

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Karakteristik Morfologi Pada Daun Tumbuhan *Manihot esculenta* Cantz

Berdasarkan gambar karakteristik morfologi pada tumbuhan *Manihot esculenta* Cantz dapat diamati dari hasil RAPD menggunakan primer OPA 2, OPA 3, OPA 5, OPA 7, OPD 11, OPD 13. Berikut ini hasil tahapan dari karakteristik morfologi yang telah dilakukan terhadap daun tumbuhan *Manihot esculenta* Cantz.

Tabel 4.1 Karakteristik Morfologi Daun *Manihot esculenta* Cantz

No	Gambar	Nama Sampel	Warna Daun	Jumlah Helai	Bentuk Daun
1		Daun Ubi Genderuwo	Hijau Tua	7	Tulang Menjari
2		Daun Ubi Roti	Hijau Tua	7	Tulang Menjari Tetapi Sempit

3		Daun Ubi Keriting	Hijau Muda	5	Berkerut Dan Bergelombang
4		Daun Ubi Jari	Hijau Muda	7	Memanjang Dan Sempit

Hasil karakteristik morfologi daun ubi genderuwo memiliki warna daun hijau tua memiliki 7 helai daun dengan bentuk daun tulang menjari, daun ubi roti memiliki warna hijau tua dengan helai 7 dan memiliki bentuk daun tulang menjari sempit. Daun ubi keritik memiliki warna hijau muda dan memiliki 5 helai daun yang berbentuk bergelombang atau berkerut, sedangkan pada daun ubi jari memiliki warna hijau muda dengan helai 7 dan memiliki bentuk daun memanjang dan sempit. Daun ubi genderuwo dan daun ubi roti memiliki kesamaan dari segi warna, helai daun, dan bentuk daun. Sedangkan daun ubi keriting dan daun ubi jari sangat berbeda jauh dari segi warna, helai daun, dan bentuk daun.

4.1.1. Hasil Isolasi DNA *Manihot esculenta* Cantz

DNA yang dimurnikan diekstraksi selama tahap isolasi DNA dan digunakan dalam prosedur PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Isolasi DNA harus dilakukan dengan cepat dan cermat, dan instrumen steril harus digunakan untuk menghindari kontaminasi DNA, yang dapat menghentikan reaksi PCR.

Untuk mendapatkan DNA dengan kualitas yang baik dari hasil isolasi DNA harus menggunakan kit komersial agar meningkatkan efektivitas dan efisiensi kerja, karena telah tersedia seperangkat perlengkapan isolasi DNA yang siap digunakan (Buchori, 2023).

Dengan menggunakan kit komersial, DNA diisolasi dari daun untuk mengungkap DNA mitokondria, kloroplas, dan genom dari berbagai spesies tanaman. Prosedur dari isolasi DNA diawali dengan pelisisan dengan penambahan FAPG 1, untuk mendapatkan FAPG 3, lalu RNA dibersihkan dengan menggunakan RNase sedangkan protein dibersihkan dengan buffer W1. Untuk mendapatkan hasil DNA yang murni dengan melakukan elusi menggunakan *elution buffer*.

Tabel 4.2. Hasil Uji kuantitas DNA *Manihot esculenta* Cantz.

No	Nama Sampel	A260/A280	Konsentrasi Dna (µg/ml)	Ket
1.	Daun Ubi Genderuwo	2.2	218.283 µg/ml	Memenuhi Syarat
2.	Daun Ubi Roti	1.5	-149.593 µg/ml	Tidak Memenuhi Syarat
3.	Daun Ubi Keriting	1.5	65.275 µg/ml	Tidak Memenuhi Persyaratan
4.	Daun Ubi Jari	1.9	186.703 µg/ml	Memenuhi persyaratan

