

**DETERMINASI PARIJOTO (*Medinilla speciosa* Blume)
BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI DAN
MOLEKULER**

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagai Syarat Guna Memperoleh
Gelar Sarjana Sains dalam Ilmu Biologi



Diajukan Oleh:

Nazhifa Fairuz Maulida

NIM: 1908016024

**POGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO SEMARANG
2022**

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nazhifa Fairuz Maulida

NIM : 1908016024

Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

**Determinasi Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)
Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler**

Secara keseluruhan adalah hasil penelitian/karya saya sendiri,
kecuali bagian tertentu yang dirujuk sumbernya.

Semarang, 2023

Pembuat Pernyataan



Nazhifa Fairuz M.

NIM: 1908016024



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
Jl. Prof. Dr. Hamka Ngaliyan Semarang
Telp.024-7601295 Fax.7615387

PENGESAHAN

Naskah skripsi berikut ini:

Judul skripsi : Determinasi Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler
Penulis : Nazhifa Fairuz Maulida
NIM : 1908016024
Program Studi : Biologi

Telah diujikan dalam Sidang Munaqosyah oleh Dewan Penguji Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo dan dapat diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana dalam Ilmu Biologi.

Semarang, 30 Juni 2023

DEWAN PENGUJI

Penguji I,

Penguji-II,

Arnia Sari Mukaromah, M.Sc.

NIP 198709112018012001

Penguji III,

Asri Febriana, M.Si

NIP 198902012019032015

Penguji IV,

Chusnul Adib Achmad, M. Sc.

NIP 198712312019032013

Pembimbing I,

Asni Akmalia, M. Sc.

NIP 198908212019032013

Pembimbing II,

Arnia Sari Mukaromah, M. Sc.

NIP 198709112018012001

Asri Febriana, M.Si

NIP 198902012019032015

NOTA DINAS

Semarang, 22 Juni 2023

Kepada

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Walisongo Semarang

Assalamu'alaikum wr. wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul skripsi : **Determinasi Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler**
Penulis : Nazhifa Fairuz Maulida
NIM : 1908016024
Program Studi : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang Munaqosyah.

Pembimbing I,



Arnia Sari Mukaromah, M. Sc
NIP 198709112018012001

NOTA DINAS

Semarang, 22 Juni 2023

Kepada

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Walisongo Semarang

Assalamu'alaikum wr. wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul skripsi : **Determinasi Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler**
Penulis : Nazhifa Fairuz Maulida
NIM : 1908016024
Program Studi : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang Munaqosyah.

Pembimbing II,



Asri Febriana, M. Si

NIP 198902012019032015

ABSTRAK

Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) merupakan tanaman obat yang terkenal di wilayah Pegunungan Muria. Masyarakat Pegunungan Muria mempercayai Parijoto dapat meningkatkan Fertilitas bagi yang sulit mendapatkan keturunan. Olahan Parijoto banyak dijual sebagai oleh-oleh khas Pegunungan Muria karena lekat akan kepercayaan masyarakat tersebut. Desa tempat budidaya Parijoto di Pegunungan Muria diantaranya Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara. Belum terdapat penelitian mengenai determinasi Parijoto di Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara. Penelitian mengenai variasi genetik dapat memberikan kontribusi dalam konservasi dan pengembangan varietas unggul. Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis karakter morfologi dan molekuler *Medinilla speciosa* Blume asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara. Karakter molekuler dianalisis menggunakan metode *DNA Barcoding* menggunakan penanda molekuler *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Determinasi karakter morfologi menunjukkan sampel Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara memiliki indeks kesamaan karakter yang tinggi dengan nilai koefisien kesamaan karakter sebesar 75%. Determinasi karakter molekuler berdasarkan penanda molekuler ITS adalah sampel Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara memiliki sekuen yang *conserved*.

Kata kunci: Parijoto, morfologi, *DNA Barcoding*, ITS

ABSTRACT

Parijoto (Medinilla speciosa Blume) is a well-known medicinal plant in the Muria Mountains region. The people of the Muria Mountains believe Parijoto can increase fertility for those who find it difficult to conceive. Parijoto preparations are sold as souvenirs typical of the Muria Mountains because of the attachment to the people's beliefs. The villages where Parijoto is cultivated in the Muria Mountains include Colo Village, Kudus Regency and Tempur Village, Jepara Regency. There has been no research on the determination of Parijoto in Colo Village, Kudus Regency and Tempur Village, Jepara Regency. Research on genetic variation can contribute to the conservation and development of superior varieties. The purpose of this study was to analyze the morphological and molecular characters of Medinilla speciosa Blume from Colo Village, Kudus Regency and Tempur Village, Jepara Regency. Molecular characters were analyzed using the DNA Barcoding method using Internal Transcribed Spacer (ITS) molecular markers. The determination of morphological characters showed that the Parijoto samples from Colo Village, Kudus Regency and Combat Village, Jepara Regency had a high character similarity index with a character similarity coefficient value of 75%. Molecular character determination based on ITS molecular markers is that Parijoto samples from Colo Village, Kudus Regency and Tempur Village, Jepara Regency have conserved sequences.

Keywords: Parijoto, morphology, DNA Barcoding, ITS

TRANSLITERASI

Penulisan transliterasi huruf-huruf Arab Latin dalam skripsi ini berpedoman pada SKB Menteri Agama dan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan RI Nomor : 158/1987 dan Nomor: 0543b/U/1987. Penyimpangan penulisan kata sandang [al-] disengaja secara konsisten supaya sesuai teks arabnya

| | | | |
|---|----|----|----|
| ا | A | ط | t} |
| ب | B | ظ | z} |
| ت | T | ع | ' |
| ث | s\ | غ | G |
| ج |] | ف | F |
| ح | h} | ق | Q |
| خ | Kh | ك | K |
| د | D | ل | L |
| ذ | z\ | م | M |
| ر | R | ن | N |
| ز | Z | و | W |
| س | S | ها | H |
| ش | Sy | ء | ' |
| ص | s} | ي | Y |
| ض | d} | | |

Bacaan Madd:

a >= a panjang

i >= I panjang

u >= u panjang

Bacaan Diftong:

au = او

ai = اي

iy=اي

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya yang senantiasa terlimpahkan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul **“Determinasi Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler”** sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Sarjana (S-1) pada Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang.

Sholawat serta salam selalu tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW yang telah memberikan inspirasi dan menuntun umat manusia menuju jalan yang lurus serta menjadi anugerah terbesar bagi seluruh alam semesta. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Sehingga pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Kedua orang tua saya, Pakde Imam dan Bude Elvi serta segenap keluarga besar yang selalu memberikan dukungan baik moral maupun materi, serta doa yang tulus atas kelancaran penulis dalam menyelesaikan perkuliahan dan penulisan skripsi;
2. Prof. Dr. H. Imam Taufiq, M. Ag., selaku Rektor UIN Walisongo Semarang;

3. Dr. Ismail, M. Ag., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang;
4. Ibu Baiq Farhatul Wahidah, M. Si., selaku Ketua Program Studi Biologi yang telah memberikan arahan selama perkuliahan dan penulisan skripsi;
5. Ibu Arnia Sari Mukaromah, M. Sc., selaku Dosen Pembimbing I yang telah berkenan memberikan tambahan ilmu, ide-ide selama penelitian, serta memberikan banyak arahan dalam penulisan skripsi;
6. Ibu Asri Febriana, M. Si., selaku Dosen Pembimbing II yang telah berkenan memberikan tambahan ilmu, ide-ide dalam penelitian, bimbingan dan arahan dalam penulisan skripsi;
7. Bapak Eko Purnomo M. Si., selaku dosen wali yang senantiasa memberikan bimbingan selama perkuliahan;
8. Ibu Sumiati, S. Pd., staff dan juga asisten Laboratorium Biologi UIN Walisongo Semarang yang telah memberikan izin dan membantu menyelesaikan penelitian;
9. Bapak dan Ibu dosen serta segenap civitas akademik Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang yang telah memberikan banyak ilmu serta motivasi penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi;

10. Riska Dwi Aswaroh, Zakiya Qothrun Nada dan Mba Rofi' Musfiroh yang telah membatu proses pengambilan sampel;
11. Chika, Tiara, Bulan, Hana, Zhusna, Yasmin dan Vivi yang telah berkenan menemani, membantu, dan memberikan semangat kepada penulis dalam proses penelitian dan penulisan skripsi;
12. Teman-teman seperjuangan dari keluarga Biologi 2019 yang telah kebersamai selama perkuliahan;
13. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan kontribusi, doa, dan dukungan sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini;

Semoga semua yang telah diberikan kepada penulis, mendapatkan balasan dari Allah SWT. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran guna menjadikan skripsi ini lebih baik. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, pembaca, serta masyarakat. Aamiin.

Semarang, 16 Juni 2023

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|-------------------------------------|
| PERNYATAAN KEASLIAN | iii |
| PENGESAHAN..... | Error! Bookmark not defined. |
| NOTA DINAS..... | iv |
| NOTA DINAS..... | v |
| ABSTRAK..... | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| TRANSLITERASI..... | viii |
| KATA PENGANTAR..... | ii |
| DAFTAR ISI | v |
| DAFTAR GAMBAR..... | viii |
| DAFTAR TABEL | x |
| BAB I: PENDAHULUAN..... | 2 |
| A. Latar Belakang Masalah..... | 2 |
| B. Rumusan Masalah | 6 |
| C. Tujuan Penelitian..... | 6 |
| D. Manfaat Penelitian | 7 |
| BAB II: LANDASAN PUSTAKA | 9 |
| A. Parijoto (<i>Medinilla speciosa</i> Blume)..... | 9 |
| 1. Morfologi Parijoto | 10 |
| 2. Persebaran Parijoto | 11 |
| 3. Kandungan dan Manfaat Parijoto | 12 |
| B. <i>DNA barcoding</i> | 13 |
| 1. Ekstraksi DNA | 14 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 2. | Amplifikasi..... | 14 |
| 3. | Elektroforesis | 15 |
| 4. | Sekuensing..... | 16 |
| 5. | Analisis molekuler..... | 16 |
| C. | Penanda molekuler <i>Internal Transcribed Spacer</i> | 17 |
| D. | Keanekaragaman Tumbuhan dalam Al-Qur'an..... | 19 |
| E. | Kajian Penelitian Yang Relevan (<i>state of the art</i>) | 21 |
| BAB III: METODE PENELITIAN..... | | 23 |
| A. | Waktu dan Tempat..... | 23 |
| B. | Bahan dan Alat..... | 24 |
| C. | Cara Kerja | 25 |
| 1. | Pengamatan parameter lingkungan..... | 25 |
| 2. | Identifikasi karakter morfologis..... | 25 |
| 3. | Pengambilan sampel dan Ekstraksi DNA..... | 26 |
| 4. | Amplifikasi <i>DNA Barcode ITS</i> dan Elektroforesis | 28 |
| 5. | Sekuensing dan Analisis Data Molekuler | 30 |
| BAB IV: HASIL DAN PEMBAHASAN..... | | 32 |
| A. | Deskripsi Hasil Penelitian..... | 32 |
| 1. | Pengamatan Parameter Lingkungan | 32 |
| 2. | Identifikasi Karakter Morfologi Parijoto..... | 33 |
| 3. | Ekstraksi DNA Genom Parijoto | 37 |
| 4. | Amplifikasi <i>DNA Barcode ITS</i> | 38 |
| 5. | Hasil sekuensing dan analisis data molekuler..... | 39 |
| B. | Pembahasan Hasil Penelitian | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 1. Parameter Lingkungan di Lokasi Pengambilan Sampel | 50 |
| 2. Karakter Morfologi <i>M. speciosa</i> | 52 |
| 3. Karakter Molekuler <i>M. speciosa</i> | 56 |
| 4. Korelasi Karakter Morfologi dan Molekuler | 64 |
| C. Keterbatasan Penelitian | 66 |
| BAB V: PENUTUP | 68 |
| A. Kesimpulan | 68 |
| B. Saran | 68 |
| REFERENCES | 70 |
| LAMPIRAN | 78 |
| DAFTAR RIWAYAT HIDUP | 86 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Judul | Halaman |
|---------------|---|----------------|
| Gambar 2.1 | Peta persebaran <i>M. speciosa</i> di seluruh dunia. Titik kuning menunjukkan persebaran <i>M. speciosa</i> | 10 |
| Gambar 2.2 | Lokasi target pasangan primer ITS-u1/ITS-u4 pada <i>Sub-region</i> ITS | 19 |
| Gambar 3.1 | Peta lokasi Desa Pengambilan Sampel | 23 |
| Gambar 4.1 | Hasil rekonstruksi dendrogram | 36 |
| Gambar 4.2 | Hasil amplifikasi sampel NK4 asal Desa Colo (a) dan sampel NJ2 asal Desa Tempur (b) | 36 |
| Gambar 4.3 | Elektroferogram ampikon sampel NK4 asal Desa Colo (a) dan sampel NJ2 asal Desa Tempur (b) | 37 |
| Gambar 4.4 | <i>Alignment</i> Sampel NK4, NJ2 dan <i>M. speciosa</i> dengan nomor akses MG6444485.1 | 41 |
| Gambar 4.5 | Pohon filogenetik Parijoto berdasarkan metode statistik <i>Neighbor joining</i> dengan algoritma <i>Tamura 3-parameter model</i> dan nilai <i>bootstrap replications</i> 1000 | 48 |
| Gambar 4.6 | Sampel tandan bunga Parijoto asal Desa Colo (a), asal Desa Tempur (b) dan berdasarkan sumber jurnal (Asih <i>et al.</i> , 2021) (c) | 54 |

Gambar 4.7 Sampel bunga Parijoto asal Desa
Colo (a) dan asal Desa Tempur
(b) 54

DAFTAR TABEL

| Tabel | Judul | Halaman |
|--------------|---|----------------|
| Tabel 4.1 | Hasil pengukuran parameter lingkungan | 32 |
| Tabel 4.2 | Data karakter morfologi Parijoto asal Desa Colo dan Desa Tempur dibandingkan dengan sumber jurnal (Asih <i>et al.</i> , 2021) | 33 |
| Tabel 4.3 | Daftar sekuen yang ditambahkan dalam pembuatan pohon filogenetik | 43 |
| Tabel 4.4 | Jarak genetik hasil alignment sekuen hasil BLASTn dan sekuen sampel | 46 |

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) merupakan tanaman kaya akan senyawa bioaktif yang bermanfaat sehingga berpotensi dalam bioprospeksi masa depan (Brazia *et al.*, 2020). Parijoto tumbuh dengan baik di wilayah pegunungan dan dataran tinggi yang bersuhu dingin, salah satunya yaitu Pegunungan Muria (Peneng & Sujarwo, 2011; Sukma *et al.*, 2021). Masyarakat Pegunungan Muria mempercayai Parijoto dapat meningkatkan fertilitas dan menjadikan wajah anak yang dikandung menjadi rupawan. Kepercayaan akan manfaat Parijoto ini tak lepas dari cerita masyarakat yang menyebutkan bahwa Istri Sunan Muria yang memakan buah Parijoto saat hamil kemudian hari melahirkan anak dengan kulit yang bersih (Hanum *et al.*, 2017). Parijoto tidak hanya dikonsumsi secara langsung, namun juga dijadikan berbagai olahan seperti jamu dan sirup. Olahan Parijoto banyak dijual sebagai oleh-oleh khas Pegunungan Muria.

