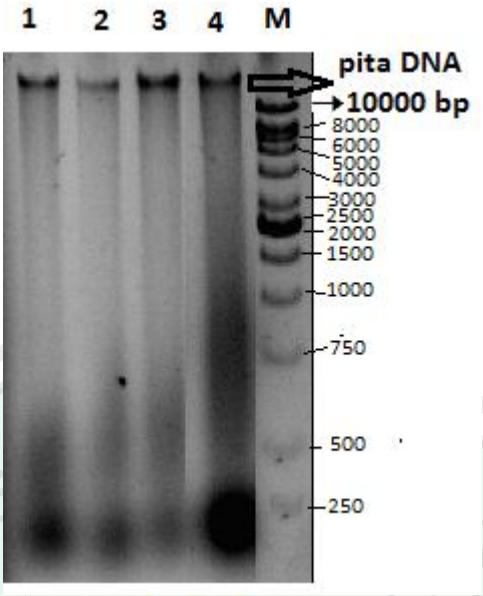
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi DNA

Analisis DNA dimulai dengan melakukan ekstraksi DNA total dari daun tanaman mangga dengan menggunakan metode CTAB (c*etyl trimethylammonium bromide*). CTAB merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol seperti pada daun mangga (Jose dan Usha, 2000). Ada tiga tahap utama dalam ekstraksi DNA ini, yaitu perusakan dinding dan membran sel (lisis), pemisahan DNA dari makromolekul seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Surzycki, 2000).

Alasan digunakan organ daun dari tanaman karena bagian ini lebih mudah diekstrak secara teknik daripada tanaman lainnya seperti akar, batang dan biji. Pemilihan daun muda mangga untuk isolasi DNA karena daun muda memiliki tekstur yang lunak dibandingkan daun tua sehingga mudah untuk dihaluskan. Selain itu, kandungan polisakarida, polifenol dan metabolit sekunder lebih sedikit daripada daun tua sehingga diharapkan hasil isolasi DNA bisa lebih murni (Syafaruddin, 2011). Hasil uji kualitatif DNA dengan elektroforesis dapat dilihat pada gambar 4.7.



Gambar 4.7 Hasil elektroforesis DNA genom mangga. M merupakan marker 10000 bp. Keterangan sumur : sumur 1 Garifta Merah, sumur 2 Gedong Gincu, sumur 3 Podang Kuning dan sumur 4 Arumanis.

Berdasarkan gambar 4.7 diketahui bahwa ketebalan pita DNA pada semua sampel hampir sama. Pita DNA yang paling tipis adalah pada sampel 2 yaitu Gedong Gincu menunjukkan konsentrasi DNA yang paling sedikit dibandingkan dengan sampel lainnya. Uji kualitas DNA dengan elektroforesis tersebut sesuai dengan hasil uji kuantitatif DNA menggunakan spektrofotometer (tabel 4.8). Berdasarkan uji kuantitatif diketahui bahwa konsentrasi DNA hasil isolasi berkisar antara 389 sampai 609 ng/µl. Sampel nomor 2 Gedong Gincu memiliki konsentrasi DNA yang paling sedikit yaitu 389,29 ng/µl, sampel Arumanis dan Podang Kuning memiliki konsentrasi DNA yang hampir sama yaitu 503,035 dan 513,775 ng/µl, sampel Garifta Merah memiliki konsentrasi DNA yang paling tinggi diantara sampel lainnya yaitu 609,495 ng/µl.

Gambar 4.7 selain menunjukkan ketebalan pita DNA juga menunjukkan *smear* pada pita DNA. Pada hasil elektroforesis diketahui bahwa masih terdapat *smear* pada semua sampel. *Smear* pita yang paling tebal dimiliki oleh sampel 1, kemudian sampel 4. Sedangkan sampel 2 dan 3 memiliki *smear* yang lebih tipis. Semakin sedikit atau tidak ada *smear* menunjukkan semakin baik kualitas DNA.

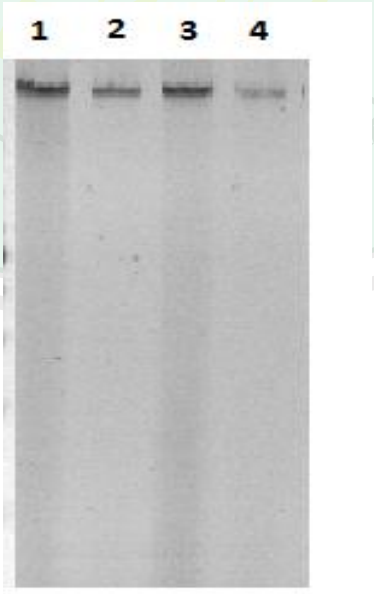
Irmawati (2003) menyatakan bahwa pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang diekstrak dalam kondisi utuh. Sedangkan, pita DNA yang terlihat menyebar menunjukan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang dapat terjadi dalam proses pemipetan, pada saat dibolak-balik dalam ependorf, disentrifus atau bahkan karena temperatur yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu.

Kemurnian DNA dari hasil elektroforesis dikonfirmasi dengan uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer. Hasil kemurnian DNA dengan menggunakan spektrofotometer dapat dilihat pada tabel 4.8.

Tabel 4.8. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi.

No.	**Nama Varietas Mangga**	**Konsentrasi DNA (x50 ng/µl)**	**A260**	**A280**	**Kemurnian (A260/A280)**
1	Garifta Merah	609,495	0,244	0,174	1,3985
2	Gedong Gincu	389.29	0.156	0,095	1,6449
3	Podang Kuning	513,775	0,206	0,153	1,3411
4	Arumanis	503,035	0,201	0,081	2,4927

Kemurnian DNA hasil isolasi berkisar antara 1,34 sampai 2,4. Sampel DNA yang mendekati murni adalah sampel Gedong Gincu yaitu 1,6449. Sampel Garifta Merah dan Podang Kuning memiliki kemurnian DNA yang hampir sama yaitu 1,3985 dan 1,3411. Kemurnian DNA di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminan protein dan fenol. Apabila kemurnian DNA melebihi 2 menunjukkan adanya kontaminan RNA, seperti pada sampel Arumanis yang memiliki kemurnian DNA 2,4927. Hal tersebut dikarenakan pita ganda DNA / RNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol akan menyerap cahaya pada 280 nm. Kontaminan RNA pada sampel DNA dapat terlihat pada hasil elektroforesis berupa pita tebal di bagian bawah. Pada sampel Arumanis terlihat adanya pita *smear* yang sangat tebal Di bagian bawah dibandingkan dengan sampel lainnya. Berdasarkan hasil uji kualitatif dan kuantitatif DNA hasil isolasi maka diperlukan langkah repurifikasi DNA.



