

**KEANEKARAGAMAN TANAMAN PEGAGAN (*Centella asiatica* L. [Urb.])
PADA KETINGGIAN DAN LINGKUNGAN YANG BERBEDA
BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI DAN MOLEKULER
MENGUNAKAN PENANDA ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)**

SKRIPSI

Oleh:
AYU RIFQI ELLYZA
NIM. 14620073



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2020**

**KEANEKARAGAMAN TANAMAN PEGAGAN (*Centella asiatica* L. [Urb.])
PADA KETINGGIAN DAN LINGKUNGAN YANG BERBEDA
BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI DAN MOLEKULER
MENGUNAKAN PENANDA ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)**

SKRIPSI

Oleh:
AYU RIFQI ELLYZA
NIM. 14620073

diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**KEANEKARAGAMAN TANAMAN PEGAGAN (*Centella asiatica* L. [Urb.])
PADA KETINGGIAN DAN LINGKUNGAN YANG BERBEDA
BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI DAN MOLEKULER
MENGUNAKAN PENANDA ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)**

SKRIPSI

Oleh:
AYU RIFQI ELLYZA
NIM. 14620073

telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
tanggal: 15, Januari 2020

Pembimbing I



Azizatur Rahmah, M. Sc
NIP. 19860930 2019032011

Pembimbing II



Mujahidin Ahmad, M. Sc
NIP. 19860512201931002



Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Dr. Evika Suci Savitri, M.P
NIP. 19740118 200312 2 002

**KEANEKARAGAMAN TANAMAN PEGAGAN (*Centella asiatica* L. [Urb.])
PADA KETINGGIAN DAN LINGKUNGAN YANG BERBEDA
BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI DAN MOLEKULER
MENGUNAKAN PENANDA ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)**

SKRIPSI

Oleh:
AYU RIFQI ELLYZA
NIM. 14620073

Telah Dipertahankan
di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan Diterima sebagai
Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 16, Maret 2020

Penguji Utama :Dr. Evika Shandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

Ketua Penguji :Suyono, M.P
NIP. 19710622 200312 1 002

Sekretaris Penguji :Azizatur Rahmah, M. Sc
NIP. 19860930 2019032011

Anggota Penguji :Mujahidin Ahmad, M. Sc
NIP. 19860512201931002

(.....)
(.....)
(.....)
(.....)

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Dr. Evika Shandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002



HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah rabbil Aalamiin....

Karya tulis sederhana ini kupersembahkan kepada:

1. Ayah Nasihin dan Ibu Nur Kholifah, sebagai bagian dari rasa terimakasih dan bakti yang tak akan mampu menandingi kasih sayang keduanya.
2. Adik-Adik ku Ilmiyah, Yudi, Qiqi yang istimewa dengan caranya masing-masing.
3. Kepada Ayu Rifqi Ellyza (diri saya sendiri), bahwa saya bersyukur, menerima, dan akan terus mencoba menjadi lebih baik.
4. *For my special brain, ADHD, the greatest gift from Allah, which characterizes who I am. thank god for giving me this magical world.*



MOTTO

اللَّهُمَّ افْتَحْ عَلَيْنَا فُتُوحَ الْعَارِفِينَ

Yaa Allah, Bukakanlah Pintu Hati kami

Sebagaimana Orang-orang yang 'Aarif.

أَمْ لَهُمْ سُؤْلٌ مِّمَّ يَسْتَمِعُونَ فِيهِ فَلَيَأْتِ مُسْتَمِعُهُمْ بِسُلْطٰنٍ مُّبِينٍ ۝ ٣٨

Ataukah mereka mempunyai tangga (ke langit) untuk mendengarkan pada " tangga itu (hal-hal yang gaib)? Maka hendaklah orang yang mendengarkan di antara mereka mendatangkan suatu keterangan yang nyata. (QS At-Thur;38).

*I was built this way for a reason
So I am going to use it*

*ADHD is my Superpower
And Allah is The Almighty*

HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ayu Rifqi Ellyza

NIM : 14620073

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Keanekaragaman Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L. [Urb.]) pada Ketinggian Berbeda Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler Menggunakan Penanda Issr (*Inter Simple Sequence Repeat*)

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-banar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 5 Desember 2019

Yang membuat pernyataan,

METERAI
PEMPEL
MB58FAHF33906204
5000
LIMA RIBU RUPIAH

Ayu Rifqi Ellyza
NIM. 14620073

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



Keanekaragaman Tanaman Pegagan (*Centella Asiatica* L. [Urb.]) Pada Ketinggian dan Lingkungan yang Berbeda Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler Menggunakan Penanda ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

Ayu Rifqi Ellyza, Azizatur Rahmah, Mujahidin Ahmad

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keanekaragaman *C. asiatica* L. pada ketinggian berbeda berdasarkan karakter morfologi dan molekuler menggunakan penanda ISSR. Penelitian ini menggunakan metode campuran deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Rangkaian kegiatan penelitian ini antara lain eksplorasi, karakterisasi morfologi, isolasi DNA dan PCR ISSR serta analisis data. Eksplorasi dilakukan pada ketinggian 300-1700 mdpl di area Malang, Batu, Pasuruan. Setiap aksesori dilakukan pengukuran kuantitatif meliputi panjang tanaman, tinggi tanaman, panjang tangkai, panjang stolon, jumlah daun, luas daun, tebal daun, diameter tangkai, dan diameter stolon. Pengukuran kualitatif dilakukan pada warna daun tua, daun muda, stolon, dan tangkai daun mengacu pada RHS colour chart. Karakterisasi molekuler dilakukan menggunakan penanda ISSR dengan Kode UBC 812, UBC 828, UBC 889, dan K18. Karakter morfologi dan molekuler tersebut kemudian dibuat dendrogram menggunakan program PAST.362 untuk mengetahui pengelompokan tiap aksesori. Hasil tabel dendrogram karakter morfologi menunjukkan *C. asiatica* L. mengelompok berdasarkan ketinggian tempat tumbuhnya. Beberapa aksesori yang terpisah dari kelompok ketinggian terdekatnya diduga memiliki ciri morfologi yang sama dengan kelompok ketinggian lainnya karena keadaan lingkungan tumbuh yang seragam. Hasil analisis dendrogram karakter molekuler menunjukkan pengelompokan *C. asiatica* L. terjadi secara acak sebelum ketinggian 1700 (aksesori C14) yang merupakan titik tertinggi pengambilan sampel. Pengelompokan *C. asiatica* L. berdasarkan morfologi maupun molekuler menunjukkan terdapat keanekaragaman yang dipengaruhi oleh ketinggian tempat tumbuh dan keadaan lingkungannya.

Kata kunci: *C. asiatica* L, ketinggian tempat, morfologi, keragaman genetik, ISSR

Diversity of Gotu Cola (*Centella Asiatica* L. [Urb.]) in Different Altitude and Environment Based on Morphology and Molecular Character Using ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) Primer

Ayu Rifqi Ellyza, Azizatur Rahmah, Mujahidin Ahmad

ABSTRACT

This research aims to know the diversity of *C. asiatica* L. in different altitude and environmental condition based on morphology and molecular character using ISSR Marker. Research design was using mix method of quantitative and qualitative descriptive. This research contain of several activity that's are exploration, morphological characterization, DNA isolation, PCR ISSR, and data analysis. Exploration was carried out at an altitude of 300-1700 meters above sea level in the areas of Malang, Batu, and Pasuruan. Accessions were collected and measured the quantitative and quantitative character. the qualitaive character such as plant lenght, plant height, number of leaves, leave wide, leave thickness, diameter of stalk, and diameter of stollon. and the qualitative characters were leave and stalk colors based on *RHS* colour chart. Molecular charracterization was using ISSR primers UBC 828, UBC 889, and K18. A dendogram phyllogenetic was made for both morphological and mollecular character by using PAST.362 software to know the accession grouping. The result of the dendogram based on morphological charracter showed that *C. asiatica* L. was highly influenced by altitude. some accessions were separated from the closest altitude group may had similarity with other accessions in different altitude caused by the same condition of environment. The result of the dendogram based on mollecular character showed a random grouping of *C. asiatica* L. before 1700 above sea level (accession C14) as the highest altitude for sampling. *C. asiatica* L. grouping based on morphology and mollecular character showed that the differentiation of altitude and environmental condition can affect the genetic diersity of *C. asiatica* L.

Keyword: *C. asiatica* L, altitude, morphology, genetic diversity, ISSR

المختلفة على أساس السمات المرفولوجية والجزئية باستخدام علامات ISSR

أبو رفقي إيزا، عزيزة الرحمة، مجاهدين أحمد

مستخلص

الهدف من هذا البحث هو لمعرفة تنوع نبات غوتو كولا *C. asiatica L.* على الارتفاع المختلف على أساس السمات المرفولوجية والجزئية باستخدام علامة ISSR. الطريقة المستخدمة في هذا البحث هي الطريقة المختلطة بين منهج النوعية الوصفية والكمية. تضمنت هذه السلسلة من الأنشطة البحثية وهي الاستكشاف والتوصيف المرفولوجي وعزلة DNA وISSR وPCR وتحليل البيانات. تم الاستكشاف على ارتفاع 300- mdp11700 في مالانج وباتو وباسوروان. تم تنفيذ كل انضمام من القياس الكمي على طول النبات وطول الساق وطول الاستول وعدد الأوراق ومساحة الورقة وسمك الورقة وقطر الساق وقطر الاستول. تم إجراء القياس النوعي على لون الأوراق القديمة والأوراق الصغيرة والاستول والأعناق التي تشير إلى RHS لون الرسم البياني. تم تنفيذ التوصيف الجزئي باستخدام علامات ISSR برموز UBC 812 و UBC 828 و UBC K18 و 889. تم بعد ذلك عمل الأشكال المرفولوجية والجزئية بواسطة مخطط شريطي باستخدام برنامج PAST.362 لمعرفة تجميع كل انضمام. دل نتيجة جدول مخطط شريطي الأشكال المرفولوجية أن تجمع حسب ارتفاع المكان للنمو. يعتقد بعض الانضمام المنفصلة من المجموعة المرتفعة الاقرب له نفس الخصائص المرفولوجية بالمجموعة المرتفعة الأخرى لأن حال بيئة النمو الموحدة. دل نتيجة تحليل مخطط شريطي الأشكال الجزئية أن تجميع يتم عشوائيا قبل ارتفاع 1700 (انضمام ج14) وهي أعلى نقطة لأخذ العينات. ظهر تجميع *C. asiatica L.* المستند إلى المرفولوجية والجزئية أن هناك تنوعا يتأثر بارتفاع مكان النمو وحالة البيئة.

الكلمات المفتاحية: *C. asiatica L.*، ارتفاع المكان، المرفولوجية، تنوع الجيني، ISSR

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis hanturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan Skripsi ini dengan baik.

Selanjutnya penulis haturkan ucapan terima kasih seiring do'a dan harapan jazakumullah Ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M.Si., D.Sc selaku Ketua Jurusan Biologi.
4. Azizatur Rahmah, M. Sc selaku Pembimbing utama , terimakasih telah membimbing dengan sabar serta menjadi sosok ibu kedua yang memberikan banyak masukan dan semangat, serta kritik dan saran yang membangun sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
5. Mujahiddin Ahmad, M.Sc dan Umaiatus Syarifah, M.A selaku pembimbing agama yang telah banyak memberikan masukan, saran, serta bimbingan sehingga menuntun penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
6. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P dan Suyono, M.P selaku dosen penguji yang telah memberi ilmu, kritik, dan saran sehingga membantu penulis menyelesaikan skripsi ini.
7. Fitriyah, M.Si dan Mahrus Ismail, M.Si selaku Kepala Laboratorium dan Laboran Genetika dan Molekuler, terimakasih telah banyak memberi masukan selama melakukan penelitian di Laboratorium.
8. Ayah Nasihin (my beloved father and first love), terimakasih atas semangat, dukungan, masukan, saran, serta Do'a yang tak pernah putus. Terimakasih atas kepercayaan yang diberikan kepada penulis serta petuah-petuah dan ceritanya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Semoga Allah menyehatkan, membahagiakan, dan memberkahi umur beliau. Amiin.

9. Ibu Nur Kholifah (My beloved mother, my half, and my soul), terimakasih atas kesabaran, masukan, kritik, saran serta Do'a yang tak pernah putus. terimakasih telah memberikan banyak pelajaran berharga dan menjadi ibu yang tegar bagi penulis. Semoga Allah menyehatkan, membahagiakan, dan memberkahi umur beliau. Amiin.
10. Adik pertama, Fitroh Hidayatul Ilmiyah yang telah menjadi partner observasi, partner cerita, partner belajar. Terimakasih sudah sangat sabar dan pengertian. Semoga sukses dan selalu bahagia. Aamiin.
11. Adik kedua, M. Wachyuddin, adik terspecial dengan bakat special. Terimakasih karena telah menjadi inspirasi terbesar, semangat terbesar, serta rasa syukur terbesar penulis. Terimakasih telah memberi do'a dan semangat dengan caramu sendiri. Semoga Allah selalu membahagiakanmu. Aamiin.
12. Adik ketiga, Qurotul Iashaqiyah (Qiqi), terimakasih atas semangat positifnya yang menular, telah menjadi adik yang belajar dewasa lebih cepat, sabar dan tekun. Semoga sukses dan selalu bahagia. Aamiin.
13. Nenek Kamsiyah yang teristimewa, yang hiperaktif namun inspiratif. terimakasih karena selalu berdoa dengan ikhlash untuk kesuksesan penulis. Yang selalu memberikan hal terbaik yang beliau bisa dan punya. Semoga Allah menyehatkan, membahagiakan, dan memberkahi umur beliau. Amiin.
14. Teman-teman di Lab yang banyak memberi masukan dan saran, Rasya, Affan, Ubet, Rifli, Laila, Nahdia. Termakasih banyak atas bantuan dan kesabaran kalian.
15. Sahabatku Yohananda Eka Putri yang bersedia menjadi peti emas sejak SMP. Terimakasih atas semangat yang ditularkan kepada penulis, serta masukan yang sangat membangun. Semoga Allah selalu melindungimu, membahagiakanmu, memberkahi umur dan ilmu yang ada padamu. Semoga persahabatan kita tetap berlanjut sampai surga. Aamiin.

16. Sahabat *Trash*, Ely Nuril Fajriyah, Cahyaning Sulistyantini, Ermaswati Lamadike. Terimakasih karena selalu ada saat masa senang dan sulit. Menjadi tempat pertama untuk bertanya pendapat. Terimakasih telah menjadi salah satu sumber kekuatan dan semangat penulis. Semoga Allah selalu melindungi, membahagiakan, dan memberkahi kalian. Semoga persahabatan kita tetap berlanjut sampai surga. Aamiin
17. Sahabatku Maslahatul Ummah, terimakasih karena telah menjadi sahabat paling berkesan yang mengajarkan banyak hal, telah membuat sebuah titik balik bagi penulis, memberi semangat dan masukan. Semoga Allah selalu melindungi, membahagiakan, dan memberkahimu. Semoga persahabatan kita tetap berlanjut sampai surga. Aamiin
18. Ibu dr. Ratri Nur Istiqomah, Sp. KJ dan Mbak Andini M. Psi atas bantuannya saat masa-masa tersulit. Yang telah membantu penulis mengenali diri dengan lebih baik.
19. Terimakasih sekali lagi kepada ibu Azizatur Rahmah, M.Sc dan ibu Kholifah Kholil, M. Si karena telah membantu dan menyemangati penulis untuk menjadi diri sendiri dan berdamai dengan trauma, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah memberkahi umur, rizqi, waktu dan semuanya. Semoga selalu dalam kebahagiaan. Aamiin.
20. Mbak Saddiqah, teman sharing dan gotong royong di lab. Terimakasih banyak telah membri banyak masukan dan saran. Serta memberi banyak solusi saat kalut. Semoga sukses selalu, lancar hingga gelar master dan seterusnya.
21. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu. Penulis dengan sangat tulus mengucapkan terimakasih.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bias memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. *Amin Ya Rabbal Alamin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 20Desember 2019

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT.....	x
مستخلص	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI.....	xvi
DAFTAR TABEL.....	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
DAFTAR SINGKATAN	xxi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	9
1.3 Tujuan	9
1.4 .Manfaat	10
1.5 Hipotesis	10
1.6 Batasan Masalah	10
BAB II KAJIAN PUSTAKA	12
2.1 Centella asiatica L.....	12
2.2 Persebaran dan Syarat Tumbuh <i>C. asiatica</i> L.....	15
2.3 Keanekaragaman Morfologi	17
2.4 Faktor Ketinggian Tempat Terhadap Keanekaragaman Morfologi.....	17
2.5 Keanekaragaman Genetik	20
2.6 Penanda Molekuler ISSR.....	21
BAB III METODE PENELITIAN	24
3.1 Jenis Penelitian	24
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
3.3 Alat dan Bahan.....	25
3.4 Prosedur Penelitian	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Karakter Morfologi <i>C. asiatica</i> L. Urb.	32

4.2 Hasil Karakterisasi Molekuler <i>C. asiatica</i> L.	44
BAB V	56
PENUTUP	56
5.1 Kesimpulan	56
5.2 Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	67



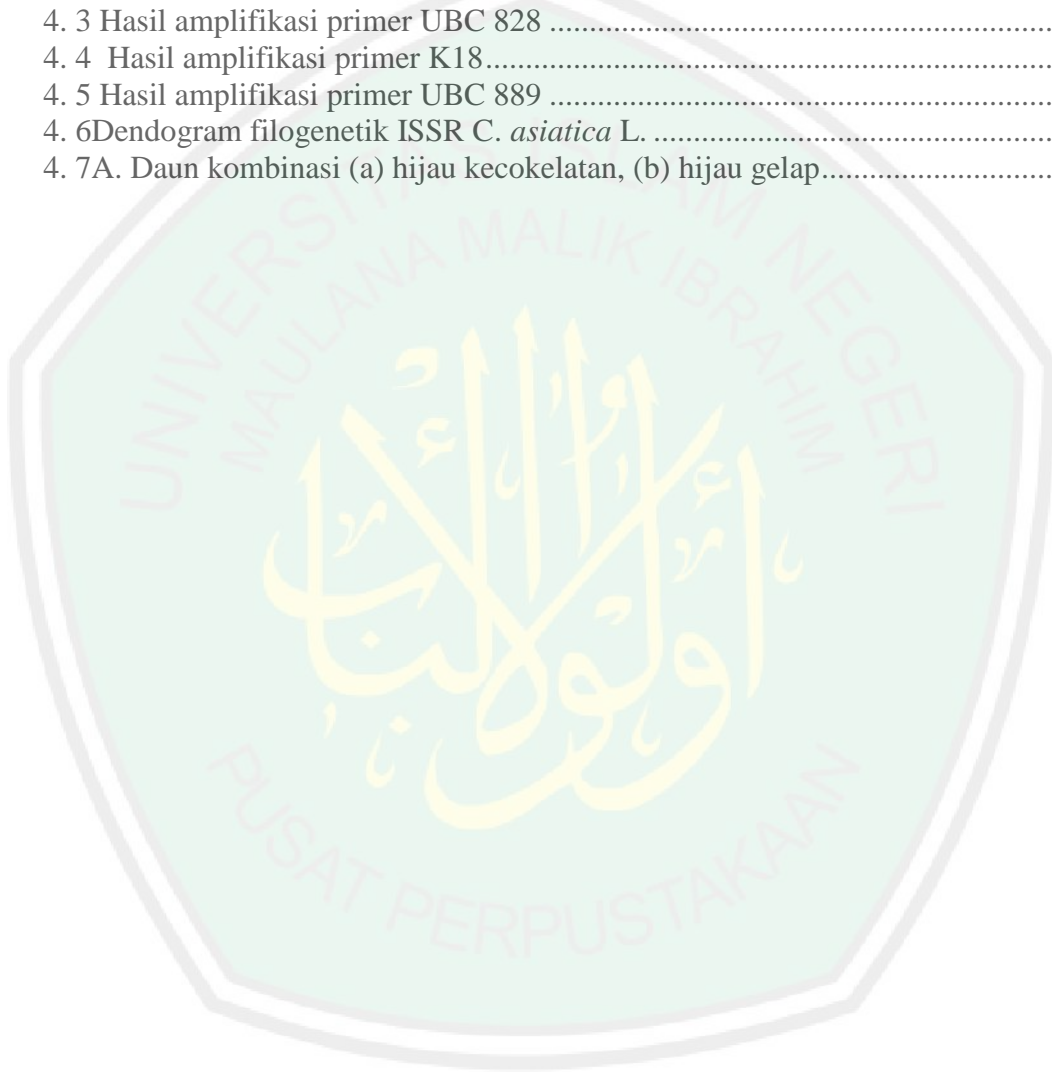
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Daftar tempat dan ketinggian wilayah pengambila sampel <i>C. asiatica</i> L.....	24
3.2Daftar primer ISSR yang digunakan dalam karakterisasi molekuler.....	26
4.1 Hasil uji DMRT Karakter Kuantitatif Morgologi <i>C. asiatica</i> L.	32
4.2 Hasil pengukuran karakter kualitatif <i>C. asiatica</i> L.	39
4.3Daftar hasil uji kuantitas DNA.....	45
4.4Total ukuran fragmen primer ISSR.....	47
4.5 Analisis pita DNA <i>C. asiatica</i> L. dengan primer ISSR.....	47
4.6 Diversitas genetik <i>C. asiatica</i> L.	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2. 1 Morfologi Pegagan (<i>C. asiatica</i> L.)	14
2. 2 Skema kemunculan band ISSR dengan PCR	23
4. 1 Dendogram filogenetik morfologi <i>C. asiatica</i> L.	40
4. 2 Hasil isolasi DNA <i>C. asiatica</i> L.	45
4. 3 Hasil amplifikasi primer UBC 828	46
4. 4 Hasil amplifikasi primer K18	46
4. 5 Hasil amplifikasi primer UBC 889	46
4. 6 Dendogram filogenetik ISSR <i>C. asiatica</i> L.	49
4. 7A. Daun kombinasi (a) hijau kecokelatan, (b) hijau gelap	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Hasil uji DMRT 5% panjang total, panjang stolon, diameter stolon	67
2 Hasil uji DMRT 5% tinggi tanaman, tinggi tangkai	67
3 Hasil uji DMRT 5% diameter tangkai	68
4 Hasil uji DMRT 5% jumlah daun dan luas daun	69
5 Hasil uji DMRT 5% tebal daun.....	70
6 Warna daun dan warna tangkai <i>C. asiatica</i> L.	71
7 Gambar warna daun <i>C. asiatica</i> L.	72
8 Gambar warna tangkai daun <i>C. asiatica</i> L.	76
9 Gambar warna stolon <i>C. asiatica</i> L.	78
10 Gambar warna ruas <i>C. asiatica</i> L.	80
11 Foto Pengamatan <i>C. asiatica</i> L. Ketinggian 1600 mdpl	81
12 Skoring Karakter Kuantitatif <i>C. asiatica</i> L. 1	84
13 Skoring karakter kuantitatif <i>C. asiatica</i> L.	85
14 Skoring karakter kualitatif <i>C. asiatica</i> L.	86
15 Skoring pita terimplikasi primer UBC 811, UBC 828, dan K18 <i>C. asiatica</i> L.	87

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Keterangan
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
ISSR	Inter Simple Sequens Repeat
SSR	Simple Sequens Repeat
RAPD	Random Amplified Pholymorphic DNA
MDPL	Meter Diatas Permukaan Laut
GPS	Global Positioning System
RHS	Royal Horticultural Society
UPGMA	Underweighted Pair Group Method with Arithmetic
PAST	Paleontological Statistics Software
RNA	Ribo Nucleic Acid
ATP	Adenosine Tri Phosphat
ADP	Adenosine Di-Phosphat
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
CTAB	Cethyl Methyl Amonium Bromide
PCR	Polymorphic Chain Reaction
TBE	Tris Borate EDTA
TE	Tris EDTA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
HCL	Hydrogen Chloride
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
PCoA	Principal Coordinate Analysis
TNB	Total Number of Band
NPB	Number of Polymorphic Band
PB	Presentation of Polymorphic Band
PIC	Primer Information Content
EMR	Effective Multiple Ratio
MI	Marker Index
RP	Resolution Power

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah SWT berfirman:

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَوِّرَاتٌ وَجَنَّتْ مِّنْ أَعْنَبٍ وَزَرَاعٌ وَنَخِيلٍ صِنَوَانٍ وَغَيْرُ صِنَوَانٍ يُسْقَى بِمَاءٍ وَجُدُونَ نَفَضًا بَعْضُهَا عَلَى بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ (الرعد [13]: ٤)

Artinya: Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanaman-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir (Qs. Ar-Ra'd [13]:4).