Pegunungan Muria terbagi menjadi tiga wilayah administratif yaitu Kabupaten Kudus di bagian selatan, Kabupaten Jepara di bagian barat laut dan Kabupaten Pati di bagian timur (Malik & Kusumarini, 2019). Desa tempat

budidaya Parijoto di Pegunungan Muria diantaranya Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara (Wibowo, 2012; Qosidah, 2022). Berdasarkan keterangan masyarakat setempat, kebun Parijoto di Desa Tempur tidak sebanyak kebun Parijoto yang ada di Desa Colo akan tetapi Kabupaten Jepara memiliki klaim atas Parijoto sebagai tanaman khas daerah. Pada tahun 2020 terjadi persaingan antara Kabupaten Kudus dan Kabupaten Jepara dalam pengajuan klaim atas Parijoto sebagai tanaman khas daerah. Berdasarkan kejadian tersebut diperlukan penelitian mengenai determinasi varietas Parijoto yang terdapat di Kabupaten Kudus dan Kabupaten Jepara (Muharror, 2020).

Belum banyak penelitian mengenai varietas Parijoto di Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara. Namun berdasarkan keterangan masyarakat setempat, terdapat perbedaan morfologi pada Parijoto yang tumbuh di Kabupaten Kudus dan Jepara yaitu dalam warna bunga dan buah muda. Determinasi dapat dilakukan sebagai upaya untuk memastikan identitas spesimen melalui perbedaan karakter yang teramati. Dengan upaya determinasi peneliti dapat terhindar dari kekeliruan sehingga dapat merujuk pada jenis yang spesifik (Octavia, 2022).

Penelitian terdahulu telah mendeterminasi morfologi *Medinilla* spp. di Kebun Raya “Eka Karya” Provinsi Bali. Metode morfologi sudah dapat mendeterminasikan *Medinilla* spp. Namun masih terdapat beberapa kekurangan dari metode tersebut yaitu cenderung tidak konsisten karena bergantung pada fase hidup organisme, factor lingkungan, keahlian peneliti dan klasifikasi yang telah ditentukan. Oleh karena itu dibutuhkan metode lanjutan yang menguatkan metode morfologi (Asih *et al.*, 2021; Peneng & Sujarwo, 2011; Zulfahmi, 2013).

DNA barcoding merupakan metode determinasi menggunakan penanda molekuler (*genetic marker*). Metode ini dianggap lebih efektif dan akurat dibandingkan metode molekuler karena DNA dapat ditemukan pada hampir semua sel pada jaringan organisme, baik yang masih hidup maupun sudah mati dan dapat disimpan tanpa terpengaruh kondisi lingkungan (Zulfahmi, 2013). *DNA barcoding* menggunakan penanda molekuler untuk identifikasi antar taxa yang spesifik. Penanda molekuler yang umumnya digunakan pada tanaman antara lain adalah *trnH-psbA*, *matK*, *ycf5*, *rbcL*, *rpoC1* dan ITS (Chen *et al.*, 2010).

ITS merupakan salah satu penanda molekuler yang digunakan pada tumbuhan, alga dan jamur. *Internal*

Transcribed Spacer (ITS) merupakan DNA *non-coding* yang terletak di antara gen ribosom subunit kecil (18S rRNA) dan subunit besar (26SrRNA) dalam DNA ribosom inti (nrDNA). Penanda molekuler ini sangat baik untuk membedakan pada tingkat spesies karena memiliki laju mutasi tinggi. ITS diakui sebagai sebagai lokus yang efektif untuk DNA barcode pada tanaman (Blouin, 2002; Kress *et al.*, 2005). Penanda molekuler yang digunakan pada penelitian ini tepatnya adalah primer *degenerate forward* ITS-u1 (5' GGA AGK ARA AGT CGT AAC AAG G 3') dan *reverse* ITS-u2 (5' GCG TTC AAA GAY TCG ATG RTT C 3') yang didesain lebih universal dan spesifik pada tanaman (Cheng *et al.*, 2016).

Penelitian mengenai *DNA barcoding* Parijoto masih sangat sedikit dibandingkan dengan penelitian morfologi dan kemanfaatannya. Sekuen nukleotida dari *M. speciosa* yang terdaftar dalam *database National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) saat ini hanya berjumlah 6 dan 2 diantaranya merupakan sekuen berdasarkan penanda molekuler ITS. Oleh karena itu, penelitian ini memiliki tingkat kebaruan yang tinggi.

Penelitian ini ditujukan untuk mendeterminasi karakter morfologi dan molekuler Parijoto yang diisolasi dari Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara. Hasil

penelitian ini diharapkan dapat memberikan referensi mengenai determinasi karakter morfologi dan molekuler *Parijoto* dari dua lokasi pengambilan sampel.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah diuraikan maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana karakter morfologi *Medinilla speciosa* Blume asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara?
2. Bagaimana karakter molekuler *Medinilla speciosa* Blume asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara berdasarkan penanda molekuler *Internal Transcribed Spacer* (ITS)?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu:

1. Untuk menganalisis karakter morfologi *Medinilla speciosa* Blume asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara
2. Untuk menganalisis karakter molekuler *Medinilla speciosa* asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara berdasarkan penanda molekuler *Internal Transcribed Spacer* (ITS)

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

- a. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai karakter morfologi *Medinilla speciosa* Blume
- b. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai karakter sekuen nukleotida *Medinilla speciosa* Blume berdasarkan penanda molekuler ITS

2. Manfaat Praktis

a. Bagi Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk meningkatkan pengetahuan di bidang biologi molekuler dan meningkatkan keterampilan di laboratorium.

2. Bagi Instansi

Penelitian ini diharapkan dapat mendukung misi prodi biologi untuk menyelenggarakan riset dalam bidang Biologi yang bercirikan kesatuan ilmu pengetahuan dan berwawasan kearifan lokal khususnya terkait pemanfaatan metode *DNA barcoding* untuk determinasi spesies.

3. Bagi Masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi baru dalam dunia ilmu pengetahuan terkait determinasi

Medinilla speciosa Blume asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara berdasarkan karakter morfologi dan molekuler

BAB II

LANDASAN PUSTAKA

A. Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)

Parijoto adalah tumbuhan dalam marga *Medinilla* yang merupakan marga terbesar kedua dalam suku Melastomataceae. Marga ini mencakup sekitar 418 spesies yang umumnya dicirikan dengan daun lebar *ever-green*, buah malai dengan tampilan yang menarik (Peneng & Sujarwo, 2011).

Ciri pembeda *M. speciosa* dari spesies lainnya dalam marga *Medinilla* adalah spesies ini memiliki cabang kotak yang halus tidak berkulit atau berbulu, ketiak daun atau ruas ditutupi bulu dan duduk daun yang terdiri dari dua, tiga daun atau empat daun dalam satu ruas (Asih *et al.*, 2021).

Klasifikasi dari tanaman Parijoto adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae

Divisi : Tracheophyta

Kelas: Magnoliopsida

Bangsa: Myrtales

Suku: Melastomataceae

Marga: *Medinilla* Gaudich

Spesies: *Medinilla speciosa* Blume (GBIF, 2023)

1. Morfologi Parijoto

Parijoto memiliki tinggi hingga 3 m. Cabang-cabangnya kecil kotak, halus, gundul dan memiliki diameter 7 – 8 mm. Cabang-cabangnya memiliki buku – buku ditutupi dengan bulu *setaceous* yang padat. Duduk daun terdiri dari tiga pada ruas yang sama atau berhadapan, subsessil (bertangkai daun sangat pendek) dengan tangkai daun yang mengalami penebalan kurang dari 5 mm, elips, 10,1 – 29 x 4,4 – 13,5cm; ujung daun tumpul, mucronate atau meruncing, pangkal daun agak unequal, runcing hingga bulat; 7, 9 tulang daun dengan 6 atau 8 tulang daun muncul dari tulang daun tengah dan di atas pangkal daun.

Daun permukaan atas Parijoto hijau licin, bawah pucat, tulang daun bagian bawah terutama bagian pangkal merah. Pembungaan terminal, bunga malai, banyak dan terbatas, gundul, terjantai, 5,7 – 10,5 cm. Kelopak bunganya berbentuk tabung, 4, merah muda, mahkota bunga 4 putih keunguan, benang sari 8, merah muda bergaris kuning, putik 1, merah muda. Buah ungu kemerahan, tangkai bunga merah. Habitatnya ditemukan pada hutan sekunder dengan tanah liat pada ketinggian 950 - 959 mdpl (Asih *et al.*, 2021).

2. Persebaran Parijoto

Parijoto (*M. speciosa*) banyak tumbuh di lereng gunung atau di hutan pada tanah yang sangat subur dan lembab mulai pada ketinggian 700 hingga 2.300 meter di atas permukaan laut (Siqhny et al., 2020; Wibowo et al., 2012).

Parijoto berasal dari Maluku, Kepulauan Sunda Kecil, Kepulauan Nicobar, Jawa, Sumatera, Borneo, Sulawesi dan semenanjung Malaya. Di pulau Jawa Parijoto tersebar di wilayah dataran tinggi dan pegunungan, salah satunya yang terkenal adalah Pegunungan Muria. (Siqhny et al., 2020; Wibowo et al., 2012).



Gambar 2.1. Peta persebaran *M. speciosa* di seluruh dunia. Titik kuning menunjukkan persebaran *M. speciosa* (GBIF, 2023)

3. Kandungan dan Manfaat Parijoto

Parijoto senyawa bioaktif yang kaya diantaranya flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, glikosida dan terpenoid yang dapat berperan sebagai antikanker, antifungi, antidiabetes, antioksidan, antibakteri dan afrosidiak (Artanti et al., 2021; Vifta & Advistasari, 2018; Wijayanti & Ardigurnita, 2019).

Senyawa antifungi pada Parijoto telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* penyebab penyakit Vulvovaginal candidiasis (Kurniadi, 2021). Senyawa antifungi tersebut adalah flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan kuinon yang bekerja dengan mengganggu permeabilitas sel dan terbentuknya dinding sel jamur (Milanda et al., 2021; Nazzaro et al., 2017).

Parijoto dapat digunakan sebagai afrosidiak karena kandungan flavonoidnya dapat bekerja sebagai antioksidan yang dapat mempertahankan motilitas sperma (Umiyati et al., 2021).

Penelitian Artanti dkk (2020) menyebutkan bahwa ekstrak methanol buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) yang dikombinasikan dengan obat kemoterapi cisplatin dapat menghambat sel kanker *HeLa cell*. Senyawa antikanker dalam Parijoto diantaranya adalah kuersetin, saponin dan

flavonoid yang terlibat pada apoptosis, autofagosit dan penghambatan siklus sel kanker (Artanti et al., 2020, 2021; Melinda et al., 2021)

B. *DNA barcoding*

DNA barcoding merupakan metode identifikasi spesies menggunakan satu atau lebih sekuen pendek DNA yang terdiri atas 400 hingga 800 pasang basa (Kress & Erickson, 2008). *DNA barcoding* memiliki banyak kegunaan dalam berbagai bidang diantaranya adalah konservasi, keamanan pangan dan pengobatan tradisional, mengungkap variasi yang samar, menilai dampak ekologis dalam studi tingkat masyarakat, analisis forensik, analisis filogenetik, kepemilikan pendukung atau hak kekayaan intelektual (Ahmed, 2022).

Metode *DNA barcoding* pertama kali diusulkan oleh Hebert dkk (2003) dengan menggunakan gen sitokrom c oksidase mitokondria (CO1) sebagai penanda molekuler untuk membedakan spesies lepidopteran (Hebert *et al.*, 2003). Berbeda dengan kerajaan hewan yang dapat menggunakan CO1 sebagai penanda molekuler universal, kerajaan tumbuhan belum memiliki penanda molekuler yang dapat digunakan secara universal (Hollingsworth *et al.*, 2011). Hingga kini penelitian mengenai penanda molekuler universal pada tanaman masih terus dilakukan. Salah satu penanda genetik

yang berpotensi menjadi penanda genetik universal pada tanaman adalah ITS (Cheng *et al.*, 2016).

Tahapan *DNA barcoding* dari awal hingga akhir adalah ekstraksi DNA, *Annealing* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), elektroforesis, sekuensing dan analisis data.

1. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA adalah metode yang bertujuan untuk mendapatkan DNA dengan cara merusak komponen sel tanpa merusak DNA. Metode ekstraksi DNA pertamakali ditemukan pada tahun 1869 oleh Friedrich Miescher yang berhasil mendapatkan nitrogen dan fosfat dari inti sel darah putih. Proses ekstraksi DNA secara konvensional dilakukan dengan menggunakan berbagai senyawa kimia seperti *phenolchloroform*. Metode ini telah banyak ditinggalkan karena membutuhkan waktu yang sangat lama hingga 18 jam dan membutuhkan banyak bahan kimia. Kini ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan lebih praktis menggunakan kit ekstraksi DNA (Adrianto, 2017; Jobes *et al.*, 1995).

2. Amplifikasi

Tahap amplifikasi dilakukan dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR pertama kali dikembangkan oleh Karry Mulis pada tahun 1985. Metode

ini bertujuan untuk menyintesis dan memperbanyak DNA secara *in vitro* dalam jumlah besar dalam waktu yang singkat. Proses PCR dilakukan dengan tiga tahapan utama, yaitu:

1. Denaturasi, proses ini bertujuan untuk memutuskan ikatan hidrogen diantara basa nitrogen, sehingga pita ganda DNA yang saling berpilin terlepas menjadi untai tunggal.
2. *Annealing*, pada tahap ini primer akan menempel pada DNA templat yang komplemen dengan urutan primer.
3. Polimerasi (*extension*), pada tahap ini DNA polimerase akan berikatan dan primer yang telah menempel pada proses *annealing* akan mengalami perpanjangan dari arah 5' menuju 3' (Adrianto, 2017).

3. Elektroforesis

Hasil ekstraksi genom DNA dan hasil PCR dapat divisualisasikan dengan melakukan elektroforesis. Prinsip kerja elektroforesis adalah pergerakan molekul dalam medium yang diberi aliran listrik. Partikel bermuatan negatif seperti DNA akan bergerak menuju kutub positif

sedangkan partikel bermuatan positif bergerak menuju kutub negatif (Adrianto, 2017).

