

**SEKUEN GEN *rbcL* SEBAGAI BARCODE DNA DALAM MENENTUKAN
VARIASI GENETIK KLON MANGGA MADU (*Mangifera indica* L. cv.
Madu)**

SKRIPSI

Oleh :
PRISELA NADILA PUTRI
NIM. 17620035



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**SEKUEN GEN *rbcL* SEBAGAI BARCODE DNA DALAM MENENTUKAN
VARIASI GENETIK KLON MANGGA MADU (*Mangifera indica* L. cv.
Madu)**

SKRIPSI

**Oleh:
PRISELA NADILA PUTRI
NIM. 17620035**

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

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

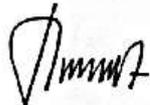
**SEKUEN GEN *rbcL* SEBAGAI BARCODE DNA DALAM MENENTUKAN
VARIASI GENETIK KLON MANGGA MADU (*Mangifera indica* L. cv.
Madu)**

SKRIPSI

**Oleh:
Prisela Nadila Putri
NIM. 17620035**

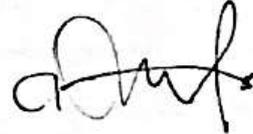
**Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji:
Tanggal 4 Oktober 2021**

Pembimbing I



**Didik Wahyudi, M. Si
NIP. 19860102 201801 1 001**

Pembimbing II



**Oky Bagas Prasetyo, M.PdI
NIDT. 19890113 20180201 1 244**

**Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang**



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

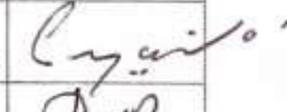
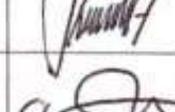
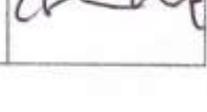
**SEKUEN GEN *rbcL* SEBAGAI BARCODE DNA DALAM
MENENTUKAN VARIASI GENETIK KLON MANGGA MADU
(*Mangifera indica* L. cv. Madu)**

SKRIPSI

**Oleh:
PRISELA NADILA PUTRI
NIM. 17620035**

telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
(S.Si.)

Tanggal: 17 November 2021

Ketua Penguji	Dr. Evika Sandi Savitri, M.P. NIP. 19710622 200312 1 002	
Anggota Penguji 1	Suyono, M.P. NIP. 19790123 2016080 1 2063	
Anggota Penguji 2	Didik Wahyudi, M.Si. NIP. 19860102 201801 1 001	
Anggota Penguji 3	Okny Bagas Prasetyo, M.Pd.I NIDT. 19890113 20180201 1 244	

Mengesahkan,
Ketua Program Studi Biologi
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang


Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.
19741018 200312 2 002



HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini dipersembahkan kepada orang-orang hebat yang telah memberikan dukungan dan motivasi penulis dalam menyusun skripsi ini, khususnya kepada:

1. Kedua orangtua dan kakak yang penulis cintai dan sayangi, Bapak Mukarnan, Ibu Supriyatin dan Mas Huda. Terimakasih telah mendidik, mendo'akan dan memotivasi penulis demi kelancaran dan kesuksesan dalam setiap usaha.
2. Kholifah Holil, M.Si, selaku dosen wali yang telah membimbing penulis mulai dari awal perkuliahan sampai menyelesaikan studi ini.
3. Didik Wahyudi, M.Si, selaku dosen pembimbing skripsi yang telah meluangkan banyak waktu, tenaga, serta ilmu yang bermanfaat untuk membimbing penulis dengan penuh kesabaran, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
4. Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I, selaku dosen pembimbing agama yang telah membimbing penulis terkait integrasi sains dan islam.
5. Ir. Karsinah, M.Si, selaku pembimbing lapang yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.
6. Pak Canto, selaku petugas Kebun Percobaan Cukurgondang yang selalu menemani saya dan teman-teman untuk mengambil sampel penelitian.
7. Teman-teman Tim Keakerabatan 2021, Nensy, Novita, Zahro dan Waladin yang selalu memberi dukungan dan membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian hingga selesai.
8. Mentor sekaligus kakak tingkat, Mbak Farah Nahdia Noor, yang telah banyak membantu dalam penyusunan skripsi ini.
9. Sahabat-sahabat tercinta, Crisita, Ria, Alfia, Victor, Putri, Dinda, Maya, Retha, Darsla, Alfian yang selalu mendukung dan memberi semangat kepada penulis untuk segera menyelesaikan tugas akhir
10. Teman-teman Wolves Biologi 2017 dan Squirrel B 2017, yang telah menemani selama proses menempuh S1. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang telah membantu penyelesaian tugas akhir ini.