Pada Ayat diatas, khususnya pada kalimat yang digaris bawah dapat diambil pelajaran bahwa Allah SWT telah menunjukkan kebesaran-Nya melalui salah satu fenomena di alam. Disebutkan dalam kalimat tersebut, bahwa pada مُتَجَوِّرَاتٌ “bagian yang berdampingan” atau yang ditafsirkan sebagai tanah oleh Al-Jazari (2007) baik itu tanah yang subur maupun kurang subur dapat tumbuh berbagai macam jenis tumbuhan. Keberagaman tumbuhan ini tidak hanya terjadi pada spesies yang berbeda saja, namun pada tumbuhan dengan spesies yang sama pula. Sebagaimana dicontohkan dalam kata صِنَوَانٍ وَغَيْرُ صِنَوَانٍ yang menurut Al-Qurtubi (2008) dan al-Jaziri (2007), selain diartikan sebagai kurma yang bercabang dan tidak bercabang, dapat diartikan pula dengan pohon kurma dengan berbagai macam jenis yang tumbuh dari satu induk. Hal ini merupakan suatu tanda kebesaran Allah SWT yang luar biasa, karena pada dasarnya tanah dan tumbuhan-tumbuhan tersebut disirami oleh satu sumber air yang sama yaitu air hujan, namun dapat tumbuh menjadi bentuk, ukuran, dan warna yang berbeda sesuai dengan keadaan lingkungannya.

Perbedaan karakter antara tanaman satu dengan lainnya selain dipengaruhi oleh faktor eksternal (lingkungan) juga internal (genetik) yang sangat penting untuk dipelajari. Studi karakterisasi ini penting dilakukan sebagai langkah awal pelestarian dan pemanfaatan tanaman secara maksimal dan bijaksana. Salah satu tanaman yang perlu ditingkatkan pelestarian dan pemanfaatannya adalah Pegagan (*Centella asiatica* L.). Tanaman ini dikenal sebagai salah satu tanaman tradisional dengan banyak khasiat. Diantaranya adalah sebagai penyembuh luka, antibakteri, antiinflamasi, kanker, stroke, memperlancar peredaran darah, hingga obat bagi penderita disorder dan gangguan jiwa (Salkhtipriya *et al.*, 2018).

Pegagan (*Centella asiatica* L.) merupakan tanaman herba perennial yang terdistribusi luas di daerah tropis dan sub-tropis benua Asia (Prasad, 2008; Ernawati *et al.*, 2016; LAL *et al.*, 2017; Salakhtipriya *et al.*, 2018). Tanaman ini tergolong dalam family *Mackinlayaceae* (Ernawati *et al.*, 2016) atau *Umbeliferae* (Bermawie *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 2017) atau *Apiaceae* (Bermawie *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 2017; Sakhtipriya *et al.*, 2018) yang dikenal dengan *Asiatic Pennywort*, *Indian Pennywort*, *Goti Cola* (Bermawie *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 2017; Gupta dan Chaturvedi, 2017; Salakhtipriya *et al.*, 2018) *Mandookarpani* (Prasad 2008) atau dikenal pula dengan Rumpun Kaki Kuda dan Antanan di Indonesia (Bermawie *et al.*, 2008).

C. asiatica L. dikenal secara turun temurun sebagai obat herba tradisional di Indonesia, China, dan India. Menurut Klopnemburg dan Versteegh terdapat lebih dari 59 resep jamu tradisional menggunakan *C. asiatica* L. dalam ramuannya (Widowati, 1992 dalam Bermawie *et al.*, 2008). Tanaman ini memiliki khasiat sebagai penyembuh luka, asma, diabetes, kanker, alzheimer, dan hipertensi (Ernawati *et al.*, 2016) tanaman ini juga digunakan sebagai terapi bagi anak-anak berkebutuhan khusus dan gangguan psikologis karena khasiatnya sebagai peningkat konsentrasi, fokus, dan membantu mengoptimalkan IQ akademik serta digunakan dalam bahan kosmetik (Bermawie *et al.*, 2008; Nur *et al.*, 2017; Monton *et al.*, 2019).

C. asiatica L. tersebar luas di berbagai negara di Asia seperti Indonesia, Malaysia, India, Cina, Pakistan, Sri Lanka, dan Afrika Selatan (Sudaakaran *et al.*, 2017). Di Indonesia, *C. asiatica* L. dapat tumbuh hampir di seluruh propinsi meliputi pulau Jawa, Sumatera, Kalimantan, Nusa Tenggara, hingga Papua. Tanaman dapat tumbuh di berbagai kondisi lingkungan, baik lembab, kering, berair, tanah liat, berpasir, ternaungi maupun tidak ternaungi, meskipun lebih banyak ditemukan di daerah lembab. Ketinggian tumbuh tanaman ini adalah 100-2500 mdpl (Bermawie *et al.*, 2008).

C. asiatica L. masuk dalam daftar tanaman terancam punah (*endangered species*) dan dilindungi oleh lembaga konservasi dunia atau *international Union Conservation of Nature ang Natural Resource (IUCN)* sebelum tahun 2013 yang disebabkan oleh eksploitasi besar-besaran di alam karena peningkatan permintaan pasar dan Industri farmasi (Prasad, 2008). Sejak 2013 tanaman ini telah meningkat statusnya menjadi *least concern* yang menunjukkan tidak lagi memerlukan perlakuan khusus karena masih banyak ditemukan di alam (Gupta, 2013). Meskipun demikian, diperlukan pelestarian dan budidaya *C. asiatica* L. dengan mutu yang baik untuk mendukung kebutuhan industry farmakologis. Langkah awal yang dapat dilakukan untuk pelestarian *C. asiatica* L. adalah eksplorasi, karakterisasi berdasarkan morfologi, fitokimia, dan molekuler, pengelompokan sesuai karakter, seleksi tetua untuk pemuliaan tanaman, serta upaya konservasi plasma nutfah (Bermawie, 2008).

Eksplorasi *C. asiatica* L. dapat dilakukan dengan mengambil sampel contoh di beberapa daerah tumbuh. Menurut Bermawie *et al* (2008), *C. asiatica* L. dapat tumbuh dengan baik pada ketinggian 100-2500 mdpl. Perbedaan ketinggian tempattumbuh tersebut dapat mempengaruhi faktor lingkungan lainnya seperti suhu, kelembaban, curah hujan, hingga ketersediaan unsur hara (Hakim *et al.*, 2015). Berdasarkan uraian kondisi lingkungan yang beragam tersebut sangat mungkin adanya keanekaragaman dari segi morfologi dan susunan genetik *C. asiatica* L. Pada

penelitian ini eksplorasi dilakukan pada daerah dengan ketinggian 300-1700 mdpl di daerah Malang, Batu, dan Pasuruan Jawa Timur.

C. asiatica L. termasuk *groundcover* dengan ukuran kecil berperawakan herba menjalar sehingga sedikit karakter yang bisa diamati untuk karakterisasi morfologi. Karakterisasi morfologi dapat dilakukan dengan membandingkan karakter kuantitatif dan kualitatif tiap sampel yang diterapkan pada tanaman induk, anakan 1, dan anakan 2. Karakter kuantitatif yang diamati antara lain panjang tanaman, tinggi tanaman, panjang tangkai daun, diameter tangkai daun, panjang daun, lebar daun, panjang ruas stolon, jumlah stolon, diameter stolon. Sedangkan karakter kualitatif meliputi warna daun (muda dan tua), tekstur permukaan atas daun, warna tangkai daun, warna buku ruas, dan warna stolon (Bermawie, 2008).

Keunggulan karakterisasi tingkat morfologi adalah keragamannya dapat diamati secara langsung. Hal ini dikarenakan karakter morfologi menunjukkan karakter fenotip yang sebenarnya dari suatu tanaman. Karakterisasi morfologi juga tidak membutuhkan biaya dan waktu yang lama dalam proses penelitiannya. Namun, karakterisasi morfologi juga memiliki kelemahan yaitu sifatnya yang mudah dipengaruhi oleh lingkungan (Bermawie *et al.* 2008). Hal ini berkaitan dengan kemampuan tumbuhan melakukan plastisitas atau bereaksi terhadap perubahan lingkungan yang disertai dengan modifikasi morfologi (Hakim *et al.*, 2015).

Kondisi lingkungan yang dapat mempengaruhi morfologi tanaman adalah ketinggian tempat. Raharjeng (2015), melalui penelitiannya pada tanaman *Sansevieria* dan Hakim *et al* (2015) pada tanaman Bambu menyebutkan bahwa ketinggian tempat sangat mempengaruhi keragaman morfologi. Semakin tinggi daerah tumbuh tanaman, kelembaban lingkungan dan curah hujan akan semakin meningkat sementara suhu dan intensitas cahaya akan semakin menurun dibandingkan daerah yang lebih rendah. Dataran rendah dengan suhu yang tinggi dan kelembaban lingkungan yang rendah akan meningkatkan laju transpirasi (Raharjeng, 2015). Suhu yang tinggi

menyebabkan tanaman akan lebih cepat kehilangan air melalui penguapan. Sebagai respon dari kondisi fisiologis tersebut, *C. asiatica* L. yang ditemukan pada dataran rendah akan memiliki ukuran daun yang lebih sempit untuk mengurangi penguapan (Raharjeng, 2015).

Warna daun *C. asiatica* L. pada dataran rendah juga akan lebih pucat serta stolon berwarna kemerahan karena kurangnya air dalam tubuh tanaman. Berbeda dengan *C. asiatica* L. dataran tinggi yang lebih terlihat segar. Hal ini disebabkan oleh kualitas cahaya dataran tinggi yang lebih baik meskipun dengan intensitas yang lebih sedikit. Kualitas cahaya yang baik ini mempengaruhi kualitas dan kuantitas klorofil tanaman. Hal ini berkaitan pula dengan kecukupan unsur N pada tempat tumbuh. Unsur N merupakan unsur hara makro yang berperan penting dalam produksi klorofil dan asam amino (Fahmi, 2010; Atmaja *et al.*, 2017). Apabila jumlah unsur N pada suatu tempat tumbuh sedikit warna daun akan terlihat lebih pucat dan berukuran kecil, bahkan kekuningan atau mengering jika terjadi defisiensi (Atmaja *et al.*, 2017; Ginting, 2017). Kaitan unsur hara N dengan ketinggian tempat dijelaskan dalam Supriadi *et al.*, (2016), bahwa terdapat korelasi positif antara ketinggian dengan kandungan N-total, yang mana seiring dengan bertambahnya ketinggian kandungan N-total juga semakin meningkat.

Ketinggian tempat tumbuh mempengaruhi intensitas dan kualitas cahaya yang diterima oleh tanaman. intensitas cahaya mempengaruhi pertumbuhan melalui proses fotosintesis, pembukaan stomata dan sintesis klorofil, sedangkan pengaruhnya terhadap pembesaran dan differensiasi sel terlihat pada pertumbuhan tinggi tanaman dan ukuran serta struktur daun dan batang (Putri, 2009). Cahaya matahari yang sampai ke bumi secara langsung dalam bentuk cahaya gelombang pendek hanya 24%, sebagian lagi dipantulkan kembali ke atmosfer dalam bentuk gelombang panjang, konduksi, konveksi, dan untuk evaporasi dan transpirasi. Apabila atmosfer berawan, maka intensitas cahaya berkurang. Di daerah tropis, intensitas cahaya sering berkurang karena tertutup oleh awan tebal, terutama pada musim penghujan

(Permanasari dan Aryanti (2014). Hal ini juga terjadi pada datran tinggi yang cenderung lebih berawan dan berkabut.

Kualitas cahaya merupakan panjang gelombang yang dapat ditangkap tanaman (satuan dalam $m\mu$). Kualitas cahaya menunjukkan panjang gelombang yang terkandung dalam cahaya. Dari 75 satuan (unit) cahaya yang sampai ke permukaan bumi atau atmosfer, apabila semua unit tidak dipantulkan oleh awan, kira-kira 44% mengandung panjang gelombang yang aktif untuk fotosintesis. Reaksi cahaya dalam fotosintesis merupakan akibat langsung penyerapan foton oleh molekul-molekul pigmen seperti klorofil. Tidak seluruh foton memiliki tingkat energi yang cocok untuk menggiatkan pigmen daun (Zulkarnain, 2009). Total radiasi matahari adalah 1360 W m^{-2} dan hanya sekitar 900 W m^{-2} yang mencapai tumbuhan karena pengaruh lapisan atmosfer. Spektrum cahaya yang dapat digunakan dalam proses fotosintesis berkisar antara 400-700 nm. Cahaya dibawah 400 nm memiliki energi yang terlalu besar sehingga dapat menyebabkan ionisasi dan kerusakan pigmen daun. Sedangkan cahaya diatas 700 nm memiliki yang kurang untuk dilakukan fotosintesis (Salisbury dan Ross, 1995). Cahaya yang diterima oleh tanaman pada dataran tinggi berupa cahaya gelombang pendek yang efektif digunakan dalam fotosintesis. Pengaruh lingkungan yang berawan menyebabkan cahaya gelombang tinggi dapat dipantulkan secara efisien kembali ke atmosfer. Hal inilah yang menyebabkan tanaman dataran tinggi memiliki warna yang segar.

Pada dataran rendah, intensitas cahaya yang didapatkan oleh tanaman lebih banyak, selain itu spektrum cahaya yang ditangkap oleh daun juga tinggi sehingga menyebabkan fotosintesis menjadi kurang efektif. Salisbury dan Ross (1995) menyebutkan bahwa intensitas cahaya yang terlalu tinggi seperti saat tengah hari membatasi laju fotosintesis dan menghambat pengikatan CO_2 . Zulkarnain (2009) juga menjelaskan bahwa pada tanaman yang tumbuh pada dataran rendah, warna daun akan terlihat tidak segar. Hal ini dikarenakan berkurangnya kadar klorofil akibat solarisasi sehingga daun menjadi hijau kekuningan. Akibatnya, laju absorpsi cahaya

dan fotosintesis menjadi rendah. Meningkatnya suhu daun pada dataran rendah menyebabkan laju transpirasi meningkat dan tidak seimbang dengan laju absorpsi air. Akibatnya, stomata menutup dan fotosintesis berkurang. Tingginya intensitas cahaya dapat menyebabkan tidak aktifnya beberapa enzim tertentu yang mengubah gula menjadi pati di dalam daun. Akibatnya, terjadi penumpukan gula, dan sebagai aksi massa maka laju fotosintesis tertekan.

Berdasarkan ada dan tidaknya naungan, tanaman yang ditemukan pada daerah ternaungi akan memiliki ukuran daun lebih lebar dibandingkan yang terpapar cahaya langsung. Hal ini merupakan respon tanaman agar tetap mendapatkan cahaya cukup sehingga fotosintesis dapat berjalan optimal (Suci dan Heddy, 2018). Perubahan kondisi lingkungan dapat mengubah keragaan morfologi *C. asiatica* L. di daerah tersebut. Sehingga, data yang didapatkan kurang akurat. Dengan demikian, dibutuhkan karakterisasi tingkat molekuler untuk melengkapi dan memperkuat data karakterisasi morfologi (Gbolahan *et al.*, 2016).

Karakterisasi tingkat molekuler membutuhkan penanda yang sesuai sehingga dapat menentukan keanekaragaman dan kekerabatan genetik. Penanda genetik yang sering digunakan dalam kepentingan ini antara lain RFLP, RAPD, SSR, dan ISSR. Berdasarkan penelitian sebelumnya, jenis-jenis penanda molekuler tersebut memiliki hasil yang baik dalam menunjukkan keragaman dan kekerabatan *C. asiatica* L. Dalam penelitian ini digunakan penanda ISSR yang dinilai mampu mengamplifikasi dan menunjukkan polimorfisme, filogenetik *C. asiatica* L sebagaimana disebutkan dalam penelitian Zhang *et al* (2012) dan Subositi *et al* (2015). ISSR diketahui pula mampu mengamplifikasi dan menunjukkan polimorfisme family Apiaceae dengan baik. seperti penelitian oleh Briad *et al.*, (2001) mengenai perbandingan marka non-spesifik untuk identifikasi varietas wortel (*Daucus carota*), dan Bradeen *et al.*,(2002) untuk polimorfisme wortel liar dan budidaya. Selain itu, Ahmadvandi *et al.*, (2013) untuk Jintan putih (*Cuminum cyminum*), Huqail dan Faisal (2010);Petroy *et al.*, (2014);Kapital *et al.*, (2015) untuk Jintan hitam (*Nigella sativa*), Zangane *et al.*,

(2016);Bahmani *et al.*, (2016) untuk Adas (*Foeniculum vulgare*), Nasr *et al.*,(2013);Rukam *et al* (2014) untuk Ketumbar (*Coriandrum sativum*), dan Ibrahim *et al.*, (2017) untuk Petroseli (*Petroselinum crisum*). Berdasarkan beberapa penelitian tersebut dapat diketahui bahwa penanda ISSR efektif digunakan dalam menunjukkan keanekaragaman Apiaceae termasuk *C. asiatica* L.

ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) merupakan jenis penanda genetik yang biasa digunakan dalam studi filogenetik dan kekerabatan tanaman. ISSR merupakan metode berbasis PCR yang mana mengamplifikasi sekuen yang berada diantara dua mikrosatelit identik (Wu *et al.*, 1994 dalam Mariana *et al.*, 2011). Mikrosatelit merupakan sekuen unik yang tersisip diantara genom. Sekuen ini merupakan intron yaitu bagian dari genom yang tidak mengkode suatu sifat sehingga tidak mudah dipengaruhi oleh lingkungan (Morgenta and Olivieri, 1993; Reddy *et al.*, 2002). Sekuen mikrosatelit dapat terdiri atas 1, 2, 3, atau 4 nukleotida berulang yang bersifat lestari (diturunkan). Sifat lestari ini menjadikan penanda mikrosatelit dapat digunakan sebagai pendeteksi keragaman genetik dan kekerabatannya berdasarkan kesamaan pita yang teramplifikasi. Diantara penanda genetik berbasis PCR yang menggunakan mikrosatelit yaitu SSR dan ISSR. Dibandingkan dengan SSR yang hanya mengamplifikasi daerah mikrosatelit, ISSR memiliki jangkauan amplifikasi yang lebih luas karena melibatkan sekuen diantara mikrosatelit yang memiliki panjang sekuen berbeda-beda. Daerah diantara dua mikrosatelit ini juga memiliki tingkat mutasi yang tinggi dibandingkan dengan bagian genom lainnya sehingga dapat menghasilkan lebih banyak pita polimorfisme (Goldstein *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 2002). Perbedaan panjang basa dan ukuran daerah teramplifikasi akan menunjukkan besarnya polimorfisme antar sampel yang diamati. sehingga dapat menunjukkan keanekaragaman antar sampel *C. asiatica* L.

Primer ISSR yang digunakan dalam penelitian ini antara lain UBC 828, K18, dan UBC 889. UBC 828 diketahui dapat mengamplifikasi pita polimorfisme pada *C. asiatica* L. dengan baik sebagaimana disebutkan dalam Al-Qahtani *et al* (2017).

Sedangkan K18 dan UBC 889 dapat menghasilkan pita polimorfisme sebesar 96.3% dan 95.4% dalam penelitian Lucilia *et al* (2012) untuk *assesment* tanaman Tebu (*Saccharum spp.*).

Pada penelitian ini akan didapatkan dua data keanekaragaman *C. asiatica* L. pada ketinggian yang berbeda yaitu berdasarkan karakter morfologi dan molekuler. Masing-masing data dibuat analisis keanekaragaman dan kekerabatan antar aksesinya untuk mengetahui pengaruh ketinggian tempat terhadap keragaan morfologi dan molekulernya. Data kekerabatan *C. asiatica* L. ini dapat digunakan untuk melengkapi data karakter *C. asiatica* L. di Indonesia sehingga dapat dikelompokkan dengan aksesori wilayah lain yang sejenis maupun untuk mendeteksi aksesori unik (endemik). Penelitian ini termasuk dalam langkah awal pemuliaan tanaman *C. asiatica* L. sehingga sangat penting untuk dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah.

1. Bagaimana keanekaragaman *C. asiatica* L. pada ketinggian yang berbeda berdasarkan karakter morfologi?
2. Bagaimana keanekaragaman genetik *C. asiatica* L. pada ketinggian yang berbeda berdasarkan penanda molekuler ISSR?.

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah.

1. Mengetahui keanekaragaman *C. asiatica* L. pada ketinggian yang berbeda berdasarkan karakter morfologi.
2. Mengetahui keanekaragaman genetik *C. asiatica* L. pada ketinggian yang berbeda berdasarkan penanda molekuler ISSR.

1.4 .Manfaat

Manfaat dari penelitian ini antara lain.

1. Hasil analisis ini dapat digunakan untuk melengkapi karakterisasi morfologi *C. asiatica* L. di Indonesia.
2. Hasil analisis ini dapat digunakan untuk melengkapi karakterisasi molekuler *C. asiatica* L. di Indonesia.
3. Hasil analisis ini dapat melengkapi informasi kekerabatan *C. asiatica* L. di Indonesia.

1.5 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah.

1. Keanekaragaman *C. asiatica* L. pada ketinggian berbeda berdasarkan karakter morfologi membentuk pengelompokan sesuai ketinggian tempat tumbuhnya berdasarkan kemiripan karakter kuantitatif dan kualitatif.
2. Keanekaragaman genetik *C. asiatica* L. pada ketinggian berbeda berdasarkan penanda molekuler ISSR membentuk engelompokan sesuai ketinggian tempat tumbuhnya berdasarkan kesamaan kemunculan pita.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian antara lain:

1. *C. asiatica* L. yang diteliti berasal daerah Malang, Batu, dan Pasuruandengan ketinggian 300-1700 mdpl.
2. Sampel *C. asiatica* L. diambil dari daerah dengan keadaan lingkungan beragam. Keadaan tanah basah, lembab dan kering, intensitas cahaya rendah, sedang, dan tinggi, serta keadaan tanaman ternaungi, ternaungi sebagian, dan tidak ternaungi.
3. Karakter morfologi yang diamati meliputi kuantitatif dan kualitatif tiap sampel. Karakter kuantitatif yang diamati antara lain panjang tanaman, tinggi

tanaman induk dan anakan 1&2, jumlah daun tanaman induk, jumlah daun tanaman anakan 1, jumlah daun tanaman anakan 2, panjang tangkai daun induk, panjang tangkai daun anakan 1, panjang tangkai daun anakan 2, diameter tangkai daun, luas daun induk dan anakan 1&2, rata-rata panjang ruas stolon, jumlah stolon, diameter stolon.

4. Karakter kualitatif meliputi warna daun (muda dan tua), warna tangkai daun, warna buku ruas, warna stolon dan ciri khusus masing-masing aksesi. Karakter warna diukur berdasarkan *RHSColor Chart*.
5. Analisis kekerabatan genetik dilakukan berdasarkan primer UBC828, K18, dan UBC 889.



BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 *Centella asiatica* L.

2.1.1 Botani *C. asiatica* L.

Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L.) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divission	: Tracheophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Rosidae
Order	: Apiales
Family	: Apiaceae/Umbelliferae
Genus	: <i>Centella</i>
Spesies	: <i>Centella asiatica</i> L.