Dapat dilihat pada tabel 4.1 Setiap sampel dianggap murni berdasarkan nilai kemurnian DNA yang ditemukan di dalamnya. Jika nilai isolat DNA berada di antara 1,8 dan 2,2 dan memenuhi kriteria, maka sampel tersebut dianggap murni (Mulyani, 2011). 1,5 tidak memenuhi persyaratan karena menunjukkan keberadaan protein lebih tinggi dari pada yang diharapkan untuk sampel DNA atau RNA murni. Hal ini menunjukkan adanya kontaminasi protein atau bahan lain seperti fenol pada saat pengeringan yang tidak sempurna dan adanya sisa kandungan metabolit sekunder, yang mungkin digunakan dalam ekstraksi asam nukleat, atau bahkan kontaminasi oleh kotoran lain yang menyerap. Biasanya, protein yang ada dalam

sampel akan menyebabkan rasio ini menjadi lebih rendah dari pada nilai ideal, karena protein menyerap, bahwa sampel tersebut tidak cukup murni dan memerlukan pemurnian lebih lanjut (Sitepu *et al*, 2019).

4.1.2. Hasil Amplifikasi Dari PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Membatasi area DNA yang harus diperkuat, langkah amplifikasi DNA dilakukan menggunakan primer acak OPA 2, OPA 3, OPA 5, OPA 7, OPD 11, dan OPD 13. Primer OPA merupakan urutan yang tidak spesifik untuk gen tertentu, primer OPA memiliki variasi dalam panjang dan jumlah fragmen DNA yang dihasilkan. OPD merupakan teknik untuk menganalisis keragaman genetik pada populasi. Tahap selanjutnya menggunakan metode elektroforesis menggunakan gel agarose 2% untuk mendapatkan potongan-potongan yang berbentuk pita DNA.

Ada tiga tahap dalam amplifikasi DNA yang dilakukan dengan PCR yaitu, Denaturasi, Annealing Dan Extension. Waktu dan suhu yang digunakan pada setiap tahapan sangat bergantung dalam proses PCR. Hot-start tahap awal yang dilakukan dengan suhu 98°C dan waktu 10 detik sebelum Denaturasi dilakukan. Denaturasi tahap mengurai utai ganda pada DNA yang terbentuk DNA tunggal dilakukan dengan suhu 98°C dan waktu 45 detik, waktu yang berlebihan dapat menurunkan kualitas DNA, sehingga harus dihindari. Untuk mendapatkan lokus gen menggunakan primer, tahap yang dilakukan setelah denaturasi yaitu amplifikasi penempelan dan pengenalan (Annealing). Suhu yang dilakukan pada Annealing 36°C dan waktu 1 menit (60 detik).

Hasil amplifikasi empat sampel dengan menggunakan 6 primer yaitu, OPA 2, OPA 3, OPA 5, OPA 7, OPD 11, OPD 13. Dari hasil tabel 4.2 dibawah pada primer OPA 2 memiliki 6 pita DNA yang teramplifikasi dengan ukuran fragmen 100-600 bp, OPA 3 memiliki 5 pita DNA yang teramplifikasi dengan ukuran fragmen 100-600 bp, pada OPA 5 memiliki 4 pita DNA yang teramplifikasi dengan ukuran fragmen 100-600 bp, sedangkan pada primer OPA 7 memiliki 4 pita DNA yang teramplifikasi dengan ukuran fragmen 100-400 bp, OPAD 11 memiliki 3 pita DNA

yang teramplifikasi dengan ukuran fragmen 200-400 bp, dan primer OPD 13 memiliki 4 pita DNA yang teramplifikasi dengan ukuran fragmen 100-400 bp.

Tabel 4.3. Hasil Amplifikasi Pada Primer

No	Primer	Urutan Basa (5' 3')	Jumlah DNA Teramplifikasi	Ukuran Pita
1.	OPA 2	(5'TGCCGAGCTG 3')	6	100-600 bp
2.	OPA 3	(5'AGTCAGCCAC 3')	5	100-600 bp
3.	OPA 5	(5'AGGGGTCTTG 3')	4	100-600 bp
4.	OPA 7	(5'GAAACGGGTG 3')	4	100-400 bp
5.	OPD 11	(5'AGCGCCATTG 3')	3	200-400 bp
6.	OPD 13	(5'GGGGTGACGA 3')	4	100-400 bp