Atas dukungan, semangat, dan motivasinya semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis. Aamiin.

MOTTO

*Jiwa yang dihiasi dengan keimanan akan lebih bercahaya daripada jiwa yang
dihiasi dengan emas dan intan berlian*

*Allah does not charge a soul except (with that within) its capacity
(Al-Baqarah : 286)*

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Prisela Nadila Putri
NIM : 17620035
Program Studi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Sekuen Gen *rbcL* sebagai Barcode DNA dalam Menentukan Variasi Genetik Klon Mangga Madu (*Mangifera indica* L. cv. Madu)

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

Malang, 30 September 2021
yang membuat pernyataan



Prisela Nadila Putri
NIM. 17620035

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

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

SEKUEN GEN *rbcL* SEBAGAI BARCODE DNA DALAM MENENTUKAN VARIASI GENETIK KLON MANGGA MADU (*Mangifera indica* L. cv. Madu)

Prisela Nadila Putri, Didik Wahyudi, Oky Bagas Prasetyo

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Mangga (*Mangifera indica* L.) merupakan tanaman buah tropis dan sub tropis yang memiliki keanekaragaman tinggi pada tingkat intraspesifik. Salah satu kebun buah mangga terbesar adalah Kebun Percobaan Cukurgondang, Pasuruan, Jawa Timur yang memiliki 298 klon dan 1.568 pohon mangga. Terdapat klon yang belum teridentifikasi dengan baik yaitu klon mangga madu, sehingga menghambat proses sertifikasi varietas. Kepastian klasifikasi tersebut berguna untuk monitoring plasma nutfah, sertifikasi, dan budidaya tanaman buah. Oleh karena itu, klon mangga madu perlu dikarakterisasi dan dievaluasi untuk mengetahui informasi variasi genetik, kekerabatan antar klon, dan laju evolusinya. Karakterisasi morfologi banyak dilakukan untuk identifikasi klon mangga. Namun, beberapa klon mangga sulit diidentifikasi menggunakan karakter morfologi, sehingga diperlukan dukungan data berupa penanda molekuler, seperti DNA barcode. DNA barcode yang digunakan dalam studi variasi genetik mangga madu ini adalah gen *rbcL*. Sebanyak 11 sampel klon mangga dianalisis secara morfologi dan molekuler, yang terdiri dari 8 klon mangga madu sebagai *in-group* dan 3 klon mangga kuweni sebagai *out-group*. Klon mangga madu mengelompok menjadi 4 cluster dan 1 cluster *out-group* berdasarkan analisis karakter morfologi. Namun, hasil berbeda ditunjukkan pada analisis molekuler. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan gen *rbcL* menunjukkan bahwa sebelas klon mangga mengelompok menjadi 4 clade. Hasil analisis data evolusi menunjukkan bahwa perpecahan antar genus *Mangifera* terjadi pada zaman Miocene (8,6 Mya). Awal dari banyaknya diversifikasi klon mangga terjadi pada Pliocene dan terus berlangsung hingga Pleistocene (6,3 Mya – 0,7 Mya).