(ITIS, 2011; IUCN, 2013; GBIF, 2017;)

Nama *Centella* diambil dari bahasa Yunani “centun” yang berarti ratusan. Hal ini menggambarkan percabangan *C. asiatica* L. yang bercabang banyak melalui stolonnya. Sebelumnya, tanaman ini diperkenalkan dengan nama *Hydrocotyle asiatica* L. oleh Carl Linnaeus yang kemudian diklarifikasi ulang sebagai *Centella asiatica* L. menggunakan sistematika botani yang valid (Sudaakaran *et al.*, 2017).

Allah SWT berfirman dalam Al-Quran surat Thaha ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَّكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّىٰ (طه [٢٠]: ٥٣)

Artinya: Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam (Q.S. Thaha [20]:53).

Pada ayat tersebut dijelaskan bahwa Allah telah menjadikan bumi terbentang luas padanya terdapat jalan-jalan untuk dilalui makhluk. Allah juga menurunkan air hujan sehingga tumbuh berbagai macam jenis tumbuhan (Al-Qarni, 2007). Kata نَبَاتٍ atau نَبْتٍ artinya adalah sesuatu yang keluar dari tanah baik berupa yang beranting seperti pohon atau yang tidak beranting seperti rerumputan, namun kata ini lebih dikhususkan untuk menyebutkan tanaman tak beranting (Al-Ashfahani, 2017). Berdasarkan ciri yang dijelaskan dalam tafsir, *C. Asiatica* L. Termasuk dalam kelompok نَبَاتٍ yaitu kelompok rerumputan yang tidak beranting serta diciptakan beraneka ragam jenisnya di bumi.

C. asiatica L. merupakan tanaman herba perennial, terna menahun, berstolon panjang dan ramping, yang dibedakan jenisnya berdasarkan panjang internodus (Gupta dan Chaturvedi, 2017; Salakthipriya *et al.*, 2018) Tanaman ini memiliki persebaran luas khususnya di daerah tropis dan sub-tropis dan dikenal sebagai salah satu obat herbal tradisional yang diterapkan secara turun temurun di berbagai Negara seperti Indonesia, Malaysia, India, dan Cina. Saat ini permintaan industri farmakologis untuk *C. asiatica* L. terus meningkat mengetahui khasiatnya yang beraneka ragam seperti penyembuh luka, antibakteri, antiinflamasi, kanker, stroke, memperlancar peredaran darah, hingga obat bagi penderita disorder dan gangguan jiwa.

C. asiatica L.. termasuk dalam *kingdom* plantae atau kelompok tanaman karena memiliki organel sel berupa plastid yang mengandung klorofil untuk fotosintesis, *C. asiatica* L. Selanjutnya tanaman ini digolongkan dalam divisi Tracheobiophyta karena merupakan kelompok tumbuhan yang memiliki berkas pembuluh. juga merupakan tumbuhan yang berkembangbiak dengan biji sehingga digolongkan dalam Subdivisi *Spermatophyta*. *C. asiatica* L. Kemudian digolongkan dalam kelas Magnoliopsida atau disebut juga dengan dikotil karena sifat bijinya yang berkeping

dua. Selain itu sifat morfologi lain seperti akar tunggang, bangun daun bulat dan tulang daun menyirip juga menunjukkan ciri Magnoliopsida (Takhtajan, 2009).

Ciri dari *C. asiatica* L. yang menjadikannya digolongkan dalam Sub-kelas Rosidae adalah ovarium majemuk dengan 2 lokus yang masing-masing diisi oleh 1 ovulum, serta stamen yang tersusun sentripetal (Xu and Le *et al.*, 2017). Tanaman ini digolongkan dalam family Apiaceae atau Umbelliferae karena memiliki susunan Bungan majemuk yang berbentuk seperti payung (*umberella*) (Xu and Le *et al.*, 2017).

2.1.2 Morfologi *C. asiatica* L.

Morfologi *C. asiatica* L. dapat diuraikan sebagai berikut:



Gambar 2. 1 Morfologi *C. asiatica* L.
(Sumber: Kubitzki, 2004).

a) Batang

Batang *C. asiatica* L. sangat kecil. Dari batang tumbuh stolon n menjalar serta bercabang mencapai 10-90 cm (Mora dan Armon, 2012; Xu dan Le *et al.*, 2017).Warna batang cokelat kemerahan. Sementara tinggi tanaman dapat mencapai 15 cm (Dawn *et al.*, 2016; Xu dan Le *et al.*, 2017) Bentuk stolon ini silinder yang mana pada setiap nodusnya muncul akar saat menyentuh tanah.

Permukaan batang kasar dan berambut halus. Internodus pada stolon panjang. Propagasi atau pembentukan tanaman baru dapat berasal dari stolon (James, 2009; Sakthipriya *et al.*, 2016).

b) Daun

Daun *C. asiatica* L. merupakan daun tunggal berwarna hijau berbentuk seperti kipas atau ginjal. Bangun daun bulat dengan pangkal membelah dan melekuk ke dalam membentuk hati. Permukaan daun licin dengan tekstur seperti kertas. Tepi daun bergerigi dan agak melengkung ke atas. Tulang daun menjari berpusat di pangkal dan tersebar ke ujung. Panjang daun 1,5-4 cm dan lebar 1,5-5 cm serta berdiameter 1-7 cm (Mora dan Armon, 2012; Dawn *et al.*, 2016; Xu dan Le *et al.*, 2017).

Tangkai daun berbentuk seperti pelepah, agak panjang, berukuran 1,5-50 cm tergantung kesuburan tempat tumbuhnya. Sepanjang tangkai daun beralur dan di pangkalnya terdapat daun sisik yang sangat pendek, licin, tidak berbulu, berpadu dengan pangkal tangkai daun (Dawn *et al.*, 2016; Subositi, 2016; Xu, Zhenghao and Le Chang *et al.*, 2017). Daun *C. asiatica* L. tersusun roset dengan jumlah sekitar 2-10 daun per rosetnya (Subositi, 2016).

2.2 Persebaran dan Syarat Tumbuh *C. asiatica* L.

C. asiatica L. terdistribusi luas di daerah tropis dan sub-tropis Asia, Afrika, dan Madagaskar (Prasad, 2008; Ernawati *et al.*, 2016; LAL *et al.*, 2017; Salakthipriya *et al.*, 2018). Diantara negara-negara Asia yang terdapat *C. asiatica* L. antara lain India, Malaysia, Indonesia, Cina, dan Jepang. Sebutan internasional *C. asiatica* L. adalah *Gotu cola* atau *Asiatic Pennywort*. Di India dikenal dengan nama *Mandookarpani*, *Takip-kohot* di Filipina, *Bevilque* di Perancis (Sutardi, 2016), *Fo-tiling* di Cina, *Indrotile* di Italia, *Indischer wassernabel* di Jerman, *Hierba doclavo* di Spanyol, *Hydrocotile asiaticum* di Prancis (Sudaakaran *et al.*, 2017).

Di Indonesia, *C. asiatica* L. dapat ditemukan hampir diseluruh wilayah yang sesuai dengan syarat tumbuhnya. Brinkhaus *et al* (2000), menyatakan bahwa tanaman ini dapat ditemukan di wilayah Sumatera, Jawa, Sulawesi, Bali, dan Flores. Sedangkan Bermawie (2008) menambahkan bahwa tanaman ini dapat ditemukan di seluruh propinsi dan kota mulai dari wilayah Aceh hingga Papua (Bermawie, 2008). Sebutan untuk tanaman ini berbeda-beda tiap daerah. Di Aceh tanaman ini disebut Pegagan, Kaki Kuda (Sumatera), Tikusan (Madura), Taidu (Bali), Kori-kori (Halmahera), Pegago (Minangkabau), Dogauke atau Gogauke (Papua), Koliditi manora (Maluku), dan Bebile (Lombok).

C. asitica L. dapat ditemukan pada daerah dengan ketinggian 100-2500 mdpl (Bermawie *et al.*, 2008), namun lebih optimum tumbuh pada ketinggian diatas 700 mdpl (Sahu *et al.*, 2015). Tanaman ini dapat ditemukan di berbagai kondisi lingkungan terutama di tanah basah dengan suhu lembab seperti tepian sungai, selokan, atau padang rumput. Tanaman ini juga dapat ditemukan di tanah kering atau berpasir baik ternaungi atau ditempat terbuka (Bermawie *et al.*, 2008; Mora dan Armon, 2012; Sahu *et al.*, 2017; Prasad *et al.*, 2018). *C. asiatica* L. umumnya sangat mudah tumbuh diberbagai tempat atau tidak memiliki batasan kondisi lingkungan yang khusus selain iklim dan ketinggian tempat. Pada daerah yang sesuai tanaman ini bahkan bisa ditemukan di dinding-dinding lembab.

C. asiatica L. memiliki distribusi yang luas di pulau Jawa baik Jawa Barat, Jawa Tengah, maupun Jawa Timur. Nama lokal *C. asiatica* L. untuk wilayah Jawa antara lain, Pegagan (DKI Jakarta), Antanan (Jawa Barat), dan Gagan-gagan atau Panigowang (Jawa) (Sutardi, 2016). Beberapa penelitian mengenai keberadaan *C. asiatica* L. di pulau Jawa antara lain, Yatias (2015) di Sukabumi Jawa Barat, Afrianto *et al.*, (2017) di gunung merapi Jawa Tengah, Lailaty *et al* (2016) di kebun raya Cibodas Jawa Barat, Maisyaroh (2010) di Cangar Jawa Timur, dan Kustiari (2015) di Tawangmangu Jawa Tengah.

2.3 Keanekaragaman Morfologi

Morfologi tumbuhan merupakan ilmu yang mempelajari bentuk dan susunan tubuh tumbuhan. Dalam definisi secara luas morfologi tumbuhan juga harus dapat menentukan fungsi masing-masing bentuk tubuh, berusaha mengetahui asal bentuk dan susunan tubuh yang demikian, serta dapat member jawaban mengenai alasan tubuh tumbuhan memiliki bentuk dan susunan yang beraneka ragam (Tjitrosoepomo, 2015).

Tjitrosoepomo (2015) menyatakan bahwa tumbuhan dapat mengalami perubahan morfologi hingga evolusi yang utamanya disebabkan oleh penyesuaian terhadap alam sekitar. Hal inilah yang menyebabkan terjadinya keanekaragaman morfologi. Keanekaragaman atau variasi morfologi dapat terjadi pada tanaman dalam satu spesies yang sama (*intraspecies*).

Penilaian keanekaragaman morfologi dapat diketahui dengan membandingkan karakter yang Nampak seperti daun, batang, akar, bunga, buah, dan organ modifikasi baik secara kuantitatif maupun kualitatif. Pada *C. asiatica* L. menurut Bermawie *et al* (2008) karakter kuantitatif yang dapat diamati antara lain tinggi tanaman, jumlah daun tanaman induk, jumlah daun tanaman anakan 1 dan 2, panjang tangkai daun, diameter tangkai daun, panjang daun, lebar daun, panjang ruas stolon, jumlah stolon, diameter stolon. Sedangkan karakter kualitatif meliputi warna daun (muda dan tua), bentuk daun (muda dan tua), bentuk tepi daun, terkstur permukaan atas daun, warna tangkai daun, warna buku ruas, warna stolon.

2.4 Faktor Ketinggian Tempat Tumbuh Terhadap Keanekaragaman Morfologi

Keragaan morfologi suatu tanaman sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan terutama ketinggian tempat tumbuh. Hal ini dikarenakan perbedaan ketinggian akan membentuk perbedaan pada faktor lingkungan lainnya seperti suhu, curah hujan, intensitas cahaya, dan kelembaban (Hakim *et al.*, 2015).

a) Curah hujan

Curah hujan berpengaruh terutama pada produktifitas tanaman. Secara morfologi tanaman yang tumbuh pada daerah dengan curah hujan rendah akan memiliki akar lebih kurus dan panjang untuk memperluas daerah penyerapan air. Pada tanaman herba, batang yang seharusnya berwarna hijau akan berwarna kemerahan karena kurangnya air dan produksi klorofil yang sedikit. Begitupula dengan daun, daun akan memiliki warna yang lebih pudar dan ukuran yang lebih sempit dibandingkan dengan tanaman pada daerah dengan curah hujan tinggi. Penyempitan ukuran daun ini merupakan upayah adaptasi untuk mengurangi penguapan.

b) Suhu dan Kelembaban Lingkungan

Dataran rendah memiliki suhu lebih tinggi dibandingkan dengan dataran tinggi. Tanaman pada dataran rendah beradaptasi terhadap suhu tinggi melalui penyempitan ukuran daun. Suhu yang tinggi menyebabkan tanaman lebih mudah kehilangan air melalui penguapan. Sehingga, ukuran daunnya akan lebih sempit dibandingkan dengan dataran tinggi untuk mengurangi penguapan (Raharjeng, 2015).

c) Paparan Cahaya Matahari

Cahaya sangat berpengaruh terhadap pembentukan klorofil. Efek cahaya meningkatkan produksi enzim metabolik yang digunakan untuk membentuk klorofil sehingga dengan penyinaran yang cukup produktifitas klorofil dapat berjalan dengan baik serta fotosintesis lebih efisien (Raharjeng, 2015). Tanaman dengan paparan cahaya yang lebih banyak cenderung berwarna lebih terang. Namun, apabila kualitas cahaya yang dipaparkan kurang baik maka klorofil dapat mengalami kerusakan sehingga dengan intensitas yang besar tersebut warna daun menjadi hijau pucat.

Dataran rendah memiliki intensitas cahaya yang lebih tinggi dengan kualitas yang lebih rendah dibandingkan dengan dataran tinggi. Hal inilah yang menyebabkan warna hijau pada tanaman dataran rendah cenderung lebih terang namun pucat atau kurang segar. Sebaliknya, paparan cahaya yang cukup serta kualitasnya yang baik pada dataran tinggi menyebabkan daun tanaman terlihat lebih segar. Terutama jika tanaman berada pada daerah yang tidak ternaungi (Raharjeng, 2015). Selain itu, respon morfologis lainnya adalah tanaman pada daerah ternaungi akan memiliki ukuran daun yang lebih lebar. Hal ini bertujuan untuk memperluas daerah penangkapan cahaya sehingga fotosintesis dapat tetap berjalan optimal (Suci dan Heddy, 2018).

d) Ketersediaan Unsur Hara

Unsur hara utama yang sangat mempengaruhi keragaan tanaman adalah unsur N dan P. Keduanya merupakan unsur hara makro yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah banyak. Unsur N (Nitrogen) berperan penting dalam pembentukan klorofil, protoplasma, protein, dan asam nukleat. Sedangkan unsur P (Fosfor) merupakan komponen penyusun senyawa untuk transfer energi (ATP-ADP) untuk sistem informasi genetik (DNA-RNA), membran sel (fosfolipid) dan fosfoprotein (Fahmi, 2010). Kekurangan unsur N akan ditunjukkan dengan warna yang pucat bahkan menguning atau kering. Sedangkan kekurangan unsur P ditandai dengan warna daun tua yang kemerah-merahan yang disebabkan terbentuknya pigmen antosianin akibat penumpukan gula karena terhambatnya proses sintesis protein (Atmaja *et al.*, 2017). Kekurangan unsur N dapat membatasi tanaman dalam menerima unsur P (Fahmi, 2010). Sementara kekurangan unsur P menghambat penyerapan unsur lain seperti K dan Cu yang membutuhkan ATP dalam pengikatannya (Atmaja *et al.*, 2017). Sifat morfologi sangat mudah dipengaruhi oleh lingkungan sehingga keanekaragamannya sangat besar. Hal ini berbeda dengan sifat genetik yang stabil dan khas secara turun-temurun (Bermawie *et al.*, 2008). Meskipun demikian, apabila sifat morfologi ini bertahan dalam waktu yang lama dan menjadi sifat yang

diturunkan, perubahan susunan genetik sangat mungkin terjadi, sehingga muncul keanekaragaman genetik (Hakim *et al.*, 2015). Ada beberapa sifat morfologi tanaman yang hanya muncul sementara akibat kondisi lingkungan saja (tidak dipengaruhi gen), dan ada pula yang kemunculannya bersifat permanen yang merupakan hasil interpretasi dari susunan genetiknya. Hal inilah yang menyebabkan penelitian keanekaragaman tanaman perlu dilengkapi dengan data molekuler.

2.5 Keanekaragaman Genetik

Allah SWT berfirman:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ۚ ٤٩ وَمَا أَمْرُنَا إِلَّا وَّحْدَةً نُّكَلِّمُكَ بِالْبَصْرِ ۚ ٥٠

Artinya: Sungguh Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran. Dan perintah Kami hanyalah dengan satu perkataan (seperti kedipan mata)(Al-Qamar [54]:49-50).

Berdasarkan ayat Al-Quran Surat Al-Qamar (49-50) dijelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu sesuai dengan ukuran yang telah ditetapkan-Nya. Kata بِقَدَرٍ “menurut ukuran” menurut Ibnu Athiyah merupakan takdir yang membatasi suatu tempat, waktu, ukuran dengan kemaslahatan dan ketelitian (Al-Ashfahani, 2017). Menurut tafsir Quraish Shihab (2002) dijelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu sesuai dengan hikmahnya. Tidak berlebihan dan tidak pula kurang. Hal ini mencakup semua makhluk dari yang terkecil sampai yang nampak. Allah menciptakan sesuai dengan *qadar* yang telah diketahui-Nya, tertulis oleh pena-Nya, demikian pula dengan sifat-sifat yang ada padanya. Dan yang demikian ini mudah bagi Allah sehingga pada ayat selanjutnya disebutkan bahwa untuk kejadian tersebut hanya diperintahkan satu kali saja atau seperti kedipan mata.

Hal-hal yang nampak pada makhluk hidup telah Allah atur dengan rapi pada materi genetik yang tersimpan dalam nukleus. Dalam materi genetik ini tersimpan ribuan informasi mengenai bentuk, warna, keturunan, hingga umur suatu organisme.

Ketetapan Allah ini dapat dipelajari polanya yang rumit oleh manusia yang menunjukkan betapa teratur dan besarnya kekuasaan Allah.

Asam Deoxyribonukleotida (DNA) merupakan suatu untai ganda (*double helix*) yang tersusun atas nukleotida. Gen adalah bagian dari DNA dengan panjang minimum tertentu yang mengkode suatu sifat sehingga dapat ditranslasikan menjadi 'suatu protein. Kumpulan dari gen-gen disebut dengan genom yang mengkode seluruh sifat dari suatu individu (Yuwono, 2010). Suatu spesies yang sama dapat memiliki keanekaragaman genetik. Perbedaan susunan gen yang besar dapat mempengaruhi keragaan morfologi suatu individu. Umumnya individu yang berkerabat dekat secara genetik memiliki ciri morfologi, sitologi, hingga fitokimia yang mirip.

Susunan gen tidak mudah dipengaruhi oleh lingkungan. keragaan morfologi dan fitokimia suatu tanaman dapat berubah sesuai dengan tempat tumbuhnya seperti ketinggian, iklim, jenis tanah, dan temperatur (Bougand, 2001 dalam Gbolahan, 2016). Oleh karena itu, karakterisasi tingkat molekuler dinilai lebih akurat karena dapat mendeteksi kesamaan dan perbedaan antar individu meskipun telah berubah keragaan morfologinya (Gbolahan, 2016).

2.6 Penanda Molekuler ISSR

Penanda molekuler merupakan suatu penandayang menggunakan asam amino, protein atau sekuen DNA sebagai bahan utama (Suparman, 2012).Penanda molekuler suatu sifat yang dapat diwariskan padaketurunannya dan dapat berasosiasi dengan genotip tertentu sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi genotp tertentu.Suatu sifat dapat digunakan sebagai penanda apabila sifat tersebut diturunkan dan terkait (*linkage*) terhadap sifat tertentu yang dikehendaki.Penanda molekuler dinilai akurat dalam menentukan kekerabatan atau keragaman karena sifatnya yang tidak terpengaruh lingkungan (Nuraida, 2012).

Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) merupakan salah satu penanda DNA berbasis PCR yang menggunakan sekuen mikrosatelit (Zietkiewicz, *et al.*, 1994 dalam Yulianti *et al.*, 2010). Mikrosatelit terdiri dari sekuen berulang dalam untai DNA yang tidak mengkode sifat tertentu dan bersifat lestari (diturunkan) (Widiastuti *et al.*, 2013). Sekuen berulang ini dapat terdiri dari di, tri, dan tetra oligonukleotida (Semagn, 2006). Penanda ISSR merupakan bentuk pengembangan dari SSR (*Simple Sequence Repeat*). Pada SSR primer akan menempel dan men-copy bagian mikrosatelit, sedangkan pada ISSR, primer akan menempel pada dua mikrosatelit dan mengamplifikasi sekuen diantaranya (gambar.2) (Karaca and Ince, 2008). Dibandingkan dengan SSR, ISSR memiliki jangkauan amplifikasi yang lebih luas karena melibatkan sekuen diantara mikrosatelit yang memiliki panjang sekuen berbeda-beda. Biasanya pita DNA yang dihasilkan dari ISSR sekitar 200-2000 bp (Karaca and Ince, 2008). Daerah diantara dua mikrosatelit ini juga memiliki tingkat mutasi yang tinggi dibandingkan dengan bagian genom lainnya sehingga dapat menghasilkan lebih banyak pita polimorfisme (Goldstein *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 2002). Perbedaan panjang basa dan ukuran daerah teramplifikasi akan menunjukkan besarnya polimorfisme antar sampel yang diamati.

ISSR merupakan penanda genetik yang bersifat kodominan sehingga dapat mendeteksi alel-alel heterozigot. Hal ini akan sangat bermanfaat untuk membedakan individu dalam satu spesies dapat digenotipkan secara khusus (Powell *et al.*, 1996 dalam Yulianti *et al.*, 2010). Meskipun demikian, hasil pemisahan ISSR sebagai dominan marker pada sampel yang terikat hukum mendel sederhana sangat baik (Reddy *et al.*, 2002)

Kelebihan penanda ISSR adalah pengaplikasiannya yang sederhana, mudah dilakukan, cepat, kuantitas DNA rendah (10-30 bp), konsisten, serta tidak memerlukan banyak informasi untuk mendesain primer. (Zietkiewicz *et al.*, 1994 dalam Yulianti *et al.*, 2010). Penanda ISSR tidak memerlukan desain primer karena akan bekerja secara acak menempel pada bagian mikrosatelit yang sesuai (Narayanan,

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan metode campuran deskriptif kuantitatif dan kualitatif. Variabel kontrol berupa daerah pengambilan aksesori *C. asiatica* L., parameter pengamatan morfologi, dan jenis primer yang digunakan dalam karakterisasi molekuler. Sedangkan variabel terikat berupa dendogram hasil analisis *C. asiatica* L. berdasarkan sifat morfologi dan molekuler menggunakan metode ISSR.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2019-Desember 2019. Sampel *C. asiatica* L. didapatkan dari 15 tempat pilihan dengan ketinggian 100-1700 mdpl di Malang, Batu, dan Pasuruan. Selanjutnya penelitian dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Daftar tempat beserta ketinggian wilayah pengambilan sampel *C. asiatica* L dapat diuraikan sebagai berikut.

Tabel 3. 1Daftar tempat dan ketinggian wilayah pengambila sampel *C. asiatica* L.