4. Sekuensing

Sekuensing dilakukan untuk mengetahui urutan basa DNA dilakukan metode sekuensing. Macam-macam metode sekuensing diantaranya yaitu metode maxam-gilbert (metode degradasi kimia), metode sanger (metode dideoksi) dan metode *automated sequencing*. Metode yang saat ini paling sering digunakan adalah metode sanger (Adrianto, 2017).

5. Analisis molekuler

Pembandingan hasil sekuensing dengan referensi *database* dapat dilakukan dengan cara melakukan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). BLAST merupakan peralatan bioinformatika yang berhubungan dengan pemakaian basis data sekuen biologis. Pencarian BLAST pada basis data sekuen memungkinkan pencarian sekuen protein maupun asam nukleat yang mirip dengan sekuen yang dilakukan BLAST. BLAST didasarkan pada algoritma *alignment* (penyejajaran) sekuen. Beberapa manfaat BLAST yaitu menemukan gen sejenis pada beberapa organisme,

memeriksa fungsi gen hasil sekuensing, dan memeriksa keabsahan hasil sekuensing (Akbar, 2021).

Sumber DNA yang dapat digunakan dalam DNA *barcoding* dapat diperoleh dari inti, kloroplas, dan mitokondria. Gen-gen yang umum dijadikan sebagai sumber DNA dalam DNA *barcoding* antara lain yaitu ITS, *rbcl*, *matK*, *psbA-trnH*, *rpoC1*, *rpoB*, *ndhJ*, *accD* dan *COI* (Chen *et al.*, 2010; Akbar, 2021).

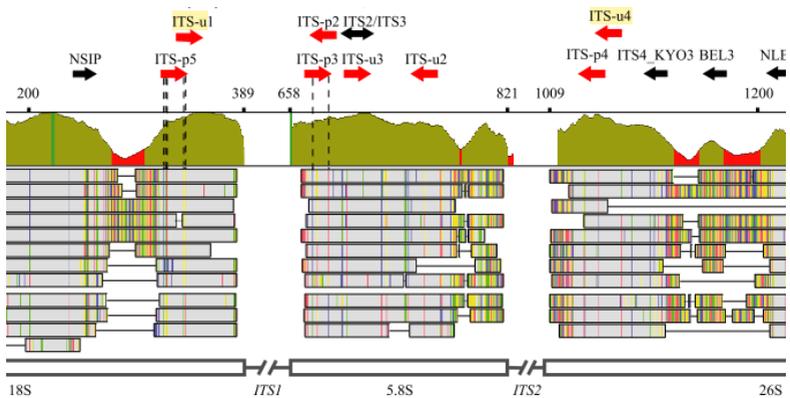
C. Penanda molekuler *Internal Transcribed Spacer*

ITS merupakan penanda molekuler yang dapat digunakan dalam analisis filogenetik karena panjangnya kurang dari 700 *base pair* dan memiliki salinan yang banyak dalam genom inti. ITS memiliki tingkat keberhasilan yang tinggi dalam amplifikasi PCR, sekuensing dua arah (*forward* dan *reverse*) dan tingkat variasi yang tinggi bahkan di antara spesies yang berkaitan erat (Letchuman, 2018; Octavia, 2022). Sekuen ITS memiliki variasi sekuen yang tinggi karena daerah tersebut merupakan daerah *non-coding* yang memiliki laju mutasi lebih tinggi dari daerah *coding*. Pada *region* ITS sering terjadi perubahan materi genetik seperti halnya mutasi sehingga dapat berbeda variasi genetiknya antar spesies (James,1996).

Region barcode yang sering digunakan pada tumbuhan dan berprospek pada *barcoding* salah satunya adalah *Internal*

Transcribed Spacer (ITS). *Region ITS* merupakan suatu urutan RNA dari proses transkripsi utama yang berada di daerah inti. Organisme eukaryotik mempunyai dua daerah ITS yaitu ITS-1 terletak di antara 18S gen dan 5.8S gen, dan ITS-2 terletak di antara 5.8S dan 28S gen. Ketiga gen inti tersebut mempunyai tingkat konservasi yang sangat tinggi (Cheng *et al.*, 2016). ITS pada daerah 18s-28s r-DNA *nuclear* menjadi fokus utama untuk digunakan pada rekonstruksi filogenetik. Karena region ITS 15 memiliki tingkat variasi yang tinggi dibandingkan dengan daerah lainnya (Takono&Okada, 2002).

Internal Transcribed Spacer (ITS) memiliki dua *sub-region* yaitu ITS1 dan ITS2. *sub-region (ITS2)* telah diusulkan sebagai DNA standar penanda barcode pada jamur dan tanaman (Schoch *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011). Salah satu pasangan primer yang mencakup *sub-region* tersebut adalah ITS-u1 dan ITS-u4. Penggunaan pasangan *marker* tersebut pada Angiospermae menghasilkan amplikon sepanjang 745 bp. Letak lokasi *sub-region ITS* yang dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Lokasi target pasangan primer ITS-u1/ITS-u4 pada *Sub-region* ITS (Cheng *et al.*, 2016)

Penggunaan penanda molekuler ITS pada suku Melastomataceae telah banyak digunakan salah satunya adalah pada marga *Bredia* (Kokubugata *et al.*, 2019). Adapula beberapa spesies dalam marga *Medinilla* juga telah terdaftar sekuen nukleotidanya berdasarkan gen ITS pada laman *database* GeneBank diantaranya *M. amplexans*, *M. petelotil*, *M. lanceata*, *M. septentrionalis*, dan *M. speciosa* (Gene Bank, 2022).

D. Keanekaragaman Tumbuhan dalam Al-Qur'an

Tumbuhan yang beranekaragam macamnya merupakan bentuk Kebesaran Allah SWT. Masing-masing memiliki persamaan dan perbedaan dalam morfologi maupun

fisiologinya. Sebagaimana telah disebutkan dalam Al-Quran surah Al-An'am ayat 99 sebagai berikut:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۗ نُنْظِرُوكَ إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ

Artinya : " Dialah yang menurunkan air dari langit lalu dengannya Kami menumbuhkan segala macam tumbuhan. Maka, darinya Kami mengeluarkan tanaman yang menghijau. Darinya Kami mengeluarkan butir yang bertumpuk (banyak). Dari mayang kurma (mengurai) tangkai-tangkai yang menjuntai. (Kami menumbuhkan) kebun-kebun anggur. (Kami menumbuhkan pula) zaitun dan delima yang serupa (bentuk dan warnanya) dan yang tidak serupa (rasanya). Perhatikanlah buahnya pada waktu berbuah dan menjadi masak. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang beriman." (Q.S Al-An'am ayat 99).

Berdasarkan Tafsir As Sa'di yang ditulis oleh Syaikh Abdurrahman bin Nashir as-Sa'di pada abad 14 H, firman-

Nya yang berbunyi “Yang serupa dan yang tidak serupa.” Ada kemungkinan kata tersebut kembali kepada delima dan zaitun, yakni serupa pohon dan daunnya namun tidak serupa buahnya. Ada kemungkinan lain, ia kembali kepada semua pohon dan buah-buahan. Sebagian lainnya mirip dengan sebagian yang lainnya dan ciri-cirinya tidak jauh berbeda, dan sebagian yang lain benar-benar berbeda. Dari itu semua manusia mengambil manfaat, menikmati buah-buahan dan menjadikannya bahan makanan dan mereka juga bisa mengambil pelajaran.

E. Kajian Penelitian Yang Relevan (*state of the art*)

Parijoto merupakan salah satu tanaman yang memiliki potensi besar untuk bioprospeksi dimasa depan karena memiliki senyawa bioaktif yang tinggi sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut melalui *DNA barcoding* (Brazia *et al.*, 2020).

Penelitian sebelumnya banyak meneliti kandungan fitokimia dan manfaatnya. Parijoto mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, glikosida dan terpenoid (Vifta & Advistasari, 2018). Sedangkan untuk manfaatnya dalam kesehatan parijoto telah teruji dapat menghambat pertumbuhan sel kanker (Artanti *et al.*, 2021)

dan berpotensi dapat meningkatkan fertilitas pria (Wijayanti & Ardigurnita, 2019).

Sebagai acuan keanekaragaman spesies Parijoto sebelumnya telah ada beberapa penelitian salah satunya mengenai deskripsi morfologi berbagai macam Parijoto di Kebun Raya Eka Karya Bali, diantaranya *Medinilla speciosa*, *Medinilla alpestris* (Jack.) Bl., dan *Medinilla magnifica* Lindl (Peneng & Sujarwo, 2011).

Penggunaan penanda molekuler ITS telah banyak digunakan pada suku Melastomataceae (Kokubugata *et al.*, 2019). Adapula beberapa spesies dalam genus *Medinilla* juga telah telah terdaftar sekuen nukleotidanya berdasarkan gen ITS pada laman *database* GeneBank diantaranya *M. amplexans*, *M. petelotil*, *M. lanceata*, *M. septentrionalis*, dan *Parijoto* (Gene Bank, 2022). *Internal Transcribed Spacer* (ITS) merupakan penanda molekuler yang memiliki tingkat polimorfisme intraspesifik yang relatif rendah sehingga sangat baik untuk membedakan antar spesies (Blouin, 2002). Dari berbagai penelitian terdahulu tersebut ditemukan *gap research* untuk meneliti determinasi Parijoto *M. speciosa* dari Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara berdasarkan karakter morfologi dan molekuler.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah FavorPrep *Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit* (Favorgen), primer ITS *forward* ITS-u1 (5' GGA AGK ARA AGT CGT AAC AAGG 3') dan *reverse* ITS-u2 (5' GCG TTC AAA GAY TCG ATG RTTC 3'), PowerPol 2x PCR Mix, *microtube* 1,5 µL (Biologix), *microtube* 200 µL (Biologix), *silica gel*, aluminium foil, serbuk agarose (Biorad), pipet tip (Biologix), etanol absolut (Merck), TBE Buffer 1X (Biorad), isopropanol (Merck), GelRed (Biorad), etanol 70%, *liquid nitrogen*, kantong teh, *gloves*, plastik klip, *tissue*, loading dye 6X (Geneaid), dan akuades steril.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Timbangan Analitik (Mettler Toledo), spatula, Erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), gelas beker (Pyrex), *microwave* (Electrolux), *gel documentation set* (Biorad), kit elektroforesis (Mupid-exu) mortar, pestle, gunting, PCR-Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), *microcentrifuge* (Eppendorf), oven (Mettler), mikropipet (Biorad), *microtip* (Biologix), vortex, *sentrifuge*, kit elektroforesis, autoklaf, GelDoc (Bio-RED EZ imager), UV Tray, PCU komputer, kulkas, rak mikrotube, GPS, lux meter, altimeter, kamera, soil pH meter, termometer dan hygrometer.

C. Cara Kerja

1. Pengamatan parameter lingkungan

Pengambilan sampel dari masing-masing lokasi dilakukan pengukuran kondisi lingkungan yang mencakup pH dan suhu tanah, suhu dan kelembaban udara, intensitas cahaya dan ketinggian. Masing-masing parameter diukur dalam tiga kali ulangan. Data yang didapatkan dicari rerata dan standar deviasinya, kemudian dianalisis perbedaan signifikansinya menggunakan software SPSS. Jenis uji yang dilakukan adalah uji normalitas dan *independent t-test*.

2. Identifikasi karakter morfologis

Karakter morfologi yang diidentifikasi mengacu pada jurnal Asih dkk (2021) meliputi Habitus, tangkai daun, bentuk daun, ujung daun, panjang daun, lebar daun, pangkal daun, jumlah venasi daun, jumlah daun setiap ruas, tekstur permukaan atas daun, jenis bunga, bentuk kelopak bunga, jumlah mahkota bunga, jumlah benang sari, jumlah putik, jenis batang, tempat tumbuh bunga, bentuk cabang, dan tekstur permukaan cabang. Karakter yang telah diidentifikasi kemudian disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan kunci determinasi.

Hasil identifikasi morfologi secara deskriptif diolah menjadi data biner menggunakan Mikrossoft Excel 2010. Nilai 1 (satu) untuk fenotip yang terdapat pada tanaman dan nilai 0 (nol) bila fenotip tidak dimiliki tanaman tersebut. Kemiripan antar individu dianalisis berdasarkan algoritma UPGMA dengan software NTSYSpc versi 2.02i untuk menghasilkan dendogram (Mohammadi & Prasanna, 2003).

3. Pengambilan sampel dan Ekstraksi DNA

Bagian tumbuhan yang diekstraksi adalah daun segar yang kondisinya baik, tidak ada luka, tidak terlalu muda maupun terlalu tua. Daun yang dipilih adalah daun ketiga dari pucuk (Muthoharoh, 2011). Daun dipetik, disterilkan dengan alkohol dan disimpan dalam kantong teh. Kantong teh tersebut dimasukkan kedalam plastik klip berisi *silica gel* untuk menyerap cairan pada daun sehingga daun mengering.

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan FAVORGEN FavorPrep™ *Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit* dengan prosedur sesuai yang tertera pada katalognya. Langkah yang pertama adalah dihaluskan 50 mg dari berat basah (hingga 100 mg) jaringan tumbuhan atau 20 mg berat kering dari jaringan tumbuhan dengan

liquid nitrogen hingga menjadi bubuk dan pindahkan ke microtube. Selanjutnya ditambahkan 400µl FAPG1 *buffer* dan 8µl RNase A stok (50mg/ml) kedalam microtube dan vortex.

Sampel yang sudah dilarutkan dinkubasi disuhu ruang selama 2 menit kemudian dinkubasi pada suhu 65°C selama 10~20 menit dan dibolak-balikkan setiap 2-3 menit. Kemudian ditambahkan 130µl FAPG2 *buffer* kedalam *microtube* lalu vortex agar tercampur rata kemudian diinkubasi di freezer selama 5 menit.

Filter coloumn ditempatkan ke *collection tube* dan sampel dipindahkan dari langkah sebelumnya ke *filter coloumn* lalu disentrifugasi dengan kecepatan ~18.000x g selama 3 menit. Supernatan dipindahkan dari *collection tube* ke *microtube* baru. *Filter coloumn* dan *collection tube* dibuang kemudian disesuaikan volume supernatan sebelumnya. Selanjutnya ditambahkan 1,5 kali dari volume sampel dengan FAPG3 *buffer* ke sampel dan lakukan *pipetting (up and down)*. Kemudian FAPG *coloumn* ditempatkan ke *collection tube* baru dan dipindahkan sekitar 750µl dari campuran sampel ke FAPG *coloumn*. Setelah itu sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 18.000x g atau 14.000rpm selama 1 menit. *Flow trough* dibuang dan

FAPG coloum ditempatkan kembali ke collection tube. Setelah 750µl campuran sampel dipindahkan lagi ke FAPG coloum selanjutnya disentrifugasi kembali pada kecepatan 18.000x g atau 14.000rpm selama 1 menit.