Kata kunci : *gen rbcL*, *klon mangga madu*, *variasi genetik*

***RbcL* GENE SEQUENCE AS A DNA BARCODE TO DETERMINE
GENETIC VARIATIONS OF MADU MANGO CLONE (*Mangifera indica*
L. cv. Madu)**

Prisela Nadila Putri, Didik Wahyudi, Oky Bagas Prasetyo

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Universitas Islam
Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

Mango (*Mangifera indica* L.) is a tropical and sub-tropical fruit plant that has high diversity at intraspecific level. One of the largest mango garden is the Cukurgondang Experimental Garden, Pasuruan, East Java, which has 298 clones and 1,568 mango trees. Some clones have not been identified properly, namely madu mango clones, thus hampering the variety certification process. Certainty of the classification is useful for monitoring germplasm, certification, and cultivation of fruit crops. Therefore, madu mango clones need to be characterized and evaluated to find out information on genetic variation, the kinship between clones, and their evolutionary rate. Morphological characterization is mostly done for the identification of mango clones. However, some mango clones are difficult to identify using morphological characters, so data support is needed in the form of molecular markers, such as DNA barcodes. The DNA barcode used in the study is *rbcL* gene. A total of 11 mango clone samples were analyzed morphologically and molecularly, consisting of 8 madu mango clones as in-group and 3 kuweni mango clones as out-group. Madu mango clones were grouped into 4 clusters and 1 out-group cluster based on morphological character analysis. However, different results were shown on molecular analysis. The results of phylogenetic tree reconstruction based on *rbcL* gene showed that eleven mango clones were grouped into 4 clades. The results of the analysis of evolutionary data show that separation between genus *Mangifera* occurred in the Miocene epoch (8.6 Mya). Mango clones diversifications occurred a lot in Pliocene epoch and continued into the Pleistocene (6.3 Mya – 0.7 Mya).

Keywords : genetic variation, madu mango clone, *rbcL* gene

تسلسل جينة *rbcL* كالباركود للحمض النووي في تحديد التنوع الوراثي لاستنساخ مانجو العسل (*Mangifera indica* L. cv. Madu)

فريسلا نديلة فوتري ، ديديك واهيودي ، أوكي باجاس براسيتيو

قسم علم الإحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية
الحكومية مالانج

مستخلص البحث

المانجو (*Mangifera indica* L.) هو نبات الفاكهة الاستوائية والشبه الاستوائي لديه تنوع عالي على المستوى غير المحدد. إحدى من أكبر بساتين المانجو هي الحديقة التجريبية *Cukurgondang*، باسوروان، جاوى الشرقية، والتي يستحق 298 استنساخ و 1568 شجرة مانجو. هناك استنساخ لم يتعرف كاملاً، وهي استنساخ مانجو مادو، حتى يعيق عملية تصديق المنوعات. حق التصنيف مفيد لرصد المصل الوراثي والتصديق وزراعة محاصيل الفاكهة. لذلك، يجب توصيف استنساخ مانجو مادو وتقييمه لمعرفة المعلومات عن التنوع الوراثي، والقرابة بين الاستنساخات، ومعدل التطور. يعقد التوصيف المورفولوجي لتحديد استنساخ المانجو. لكن بعض استنساخات المانجو صعبة في تحديدها باستخدام الصفة المورفولوجية، لذلك يحتاج دعم البيانات في شكل العلامات الجزيئية، مثل الباركود للحمض النووي. الباركود للحمض النووي المستخدم في دراسة التنوع الوراثي لمانجو مادو هو جينة *rbcL*. تحلل 11 عينة من استنساخ المانجو مورفولوجياً وجزيئياً، تتكون من 8 استنساخات من مانجو مادو كمجموعة داخلية و 3 استنساخات من مانجو كووين كمجموعة خارجية. يجمع استنساخ مانجو مادو في 4 مجموعات و 1 مجموعة خارجية بناءً على تحليل الصفة المورفولوجية. لكن، تظهر نتائج مختلفة في التحليل الجزيئي. أظهرت نتائج إعادة تأسيس شجرة التطوير بناءً على جينة *rbcL* أن تم تجميع 11 استنساخاً للمانجو في 4 مجموعات. تظهر نتائج تحليل البيانات التطورية أن الانقسام بين جنس مانجيفيرا حدث في العصر الميوسيني (8.6 ميا). حدثت بداية العديد من التنوعات في استنساخ المانجو في العصر البليوسيني واستمرت في العصر الجليدي (6.3 ميا - 7.0 ميا).