Gambar 4. 8 Hasil elektroforesis repurifikasi DNA. Keterangan sumur : sumur 1 Garifta Merah, sumur 2 Gedong Gincu, sumur 3 Podang Kuning dan sumur 4 Arumanis.

Berdasarkan hasil elektroforesis (gambar 4.8) diketahui bahwa pita DNA hasil repurifikasi lebih tipis dibandingkan sebelum repurifikasi. Hal ini dikarenakan adanya DNA yang ikut terbuang saat proses repurifikasi. Hasil uji kuantitatif dengan spektrofotometer juga menunjukkan bahwa konsentrasi DNA berkurang dari konsentrasi sebelumnya. Konsentrasi DNA sampel Garifta Merah, Gedong Gincu dan Podang Kuning berkurang hampir setengah dari konsentrasi awal. Sedangkan konsentrasi DNA sampel Arumanis berkurang sangat drastis dari 503,035 menjadi 115, 46 ng/µl. Hasil pengujian kuantitatif repurifikasi DNA dapat dilihat pada tabel 4.9

Tabel 4.9 Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA hasil repurifikasi.

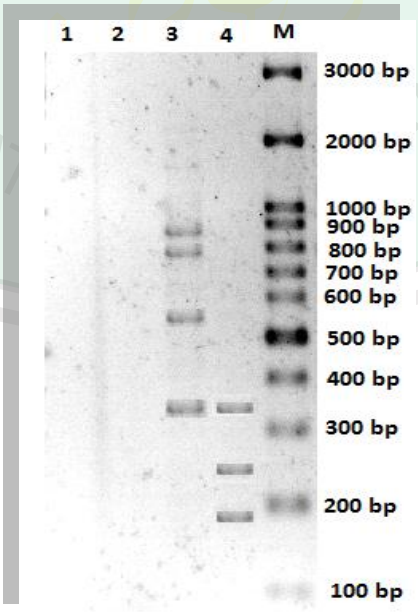
No.	**Nama Varietas Mangga**	**Konsentrasi DNA (x50 ng/µl)**	**A260**	**A280**	**Kemurnian (A260/A280)**
1	Garifta Merah	342,23	0,137	0,071	1,9362
2	Gedong Gincu	177,315	0,071	0,034	2,0702
3	Podang Kuning	297,19	0,119	0,076	1,5558
4	Arumanis	115,46	0.046	0.027	1,7190

Kualitas DNA hasil repurifikasi lebih baik dari sebelumnya. Hal ini dapat diketahui dari berkurangnya *smear* dan tidak adanya pita tebal di bagian bawah hasil elektroforesis yang menunjukkan adanya kontaminan RNA. Kemurnian DNA semua sampel meningkat menjadi lebih murni. Sampel yang murni yaitu Garifta Merah 1,9362 dan Gedong Gincu 2,0702. Sampel yang mendekati murni yaitu Arumanis 1,7190, sedangkan kemurnian sampel Podang Kuning hanya 1,5558. Nilai kemurnian tersebut menunjukkan bahwa sampel DNA Podang Kuning masih terkontaminasi oleh protein. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa hal diantaranya adalah ketidaktelitian dalam proses *pipeting* sehingga kontaminan protein masih ikut terhisap bersama DNA. Berdasarkan hasil uji

kualitatif dan kuantitatif repurifikasi DNA, maka analisis DNA dapat dilanjutkan ke tahap amplifikasi.

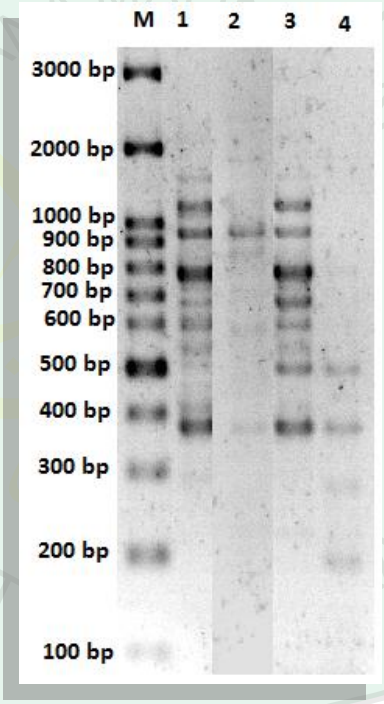
4.2 Amplifikasi DNA Berdasarkan RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*)

Primer RAPD memiliki panjang primer 10 bp yang dapat menempel secara acak pada sekuen target homolognya dalam genom. Primer RAPD dapat mengamplifikasi DNA genom secara acak, tidak spesifik pada gen tertentu sehingga mampu menggambarkan kondisi genom antar sampel secara menyeluruh. Selain itu, pemilihan teknik RAPD karena mudah dilakukan, relatif cepat, serta secara ekonomi hanya menggunakan bahan dalam jumlah mikro (Isabel *et al.* 1993). Amplifikasi DNA dengan teknik RAPD menggunakan 3 primer yaitu OPA 12 (gambar 4.9), OPA 13 (gambar 4.10), OPL 17 (gambar 4.11).



Gambar 4.9 Hasil amplifikasi DNA dengan primer OPA 12. Keterangan M= marker 100bp, sampel 1 Garifta Merah, sampel 2 Gedong Gincu, sampel 3 Podang Kuning, sampel 4 Arumanis.

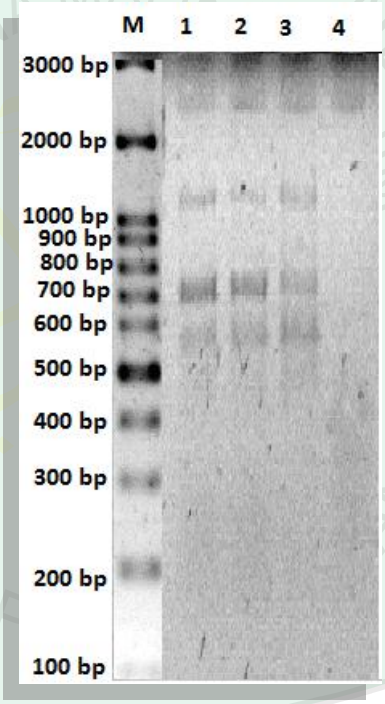
Amplifikasi DNA dengan primer OPA 12 menghasilkan 6 pita polimorfik, namun primer ini tidak dapat mengamplifikasi sampel 1 (Garifta Merah) dan sampel 2 (Gedong Gincu). Dimungkinkan bahwa sampel 1 dan sampel 2 tidak memiliki sekuen yang cocok dengan primer OPA 12. Amplifikasi pada sampel 3 (Podang Kuning) menghasilkan 4 pita pada ukuran 850 bp, 750 bp, 570 bp, dan 350 bp. Sedangkan amplifikasi pada sampel 4 (Arumanis) menghasilkan pita dengan ukuran 350 bp, 250 bp dan 180 bp.