Flow trough dibuang dan FAPG *column* tempatkan kembali ke *collection tube*. Setelah ditambahkan 400µl W1 *buffer* ke FAPG *column*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 18.000x g atau 14.000rpm selama 30 detik. *Flow through* dibuang dan FAPG *column* ditempatkan kembali ke *collection tube*. Proses *washing* dilakukan sebanyak dua kali kemudian disentrifugasi pada kecepatan 18.000x g atau 14.000rpm selama 3 menit untuk proses pengeringan. FAPG *column* digabungkan dengan *elution tube (microtube 1,5ml)*, lalu ditambahkan 50~200µl elusi *buffer* yang telah dipanaskan terlebih dahulu ke tengah membran dari FAPG *column*. FAPG *column* diposisikan berdiri selama 1 menit di suhu ruang kemudian disentrifugasi di kecepatan 18.000x g atau 14.000rpm selama 1 menit untuk mengelusikan DNA murni.

4. Amplifikasi DNA Barcode ITS dan Elektroforesis

Amplifikasi dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* berdasarkan *sub-region* ITS tepatnya menggunakan primer *forward* ITS-u1 5'- GGA AGK ARA AGT

CGT AAC AAG G -3' dan *reverse* ITS-u2 5'- GCG TTC AAA GAY TCG ATG RTT C -3' (Cheng *et al.*, 2016). PCR untuk dikirim sebagai sampel sekuensing dilakukan dengan total volume 50 μ L yang terdiri atas 25 μ L MyTaq HS Red Mix PowerPol 2x PCR Mix, 13 μ L ddH₂O steril, 2 μ primer *forward*, 2 μ L primer *reverse* dan 8 μ L DNA template. Sedangkan PCR untuk optimasi primer dilakukan dengan total volume 13 μ L.

Amplifikasi dimulai dengan pra denaturasi dengan suhu 95°C selama 3 menit, kemudian dilanjut ke 3 tahap yang dijalankan sebanyak 34 siklus yaitu: denaturasi dengan suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* dengan suhu 55°C selama 30 detik, dan elongasi dengan suhu 72°C selama 1 menit. Kemudian dilanjut ketahap pascaelongasi selama 10 menit dengan suhu 72°C (Cheng *et al.*, 2016).

Hasil amplifikasi divisualisasikan dengan metode elektroforesis. Agar elektroforesis dibuat dengan konsentrasi 1% yaitu ditimbang 0.8 gr bubuk agarose, dimasukan kedalam erlenmayer dan ditambahkan dengan TBE *buffer* sebanyak 80 ml kemudian dihomogenkan sebentar dan dilarutkan kedalam *microwave* selama 8-10 menit. Kemudian larutan agar didiamkan beberapa detik dan diteteskan 1 μ L gelred. Selanjutnya agarose dituang

dalam cetakan agar yang sudah dipasang *comb* dan ditunggu sampai memadat.

Cetakan agar ditenggelamkan dalam TBE 1X pada alat elektroforesis, dinyalakan mesinnya dan di dalam 100 volt selama 30 menit. Setelah itu, agarose dilepas dari tempat agar dan diletakkan di atas UV tray. Selanjutnya dilakukan visualisasi hasil elektroforesis dengan menggunakan GelDoc dan komputer. Hasil visualisasi disimpan dan dikirim untuk sekuensing.

5. Sekuensing dan Analisis Data Molekuler

Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis yang positif dilakukan sekuensing. Tahap ini diserahkan kepada perusahaan jasa sekuensing. Hasil sekuensing diterima dalam bentuk AB1 File kemudian sekuen *forward* dan *reverse* dilakukan *contig* menggunakan *software* BioEdit. Hasil identifikasi karakter molekuler disajikan dalam bentuk gambar hasil pensejajaran menggunakan program Multaline. Sekuen kemudian di-*submit* pada laman NCBI untuk mendapatkan nomor akses. Untuk tahap *submission* harus memiliki akun NCBI dan *login* ke laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Selanjutnya sekuen yang akan di-*submit* disimpan dalam format FASTA dan disiapkan juga file data sekuen berdasarkan template

yang berlaku. File data sekuen disimpan dalam format *text (Tab delimited)*. Keterangan pendukung mengenai sekuen dilengkapi pada bagian *submission portal* kemudian sekuen dan file data sekuen diupload.

Sekuen hasil *contig* kemudian dicari pembanding-nya pada laman www.ncbi.nlm.nih.gov menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Beberapa sekuen hasil BLAST yang paling mirip berdasarkan *Query cover*, *E value* dan *percent identity*-nya beserta *outgroup* dilakukan *multiple sequence alignment* menggunakan ClustalW pada *software* MEGA kemudian dianalisis dan dicari jarak genetiknya (Thompson,1997). Pembuatan pohon filogenetik dilakukan menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ) dengan algoritma *Tamura 3-parameter model* dan nilai *bootstrap replications* 1000 (Acharya *et al.*, 2022; Saitou and Nei 1987; Tamura, 2011). Kedua sampel diidentifikasi karakter molekulernya dan dibandingkan dengan sekuen yang memiliki kekerabatan paling dekat berdasarkan pohon filogenetik.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Deskripsi Hasil Penelitian

1. Pengamatan Parameter Lingkungan

Hasil pengukuran faktor lingkungan menunjukkan adanya perbedaan ketinggian, intensitas cahaya, kelembaban udara, suhu tanah dan pH tanah. Lokasi pengambilan sampel di Desa Tempur Kabupaten Jepara memiliki ketinggian yang lebih tinggi dan udara yang lebih lembab dibandingkan dengan lokasi pengambilan sampel di Desa Colo Kabupaten Kudus, sedangkan lokasi pengambilan sampel di Desa Colo Kabupaten Kudus memiliki Intensitas cahaya, suhu dan pH tanah yang lebih tinggi dibandingkan dengan lokasi pengambilan sampel di Desa Tempur Kabupaten Jepara. Meskipun terdapat perbedaan faktor lingkungan namun berdasarkan uji *independent T-test* tidak terdapat perbedaan yang nyata secara statistik antara lokasi pengambilan sampel di Desa Colo dan di Desa Tempur. Pengamatan parameter lingkungan di Desa Colo Kabupaten Kudus dilaksanakan pada tanggal 24 September 2022 pada pukul 11.00 WIB dan pengamatan parameter lingkungan di Desa Tempur Kabupaten Jepara dilaksanakan

pada tanggal 22 September 2022 pukul 13.00 WIB. Hasil pengukuran faktor lingkungan dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil pengukuran parameter lingkungan

| Jenis parameter lingkungan | Desa Colo | Desa Tempur |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Ketinggian (mdpl) | 892±0 ^a | 910±0 ^a |
| Intensitas cahaya (Cd) | 144,66±4,04 ^a | 87,33±14,47 ^a |
| Kelembaban udara (RH) | 71±1,73 ^a | 75,66±0,58 ^a |
| Suhu udara (°C) | 29±0 ^a | 29±0 ^a |
| Suhu tanah (°C) | 26,33±0,58 ^a | 24,33±0,58 ^a |
| pH tanah | 6,93±0,12 ^a | 6,8±0,2 ^a |

^a Tidak terdapat perbedaan yang nyata secara statistik pada tingkat kepercayaan 95%

2. Identifikasi Karakter Morfologi Parijoto

Hasil pengamatan karakter morfologi disajikan pada tabel 4.2 dengan total ada 24 karakter yang diamati. Dari 24 karakter tersebut terdapat tujuh karakter yang memiliki variasi yaitu karakter kuantitatif meliputi panjang daun, lebar daun, jumlah venasi, jumlah kelopak bunga dan jumlah benang sari serta karakter kualitatif meliputi warna tangkai bunga dan tempat tumbuh bunga.

Tabel 4.2 Data karakter morfologi Parijoto asal Desa Colo dan Desa Tempur dibandingkan dengan sumber jurnal (Asih *et al.*, 2021)

| Karakter morfologi | Ds. Colo | Ds. Tempur | Ds. Lempuyang (Asih <i>et al.</i> , 2021) |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Habitus | Semak | Semak | Semak |
| Jenis batang | Berkayu, beruas | Berkayu, beruas | Berkayu, beruas |
| Cabang | Kotak | Kotak | Kotak |
| Permukaan cabang | Halus dan gundul | Halus dan gundul | Halus dan gundul |
| Buku-buku | Ditutupi bulu setaceus | Ditutupi bulu setaceus | Ditutupi bulu setaceus |
| Tangkai daun | Subsessils | Subsessils | Subsessils |
| Warna tulang daun | Kemerahan di bagian pangkal bawah | Kemerahan di bagian pangkal bawah | Kemerahan di bagian pangkal bawah |
| Bentuk daun | Elips | Elips | Elips |
| Ujung daun | Tumpul, meruncing | Tumpul, meruncing | Tumpul, meruncing |
| Panjang daun | 10-25 cm | 10-25 cm | 10,1-29 cm |
| Lebar daun | 4-10 cm | 5-11 cm | 4,4-13,5 cm |
| Pangkal daun | runcing, bulat | runcing, bulat | runcing, bulat |
| Jumlah venasi daun | 5 atau 7 | 5 atau 7 | 7 atau 9 |
| Jumlah duduk daun setiap ruas | 3 berhadapan | 3 berhadapan | 3 berhadapan |

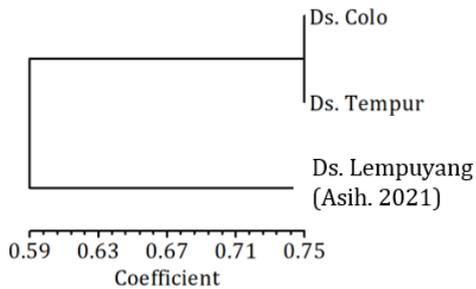
Tabel 4.2 Lanjutan

| Karakter | Ds. Colo | Ds. Tempur | Ds. Lempuyang (Asih <i>et al.</i> , 2021) |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| Permukaan atas daun | Licin | Licin | Licin |
| Jenis bunga | Malai | Malai | Malai |
| Bentuk kelopak bunga | Tabung | Tabung | Tabung |
| Jumlah mahkota bunga | 5 atau 4 | 5 | 4 |
| Jumlah benang sari | 8 atau 10 | 10 | 8 |
| Jumlah putik | 1 | 1 | 1 |
| Jenis batang | Berkayu, beruas | Berkayu, beruas | Berkayu, beruas |
| Tempat tumbuh bunga | Aksilaris dan terminalis | Aksilaris dan terminalis | Terminalis |
| Warna tangkai bunga | Merah muda | Magenta | Merah muda |
| Warna tangkai buah | Magenta | Magenta | Magenta |

Perbedaan karakter morfologi antara *M. speciosa* asal Desa Colo Kabupaten Kudus, Desa Tempur Kabupaten Jepara dan Desa Lempuyang (Asih *et al.*, 2021) juga disajikan dalam kunci determinasi berikut

| | |
|---|-------------------------------|
| 1a. Panjang daun 10-25 cm dengan jumlah venasi daun 5 atau 7..... | 2 |
| 1b. Panjang daun 10,1-29 cm dengan jumlah venasi daun 7 atau 9..... | <i>M. speciosa</i> |
| Ds. Lempuyang (Asih <i>et al.</i> , 2021) | |
| 2a. Bunga tumbuh secara terminalis..... | 3 |
| 2b. Bunga tumbuh secara aksilaris..... | 3 |
| 3a. Mahkota bunga berjumlah 4 atau 5. Benang sari berjumlah 8 atau 10. Tangkai bunga berwarna merah muda..... | <i>M. speciosa</i> Ds. Colo |
| 3b. Mahkota bunga berjumlah 5. Benang sari berjumlah 10. Tangkai bunga berwarna magenta..... | <i>M. speciosa</i> Ds. Tempur |

Hasil rekonstruksi dendogram pada gambar 4.1 menunjukkan koefisien tingkat kesamaan karakter morfologi antara sampel Parijoto asal Desa Colo dan sampel Parijoto asal Desa Tempur yaitu 0,75 atau 75%. Nilai koefisien kesamaan karakter yang lebih dari 75% menunjukkan kemiripan yang tinggi atau keragaman yang rendah (Goncalvales *et al.*, 2014).



Gambar 4.1 Dendrogram morfologi Parijoto berdasarkan algoritma UPGMA

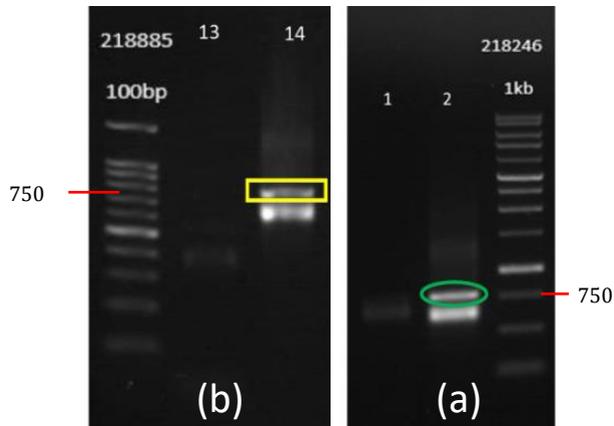
3. Ekstraksi DNA Genom Parijoto

Ekstraksi DNA genom Parijoto dilakukan pada dua tanaman dari setiap lokasi pengambilan sampel. Sampel asal Desa Colo Kabupaten Kudus dikodekan dengan NK1 dan NK2 sedangkan sampel asal Desa Tempur Kabupaten Jepara dikodekan dengan NJ1 dan NJ2. Ekstraksi mulanya dilakukan dengan sampel kering namun belum berhasil pada sampel NK1 dan NK2 sehingga dilakukan pengambilan sampel ulang di Desa Colo Kabupaten Kudus yang diberi kode NK3 dan NK4. Ekstraksi dilakukan pada kedua sampel tersebut dalam kondisi segar. Hasil Ekstraksi DNA terbaik yang digunakan untuk sekuensing adalah sampel NJ2 yang mewakili sampel dari Desa Tempur Kabupaten Jepara dan

NK4 yang mewakili sampel dari Desa Colo Kabupaten Kudus.