Suhu yang terlalu tinggi (37°C) atau terlalu rendah (34–35°C) dapat menyebabkan primer tidak menempel selama amplifikasi. Langkah ekstensi mengikuti langkah annealing, di mana untai baru dimulai di lokasi basa nukleotida yang terhubung dari ujung 5 primer ke ujung 3. Suhu 72°C dan waktu 30 detik diperlukan untuk langkah Ekstensi. Langkah terakhir, Ekstensi Akhir, dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit (300 detik) untuk memastikan bahwa lokus gen target telah menghasilkan basa nukleotida pada untai DNA. Dalam PCR, siklus amplifikasi diulang 30 kali untuk mendapatkan jumlah kelipatan segmen DNA yang diperlukan. Terbentuknya pita yang semakin tipis mengindikasikan bahwa primer tidak melekat dengan baik pada cetakan pada suhu pemanasan yang terlalu tinggi, sedangkan suhu pemanasan yang terlalu rendah menyebabkan primer melekat pada tempat penempelan yang tidak spesifik, yang selanjutnya mengakibatkan bertambahnya fragmen lokus yang tidak diinginkan (Setyawati, 2021).

4.1.3. Hasil Elektroforesis

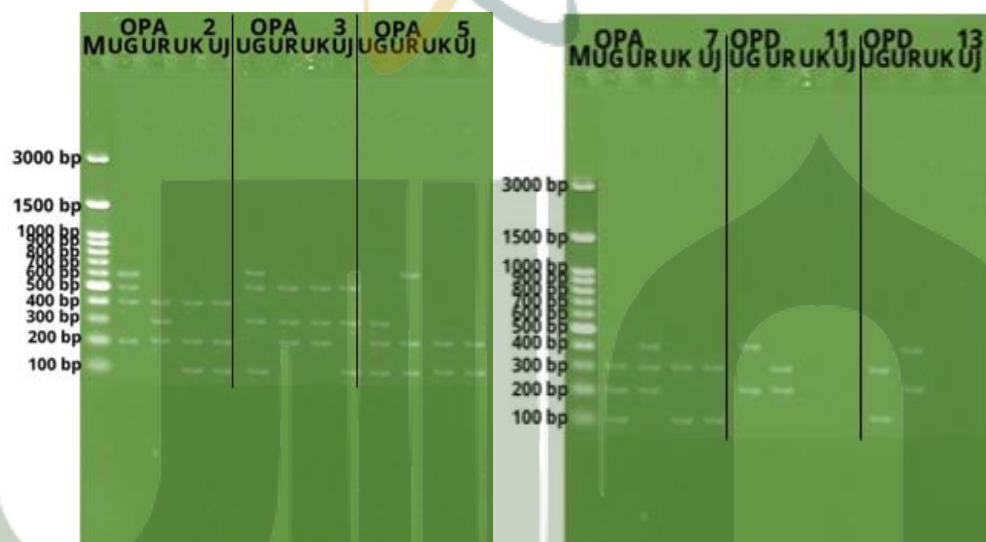
Elektroforesis terdiri dari komponen utama dalam penggunaannya. Pertama adalah komponen pembawa berupa larutan elektrolit, sering kali berupa larutan penyangga dengan pH tertentu berdasarkan sifat zat yang harus dipisahkan. Selain itu, media membedakan lokasi proses. Media pemisah ini dapat berupa gelatin, gel polikrilamida, gel pati, busa poliuretan, atau kertas (selulosa asetat, selulosa nitrat). Pada peralatan rangkaian, elektroda merupakan komponen yang paling krusial karena berfungsi sebagai penghubung arus listrik dengan media pemisah dan baterai atau arus listrik sebagai sumber energi (source) (Harahap,2018).