Gambar 4.10 Hasil amplifikasi DNA dengan primer OPA 13. Keterangan M= marker 100bp, sampel 1 Garifta Merah, sampel 2 Gedong Gincu, sampel 3 Podang Kuning, sampel 4 Arumanis.

Primer OPA 13 dapat mengamplifikasi semua sampel DNA mangga. Amplifikasi DNA dengan primer OPA 13 menghasilkan 12 pita yang polimorfik dan 1 pita monomorfik. Pita polimorfik yang dihasilkan diantaranya 1700 bp, 1200 bp, 950 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 550 bp, 500 bp, 400 bp, 280 bp dan 190 bp. Pita monomorfik yang terdapat pada semua sampel memiliki panjang

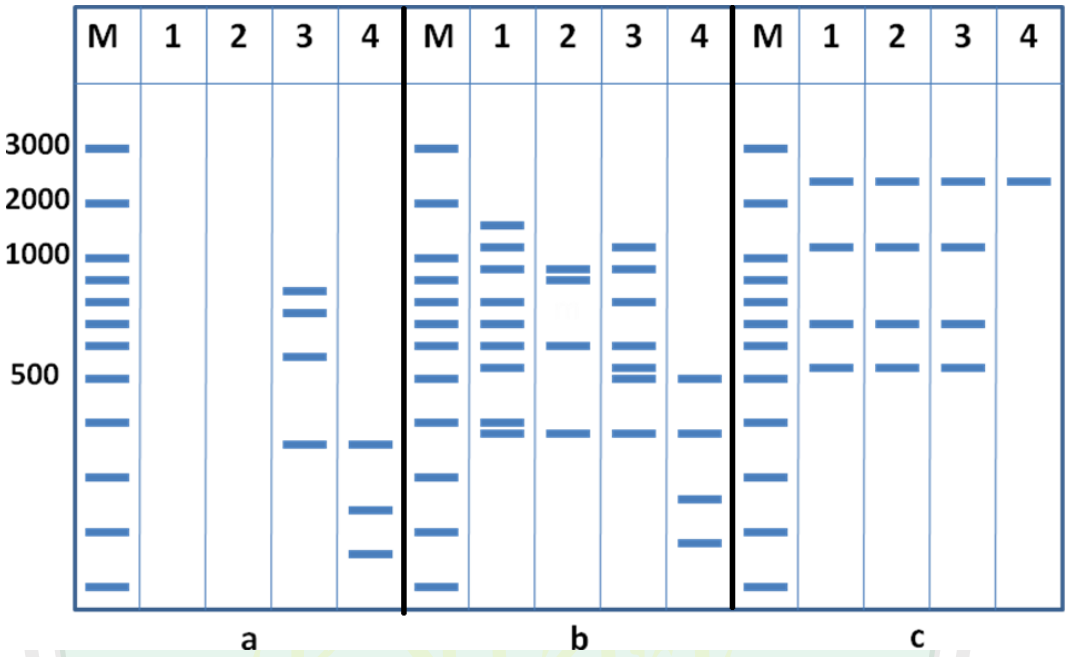
380 bp. Amplifikasi pada sampel 1 (Garifta Merah) menghasilkan 9 pita dengan ukuran 1700 bp, 1200 bp, 950 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 550 bp, 400 bp, dan 380 bp. Pita pada sampel 2 (Gedong Gincu) muncul pada ukuran 950 bp, 900 bp, 600 bp dan 380 bp. Amplifikasi pada sampel 3 (Podang Kuning) menghasilkan 8 pita dengan panjang 1200 bp, 950 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 550 bp, 500 bp dan 380 bp. Amplifikasi pada sampel 4 (Arumanis) menghasilkan 4 pita yaitu 500 bp, 380 bp, 280 bp dan 190 bp.



Gambar 4.11 Hasil amplifikasi DNA dengan primer OPL 17. Keterangan M= marker 100bp, sampel 1 Garifta Merah, sampel 2 Gedong Gincu, sampel 3 Podang Kuning, sampel 4 Arumanis.

Amplifikasi DNA dengan primer OPL 17 menghasilkan 4 pita. Terdapat 1 pita monomorfik dengan panjang 2500 bp yang terdapat pada semua sampel. Tiga pita polimorfik yang dihasilkan memiliki panjang 1100 bp, 700 bp dan 520 bp yang teramplifikasi pada sampel 1 (Garifta Merah), 2 (Gedong Gincu), 3 (Podang

Kuning). Zimogram pita hasil amplifikasi dengan teknik RAPD dapat dilihat pada gambar 4.12.



Gambar 4.12 Zimogram pita hasil amplifikasi RAPD. Keterangan : a. OPA 12, b. OPA 13, c. OPL 17. M= marker 1000bp, sampel 1 Garifta Merah, sampel 2 Gedong Gincu, sampel 3 Podang Kuning, sampel 4 Arumanis.

Berdasarkan zimogram di atas dapat dibandingkan hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan ketiga primer. Primer yang dapat mengamplifikasi DNA pada semua sampel adalah primer OPA 13 dan OPL 17, sedangkan primer OPA 12 hanya dapat mengamplifikasi sampel 3 (Podang Kuning) dan 4 (Arumanis).

Hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer OPA 12 menunjukkan adanya 1 pita yang terdapat pada sampel 3 (Podang Kuning) dan sampel 4 (Arumanis) yang memiliki panjang basa sama yaitu pita 350 bp. Dengan dihasilkannya pita tersebut dapat diketahui bahwa sekuen DNA pada pita yang

teramplifikasi tersebut mengkode sifat yang sama pada sampel 3 (Podang Kuning) dan 4 (Arumanis).