الكلمات المفتاحية: الجينة *rbcL*، التنوع الوراثي، استنساخ مانجو مادو

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik, sebagai syarat kelulusan di Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri M.P., selaku Ketua Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Didik Wahyudi, M.Si., selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.
5. Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I., selaku dosen pembimbing agama yang telah banyak memberikan bimbingan terkait integrasi sains dan islam.
6. Ir. Karsinah, M.Si, selaku pembimbing lapang yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.
7. Kholifah Holil, M.Si, selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan kepada penulis dari awal hingga akhir studi.
8. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P. dan Suyono, M.P., selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi.

Malang, Oktober 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	v
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vi
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
مستخلص البحث.....	x
KATA PENGANTAR.....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan	8
1.4 Manfaat	8
1.5 Batasan Masalah	9
BAB II KAJIAN PUSTAKA	10
2.1 Botani Mangga Madu	10
2.1.1 Taksonomi dan Morfologi Klon Mangga Madu.....	10
2.1.2 Habitat dan Distribusi Mangga Madu.....	17
2.1.3 Manfaat Mangga (<i>Mangifera indica</i> L.).....	18
2.2 Variasi Genetik	19
2.3 Keekerabatan Tumbuhan	20
2.4 Barcode DNA	21
2.5 Gen <i>rbcL</i>	22
2.6 Analisis Filogenetik	24
BAB III METODE PENELITIAN	28
3.1 Rancangan Penelitian	28
3.2 Waktu dan Tempat	28
3.3 Alat dan Bahan	28
3.3.1 Alat	28
3.3.2 Bahan	29
3.4 Prosedur Penelitian	29
3.4.1 Karakterisasi Morfologi dan Pengambilan Sampel	29
3.4.2 Karakterisasi Molekuler.....	31
3.4.2.1 Isolasi DNA	31
3.4.2.2 Uji Kualitatif DNA	32
3.4.2.3 Amplifikasi dan Sequencing Gen <i>rbcL</i>	33

3.5 Analisis Data	34
3.5.1 Analisis Variasi Morfologi	34
3.5.2 Analisis Sekuen dan Variasi Genetik	34
3.5.3 Analisis Hubungan Kekerbatan dan Estimasi Waktu Divergensi	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Karakterisasi Klon Mangga Madu Berdasarkan Karakter Morfologi	36
4.1.1 Hasil Karakterisasi Morfologi Klon Mangga Madu	36
4.1.2 Pengelompokan dan Nilai Similaritas Klon Mangga Madu	40
4.2 Karakterisasi Klon Mangga Madu Berdasarkan Gen <i>rbcL</i>	46
4.2.1 Analisis Hasil Amplifikasi	46
4.2.2 Analisis Hasil Sekuensing	47
4.2.3 Variasi Genetik Klon Mangga Madu.....	48
4.2.4 Hubungan Kekerbatan Klon Mangga Madu	56
4.3 Estimasi Waktu Divergensi Klon Mangga Madu	59
BAB V PENUTUP	63
5.1 Kesimpulan	63
5.2 Saran	64
DAFTAR PUSTAKA	65
LAMPIRAN	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Morfologi pohon mangga madu.....	11
2.2. Morfologi daun mangga madu.....	12
2.3. Variasi warna daun muda mangga madu.....	13
2.4. Susunan perbungaan pada mangga madu.....	14
2.5. Kenampakan buah mangga madu.....	17
2.6. Diagram yang menunjukkan posisi urutan gen <i>rbcL</i>	24
4.1. Fenogram klon mangga madu berdasarkan karakter morfologi menggunakan indeks similaritas Bray-curtis.....	41
4.2. Karakter seragam pada cluster I.....	42
4.3. Karakter seragam pada cluster II.....	42
4.4. Karakter seragam pada cluster III.....	42
4.5. Karakter pembeda pada cluster IV.....	43
4.6. Karakter seragam pada cluster V.....	44
4.7. Visualisasi hasil amplifikasi menggunakan primer <i>rbcL</i> 1 dan 2.....	47
4.8. Jarak genetik 11 klon mangga.....	55
4.9. Distribusi haplotipe 11 klon mangga.....	56
4.10. Rekonstruksi pohon filogenetik dengan metode <i>Neighbor-joining</i>	58
4.11. Rekonstruksi pohon filogenetik dengan metode <i>Maximum Parsimony</i>	58
4.12. Pohon filogenetik estimasi waktu divergensi dari 11 klon mangga.....	62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Daftar karakter morfologi mangga yang diamati	30
3.2 Daftar nama klon mangga koleksi dari IP2TP Cukurgondang	31
4.1 Koefisien similaritas klon mangga berdasarkan karakter morfologi	45
4.2 Hasil BLAST sekuen <i>rbcL</i> dari 11 klon mangga.....	50
4.3 Komposisi basa nukleotida sekuen <i>rbcL</i> dari 11 klon mangga.....	52
4.4 Variasi singletone sekuen <i>rbcL</i> dari 11 klon mangga.....	54
4.5 Estimasi waktu divergen 11 klon mangga	61