No	Ketinggian	Garis lintang	Garis bujur	Kota/Kab	Tempat
1	300 mdpl	S07 ⁰ 46.515'	E112 ⁰ 44.398'	Pasuruan	Purwodadi,
2	350 mdpl	S07 ⁰ 47.833'	E112 ⁰ 43.941'	Pasuruan	Purwodadi,
3	500 mdpl	S07 ⁰ 47.861'	E112 ⁰ 43.971'	Malang	Malang
4	600 mdpl	S07 ⁰ 57.037'	E112 ⁰ 36.446'	Malang	Dau
5	800 mdpl	S07 ⁰ 55.574'	E112 ⁰ 35.454'	Malang	Gubuklakah
6	1000 mdpl	S08 ⁰ 01.878'	E112 ⁰ 48.128'	Malang	Gubuklakah
7	1100 mdpl	S08 ⁰ 01.733'	E112 ⁰ 49.395'	Malang	Coban Pelangi

8	1200 mdpl	S08 ⁰ 00.802'	E112 ⁰ 51.864'	Batu	Coban Talun
9	1300 mdpl	S07 ⁰ 49.357'	E112 ⁰ 30.609'	Batu	Coban Rondo
10	1320 mdpl	S07 ⁰ 52.080'	E112 ⁰ 29.149'	Batu	Coban Talun
11	1400 mdpl	S07 ⁰ 48.256'	E112 ⁰ 30.978'	Batu	Tulungrejo
12	1500 mdpl	S07 ⁰ 47.635'	E112 ⁰ 31.248'	Batu	Cangar
13	1600 mdpl	S07 ⁰ 46.985'	E112 ⁰ 31.479'	Batu	Cangar
14	1700 mdpl	S07 ⁰ 44.521'	E112 ⁰ 32.033'	Batu	Cangar

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam karakterisasi morfologi antara lain penggaris, jangka sorong, pensil, kamera, box sampel, buku catatan, Aplikasi GPS esensial, dan aplikasi altimeter. Sedangkan untuk karakterisasi molekuler dibutuhkan tube 1,5 ml (*Biologix*), tip (putih, kuning, biru) (*Biologix*), mikropipet (*Bio-rad*), freezer (*Thermo-scientific*), mortar, alu, spatula, neraca analitik (*Sartorius*), waterbath (*Memmert*), sentrifuse (*Biorad*), microwafe (*U-ROLUX*), Erlenmeyer (*Herma*), gelas ukur (*Herma*), nanodrop, alat elektroforesis (*Bio-Rad*), thermal cycler (*Bio-Rad*), dan Gel Doc (*Bio-Rad*).

3.3.2 Bahan-bahan

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian karakterisasi morfologi antara lain sampel segar *C. asiatica* L., kertas putih, silica gel, dan es batu. Sedangkan untuk karakterisasi molekuler dibutuhkan buffer CTAB (*Applicem*), kloroform, fenol, etanol 70% (*Emsure*), isopropanol (*Emsure*), ddh2o, agarose (*SciencePreneur*), TBE, buffer TE, PCR mix(*Promega*), loading dye, EtBr (*Sigma Al-Dricc*) molecular water (*Generik*), agarose (*SciencePreneur*), TBE (*Thermoscientific*),

PCR mix (*Thermoscientific*), loading dye (*Thermoscientific*), EtBr (*Sigma Aldrich*) dan primer ISSR (*Integrated DNA Technologies*) sebagai berikut:

Tabel 3.1 Daftar primer ISSR yang digunakan dalam karakterisasi molekuler

No	Primer	Sekuen	Tm
1	UBC 828	5'TGTGTGTGTGTGTGTGA3'	52
2	K18	5'DVHCACACACACACACA3'	54
3	UBC 889	5'BDBCACACACACACACA3'	54,0

(Lucilia *et al.*, 2011; Al-Qahtani *et.*, 2017).

3.4 Prosedur Penelitian

Analisis Keanekaragaman *C. asiatica* L. Jawa Timur berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler ISSR diawali dengan eksplorasi sampel, karakterisasi morfologi, isolasi DNA, uji kualitatif dan kuantitatif, PCR dengan primer ISSR, elektroforesis, dan analisis data.

3.4.1 Eksplorasi Sampel

Eksplorasi sampel dilakukan pada 14 tempat dengan ketinggian yang berbeda mulai dari 300 mdpl hingga 1700 mdpl di area Malang, Batu, dan Pasuruan. Penentuan titik sesuai dengan ketinggian tertentu dilakukan menggunakan *Altimeter*. Titik penemuan *C. asiatica* L. ditandai dengan menggunakan *Gps Essential*.

A. Karakterisasi morfologi

Karakterisasi morfologi dilakukan berdasarkan karakter kuantitatif dan kualitatif. Pengukuran *C. asiatica* dilakukan pada bagian dengan ukuran terbesar yang diduga sebagai tanaman induk beserta 2 tanaman anakan hasil percabangan stolon. Pada penelitian ini dilakukan 3 kali ulangan.

a) Karakter kuantitatif

Karakter kuantitatif yang diamati antara lain panjang tanaman, tinggi tanaman induk dan anakan 1&2, jumlah daun tanaman induk, jumlah daun tanaman anakan 1, jumlah daun tanaman anakan 2, panjang tangkai daun induk, panjang tangkai daun anakan 1, panjang tangkai daun anakan 2, diameter tangkai daun, luas daun induk dan anakan 1&2, rata-rata panjang ruas stolon, jumlah stolon, diameter stolon.

Panjang tanaman diukur dari tanaman induk hingga ujung stolon terakhir tanaman anakan. Sedangkan tinggi tanaman diukur dari bagian terbawah tangkai sebelum akar hingga ujung daun tanaman. Panjang tangkai diukur dari sebelum stolon hingga dibawah daun, sedangkan diameter tangkai diukur menggunakan jangka sorong.

Jumlah ruas dihitung dari tanaman induk ke anakan 2. Kemudian panjang stolon didapatkan dari pengukuran rata-rata jarak anatar stolon ke ruas. Selanjutnya diameter stolon diukur menggunakan jangka sorong. Luas daun diukur berdasarkan panjang dikalikan lebar daun pada daun terbesar tiap tanaman induk dan anakan. Sedangkan tebal daun juga diukur menggunakan jangka sorong (Bermawie, 2008).

b) Karakter kualitatif

Karakter kualitatif yang diukur meliputi warna daun (muda dan tua), ciri, warna tangkai daun, warna buku ruas, dan warna stolon. Karakter warna diukur berdasarkan *RHSColor Chart* (Bermawie, 2008)

3.4.2 Analisis Data Karakter Morfologi

Data hasil karakterisasi morfologi berdasarkan pengukuran secara kuantitatif dan kualitatif digabungkan dalam tabel pengamatan pada MS. Excel. Data

tersebut kemudian diuji jarak berganda Duncan 5% untuk menentukan pengaruh ketinggian terhadap masing-masing parameter pengukuran morfologi tanaman.

Analisis keanekaragaman dan kekerabatan antar aksesori dilakukan dengan membuat dendogram filogenetik. Data yang telah disusun dalam *Ms. Excel* dinotasikan (*score*) sesuai dengan karakter yang didapatkan. Data ini kemudian dianalisis klaster menggunakan program PAST.362 meliputi dendogram kekerabatan dengan metode *Unweighted Pair Grup Method Using Arithmetic Method* (UPGMA).

3.4.3 Isolasi DNA

DNA diisolasi dari bagian daun sampel segar *C. asiatica* L. menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi berdasarkan Zhang *et al.*, (2011). Sampel daun *C. asiatica* L. ditimbang sebanyak 0, 2 g kemudian di-*freezer* selama 12 jam bersama mortar dan alu. Sampel selanjutnya digerus pada mortar dan alu dingin. Sampel halus dimasukkan dalam tube 2 ml dan ditambahkan 600 μ l *buffer CTAB* 2% (75 mM Tris HCl, 15 mM EDTA, 1, 05 mM NaCl, 0,4 % 2-merchapthoethanol, 1,5% PVP, 2% CTAB). Sampel diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 65° C selama 50 m. Selama inkubasi, sampel dalam tube sesekali dibolak-balik untuk menjaga sampel tetap homogen. Setelah inkubasi, sampel ditunggu sampai suhu kembali normal. Selanjutnya ditambahkan fenol:kloroform:isoamilalkohol (PCI) dengan perbandingan 3:2:1 dan disentrifuse 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatant dari hasil sentrifuse diambil dan dipindahkan ke tube baru. Supernatant kemudian ditambah dengan isopropanol dingin dengan perbandingan supernatant:isopropanol (2:3). Campuran larutan tersebut kemudian dibolak-balik untuk homogenasi dan disentrifugasi 12000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya supernatant dibuang, pellet ditambahkan dengan ethanol 70% dan 96% kemudian dikering anginkan. Langkah terakhir

ditambahkan 100 μ l *TE buffer* (2,5 mM Tris HCl, 0,25 mM EDTA) kemudian disimpan dalam freezer.

3.4.4 Uji Kualitatif DNA

Isolat DNA diuji kualitasnya melalui elektroforesis pada gel agarosa 1% dalam 30 ml TBE. Pemasakan agar dilakukan menggunakan *Microwave* hingga berwarna bening. Agar kemudian dicetak pada tray yang telah diseimbangkan posisinya dengan *Water compass*. Sumuran agar dicetak menggunakan sisir (*Well forming comb*) pada bagian tepi. Selanjutnya, ditunggu sekitar 15menit hingga agar mengeras untuk melepas sumuran. Agar beserta tray kemudian dipindahkan ke tank elektroforesis.

Posisi sumuran agar ditempatkan pada kutub negatif (-) yang ditandai dengan warna hitam pada tank berisi TBE. Pada sumuran pertama dimasukkan marker DNA 1 Kb sebanyak 1 μ l. Sampel DNA hasil isolasi 2 μ l dihomogenkan dengan 1 μ l *loading dye* kemudian dimasukkan dalam sumuran agarosa mulai dari sumuran kedua. Tank kemudian ditutup sesuai warna dan dihubungkan pada *Power Suplay*. Pada *Power Suplay* diatur tegangan 100 volt dan waktu 30 menit kemudian ditekan tombol *run*. Langkah selanjutnya setelah elektroforesis adalah visualisasi DNA menggunakan *UV-transiluminator Gel doc*. Keberhasilan isolasi DNA ditandai dengan munculnya pita DNA.

3.4.5 Uji Kuantitatif DNA

Uji kuantitas DNA dilakukan dengan menggunakan nanodrop. Sebanyak 1 μ l sampel diuji pada nanodrop untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA. Konsentrasi DNA diketahui berdasarkan rumus $\lambda_{260} \times \text{faktor pengencer} \times 50$ μ g/ml. Sedangkan kemurnian DNA diketahui dari hasil perbandingan nilai absorbansi $\lambda_{260}/\lambda_{280}$. DNA dinyatakan murni jika nilai absorbansinya berkisar antara 1,8-2 ng/ml. Apabila nilai kurang dari 1,8 maka dinyatakan terkontaminasi

Protein, sedangkan jika nilai absorbansi lebih dari 2 menunjukkan DNA terkontaminasi RNA.

3.4.6 PCR

Persiapan proses PCR dilakukan dengan mengambil 3 µl isolat DNA 25 ng, 1 µl primer ISSR, 2 µl ddH₂O dan 5 µl PCR mix dalam microtube PCR. Amplifikasi DNA dilakukan dalam *thermocycler* dengan ketentuan pradenaturasi 95°C 3 menit, denaturasi 95°C 1 menit, annealing 48-54°C 30 detik, elongasi 72°C 2 menit 39x siklus, dan post elongasi 72°C 8 menit, kemudian suhu dipertahankan pada 4°C sampai proses selesai. Hasil amplifikasi kemudian dilihat dengan elektroforesis pada 1,5% agarose dan TBE buffer.

3.4.7 Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan untuk mengetahui keberhasilan PCR. Elektroforesis dilakukan pada agarose 1,5% dan 30 ml TBE buffer. Pada sumuran pertama agarosa dimasukkan marker DNA 100 bp sebanyak 1µl dilanjutkan dengan sampel hasil PCR 5 µl pada sumuran kedua dan seterusnya. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit kemudian ditekan tombol *run*. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan pada UV-Transiluminator.

3.4.8 Analisis Data Hasil Elektroforesis

Data yang dihasilkan dari hasil elektroforesis berupa gambar kemunculan pita DNA masing-masing primer dan sampel. Berdasarkan kemunculan pita tersebut, dibuat data biner dengan notasi 1 untuk adanya pita dan 0 untuk pita yang tidak muncul. Data ini kemudian dianalisis Primer Information Content (PIC) menggunakan Ms. Excel. Analisis kluster menggunakan program PAST.362 meliputi dendrogram kekerabatan dengan metode Unweighted Pair

Grup Method Using Aritmetic Method (UPGMA), dan analisis similaritas masing-masing pita berdasarkan rumus index similaritasjaccard.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakter Morfologi *C. asiatica* L. Urb.

4.1.1 Hasil Pengukuran Kuantitatif

Karakter morfologi *C. asiatica* L. menunjukkan karakter fenotip sesungguhnya dari tanaman tersebut. Karakter morfologi ini merupakan reaksi dari keadaan fisiologis suatu tanaman yang dipengaruhi oleh berbagai macam faktor seperti faktor molekuler maupun tempat dan kondisi lingkungan tumbuh (Ai dan Torey, 2013). Hasil pengukuran karakter kuantitatif morfologi tanaman dirinci pada tabel 4.1 yang dinyatakan dalam bentuk angka dan notasi berdasarkan uji DMRT. Sedangkan keadaan lingkungan tempat tumbuh masing-masing aksesori *C. asiatica* L. diuraikan dalam tabel 4.2.

Tabel 4. 1 hasil uji DMRT Karakter Kuantitatif Morgologi *C. asiatica* L.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	Re rat a
Ketinggia n	300 mdpl	350 mdpl	500m dpl	600 mdpl	850 mdpl	1000 mdpl	1100 mdpl	1200 mdpl	1300 mdpl	1320 mdpl	1400 mdpl	1500 mdpl	1600 mdpl	1700 mdpl	28
Panjang tanaman	22ab	19a	21 Ab	20ab	35ab	24ab	29ab	40ab	41ab	44b	28ab	23ab	22ab	27ab	3,0 9
jumlah ruas	3a	3a	2,7a	3,3a	2,7a	3a	3a	3,3a	3a	4a	3a	3a	3,3a	3a	10, 9
Panjang stolon	8a	9ab	8,6 Ab	7,4a	12abc	9,5ab	19c	13 abc	15,6 Bc	11,7 Ab	9,5 ab	11ab	9,33 Ab	10ab	0,3
Diameter stolon	0,33c	0,48d	0,22b	0,42d	0,28b	0,13a	0,40d	0,35c	0,48d	0,38c	0,33c	0,25b	0,38c	0,27b	14, 6
Tinggi tanaman	17,5b	12b	21,4	15,5b	13b	3,7a	11,6b	12,7b	30c	17,6	13,4b	7,3a	12b	16,5b	10, 7
Tinggi tangkai	9,7a	5,6a	16,5b	12b	9,5a	2,7a	7a	10a	23c	14,7b	10a	5,4a	9,5a	13,6b	0,1
Diameter tangkai	0,11b	0,09a	0,10a	0,13b	0,11 b	0,05a	0,09a	0,14b	0,13b	0,17b	0,13b	0,13b	0,09a	0,13b	4,3
jumlah daun tiap ruas	6,33c	4,7ab c	4,3ab c	5,7bc	5,3ab c	3ab	2,3a	5abc	3abc	3abc	3,7ab c	4abc	6abc	4bc	3,2
Jumlah daun	3a	4a	4a	4a	5a	3a	2a	4a	3a	2a	3a	3a	2a	3a	9,5
Luas daun	7,8a	6a	8,6a	7,4a	8a	1,5a	4,7a	8,7a	37c	13b	7a	5a	10a	8a	

Keterangan : **bold** Nilai tertinggi

bold Nilai terendah

Tabel 4. 2 Rincian kondisi lingkungan tumbuh *C. asiatica* L.

Aksesi	Lokasi	Kondisi tanah	Naungan
C1	Purwodadi Pasuruan	Kering	ternaungi sebagian
C2	Purwodadi Pasuruan	Lembab Berbatu	tidak ternaungi
C3	Malang	Kering	ternaungi sebagian
C4	Dau Malang	Kering	tidak ternaungi
C5	Tumpang	Lembab	tidak ternaungi
C6	Tumpang	Kering	tidak ternaungi
C7	Coban Pelangi	Kering	Ternaungi
C8	Coban Talun	Tumbuh pada batuan licin	Ternaungi
C9	Coban Rondo	Lembab	Ternaungi
C10	Coban Talun	Basah	Ternaungi
C11	Batu	Basah	tidak ternaungi
C12	Batu	Kering	tidak ternaungi
C13	Cangar	Basah	Ternaung
C14	Cangar	Kering	tidak ternaungi

a. Panjang tanaman

Berdasarkan hasil pengukuran dan uji DMRT terhadap karakter panjang tanaman diketahui rata-rata panjang *C. asiatica* L. adalah 28.3 cm. Tanaman paling panjang ditunjukkan dengan notasi *b* yaitu aksesi C10 (1320 mdpl) dengan panjang 43.67 cm, sedangkan tanaman paling pendek ditunjukkan dengan notasi *a* yaitu aksesi C2 (350 mdpl) dengan panjang 19.3 cm. Aksesi C2 ditemukan pada daerah dataran rendah yaitu 350 mdpl, yang merupakan titik terendah kedua pengambilan sampel dalam penelitian ini. Sedangkan aksesi C10 ditemukan pada dataran tinggi yaitu 1320 mdpl. Perbedaan ketinggian ini menyebabkan perbedaan pada kondisi lingkungan pertumbuhan. Ketinggian 1320 mdpl merupakan area berkabut dengan suhu yang rendah, sementara pada ketinggian 350 mdpl lingkungan cenderung lebih panas dan kering. Area penemuan aksesi C2 adalah persawahan dengan pengairan sedang, sementara C10 ditemukan pada area hutan pinus yang sangat lembab yang ternaungi.

Panjang tanaman sangat dipengaruhi oleh kecukupan unsur hara dalam tanah untuk kecepatan pertumbuhan tanaman. Unsur hara makro yang sangat dibutuhkan dalam pertumbuhan tanaman adalah unsur N dan P. Kedua unsur hara ini berperan penting dalam menjelaskan bahwa kedua unsur tersebut merupakan komponen pembentuk protein, asam nukleat, dan senyawa transfer energi sehingga sangat berpengaruh bagi pertumbuhan tanaman (Fahmi,2010).Supriadi *et al.* (2016) menjelaskan bahwa terdapat korelasi positif antara ketinggian tempat dengan kandungan N-total, yang mana seiring dengan bertambahnya ketinggian kandungan N dalam tanah juga semakin meningkat.

b. Jumlah Ruas Tanaman

Jumlah ruas masing-masing aksesori tidak berbeda nyata yang mana ditunjukkan dengan notasi *a*. Hal ini menunjukkan secara statistik tidak ada perbedaan yang signifikan mengenai ketinggian tempat maupun kondisi lingkungan terhadap jumlah ruas *C. asiatica* L.

Ruas stolon yang dimiliki oleh masing-masing aksesori rata-rata berjumlah 3 buah. Ruas paling banyak dimiliki oleh aksesori C10(1320 mdpl) yang berjumlah 4, sedangkan aksesori C3 (500 mdpl) memiliki rata-rata jumlah ruas yang paling sedikit yaitu 2.67 ruas. Pada *C. asiatica* L. ruas pada stolon biasanya akan mendukung terbentuknya anakan baru. Pada tanaman dengan jumlah ruas lebih dari 3 menunjukkan terdapat 1 ruas tambahan yang tidak mendukung anakan baru. Hal ini dikarenakan tanaman C10 tumbuh pada lingkungan yang ternaungi. Menurut Kurniawati *et al.*, (2005), *C. asiatica* L. pada tempat ternaungi memiliki jumlah anakan lebih sedikit dibandingkan tanaman yang tumbuh tidak pada naungan. Hal ini dikarenakan kurangnya jumlah paparan cahaya matahari yang berperan dalam metabolisme dalam tanaman.

Paparan cahaya matahari yang lebih sedikit menyebabkan laju fotosintesis lebih lambat sehingga hasil fotosintat berupa gula, ATP dan NADPH juga

menurun. Fotosintat yang sedikit ini berpengaruh terhadap kemampuan tanaman membentuk anakan baru. Hal inilah yang menyebabkan aksesi yang tumbuh pada daerah ternaungi meskipun memiliki ukuran tubuh yang lebih besar namun jumlah anakannya lebih sedikit dibandingkan aksesi yang tidak ternaungi.

c. Panjang Stolon

Panjang stolon antar aksesi menurut uji DMRT tidak berbeda nyata pada tiap ketinggian. Hal ini menunjukkan secara statistik tidak ada perbedaan yang signifikan mengenai ketinggian tempat maupun kondisi inkungan terhadap panjang stolon *C. asiatica* L. Rata-rata stolon terpanjang dimiliki oleh aksesi C7 (1100 mdpl) yaitu 18.90 cm dan terendah oleh aksesi C1(300 mdpl) yaitu 8.03 cm.

Diameter stolon tertinggi dimiliki oleh aksesi C9 (1300 mdpl), sedangkan diameter terendah ditunjukkan oleh aksesi C2 (350 mdpl). Berdasarkan notasi dari analisis DMRT, diketahui nilai diameter stolon tertinggi hingga terendah acak pada masing-masing ketinggian. Sehingga ketinggian tempat dapat dinyatakan tidak mempengaruhi diameter stolon *C. asiatica* L.

Diameter stolon dapat dipengaruhi oleh kadar air tanah pada tempat tumbuh tanaman. Aksesi C9 pada ketinggian 1300 mdpl tumbuh pada daerah dengan kadar air tinggi sehingga memiliki ukuran yang besar. Hakim *et al* (2015), menyatakan bahwa tanaman yang tumbuh pada lingkungan dengan kadar air tinggi akan memiliki batang yang lebih besar dan berwarna hijau segar. Hal ini dikarenakan batang tanaman tersebut akan terisi oleh air sehingga memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan tanaman yang hidup pada daerah kering.

d. Tinggi Tanaman dan Panjang Tangkai

Parameter selanjutnya yang diukur adalah tinggi tanaman dan panjang tangkai. Baik tanaman induk, anakan 1, dan anakan 2, tinggi tanaman dan

panjang tangkai terkecil dimiliki oleh aksesori C6 (1000 mdpl). Sedangkan tanaman tertinggi dan tangkai terpanjang dimiliki oleh aksesori C9 yang tumbuh pada ketinggian 1300 mdpl. Tinggi tanaman dan panjang tangkai dipengaruhi oleh aktivitas auksin pada tanaman. Hal ini berkaitan dengan dengan intensitas cahaya yang diterima oleh tanaman tersebut. Menurut Kurniawati *et al.*, (2005), bagian tanaman yang terkena cahaya mengandung auksin lebih rendah daripada bagian yang gelap atau ternaungi. Auksin merangsang pemanjangan sel dan akibatnya juga pemanjangan batang. Aksesori C6 (1000 mdpl) ditemukan pada lingkungan terbuka sedangkan aksesori C9 (1300 mdpl) ditemukan pada lingkungan ternaungi pohon-pohon besar. Hal inilah yang menyebabkan aksesori C9 dapat tumbuh lebih tinggi dibandingkan C6 dan aksesori lainnya.

e. Diameter tangkai

Berdasarkan notasi dari analisis DMRT, diketahui nilai diameter tangkai tertinggi hingga terendah acak pada masing-masing ketinggian. Sehingga ketinggian tempat dapat dinyatakan tidak mempengaruhi diameter tangkai *C. asiatica* L.