4. Amplifikasi DNA *Barcode* ITS

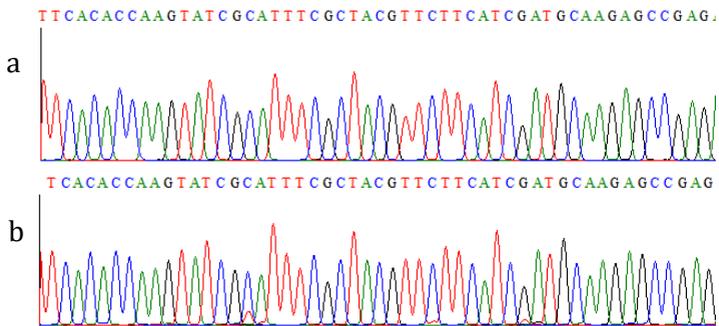
Amplifikasi DNA *Barcode* ITS berhasil dilakukan pada ekstrak sampel NK4 dan NJ2. Amplikon kemudian dikirimkan kepada penyedia jasa sekuensing dan didapatkan hasil uji kualitas amplikon sebagaimana gambar 4.2. Hasil elektroforesis tersebut menunjukkan adanya *multiband*. *Band* target berada pada kisaran panjang 750 bp. Panjang sekuen dengan pasangan penanda molekuler ITS-u1/ ITS-u4 adalah sekitar 745 bp (Cheng *et al.*, 2016).



Gambar 4.2 Hasil amplifikasi sampel NK4 asal Desa Colo (a) dan sampel NJ2 asal Desa Tempur (b)

5. Hasil sekuensing dan analisis data molekuler

Hasil sekuensing yang didapatkan dari penyedia jasa sekuensing merupakan dua file dengan format *AB1 File* berbentuk elektroferogram sebagaimana ditunjukkan pada gambar 4.3. Elektroferogram tersebut menunjukkan hasil yang baik. Elektroferogram yang baik memiliki puncak sinyal yang tidak bertumpuk (*Guspratiwi et al., 2019*).

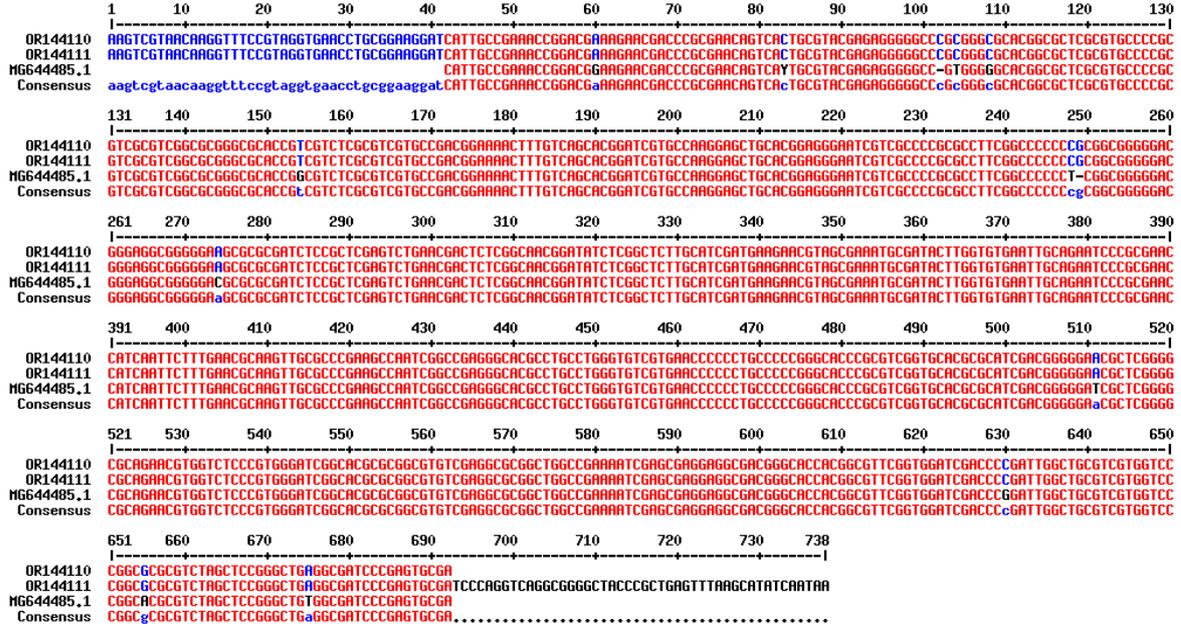


Gambar 4.3 Elektroferogram amplicon sampel NK4 asal Desa Colo (a) dan sampel NJ2 asal Desa Tempur (b)

Hasil *contig* dari sample NK4 adalah sekuen sepanjang 692 bp sedangkan hasil dari *contig* sampel NJ2 adalah sekuen sepanjang 738 bp. Data tersebut menguatkan deskripsi hasil sebelumnya mengenai panjang amplicon pada hasil elektroforesis. Panjang amplicon pasangan *marker* ITSu1/ITSu4 pada angiospermae adalah sekitar 745bp (*Cheng et al., 2016*). Hasil *contig* disajikan dalam

format FASTA pada lampiran 3. Setelah di *submit* ke laman NCBI sampel NK4 dikodekan dengan nomor aksesori OR144110 dan sampel NJ2 dikodekan dengan nomor aksesori OR144110. Kedua sampel juga dilakukan *multiple alignment* dengan sekuen *M. speciosa* (MG644485.1) dari NCBI sebagai pembandingan untuk melihat perbedaan panjang sekuen seperti pada gambar 4.4.

Gambar 4.4 *Multiple alignment* sampel NK4, NJ2 dan *M. speciosa* dengan nomor aksesori MG644485.1



Berdasarkan hasil *multiple alignment* tersebut sampel OR144110 dan OR144111 memiliki sekuen yang *conserved* namun memiliki variasi terhadap sekuen *M. speciosa* (MG644485.1).

Hasil BLAST yang ditunjukkan pada lampiran 4 dipilih 7 sekuen yang paling mirip berdasarkan *Query cover*, *E value* dan *percent identity*-nya. Nilai *Query coverage* menunjukkan persentase sampel yang terpakai dalam analisis BLAST. Urutan nukleotida dikatakan identik apabila memiliki nilai *Query coverage* sedikitnya 40% (Nugraha *et al.*, 2014; Hanin, 2018). Nilai *Expectation value* yang kurang dari 10⁻⁴ atau nilai *E-value* yang semakin mendekati nol menunjukkan tingkat homologi yang tinggi (Isda, 2013). *Percent identity* merupakan nilai tertinggi dari persentase identitas atau kecocokan antara urutan nukleotida *Query* dengan urutan nukleotida *database* yang disejajarkan. Semakin tinggi nilai *Percent identity* maka semakin cocok urutan nukleotida sampel dengan urutan nukleotida *database* (Hanin, 2018). Daftar sekuen dan *outgroup* yang digunakan dalam pembuatan pohon filogenetik dapat dilihat dalam tabel pada tabel 4.3.

Tabel 4.3 Daftar sekuen yang ditambahkan dalam pembuatan pohon filogenetik

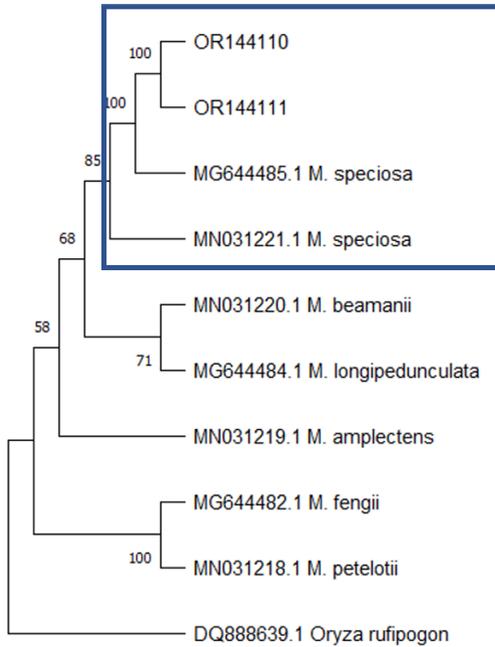
| No. | Nomor aksesori | Species | Max Score | Total Score | Query Cover | E Value | Per. Ident | Acc Length |
|-----|----------------|----------------------------|--|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| 1 | MG644485.1 | <i>M. speciosa</i> | 1131 | 1131 | 88% | 0.0 | 98.00% | 649 |
| 2 | MN031221.1 | <i>M. speciosa</i> | 870 | 870 | 88% | 0.0 | 90.88% | 652 |
| 3 | MN031219.1 | <i>M. amplexans</i> | 787 | 787 | 88% | 0.0 | 88.65% | 652 |
| 4 | MN031220.1 | <i>M. beamanii</i> | 771 | 771 | 88% | 0.0 | 88.15% | 652 |
| 5 | MG644484.1 | <i>M. longipedunculata</i> | 734 | 812 | 83% | 0.0 | 90.14% | 619 |
| 6 | MG644482.1 | <i>M. fengii</i> | 717 | 717 | 88% | 0.0 | 86.63% | 653 |
| 7 | MG644482.1 | <i>M. petelotii</i> | 710 | 710 | 88% | 0.0 | 86.47% | 652 |
| 8 | DQ888639.1 | <i>Oryza rufipogon</i> * | *Sekuen selain dari hasil BLAST yang ditambahkan sebagai <i>outgroup</i> | | | | | |

Perhitungan jarak genetik dari hasil BLAST disajikan pada Tabel 4.4. Tabel tersebut menunjukkan bahwa antara OR144110 dan OR144111 memiliki jarak genetik 0,0000 sehingga kedua sampel tersebut memiliki sekuens yang *conserved*. Selain itu jarak genetik terdekat dari kedua sampel adalah 0,0156 dari sekuen *M. speciosa* dengan nomor aksesori MG644485.1 sedangkan jarak genetik terjauh dari kedua sampel adalah 0,2095 dari sekuen *outgroup* yang ditambahkan yaitu *Oryza rufipogon* dengan nomor aksesori DQ888639.1.

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik dengan metode statistik *Neighbor joining* dengan algoritma *Tamura 3-parameter model* dan nilai *bootstrap replications* 1000 dapat dilihat ada gambar 4.5. Pohon filogenetik tersebut menunjukkan bahwa dua sampel Parijoto dan dua sekuen *M. speciosa* dari NCBI membentuk satu klad. Selain itu sekuen nukleotida yang menunjukkan kekerabatan terdekat adalah *M. speciosa* dengan nomor aksesori MG644485.1. Hal tersebut menguatkan deskripsi hasil sebelumnya bahwa jarak genetik terdekat dengan kedua sampel adalah *M. speciosa* dengan nomor aksesori MG644485.1 sehingga dapat dinyatakan bahwa OR144110 dan OR144110 merupakan spesies *M. speciosa* dan bukan merupakan spesies yang lain.

Tabel 4.4 Jarak genetik hasil alignment sekuen hasil BLASTn dan sekuen sampel

| | NK4 | NJ2 | MG644485.1 <i>M. speciosa</i> | MN031221.1 <i>M. speciosa</i> | MN031219.1 <i>M. amplexens</i> | MN031220.1 <i>M. beamanii</i> | MG644484.1 <i>M. longipedunculata</i> | MG644482.1 <i>M. fengii</i> | MN031218.1 <i>M. petelotii</i> | DQ888639.1 <i>Oryza rufipogon</i> |
|--|---------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| NK4 | | | | | | | | | | |
| NJ2 | 0,0000 | | | | | | | | | |
| <i>M. speciosa</i> (MG644485.1) | 0,0156 | 0,0156 | | | | | | | | |
| <i>M. speciosa</i> (MN031221.1) | 0,0922 | 0,0922 | 0,0855 | | | | | | | |
| <i>M. amplexens</i> (MN031219.1) | 0,1226 | 0,1226 | 0,1154 | 0,1010 | | | | | | |
| <i>M. beamanii</i> (MN031220.1) | 0,1226 | 0,1226 | 0,1193 | 0,1084 | 0,0496 | | | | | |
| <i>M. longipedunculata</i> (MG644484.1) | 0,0954 | 0,0954 | 0,0879 | 0,1452 | 0,0989 | 0,0491 | | | | |
| <i>M. fengii</i> (MG644482.1) | 0,1432 | 0,1432 | 0,1379 | 0,1142 | 0,0614 | 0,0860 | 0,1341 | | | |
| <i>M. petelotii</i> (MN031218.1) | 0,1435 | 0,1435 | 0,1381 | 0,1142 | 0,0614 | 0,0860 | 0,1344 | 0,0000 | | |
| <i>Oryza rufipogon</i> (DQ888639.1) | 0,6249 | 0,6249 | 0,6113 | 0,6107 | 0,5552 | 0,5575 | 0,5776 | 0,5547 | 0,5529 | |



Gambar 4.5 Pohon filogenetik Parijoto berdasarkan metode statistik *Neighbor joining* dengan algoritma *Tamura 3-parameter model* dan nilai *bootstrap replications* 1000.

B. Pembahasan Hasil Penelitian

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah *purposive sampling* yaitu suatu teknik penentuan dan pengambilan sampel yang ditentukan oleh peneliti dengan pertimbangan tertentu (Maharani & Bernard, 2018). Pertimbangan-pertimbangan yang dilakukan dalam teknik *purposive sampling* ini bisa beragam dan bergantung pada kebutuhan dari penelitian yang dilakukan. Lokasi pengambilan sampel ditentukan dengan memilih tanaman Parijoto yang tumbuh di atas tanah dengan usia ± 10 tahun untuk memastikan tanaman yang digunakan sebagai sampel merupakan spesies asli daerah yang diteliti. Parijoto banyak tumbuh dengan bebas di alam namun di Pegunungan Muria habitat liar Parijoto memiliki medan yang curam sehingga lokasi pengambilan sampel yang dipilih dari kedua lokasi adalah di kebun dan pekarangan warga.

1. Parameter Lingkungan di Lokasi Pengambilan Sampel

Pengamatan parameter lingkungan perlu dilakukan dalam penelitian karena sifat yang muncul pada tanaman dapat dipengaruhi oleh faktor keragaman genetik maupun faktor lingkungan (Suzuki *et al.*, 1989). Parameter lingkungan yang diukur meliputi pH tanah, suhu tanah,

suhu udara, kelembaban udara, intensitas cahaya dan ketinggian. Lokasi pengambilan sampel di Desa Tempur Kabupaten Jepara memiliki ketinggian yang lebih tinggi dan udara yang lebih lembab dibandingkan dengan lokasi pengambilan sampel di Desa Colo Kabupaten Kudus. Lokasi pengambilan sampel di Desa Colo Kabupaten Kudus memiliki Intensitas cahaya, suhu dan pH tanah yang lebih tinggi dibandingkan dengan lokasi pengambilan sampel di Desa Tempur Kabupaten Jepara.

Data rerata yang didapatkan dari dua lokasi pengambilan sampel dilakukan uji normalitas untuk mengetahui apakah kedua data tersebut berdistribusi secara normal. Hasil uji normalitas pada lampiran 1 menunjukkan nilai signifikansi (sig.) $0,07 > 0,05$ artinya kedua data tersebut berdistribusi secara normal sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan test selanjutnya yaitu uji *independent t-test* (Sujarweni, 2014). Uji *independent t-test* dilakukan untuk menganalisis perbedaan signifikansi dari parameter lingkungan di kedua lokasi pengambilan sampel. Jenis uji *independent t-test* ini dipilih karena data yang didapatkan merupakan data yang tidak berpasangan. Menurut Sujarweni (2014) nilai signifikansi (sig.) $> 0,05$ menunjukkan bahwa *varians* antara dua kelompok data adalah homogen atau sama. Hasil uji uji *independent t-test*

pada lampiran 2 menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,954 sehingga bisa disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata antara data faktor lingkungan lokasi pengambilan sampel di Desa Colo dan Desa Tempur.