DAFTAR LAMPIRAN

1. Variasi tipe pohon pada klon mangga madu.....	74
2. Variasi bentuk kanopi pohon.....	74
3. Variasi bentuk pertumbuhan pohon	75
4. Bentuk helai daun	75
5. Susunan daun terhadap batang	76
6. Variasi panjang daun.....	76
7. Variasi lebar daun.....	76
8. Variasi panjang tangkai daun	77
9. Variasi ujung daun.....	77
10. Variasi bentuk tepi daun.....	77
11. Variasi bentuk pangkal daun.....	78
12. Variasi bentuk warna daun muda.....	78
13. Nilai QV20+ dari 11 sekuen klon mangga.....	78
14. Visualisasi data <i>electrophenogram</i>	79
15. Tabel karakter morfologi mangga berdasarkan morfologi.....	80
16. Tabel karakterisasi mangga berdasarkan karakter morfologi	83
17. Formulir checklist plagiasi	84
18. Bukti konsultasi pembimbing biologi	85
19. Bukti konsultasi pembimbing agama	86

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia disebut sebagai negara yang kaya akan keanekaragaman hayati (*megabiodiversity*), karena berada di wilayah tropis antara dua benua (Kusmana & Hikmat, 2015; Rugayah dkk., 2019). Keanekaragaman tersebut merupakan nikmat luar biasa yang telah Allah turunkan ke bumi. Sebagaimana dalam firman Allah SWT pada surah Taha ayat 53 yang telah menciptakan tumbuhan dengan bermacam jenisnya :

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَّكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً
فَأَخْرَجْنَا بِهٖ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّىٰ

“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.”

Keanekaragaman tumbuhan telah disebutkan dalam surat Taha ayat 53. Adapun firman Allah SWT pada kalimat *“dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam”*. Kalimat tersebut menunjukkan bahwa telah diciptakan berbagai macam tumbuhan. Tumbuhan tersebut dapat berupa tanaman dan buah-buahan, ada yang memiliki rasa masam, ada yang manis, dan ada yang pahit, serta berbagai jenis lainnya dari hasil tanaman dan buah-buahan (Katsir, 2014). Seperti halnya buah mangga, meskipun memiliki warna buah yang sama, namun rasa setiap varietas berbeda dan memiliki ciri khasnya masing-masing. Kata *أَزْوَاجًا*, dalam hal ini menjelaskan bahwa aneka tumbuhan yang dapat dipahami dalam arti

jenis-jenis tumbuhan. Contohnya seperti tumbuhan berkeping dua (dikotil), ataupun tumbuhan berkeping satu (monokotil) (Shihab, 2002). Keanekaragaman tumbuhan berbuah di Indonesia cukup tinggi dan banyak dimanfaatkan oleh masyarakat dalam bidang konsumsi, ekonomi, maupun obat-obatan (Uji, 2007).

Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah SWT surah Fatir ayat 27 :

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ ثَمَرَاتٍ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهَا ۗ وَمِنَ الْجِبَالِ جُدَدٌ بَيضٌ وَحُمْرٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهَا وَغَرَابِيبُ سُودٌ

“Tidakkah engkau melihat bahwa Allah menurunkan air dari langit lalu dengan air itu Kami hasilkan buah-buahan yang beraneka macam jenisnya. Dan di antara gunung-gunung itu ada garis-garis putih dan merah yang beraneka macam warnanya dan ada (pula) yang hitam pekat.”

Menurut tafsir Katsir (2014), Allah SWT menyebutkan tentang kekuasaan-Nya yang sempurna melalui segala sesuatu yang diciptakan-Nya. Segala sesuatunya beraneka ragam bentuk, warna, dan rupanya, padahal penciptaannya dari air yang diturunkan-Nya dari langit (Katsir, 2014; At-Thabari, 2007). Firman-Nya pada lafadz, *فَأَخْرَجْنَا بِهِ ثَمَرَاتٍ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهَا* “Lalu dengan air itu Kami hasilkan buah-buahan yang beraneka macam jenisnya”, maksudnya adalah Allah menurunkan hujan dan mengairi pohon-pohon di bumi. Kemudian dengan itu, Allah menciptakan berbagai pohon berbuah yang beraneka ragam warnanya. Ada yang merah, ada yang hitam, kuning, serta warna lainnya (Ath-Thabari, 2007). Artinya, dengan sebab turunnya air dari langit, maka suburilah bumi dan hiduplah segala-galanya. Di antaranya tumbuhlah berbagai macam jenis buah-buahan (Hamka, 2007).

Indonesia mengalami kenaikan jumlah produksi mangga sebesar 273.797 ton terhitung sejak tahun 2018 hingga 2020. Jawa menghasilkan 76,5% dari

jumlah produksi mangga nasional, sehingga menjadi penghasil utama mangga di Indonesia. Namun, dari jumlah produksi tersebut hanya 1.073.343 ton yang di ekspor pada tahun 2020 (BPS, 2020). Jumlah penurunan ini disebabkan karena kualitas mangga yang kurang baik, serta belum adanya program pemuliaan yang efektif (Nasution dkk., 2014).

Mangga memiliki keanekaragaman varietas yang tinggi, yaitu sekitar 1.600 varietas di dunia (Anu *et al.*, 2015). Di Indonesia, masyarakat hanya memanfaatkan 57 varietas dari 250 varietas mangga yang ada (Dinesh *et al.*, 2011; Ramadani *et al.*, 2020). Mangga memiliki keanekaragaman yang tinggi pada tingkat intraspesifik, yang ditunjukkan dengan banyaknya kultivar, klon, dan *landrace* yang terdapat di pekarangan rumah dan kebun buah (Ariffin *et al.*, 2015). Variasi genetik pada mangga dapat terjadi dalam klon yang sama, meliputi variasi bentuk, ukuran, warna, dan kualitas buah yang dianggap berasal dari mutasi tunas (aseksual) (Anu *et al.*, 2015; Begum *et al.*, 2014; Venkateswarlu, 2013). Persilangan aseksual dapat digunakan untuk melestarikan mutasi, yang umumnya mutasi tersebut diperoleh dari perbanyakan seksual. Dengan demikian, selama evolusi terjadi, jumlah mutasi pada klon yang berbeda kemungkinan telah membentuk polimorfisme di antara klon mangga madu tersebut (Venkateswarlu, 2013).