Hasil pengukuran menunjukkan tangkai terkecil dimiliki oleh aksesori C6 (1000 mdpl). Sedangkan tangkai terbesar dimiliki oleh aksesori C10 (1320 mdpl). Tebal diameter tangkai ini dipengaruhi oleh kadar air dalam tanah tempat tumbuh tanaman dan intensitas cahaya yang diterima oleh tanaman. Lingkungan dengan kadar air yang rendah dan intensitas cahaya yang tinggi akan memiliki tanaman dengan ukuran kecil dan berdiameter sempit untuk mencegah kehilangan air akibat penguapan berlebihan (Raharjeng, 2015; Suci dan Heddy, 2018). Ketinggian 1000 mdpl memiliki ciri lingkungan yang panas dan kering sehingga menjadikan aksesori C6 memiliki diameter tangkai sempit. Penyempitan tangkai ini berfungsi untuk mengurangi penguapan pada tanaman akibat kadar air dalam tanah yang rendah dan paparan sinar matahari

yang besar. Sedangkan pada ketinggian 1320 mdpl, lingkungan sekitarnya basah dan lembab. Adanya naungan pohon-pohon besar juga menyebabkan intensitas cahaya yang diterima tanaman lebih rendah. Hal ini menyebabkan tangkai aksesi C10 dapat memiliki diameter yang lebih besar.

f. Jumlah Daun

Karakterisasi kuantitatif selanjutnya dilakukan pada daun *C. asiatica* L. meliputi rata-rata jumlah daun tiap ruas, jumlah daun tanaman induk dan anakan, luas daun dan tebal daun. Rata-rata jumlah daun tiap ruas diukur untuk mengetahui jumlah daun yang dapat tumbuh pada masing-masing ruas atau anakan baru. Semakin banyak daun yang tumbuh menunjukkan efisiensi tanaman tersebut dalam melakukan fotosintesis (Raharjeng, 2015). Jumlah daun tiap ruas terendah dimiliki oleh aksesi C7 (1200 mdpl) dengan rata-rata 2.33 buah daun, dan terbanyak oleh aksesi C1(300 mdpl) dengan rata-rata 6.33 buah daun. Selanjutnya dihitung rata-rata jumlah daun pada tanaman induk, anakan 1, dan anakan 2. Rata-rata jumlah daun terbanyak dimiliki oleh aksesi C5 (850 mdpl), sedangkan jumlah daun terendah dimiliki oleh aksesi C10 (1320 mdpl). Jumlah daun pada tanaman dipengaruhi oleh kesuburan tanah tempat tumbuh dan intensitas cahaya pada lingkungan tersebut. Aksesi dengan daun yang banyak tumbuh pada lingkungan yang subur dan intensitas cahaya yang cukup. Lingkungan dengan intensitas cahaya yang rendah seperti pada ketinggian 1320 mdpl memiliki jumlah daun yang paling sedikit karena berkurangnya produksi fotosintat yang berakibat pada berkurangnya pembentukan daun (Kurniawati *et al.*, 2005).

g. Luas dan Tebal Daun

Luas daun dihitung dari panjang daun dikalikan lebar daun. Semakin luas daun suatu tanaman menunjukkan semakin luas pula area fotosintesis sehingga energi dan cadangan makanan yang dihasilkan semakin banyak. Hal ini berkaitan dengan pertumbuhan dan perkembangan aksesi tersebut yang lebih pesat dibandingkan dengan aksesi lainnya. Luas daun tertinggi baik

tanaman induk, anakan 1, maupun anakan 2 dimiliki oleh aksesori C9 yang tumbuh pada ketinggian 1300 mdpl. Sedangkan luas daun terendah pada aksesori C6 (1000 mdpl) (tabel.4.1). Tebal daun rata-rata tanaman induk dan anakan 1 0.1 cm, sedangkan pada anakan 2 0.03 cm. Daun tertebal dimiliki oleh aksesori C11 (1400 mdpl) dengan rata-rata 0.08 cm. sedangkan daun tertipis adalah aksesori C5 (850 mdpl), C6 (1000 mdpl), dan C7 (1100 mdpl). Aksesori C9 tumbuh pada daerah ternaungi sehingga daun pada aksesori tersebut melebar untuk mengoptimalkan penangkapan cahaya matahari. Sedangkan aksesori C6 tumbuh pada lingkungan terbuka dan kering sehingga mempersempit luas daun dan batang untuk mengurangi penguapan (Raharjeng, 2015).

4.1.2 Hasil pengukuran kualitatif

Pengukuran kualitatif dilakukan pada warna daun, warna tangkai, dan warna stolon. Hasil pengukuran warna masing-masing aksesori ditunjukkan pada tabel 4.2. Warna daun tua *C. asiatica* L. yang ditemukan berkisar antara hijau gelap hingga hijau kecokelatan dengan tingkatan yang berbeda-beda. Kelompok hijau lemah meliputi kode 1 dan 2. Kelompok hijau kecokelatan meliputi kode 3 dan 4, sedangkan kelompok hijau gelap ditulis dengan kode 1 dan 2.

Daun tua hijau gelap dimiliki oleh aksesori C1, C2, C3, C4, C5, C9, C10, C11, C7, dan C8. Aksesori-aksesori ini tumbuh pada ketinggian yang beragam mulai dari 300 mdpl hingga 1320 mdpl. Hal yang sama dari aksesori dengan daun hijau gelap ini adalah kondisi tanah yang basah atau terairi dengan baik. Sedangkan daun tua dengan warna hijau kecokelatan dimiliki oleh aksesori C11, C6, C12, dan C14 dengan kondisi tanah kering.

Tabel 4. 3 Hasil pengukuran karakter kualitatif *C. asiatica* L.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14
Ketinggian	300 mdpl	350 mdpl	500 mdpl	600 mdpl	850 mdpl	1000 mdpl	1100 mdpl	1200 mdpl	1300 mdpl	1320 mdpl	1400 mdpl	1500 mdpl	1600 mdpl	1700 mdpl
Warna daun tua	5	5	5	5	5	3	6	6	5	3	5	3	4	3
Kombinasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
Warna daun muda	1	3	1	3	2	4	2	5	5	5	4	1	2	3
Warna stolon	3	3	5	1	2	2	3	2	1	1	4	4	4	4
Warna tangkai	2	3	5	3	2	2	2	1	1	2	1	2	2	5
Kombinasi	-	1	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Warna ruas	3	3	2	1	2	2	2	2	1	2	3	3	3	1

Keterangan: 1-2 : hijau lemah, 3-4 : hijau kecokelatan, 5-6: hijau gelap

Pada daun muda warna daun berkisar dari hijau gelap dan hijau kecokelatan. warna hijau gelap dimiliki oleh aksesori C8, C9, dan C10 yang tumbuh pada daerah dengan kondisi tanah basah dan kelembaban yang tinggi. Warna hijau kecokelatan dimiliki oleh aksesori C2, C4, C14, C5, C11, dan C13 yang tumbuh pada keadaan lingkungan dan ketinggian yang beragam. Warna tangkai daun, stolon, dan ruas bervariasi antara hijau gelap, hijau kecokelatan, dan hijau lemah.

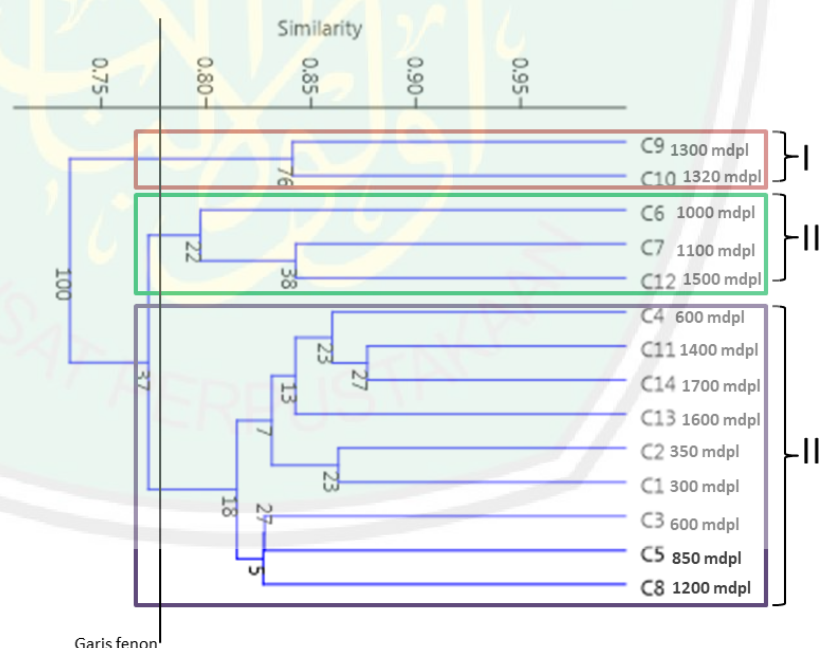
Berdasarkan hasil pengukuran warna daun, stolon, dan ruas tanaman *C. asiatica* L. diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan antara warna daun pada ketinggian 300 mdpl-1700 mdpl. Hal ini menunjukkan bahwa selain ketinggian tempat tumbuh faktor lingkungan mikro juga mempengaruhi produksi klorofil dan intensitas warna pada tanaman. Diantaranya adalah ketersediaan air dalam tanah, unsur hara, serta kuantitas dan kualitas cahaya yang diperoleh oleh tanaman.

Menurut Prihastanti (2010), ketersediaan air dalam tanah mempengaruhi respon fisiologis tanaman, terutama dalam fotosintesis dan biosintesis klorofil. Saat air dalam tanah tidak mencukupi kebutuhan tanaman, maka pembentukan protoklorofil terhambat sehingga hanya sedikit klorofil yang terbentuk.

Warna daun dan batang juga dipengaruhi oleh kuantitas atau intensitas cahaya yang diterima oleh tanaman. Secara umum dataran rendah mendapatkan intensitas cahaya yang lebih banyak dibandingkan dengan dataran tinggi. Jumlah cahaya yang cukup mempengaruhi efisiensi fotosintesis (Raharjeng, 2016). Selain itu,

kualitas cahaya juga mempengaruhi intensitas warna pada tanaman. Dalam hal ini, tanaman pada dataran tinggi cenderung memiliki warna yang lebih segar karena mendapatkan cahaya dengan kualitas yang lebih baik. Spektrum cahaya yang dapat diserap oleh tanaman adalah gelombang cahaya pendek berkisar antara 300-700 nm (Salisbury dan Ross, 1995). Pada dataran tinggi yang berawan dan berkabut, gelombang cahaya menjadi semakin banyak dipantulkan kembali ke atmosfer sehingga hanya gelombang cahaya pendek yang sampai di tanaman. Hal ini berkaitan dengan keadaan klorofil. Gelombang cahaya panjang yang berenergi tinggi berpotensi merusak klorofil dan mengurangi efisiensi fotosintesis. Spektrum cahaya intensitas warna daun ditentukan oleh berbagai faktor terutama intensitas dan kualitas cahaya matahari. Intensitas cahaya berperan dalam efisiensi fotosintesis (Zulkarnain, 2009).

4.1.3 Analisis Keanekaragaman Morfologi *C. asiatica* L. Berdasarkan Tabel Filogenetik



Gambar 4. 1 Dendrogram filogenetik morfologi *C. asiatica* L.

Berdasarkan hasil tabel dendrogram untuk ciri morfologi *C. asiatica* L. (gambar.4.1) didapatkan 3 klaster besar. Pembagian klaster dilakukan berdasarkan

garis fenon pada koefisien similaritas 0.77 (77%). Garis fenon merupakan garis pembantu untuk membatasi pembagian klaster dalam dendogram (Ahsana, 2012). Klaster-klaster ini mengelompok berdasarkan ketinggian tempat terdekatnya. Aksesori C9 (1300 mdpl) mengelompok bersama aksesori C10 (1320 mdpl) pada koefisien similaritas 0,84 atau 84%. Keduanya memiliki ciri morfologi yang hampir sama, yaitu sama-sama tumbuh sangat subur dan berukuran besar, daun lebar berwarna hijau pekat segar, dan batang besar berair berwarna hijau. Keduanya tumbuh pada lingkungan dengan kelembaban tinggi dan kadar air yang melimpah, hal ini dapat diketahui dari tekstur tanah yang gembur dan basah. Hal inilah yang menyebabkan aksesori C9 dan C10 memiliki perawakan yang besar dan segar karena kadar air dan nutrisi dalam tanah mencukupi untuk pertumbuhan tanaman. Fahmi (2010) dan Atmaja *et al.*, (2017) menyebutkan bahwa kesuburan tanah suatu tempat mempengaruhi kandungan unsur N dalam tanah. Tanah yang subur akan lebih banyak mengandung unsur N sehingga tanaman yang tumbuh pada tanah tersebut dapat tumbuh dengan optimal dan memiliki warna hijau yang sehat. Kedua aksesori ini juga hidup ternaungi oleh pohon-pohon besar yang menyebabkan daun-daunnya tumbuh melebar untuk mengoptimalkan penangkapan cahaya matahari. Hal ini sebagaimana dijelaskan dalam Suci dan Heddy (2018), yang menyebutkan bahwa tanaman yang tumbuh dibawah naungan akan memiliki daun yang lebih lebar dibandingkan yang tidak ternaungi untuk memperluas area penyerapan cahaya matahari.

Klaster 2 terdiri dari 3 aksesori yaitu C6 (1000 mdpl), C7 (1100 mdpl), dan C12 (1500). Aksesori C6 dan C7 dekat secara ketinggian tempat tumbuhnya, sedangkan aksesori C12 mengelompok tidak berdasarkan ketinggian tempat tumbuhnya. Ketiga aksesori tersebut mengelompok karena memiliki kesamaan ciri morfologi. Ketiganya memiliki bentuk tubuh yang kecil, menjalar, dan daun berwarna hijau pucat. Keragaman morfologi ketiga aksesori tersebut berkaitan dengan kondisi lingkungan tempat tumbuhnya. Aksesori-aksesori tersebut tumbuh pada daerah panas dan tanah yang kering. Kurangnya kadar air ini menjadikan pertumbuhan tanaman terhambat. Dengan kadar air yang rendah daun-daun tanaman akan cenderung

sempit untuk mengurangi penguapan. Hal ini sebagaimana dijelaskan dalam Raharjeng (2015) bahwa daerah yang panas menunjukkan suhu lingkungan yang tinggi dan berpengaruh pada kadar air. Suhu yang tinggi menyebabkan tanaman akan lebih cepat kehilangan air melalui penguapan. Sebagai respon dari kondisi fisiologis tersebut, *C. asiatica* L. yang ditemukan pada dataran rendah akan memiliki ukuran daun yang lebih sempit untuk mengurangi penguapan (Raharjeng, 2015). Aksesori C6 dan C7 menunjukkan pengelompokan berdasarkan ketinggian tempatnya, sedangkan C12 mengelompok berdasarkan aksesori ini karena memiliki kemiripan morfologi 84%. Kemiripan morfologi yang besar meskipun berada pada ketinggian yang berbeda ini diduga berkaitan dengan kondisi lingkungan yang hampir sama yaitu daerah yang kering dan panas.

Klaster 3 terbentuk dari koefisien similaritas 0,82 (82%). Klaster ini berisi total 9 anggota. Lima anggota berasal dari ketinggian 300 mdpl-600 mdpl. Sedangkan 4 anggota lainnya dari ketinggian 1200 mdpl, 1400 mdpl, 1600 mdpl, dan 1700 mdpl. Aksesori C4 (600 mdpl) terpisah dengan kelompok dataran rendah lainnya dan bergabung dengan aksesori C11 (1400 mdpl), C14 (1400 mdpl), dan C13 (1600 mdpl) pada similaritas 0,84 (84%). Sedangkan aksesori C8 (1200 mdpl) justru bergabung dengan kelompok dataran rendah yaitu aksesori C2 (350 mdpl), C1 (300 mdpl), C3 (500 mdpl), dan C5 (850 mdpl). Hal ini menunjukkan beberapa aksesori yang tumbuh pada ketinggian yang berdekatan memiliki keragaman morfologi yang hampir sama. Namun, dapat juga seragam dengan aksesori pada ketinggian yang jauh jaraknya. Hal ini menunjukkan keragaman morfologi *C. asiatica* L. tidak hanya dipengaruhi oleh ketinggian tempat tumbuhnya.

Daerah dataran tinggi secara umum memiliki suhu lingkungan yang lebih rendah, curah hujan dan kandungan air tanah yang lebih tinggi, intensitas cahaya yang lebih sedikit, dan kelembaban yang lebih tinggi dibandingkan dengan dataran rendah. Namun, secara khusus kondisi lingkungan tempat tumbuh suatu tanaman baik pada dataran tinggi maupun dataran rendah dapat ditemukan seragam. Seperti pada aksesori C4 (600 mdpl), C11 (1400 mdpl), C14 (1700 mdpl), C13 (1600 mdpl), C2 (350 mdpl), C1 (300 mdpl), C3 (500 mdpl), dan C5 (600

mdpl) yang ditemukan di areal persawahan dengan pengairan sedang dan tanpa naungan. Kondisi lingkungan yang seragam inilah yang diduga menjadikan aksesibilitas tersebut memiliki keragaman morfologi yang hampir sama yaitu memiliki ukuran tubuhan daun yang sedang. Keadaan yang berbeda dimiliki oleh aksesibilitas C8 (1200 mdpl) yang ditemukan pada lingkungan yang sangat basah tepat di sekitar air terjun Coban Talun. Meskipun aksesibilitas C8 ditemukan pada daerah dengan kadar air dan kelembaban yang tinggi, ukuran aksesibilitas ini tidak sebesar kluster 1. Hal ini dikarenakan tanaman ini ditemukan pada tanah berbatu yang licin sehingga menjadikannya sulit menyerap air dalam tanah. Aksesibilitas ini juga mendapatkan paparan sinar matahari yang lebih banyak dibandingkan kluster 1 karena tumbuh tidak pada naungan sehingga tidak terjadi pelebaran daun.

Hasil pengelompokan *C. asiatica* L. tersebut tersebut sesuai dengan Firman Allah dalam Surat Al-A'raf ayat 58 yang berbunyi:

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرُجُ نَبَاتُهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ وَالَّذِي خَبُثَ لَا يَخْرُجُ إِلَّا نَكْدًا كَذَلِكِ نُصَرِّفُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ
يَشْكُرُونَ (الأعراف [٧]: ٥٨)

Artinya: Dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah; dan tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana. Demikianlah Kami mengulangi tanda-tanda kebesaran (Kami) bagi orang-orang yang bersyukur (Qs. Al-A'raf [7]:58).

Kata *balad* tersusun dengan kata sifat *al-Thayyibu* yaitu berarti baik . Ayat ini menjelaskan mengenai tanah yang baik yaitu tanah yang subur akan tumbuh berbagai jenis tanaman yang baik pula sifatnya (Ath-Thabari, 2008). Pada ayat ini secara tersirat dibahas unsur tanah dan peranannya bagi tanaman yang hidup pada tanah tersebut (Shihab, 2015). Pada tanah yang subur dan memiliki banyak kandungan air, tanaman yang tumbuh pada tanah tersebut akan tumbuh subur dan kuat. Secara morfologi tanaman-tanaman ini akan menunjukkan ciri berupa daun yang segar dan besar, batang kuat dan tinggi. Sedangkan pada tanah yang kering, tanaman yang tumbuh akan menunjukkan ciri morfologi warna daun pucat, tanaman kecil dan kering, serta batang tidak kokoh.

4.2 Hasil Karakterisasi Molekuler *C. asiatica* L.

4.2.1 Ekstraksi DNA

Hasil dari ekstraksi DNA dapat diketahui dengan melakukan uji kuantitas dan kualitas DNA. Uji kuantitas dilakukan menggunakan nanodrop untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA. DNA dinyatakan murni jika nilai perbandingan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm berkisar antara 1,8-2 µg/ml. Nilai kurang dari 1,8 µg/ml menunjukkan kontaminasi protein, sedangkan nilai lebih dari 2 µg/ml menunjukkan kontaminasi RNA (Mulyani *et al.*, 2012). Berdasarkan hasil uji nanodrop (tabel 4.2) diketahui dari 14 aksesori yang diisolasi hanya 2 aksesori yang memiliki kemurnian baik yaitu aksesori C7 dan C12 dengan nilai 1.83 dan 2.02.

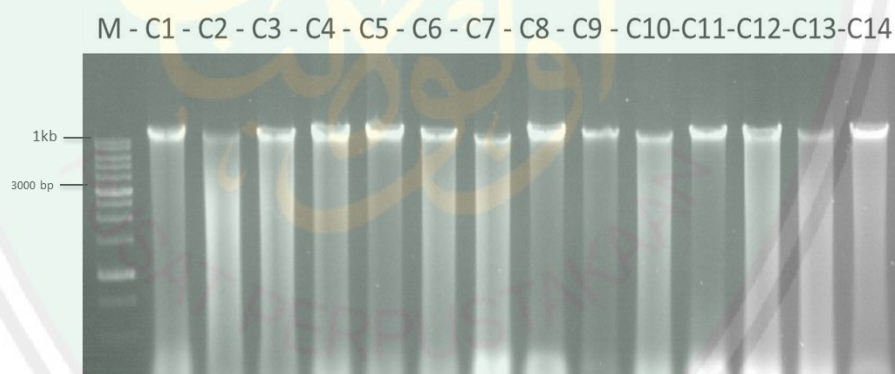
Uji nanodrop juga digunakan untuk mengetahui konsentrasi DNA. DNA dengan konsentrasi yang tinggi dan kemurnian yang baik menunjukkan kualitas hasil isolasi yang baik. Berdasarkan hasil uji diketahui aksesori C11 memiliki konsentrasi terbesar yaitu 3204 µg/ml sedangkan aksesori C7 memiliki konsentrasi terendah yaitu 1.83 µg/ml. konsentrasi DNA yang didapat dari masing-masing aksesori tergolong baik karena memenuhi syarat konsentrasi ideal untuk dilakukan PCR. Konsentrasi ideal DNA untuk PCR adalah 50 mg/µl - 25 mg/µl. konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan pita DNA sulit terurai dan teramplifikasi. Sedangkan konsentrasi DNA yang terlalu tipis berpengaruh pada letaban pita yang terbentuk, menjadi sangat tipis atau samar (Langga dan Kuswinanti, 2012). Oleh Karena itu dari hasil DNA yang didapatkan perlu dilakukan pengenceran menjadi 50 mg/µl sehingga dapat dilakukan PCR dengan hasil pita yang jelas.

Hasil pita yang teramplifikasi sangat mempengaruhi pembacaan saat skoring sehingga menentukan dendogram yang dibuat. Apabila pita terlihat samar maka akan menyulitkan saat proses skoring sehingga hasil yang didapatkan kurang akurat.

Tabel 4. 4Daftar hasil uji kuantitas DNA

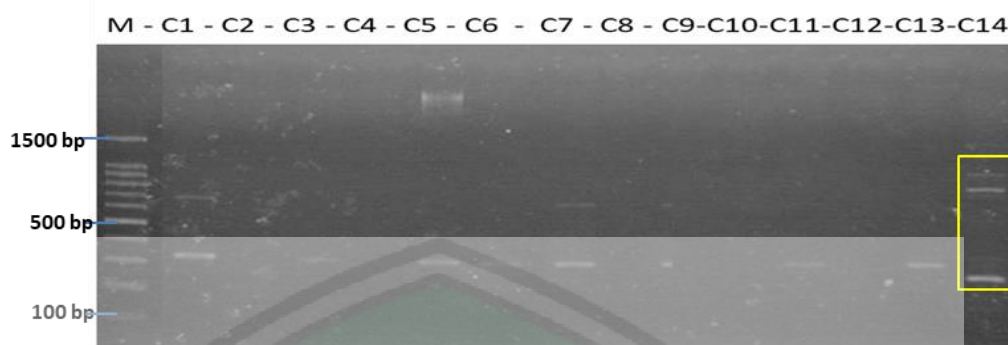
Aksesi	Kemurnian (260 nm/280 nm)	Konsentrasi (mg/μl)
C1	1.40	898.20
C2	1.48	767.75
C3	1.54	755.12
C4	1.53	1088.6
C5	1.79	650.16
C6	1.30	811.03
C7	1.83	571.26
C8	1.46	1132.3
C9	1.50	216.08
C10	1.41	1932.3
C11	1.25	3203.9
C12	2.02	741.53
C13	1.76	904.46
C14	1.00	3988.9

Hasil elektroforesis genom *C. asiatica* L. dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA yang diisolasi. Berdasarkan hasil elektroforesis pada gambar diketahui setiap aksesi menghasilkan 1 pita *whole genom* dengan panjang 1 kb.