Hasil amplifikasi DNA dengan primer OPA 13 menghasilkan 1 pita monomorfik yaitu pada ukuran 380 bp. Pita tersebut menunjukkan adanya sekuen DNA yang sama yang teramplifikasi pada keempat sampel mangga. Pada sampel 1 (Garifta Merah) dihasilkan 3 pita yang tidak terdapat pada sampel lain, panjang pita tersebut yaitu 1700 bp, 700 bp dan 400 bp. Pada sampel 2 hanya ada 1 pita yang berbeda dengan sampel lain yaitu pita dengan panjang 900 bp. Pada sampel 4 dihasilkan 2 pita yang hanya ada di sampel 4 yaitu pita 190 bp dan 280 bp. Pita yang muncul pada varietas tertentu menunjukkan adanya sekuen DNA genom yang unik dan hanya dimiliki oleh varietas tersebut.

Kemiripan sifat antar varietas dapat diketahui dari banyaknya pita yang sama antar sampel. Pita dengan panjang 1200 bp, 800 bp dan 550 bp hanya terdapat pada sampel 1 dan sampel 3. Pita dengan panjang 500 bp muncul pada sampel 3 dan 4. Produk pita dengan panjang 950 bp dan 600 bp muncul pada sampel 1, 2 dan 3.

Hasil amplifikasi DNA dengan primer OPL 17 menunjukkan sampel 1 (Garifta Merah), 2 (Gedong Gincu) dan 3 (Podang Kuning) menghasilkan 4 pita. Empat pita tersebut memiliki panjang basa sama. Sedangkan sampel 4 (Arumanis) menunjukkan jumlah pita yang berbeda, yaitu hanya terdapat 1 pita dengan panjang 2500 bp.

Pita dengan panjang basa yang berbeda diakibatkan oleh sekuen DNA yang berbeda sehingga ketika mengalami proses translasi akan menghasilkan kode

protein yang berbeda. Sekuen DNA tersebut merupakan informasi genetik yang terdapat di dalam gen struktural yang diekspresikan melalui proses transkripsi dan translasi sehingga menghasilkan asam amino yang terangkai menjadi polipeptida (protein) dengan berbagai fungsi dalam metabolisme. Fenotipe dan proses metabolisme individu ditentukan oleh protein-protein tersebut, sehingga adanya variasi yang nampak pada varietas tersebut adalah merupakan indikasi bervariasinya protein-protein yang dimiliki oleh varietas tersebut (Liu *et. al.* 2006).

Pita hasil amplifikasi dengan panjang basa yang sama menunjukkan lokus gen yang sama. Namun, belum tentu memiliki sekuen basa DNA yang sama. Untuk mengetahui perbedaan sekuen pita pada lokus yang sama perlu dilakukan sekuensing DNA. Karakterisasi sekuen berguna untuk mengetahui jenis gen yang teramplifikasi.

Rangkuman hasil statistik primer RAPD dan persentase polimorfisme dari pita yang dihasilkan dapat dilihat pada tabel 4.10 berikut ini.

Tabel 4.10 Derajat polimorfisme pita hasil amplifikasi dengan primer RAPD

No.	**Primer**	**Total Pita**	**Polimorfik**	**Ukuran pita (bp)**	**Persentase polimorfisme (%)**
1.	OPA 12	6	6	180-850	100
2	OPA 13	13	12	190-1700	92,30
3	OPL 17	4	3	520-2500	75
JUMLAH		23	21	180-2500	
Rata-rata Persentase polimorfisme					91,30 %

Berdasarkan hasil amplifikasi, persentase polimorfisme primer yang digunakan pada penelitian ini mencapai 91, 30%. Persentase ini sangat tinggi karena mendekati 100%. Persentase polimorfisme primer yang digunakan pada

penelitian ini berbeda dengan penelitian Manchekar (2008), karena sampel yang digunakan berbeda. Persentase primer OPA 12, OPA 13 dan OPL 17 pada penelitian ini berturut-turut adalah 100%, 92,30%, 75% sedangkan pada penelitian Manchekar (2008) adalah 71,4%, 16,66%, 66,66%. Dapat disimpulkan bahwa ketiga primer yang digunakan pada penelitian ini sangat bagus untuk analisis variasi genetik mangga.

4.3 Analisis Variasi Genetik Mangga Berdasarkan RAPD

Variasi genetik keempat sampel mangga berdasarkan analisis dengan *software* Popgen ver. 1.32 dapat dilihat pada tabel 4.11.

Tabel 4.11 Statistik variasi genetik untuk semua lokus yang teramplifikasi

Lokus	**na (**alel yang teramati**)**	**Ne (**alel yang efektif)	**h (**variasi genetik Nei's (1973)**)**
OPA 12-1	2	1,6	0.5623
OPA 12-2	2	1,6	0.5623
OPA 12-3	2	1,6	0.5623
OPA 12-4	2	2,0	0.6931
OPA 12-5	2	1,6	0.5623
OPA 12-6	2	1,6	0.5623
OPA 13-1	2	1,6	0.5623
OPA 13-2	2	2	0.6931
OPA 13-3	2	1,6	0.5623
OPA 13-4	2	1,6	0.5623
OPA 13-5	2	2	0.6931
OPA 13-6	2	2	0.6931
OPA 13-7	2	1,6	0.5623
OPA 13-8	2	2	0.6931
OPA 13-9	2	2	0.6931
OPA 13-10	2	1,6	0.5623
OPA 13-11	1	1	0.6931
OPA 13-12	2	1,6	0.5623
OPA 13-13	2	1,6	0.5623
OPL 17-1	1	1	0.6931
OPL 17-2	2	1,6	0.5623
OPL 17-3	2	1,6	0.5623
OPL 17-4	2	1,6	0.5623
Rata-rata	1,9130	1,6522	0,3750
St. Dev	0,2881	0,2711	0,1822

Hasil analisis menunjukkan rata-rata jumlah alel yang teramati pada keempat sampel mangga adalah 1,9130 dan rata-rata jumlah alel efektif adalah 1,6522. Adapun nilai nilai He dari masing-masing lokus adalah 0,5623 dan 0,6931, rata-rata variasi genetik (He) pada keempat sampel adalah 0,3750. Menurut Weising (2005), marker dominan seperti RAPD hanya dapat memproduksi dua alel pada masing-masing lokus. Oleh karena itu, nilai He maksimum adalah 0,5. Dari hasil analisis DNA dalam penelitian ini dapat dikatakan bahwa keragaman genetik keempat varietas mangga tergolong tinggi.

Parameter lain untuk mengetahui variasi genetik adalah jarak genetik. Jarak genetik digunakan untuk menunjukkan seberapa dekat kekerabatan antar genetik empat varietas mangga dilihat dari nilainya (Meisetyani, 2006). Hasil analisis jarak genetik antar varietas dapat dilihat pada tabel 4.12.

