah 1 µL *loading dye.*

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Optimasi PCR yang dilakukan pertama kali pada semua sampel yang ada pada tabel 4.3. menggunakan primer OPA 1-5. Primer diencerkan menggunakan *buffer* TAE dengan perbandingan 1:10 µL. Pemakaian primer ini untuk mendapatkan penempelan hasil band pada sampel. Ketentuan penyusunan primer adalah primer disusun dari urutan oligonukleotida sepanjang 15-32 bp pada ujung-5' pita DNA cetakan maupun komplemennya (Fatchiyah, dkk., 2011).

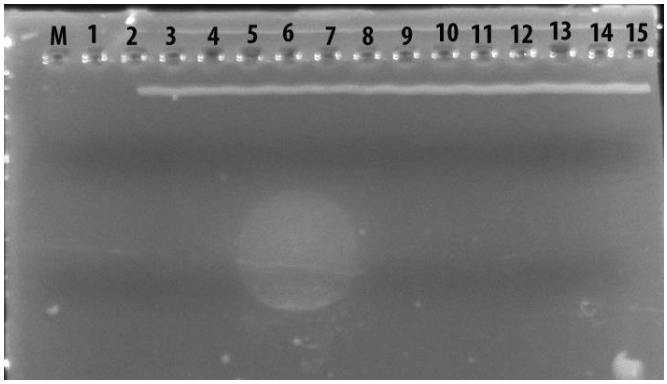


Gambar 4.7. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 1 optimasi suhu Annealing 35ºC
Sumber : Dok. Pribadi

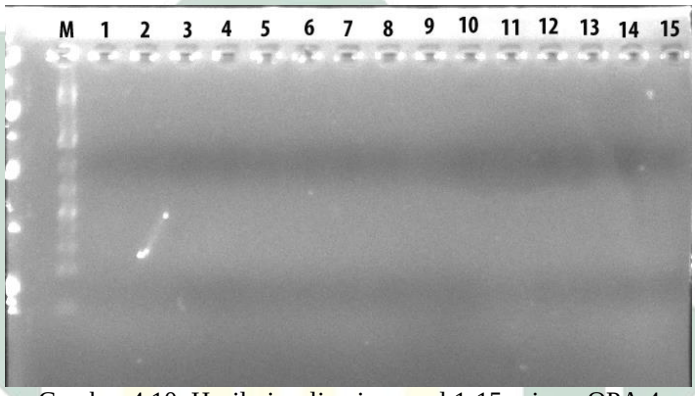


Gambar 4.8. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 2 optimasi suhu Annealing 35ºC
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

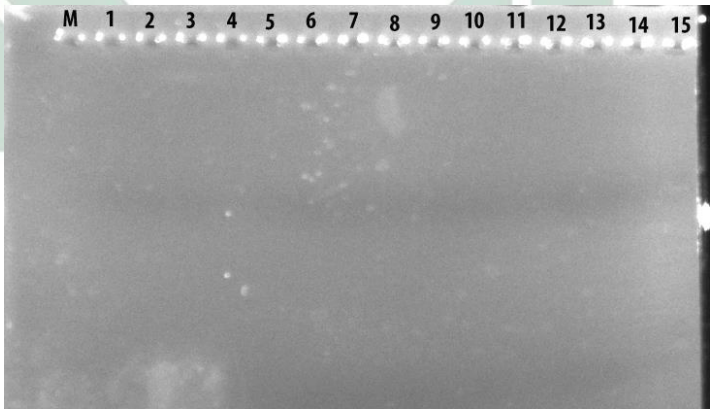
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 4.9. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 3 optimasi suhu Annealing 40ºC
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.10. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 4 optimasi suhu Annealing 40ºC
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.11. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 5 optimasi suhu Annealing 45ºC
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

Visualisasi sampel dilakukan trial pertama kali menggunakan primer OPA 1-5 saja, karena mencari kecocokan optimasi anatara primer san sampel. Akan tetapi tidak langsung mendapatkan band sampel yang diinginkan. Seperti terlihat pada gambar 4.7. menggunakan *gel*

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

documentation ini di *running* dengan elektroforesis selama 60 menit 100 volt. Sampel tidak terlihat adanya warna sisa pada gel akhir sebelum di UV, sehingga band terlihat *semear* seperti tampak pada gambar 4.7. Pada gambar 4.8. di *running* elektroforesis selama 50 menit 100 volt. Band marker lebih terlihat jelas, akan tetapi kondisi miring. Sedangkan band pada sampel lain dengan primer OPA 2 tidak terlihat sama sekali.

Hasil visualisasi pada gambar 4.9. dan gambar 4.10. di*running* elektroforesis selama 50 menit 100 volt. Gambar 4.9. tidak tampak satupun band baik dari marker ataupun dari seluruh sampel dengan primer OPA 3. Sedangkan hasil gambar 4.10. bagian marker terlihat band *smear* akan tetapi nihil pada seluruh sampel dengan primer OPA 4. Gambar 4.11. di *running* elektroforesis selama 45 menit 100 volt dan tampak hasil bahwa band pada marker maupun sampel dengan primer OPA 5 tidak ada yang terllihat. Dari kelima gambar (Gambar 4.7 – Gambar 4.11) tidak satupun mendaapatkan hasil band pada sampel. Ketidak munculan band-band pada seluruh sampel menyebabkan tidak dapat mengukur fragmen DNA. Hal ini terjadi karena primer belum mendapatkan kecocokan dengan sampel jaringan daun. menurut Azizah (2009), penyebab hasil yang kurang baik pada amplifikasi bisa karena ketidaksesuaian primer, optimasi PCR atau efisiensi. Primer yang tidak sesuai dapat menyebabkan tidak adanya daerah genom yang teramplifikasi atau teramplifikasinya genom pada daerah lain yang tidak dijadikan titik sasaran.

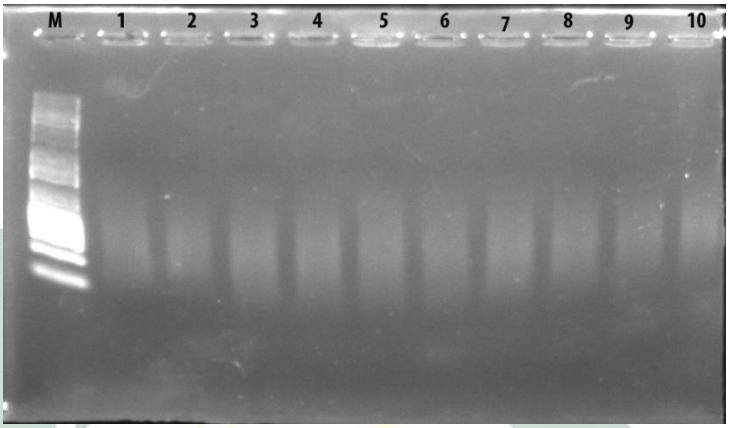
Percobaan selanjutnya menggunakan protokol progam PCR menurut penelitian yang sudah memiliki hasil terbaik. Salah satunya dalam penelitian Paramar (2015), dimana teknik molekular RAPD dan primer OPA digunakan, dengan sampel tanah yang menghasilkan bakteri pengurai *chloropyrifos.* Penelitian ini menyatakan bahwa total band DNA polimorfik yang teramplifikasi sebanyak 14 primer RAPD. Jumlah tertinggi adalah 13 band dari primer OPA 1, sedangkan jumlah terendah adalah 4 band dari primer OPA 3. Dari hasil tersebut, penelitian ini mencoba menggunakan *setting* suhu PCR sesuai dengan Paramar (2015).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