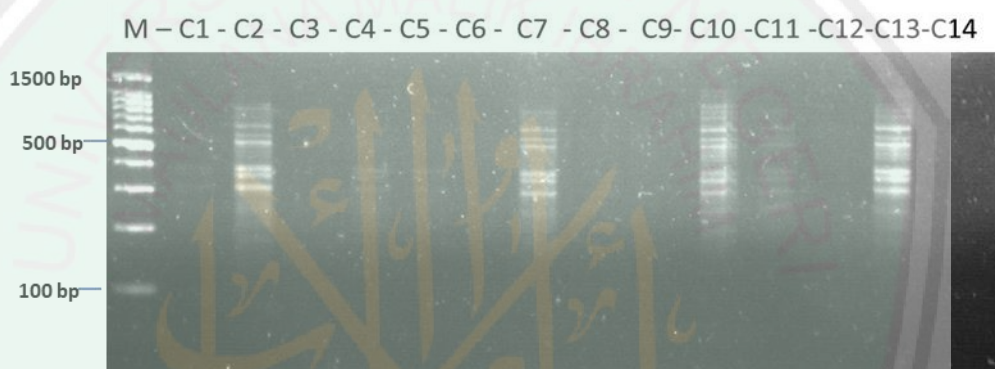
Gambar 4. 2 Hasil isolasi DNA *C. asiatica* L.

4.2.2 Amplifikasi PCR-ISSR

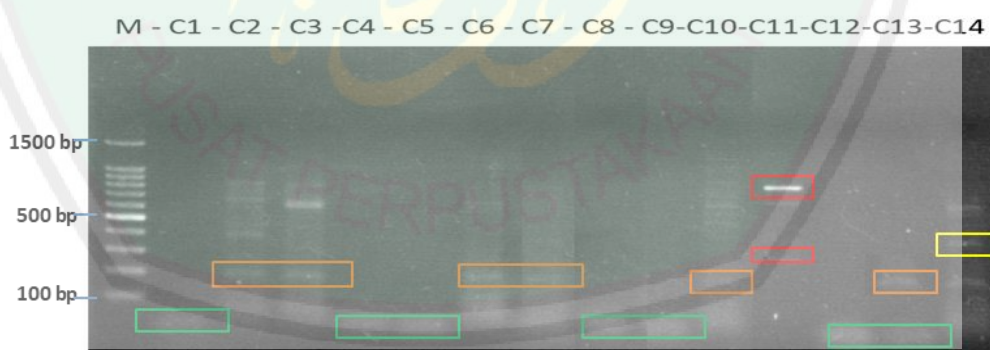
Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer UBC 828, K18, dan UBC 889 menghasilkan beberapa pita yang terdiri atas pita monomorfis dan polimorfis. Beberapa pita yang terbentuk merupakan pita khusus pada aksesi tertentu sebagaimana pada gambar 4.3, gambar 4.4, dan gambar 4.5.



Gambar 4. 3 Hasil amplifikasi primer UBC 828
 Keterangan: pita 1250, 900, 300 bp klaster 4 akses C14



Gambar 4. 4 hasil amplifikasi primer K18



Gambar 4. 5 Hasil amplifikasi primer UBC 889
 Keterangan : Pita 850 dan 250 bp klaster 3, C11
 Pita 200 bp, klaster 1 dan 2
 Pita 300 bp klaster 4
 Pita 50 bp klaster 5

PCR dilakukan pada ke-14 aksesi menggunakan 4 jenis primer ISSR yang diantaranya adalah primer UBC 828, K18, dan UBC 889. Rangkuman pita yang dihasilkan oleh masing-masing primer diuraikan dalam tabel 4.4.

Tabel 4. 5Total ukuran fragmen primer ISSR

No	Primer	Total fragmen teramplifikasi	Fragmen Monomorfik	Persentase Polimorfik (%)	Ukuran Fragmen (bp)
1.	UBC 828	5	4	20,0	1250-300
2.	K18	14	11	21,4	1000-150
3.	UBC 889	15	7	53,3	900-50
Total		34	22	94,7%	
Rerata			0	31,6%	

Data biner hasil skoring pita DNA masing-masing primer kemudian dianalisis *Total Number of Band (TNB)*, *Effective multiplex ratio(EMR)*, *Resolution Power (RP)*, dan *Polymorphism Information Content (PIC)* (tabel 4.4).

Tabel 4.5 Analisis pita DNA *C. asiatica* L. dengan primer ISSR

Primer	Total Number of Band (TNB)	Number of Polymorphic Band (NPB)	Present ation of Pholymorphic Band (PB)	Primer Informat ion Content (PIC)	Effectiv e Multiple Ratio (EMR)	Marker Index (MI)	Resolutio n Power (Rp)
UBC 828	5	1	20,0	0,28	5	1,42	1,71
K18	14	3	21,4	0,34	42	14,14	6,00
UBC 889	15	8	53,3	0,30	120	35,57	5,43
Rata-rata	8,75	3,25	24,4	0,35	42	12,91	3,50

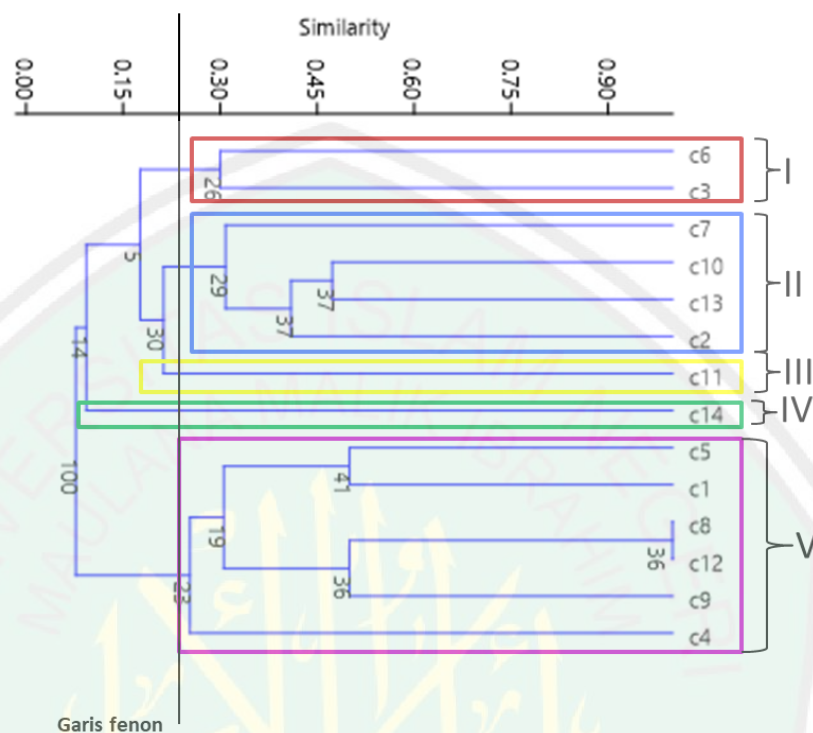
Total number of band (TNB) tiap primer tertinggi pada primer ubc 889 dengan total jenis band 15 jenis dengan ukuran antara 50-900 bp, primer K18 sebanyak 14 jenis, dan primer UBC 828 sebanyak 5 jenis pita. Nilai pita polimorfis (NPB; *Number of Polymorphic Band*) sebanyak jumlah jenis pita sehingga nilai presentasi pita polimorfis (PB; *Presentation of Polymorphic Band*) terhadap total pita yang didapatkan. Polimorfisme tertinggi dimiliki oleh primer UBC 889 dengan nilai 42,8%. Hal ini menunjukkan primer UBC 889 dinilai paling mampu menunjukkan keanekaragaman genetik *C. asiatica* L. dibandingkan 3 primer lainnya.

Analisis nilai rasio multiple efektif (EMR; *Effective multiplex ratio*) bertujuan untuk mengetahui rasio efektif dari jumlah keseluruhan pita terhadap jumlah pita polimorfik (Roldan-Ruiz., *et al* 2007). Rata-rata EMR primer adalah 42, nilai tertinggi pada primer UBC 889 yaitu 120, K18 42, dan UBC 828 senilai 5,. Indeks Marker (MI; *marker indexes*) rata-rata sebesar 12.91 dengan nilai tertinggi pada primer UBC 889 35.57 dan terendah pada primer UBC 828 yaitu 1.42.

Keefektifan primer dalam menghasilkan pita diketahui dengan menghitung nilai Resolution power primer. Masing-masing primer memiliki nilai antara 1.71-6.00 dengan rata-rata nilai 3.50. nilai RP tertinggi ditunjukkan oleh primer K18 dan terendah ditunjukkan oleh primer UBC 828 Hal ini menunjukkan primer K18 paling efektif dalam menghasilkan pita aksesori tanaman *C. asiatica*L..

Primer yang paling informatif terhadap sampel diketahui berdasarkan nilai PIC (*Polymorphism Information Content*). Nilai PIC tertinggi ditunjukkan oleh primer UBC K18 dengan nilai 0.34, sementara primer dengan PIC terendah adalah UBC 828 dengan nilai 0.28. Rata-rata nilai PIC yang didapatkan dalam penelitian ini adalah 0.35. Primer dengan nilai PIC yang semakin tinggi dinilai semakin baik dalam menganalisis variasi genetik (Roldan-Ruiz, *et al* 2007).

4.2.3 Analisis Keanekaragaman Genetik Berdasarkan Uji Filogenetik



Gambar 4. 6 Dendrogram filogenetik ISSR *C. asiatica* L.

Analisis *clustering* menunjukkan terbentuk 5 klaster. Pembagian klaster dilakukan berdasarkan garis fenon pada simsimilaritas 22.5%, sehingga aksesi yang pengelompokannya dilewati garis tersebut digolongkan dalam 1 klaster. Klaster 1 terdiri dari 2 aksesi yaitu C6 (1000 mdpl), dan C3 (400 mdpl). Sedangkan klaster 2 terdiri dari 4 aksesi antara lain, C7 (1100 mdpl), C10 (1320 mdpl), C13 (1600 mdpl), dan C2 (350 mdpl). Berdasarkan data tersebut diketahui klaster ini tidak mengelompok berdasarkan ketinggian tempat tumbuhnya. Hal ini menunjukkan bahwa ketinggian tempat tumbuh tidak berpengaruh terhadap keanekaragaman genetik *C. asiatica* L. klaster 1 mengelompok pada persen similaritas 0.30 (30%), sedangkan klaster 2 mengelompok pada persen similaritas 0.29 (29%). Berdasarkan hasil PCR ditunjukkan dengan pita 200 bp pada primer UBC 889 (gambar 4.6).

Klaster 3 terdiri dari 1 aksesori yaitu aksesori C11 (1400 mdpl). Klaster ini terpisah dari aksesori lainnya pada persen similaritas 0.18 (18%). Klaster ini tidak memisah berdasarkan ketinggian tempatnya mengingat aksesori terdekatnya yaitu C10 (1320 mdpl) berada pada klaster 2 dan C12 (1500 mdpl) berada pada klaster 5. Namun, ditinjau dari pita DNA yang teramplifikasi ada 2 pita unik yang hanya dimiliki oleh aksesori ini yaitu 850 bp dan 250 bp pada primer UBC 889 (gambar 4.6). Pita-pita unik ini diduga menunjukkan karakter daun C14 yang unik yaitu memiliki 2 kombinasi warna dengan corak teratur. Warna dasar daun hijau kecokelatan dengan corak hijau gelap pada alur urat daunnya (Gambar 4.7). Hal ini berkaitan dengan kemampuan ISSR dalam mendeteksi variasi genetik diantara 2 mikrosatelit identik yang merupakan daerah ekson (daerah yang diekspresikan).



Gambar 4. 7A. Daun kombinasi (a) hijau kecokelatan, (b) hijau gelap
 B. Daun hijau kecokelatan
 C. Daun hijau gelap

Klaster 4 terdiri dari 1 aksesori yaitu aksesori C14 (1700 mdpl). Aksesori ini terpisah pada koefisien similaritas 0.10 (10%). Aksesori ini diambil dari titik tertinggi pengambilan sampel yaitu 1700 mdpl sehingga dapat dikatakan bahwa pemisahannya dengan klaster lain dipengaruhi oleh ketinggian tempat. Aksesori ini memiliki koefisien similaritas terendah dari aksesori lainnya yang menunjukkan bahwa aksesori ini memiliki karakter molekuler yang paling berbeda. Di bawah titik tersebut aksesori lainnya masih mengelompok secara acak, sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa aksesori pada ketinggian 1700 mdpl merupakan batas pembeda karakter molekuler *C. asiatica* L. berdasarkan hasil amplifikasi penanda ISSR.

Aksesi C14 memiliki 4 pita yang tidak dimiliki oleh aksesi lainnya dari total 8 pita teramplifikasi. Diantaranya adalah pita 1250, 900, dan 300 bp pada primer UBC 828 (Gambar 4.4), serta pita 300 pada primer UBC 889 (Gambar 4.6). Pita-pita inilah yang menjadikan aksesi ini memiliki similaritas terendah dibanding aksesi lain sehingga menjadikannya aksesi dengan keanekaragaman genetik tertinggi. Perbedaan kemunculan pita ini berkaitan dengan letak geografis tumbuh aksesi tersebut. Aksesi C14 tumbuh pada titik tertinggi eksplorasi yaitu 1700 mdpl. Pada ketinggian tersebut suhu lingkungan sangat rendah, dengan kelembaban yang sangat tinggi, dan intensitas cahaya yang minim (Raharjeng, 2015). Kondisi lingkungan yang demikian menyebabkan tanaman-tanaman yang tumbuh pada daerah tersebut memiliki pola metabolisme yang lebih lambat dibandingkan aksesi lainnya (Hakim, 2015).

Yousef and Moghoub (2015) menjelaskan bahwa terdapat korelasi yang kuat antara kondisi geografis dan keanekaragaman genetik. Dalam penelitiannya disebutkan bahwa ketinggian tempat tumbuh menunjukkan variasi dalam jumlah alel, identitas alel-alel, dan karakter molekuler khusus yang mereka miliki dalam populasi. Sehingga menjadikan aksesi-aksesi cenderung mengelompok sesuai ketinggian tempat tumbuhnya. Penanda ISSR merupakan penanda molekuler yang bersifat dominan. Hal ini berartifacts homozigot dominan maupun heterozigot bernilai sama yaitu 1 pita. Sedangkan sifat resesif tidak dapat teramplifikasi (Reddy *et al.*, 2002). Sehingga aksesi-aksesi *C. asiatica* L. akan mengelompok berdasarkan kesamaan alel dominan yang terbentuk tersebut.

Benharira, *et al.*, (2005), menjelaskan bahwa suatu spesies dapat terfragmentasi secara alami berdasarkan habitat yang membentuknya, namun masih dalam satu jaringan yang saling berhubungan. Perbedaan geografis tempat tumbuh mempengaruhi fenotip spesies tersebut secara nyata yang terdistribusi dalam suatu gradien lingkungan. Keanekaragaman genetik suatu spesies akan berkurang seiring dengan pergeseran geografis dari gradien lingkungan tersebut. Dalam hal ini, aksesi C14 pada ketinggian 1700 mdpl memiliki keanekaragaman tertinggi dan semakin berkurang pada ketinggian yang lebih rendah dibawahnya.

Berkurangnya keanekaragaman ini ditandai dengan besarnya similaritas yang dimiliki oleh masing-masing aksesi pada ketinggian tersebut. Hal ini merupakan pola adaptasi jangka panjang dalam rentang yang konstan yang menunjukkan pola evolusi (Benharia *et al.*, 2005).

Berdasarkan ilmu evolusi, hal ini sesuai dengan teori oleh Jean Baptiste Lamarck yang mengemukakan gagasan bahwa (1) alam menghasilkan berturut-turut semua bentuk kehidupan yang berbeda di bumi, dan (2) perubahan perilaku yang diinduksi lingkungan memimpin perubahan spesies (Burkhard, 2013). Hal ini juga didukung oleh teori evolusi Darwin yang menjelaskan bahwa terdapat variasi genetik antar individu dan populasi yang akan dipertahankan atau dihilangkan berdasarkan seleksi alam (Laikre *et al.*, 2009).

Perbedaan karakter molekuler yang ditunjukkan oleh masing-masing aksesi pada ketinggian yang berbeda ini sangat mungkin terdeteksi dalam penggunaan ISSR mengingat jenis markah ini yang mengamplifikasi bagian diantara 2 mikrosatelit identik yang bersifat *highly mutation site* atau memiliki potensi mutasi yang tinggi.

4.3.3 Diversitas Genetik *C. asiatica* L. Urb.

Tabel 4.6 Diversitas genetik *C. asiatica* L.

aksesi	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11	c12	c13	c14
c1	1,00													
c2	0,00	1,00												
c3	0,10	0,20	1,00											
c4	0,17	0,17	0,00	1,00										
c5	0,50	0,08	0,10	0,40	1,00									
c6	0,14	0,36	0,30	0,29	0,33	1,00								
c7	0,30	0,25	0,20	0,17	0,18	0,15	1,00							
c8	0,33	0,00	0,00	0,25	0,33	0,00	0,10	1,00						
c9	0,25	0,00	0,00	0,20	0,25	0,00	0,09	0,50	1,00					
c10	0,06	0,44	0,20	0,18	0,12	0,31	0,30	0,00	0,00	1,00				
c11	0,00	0,20	0,07	0,09	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,20	1,00			
c12	0,33	0,00	0,00	0,25	0,33	0,00	0,10	1,00	0,50	0,00	0,00	1,00		
c13	0,15	0,38	0,05	0,33	0,25	0,21	0,38	0,08	0,08	0,47	0,25	0,08	1,00	
c14	0,00	0,13	0,14	0,00	0,00	0,18	0,06	0,00	0,11	0,14	0,00	0,00	0,00	1,00

Keterangan: 1,00 nilai similaritas tertinggi

Diversitas genetik *C. asiatica* L. diketahui berdasarkan nilai koefisien similaritas antar aksesori. Nilai similaritas menunjukkan nilai kedekatan genetik antar aksesori berdasarkan persamaan pita yang terbentuk. Nilai koefisien similaritas pada penelitian ini berkisar antara 0 sampai 1. Menurut Pratiwi (2012), apabila nilai koefisien genetik antar 2 aksesori semakin dekat dengan 1 maka aksesori tersebut semakin identik secara genetik. Namun, apabila nilai koefisiennya semakin mendekati 0, maka aksesori tersebut semakin jauh secara genetik (Pratiwi, 2012).

Nilai koefisiensi tertinggi didapatkan oleh aksesori C1 dan C5, C9 dan C12, serta C10 dan C13 yaitu 0.6 atau 60%, sedangkan nilai koefisiensi similaritas terendah sebesar 0.00 terdapat pada aksesori C1 dan C2, C3 dan C4, C2 dan C9, C2 dan C8, C3 dan C8, C3 dan C9, C8 dan C10, C9 dan C10, C8 dan C11, C9 dan C11, C5 dan C11, C6 dan C11, C2, C3, C6, C10 lalu C12, C1, C4, C5, C8, C11, C12, C13 dan C14. Sebagaimana hasil dendrogram yang menunjukkan aksesori C14 sebagai aksesori yang paling jauh kekerabatannya. Hal ini dibuktikan pada analisis diversitas genetik ini dimana aksesori C14 memiliki koefisiensi 0% terbanyak terhadap aksesori lain yaitu 8 aksesori dari total 14 aksesori. Hal ini menunjukkan aksesori C14 memiliki perbedaan paling besar terhadap aksesori lainnya.

Aksesori C8 dan C12 memiliki nilai koefisien tertinggi yaitu 1.00 atau 100%. Hal ini dikarenakan kedua aksesori tersebut hanya menghasilkan pita teramplifikasi pada keseluruhan primer yaitu 50 bp pada primer UBC 889. Hal ini berkaitan dengan nilai PIC primer yang rendah dalam memberikan informasi genetik *C. asiatica* L. yaitu dengan rata-rata nilai PIC 0,35% sehingga tidak semua sifat dalam aksesori dapat teramplifikasi.

Keanekaragaman *C. asiatica* L. berdasarkan penanda molekuler ISSR menunjukkan terjadi pengelompokan secara acak selain aksesori C14 yang diambil dari titik tertinggi pengambilan sampel yaitu 1700 mdpl. Hal ini menunjukkan bahwa pada analisis keanekaragaman molekuler tidak terjadi pengelompokan sesuai ketinggian tempat dibawah ketinggian 1700 mdpl. Berbeda dengan hasil

analisis klustering berdasarkan karakter morfologi yang menunjukkan pengelompokan menurut ketinggian dan keadaan lingkungan tumbuhnya. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa ketinggian tempat yang mempengaruhi perbedaan morfologi belum tentu berpengaruh pula pada keanekaragaman molekulernya. Hal ini sebagaimana disebutkan dalam Gbolahan *et al.* (2016) bahwa kondisi lingkungan dapat dengan mudah mempengaruhi morfologi *C. asiatica* L. yang tidak selalu diikuti dengan keanekaragaman molekulernya. Oleh karena itu, karakterisasi tingkat molekuler sangat penting untuk mendapatkan data keanekaragaman yang lebih akurat. Berkaitan dengan hal tersebut, Hakim *et al.*, (2015), menyatakan bahwa tumbuhan dapat melakukan plastisitas atau modifikasi morfologi sesuai dengan lingkungannya untuk mempertahankan kestabilan metabolisme dalam tubuhnya.

Allah SWT berfirman dalam Al-Quran surat Al-A'la ayat 2 dan 3 yaitu:

الَّذِي خَلَقَ فَسَوَّىٰ ۚ ۡ وَالَّذِي قَدَّرَ فَهَدَىٰ ۚ ۢ

Artinya: Yang menciptakan dan menyempurnakan dan yang menentukan kadar serta memberi petunjuk (Qs. Al-A'la [87]:2-3)

Dalam ayat tersebut dijelaskan bahwa Allah telah menentukan kadar yang sesuai dalam setiap penciptaan makhluknya sehingga dapat berfungsi dan bermanfaat dengan baik. Hal ini sebagaimana dijelaskan dalam Shihab (2015), bahwa kata فَسَوَّىٰ berarti menyeimbangkan sesuatu dari segi kualitas dan kuantitasnya. Sehingga bentuk sempurna dari suatu makhluk tersebut adalah seimbang dengan fungsi dan maksud penciptaannya (Ath Thabari, 2001). Selain itu, pada ayat ke-3 disebutkan bahwa Allah jugalah yang memberi petunjuk. Petunjuk tersebut menurut Shihab (2015) adalah petunjuk dalam penyampaiannya. Berdasarkan ayat tersebut, jika dikaitkan dengan sifat genetik *C. asiatica* L. dapat diambil pelajaran bahwa sifat genetik *C. asiatica* L. telah ditentukan sesuai dengan kadarnya dengan sangat teliti. Perbedaan morfologi tanaman yang disebabkan oleh perubahan lingkungan merupakan suatu bentuk dari فَهَدَىٰ (petunjuk) bagi tanaman tersebut untuk mengekspresikan sifat genetisnya sehingga dapat tetap berfungsi dengan baik di alam.