Tabel 4.12 Jarak genetik empat varietas mangga

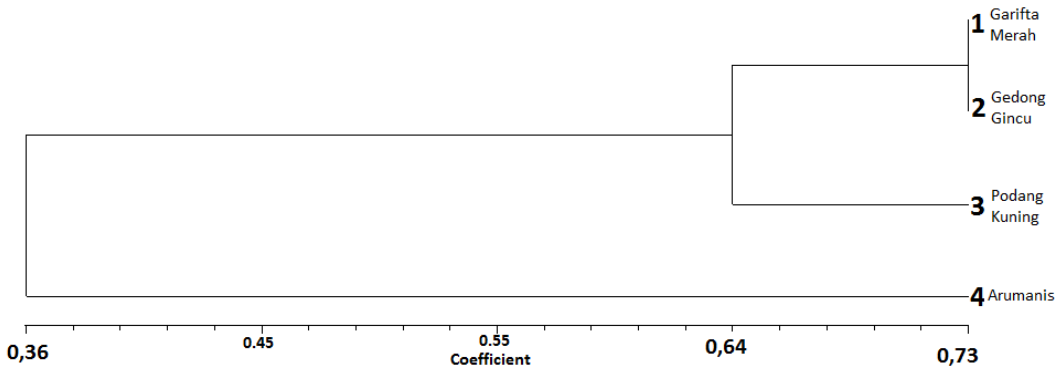
Varietas	**Garifta Merah**	**Gedong Gincu**	**Podang Kuning**	**Arumanis**
Garifta Merah	****			
Gedong Gincu	0,3629	****		
Podang Kuning	0,3629	0,5705	****	
Arumanis	1,3437	0,7376	1,1896	****

Berdasarkan tabel 4.12 jarak genetik empat varietas mangga menunjukkan kisaran antara 0,3629-1,13437. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa jarak genetik antara Garifta Merah dengan Arumanis memiliki jarak genetik terjauh dengan nilai 1,3437. Jarak genetik yang besar ini menandakan bahwa hubungan kekerabatan kedua varietas sangat jauh. Jarak genetik terjauh kedua adalah

Podang Kuning dengan Arumanis yaitu 1,1896. Jarak antara Gedong Gincu dengan Arumanis adalah 0,7378. Jarak antara Gedong Gincu dengan Podang Kuning adalah 0,5705. Sedangkan varietas Garifta merah dengan Gedong Gincu 0,3629. Nilai jarak genetik ini sama dengan nilai jarak genetik antara varietas Garifta Merah dengan Podang Kuning. Jarak genetik yang dekat menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan kedua varietas sangat dekat.

4.4 Hubungan Kekerabatan Mangga Berdasarkan Hasil Amplifikasi dengan Teknik RAPD

Hubungan kekerabatan mangga Garifta Merah, Gedong Gincu, Podang Kuning dan Arumanis ini didasarkan pada hasil amplifikasi primer OPA 12, OPA 13 dan OPL 17. Hubungan kekerabatan antar varietas mangga tersebut dapat diketahui dari koefisien genetiknya. Koefisien genetik terbentang antara 0 sampai 1. Apabila koefisien genetiknya semakin dekat dengan 1 maka varietas tersebut semakin mirip secara genetik, namun apabila koefisien genetiknya mendekati 0 maka varietas tersebut semakin berbeda secara genetik (Pratiwi, 2012). Hasil analisis dengan *software* NTSYS disajikan dalam bentuk dendogram (gambar 4.13).



Gambar 4.13 Dendogram hubungan kekerabatan mangga berdasarkan RAPD.

Dendogram pada gambar 4.13 memperlihatkan bahwa sampel 1 (Garifta Merah) berkerabat dekat dengan sampel 2 (Gedong Gincu). Kemiripan varietas tersebut terletak pada koefisien 0,73. Sampel 3 Podang Kuning memiliki koefisien genetik 0,64 dengan sampel 1 (Garifta Merah) dan sampel 2 (Gedong Gincu). Sedangkan Arumanis memiliki kondisi genetik yang jauh berbeda dengan varietas lainnya. Koefisien kemiripan genetik Arumanis dengan varietas lainnya hanya 0,36.

Hubungan kekerabatan berdasarkan dendogram di atas sesuai dengan warna kulit buah mangga pada masing-masing varietas. Garifta Merah berkerabat dekat dengan Gedong Gincu, hal ini dapat dilihat dari fenotipe buah tersebut yang mirip dibandingkan dengan sampel lainnya. Buah mangga Garifta Merah berwarna merah pada pangkalnya dan kuning pada ujungnya, sedangkan mangga Gedong Gincu berwarna oranye gelap namun dapat berwarna merah ketika telah masak.

Podang Kuning memiliki warna kulit buah kuning namun terdapat sirat kemerahan. Warna kulit buah Podang Kuning ini mendekati warna Garifta Merah dengan Gedong Gincu apabila dibandingkan dengan warna kulit buah Arumanis. Podang Kuning memiliki koefisien kemiripan yang cukup besar yaitu 0,64 dengan mangga Garifta Merah dan Gedong Gincu.

Buah mangga varietas Arumanis secara morfologi merupakan sampel yang paling berbeda dengan varietas mangga lainnya karena warna kulit buahnya hijau. koefisien kemiripannya hanya 0,36 dengan varietas mangga lainnya. Buah mangga Arumanis berwarna hijau dan ketika masak berwarna agak kekuningan.

Rasa daging buahnya manis, sedangkan rasa daging buah varietas lainnya manis segar.

Varietas Arumanis berkerabat sangat jauh dengan Garifta Merah, selain dikarenakan berbeda secara morfologi juga dikarenakan asal mangga yang berbeda. Garifta Merah merupakan mangga introduksi dari Taiwan sedangkan Arumanis merupakan mangga asli Indonesia dari Probolinggo. Namun, pengelompokan berdasarkan asal varietas buah tidak sepenuhnya sesuai. Mangga Gedong Gincu yang berasal dari Majalengka, Jawa Barat ternyata berkerabat dekat dengan Garifta Merah dari Taiwan. Sedangkan mangga Arumanis dengan Podang Kuning yang berasal dari Kediri berkerabat cukup jauh dengan koefisien kemiripan 0,36 padahal kedua varietas tersebut sama-sama berasal dari Jawa Timur.