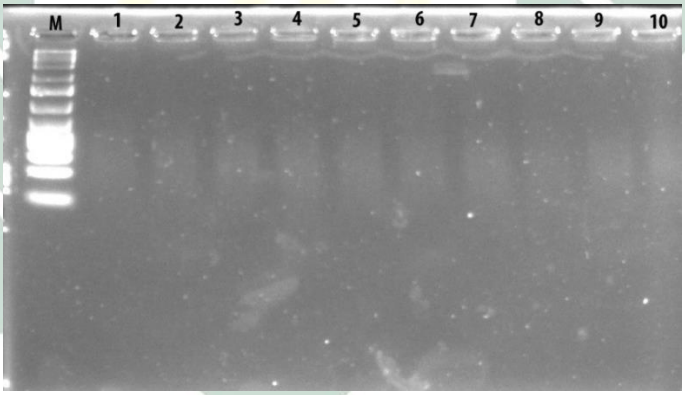
Tabel 4.4. Progam PCR

Progam	Suhu	Time
Pre Denaturation	94ºC	5 minutes
Denaturation	94ºC	1 minutes
Annealing	36ºC	1,5 minutes
Extention	72 ºC	2 minutes
Post Extention	72 ºC	7 minutes

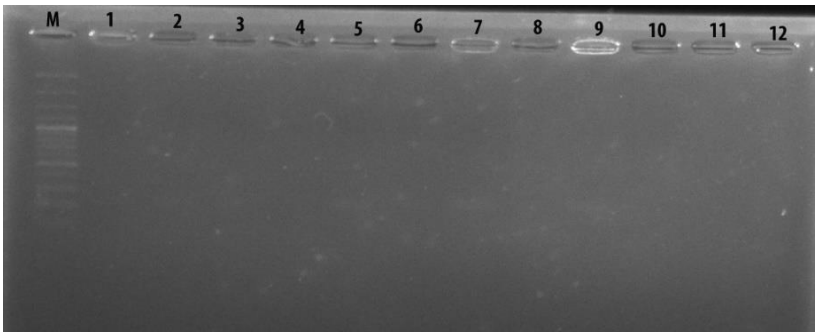
(Paramar, 2015)



Gambar 4.12. Hasil visualisasi sampel 1 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.4.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.13. Hasil visualisasi sampel 7 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.4.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.14. Hasil visualisasi elektroforesis sampel 1-12 tanpa primer
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Gambar 4.12 dan gambar 4.13. merupakan hasil visualisasi *running* elektroforesis progam PCR sesuai tabel 4.7. Percobaan awal memilih menggunakan sampel 1 dengan primer OPA 1-10 karena sampel 1 memiliki tingkat kemurnian 1,8 serta dapat terlihat perbedaan di semua jenis primer yang digunakan dalam satu sampel. Seluruh sampel di *running* selama 20 menit 25 volt ditambah 20 menit 50 volt. Seperti terlihat pada gambar 4.12. bahwa hasil seluruh band *smear* dan band marker miring. Kemudian pada percobaan kedua kalinya mengulang dengan optimasi yang sama, yaitu pada tabel 4.4. menggunakan sampel 7 primer OPA 1-10.

Penggunaan sampel 7 karena memiliki nilai absorbansi Å260/Å280 yaitu 1,8. Seluruh sampel di *running* selama 30 menit 25 volt ditambah 20 menit 25 volt. Hal ini diharapkan dapat memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan *running* sebelumnya. Akan tetapi, hasil yang didaptkan seperti terlihat pada gambar 4.13. bahwa marker terlihat lebih jelas daripada hasil sebelumnyadan pada sampel terlihat lebih samar. Sangat berbeda dengan penelitian Paramar (2015), yang menghasilkan band lebih banyak di setiap sampel, pada visualisasi ini semua primer bandnya smear.

Karena dengan menggunakan metode sebelumnya tidak didapatkan sama sekali, maka perlu dilakukan optimasi lain dengan cara *running* pada genom sampel daun 1-12 yang telah diisolasi, tanpa di PCR dan tanpa penambahan primer. Tujuan dari trial ini adalah melihat adanya fragmen DNA pada masing-masing sampel tanpa adanya ikatan dengan primer. Sampel sebanyak 3 µL dicampurkan dengan 1 µL *loading dye.* Sampel jaringan di *running* sebanyak tiga kali ulangan, karena dirasa pergerakan molekul ke kutub positif kurang maksimal 1) 50 volt 30 *min*, 2) 50 volt 20 *min*, dan 3) 25 volt 10 *min.* Hasilnya terlihat seperti pada gambar 4.13. bahwa hanya tampak marker yang lebih jelas dibandingkan hasil running sebelum-sebelumnya akan tetapi band DNA pada sampel tidak ada yang terlihat sama sekali.

Optimasi yang dipilih dan sudah dilakukan hasilnya kurang maksimal, maka percobaan selanjutnya menggunakan optimasi sesuai

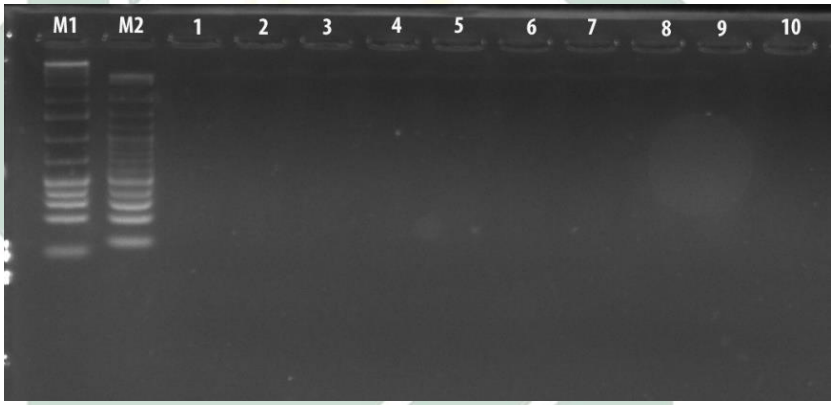
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

protokol pada penelitian Wahyuningsih (2019) yang terdapat pada tabel 4.5. dimana dalam penelitian yang dilakukan pada pohon pisang menggunakan daun sebagai sampelnya. Hasil tersebut membuktikan bahwa dari 10 primer OPA terdapat primer yang mampu menghasilkan pita polimorfik DNA kultivar pisang sebanyak 8 primer. Sedangkan primer OPA5 dan OPA6 merupakan 2 primer lain yang tidak menghasilkan pita DNA. Kisaran panjang pita yang dihasilkan antara ± 200 bp - ± 500 bp.

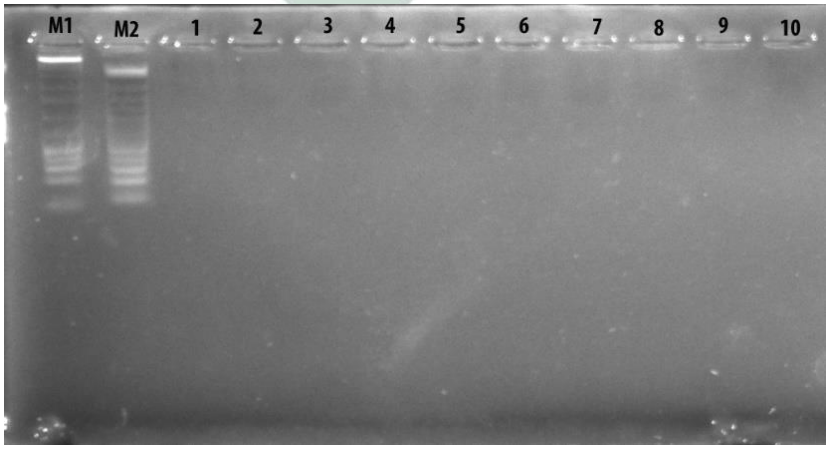
Tabel 4.5. Progam PCR

Progam	**Suhu**	**Time**
Pre Denaturation	94ºC	5 minutes
Denaturation	94ºC	1 minutes
Annealing	41ºC / 46ºC	2 minutes
Extention	72 ºC	2 minutes
Post Extention	72 ºC	7 minutes

(Wahyuningsih, 2019)



Gambar 4.15. Hasil visualisasi sampel 6 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.5.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.16. Hasil visualisasi sampel 12 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.5.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