2. Karakter Morfologi *M. speciosa*

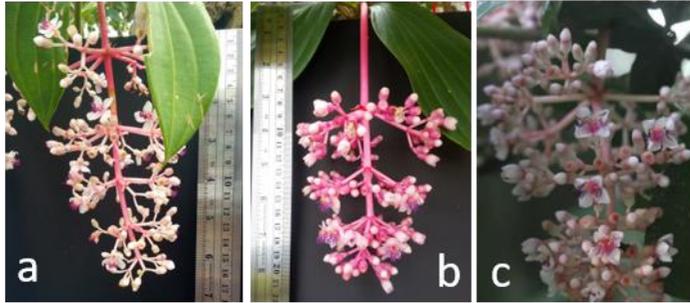
Karakter morfologi yang digunakan dalam analisis morfologi didasarkan pada penelitian Asih dkk (2021) meliputi bagian daun, bunga, buah dan batang pohon. Berdasarkan kunci determinasi pada lampiran 3 pengamatan karakter morfologi Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Parijoto asal Desa Tempur Kabupaten Jepara merupakan *Medinilla speciosa*. Hasil pengamatan karakter morfologi dideskripsikan pada tabel 4.2. Dari 24 karakter yang diamati pada tabel tersebut terdapat empat karakter morfologi yang membedakan sampel Parijoto asal Desa Colo dan Desa Tempur diantaranya karakter kuantitatif meliputi lebar daun, jumlah kelopak dan jumlah benang sari serta karakter kualitatif yaitu warna tangkai bunga. Banyaknya perbedaan karakter kuantitatif 71% dari keseluruhan perbedaan karakter menunjukkan bahwa perbedaan karakter kuantitatif lebih banyak daripada perbedaan karakter kualitatif.

Karakter kuantitatif kurang signifikan dalam menjadi tolak ukur jika dibandingkan dengan karakter kualitatif. Hal ini disebabkan karena karakter kualitatif tumbuhan seperti dipengaruhi oleh beberapa gen yang relatif stabil karena tidak atau sedikit dipengaruhi oleh lingkungan (Rachmah *et al.*, 2023; Jameela *et al.*, 2014).

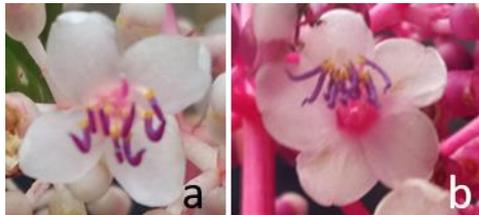
Berdasarkan tabel 4.2 Bagian tanaman yang menunjukkan banyak perbedaan adalah pada bunga. Tangkai bunga Parijoto asal Desa Tempur berwarna lebih gelap dibandingkan Parijoto asal Desa Colo dan gambar dari jurnal pembandingan (Asih *et al.*, 2021) dapat dilihat pada gambar 4.6. Perbedaan intensitas warna bunga dapat disebabkan karena kadar antosianin. Semakin tinggi kadar antosianin maka semakin intensitas warna bunga juga semakin pekat. Kadar antosianin dipengaruhi oleh beragam faktor lingkungan seperti cahaya matahari, iklim dan tanah (Sangadji *et al.*, 2017).

Sampel Parijoto asal Desa Colo memiliki empat atau lima mahkota bunga sedangkan Parijoto asal Desa Tempur hanya memiliki lima mahkota bunga. Selain itu sampel asal Desa Colo memiliki delapan atau sepuluh benang sari sedangkan sampel asal Desa Tempur hanya memiliki sepuluh benang sari sebagaimana yang dapat dilihat pada gambar 4.7. Ciri morfologi tersebut sesuai dengan

penjabaran Backer & Brink (1963) bahwa *M. speciosa* dapat memiliki 4 atau 5 mahkota bunga dengan jumlah benang sari kelipatan dua dari jumlah mahkotanya.



Gambar 4.6 Sampel tandan bunga Parijoto asal Desa Colo (a), asal Desa Tempur (b) dan berdasarkan sumber jurnal (Asih *et al.*, 2021) (c)



Gambar 4.7 Sampel bunga Parijoto asal Desa Colo (a) dan asal Desa Tempur (b)

Berdasarkan deskripsi morfologi pada tabel 4.2 dan dendrogram pada gambar 4.1 menunjukkan bahwa sampel Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan sampel Parijoto asal Desa Tempur Kabupaten Jepara membentuk

klad pada koefisien kesamaan 0,75 artinya memiliki persamaan karakter morfologi sebesar dari 75%. Nilai koefisien kesamaan karakter yang lebih dari 75% menunjukkan kemiripan yang tinggi atau keragaman yang rendah (Goncalvales *et al.*, 2014).

Kemiripan karakter morfologi yang tinggi tidak sesuai dengan pernyataan masyarakat dari masing-masing lokasi pengambilan sampel yang menyatakan bahwa Parijoto dari Desa Colo dan Desa Tempur memiliki perbedaan jelas dalam morfologi. Hal ini mungkin disebabkan karena kesamaan penyebutan beberapa spesies dalam genus *Medinilla* yang juga disebut sebagai Parijoto. Menurut Mumpuni (2014) di pegunungan Muria terdapat dua Parijoto lain selain *M. speciosa* yaitu *M. javanensis* dan *M. verrucosa*. *M. javanensis* merupakan sinonim dari spesies *M. alpestris* (Kartonegoro, 2022; Backer & Brink, 1963). Menurut Asih dkk (2021) *M. alpestris* memiliki perawakan yang sekilas mirip dengan *M. speciosa* akan tetapi *M. alpestris* memiliki duduk daun berhadapan sedangkan *M. speciosa* memiliki duduk daun berkarang 3. Selain itu buah muda *M. alpestris* cenderung berwarna merah sedikit jingga sedangkan *M. speciosa* memiliki buah muda berwarna merah muda. Dalam hal ini perbedaan Parijoto di tingkat

genus disalahpahami sebagai perbedaan tingkat spesies oleh masyarakat.

3. Karakter Molekuler *M. speciosa*

Pengambilan sampel dilakukan sebelum melakukan ekstraksi DNA genom. Bagian tumbuhan yang digunakan dalam ekstraksi DNA adalah daun ketiga dari pucuk. Menurut Muthoharoh (2011) daun ketiga dari pucuk ini mewakili daun muda. Penggunaan silica gel untuk menyerap cairan pada daun sehingga daun mengering dan menjaga sampel agar tidak busuk sebagaimana penelitian Liston dkk (1990) yang menyatakan bahwa DNA tumbuhan dapat di-ekstraksi dari sampel yang dikeringkan menggunakan *silica gel*. Sampel asal Desa Colo Kabupaten Kudus diberi kode NK1 dan NK2 sedangkan sampel asal Desa Tempur Kabupaten Jepara diberi kode NJ1 dan NJ2.

Ekstraksi menggunakan sampel kering berhasil dilakukan pada sampel NJ1 dan NJ2 namun belum berhasil pada sampel NK1 dan NK2. Kegagalan dalam proses ekstraksi DNA dapat disebabkan karena beragam faktor seperti keahlian peneliti, metode ekstraksi, jenis kit yang digunakan serta sampel yang diekstraksi (Octavia *et al.*, 2021). Teknik ekstraksi DNA tumbuhan terbilang lebih sulit dibandingkan dengan ekstraksi DNA sel hewan dan bakteri. Hal ini disebabkan karena adanya dinding sel pada

tumbuhan yang membutuhkan teknik khusus untuk menghancurkannya diantaranya menggunakan pasir silika dan *liquid nitrogen*. Penggunaan *liquid nitrogen* dapat membekukan sampel saat proses penghalusan. Sampel yang dihaluskan dalam kondisi beku dapat mencegah degradasi DNA (Sari *et al.*, 2014). Penghancuran sampel dengan *liquid nitrogen* harus dilakukan dengan tidak membiarkan sampel mencair dan langsung melanjutkan ke langkah selanjutnya dalam ekstraksi DNA.

Pemilihan jenis sampel juga dapat mempengaruhi proses ekstraksi DNA, Jaringan segar dari daun muda lebih direkomendasikan sebagai bahan ekstraksi karena mengandung lebih sedikit komponen polifenol dan terpenoid dibandingkan jaringan yang lebih tua. Pengambilan sampel ulang di Desa Colo Kabupaten Kudus dilakukan untuk mengganti sampel daun kering yang tidak berhasil diekstraksi dengan sampel daun segar yang baru. Dua sampel baru tersebut dikodekan dengan NK3 dan NK4. Keduanya langsung diekstraksi dalam kondisi segar dan dari ekstraksi tersebut kedua sampel berhasil diamplifikasi.

Ketidakberhasilan dalam amplifikasi sampel kering sebelumnya dimungkinkan terjadi karena adanya senyawa yang menghambat amplifikasi PCR. Sebagaimana disebutkan dalam beberapa penelitian terdahulu bahwa

polifenol dan terpenoid yang nampak sebagai jaringan kecoklatan pada daun tua dilepaskan selama proses lisis sel. Senyawa tersebut melekat secara irreversibel pada DNA sehingga seringkali menghambat amplifikasi PCR (Jobes *et al.*, 1995).

Hasil amplifikasi dikirimkan kepada penyedia jasa sekuensing dan didapatkan hasil uji kualitas amplicon sebagaimana gambar 4.3. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya *multiband*. *Multiband* dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya suhu *annealing* yang terlalu rendah atau kelebihan primer. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat mengakibatkan timbulnya pita DNA yang tidak spesifik. Kemunculan *Multiband* tersebut dapat diatasi dengan peningkatan suhu *annealing* atau menggunakan primer yang lebih panjang (Wulandari, 2017). Meskipun terdapat *multiband* pita amplicon yang dipilih tetap disesuaikan dengan panjang amplicon target yaitu pada kisaran 750 bp. Panjang sekuen dengan pasangan penanda molekuler ITS-u1/ ITS-u4 adalah sekitar 745 bp (Cheng *et al.*, 2016).

Hasil sekuensing yang didapatkan dari penyedia jasa merupakan dua file dengan format AB1 File *forward* dan *reverse* untuk masing-masing sampel yang dapat dilihat pada lampiran 3. Untuk sampel NK4 sekuen *forward*-nya

memiliki panjang 633 bp dan *reverse* sepanjang 730 bp. Sedangkan untuk sampel NJ2 sekuen *forward*-nya memiliki panjang 732 bp dan *reverse* sepanjang 729 bp. Kedua file tersebut dilakukan *contig* untuk mendapatkan sekuen yang lebih baik dan siap untuk dilakukan *alignment*.

Hasil *alignment* NK4 dan NJ2 menunjukkan sample NJ2 lebih panjang dibandingkan sampel NK4. Hal ini disebabkan karena kualitas amplikon sampel NK4 kurang baik dibandingkan amplikon sampel NJ2. Sekuen *forward* NK4 jauh lebih pendek dibandingkan sekuen *reverse*-nya. Selain itu bagian belakang dari sekuen *forward* NK4 memiliki elektroferogram yang buruk karena memiliki puncak sinyal yang tidak jelas dan bertumpuk. Elektroferogram yang baik memiliki puncak sinyal yang tidak bertumpuk (Guspratiwi *et al.*, 2019). Sebagian sekuen yang menampilkan elektroferogram buruk dipotong saat proses *contig* untuk menghasilkan data yang baik. Karena pemotongan inilah sekuen NK4 menjadi lebih pendek dibandingkan NJ2 yang memiliki elektroferogram lebih baik. Sekuen hasil *contig* dalam format FASTA dapat dilihat pada lampiran 3. Setelah di *submit* ke laman NCBI sampel NK4 dikodekan dengan nomor aksesori OR144110 dan sampel NJ2 dikodekan dengan nomor aksesori OR144111.

Tujuh sekuens hasil BLAST yang dipilih pada tabel 4.3 merupakan sekuens yang paling mirip berdasarkan *Query cover*, *E value* dan *percent identity*-nya. *Percent query cover* menggambarkan persentase nukleotida yang sama dengan sekuens yang terdaftar pada NCBI. *Expectation value* menunjukkan jumlah perbedaan hasil *alignment* dengan skor yang sesuai dan diharapkan terdapat pada NCBI. Semakin rendah nilai *expectation value*, maka semakin rendah perbedaan sekuennya atau sekuens tersebut memiliki tingkat homologi yang tinggi. *Percent identity* menunjukkan persentase keserasian tertinggi dari suatu sekuens dengan subyek sekuens yang sama (Isda & Sofiyanti, 2019).

Pemilihan tujuh sekuens hasil BLAST di genbank dari genus *Medinilla* pada tabel 4.3 didasarkan pada nilai *percent query cover* yang tinggi yaitu berada pada rentang 83% hingga 88%; nilai *expectation value* yang rendah yaitu nol (0); dan nilai *percent identity* yang tinggi yaitu berada pada rentang 86,47% hingga 98,00%. Selain tujuh sampel hasil BLAST pada Tabel 4.3 juga ditambahkan *outgroup*. Dalam analisis filogenetika kelompok *outgroup* sangat dibutuhkan dan menyebabkan pembagian karakter atau ciri. *Outgroup* yang dipilih adalah outgrup yang dapat terpisah dari klad marga *Medinilla* yaitu *Oryza rufipogon*

dengan nomor akses DQ888639.1 (Hidayat & Pancoro, 2008; Wu *et al.*, 2007). Penggunaan *outgroup* bertujuan sebagai kontrol dalam rekonstruksi pohon filogenetik. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik yang baik menunjukkan *outgroup* yang terpisah dari klad utama.

Analisis jarak genetik dilakukan untuk melihat hubungan kekerabatan. Jarak genetik merupakan ukuran divergensi genetik antar spesies atau antar populasi dengan spesies (Saitou & Nei, 1987). Semakin rendah nilai jarak genetik pada suatu spesies, maka hubungan kekerabatannya semakin dekat (Aprilyanto & Sembiring, 2016). Sedangkan menurut Li dkk (1999) Pembuatan pohon filogenetik bertujuan untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya.

Pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan metode *Neighbor Joining*. Metode statistik ini merupakan salah satu metode analisis filogenetik yang mengasumsikan bahwa terdapat perbedaan laju evolusi di setiap percabangan. Analisis *Neighbor Joining* menggunakan dasar dari *operational taxonomy unit* (OTU) dan jarak genetik (*p-distance*). Kelebihan program ini adalah hanya membutuhkan waktu yang singkat dan dapat diplikasikan terhadap berbagai macam data. Kekurangan dari program

ini adalah kalkulasi jarak dapat menjadi masalah apabila sekuen *divergen* dan memiliki banyak celah pada *alignment* (Octavia *et al.*, 2021).