Tabel 4.4. Hasil Elektroforesis

No	Primer	Urutan Basa (5'-3')	Total Pita	Pita Polimorfik	Pita Monomorfik	Ukuran Pita
1.	OPA 2	(5'TGCCG AGCTG 3')	6	4	2	100-600 bp
2	OPA 3	(5'AGTCA GCCAC 3')	5	3	2	100-600 bp
3	OPA 5	(5'AGGGG TCTTG 3')	4	3	1	100-600 bp
4	OPA 7	(5'GAAAC GGGTG 3')	4	3	1	100-400 bp
5	OPD 11	(5'AGCGC CATTG 3')	3	3	0	200-400 bp
6	OPD 13	(5'GGGGT GACGA 3')	4	4	0	100-400 bp

Hasil dari amplifikasi menggunakan primer OPA 2, OPA 3, OPA 5, OPA 7, OPD 11, OPD 13 yang diuji menggunakan metode elektroforesis gel agarose 1% dan menghasilkan pita DNA dan sampel yang diberi kode UG, UR, UK, UJ. Jumlah pola pita DNA pada primer OPA 2 difragmen 100 bp, 300 bp, 500 bp dan 600 bp memiliki 4 pita DNA polimorfik sedangkan difragmen 200 bp dan 400 bp memiliki 2 pita monomorfik dengan ukuran panjang fragmen 100 bp-600 bp, sedangkan OPA 3 memiliki 3 pita DNA polimorfik difragmen 100 bp, 200 bp dan 600 bp dan 2 pita monomorfik difragmen 300 bp dan 500 bp dengan ukuran panjang fragmen 100 bp-600 bp, OPA 5 memiliki pita DNA polimorfik yang berjumlah 4 difragmen 200 bp,

300 bp, 600 bp sedangkan difragmen 100 bp hanya memiliki 1 pita monomorfik dengan ukuran fragmen 100 bp-600 bp. Hasil jumlah pada primer OPA 7 memiliki 3 pita DNA polimorfik difragmen 100 bp, 200 bp, dan 400 bp dan 1 pita monomorfik difragmen 300 bp dengan ukuran panjang fragmen 100 bp-400 bp, sedangkan pada OPD 11 memiliki 3 pita DNA polimorfik difragmen 200 bp, 300 bp, dan 400 bp dengan ukuran panjang fragmen 200 bp-400 bp, OPD 13 memiliki jumlah pita DNA sebanyak 4 pita DNA polimorfik difragmen 100 bp, 200 bp, 300 bp, dan 400 bp dengan ukuran panjang fragmen 100 bp-400 bp, dan pada primer OPD 11 dan OPD 13 tidak memiliki pita DNA monomorfik.



Gambar 4.1. Hasil pola pita DNA OPA 2, OPA 3, OPA 5, OPA 7, OPD 11, OPD 13
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2024)

Tanaman ubi kayu (*Manihot esculenta* Cantz) memiliki sampel DNA yang dielektroforesis menggunakan primer dengan teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Dari sampel tersebut memiliki hasil potongan-potongan DNA yang sudah melewati dari tahap elektroforesis. Pita DNA polimorfik adalah gambar pita DNA yang muncul pada ukuran tertentu. Pita yang dimiliki oleh setiap orang yang dijadikan sampel disebut monomorfik, sedangkan polimorfik terjadi karena tidak adanya amplifikasi pada lokus yang disebabkan oleh variasi dalam urutan basa nukleotida di tempat perlekatan primer. (Sulistyawati, 2017).

4.2. Analisis Keragaman Morfologi Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Cantz)

Keragaman morfologi salah satu indikator yang sangat besar perannya untuk mengidentifikasi tumbuhan secara visual. Untuk memudahkan peneliti memperkenalkan nama spesies dan mengidentifikasi berbagai jenis tanaman. Tanaman dapat dicirikan secara morfologis dari berbagai bagian, termasuk akar, batang, dan daun. Untuk memeriksa struktur tubuh tanaman secara lengkap, bagian tanaman ini dapat memberikan analisis yang cukup menyeluruh (Liunokas, 2021). Daun dari tanaman ubi genderuwo dan roti memiliki perbedaan dibentuk daun yang dimana daun ubi roti memiliki bentuk tulang menjari tetapi sempit, sedangkan ubi genderuwo memiliki bentuk tulang menjari, pada kedua sampel ini memiliki warna yang sama yaitu hijau tua dan memiliki helai daun 7. Ubi keriting memiliki bentuk daun yang bergelombang, memiliki warna daun hiau tua, dan memiliki jumlah helai 5, sedangkan ubi jari memiliki warna hijau muda, memiliki helai daun 7 dan pada bentuk daun memanjang dan sempit.