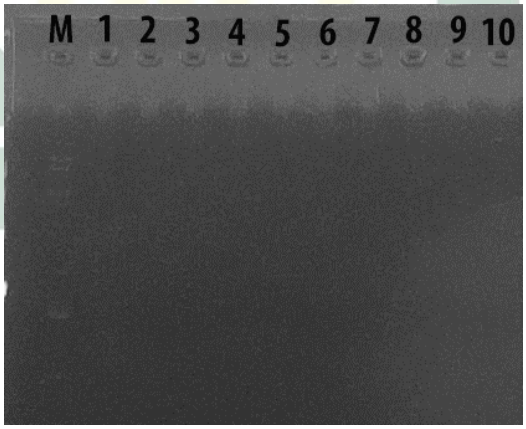
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Sampel yang digunakan dalam optimasi pada tabel 4.5. hanya 2 yaitu sampel 6 (gambar 4.15.) dan 12 (gambar 4.16) karena kemurnian DNA yang bagus dari keseluruhan sampel 1.938 dan 1931. Marker yang digunakan ada dua jenis yaitu **GeneRuler 100 bp Plus** dan **GeneRuler 1 kb Plus**. Kedua sampel ini diberi perlakuan pemberian primer yang berbeda pula. Pada sampel 6 primer hasil pengenceran 1:9 dan sampel 12 primer hasil pengenceran 2:4 atau sesuai dengan pengenceran primer dalam penelitian Wahyuningsih (2020). Kedua sampel di*running* bersamaan selama 100 volt 60 *min.* Akan tetapi keduanya memiliki hasil yang berbeda dengan penelitian Wahyuningsih (2020), visualisasi sampel dan primer ini tidak memunculkan pita polimorfik sama sekali. Hanya bagian marker saja yang tampak lebih jelas.

Tabel 4.6. Progam PCR

Progam	Suhu	Time
Pre Denaturation	95ºC	10 minutes
Denaturation	95ºC	2 minutes
Annealing	55ºC	1 minutes
Extention	72 ºC	1 minutes
Post Extention	72 ºC	5 minutes

(Rokhim, 2017)



Gambar 4.17. Hasil visualisasi sampel 5 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.6.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

Kembali dilakukan amplifikasi pada PCR-RAPD dengan progam PCR yang berbeda, untuk mendapatkan hasil band yang diharapkan dan lebih bagus. Kali ini digunakan prosedus sesuai penelitian Rokhim (2017) (tabel 4.6.) menggunakan sampel 5 yang sebelumnya telah diisolasi menggunakan KIT promega. Amplifikasi ini dilakukan selama 30 siklus

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

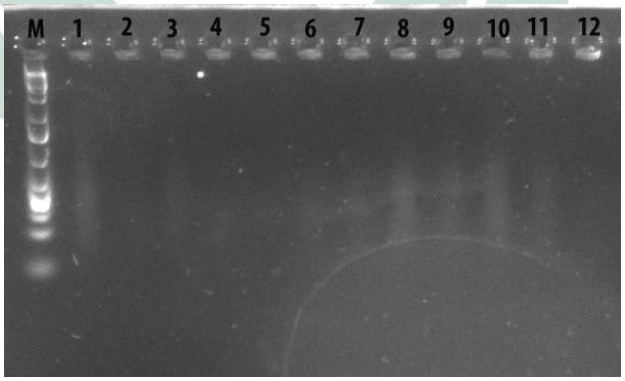
atau Kemudian di*running electrophoresis* selama 100 volt 75 *min.* Seperti terlihat pada gambar 4.17. bahwa hasil visualisasi *gel documentation* tidak ada band. Band pada marker juga tidaak terlalu tampak jika dibandingkan dengaan optimasi suhu sebelum-sebelumnya.

Setiap primer pasti memiliki Tm (*Melting temperature*), merupakan 50% temperaturnya memisahkan untai ganda DNA. Pemilihan suhu *annealing* proses PCR sangat dipengaruhi oleh pemilihan Tm suatu primer. Tm berkaitan dengan panjang primer dan komposisi primer (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Sesuai keterangan tersebut, percobaan dilakukan dengan memisahkan antar primer sesuai suhu Tm-nya masing-masing. Dalam hal ini, peneliti membagi antara Tm 32°C (primer OPA 3, OPA 4, OPA 5, OPA 7, OPA 8, OPA 10) dan 34 ^{o}C (OPA 1, OPA 2, 6, OPA 9). Sehingga *running* mengikuti kesesuian suhu yang seragam dengan progam PCR seperti pada tabel 4.7. optimasi pada suhu Tm 32°C.

Tabel 4.7. Progam PCR

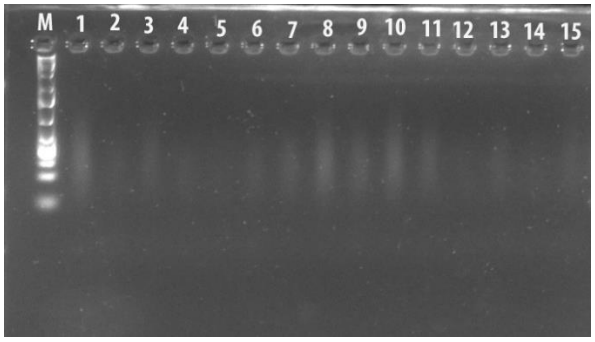
Progam	Suhu	Time
Pre Denaturation	94°C	5 minutes
Denaturation	94°C	1 minutes
Annealing	32°C	2 minutes
Extention	72 ^{o}C	2 minutes
Post Extention	72 ^{o}C	7 minutes

(Dok. Pribadi, 2020)

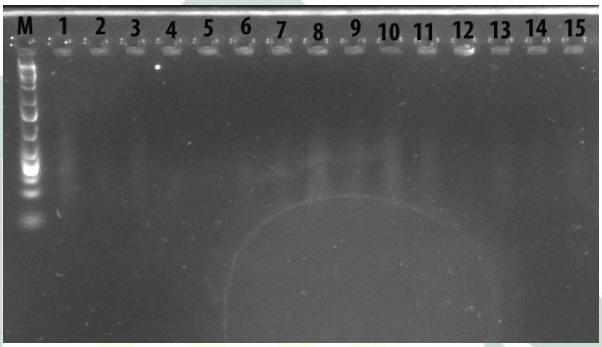


Gambar 4.18. Hasil visualisasi sampel 5 primer OPA 3, OPA 4, OPA 5, OPA 7, OPA 8, dan OPA 10
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

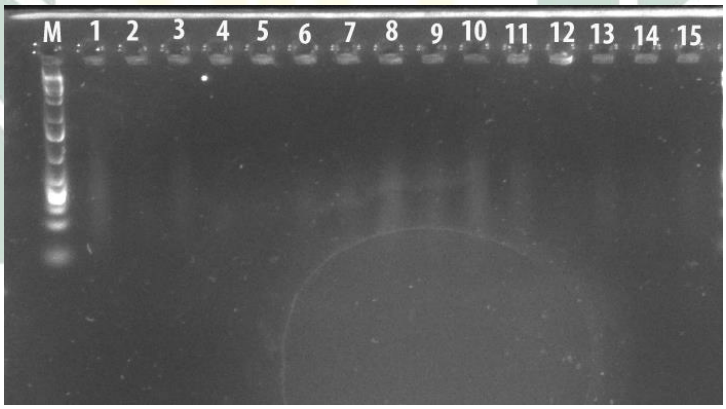
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 4.19. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 3 mastermix promega
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.20. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 4 mastermix promega
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.21. Hasil visualisasi sampel 1-15 primer OPA 5 master mix thermo scientific
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

Sampel yang digunakan untuk amplifikasi ini adalah sampel 5 karena memiliki angka kemurnian 2.043 yang artinya baik. Sampel di *running* menggunakan mastermix *Thermo Scientific*. Hasil visualisasi ini terlihat pada gambar 4.18. Optimasi ini dilakukan pada keenam primer dengan suhu Tm 32°C dengan 2 modifikasi yaitu hasil 1-6 primer pengenceran 1:4 dan hasil 7-12 primer pengenceraan 1:9 (gambar 4.17).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Keseluruhan hasil tidak menampakkan band sama sekali, hanya bagian marker yang terlihat.