Hasil analisis variasi genetik dengan teknik RAPD yang menunjukkan kekerabatan antar varietas mangga sesuai dengan warna kulit buah mangga. Keterkaitan primer RAPD yang digunakan pada penelitian ini dengan gen penyandi warna buah (beta karoten) didukung dengan hasil dendogram yang mengelompok berdasarkan warna kulit buahnya. Namun, Primer RAPD merupakan primer umum yang masih belum bisa secara pasti digunakan untuk menyeleksi mangga berdasarkan warna kulit buahnya. Oleh karena itu, hal analisis variasi genetik masih perlu diklarifikasi dengan menggunakan penanda molekuler gen spesifik yang berperan langsung terhadap warna buah.

Karakteristik buah yang berbeda termasuk warna kulit buah mangga merupakan bukti kekuasaan Allah dan kesempurnaan ilmuNya seperti yang telah difirmankan dalam al-Qur'an surat Ar-Ra'd ayat 4 :

وَفِي ٱلۡأَرۡضِ قِطَعٞ مُّتَجَٰوِرَٰتٞ وَجَنَّٰتٞ مِّنۡ أَعۡنَٰبٖ وَزَرۡعٞ وَنَخِيلٞ صِنۡوَانٞ وَغَيۡرُ صِنۡوَانٖ يُسۡقَىٰ بِمَآءٖ وَٰحِدٖ

وَنُفَضِّلُ بَعۡضَهَا عَلَىٰ بَعۡضٖ فِي ٱلۡأُكُلِۚ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَأٓيَٰتٖ لِّقَوۡمٖ يَعۡقِلُونَ 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 sebagian tanam-tanaman itu atas sebagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir.

Kata متجورات pada ayat tersebut bermakna 'berdampingan' menunjukkan lahan yang saling berdampingan satu sama lain. Lahan di bumi ada yang subur dan ada pula yang tandus, ada yang produktif dan ada pula yang mati. Di bumi yang subur terdapat kebun-kebun dengan berbagai macam buah-buahan. Dalam ayat ini dicontohkan anggur (اعناب) dan korma (نخيل). Kata يسقى بماء واحد yang artinya disirami dengan air yang sama menunjukkan tanaman buah-buahan itu terletak di satu tempat dan hidup dari satu sumber mata air. Namun buah-buahan tersebut memiliki rasa yang berbeda-beda, hal ini ditunjukkan dengan kata ونفضل yang artinya 'Kami melebihkan' menunjukkan kesengajaan Allah untuk melebihkan rasa (الاكل) sebagian tanaman dari tanaman lain. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda bagi kaum yang berfikir. Kata berfikir dalam ayat ini ditunjukkan dengan يعقلون yaitu orang yang menggunakan akalnya (al-Qarni, 2008).

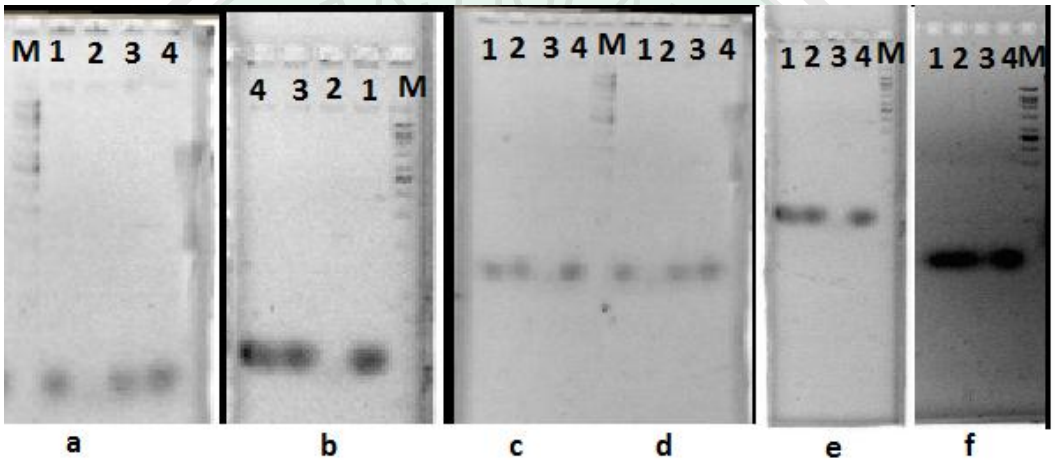
Abdullah (2005) menjelaskan perbedaan dalam jenis buah-buahan dan tanaman itu dari segi bentuk, warna, rasa, bau daun dan bunganya. Ada yang sangat manis, ada yang sangat asam, sangat pahit, sepet, segar, dan ada yang bermacam-macam atau bercampur rasanya. kemudian ada yang berubah rasa dengan izin Allah. Ada yang berwarna kuning, merah, putih, hitam, biru dan lain-lain. Demikian juga dengan beraneka macamnya warna bunga padahal semuanya berasal dari satu zat alam yang sama yaitu air, tetapi menghasilkan tumbuh-tumbuhan dan buah yang beraneka macam warna dan rasa yang tidak terhitung. Sesungguhnya dalam hal-hal seperti itu, terdapat tanda-tanda kebesaran Allah bagi orang yang menyadarinya.

Fenotipe makhluk hidup ditentukan oleh gen dan lingkungan. Gen adalah segmen DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) yang memprogram sifat-sifat khusus suatu makhluk hidup. Makhluk hidup yang secara genetik berbeda mengekspresikan sifat yang berbeda meskipun terletak pada kondisi lingkungan yang sama (Campbell, *et. al,* 2002). Secara tersirat, kandungan QS. Ar-Ra'du ayat 4 menunjukkan bahwa selain lingkungan, faktor yang menyebabkan variasi fenotipe pada tumbuh-tumbuhan adalah faktor dari dalam yaitu faktor genetik.

Kandungan surat ar-Ra'du ayat 4 menegaskan kepada umat manusia tentang keutamaan berfikir terhadap ayat-ayat kauniyah. Keutamaan akal untuk mencari petunjuk agar dapat mengetahui kebenaran dan mengikutinya (al-Jazairi, 2007). Keanekaragaman warna dan kandungan beta karoten buah mangga tentu tidak akan terjadi kecuali atas kekuasaan Allah. Keanekaragaman tersebut merupakan tanda yang nyata tentang kekuasaan Allah untuk orang yang berpikir.