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui bahwa tidak semua sifat dalam gen *C. asiatica* L. dapat diketahui melalui keragaan morfologi. Hal ini dalam Ath Thabari (2001), dijelaskan bahwa kalimat “*menyempurnakan, menentukan kadar dan memberi petunjuk*” sesuai dengan tujuannya mengandung ilham pengetahuan didalamnya. Hal ini menunjukkan bahwa yang diketahui atau nampak pada manusia hanya sebagian kecil saja, sedangkan dibalik semua itu terdapat kuasa Allah yang sangat luarbiasa.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari Penelitian Analisis Keanekaragaman Tnaman Pegagan (*Centella asiatica* L. Urb.) pada Ketinggian yang Berbeda Berdasarkan Karakter Morfologi dan Penanda Molekuler ISSR antara lain:

1. Keanekaragaman *C. asiatica* L. berdasarkan karakter morfologi menunjukkan terjadi pengelompokan menjadi 3 klaster berdasarkan ketinggian tempat. Beberapa aksesori yang tidak mengelompok sesuai ketinggiannya tumbuh pada kondisi lingkungan yang seragam sehingga memiliki karakter kuantitatif dan kualitatif morfologi yang mirip.
2. Keanekaragaman *C. asiatica* L. berdasarkan karakter molekuler menggunakan penanda ISSR mengelompok menjadi 5 klaster berdasarkan similaritas pita yang teramplifikasi. Klaster 1, 2 dan 5 mengelompok secara acak, klaster 2 terbentuk berdasarkan karakter pita unik, dan klaster 3 terbentuk hanya dengan 1 anggota yang diambil dari titik tertinggi yaitu ketinggian 1700 mdpl.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. Perlu dilakukan analisis keanekaragaman morfologi *C. asiatica* L. dengan parameter kadar air tanah dan intensitas cahaya yang diterima oleh masing-masing aksesori .
2. Perlu dilakukan pengukuran intensitas cahaya, suhu, dan kelembaban menggunakan alat yang sesuai saat eksplorasi untuk mengetahui kondisi lingkungan dengan lebih valid.

3. Perlu dilakukan penentuan populasi dalam pengambilan sampel tiap ketinggian, sehingga dapat diukur jarak genetik populasi dan frekuensi alel efektif yang berkaitan dengan kekerabatan genetik dan pola evolusi pita-pita yang teramplifikasi.
4. Perlu dilakukan penanaman kembali masing-masing aksesi dengan kontrol kondisi lingkungan sehingga didapatkan hasil keanekaragaman yang akurat berdasarkan kondisi lingkungan yang homogen.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadvandi, Hossein Rostami., Kianoosh Cheghamirza., Danial Kahrizi, Sohbati Al-Huqail, Asma and Faisal Al-Saad. 2010. DNA Fingerprinting and Genotyping of Four Black Seed (*Nigella sativa* L.) Taxa. *JKAU: Met., Env. & Arid Land Agric. Sci.* Vol. 21. No. 1.
- Ahsana, Diena. 2012. Keanekaragaman Varietas dan Hubungan Kekerbatan Pada Tanaman Jati (*Tectona Grandis* Linn.) Melalui Pendekatan Morfologi di Kebun Bibit Permanen Kecamatan Kedungpring, Lamongan. *Skripsi*. Universitas Airlangga.
- Ai, Nio Song. 2011. Biomassa dan Kandungan Klorofil Total Daun Jahe (*Zingiber Officinale* L.) yang Mengalami Cekaman Kekeringan. *Jurnal Ilmiah Sains*. Vol. 11.
- Al-Ashfahani, Ar-Raghib. 2017. *Kamus Al-Qur'an Jilid 3*. diterjemahkan oleh Ahmad Zaini Dahlan, Lc. Depok: Pustaka Khazanah Fawa'id.
- Al-Jazairi, Syaikh Abu Bakar Jabir. 2007. *Tafsir Al-Quran Al-Aisar Jilid 4*. diterjemahkan oleh Suratman, Lc dan Fityan Amali, Lc. Jakarta Timur: Darus Sunnah Press.
- Alqahtani, Ali., Jun-Lae Cho, Ka Ho Wong, Kong M. Li, Valentina Razmovski-Naumovski, and George Q. Li. 2017. Differentiation of Three *Centella* Species in Australia as Inferred from Morphological Characteristics, ISSR Molecular Fingerprinting and Phytochemical Composition. *Frontiers in Plant Science*. Vol 8.
- Alqahtani, Ali., Jun-Lae Cho¹., Ka Ho Wong¹., Kong M. Li., Valentina Razmovski-Naumovski., and George Q. Li. 2017. Differentiation of Three *Centella* Species in Australia as Inferred from Morphological Characteristics, ISSR Molecular Fingerprinting and Phytochemical Composition. *Frontiers in Plant Scie*. Volume 8.
- Al-Qarni, 'Aidh. 2007. *Tafsir Muyassar*. diterjemahkan oleh Tim Qisthi Press. Jakarta: Qisthi Press.
- Al-Qurthubi, Syaikh Imam. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi Jilid 11*. diterjemahkan oleh Amir Hamzah. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Al-Qurthubi, Syaikh Imam. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi Jilid 7*. diterjemahkan oleh Amir Hamzah. Jakarta: Pustaka Azzam.

- Al-Qurthubi, Syaikh Imam. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi Jilid 9*. diterjemahkan oleh Amir Hamzah. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Amborseet, Dawn C.P. *al.*, 2015. *Leafy Medicinal Herbs; Botany, Chemistry, Postharvest, Technology and Uses*. India: Cabi.
- Ath-Thabari, Abu Ja'far Muhammad bin Jarir. 2001. *Tafsir Ath-Thabari Jilid 12: Surat Al-A'raf*. Diterjemahkan oleh Abdul Shomad dan Yusuf Hamdani. Jakarta Selatan: Pustaka Azzam.
- Ath-Thabari, Abu Ja'far Muhammad bin Jarir. 2008. *Tafsir Ath-Thabari Jilid 11: Surat Al-A'raf*. Diterjemahkan oleh Abdul Shomad dan Yusuf Hamdani. Jakarta Selatan: Pustaka Azzam.
- Atmaja, Ida Setya Wahyu. 2017. Pengaruh Uji *Minus One Test* pada Pertumbuhan Vegetatif Tanaman Mentimun. *Jurnal Logika*. Vol. XIX. No. 1.
- Bahmani, Kaivan., Ali Izadi-Darbandi, Ali Ashraf Jafari, Seyed Ahmad Sadat Noori & Mostafa Farajpour. 2012. Assessment of Genetic Diversity in Iranian Fennels Using ISSR Markers. *Journal of Agricultural Science*. Vol. 4. No. 9.
- Bahraminejad. 2013. Comparison of morpho-agronomic traits versus RAPD and ISSR markers in order to evaluate genetic diversity among *Cuminum cyminum* L. accessions. *AJCS* 7(3).
- Benharira. M. Alleaume-, I. R. Pen., And O. Ronce. 2005. Geographical Patterns of Adaptation Within A Species' Range: Interactions Between Drift And Gene Flow. *J. Evol. Biol* No. 19
- Bermawie, Nurliani., Susi Purwiyanti dan Mardiana. 2008. Keragaan Sifat Morfologi, Hasil dan Mutu Plasma Nutfah Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urban.) *Bul. Litro*. Vol. Xix. No. 1.
- Bradeen, James M., Inga C. Bach., Mathilda Briard., Valeria Ie Clere., Dariusz Grzebelus., Doghlas A. Senalik., Philip W. Simon. 2002. Molecular Diversity Analysis of Cultivated Carrot (*Daucus carota* L.) and Wild *Daucus* Populations Reveals a Genetically Nonstructured Composition. *J. AMER. Soc. Hort. Sci.* Vol. 127. No. 3.
- Briard, M., V. Le Clerc, A.E. Mausset and A. Veret. 2001. A Comparative Study on The Use Of ISSR, Microsatellites and Rapd Markers For Varietal Identification of Carrot Genotypes. complex in Madagascar. *Industrial Crops and Products*. Vol. 47.

- Briard, M., V. Le Clerc., A.E. Mausset and A.Veret. 2001. A Comparative Study on The Use of Issr, Microsatellites and Rapd Markers for Varietal Identification of Carrot Genotypes. *Acta Hort.* 546.
- Burkhardt, Richard W.2013. Lamarck, Evolution, and The Inheritance of Acquired Characters. *Genetics.* Vol. 194.No. 4.
- El-Nasr, T.H.S. Abou., M.M. Ibrahim, K.A. Aboud and Magda A.M. El-Enany. 2013. Assessment of Genetic Variability for Three Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Cultivars Grown in Egypt, Using morphological Characters,Essential Oil Composition and ISSR Markers. *World Applied Sciences Journal.* 25 (6).
- Ernawati, Mei., Dedy Duryadi Solihin., Yulin Lestari. 2016. Community Structures Of Endophytic Actinobacteria From Medicinal Plant *Centella Asiatica* L. Urban-Based On Metagenomic Approach. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* Vol. 8. No. 2.
- Gbolahan, Balogun Wasiu., Adebayo Ismail Abiola., Jahangir Kamaldin., Mohammad Ayaz Ahmad And Maria S. Atanassova. 2016. Accession In *Centella Asiatica*; Current Understanding And Future Knowledge. *Journal of Pure and Applied Microbiology.* Vol. 10. No. 4.
- Ginting, Adetias Katanakan. 2017. Pengaruh Pemberian Nitrogen dan Fosfor Terhadap Pertumbuhan Legum *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema pubescens* dan *Arachis pintoi*. *Skripsi.* Fakultas Peternakan Universitas Jambi.
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF). 2017. *Centella asiatica* (L.) Urb. *GBIF Backbone Taxonomy* checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei>. diakses via GBIF.org pada 15 Juli 2019.
- Goldstein, David., Andreas Rui Linares., Luigi Luca Cavalli-Sforza., Marcus W. Feldman. 1995. An Evaluation of Genetic Distances for Use With Microsatellite Loci. *Genetics.* Vol. 139.
- Gupta, A.K. 2013. *Centella asiatica*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2013.* International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.
- Gupta, Shubhpriya and Preeti Chaturvedi. 2017. Foliar Endophytic Diversity of *Centella asiatica* (L.) Urban in Relation to Different Seasons and Leaf Age. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* Vol. 6. No. 6.
- Hakim, Tria Fauzi Prabandani., Pudji Widodo., dan Eming Sudiana. 2015. Variasi Morfologi Bambu Tali [*Gigantochloa apus* (Schult.F.) Kurz.] pada Berbagai Ketinggian Tempat di Sub Daerah Aliran Sungai Pelus. *Biosfera.* 32 (1).

- Hariri, Muhammad Rifqi. 2016. Keragaman Genetik Tarum (*Indigofera Tinctoria* L.) di Pulau Jawa dan Madura Sebagai Pewarna Alami Batik Berdasarkan Marka Inter-Simple Sequence Repeats. *Tesis*: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Ibrahim, Heba M. M., Omnia F. Abou El-Leel., and Khalad A. Emam. 2017. Molecular Profiling for Genetic Variability in *Petroselinum crispum* Based on ISSR and RAPD Markers. *Middle East Journal of Agriculture*. Vol.6. No. 1.
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 2011 *ITIS Report Centella asiatica* (L.) Urb. Taxonomic Serial no. 29612. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=29612#null. Diakses pada 18 Juni 2019.
- James, Jacinda T. and Ian A. Dubery. 2009. Pentacyclic Triterpenoids from the Medicinal Herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*. Vol. 14.
- Joseph, G.V.R., Sachin Chaturvedi and Deokule S.S. 2001. Standardisation and Quality Evaluation of *Centella asiatica* Linn. *Ancient Science of Life*. Vol. 20. No. 4.
- Kapital, Birhanu., Tileye Feyissa., Yohannes Petros and Said Mohammed. 2015. Molecular diversity study of black cumin (*Nigella sativa* L.) from Ethiopia as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Afr. J. Biotechnol.* 14 (18).
- Kapital, Birhanu., Tileye Feyissa., Yohannes Petros., and Said Mohammed. 2015. Molecular diversity study of black cumin (*Nigella sativa* L.) from Ethiopia as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 14. No. 18.
- Karaca M, Ince AG. 2008. Minisatelite as DNA Markers to Classify Bermudagrasses (*Cynodon* spp.): Confirmation of Minisatelite in Amplified Products. *J Genet*. Vol. 87.
- Kurniawati, Ani., Latifah K. Darusman., Rani Yulie Rachmawaty. 2005. Pertumbuhan, Produksi dan Kandungan Triterpenoid Dua Jenis Pegagan (*Centella asiatica* L. (Urban)) Sebagai Bahan Obat pada Berbagai Tingkat Naungan. *Bul. Agron.* 33 (3).
- Laikre, Linda., Fred W. Allendorf, Laurel C. Aroner, C. Scott Baker, David P. Gregovich, Michael M. Hansen, Jennifer A. Jackson, Katherine C. Kendall, Kevin Mckelvey, Maile C. Neel, Isabelle Olivieri, Nils Ryman, Michael K. Schwartz, Ruth Short Bull, Jeffrey B. Stetz, David A. Tallmon, Barbara L. Taylor, Christina D. Vojta, Donald M. Waller, And Robin S. Waples. 2009.

- Neglect of Genetic Diversity in Implementation of the Convention on Biological Diversity. *Conservation Biology*. Volume 24. No. 1
- Lal a, R.K., Pankhuri Guptab., Basant Kumar Dubeya. 2017. Genetic variability and associations in the accessions of Manduk parni {*Centella asiatica* (L. *Industrial Crops and Products*. 96.
- Lotulung, Puspa Dewi N., Sri Handayani, Teni Ernawati, Tri Yuliani, Nina Artanti dan Tjandrawati Mozef. 2015. Standardisasi Ekstrak Pegagan, *Centella Asiatica* Sebagai Obat Herbal Terstandar Hepatoprotektor. *JKTI*. Vol. 17. No. 2.
- Lucília, Maria M. da Costa, Lidiane L. Barbosa Amorim, Alberto V. C. Onofre, Luiz J. O. Tavares de Melo, Maria Betânia M. de Oliveira, Reginaldo de Carvalho, Ana M. Benko-Iseppon. 2011. Assessment of Genetic Diversity in Contrasting Sugarcane Varieties Using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *American Journal of Plant Sciences*. Vol. 2.
- M. Ibrahim, Heba M., Omnia F., Abou El-Leel., Khalad A., Emam. 2017. Molecular Profiling for Genetic Variability in *Petroselinum crispum* Based on ISSR and RAPD Markers. *Middle East Journal of Agriculture*. Vol. 06. No. 01.
- Mariana, Baiq Dina., A. Sugiyanto., A. Supriyanto. 2011. Genetic Diversity of Local Accessions of *Dimocarpus longan* Revealed by ISSR Markers. *Buletin Plasma Nutfah*. Vol. 17. No. 1.
- Moerfiah., Muhtabadihardja., Santi Puspita Dewi. 2014. Efektivitas Sediaan Salep Ekstrak Herba Pegagan (*Centella Asiatica* (L) Urb) Untuk Penyembuhan Luka pada Mencit Jantan (*Mus Musculus Albinus*). *Fitofarmaka*, Vol. 4. No.1.
- Monton, Chaowalit., Sukanya Settharaksaa., Chitradee Luprasong., Thanapat Songsak. 2019. Article An optimization approach of dynamic maceration of *Centella asiatica* to obtain the highest content of four centelloids by response surface methodology. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.
- Mora, Enda dan Armon Fernando. 2012. Optimasi Ekstraksi Triterpenoid Total Pegagan (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) yang Tumbuh di Riau. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*. 1(1).
- Morgenta, M., A.M. Olivieri. 1993. PCR Amplified Microsatellite as Markers in Plant Genetics. *The Plant Journal*. 3 (1).
- Mukherjee, Pulok K. *Quality Control of Herbal Drugs*. Department of Pharmaceutical Technology. Jadavpur University India.

- Nema, Neelesh Kumar., Niladri Maity., Birendra Kumar Sarkar & Pulok Kumar. 2013. Matrix metalloproteinase, hyaluronidase and elastase inhibitory potential of standardized extract of *Centella asiatica*. *Pharm Biol.* 51(9).
- Nur, Adelianda Auliani Kamaruddin, Mazarina Devi, Laili Hidayati. 2017. Pengaruh Penambahan Pegagan (*Centela asiatica* L. Urban) terhadap Daya Terima dan Mutu Kerupuk. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 6 (3).
- Nur, Adelianda Auliani Kamaruddin., Mazarina Devi, Laili Hidayati. 2017. Pengaruh Penambahan Pegagan (*Centela asiatica* L. Urban) terhadap Daya Terima dan Mutu Kerupuk. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan.* 6 (3).
- Pinho, Danilo B., Andre L. Firmino, Walnir G. Ferreira-junior & Olinto L. Pereira. 2012. An efficient protocol for DNA extraction from *Meliolales* and the description of *Meliola centellae* sp. nov. *Mycotaxon.* Vol. 122.
- Poyraz, Ismail. 2014. An Efficient DNA Isolation Method from *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) Seeds for RAPD and ISSR Analysis. *Araştırma Makalesi/ Research Article.* 22.
- Prakash, Ved., Nishita Jaiswal., Mrinal Srivastava. 2017. A Review on Medicinal Properties of *Centella asiatica*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* Vol. 10. No. 10.
- Pramono S dan D. Ajiastuti. 2004. Standardisasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) berdasarkan kadar asiatikosidasecara KLT-densitometri. *Majalah Farmasi Indonesia.* 15(3).
- Pramono, Suwijoyo. 2005. Efek Antiinflamasi Beberapa Tumbuhan Umbelliferae. *Hayati.* Vol. 12. No. 1.
- Prasad, Archana., Manju Singh., Narayan Prasad Yadav., Ajay Kumar Mathur., Archana Mathur. 2014. Molecular, chemical and biological stability of plants derived fromartificial seeds of *Centella asiatica* (L.) Urban-An industriallyimportant medicinal herb. *Industrial Crops and Products.* Vol. 60.
- Prasad, M. N. V., K. Padmalatha. 2008. Genetic Diversity in *Centella asiatica* (L.) Urb., a Memory-Enhancing Nutraceutical Herb, using RAPD Markers. *Medicinal and Aromatical Plant Science and Biotechnology.*
- Pratiwi, P. 2012. Analisis Variasi Genetik beberapa Populasi *Globba leucantha* Miq.di Sumatera Barat dengan Random Amplified Pholymorphism DNA (RAPD). *Thesis.* Program Pasca Sarjana Universitas Amdalas.

- Prihastanti, Erna. 2010. Kandungan Klorofil dan Pertumbuhan Semai Kakao (*Theobroma cacao* L.) PADA Perlakuan Cekaman Kekeringan yang Berbeda. *Bioma*. Vol. 12. No. 2.
- Putri, I. R. 2009. Pengaruh Intensitas Cahaya Matahari Terhadap Pertumbuhan Jenis *Shorea parvifolia* dan *Shorea leprosula* dalam Teknik TPT Intensif. *Skripsi*. Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. 126 hal.
- Raharjeng, Anita Restu Puji. 2015. Pengaruh Faktor Abiotik Terhadap Hubungan Kekerabatan Tanaman *Sansevieria trispinosa* L. *Jurnal Biota*. Vol. 1. No. 1.
- Rahmaniati M, Aulia., Maria Ulfah., Dewi Andini Kunti Mulangsari. 2018. Standarisasi Parameter Non Spesifik Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* L.) di Dua Tempat Tumbuh . *Inovasi Teknik Kimia*. Vol. 3, No. 1.
- Rakotondralambo, Soaharin'ny Ony Raoseta., Marguerite Rodier-Goud., Ronan Rivallan., Alexandra Lussert., Pascal Danthu., Frédéric de Lamotte., Eliane Ralambofetra, Perle Ramavovololona, Jean-Louis Noyer, Franc-Christophe Baurens, 2013. Insight into the biology, genetics and evolution of the *Centella asiatica* polyploidy
- Reddy, M. Pardeep., N Sharla., E.A Siddiq. 2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and its Application in Plant Breeding. *Euphytica*. No. 128.
- Roldan-Ruiz, J. Dendauw, E. VanBockstaele, A. Depicker, M. De Loose. 2000. AFLP Markers Reveal High Polymorphic Rates in Ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol Breed*. 125-134.
- Rukam S., Tomar., Kulkarni G. U., Parakhia M. V., Thakkar J. R., Rathod V. M., Solanki R. K. and Golakiya B. A. 2014. Genetic diversity analysis in coriander (*Coriandrum sativum*) genotypes through morphological and molecular characterization. *Research Journal of Biotechnology*. Vol. 9 (3).
- Rukam, Tomar S., Kulkarni G. U., Parakhia M. V., Thakkar J. R., Rathod V. M., Solanki R. K. and Golakiya B. A. 2014. Genetic diversity analysis in coriander (*Coriandrum sativum*) genotypes through morphological and molecular characterization. *Research Journal of Biotechnology* Vol. 9 (3).
- Sahu, Jagajjit., Anupam Das Talukdar., Kamalakshi Devi., Manabendra Dutta Choudhury., Madhumita Barooah., Mahendra Kumar Modi., and Priyabrata Sen. E-Microsatellite Markers for *Centella asiatica* (Gotu Kola) Genome: Validation and Cross-Transferability in Apiaceae Family for Plant Omics Research and Development. *OMICSA Journal of Integrative Biology*. Vol. 19. No.

- Sakthipriya, M. S.S., Vishnu, S. Sujith, P. Rajesh Kumar, K.K. Sabu. 2018. Analysis of Genetic Diversity of *Centella asiatica* Using SSR Markers. *International Journal of Applied Science and Biotechnology*. Vol. 6. No. 2.
- Sakthipriya, M. S.S., Vishnu, S. Sujith, P. Rajesh Kumar, K.K. Sabu. 2018. Analysis of Genetic Diversity of *Centella asiatica* Using SSR Markers. *International Journal of Applied Science and Biotechnology*. Vol. 6. No. 2.
- Salisbury, Frank B. And Cleon W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid II (Biokimia Tumbuhan)*. Bandung: Penerbit ITB.
- Semagn, K., A. Bjornstad., M. N. Ndjiondjop. 2006. An Overview of Molecular Marker Methods for Plants. *African Journal of Biotechnology*. Review.
- Shihab, M. Quraish. 2015. *Tafsir Al-Mishbah Volume 15*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, M. Quraish. 2015. *Tafsir Al-Mishbah Volume 7*. Jakarta: Lentera Hati.
- Subositi, Dyah., Harto Widodo, dan Nita Supriyati. 2016. Skrining Marka ISSR untuk Autentikasi Pegagan (*Centella asiatica* [L.] Urb.) . *Buletin Plasma Nutfah*. 22 (1).
- Sudhakaran, Madathilparambil Vasu. 2017. Botanical Pharmacognosy of *Centella asiatica* (Linn.)Urban. *Pharmacogn J*. 9(4).
- Sudhakaran, Madathilparambil Vasu. 2017. Botanical Pharmacognosy of *Centella asiatica* (Linn.)Urban. *Pharmacogn J*. 9(4).
- Takhtajan, Armen. 2009. *Flowering Plants*. Russia: Springer
- Tiwari, R. K., S. Chanda., M. Deepak., B. Murli and A. Agarwal. 2010. HPLC Method Validation for Simultaneous Estimation of Madecassoside, Asiaticoside And Asiatic Acid in *Centella asiatica*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2(3).
- Tucci, Alberto and De Leo. 2014. *Erbe Officinali e Piante Medicinalli-Prontuario Enciclopedico*. Roma: Prima Edizione Digitale.
- Vajira, Seneviratne., Hapuarachchi SD and Perera PK. 2016. Standardization and Quality Control of *Centella Asiatica* Linn. (Gotukola) Dried Powder and Capsules. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. Vol. 5, No. 1.
- Xu, Zhenghao and Le Chang *et al.*, 2017. *Identification and Control of Common Weeds; Volume 3*. Hangzou: Zheijiang University Press.