Running kedua dilakukan keseluruh sampel primer OPA 3 pengenceran 1:9 menggunakan mastermix Promega. Hasil ini juga masih nihil karena seluruh sampel memunculkan band yang *smear* seperti terlihat pada gambar 4.19. *Running* ketiga dilakukan sama seperti sebelumnya, seluruh sampel yang telah diisolasi menggunakan primer OPA 4 pengenceran 1:9 memakai mastermix *Thermo Scientific*, hasilnya terlihat pada gambar 4.20. bahwa band tidak ada yang teramplifikasi sehingga tidak memunculkan band sama sekali kecuali marker. *Running* keempat dilakukan untuk seluruh sampel yang telah diisolasi menggunakan primer OPA 5 pengenceran 1:9 dengan mastermix *Thermo Scientific*. Hasil tersebut terlihat pada gambar 4.21. dimana seluruh sampel tidak ada yang teramplifikasi oleh primer OPA 5.

Suatu DNA dapat diekstraksi dari sampel yang segar, diawetkan atau sampel kering. Akan tetapi sampel segar sangat disarankan, untuk memperoleh DNA dengan kualitas baik (Semagn,dkk., 2006). Dikhawatirkan band dari genom DNA daun maja (*Aegle marmelos*) tidak muncul-muncul dengan berbagai optimasi yang dilakukan adalah penyebab dari sampel yang diisolasi dalam keadaan kering, sehingga peneliti melakukan sampling ulang pada seluruh sampel dengan harapan mendapatkan hasil yang lebih baik. Perlakun sampel tetap sama dengan sebelumnya, setelah diisolasi dispektrofotometri menggunakan biodrop seperti yang terlihat pada tabel 4.11.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tabel 4.8. Hasil Konsentrasi DNA daun *Aegle marmelos* L. sampling kedua

Kode Sampel	Nama sampel	Konsentrasi (µg/ml)	Å260/Å280
1	Kecamatan Mojosari	1.224	1.817
2	Kecamatan Pungging	3.949	1.881
3	Kecamatan Pacet	2.235	1.886
4	Kecamatan Kutorejo	1.433	1.955
5	Kecamatan Trowulan	2.094	2.005
6	Kecamatan Dawarblandong	-2.852	2.476
7	Kecamatan Sooko	5.462	1.942
8	Kecamatan Puri	2.360	1.873
9	Kecamatan Bangsal	2.241	1.964
10	Kecamatan Dlanggu	0.650	2.167
11	Kecamatan Jatirejo	1.557	2.056
12	Kecamatan Kemlagi	-5.301	1.893
13	Kecamatan Jetis	-6.007	1.883
14	Kecamatan Prajurit Kulon	-6.172	1.886
15	Kecamatan Magersari	-5.535	1.824

(Dok. Pribadi, 2020)

Hasil spektro seluruh sampel pada sampling kedua memiliki nilai konsentrasi yang berbeda dengan sampel-sampel sebelumnya. Konsentrasi paling tinggi pada sampel 7 yaitu 5.462 (µg/ml) dengan nilai absorbansi Å260/Å280 yaitu 1.942, sedangkan konsentrasi paling rendah pada sampel 14 yaitu -6.172 (µg/ml) nilai absorbansi Å260/Å280 yaitu 1.886. Seluruh genom dalam tabel 4.8. diamplifikasi dengan *thermocycler* PCR *setting* suhu annealing yang telah diperhitungkan.

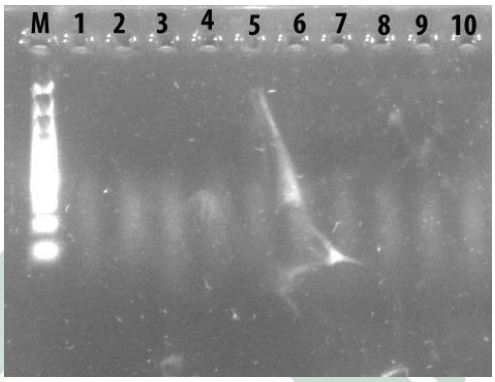
Suhu annealing sangat tergantung pada primer dengan T_m tertentu. Penentuan formula primer ditentukan secara teoritikal oleh T_m asam nukleat (Fatchiyah, dkk., 2011). Sedangkan menurut Handoyo dan Rudiretna (2001), perkiraan primer dapat berikatan dengan DNA template secara stabil merupakan suhu *annealing temperature* (Ta). Apabila suhu *annealing* lebih tinggi dapat mempersulit terjadinya ikatan antara primer dengan DNA template sehingga menghasilkan produk PCR yang kurang efisien. Namun, apabila Ta lebih rendah juga dapat menyebabkan terjadinya primer tidak menempel pada DNA template yang tidak spesifik. Sehingga kesempatan ini digunakan optimasi suhu 33°C.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

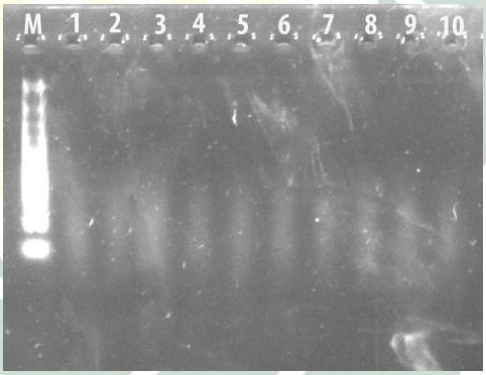
Tabel 4.9. Progam PCR

Progam	Suhu	Time
Pre Denaturation	94ºC	5 minutes
Denaturation	94ºC	1 minutes
Annealing	33ºC	1 minutes
Extention	72 ºC	45 second
Post Extention	72 ºC	7 minutes

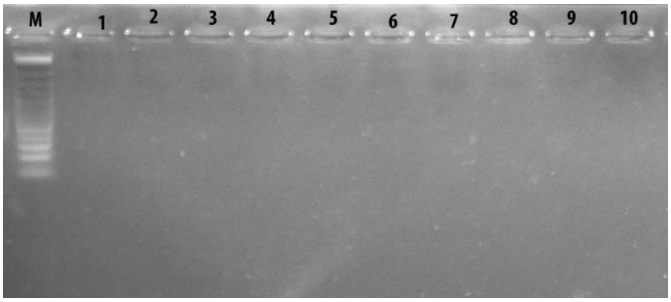
(Dok. Pribadi, 2020)



Gambar 4.22. Hasil visualisasi sampel 6 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.9.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.23. Hasil visualisasi sampel 12 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.9.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.24. Hasil visualisasi sampel 13 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.9.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

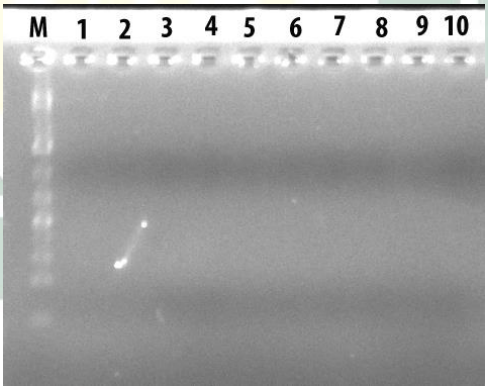
Pemilihan ketiga sampel karena memiliki nilai kemurnian yang bagus dibanding 12 sampel lainnya. Sampel 6 (2.576), sampel 12 (1.892), dan sampel 13 (1.883). Sampel di amplifikasi menggunakan primer OPA 1-6 dan mastermix *hermo scientific* selama 35 siklus. Hasil visualisasi keseluruhan sampel adalah negatif sperti terlihat pada gambar 4.22 s/d gambar 4.24. Hal ini menaandakan tidak adanya band yang mampu berikatan dengaan primer pada tahap *annealing* di suhu 33ºC.

Dilakukan *running* lagi, menggunakan suhu *annealing* sesuai suhu Tm pada primer dengan pengelompokan pada suhu Tm 34ºC sesuai tabel 4.10.