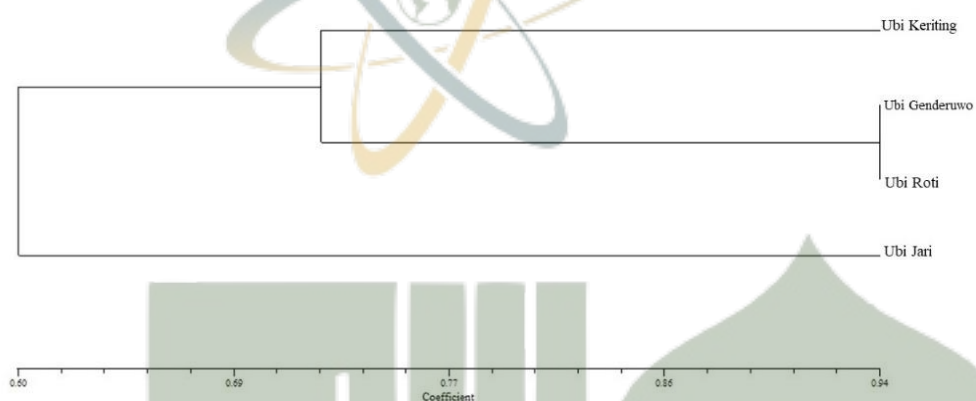
4.3. Analisis Hubungan Dendogram *Manihot esculenta* Cantz Dengan Penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)

Dendogram adalah langkah-langkah analisis kluster Analisis kluster adalah studi statistik yang mencoba mengelompokkan item berdasarkan kesamaan dalam propertinya. Analisis ini didasarkan pada representasi visual yang menunjukkan bagaimana kluster dihasilkan dan nilai koefisien jarak pada setiap tahap (Ramadhani, 2018).

Tabel 4.5. Hasil Analisis Hubungan Dendogram

No	Sampel	Nilai Koefisien
1.	Ubi Genderuwo	0,85
2.	Ubi Roti	0,85
3.	Ubi Keriting	0,77
4.	Ubi Jari	0,60 (Outlier)

Keragaman spesies tumbuhan *manihot* dari hubungan dendrogram dapat dilihat dari tabel 4.5 menunjukkan kelompok keragaman yang sama yaitu, ubi genderuwo dengan ubi roti yaitu 0,85 memiliki hubungan keragaman yang erat dan bergabung dalam clade 1. Sedangkan di clade 2 ubi keriting yaitu adanya hubungan keragaman dan evolusi antara kelompok clade 1 dengan tanaman ubi genderuwo dan ubi roti yaitu 0.77, sedangkan clade 3 tanaman ubi jari dalam hasil dendrogram termasuk tanaman terjauh (Outlier) yaitu 0.60.



Gambar 4.2. Hasil Hubungan Dendrogram *Manihot esculenta* Cantz

Semakin banyak karakter yang dapat bekerja sama, semakin besar koefisiennya, yang menunjukkan hubungan yang lebih cekatan. Sebaliknya, ketika lebih banyak perbedaan dalam karakter ditemukan, koefisiennya menurun, yang menunjukkan melemahnya hubungan antara genotipe yang sedang dibandingkan. (Tambunan, 2019). Outlier adalah data dengan penyimpangan yang mencolok dari mayoritas pengamatan. Nilai outlier dapat menyebabkan spesifikasi model yang tidak tepat, estimasi parameter yang bias, dan bahkan analisis dan kesimpulan yang keliru atau salah, yang membuat analisis data tidak efektif ketika langkah-langkah pengendalian data diterapkan (Mahendra, 2015). Pengelompokan data matriks dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode UPGMA, fungsi SIMQUAL, koefisien DICE pada program NTSYS 2.02. Berdasarkan data RAPD dilakukan analisis komponen utama untuk menentukan posisi relatif 4 spesies daun tanaman ubi kayu dengan pita-pita yang berperan dalam pengelompokan tersebut (Dwiatmini, 2003).