Bootstrap replications yang digunakan pada pembuatan pohon filogenetik seperti yang terlihat pada Gambar 4.4 yaitu 1000 ulangan. *Bootstrap replication* tersebut digunakan untuk mengevaluasi kestabilan cabang. Cabang dengan nilai bootstrap yang tinggi memiliki validitas yang lebih baik. Nilai *bootstrap* dikatakan stabil apabila nilai *bootstrap* >90%, sedangkan nilai *bootstrap* dikatakan rendah apabila <70% (Osawa *et al.*, 2004). Waktu yang dibutuhkan untuk pembuatan pohon filogenetik ditentukan oleh *bootstrap replications*. Semakin rendah nilai *bootstrap replication* maka semakin cepat waktu yang dibutuhkan dalam pembuatan pohon filogenetik (Hoang *et al.*, 2018). Meskipun penggunaan *bootstrap replication* 100 ulangan banyak digunakan untuk mempersingkat waktu namun penggunaan beberapa ribu ulangan direkomendasikan untuk mendapatkan hasil yang sangat baik (Hedges, 1992).

Berdasarkan tabel 4.4 antara OR144110 dan OR144111 jarak genetik 0,0000 artinya antara kedua sampel tersebut memiliki similaritas 100% atau identik. Hal tersebut diperkuat dengan hasil rekonstruksi pohon filogenetik pada gambar 4.5. Kedua sampel memiliki nilai *bootstrap* 100

sehingga dikategorikan percabangan stabil. Nilai bootstrap diantara 70-100 menunjukkan bahwa percabangan dan pohon filogenetik tidak akan berubah (Simson, 2006). Sekuens OR144110 dan OR144111 berada dalam satu klad dengan dua *M. speciosa* dari NCBI sehingga bisa disebut sebagai monofiletik.

Antara sampel OR144110 dan OR144111 dengan *M. speciosa* (MG644485.1) memiliki jarak genetik 0,0156 artinya sampel tersebut memiliki variasi yang rendah dengan nilai *bootstrap* 100 sehingga dikategorikan sebagai percabangan yang stabil dan memiliki kemiripan tinggi. Sementara itu antara sampel OR144110 dan OR144111 dengan *M. speciosa* (MN031221.1) memiliki jarak genetik 0,0922 artinya sampel tersebut memiliki variasi yang rendah dengan nilai *bootstrap* 84 sehingga dikategorikan sebagai percabangan yang stabil dan memiliki variasi yang rendah.

Pemilihan penanda molekuler ITS dikarenakan *region* ITS merupakan DNA ribosomal yang berada pada inti sel dan merupakan sekuen DNA *non-coding* sehingga diharapkan memiliki variasi genetik yang tinggi sehingga dapat mendeterminasikan karakter genetik di tingkat spesies. Berdasarkan karakter molekuler *region* ITS menunjukkan sekuen yang *conserved* antara sampel

Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Parijoto asal Desa Tempur Kabupaten Jepara. Hal tersebut menunjukkan bahwa penanda molekuler ITS belum bisa menunjukkan variasi genetik pada Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Parijoto asal Desa Tempur Kabupaten Jepara.

4. Korelasi Karakter Morfologi dan Molekuler

Berdasarkan hasil pengamatan 24 karakter morfologi didapatkan nilai koefisien persamaan karakter sebanyak 75%. Nilai koefisien tersebut menunjukkan bahwa kedua sampel memiliki banyak persamaan berdasarkan penanda morfologi (Goncalvales *et al.*, 2013). Berdasarkan tabel 4.2 perbedaan antara sampel Parijoto asal Desa Colo dan Desa Tempur lebih banyak pada karakter kuantitatif dibandingkan karakter kualitatif yaitu sebanyak 71% dari keseluruhan perbedaan karakter. Perbedaan karakter kuantitatif cenderung disebabkan karena faktor lingkungan daripada faktor genetik (Rachmah *et al.*, 2023; Jameela *et al.*, 2014). Hal tersebut tidak sesuai dengan hasil pengukuran parameter lingkungan yang menyatakan bahwa kondisi lingkungan di dua lokasi pengambilan sampel tidak berbeda nyata secara statistik.

Berdasarkan hasil *multiple alignment* dan perhitungan jarak genetik sampel Parijoto asal Desa Colo dan sampel

Parijoto asal Desa Tempur menunjukkan sekuen *region Internal Transcribed Spacer* (ITS) yang *conserved*. Selain itu hasil rekonstruksi pohon filogenetik juga menunjukkan dua sampel mengelompok dengan dua sekuen *M. speciosa* di NCBI membentuk satu klad. Hal tersebut mendukung data morfologi yang menunjukkan kesamaan yang tinggi antara sampel Parijoto asal Desa Colo dengan sampel Parijoto asal Desa Tempur serta keduanya merupakan spesies *M. speciosa* berdasarkan *region* ITS.

Penggolongan tanaman dibawah tingkat spesies diantaranya adalah subspesies, varietas dan forma. Penggolongan subspecies dan varietas didefinisikan sebagai bagian dari evolusi yang terkait dengan faktor geografis, ekologi dan/atau filogenetik. Varietas adalah sekelompok tanaman dari suatu jenis atau spesies yang ditandai oleh bentuk dan pertumbuhan tanaman, daun, bunga, buah, biji, dan ekspresi karakter atau kombinasi genotipe yang dapat membedakan dengan jenis atau spesies yang sama oleh sekurang-kurangnya satu sifat yang menentukan dan sifat tersebut diwariskan pada keturunan apabila dilakukan perbanyakan atau memiliki heritabilitas yang tinggi (Departemen Pertanian 2002). Forma adalah perbedaan dibawah subspecies dan varietas yang tidak

memiliki derajat integritas geografis, ekologis maupun filogenetik (Hamilton & Reichard, 1992).

Perbedaan parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Parijoto asal Desa Tempur Kabupaten Jepara belum bisa disebut sebagai perbedaan di tingkat varietas karena masih dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai heritabilitas karakter pembeda. Berdasarkan karakter morfologi dan molekuler yang telah disebutkan diatas maka perbedaan antara Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan Parijoto asal Desa Tempur Kabupaten Jepara merupakan forma.

C. Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini dapat menjadi bahan pertimbangan bagi penelitian selanjutnya agar didapatkan hasil penelitian yang lebih baik karena memiliki beberapa keterbatasan, antara lain:

1. Penelitian hanya terbatas pada satu lokasi pengambilan sampel di Desa Colo Kabupaten Kudus dan satu lokasi di Desa Tempur Kabupaten Jepara
2. Sekuen yang digunakan pada penelitian ini hanya berasal dari satu region yaitu *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dan hasil penelitian menunjukkan sekuen yang *conserved* antara sampel Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan sampel Parijoto asal Desa Tempur Kabupaten Jepara.

3. Karakter morfologi yang diamati hanya terbatas pada karakter yang dapat diamati peneliti

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dan analisis hasil penelitian yang telah dilakukan, simpulan pada penelitian ini yaitu:

1. Sampel Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus dan sampel Parijoto asal Desa Tempur Kabupaten Jepara memiliki kesamaan dan perbedaan dalam segi morfologinya. Berdasarkan hasil rekonstruksi dendogram tingkat kesamaan koefisien karakter morfologi antara Parijoto asal Desa Colo dan Parijoto asal Desa Tempur memiliki nilai yang tinggi yaitu 0,75 atau 75%.
2. Berdasarkan penanda molekular ITS sampel Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus memiliki karakteristik panjang sekuen 692 bp dan sampel Parijoto asal Desa Colo Kabupaten Kudus memiliki karakteristik dengan panjang sekuen 738 bp, tidak jauh dari rata-rata panjang sekuen ITS dengan pasangan primer ITSu1/ITSu4 yaitu ± 645 bp. Kedua sampel juga menunjukkan sekuen yang *conserved*.

B. Saran

1. Pengukuran parameter lingkungan pada masing-masing lokasi sebaiknya dilakukan pada waktu yang sama dan

perlu dilakukan pengukuran lebih lanjut mengenai parameter lingkungan lain seperti kandungan zat hara dalam tanah

2. Pengambilan sampel sebaiknya dilakukan pada lebih banyak lokasi pengambilan sampel supaya data yang didapatkan lebih akurat
3. Penelitian lanjut mengenai morfologi Parijoto dilakukan menggunakan lebih banyak karakter morfologi baik kuantitatif maupun kualitatif
4. Penelitian mengenai metabolit sekunder Parijoto perlu dilakukan khususnya di Desa Colo Kabupaten Kudus dan Desa Tempur Kabupaten Jepara
5. Penelitian lanjut mengenai determinasi Parijoto (*M. speciosa*) menggunakan *DNA barcoding* perlu dilakukan dengan mencoba penanda molekuler yang lain untuk dapat melihat variasi genetik.

REFERENCES

- Acharya, G. C., Mohanty, S., Dasgupta, M., Sahu, S., Singh, S., Koundinya, A. V. V., Kumari, M., Naresh, P., & Sahoo, M. R. (2022). Molecular Phylogeny, DNA Barcoding, and ITS2 Secondary Structure Predictions in the Medicinally Important *Eryngium* Genotypes of East Coast Region of India. *Genes*, *13*(9). <https://doi.org/10.3390/genes13091678>
- Adrianto, H. (2017). *Buku Ajar Biologi Sel dan Molekuler* (1st ed.). Deepublish.
- Ahmed, S. (2022). DNA Barcoding in Plants and Animals: A Critical Review. *Preprints*, *January*. <https://doi.org/10.20944/preprints202201.0310.v1>
- Artanti, A. N., Pujiastuti, U. H., Priharsara, F., & Rakhmawati, R. (2020). Synergistic Cytotoxicity Effect by Combination of Methanol Extract of Parijoto Fruit (*Medinilla speciosa* Reinw. ex. Bl) and Cisplatin Against Hela Cell Line. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, *11*(1), 16. <https://doi.org/10.14499/indonesianjcanchemoprev11iss1pp16-21>
- Artanti, A. N., Pujiastuti, U. H., Susanto, R. K., Pratiwi, L. D., Priharsara, F., & Rakhmawati, R. (2021). Cytotoxicity effect of nonpolar extract from parijoto (*medinilla speciosa* reinw. ex. bl) fruit against hela and widr cell line. *Journal of Physics: Conference Series*, *1912*(1), 16–21. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1912/1/012048>

- Aryana, IGP Muliarta. 2018. Uji Keseragaman, Heritabilitas dan Kemajuan Genetik Galur Padi Beras Merah Hasil Seleksi Balik di Lingkungan Gogo. *CROP AGRO, Jurnal Ilmiah Budidaya*. Vol. 3 (1) 2621-5748
- Asih, N. P., Sudirga, I. G., & Tirta, I. G. (2021). The Diversity, Distribution and Conservation of Bali's *Medinilla* in Eka Karya Bali Botanical Garden. *Jurnal Wasian*, 8(2), 103–113. <https://doi.org/10.20886/jwas.v8i2.6286>
- Brazia, A., Adi, L., Kaho, M., Lindawati, Rosaria, Rustiami, H., & Sukara, E. (2020). *Upgrading Indonesian Local Ethnomedicinal Knowledge with Molecular Phylogenetics*. 194(FANRes 2019), 297–305. <https://doi.org/10.2991/aer.k.200325.059>
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y., & Zhou, S. (2016). Barcoding the kingdom Plantae: New PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 138–149. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12438>
- Goncalvales, R., Silva, and Valentao. 2013. Influence of Taro (*Colocasia esculenta* L. Shott) Growth Conditions on the Phenolic Composition and Biological Properties. *Food Chemistry*. 14: 3480-3485.
- Hamilton, C. W., & Reichard, S. H. 1992. Current practice in the use of subspecies, variety, and forma in the classification of wild plants. *Taxon*, 41(3), 485-498.
- Hanum, A. S., Prihastanti, E., & Jumari. (2017). Ethnobotany of utilization, role, and philosophical meaning of parijoto (*Medinilla*, spp) on Mount Muria in Kudus Regency,

- Central Java. *AIP Conference Proceedings*, 1868(2017).
<https://doi.org/10.1063/1.4995210>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003).
Biological identifications through DNA barcodes.
Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,
270(1512), 313–321.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011).
Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 6(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>
- Jameela, H., Sugiharto, A. N., Soegiyanto, A. 2014. Keragaman
Genetik dan Heritabilitas Karakter Komponen Hasil pada
Populasi F2 Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) Hasil
Persilangan Varietas Introduksi dengan Varietas Lokal.
Jurnal Produksi Tanaman, Volume 2 (4)
- Jobes, D. V., Hurley, D. L., & Thien, L. B. 1995. Plant DNA
isolation: a method to efficiently remove polyphenolics,
polysaccharides, and RNA. *Taxon*, 44(3), 379-386.
- Kartonegoro, A.. 2022. Annotated checklist of the *Medinilla*
(Melastomataceae) of Malesia. *Rheedea*, 32, 221-279.
- Kokubugata, G., Nakamura, K., Kuo, W. H., Qi, Z. C., Chung, K. F.,
Fu, C. X., Suzuki, Y., & Yokota, M. (2019). Reappraisal of
tashiroea as a genus independent of *breidia*
(Melastomataceae) based on molecular data. *Phytotaxa*,
392(1), 75–83.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.392.1.8>

- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). DNA Barcoding-a Windfall for Tropical Biology? *Biotropica*, 40(4), 405–408. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2008.00426.x>
- Maharani, S., Bernard, M., 2018. Analisis Hubungan Resiliensi Matematik Terhadap Kemampuan Pemecahan Masalah Siswa pada Materi Lingkaran. *Jurnal Pembelajaran Matematika Inovatif*. Vol.1 (5)
- Malik, A., & Kusumarini, N. (2019). Identifikasi Jenis-Jenis Tumbuhan Sekitar Mata Air Tiga Rasa Sebagai Upaya Konservasi Air Di Gunung Muria Kudus. *Al-Hayat: Journal of Biology and Applied Biology*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.21580/ah.v2i1.4645>
- Melinda, S., Annisaa', E., & Sasikirana, W. (2021). Potensi Sitotoksik Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) Terpurifikasi pada Sel Kanker Serviks HeLa. *Generics: Journal of Research in Pharmacy*, 1(2), 44–52. <https://doi.org/10.14710/genres.v1i2.11100>
- Milanda, T., Fitri, W. N., Barliana, M. I., Chairunnisaa, A. Y., & Sugiarti, L. (2021). Antifungal activities of *Medinilla speciosa* Blume fruit extracts against *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum*. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, 11(3), 1–8. <https://doi.org/10.51847/XDBIHmqd2P>
- Muharror, A. (2020). Jadi Rebutan. Parijoto Resmi Menjadi Tanaman Lokal Jepara. In *Gatra.com*. <https://www.gatra.com/news-495519-ekonomi-jadi-rebutan-parijoto-resmi-menjadi-tanaman-lokal-jepara.html>

- Nahdi, M. S., Martiwi, I. N. A., & Arsyah, D. C. (2016). The ethnobotany of medicinal plants in supporting the family health in Turgo, Yogyakarta, Indonesia. *Biodiversitas*, *17*(2), 900–906. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d170268>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, *10*(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Octavia, D., Mukaromah, A. S., Martiansyah, I., Mimin, Ma'mun, Rukmanto, H. 2021. Isolasi DNA Tumbuhan Hasil Eksplorasi di Nusakambangan dengan Metode Kit di Laboratorium Treub, Kebun Raya Bogor. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. Vol. 7 (1)
- Peneng, I. N., & Sujarwo, W. (2011). Morphological Description of *Medinilla* Spp . In Bali Botanic Garden In Order to Develop as Ornamental Plant. *Widyariset*, *14*(3), 497–506.
- Purba, E. C., Silalahi, M., & Nisyawati. (2018). Gastronomic ethnobiology of “terites”—a traditional Batak Karo medicinal food: A ruminant’s stomach content as a human food resource. *Journal of Ethnic Foods*, *5*(2), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2018.06.002>
- Sangadji, I., Rijal, M., Astri K., Y. 2017. Kandungan Antosianin di dalam Mahkota Bunga Beberapa Tanaman Hias. *Jurnal Biology Science & Education*. Vol. 6 (2). 2541-1225
- Sari, S. K., Listyorini, D., Mazieda, M. N., & Sulasmi, E. S. 2014. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi dna pada daun cabai rawit (*Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau) menggunakan genomic DNA mini kit (plant) Geneaid. In *Proceeding*

Biology Education Conference: Biology, Science, Environmental, and Learning (Vol. 11, No. 1, pp. 65-70).