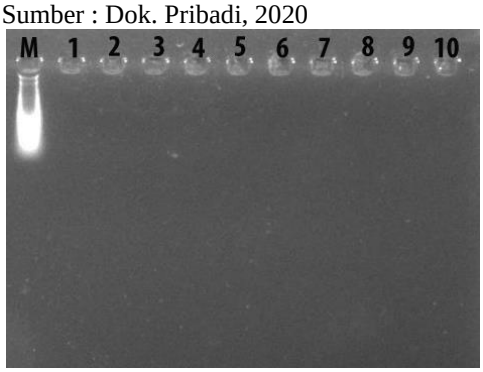
Tabel 4.10. progam PCR

Progam	Suhu	Time
Pre Denaturation	94ºC	5 minutes
Denaturation	94ºC	1 minutes
Annealing	34ºC	2 minutes
Extention	72 ºC	2 minutes
Post Extention	72 ºC	9 minutes

(Dok. Pribadi, 2020)

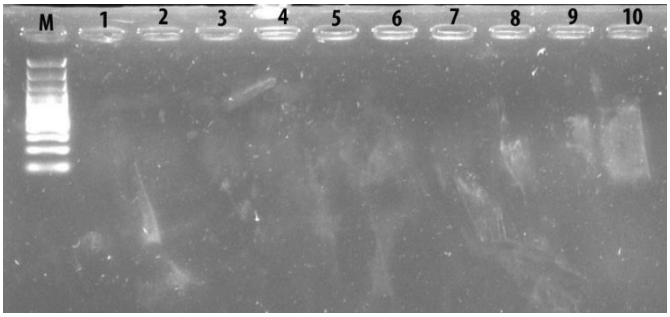


Gambar 4.25. Hasil visualisasi sampel 6 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.10.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

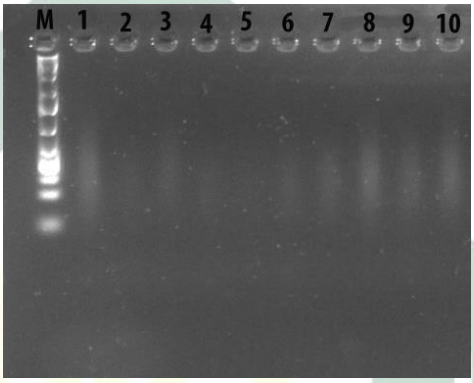


Gambar 4.26. Hasil visualisasi sampel 12 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.10.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

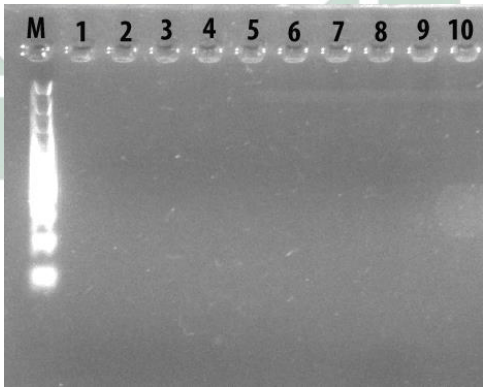
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 4.27. Hasil visualisasi sampel 13 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.10.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.28. Hasil visualisasi sampel 14 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.10.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.29. Hasil visualisasi sampel 15 primer OPA 1-10 optimasi suhu ada pada tabel 4.10.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

Hasil visualisasi genom menggunakan geldoc suhu *annealing* 34°C adalah terlihat pada gambar 4.25. s/d 4.29. Gambar menunjukkan hasilnya negatif, bahwa seluruh genom tidak ada yang terlihat kecuali marker. Menurut Qubais (2015), kemurnian DNA dibawah 1,8 menunjukkan terdapatnya kontaminan fenol atau senyawa lain. Apabila kemurnian

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

melebihi 2 menunjukkan adanya kontaminan berupa RNA seperti hasil pada sampel 15 (gambar 4.29) dan sampel 5 (gambar 4.17.).

Berdasarkan hasil isolasi seluruh genom dengan konsentrasi tertinggi pada tabel 4.3. dan tabel 4.8. konsentrasi DNA diencerkan. Tujuan pengenceran sampel adalah untuk mengurangi kesalahan interpretasi pita, karena tidak ada pita yang dihasilkan atau hasil pita tidak jelas. Sampel yang diencerkan meliputi 3 sampel lama dan 3 sampel baru. Hal ini dilakukan untuk mengetahui perbedan dari kedua jenis saampel. Setelah diencerkan, sampel di amplifikasi kembali untuk mendapatkan hasil yang lebih maksimal. Pengubahan konsentrasi ini menggunakan rumus pengenceran seperti di bawah ini :

$$V_1 . M_1 = V_2 . M_2$$

Tabel 4.11. Hasil konsentrasi pengenceran sampel lama dan baru

Kode Sampel	Nama sampel	Sebelum		Sesudah	
		Konsentrasi (µg/ml)	Å260/Å280	Konsentrasi (µg/ml)	Å260/Å280
1	Kecamatan Mojosari	4.440	1.858	-0.464	2.166
2	Kecamatan Pungging	2.234	2.061	-0.617	1.680
3	Kecamatan Pacet	5.097	1.795	-0.489	1.442
13	Kecamatan Jetis	-6.007	1.883	-0.163	-4.417
14	Kecamatan Prajurit Kulon	-6.172	1.886	-0.528	1.900
15	Kecamatan Magersari	-5.535	1.824	-0.591	1.733

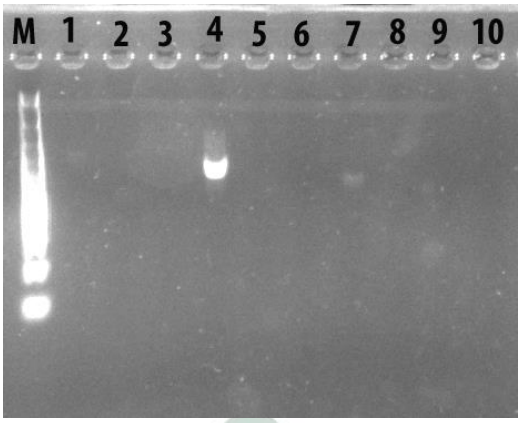
(Dok. Pribadi, 2020)

Tabel 4.12. Progam PCR

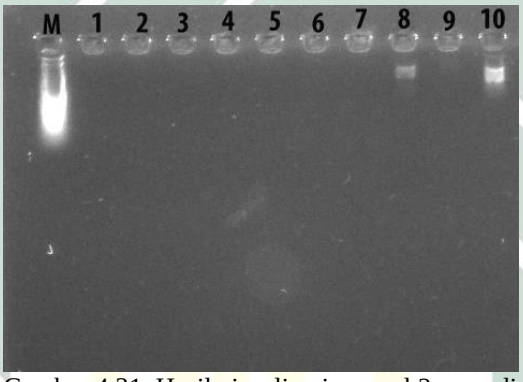
Progam	Suhu	Time
Pre Denaturation	94ºC	5 minutes
Denaturation	94ºC	1 minutes
Annealing	36ºC	1,5 minutes
Extention	72 ºC	2 minutes
Post Extention	72 ºC	7 minutes

(Paramar, 2015)

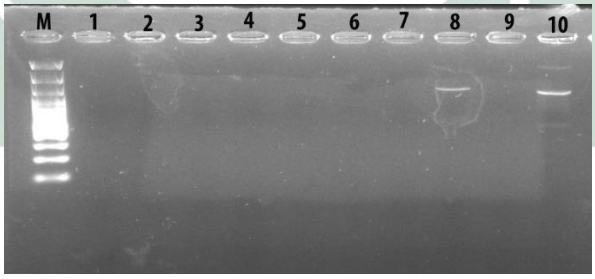
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 4.30. Hasil visualisasi sampel 13 yang diencerkan, primer 1-10 optimasi pada tabel 4.12.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.31. Hasil visualisasi sampel 2 yang diencerkan, primer OPA 1-10 optimasi pada tabel 4.12.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020