Klon merupakan kultivar tanaman yang memiliki penamaan sendiri dan berasal dari perbanyakan secara aseksual (Venkateswarlu, 2013). Terdapat 298 klon dan 1.568 pohon mangga yang dibudidayakan di Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian (IP2TP) Cukurgondang, Pasuruan, Jawa

Timur (Sembiring *et al.*, 2020). Salah satu klon yang belum teridentifikasi dengan baik adalah klon mangga madu, sehingga menghambat proses sertifikasi klon (Komunikasi Pribadi, 2021). Klon mangga madu yang sudah tersertifikasi oleh Kementerian Pertanian adalah klon 225, sedangkan masih terdapat 7 klon lain yang belum tersertifikasi dengan baik (Keputusan Menteri Pertanian, 2007). Diantara tujuh klon tersebut adalah madu 65, madu 67, madu 139, madu 179, madu 311, madu banjar, dan madu Z. Tujuh aksesori tersebut berasal dari wilayah yang berbeda yaitu Pasuruan, Probolinggo, dan Kalimantan Selatan (Komunikasi Pribadi, 2021). Upaya pengembangan sertifikasi kultivar mangga membutuhkan klasifikasi yang lebih jelas. Kepastian klasifikasi tersebut berguna untuk monitoring plasma nutfah, sertifikasi, dan budidaya tanaman buah (Fitmawati *et al.*, 2009). Oleh karena itu, karakterisasi klon mangga madu perlu dilakukan untuk mengetahui variasi genetik dari tujuh klon mangga madu yang berasal dari berbagai daerah yang berbeda, serta informasi mengenai kekerabatan antar klon madu (Limbongan *et al.*, 2016).

Variabilitas genetik merupakan sumber penting untuk mengidentifikasi karakter yang berhubungan dan bertanggung jawab untuk pemuliaan tanaman (Kishor *et al.*, 2019). Variasi dapat ditunjukkan dengan adanya perbedaan satu pasang basa nukleotida dari aksesori yang berbeda lokasi asal (Kairupan dkk., 2015). Isolasi geografis dan pengaruh lingkungan menghasilkan variasi genetik yang nyata dan perbedaan tampilan morfologi (Turan *et al.*, 2004). Pengetahuan tentang tingkat keragaman atau keterkaitan genetik dalam plasma nutfah mangga madu sangat penting untuk mengembangkan strategi peningkatan produktivitas di

masa mendatang (S. K. Singh *et al.*, 2015). Selain itu, juga diperlukan analisis hubungan filogenetik dan menyelidiki kemungkinan perbedaan pada tingkat molekuler pada mangga madu. Secara bersamaan, hal ini juga membantu menilai tingkat variasi genetik yang dilihat dari ciri morfologinya (Anu *et al.*, 2015).

Beberapa pendekatan melalui karakterisasi morfologi telah dilakukan untuk menjelaskan posisi taksonomi dari mangga madu (Fitmawati dkk., 2013; Ichsan & Wijaya, 2014; Nilasari dkk., 2013; Sadri *et al.*, 2017). Namun, beberapa klon mangga madu sulit diidentifikasi menggunakan karakter morfologi, karena sifatnya tidak stabil dan dipengaruhi kondisi lingkungan (Ariffin *et al.*, 2015; Korir *et al.*, 2013). Karakterisasi morfologi memerlukan pengamatan ekstensif terhadap tanaman pada berbagai tahap pertumbuhan, terutama pada pembungaan dan pembuahan (Venkateswarlu, 2013). Alasan lain yaitu tingginya perubahan morfologi akibat banyaknya persilangan antar jenis Mangifera, sehingga karakter morfologi yang beragam banyak dijumpai pada marga ini (Fitmawati *et al.*, 2017). Pemahaman mengenai organ vegetatif dan generatif juga sangat rumit pada marga Mangifera (Hidayat *et al.*, 2011). Sementara itu, keanekaragaman genetik mangga pada tingkat molekuler lebih banyak diterima (S. K. Singh *et al.*, 2015).