- Siqhny, Z. D., Azkia, M. N., & Kunarto, B. (2020). Karakteristik Nanoemulsi Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume). *Jurnal Teknologi Pangan Dan Hasil Pertanian*, 15(1), 1. <https://doi.org/10.26623/jtphp.v15i1.1888>
- Sukma, M. O., Lianah, L., & Hidayat, S. (2021). Diversity of Butterflies (Ordo Lepidoptera) and Flower Plants in Mount Muria Kudus, Central Java. *Jurnal Biodjati*, 6(1), 122–135. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v6i1.10070>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tusanti, I., Johan, A., & Kisdjamiatun, R. (2014). Sitotoksitas in vitro ekstrak etanolik buah parijoto (*Medinilla speciosa*, reinw.ex bl.) terhadap sel kanker payudara T47D. *Jurnal Gizi Indonesia (The Indonesian Journal of Nutrition)*, 2(2), 53–58. <https://doi.org/10.14710/jgi.2.2.53-58>
- Umiyati, W., Pramesti, M. A., & Pujiastutik, E. (2021). Pest and Disease Identification in Parijoto Plant (*Medinilla speciosa* blume) at Nglurah Tawangmangu. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(3), 1073–1080. <https://doi.org/10.29303/jbt.v21i3.2970>

- Vifta, R. L., & Advistasari, Y. D. (2018). Skrining Fitokimia, Karakterisasi, dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.). *Prosiding Seminar Nasional Unimus*, 1, 8–14.
- Wibowo, H. A., Wasino, & Setyowati, D. L. (2012). Kearifan Lokal dalam Menjaga Lingkungan Hidup (Studi Kasus Masyarakat di Desa Colo Kecamatan Dawe Kabupaten Kudus). *Journal of Educational Social Studies*, 1(1). <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-11-0760>
- Wijayanti, D., & Ardigurnita, F. (2019). Potential of Parijoto (*Medinilla speciosa*) Fruits and Leaves in Male Fertility. *Animal Production*, 20(2), 81. <https://doi.org/10.20884/1.jap.2018.20.2.685>
- Wu, H. H., Zhao, X. H., Zong, X. Y., Ding, R., & Chen, X. H. .2020. Complete mitochondrial genome of *Medinilla magnifica* (Myrtales, Melastomataceae). *Mitochondrial DNA Part B*, Vol. 5(2), 1716-1717.
- Wulandari, Aisyah. 2017. Optimasi dan Validasi Metode Most Probable Number (MPN) dengan Kofirmasi Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Deteksi *Salmonella* spp. pada Ayam Goreng. Skripsi. Universitas Negeri Jakarta.
- Zulfahmi. 2013. Penanda DNA untuk Analisis Genetik Tanaman (DNA Markers for Plants Genetic Analysis).
- Octavia, Devi. 2022. Determinasi *Globba* sp. (Zingiberaceae) Asal Sumatra Utara Koleksi Kebun Raya Bogor Menggunakan DNA Barcoding Region Internal Transcribed Spacer. Skripsi. Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang

- Akbar, Fauzi. 2021. Konservasi Genetik Hantap (*Sterculia oblongata* R. Br.) Menggunakan DNA Barcoding Sekuen psbA-trnH. Skripsi. Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang
- Rachmah, A. N., Febriana, A., Kusumarini, N., Oktaviani, E., & Mukaromah, A. S. 2023. Authentication of Three Wax Apples Cultivars (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & LM Perry) Based on Morphological Character and Fruit Metabolite Profile. *Floribunda*, 7(2), 64-74.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Uji normalitas Sig >0,05 = tidak ada perbedaan nyata secara statistik

| | | Levene's Test for Equality of Variances | | Independent Samples Test | | | | t-Test for Equality of Means | | 95% Confidence Interval of the Difference | |
|------|-----------------------------|---|------|--------------------------|-------|--------------------------|-------------|------------------------------|-----------------------|---|-----------|
| | | F | Sig. | t | df | Significance One-Sided p | Two-Sided p | Mean Difference | Std. Error Difference | Lower | Upper |
| Data | Equal variances assumed | .004 | .954 | -.030 | 10 | .488 | .976 | -6.13333 | 201.99271 | -456.20114 | 443.93448 |
| | Equal variances not assumed | | | -.030 | 9.992 | .488 | .976 | -6.13333 | 201.99271 | -456.24778 | 443.98111 |

Lampiran 2 Uji *Independent T-test*

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Unstandardized Residual | |
|--|-------------------------|-------------------------|------|
| N | | 6 | |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | .0000000 | |
| | Std. Deviation | 23.91289349 | |
| Most Extreme Differences | Absolute | .380 | |
| | Positive | .380 | |
| | Negative | -.277 | |
| Test Statistic | | .380 | |
| Asymp. Sig. (2-tailed) ^c | | .007 | |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) ^d | Sig. | .007 | |
| | 99% Confidence Interval | Lower Bound | .005 |
| | | Upper Bound | .009 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. Lilliefors' method based on 10000 Monte Carlo samples with starting seed 2000000.

Group Statistics

| | Lokasi | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|------|--------|---|----------|----------------|-----------------|
| Data | Tempur | 6 | 188.8533 | 354.66510 | 144.79142 |
| | Colo | 6 | 194.9867 | 344.99131 | 140.84211 |

Lampiran 3 Kunci determinasi *Medinilla* (Backer & Brink, 1963)**1. *Medinilla speciosa* Blume****Kunci determinasi:**

1b-3a-4a

2. *Medinilla verucosa* (Bl.) Bl.**Kunci determinasi:**

1b-3b-5b-8b-9a

3. *Medinilla alpestris* (Jack) Bl. Syn *M. javanensis* (Bl.) Bl.**Kunci determinasi:**

1b-3b-5b-8b-9b

Lampiran 3 Sekuen hasil *contig*

>NK4

AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT
 TGCCGAAACCGGACGAAAGAACGACCCGCGAACAGTCACTGCGT
 ACGAGAGGGGGCCCGCGGGCGCACGGCGCTCGCGTGCCCCGCGT
 CGCGTCGGCGCGGGCGCACCGTCGTCTCGCGTCGTGCCGACGGA
 AAAC TTTGT CAGCACGGATCGTGCCAAGGAGCTGCACGGAGGGA
 ATCGTCGCCCCGCGCCTTCGGCCCCCGCGGCGGGGACGGGA
 GGCGGGGAAGCGCGGATCTCCGCTCGAGTCTGAACGACTCTC
 GGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCGA
 AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCAA
 TTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCAATCGGCCGAGGGCA
 CGCCTGCCTGGGTGTCTGTAACCCCCCTGCCCCGGGCACCCGC
 GTCGGTGCACGCGCATCGACGGGGGAACGCTCGGGGCGCAGAAC
 GTGGTCTCCCGTGGGATCGGCACGCGGGCGTGTCTGAGGCGCGG
 CTGGCCGAAAATCGAGCGAGGAGGCGACGGGCACCACGGCGTTC
 GGTGGATCGACCCCGATTGGCTGCGTCTGGTCCCGGCGCGCGT
 CTAGCTCCGGGCTGAGGCGATCCCGAGTGCGA

>NJ2

AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT
 TGCCGAAACCGGACGAAAGAACGACCCGCGAACAGTCACTGCGT
 ACGAGAGGGGGCCCGCGGGCGCACGGCGCTCGCGTGCCCCGCGT
 CGCGTCGGCGCGGGCGCACCGTCGTCTCGCGTCGTGCCGACGGA

AAACTTTGTCAGCACGGATCGTGCCAAGGAGCTGCACGGAGGGA
ATCGTCGCCCCGCGCCTTCGGCCCCCCCCGCGGCGGGGGACGGGA
GGCGGGGGAAGCGCGGATCTCCGCTCGAGTCTGAACGACTCTC
GGCAACGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCGA
AATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCAA
TTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCAATCGGCCGAGGGCA
CGCCTGCCTGGGTGTGCTGAACCCCCCTGCCCCGGGCACCCGC
GTCGGTGCACGCGCATCGACGGGGGAACGCTCGGGGCGCAGAAC
GTGGTCTCCCGTGGGATCGGCACGCGGGCGTGTGCGAGGCGCGG
CTGGCCGAAAATCGAGCGAGGAGGCGACGGGCACCACGGCGTTC
GGTGGATCGACCCCGATTGGCTGCGTGTGGTCCCGGCGCGCGT
CTAGCTCCGGGCTGAGGCGATCCCGAGTGCATCCAGGTCAGG
CGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAAT

Lampiran 4 Daftar sekuen hasil BLAST

| No. | Nomor akses | Species | Max Score | Total Score | Query Cover | E Value | Per. Ident | Acc Length |
|-----|----------------------------|----------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| 1 | MG644485.1 | <i>M. speciosa</i> | 1131 | 1131 | 88% | 0.0 | 98.00% | 649 |
| 2 | MN031221.1 | <i>M. speciosa</i> | 870 | 870 | 88% | 0.0 | 90.88% | 652 |
| 3 | MN031219.1 | <i>M. amplectens</i> | 787 | 787 | 88% | 0.0 | 88.65% | 652 |
| 4 | MN031220.1 | <i>M. beamanii</i> | 771 | 771 | 88% | 0.0 | 88.15% | 652 |
| 5 | MG644484.1 | <i>M. longipedunculata</i> | 734 | 812 | 83% | 0.0 | 90.14% | 619 |
| 6 | MG644482.1 | <i>M. fengii</i> | 717 | 717 | 88% | 0.0 | 86.63% | 653 |
| 7 | MG644482.1 | <i>M. beamanii</i> | 717 | 717 | 76% | 0.0 | 89.05% | 618 |
| 8 | MG644482.1 | <i>M. petelotii</i> | 710 | 710 | 88% | 0.0 | 86.47% | 652 |
| 9 | MF348879.1 | <i>M. cumingii</i> | 636 | 636 | 47% | 0.0 | 99.15% | 353 |
| 10 | KP093024.1 | <i>M. septentrionalis</i> | 625 | 625 | 98% | 1e-179 | 82.88% | 723 |
| 11 | OL536562.1 | <i>M. magnifica</i> | 592 | 592 | 47% | 1e-169 | 96.88% | 353 |
| 12 | MN031231.1 | <i>M. septentrionalis</i> | 501 | 501 | 83% | 2e-142 | 82.10% | 635 |

Lampiran 4 Lanjutan

| No. | Nomor akses | Species | Max Score | Total Score | Query Cover | E Value | Per. Ident | Acc Length |
|-----|----------------------------|---------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| 13 | KR532361.1 | <i>M. septentrionalis</i> | 501 | 501 | 59% | 2e-142 | 87.58% | 493 |
| 14 | MG644480.1 | <i>M. asamica</i> | 481 | 481 | 83% | 2e-136 | 81.51% | 636 |
| 15 | OL536561.1 | <i>M. crassifolia</i> | 457 | 457 | 47% | 4e-129 | 90.08% | 352 |
| 16 | MN031232.1 | <i>M. lanceata</i> | 455 | 455 | 83% | 1e-128 | 80.91% | 627 |
| 17 | KR532359.1 | <i>M. septentrionalis</i> | 348 | 348 | 48% | 3e-96 | 84.72% | 410 |
| 18 | KR532360.1 | <i>M. septentrionalis</i> | 318 | 318 | 46% | 2e-87 | 84.01% | 394 |
| 19 | KR532358.1 | <i>M. lanceata</i> | 311 | 311 | 46% | 3e-85 | 83.53% | 396 |
| 20 | KR532357.1 | <i>M. lanceata</i> | 309 | 309 | 46% | 1e-84 | 83.48% | 395 |
| 21 | MG518547.1 | <i>M. squilula</i> | 139 | 139 | 12% | 2e-33 | 94.44% | 182 |
| 22 | MG518548.1 | <i>M. chermizonii</i> | 73.1 | 73.1 | 6% | 2e-13 | 92.16% | 318 |

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

1. Nama Lengkap : Nazhifa Fairuz Maulida
2. Tempat & Tanggal Lahir : Semarang, 16 Juni 2001
3. Alamat Rumah : Jl. Cendana Utara IV No. 86.
Sambiroto, Tembalang, Kota Semarang
4. No. HP : 088221023139
5. E-mail : nazhifafairuz@gmail.com,
nazhifa.fairuz_1908016024@student.walisongo.ac.id

B. Riwayat Pendidikan

1. Pendidikan Formal
 - a. SDIT Tunas Harapan lulus tahun 2013
 - b. Mts NU Banat Kudus lulus tahun 2016
 - c. MA NU Banat Kudus lulus tahun 2019
 - d. UIN Walisongo Semarang lulus tahun 2023
2. Pendidikan Non-Formal
 - a. TPQ As Sahal Sambiroto, Tembalang, Semarang
 - b. Ma'had al Ulumisy Syar'iyah lil Banat Yanbu'ul Quran
Kudus
 - c. Pondok Pesantren Yanabiul Ulum Warrohmah, Kudus