Gambar 4.32. Hasil visualisasi pengulangan sampel 2 optimasi pada tabel 4.12.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

Gambar 4.30. menunjukkan adanya band pada sampel 13 yang terdeteksi di primer OPA 4. Ini merupakan awal adanya amplifikasi DNA genom dengan primer. Akan tetapi hasil band terlihat *smear* dan lebih terang di bagian bawah, ini menandakan pada tahap isolasi terdapat adanya meteri genetik lain selain DNA sampel daun. Menurut Qubais (2015) hasil visualisasi bagian bawah yang terlihat band lebih tebal merupakan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

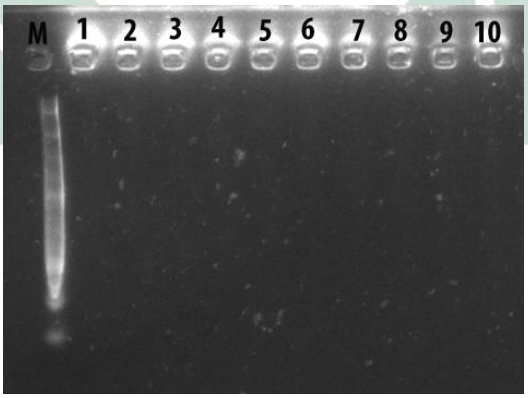
kontaminan RNA di sampel DNA. Running elektroforesis dilakukan selama 60 *min* dengan 50 volt.

Sedangkan pada gambar 4.31. juga terlihat adanya band pada primer 8 dan 10. Karena *running* dilakukan hanya 25 volt selama 60 *min*, sehingga hasil band tampak seperti menggantung di atas dan tidak dapat turun. Selain menujukkan ketebalan pita DNA juga keadaan pita DNA yang *smear*. *Smear* pita yang lebih tebal dimiliki oleh primer OPA 10 dan yang lebih tipis adalah primer OPA 8. Semakin tidak ada *smear* menunjukkan DNA yang berkualitas baik. Dirasa hasil visualisasi sampel 2 lebih baik dari hasil visualisai sampel yang lain tetapi hasil band kurang maksimal, maka dilakukan running ulang pada sampel yang sama dan optimasi yang sama. Sehingga dihasilkan seperti tampak pada gambar 4.32. Pita DNA terlihat lebih jelas teramplifikasi pada primer OPA 8 dan OPA 10.

Tabel 4.13. progam PCR

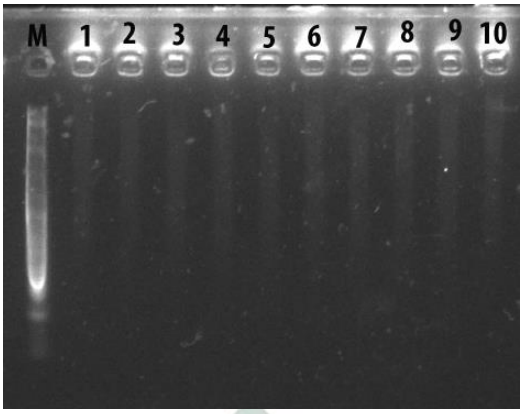
Progam	Suhu	Time
Pre Denaturation	95ºC	5 minutes
Denaturation	94ºC	1 minutes
Annealing	35ºC	2 minutes
Extention	72 ºC	1 minutes
Post Extention	72 ºC	5 minutes

(Dok. Pribadi, 2020)



Gambar 4.33. Hasil visualisasi sampel 1 optimasi pada tabel 4.13.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 4.34. Hasil visualisasi sampel 7 optimasi pada tabel 4.13.
Sumber : Dok. Pribadi, 2020

Hasil visualisasi genom suhu *annealing* 35°C terlihat pada gambar 4.33. dan 4.34. bahwa band marker tampak smear begitu pula pada sampel 7, seluruh band sampel terlihat samar-samar. Ini merupakan visualisi DNA terakhir selama di Laboratorium Genetika dan Molekular.

Panjang primer RAPD sekitar 10 bp yang dapat menempel secara acak pada sekuen target homolognya dalam genom. Primer RAPD dapat mengamplifikasi DNA Genom secara acak, tidak hanya spesifik pada gen tertentu saja, sehingga mampu menggambarkan kondisi genom antar sampel secara menyeluruh (Isabel, dkk., 1993). Amplifikasi DNA teknik RAPD ini, menggunakan primer OPA 1 – OPA 10 dengan berbagai optimasi untuk mendapatkan keberhasilan amplifikasi DNA genom dengan primer.

Dari semua optimasi yang telah dilakukan hanya terdapat satu suhu *annealing* yang mampu mengamplifikasi DNA genom sampel daun *Aegle marmelos* yaitu 36°C sesuai penelitian Paramar (2015). Hal ini kemungkinan bahwa primer OPA 1-10 sekuensnya tidak cocok dengan sekuens whole genom daun maja (*Aegle marmelos* L.), sementara untuk menacari whole genom maja sendiri di NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) tidak tersedia dalam jumlah banyak.

Pada penelitian ini ada 3 primer yang mampu mengamplifikasi DNA genom yaitu primer OPA 4, OPA 8 dan OPA 10. Berdasarkan uji kuantitatif diketahui bahwa konsentrasi DNA hasil isolasi yang teramplifikasi berkisar antara -0.163 (sampel 13 pengenceran) dan -0.617

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

µg/ml (sampel 2 pengenceran). Amplifikasi DNA primer OPA 8 dan OPA 10 menghasilkan pita monomorfik di sampel 2 pengenceran. Masing-masing terlihat band pita DNA pada primer OPA 8 dengan panjang band ± 1000 bp dan primer OPA 10 dengan panjang band ± 900 bp. Pada optimasi yang sama, primer tersebut tidak dapat mengamplifikasi sampel 13 pengenceran, penyebab yang mungkinkan hal tersebut terjadi adalah bahwa sampel 13 tidak memiliki sekuen yang cocok dengan primer OPA 8 dan OPA 10. Sedangkan primer OPA 4 menghasilkan pipta monomorfik di sampel 13 yang telah diencerkan sebesar ± 800 bp.

Seluruh DNA genom yang telah di visualisasi tidak adanya amplifikasi antara sampel dengan primer. Pada gambar 4.30. – gambar 4.32. menunjukkan adanya band, dimana bagian bawah terlihat lebih terang. Menurut Irmawati (2003) pita DNA yang mengumpul dan tebal menunjukkan bahwa konsentrasi yang terlalu tinggi dan ekstraksi DNA total dalam keadaan utuh. Sedangkan, pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga terjadinya genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB V

PENUTUP

5.1. Simpulan

Analisis molekular menggunakan teknik RAPD menunjukkan bahwa sampel daun maja tidak dapat teramplifikasi oleh primer OPA 1-10. Hal ini disebabkan karena tidak adanya kecocokan antara sekuens primer OPA 1-10 dengan sekuens whole genom daun maja. Primer yang paling baik digunakan pada penelitian ini adalah OPA 4, OPA 8, dan OPA 10 karena masing-masing menghasilkan band monomorfik. Band yang dihasilkan OPA 4 sebesar ± 800 bp, OPA 8 sebesar ± 1000 bp, dan OPA 10 sebesar ± 900 bp. Optimasi suhu annealing yang mampu memngamplifikasi DNA genom sampel daun *Aegle marmelos* L. adalah 36°C.

5.2. Saran

a. Optimasi penelitian masih perlu dilanjutkan kembali hingga mendapat band polimorfisme dari kombinasi primer RAPD.
b. Dilakukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan hasil lebih akurat terkait data genotipe yang sulit untuk dipecahkan.
c. Menambah jumlah sampel dapat ditambahkan untuk mengetahui informasi genetik di seluruh kecamatan yang ada di Kabupaten dan Kota Mojokerto.