- Youssef, M. A. H., Mahgoub, H.A.M. 2015. Phytochemical and Molecular Analysis of Some Medicinal Plants of Labiatae Family Growing at Different Altitudes on Saint Katherine Mountain, South Sinai, Egypt. *Egypt. J. Genet. Cytol.* No. 44.
- Yulianti, Farida., C. Martasari., Karsinah., Tangguh Hartono. 2010. Variasi Genetik Jeruk Keprok (*Citrus reticulata* L.) Hasil Radiasi Sinar Gamma Menggunakan Penanda ISSR. *Buletin Plasma Nutfah.* Vol. 16. No. 2.
- Yuwono, Triwibowo. 2010. *Biologi Molekuler.* Yogyakarta: UGM Press.
- Zainol, N.A., S.C. Voo., M.R. Sarmidi., R.A. Aziz. 2008. Profiling of *Centella Asiatica* (L.) Urban Extract. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences.* Vol. 12. No. 2.
- Zhang, Xiao-Gang., Ting Han., Qiao-Yan Zhang., Hong Zhang., Bao-Kang Huang., Li-Li Xu., Lu-Ping Qin. 2009. Chemical Fingerprinting and Hierarchical Clustering Analysis of *Centella asiatica* from Different Locations in China. *Chromatographia.* Vol. 69. No. 1.
- Zhang, Xiao-Gang., Ting Han., Zhi-Gao He., Qiao-Yan Zhang., Lei Zhang., Khalid Rahman., Lu-Ping Qin. 2012. Genetic Diversity of *Centella Asiatica* in China Analyzed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Combination Analysis with Chemical Diversity. *J Nat Med.* 66.
- Zulkarnain. 2009. *Dasar-dasar Hortikultura.* Bumi Aksara. Jakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil uji DMRT 5% panjang total, panjang stolon, diameter stolon

No	Aksesi	ketinggian	p. total	jumlah ruas	Panjang stolon	Diameter stolon		
						Induk	anakan 1	anakan 2
1	C1	300	21,63ab	3,00a	8,03a	0,30c	0,45d	0,25cde
2	C2	350	19,33a	3,00a	9,03ab	0,71l	0,40d	0,33de
3	C3	500	21,33ab	2,67a	8,58ab	0,20b	0,22b	0,23cd
4	C4	600	20,33ab	3,33a	7,40a	0,51h	0,32	0,45f
5	C5	850	34,73ab	2,67a	12,10abc	0,60i	0,12a	0,12b
6	C6	1000	23,53ab	3,00a	9,53ab	0,18a	0,20b	0,00a
7	C7	1100	29,17ab	3,00a	18,90c	0,50g	0,36c	0,35e
8	C8	1200	39,90ab	3,33a	13,23abc	0,40f	0,40d	0,25cde
9	C9	1300	41,40ab	3,00a	15,62bc	0,68k	0,40d	0,35e
10	C10	1320	43,67b	4,00a	11,67ab	0,65j	0,30c	0,20bc
11	C11	1400	28,33ab	3,00a	9,55ab	0,35e	0,40d	0,23cd
12	C12	1500	23,33ab	3,00a	10,90ab	0,30c	0,20b	0,25cde
13	C13	1600	22,17ab	3,33a	9,33ab	0,50g	0,55e	0,10ab
14	C14	1700	26,67ab	3,00a	10,18ab	0,32d	0,40d	0,10ab
Jumlah			395,5	43,3	154,1	6,2	4,7	3,2
rata-rata			28,3	3,1	11,0	0,4	0,3	0,2

Lampiran 2 Hasil uji DMRT 5% tinggi tanaman, tinggi tangkai

no	Aksesi	Ketinggian	Tinggi tanaman			Tinggi tangkai		
			Induk	anakan 1	anakan 2	Induk	anakan 1	anakan 2
1	C1	300	20,33cd	18,00bc	14,17abc	10,73cdef	9,63abcd	8,70abcd
2	C2	350	15,60bc	10,50ab	9,83ab	6,20ab	6,13ab	4,53abc
3	C3	500	25,20d	22,90cd	16,00bc	19,83g	17,67de	11,97bcd
4	C4	600	18,00cd	16,40bc	12,07abc	13,13cde	12,03bcd	10,20abcd
5	C5	850	18,60cd	11,47ab	8,73ab	13,87cdef	8,67abc	6,00abc
6	C6	1000	4,73a	4,60a	1,97a	3,33a	3,17a	1,47a
7	C7	1100	17,10bcd	11,97ab	5,67ab	9,07abcd	7,67abc	4,80abc
8	C8	1200	13,67bc	14,23bc	10,27abc	10,10bcde	12,75bcd	7,57abcd

9	C9	1300	37,10e	30,00d	22,50c	28,27h	24,23e	17,20d
10	C10	1320	20,60cd	17,90bc	14,30ab c	16,03f g	15,40cd	12,60cd
11	C11	1400	15,03bc	13,53ab c	11,53ab c	11,50b cde	10,83abc d	8,77abcd
12	C12	1500	9,17ab	9,30ab	3,47ab	7,73ab c	6,45ab	2,10ab
13	C13	1600	14,73bc	14,73bc	6,77ab	11,70b cde	12,33bcd	4,53abc
14	C14	1700	18,70cd	16,37bc	14,50ab c	15,87e fg	12,70bcd	12,13bcd
Jumlah			248,6	211,9	151,8	177,4	159,7	112,6
rata-rata			17,8	15,1	10,8	12,7	11,4	8,0

Lampiran 3 Hasil uji DMRT 5% diameter tangkai

No	Aksesi	Ketinggian	Diameter tangkai		
			Induk	anakan 1	anakan 2
1	C1	300	0,12abc	0,10ab	0,10bcd
2	C2	350	0,53d	0,10ab	0,12cd
3	C3	500	0,12abc	0,10ab	0,07b
4	C4	600	0,15abc	0,10ab	0,13d
5	C5	850	0,12abc	0,12abc	0,08bc
6	C6	1000	0,07a	0,07a	0,01a
7	C7	1100	0,10ab	0,10ab	0,08bc
8	C8	1200	0,12abc	0,20abc	0,10bcd
9	C9	1300	0,20bc	0,10ab	0,10bcd
10	C10	1320	0,23c	0,20abc	0,08bc
11	C11	1400	0,15abc	0,11ab	0,12cd
12	C12	1500	0,12abc	0,18abc	0,08bc
13	C13	1600	0,10ab	0,10ab	0,07b
14	C14	1700	0,15abc	0,12ab	0,13d
Jumlah			2,3	1,7	1,3
rata-rata			0,2	0,1	0,1

Lampiran 4. Hasil uji DMRT 5% jumlah daun dan luas daun

No	Aksesi	Ketinggian	jumlah daun tiap ruas	Σ daun induk	Σ daun anakan 1	Σ daun anakan 2	Luas daun		
							Induk	anakan 1	anakan 2
1	C1	300	6,33c	4ab	3a	2b	10,07abc	5,30ab	8,13ab
2	C2	350	4,67abc	4ab	4ab	3b	9,16abc	3,71a	5,33a
3	C3	500	4,33abc	7b	3a	3b	10,76abc	8,50ab	6,47ab
4	C4	600	5,67bc	5b	2a	4bc	9,40abc	8,42ab	4,27a
5	C5	850	5,33abc	7b	6b	3b	9,43abc	7,04ab	7,35ab
6	C6	1000	3,00ab	4ab	3a	3b	3,07a	1,15a	0,30a
7	C7	1100	2,33a	4ab	1a	1b	9,35abc	2,35a	2,37a
8	C8	1200	5,00abc	5b	3a	4bc	12,54abc	8,20ab	5,49a
9	C9	1300	3,33abc	4ab	2a	2b	54,97c	37,76c	18,89b
10	C10	1320	3,00abc	2a	3a	0a	19,21c	14,33b	5,45a
11	C11	1400	3,67abc	4ab	2a	3b	10,91abc	6,39ab	4,37a
12	C12	1500	4,33abc	5b	4ab	1b	5,43ab	7,85ab	1,56a
13	C13	1600	6,00abc	5b	2a	0a	13,85bc	9,55ab	8,80ab
14	C14	1700	4,00bc	5b	2a	2b	9,76abc	8,20ab	6,73ab
Jumlah			61,0	65	37	31	187,9	128,8	85,5
rata-rata			4,4	4,6	2,6	2,2	13,4	9,2	6,1

Lampiran 5 Hasil uji DMRT 5% tebal daun


No	Aksesi	Ketinggian	Tebal daun			Rata-rata
			Induk	anakan 1	anakan 2	
1	C1	300	0,04c	0,08c	0,09c	0,07c
2	C2	350	0,0b	0,08c	0,02a	0,05b
3	C3	500	0,05d	0,02a	0,01a	0,03a
4	C4	600	0,09f	0,05b	0,03ab	0,06b
5	C5	850	0,05d	0,02a	0,0a2	0,03a
6	C6	1000	0,05d	0,02a	0,01a	0,03a
7	C7	1100	0,02a	0,05b	0,02a	0,03a
8	C8	1200	0,07e	0,08c	0,05b	0,07c
9	C9	1300	0,05d	0,05b	0,05b	0,05b
10	C10	1320	0,05d	0,05b	0,03ab	0,04a
11	C11	1400	0,10g	0,10d	0,05b	0,08c
12	C12	1500	0,02a	0,05b	0,05b	0,04a
13	C13	1600	0,05d	0,05b	0,03ab	0,04a
14	C14	1700	0,10g	0,05b	0,02a	0,06b
Jumlah			0,8	0,8	0,5	
rata-rata			0,1	0,1	0,03	




Lampiran 6 Warna daun dan warna tangkai *C. asiatica* L.


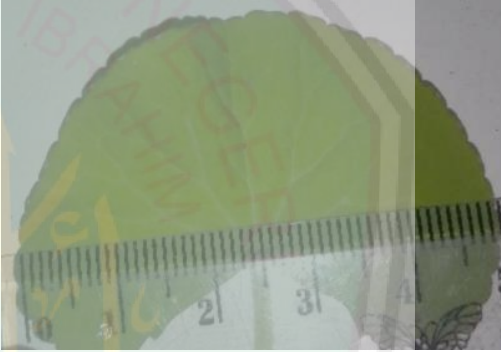

No	Aksesi	Ketinggian	Warna daun			Warna stolon	Warna tangkai		Warna buku ruas
			Daun Tua		Daun muda		Warna utama	kombinasi	
			Warna utama	Kombinasi	Warna utama				
1	C1	300	135 A	-	137 B	148 B	143 B	-	147 C
2	C2	350	135 A	-	141 A	148 A	148 A	137 B	148 B
3	C3	500	N 134 A	-	137 C	137 A	N 137 D	-	146 C
4	C4	600	135 A	-	141 A	145 C	148 A	143 A	138 C
5	C5	850	135 A	-	139 A	144 A	143 A	-	143 A
6	C6	1000	137 D	-	143 A	143 D	142 C	-	143 D
7	C7	1100	137 A	-	139 A	148 B	143 B	-	144 D
8	C8	1200	135 B	-	N 134 A	141 B	144 A	-	144 D
9	C9	1300	135 A	-	135 A	141 D	141 C	-	139 C
10	C10	1320	135 A	-	N 134 A	141 B	143 A	-	144 D
11	C11	1400	138 A	139 A	141 A	148 A	148 A	-	147 C
12	C12	1500	137 D	-	N 137 D	148 B	142 B	-	144 D
13	C13	1600	139 A	-	139 A	148 B	146 B	-	148 D
14	C14	1700	137 C	-	141 C	148 A	135 D	-	138 D

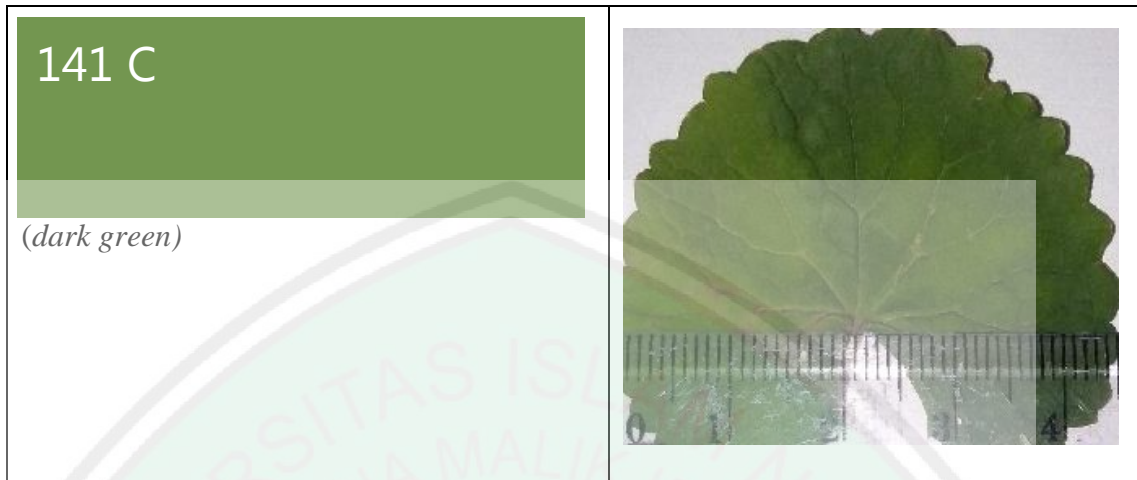
Lampiran 7 Gambar warna daun *C. asiatica* L.

<p>135 A</p>  <p>(dark green)</p>	
<p>N 134 A</p>  <p>(dark green)</p>	
<p>(brown green)</p> <p>137 D</p> 	
<p>137 A</p>  <p>(dark green)</p>	

<p>135 B</p>  <p>(dark green)</p>	
<p>138 A</p>  <p>139 A</p>  <p>138 A (brown green) 139 A (dark green)</p>	
<p>137 D</p>  <p>(brown green)</p>	

<p>139 A</p> <p><i>(dark green)</i></p>	
<p>137 C</p> <p><i>(brown green)</i></p>	
<p>137 B</p> <p><i>(brown green)</i></p>	

<p>141 A</p> <p><i>(dark green)</i></p>	
<p>143</p> <p><i>(dark green)</i></p>	
<p>N 137 D</p> <p><i>(dark green)</i></p>	



Lampiran 8. gambar warna tangkai daun *C. asiatica* L.




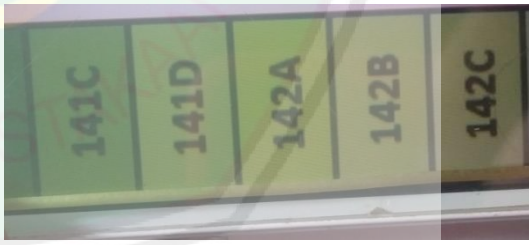


<p>142 C</p> <p>(light green)</p>	
<p>142 B</p> <p>(light green)</p>	
<p>143 A</p> <p>(dark green)</p>	
<p>135 D</p> <p>(light green)</p>	
<p>146 B</p> <p>(brown green)</p>	

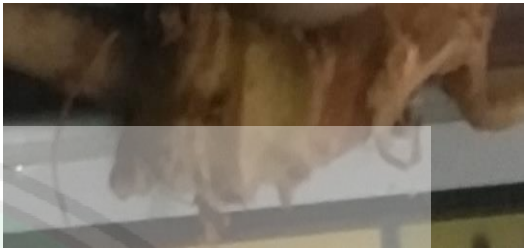

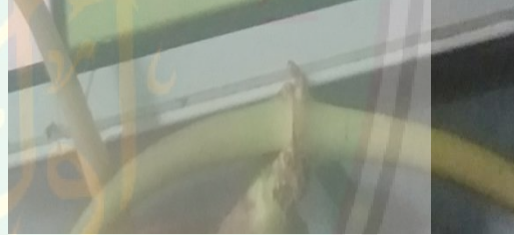


Lampiran 9 Gambar warna stolon *C. asiatica* L.








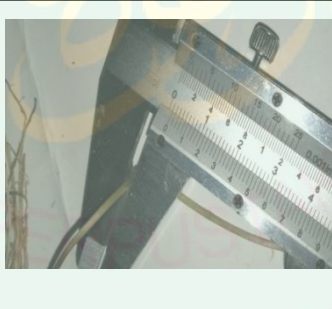



<p>148 B</p> <p><i>(Brown green)</i></p>	
<p>145 C</p> <p><i>(light green)</i></p>	
<p>141 B</p> <p><i>(dark green)</i></p>	
<p>141 D</p> <p><i>(light green)</i></p>	







Lampiran 10 Gambar warna ruas *C. asiatica* L.

<p>146 C</p> <p>(brown green)</p>	
<p>147 C</p> <p>(brown green)</p>	
<p>138 D</p> <p>(light green)</p>	

Lampiran 11 Foto Pengamatan *C. asiatica* L.

		
Panjang tanaman	Panjang ruas stolon	Panjang tangkai daun
		
Panjang daun	Lebar daun	Tebal daun
		
Diameter tangkai daun induk	Diameter stolon	Diameter tangkai daun anakan 1

		
Tebal daun anakan 1	Diameter tangkai daun anakan 1	Lebar daun anakan 1

		
Panjang tangkai daun anakan 1	Panjang ruas stolon anakan 1	Panjang tangkai daun anakan 2
		
Panjang daun anakan 2	Kebar daun anakan 2	Panjang tanaman 2

		
<p>Panjang tanaman 3</p>		



Lampiran 12. Skoring Karakter Kuantitatif *C. asiatica L.*

no	ketinggian	Kode	panjang total	jumlah ruas	jumlah daun tiap ruas	Σ daun induk	Σ daun anakan 1	Σ daun anakan 2	tinggi tanaman induk	tinggi anakan 1	tinggi anakan 2	panjang geragih	panjang tangkai induk	panjang tangkai anakan 1	panjang tangkai anakan 2
1	300	C1	1	2	3	4	3	2	5	4	3	2	3	3	2
2	350	C2	1	2	3	4	4	3	3	2	2	2	2	2	1
3	500	C3	1	1	3	7	3	3	5	5	4	2	4	4	3
4	600	C4	1	2	3	5	2	4	4	4	3	2	3	3	3
5	850	C5	4	1	3	7	6	3	4	3	2	3	3	5	2
6	1000	C6	2	2	2	4	3	3	4	1	1	2	1	1	1
7	1100	C7	3	2	2	4	1	1	4	3	2	4	2	3	1
8	1200	C8	4	2	3	5	3	4	1	3	3	3	2	3	2
9	1300	C9	5	2	1	4	2	2	7	6	5	4	5	5	4
10	1320	C10	5	3	2	2	3	0	6	4	3	3	4	4	3
11	1400	C11	3	2	2	4	2	3	4	3	3	2	3	3	2
12	1500	C12	2	2	2	5	4	1	2	2	1	3	2	2	1
13	1600	C13	1	2	3	5	2	0	4	3	2	2	3	4	1
14	1700	C14	2	2	2	5	2	2	4	4	3	3	4	3	3

Lampiran 13. Skoring karakter kuantitatif *C. asiatica* L.

no	Ketinggian	Kode	tinggi daun induk	tinggi daun anakan 1	tinggi daun anakan 2	lebar daun tanaman induk	lebar daun anakan 1	lebar daun anakan 2	luas daun induk	luas daun anakan 1	luas daun anakan 2	tebal daun induk	tebal daun anakan 1	tebal daun anakan 2	Diameter tangkai induk	Diameter tangkai anakan 1	Diameter tangkai anakan 2	Diameter stolon induk	Diameter stolon anakan 1	Diameter stolon anakan 2
1	300	C1	2	2	2	2	4	3	2	2	3	1	3	3	2	1	2	1	2	3
2	350	C2	2	2	2	2	3	2	2	1	2	1	3	1	4	1	3	3	2	4
3	500	C3	2	2	2	3	4	3	3	3	2	2	1	1	2	1	1	1	1	3
4	600	C4	2	3	2	2	2	3	2	3	2	3	2	1	3	1	3	2	1	5
5	850	C5	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	1	1	2	2	2	2	1	1
6	1000	C6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1100	C7	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	4
8	1200	C8	2	2	2	4	4	4	3	3	2	2	3	2	2	3	2	1	2	3
9	1300	C9	4	4	3	5	6	5	5	5	4	2	2	2	5	1	2	2	2	4
10	1320	C10	3	3	2	4	5	3	4	4	2	2	2	1	5	3	2	2	1	2
11	1400	C11	2	2	2	3	2	3	3	2	2	3	3	2	3	2	3	1	2	3
12	1500	C12	1	2	1	2	3	2	1	2	1	1	2	2	2	3	2	1	1	3
13	1600	C13	2	3	2	3	3	3	3	3	3	2	2	1	1	1	2	2	2	1
14	1700	C14	2	3	2	3	3	4	2	3	2	3	2	1	3	2	3	2	2	1

Lampiran 14. Skoring karakter kualitatif *C. asiatica* L.

no	Ketinggian	kode	Warna daun tua	kombinasi	warna daun muda	warna tangkai	Kombinasi	warna geragih	warna buku ruas
1	300	C1	1	1	2	3	1	4	3
2	350	C2	1	1	4	4	2	4	3
3	500	C3	1	1	2	1	1	1	2
4	600	C4	1	1	4	4	3	3	1
5	850	C5	1	1	3	3	1	3	2
6	1000	C6	3	1	5	3	1	3	2
7	1100	C7	2	1	3	3	1	4	2
8	1200	C8	2	1	1	2	1	3	2
9	1300	C9	1	1	1	2	1	2	1
10	1320	C10	1	1	1	3	1	2	2
11	1400	C11	4	2	6	2	1	4	3
12	1500	C12	3	1	2	3	1	4	3
13	1600	C13	5	1	3	3	1	4	3
14	1700	C14	3	1	4	1	1	4	1

Lampiran 15. Skoring pita terimplifikasi primer UBC 811, UBC 828, dan K18 *C. asiatica* L.

marker	Akresi	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11	c12	c13	c14
UBC 828	1250	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
	900	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
	800	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	300	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
K18	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	800	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	600	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
	500	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	375	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	350	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	300	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	250	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
UBC 889	900	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	700	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	650	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

600	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
575	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
450	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
400	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
200	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
75	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
50	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK
IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp/Faks. (0341) 558933

Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Ayu Rifqi Ellyza
NIM : 14620073
Program Studi : Biologi
Semester : Genap TA. 2019-2020
Pembimbing : Azizatur Rahmah, M.Sc
Judul Skripsi : Keanekaragaman Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L. [Urb.]) Pada Ketinggian dan Lingkungan yang Berbeda Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler Menggunakan Penanda ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

No.	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	29 Mei 2019	Konsultasi judul, bab 1, bab 2, bab 3	1.
2.	20 Juli 2019	Konsultasi bab 1, 2, 3	2.
3.	5 Desember 2019	Konsultasi bab 4 (hasil)	3.
4.	10 Desember 2019	Konsultasi bab 4 (pembahasan morfologi)	4.
5.	18 Desember 2019	Konsultasi bab 4 (Dendogram Molekuler dan Morfologi), menentukan garis fenon	5.
6.	25 Desember 2019	Konsultasi pembahasan bab 4	6.
7.	27 Desember 2019	Konsultasi bab 4 (pembahasan molekuler)	7.
8.	31 Desember 2019	Acc skripsi	8.

Malang, 16 Maret 2020

Mengetahui,



Pembimbing Skripsi

Azizatur Rahmah, M.Sc
NIP. 19860930 2019032011



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK
IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp/Faks. (0341) 558933

Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI INTEGRASI ISLAM DAN SAINS

Nama : Ayu Rifqi Ellyza
NIM : 14620073
Program Studi : Biologi
Semester : Genap TA. 2019-2020
Pembimbing : Mujahidin Ahmad, M.Sc
Judul Skripsi : Keanekaragaman Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L. [Urb.]) pada Ketinggian dan Lingkungan yang Berbeda Berdasarkan Karakter Morfologi dan Molekuler Menggunakan Penanda ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

No.	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	4 Desember 2019	Konsultasi integrasi Bab 1 dan 2	1.
2.	6 Desember 2019	Konsultasi integrasi Bab 4	2.
3.	3 Januari 2020	Acc skripsi	3.

Malang, 16 Maret 2020

Mengetahui

Drs. Eviko Saefandi Savitri, M.P
NIP. 1961018 200312 2 002

Pembimbing Skripsi

Mujahidin Ahmad, M.Sc
NIP. 1986051201931002