4.5 Amplifikasi Gen PSY dengan Menggunakan Primer 1

Primer 1 yang digunakan untuk mengamplifikasi gen PSY didesain dari gen PSY Mangga Jinhuang dari Cina (kode akses NCBI. JQ277716.1). Amplifikasi gen target dari kodon start AUG. Panjang pita hasil amplifikasi 1280 bp. Hasil amplifikasi dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 2 % dapat dilihat pada gambar 4.14



Gambar 4.14 Hasil amplifikasi gen PSY dengan menggunakan primer 1. (a) suhu *annealing* 50^{o}C, (b) suhu *annealing* 51^{o}C, (c) suhu *annealing* 52^{o}C, (d) suhu *annealing* 53^{o}C, (e) suhu *annealing* 54^{o}C, (f) suhu *annealing* 55^{o}C. Keterangan M= Marker 1 kb. Sampel 1 Garifta Merah, sampel 2 Gedong Gincu, sampel 3 Podang Kuning dan sampel 4 Arumanis.

Hasil elektroforesis gambar 4.14 menunjukkan bahwa tidak ada pita yang teramplifikasi dengan primer 1 pada setiap suhu *annealing* yang dicoba. Noda hitam di bagian bawah kemungkinan adalah sisa primer yang tidak terpakai saat proses PCR. Fatchiyah (2009) menyatakan bahwa suhu *annealing* dan primer yang tidak sesuai dapat menyebabkan DNA target tidak teramplifikasi. Suhu *annealing* yang digunakan pada proses amplifikasi ini berdasarkan perhitungan primer yang didesain dan suhu *annealing* yang direkomendasikan oleh pabrik

pembuat primer yaitu antara 50-55ºC. Namun, ternyata masih belum bisa teramplifikasi. Sehingga kemungkinan penyebab ketidakberhasilan amplifikasi bukanlah suhu *annealing*.

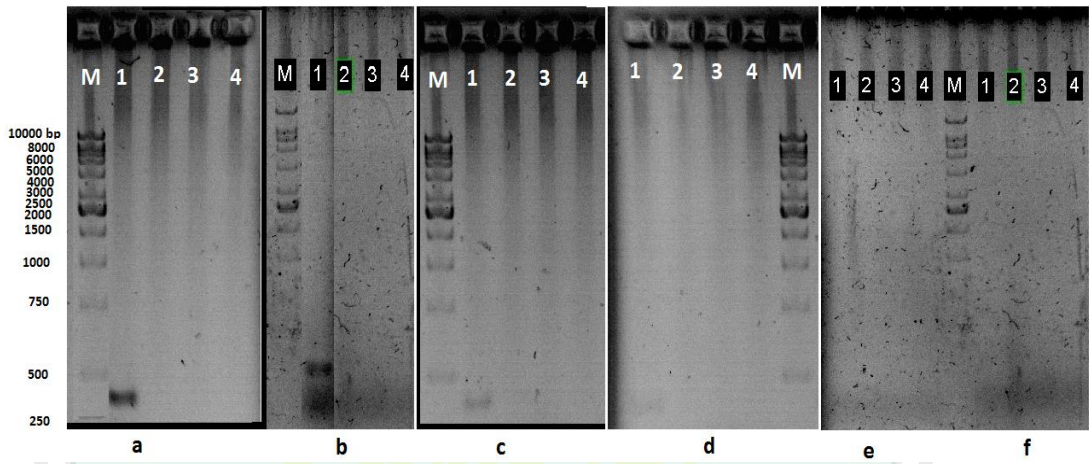
Penyebab ketidakberhasilan amplifikasi gen PSY pada penelitian ini kemungkinan disebabkan karena PCR *mix* yang kurang sesuai. PCR *mix* yang digunakan pada amplifikasi gen PSY berupa PCR *mix* instan yang siap pakai. Kemungkinan lain penyebab ketidakberhasilan amplifikasi gen PSY adalah sampel DNA genom yang kurang murni. Primer spesifik seperti primer gen PSY membutuhkan DNA template yang sangat murni, berbeda dengan primer RAPD yang tidak membutuhkan kemurnian DNA cetakan yang tinggi (Liu, *et. al.*2006).

Faktor lain yang menyebabkan ketidakberhasilan proses amplifikasi dalam penelitian ini adalah ketidaksesuaian primer dengan sampel. Yuwono (2006) menyebutkan bahwa pada saat tahap *annealing*, primer akan menempel pada untaian DNA yang telah terpisah menjadi untai tunggal. Primer tersebut akan membentuk jembatan hidrogen dengan untaian DNA pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Sekuen primer 1 yang didesain dari gen PSY mangga Jinhuang Cina kemungkinan memiliki sekuen yang berbeda dengan sekuen gen PSY sampel mangga Indonesia. Akibatnya primer 1 tidak dapat menempel pada DNA target. Berdasarkan hasil tersebut, maka diperlukan primer lain untuk mengamplifikasi gen PSY mangga.

4.6 Amplifikasi gen PSY Menggunakan Primer 2

Primer 2 didesain dari gen PSY mangga Jinhuang Cina (kode akses NCBI. JQ277716.1) pada daerah sekuen yang terkonservasi dengan gen PSY tanaman

lain yang ada di *gene bank*. Daerah sekuen yang dipilih untuk mendesain primer ini merupakan sekuen yang dipertahankan tetap (*conserve*) atau sama pada beberapa spesies tanaman seperti pada *Citrus sp.*, *Glycine max*, dan *Medicago truncatula*. Panjang pita hasil amplifikasi berdasarkan desain primer adalah 622 bp. Hasil amplifikasi gen PSY mangga menggunakan primer 2 dengan optimasi suhu *annealing* antara 50-55^{o} C dapat dilihat pada gambar 4.15 berikut ini.



Gambar 4.15 Hasil amplifikasi gen PSY dengan menggunakan primer 2. (a) suhu *annealing* 50,5^{o}C, (b) suhu *annealing* 51,5^{o}C, (c) suhu *annealing* 52,5^{o}C, (d) suhu *annealing* 53,5^{o}C, (e) suhu *annealing* 54,5^{o}C, (f) suhu *annealing* 55,5^{o}C. Keterangan M=Marker 1 kb. Sampel 1 Garifta Merah, sampel 2 Gedong Gincu, sampel 3 Podang Kuning dan sampel 4 Arumanis.

Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa sampel yang dapat teramplifikasi adalah sampel 1 (Garifta Merah) menghasilkan pita dengan panjang 400 bp. Hasil optimasi suhu *annealing* menunjukkan bahwa suhu yang dapat digunakan untuk amplifikasi gen PSY dengan primer 2 adalah suhu 50,5^{o}C, 51,5^{o}C, 52,5^{o}C dan 53,5^{o}C. Sedangkan pada suhu 54,5 ^{o}C dan 55,5 ^{o}C tidak dihasilkan pita. Suhu yang dapat menghasilkan pita paling jelas adalah suhu 50,5 ^{o}C . Hasil optimasi suhu *annealing* ini 5^{o}C di bawah perhitungan. Namun, sesuai dengan rekomendasi

suhu *annealing* dari pabrik primer. Fatchiyah (2011) menjelaskan bahwa suhu *annealing* biasanya 5^{o}C di bawah T_m primer yang sebenarnya. Secara praktis, T_m dipengaruhi oleh komponen buffer, konsentrasi primer dan cetakan DNA. Amplifikasi pada suhu *annealing* sekitar 55^{o}C akan dihasilkan produk amplifikasi yang memiliki spesifisitas tinggi.

Terdapat 1 pita yang muncul menunjukkan adanya 1 lokus gen yang teramplifikasi pada sampel 1 (Garifta Merah). Panjang pita amplikon mendekati 500 pasang basa. Hasil amplifikasi ini lebih pendek dari target produk yang sudah didesain. Belum bisa dipastikan bahwa yang teramplifikasi tersebut adalah gen PSY karena produk amplifikasi tidak sesuai dengan yang didesain.

Terdapat beberapa faktor yang menyebabkan tidak berhasilnya amplifikasi PCR yaitu komposisi PCR (kerusakan pada enzim Taq Polimerase), suhu *annealing*, primer yang tidak sesuai dan kualitas DNA genom yang buruk. Kualitas genom yang kurang baik bisa jadi penyebab ketidakberhasilan amplifikasi DNA. Meskipun sampel DNA genom bisa diamplifikasi dengan primer RAPD, namun belum tentu bisa diamplifikasi dengan primer yang lebih spesifik. Karena primer RAPD tidak membutuhkan kualitas DNA genom yang sangat baik, sedangkan primer yang lebih spesifik memerlukan kualitas DNA yang sangat murni (Liu *et. al.* 2006).

Faktor komposisi PCR dan suhu *annealing* kemungkinan bukan penyebab ketidakberhasilan amplifikasi sampel 2 (Gedong Gincu), sampel 3 (Podang Kuning) dan sampel 4 (Arumanis). Hal ini dikarenakan dengan komposisi PCR dan suhu *annealing* yang sama, ternyata sampel 1 (Garifta Merah) dapat

teramplifikasi. Kemungkinan lain penyebab ketidakberhasilan amplifikasi gen PSY pada sampel-sampel tersebut adalah sekuen primer yang tidak sesuai dengan DNA cetakan sampel.

Enzim PSY memiliki domain Trans-IPPS-HH yang mengandung sisi aktif PSY dan asam amino yang berinteraksi dengan substrat GGDP dan kofaktor kation. Dua tipe domain Trans-IPP-HH yang telah diketahui yaitu domain Trans-IPP-HH pada Psy 1 disebut SQS-PSY1 (*squalene/ phytoene synthase signatures 1*) yang bertanggung jawab dalam biosintesis beta karoten di daun dan domain Trans-IPP-HH Psy 2 disebut SQS-PSY2 (*squalene/ phytoene synthase signatures 2*) yang bertanggung jawab dalam biosintesis beta karoten di buah berturut-turut terdiri atas 16 dan 26 asam amino. Analisis SQS PSY pada buah pisang membuktikan bahwa seluruh sekuen SQS-PSY1 konserve, sedangkan SQS-PSY2 tidak memiliki sekuen konserv yang tinggi seperti pada SQS-PSY1 (Mlalazi, 2010). Meskipun gen PSY mangga sampai saat ini masih belum dikarakterisasi, kemungkinan struktur sekuen gennya tidak jauh berbeda dengan tanaman lain. Karena sekuen PSY 2 memiliki sekuen konserve yang rendah kemungkinan hal inilah yang menyebabkan sulitnya mendesain primer pada gen PSY2.

Regulasi molekuler di dalam sel berawal dari gen yang menghasilkan protein dan mempengaruhi metabolisme hingga mengekspresikan fenotipe adalah bukti kekuasaan Allah. Ilmu Allah meliputi segala sesuatu yang kecil maupun yang besar seperti yang tertulis dalam surat al-Qamar ayat 53:

وَكُلُّ صَغِيرٍ وَكَبِيرٍ مُّسْتَطَرٌ ﴿٥٣﴾

Artinya : *Dan segala (urusan) yang kecil maupun yang besar (semuanya) adalah tertulis.*

Kata مستطر yang artinya tertulis bermakna telah ditakdirkan oleh Allah. Allah telah mengatur segala urusan yang ada di langit maupun di bumi baik itu yang kecil(صغير) maupun yang besar (كبير). Kata kecil (صغير) disebutkan terlebih dahulu sebelum kata besar (كبير) menunjukkan bahwa urusan yang kecil adalah penting karena sesuatu hal yang besar berawal dari hal kecil (al-Qarni, 2008). Allah menciptakan keteraturan pada hal yang kecil seperti gen hingga menghasilkan suatu fenotipe. Keteraturan yang terjadi dalam kehidupan telah ditetapkan Allah sebelum makhluk hidup itu diciptakan. Seperti yang telah dijelaskan dalam Surat al-Qamar ayat 49.

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَٰهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya : *Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran.*

Allah menetapkan suatu ukuran dan memberikan petunjuk terhadap semua makhluk kepada ketetapan tersebut. Tidak ada sesuatupun yang terjadi di alam semesta ini yang telah diketahui oleh ilmu Allah yang Maha Sempurna sebelum terjadinya sesuatu itu. Allah menciptakan sesuatu dan menentukan ukurannya sesuai ketetapan-Nya. Dengan mempelajari ilmu Allah, kita bisa mengetahui bagaimana sunnatullah itu terjadi (Abdullah, 2005).

Informasi mengenai gen PSY yang berperan dalam kandungan beta karoten buah mangga sangat penting untuk proses pemuliaan tanaman mangga. Informasi tersebut dapat membantu pengembangan marka molekuler spesifik yang dapat digunakan dalam penyeleksian tanaman untuk memperoleh tanaman mangga yang

mengandung beta karoten tinggi. Selain itu, informasi mengenai struktur dan sekuen gen PSY mangga dapat dimanfaatkan untuk mempelajari lebih dalam tentang regulasi biosintesis beta karoten pada buah mangga.

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM
PUSAT PERPUSTAKAAN