Penanaman dan perlindungan berupa usaha budidaya pada tanaman maja (*Aegle marmelos*) agar jumlahnya tidak menurun termakan waktu.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR PUSTAKA

Abdul, M.P.M., Gopalakrishnan, A., Musammilu, K.K., Mohindra, V., Lal. K.K., Basheer, V.S., and W.S, Lakra, , 2009. Genetic Variation and Population Structure of Endemic Yellow Catfish, *Horabagrus brachysoma* (Bagridae) Among Three Population of Western Ghat Region Using RAPD and Microsatellite Markers. *Molecular Biology Reports*, Vol. 36 (7).

Abdullah, T. 2018. Inilah Buah Maja Pengispirasi Majapahit. Diakses pada tanggal 16 Juni 2019 <https://www.cendananews.com/2018/06/inilah-buah-penginspirasi-majapahit.html>.

Al-Qur'an Mushaf Terjemah Edisi Tahun 2002. 2005. Al-Huda Kelompok Gema Insani, Depok.

Anggereini, E. 2008. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Suatu Metode Analisis DNA Dalam Menjelaskan Berbagai Fenomena Biologi. *Jurnal biospecies*. Vol. 1, No. 2: 73-76.

Anwar, K. 2009. Potensi Wisata Budaya Situs Sejarah Peninggalan Kerajaan Majapahit di Trowulan Mojokerto. *Laporan Tugas Akhir*. Fakultas Sastra dan Seni Rupa. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Ashraf, K., Ahmad, A., Chaudhary, A., Mujeeb, M., Ahmad, S., dan M. Amir. 2014. Genetic Diversity Analysis of Zingiber Officinale Roscoe by RAPD Collected from Subcontinent of India. *Saudi Journal of Biology Science*, XXI(2), 159-165.

Azizah, A. 2009. Perbandingan Pola Pita Amplifikasi DNA Daun, Bunga Kelapa Sawit Normal dan Abnormal. *Skirpsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Badan POM RI. 2008. *Informasi Obat Nasional Indonesia.* Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta.

Bahreisy, H. 1980. *Himpunan Hadist Pilihan Hadist Shahih Bukhari*. Al-Ikhlas, Surabaya.

Bani, P.W., Daryono B.S., dan Purnomo. 2017. Penanda Molekular Inter Simple Squence Repeat untuk MenentukanKetahanan Tanaman Jangung terhadap Penyakit Bulai. *Jurnal Fitopatologi Inonesia*, Vol.13, No.4, P:127-135.

Batutah, M.A. 2017. Distilasi Bertingkat Bioetanol dari Buah Maja (*Aegle marmelos* L.). *Jurnal IPTEK*, Vol.21, No.2.

BioDrop. 2020. Using a BioDrop µLITE Spektrofotometer to Measure the Concentration of Low Volume Samples of dsDNA. *BioDropTM µLITE dsDNA Application Note*. Diakses pada tanggal 21 Mei 2020 <www.biodrop.co.uk>

Depkes RI. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Departemen Kesehatan Dan Kesejahteraan Republik Indonesia, Jakarta.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Destiana, A.L., Agus, N., dan A.H. Susanto. 2011. Variasi Genetik Ikan Senggaringan (Mystus nigriceps) dari Sungai Klawung Berdasarkan Marka RAPD. *Makalah Seminar Hasil Penelitian*. Fakultas Biologi, Universitas Jenderan Soedirman, Purwokerto.

Ding, G. 2019. Lab Thermal Cycler Pcr Harga Mesin. Qixia District, Nanjing, Cina. Diakses pada tanggal 20 Juni 2019 <https://indonesian.alibaba.com/product-detail/lab-pcr-thermal-cycler-machine-price-60685906735.html>

Diredja, W. 2014. Perbandingan Kemurnian Hasil Isolasi DNA dengan Metode Ekstraksi Fenol dan Metode *Salting Out* Skala Kecil. *Thesis*. Progam Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Surbaya.

Ernawati, A. 2009. Optimasi Metode Isolasi DNA *Annona Muricata* Linn. Dengan Uji Kualitatif dan Kuantitatif. *Skripsi*. Universitas Airlangga Surabaya.

Fahey, G. C dan L. L. Berger. 1988. Carbohydrate Nutrition of Ruminants. In : D.C Cruch(Ed.). Digestive Phisiology and Nutrition of Ruminants. *The Ruminant Animal*. Prentice Hall Eglawood Cliifs, New Jersey.

Fatchiyah, Arumningtyas, E.L., Widyarti, S dan R. Sri. 2011. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga, Jakarta.

Fatmawati, I. 2015. Efektivitas Buah Maja (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) Sebagai Bahan Pembersih Logam Besi. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*, Vol.9, No.1, Hal.81-87. Balai Pelestarian Cagar Budaya Jawa Timur.

Ferniah, R.S. dan S. Pujiyanto. 2013. Optimasi Isolasi DNA (*Capsium annum* L.) Berdasarkan Perbedaan Kualitas dan Kuantitas Daun serta Teknik Penggerusan. *Bioma*. Vol. 156, No.1.

Hananto, A. 2018. *Buah Ini Menjadi Asal Nama Kerajaan Majapahit*. Diakses pada tanggal 26 Juni 2019 <https://www.goodnewsfromindonesia.id/2018/02/17/buah-ini-asal-nama-kerajaan-majapahit>

Handayani, T., Sastrosumarjo, S., Sopandie, D., Suharsono., dan A. Setiawan. 2006. Analisis Marka Morfologi dan Molekular Sifat Ketahanan Kedelai Terhadap Intensitas Cahaya Rendah. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*, Vol. 8, No, P:43-50.

Handoyo, D., dan A. Rudiretna. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Poplymerase Chain Reaction* (PCR). Pusat Studi Bioteknologi. Universitas Surabaya.

Hariana, A. 2008. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Seri 2. Penebar Swadaya : Depok.

Holla, K.M.S., Jameel, A.K., Sowjanya, M.S., and H.E Shasidhar. 2014. Monomorphic Molecular Markers are as Informative as Polymorphic Molecular Markers. *Indian Journal Genet*, Vol.74, No.4.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Isabel, N., N. Tremblay., M. Michaud., F. M. Tremblay., dan J. Bosquet. 1993. RAPDs as an Aid to Evaluate The Genetic Integrity of Somatic Embryogenesis-derived Pupulation of *Picea mariana* (Mill). *B.S.P*. TAG. Vol. 86. P. 81-87.

Kala, C.P., Dhyani, P.P. and B.S, Sajwan. 2006. Developing The Medicinal Plants Sector in Northern India: challenges and opportunities. *Journal of Ethnobiology and Ethnomed*, Vol.2, No.1, P.1-15.

Konservasi Biodiversitas Raja Ampat. 2015. Konservasi Keragaman Genetik. *Informasi Status, Kondisi dan Berita Biodiversitas Indonesia*, Vol.4, No.2.

Kualita, S. 2017. Pemuliaan Pohon : Pengertian, Replikais dan Pewarisan Sifat. Diakses pada tanggal 27 Juni 2019 <https://sangkakkualita.blogspot.com/2016/03/dna.html?m=1>.

Liu, Z and G.R, Furnier. 1993. Comparison of Allozyme, RFLP and RAPD Markers for Revealing Genetic Variation Within and Between Trembling Aspen and Bigtooth Aspen. *Theor. Appl. Genet*, 87, 97, 105.

Maghfiroh, N.2015. *99 Fenomena Menakjubkan dalam AL-Qur'an*. Mizania Pustaka, Bandung.

Mangkoko. 2017. *Apakah Buah Maja Rasanya Pahit?*. Diakses pada tanggal 27 Juni 2019 <https://mangkoko.com/kebun_organik/buah-maja-pahit>

McGregor, C.E., Lambert. C.A., Greyling, M.M., Louw, J.H., dan L, Warnich. 2000. A Comparative Assesment of DNA Fingerprinting Techniques (RAPD, ISSR, AFLP, and SSR) in Tetraploid Potato (*Solanun tuberosum* L.) Germplasm. *Euphytica* 113 : 135-144. University of Stellenbosch, Republic of South Africa.

Merapi, H. 2018. Maja Bantu Lawan Hipertensi. Diakses pada tanggal 23 Juni 2019 https://www.harianmerapi.com/herbal/2018/01/18/5877/maja-bantu-lawan-hipertensi

Mulando. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Mulyani dan Tim Penulisan Sejarah Kabupaten Mojokerto. 1993. *Sejarah Kabupaten Mojokerto Sebuah Pendekatan Administratif dan Sosial Budaya*. Mojokerto.

Neeraj., Bisht, V., and V. Johar. 2017. Bael (*Aegle marmelos*) Extraordinary Species of India: A Review, *International Journal of Basic & Applied Sciences*, Vol.6, No.3, P : 1870-1887.

Paramar, K., R.S. Tomar., M.V. Parakhia., B.J. Malviya., V.M. Rathod., A.J. Bhatt., R.B. Bhalara dan B.A. Golakiya. 2015. Molecular Characterization of Chloropyrifos Degrading Bacteria and Gene. *Journal of Cell and Tissue Research*. Vol.15, No.3, P: 5233-5239.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Patra, A. K. Dan J. Saxena. 2010. A New Perspective on The Use of Plant Secondary Metabolites to Inhibit Methanogenesis in The Rumen. *Journal Phytochemistry*. 71:1198-1222.

Promega Corporation. 2013. *Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega part#9PIA112*. Promega Corporation, USA.

Purnomo, E dan R.S, Ferniah. 2018. Polimorfisme Cabai Rawit dan Cabai Gendot dengan Penanda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Menggunakan Primer OPA-8. *Berkala Bioteknologi*, Vol.1, No.1.

Purwanto, A.E dan D.R. Sulistyastuti. 2007. *Metode Penelitian Kuantitatif, Untuk Administrasi Publik, dan Masalah-masalah Sosial.* Gaya Media, Yogyakarta.

Qubais, A. 2015. Analisis Variasi Genetik Beberapa Varietas Mangga (*Mangifera indica* L.) Berdasarkan RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) dan Penanda MOLEKULAR Gen PSY (*Phytoene Synthase*). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.

Randriani, E., Tresniawati, C., dan Syafaruddin. 2012. Pemanfaatan Teknik Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Untuk Pengelompokan Secara Genetik Plasma Nutfah Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L.). *Buletin RISTRI*, Vol.3 (1). Balai Penellitian Tanaman Industri dan Penyegar, Sukabumi.

Rell, F., Widyastuti, S.K., dan I.N, Wandia. 2013. Polimorfisme Lokus Mikrosatelit D10S1432 Pada Populasi Monyet Ekor Panjang Di Sangeh. *Jurnal Ilmu dan Kesehatan Hewan*, Vol. 1, No. 1.

Rismayani. 2013. Manfaat Buah Maja Sebagai Pestisida Nabati Untuk Hama Penggerek Buah Kakao (*Conomorpha cramerella*). *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*, Vol. 9, No.3.

Rohmah, L.B., Resmisari, R.S., W.M.L.D, Setyawan., dan Y.M. Ni'mah. 2018. Ethnobotany of Maja Plants (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) in Trowulan district, Mojokerto regency, Indonesia. *Plant and Animal Research Journal*, Vol.1, No.2, P : 38 – 42.

Rokhim, S., Y. Rachmawati., K. Hinayati., dan S. Ulya. 2017. Karakterisasi Molekular Kelor (*Moringa oleifera*) Menggunakan Primer Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Prosiding Temu Nasional Inovasi Pemanfaatan & Festival Sumberdaya Genetik Lokal Malang*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Kementrian Pertanian.

Sambrook, J. dan D. W Russell. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Semagn, K., A. Bjornstad., dan B. Ndjiondjob. 2006. An Overview of Molecular Marker Methods For Plants. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 5. No. 25. Norwegian University of Life Sciences, Department of Plant and Enviromental Sciences, Norway.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Setyowati, N. 2013. Optimasi Isolasi DNA dan PCR-RAPD pada Tanaman Garut (*Maranta arundinaceae* L.) Lokal DIY. *Skripsi*. Progam Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Univeritas Islam Negeri Sunan Kalijaga, Yogyakarta.

Shihab, MQ. 2001. *Tafsir al-Misbah : Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qur'an*. Lentera Hati, Jakarta.

Smith, K. 2009. *Genetic Polymorphism and SNPs Genotyping, Haplotype Assembly Problem, Haplotype Map, Functional Genomics and Proteomics*.

Sripichai, O. 2007. Genetic Polymorphisms and Implications for Human Diseases. *Journal Med Assoc Thai*, Vol. 90, No. 2.

Sudiono., Hidayati S.H., Suseno, R., dan S. Sosromarsono. 2004. Penggunaan Teknik PCR dan RFLP Untuk Deteksi dan Analisis Keragaman Virus Gemini pada Tanaman Tomat yang Berasal dari Berbagai Daerah di Jawa Barat dan Lampung. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, Vol.4, No.2, P:89-93.

Suhartini, N. 2014. Karakterisasi Genetik Udang Jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) Hasil Tangkapan dari Laguna Segara Tengah Berdasarkan Haplotipe DNA Mitokondria dengan Menggunakan Metode PCR-RFLP. *Skripsi*. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Sulandari, S dan M.S.A, Zein,. 2012. Molecular Techniques for Sex Identifications of Birds : Implication for Captive Breeding Progam in Indonesia. *Hayati*. Submitted.

Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Syarif, A.F. 2013. Analisis RAPD (*Randomly Amplified Polymorphyc DNA*) Hibrida Antara Kerapu Batik *Epinephelus microdon* Betina Dengan Kerapu Kertang *E. lanceolatus* Jantan Dan Respon Terhadap Perbedaan Salinitas. *Skirpsi*. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor Bogor.

Tingey, S.V., Rafalski J.A., dan M.K. Hanafey. 1994. Genetic analysis with RAPD markers. In : Coruzzi, C. and P. Puidormenech (eds.). *Plant Molecular Biology*. Belin: Springer-Verlag.

Tjitrosoepomo, G. 2009. *Morfologi Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Trent, R. J. 2012. *Forensic Science and Medicine. Molecular Medicine, 275–299.*

USDA Agricultural Research Service. GRIN Germplasm Resources Information Network. 2017. *Taxon : Aegle marmelos* (L.) Correa. National Plant Germplasm System, US Department of Agriculture.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Utami, P. 2008. *Tanaman Obat.* PT Agromedia Pustaka, Jakarta.

Venudevan, B dan P, Srimathi. 2014. Seed Technological Approaches for Restoration of Endangered Medicinal Tree Bael (*Aegle marmelos* (L.) Corr.). *Life Sciences Leaflets*, Vol.54, No.22, P.61 to 67.

Vinolia, I. 2014. Persebaran dan Karakter Populasi Maja (*Aegle marmelos* L. Correa) di Situs Candi Trowulan Kecamatan Trowulan Kab. Mojokerto. *Skripsi*. Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

Wahyuningsih, A. 2019. Keragaman Genetik Pisang (Musa Spp.) Berdasarkan Karakter Fenotip Dan Molekular Menggunakan Penanda Random Amplified Polymorphic Dna (Rapd) Di Kabupaten Lumajang. *Skripsi*. Program Studi Biologi, Fakultas Sains Dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya.

Wandia, I.N., Putra I.G.A.A, dan I.G, Soma. 2009. Polimorfisme Genetik Populasi Monyet ekor panjang di Lokasi Pariwisata, Bali. *Laporan Fundamental Dana DIPA*. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Bali.

Welsh, J dan Mc Celland. 1990. *Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers*. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

Williams, J.G.K., Anne, R.K., Kenneth, J.L., Rafalski, J.A., dan S.V. Tingey,. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, Vol.18, No. 22 6531.

Wright, J.W. 1976. *Introduction to Forest Genetics*. Academic Press Inc, New York, San Fransisco, London.

Zein, M.S.A dan M.P. Dewi,. 2013. *DNA Barcode Faunaa Indonesia*. Kencana Prenadamedia Group, Jakarta.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id