Beberapa gen dan urutan DNA telah digunakan dalam studi filogenetik marga Mangifera. Diantaranya, gen *rbcL* (Fitmawati *et al.*, 2017; Juliantari *et al.*, 2018; Rafidah dkk., 2019; Suparman *et al.*, 2013), penyandi maturase (*matK*) (Hidayat *et al.*, 2011), dan intron *trnL-F* (Jagarlamudi *et al.*, 2011; Muellner-Riehl *et al.*, 2016). Penanda molekuler atau disebut juga sebagai penanda DNA, dikenal cepat dan banyak digunakan untuk mempelajari keragaman genetik,

mengidentifikasi spesies dalam koleksi plasma nutfah, menguji stabilitas dan integritas aksesori, dan menyelesaikan hubungan taksonomi (Rao, 2004). Penanda DNA barcode efektif digunakan dalam menelusuri keragaman genetik pada klon mangga. Informasi mengenai hal tersebut penting dalam konservasi plasma nutfah mangga, program sertifikasi, evaluasi sumber daya genetik, serta penyediaan bibit yang seragam secara genetik (Korir *et al.*, 2013).

Gen *rbcL* (*ribolusa 1,5-bisphospate carboxylase/RuBisCO*) adalah penanda fragmen pada sistematika tanaman yang direkomendasikan. Gen *rbcL* merupakan wilayah yang sangat konservatif, cukup baik dalam membedakan antar spesies dan sesuai untuk hubungan filogenetik antar anggota dalam marga *Mangifera*. Marka *rbcL* cukup baik untuk menganalisis hubungan filogenetik pada *Mangifera* sampai tingkat genus, spesies, dan infraspecies (Juliantari *et al.*, 2018; Trivedi *et al.*, 2018). Penanda ini ditetapkan oleh *Barcode of Life Database* (BOLD) sebagai barcode sekuen DNA untuk menganalisis keragaman genetik suatu spesies dan bersifat universal pada semua gen tanaman (Trivedi *et al.*, 2018).

Gen *rbcL* berukuran panjang sekitar 1400 bp (*base pair*), sehingga menyediakan banyak karakter untuk kajian filogenetik (CBOL, 2009). Sekuen gen *rbcL* digunakan dalam penelitian ini karena memiliki wilayah *conserve* yang cukup tinggi dan mutasinya rendah. Tingkat mutasi yang rendah diduga disebabkan oleh peranan gen *rbcL* yang mengkode protein RuBisCO. Mutasi yang rendah ini akan menguntungkan kajian mendalam tentang variasi genetik dan filogenetik intraspecies (Basith, 2015). Nilai *conserve region* tinggi dan

mutasi rendah akan memudahkan dalam perkiraan taksonomi dan evolusi, termasuk penelusuran asal usul nenek moyang akan lebih mudah (Nurhasanah *et al.*, 2019).

Mangga merupakan tanaman yang potensial untuk dikembangkan, karena mempunyai tingkat keragaman genetik yang tinggi (Sadri *et al.*, 2017). Contoh mangga yang dapat dimanfaatkan yaitu *Mangifera indica* L. cv. Madu (Ariffin *et al.*, 2015). Mangga madu sendiri memiliki banyak klon didalamnya. Hal tersebut membuktikan bahwa, keragaman genetik pada mangga cukup tinggi. Oleh karena itu, perlu dilakukan karakterisasi morfologi dan molekuler berdasarkan gen *rbcL*. Tujuannya sebagai dasar pemahaman konservasi plasma nutfah mangga (Oktavianto dkk., 2015), mengelompokkan kultivar mangga berdasarkan ciri morfologi dan molekuler, dan memberi informasi keragaman genetik kultivar mangga. Informasi ini dapat menunjang proses sertifikasi tanaman mangga madu (Fitmawati dkk., 2009).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengelompokan klon mangga madu berdasarkan karakter morfologi?
2. Bagaimana variasi genetik dan hubungan kekerabatan klon mangga madu berdasarkan penanda gen *rbcL*?
3. Bagaimana estimasi waktu divergensi dari klon mangga madu berdasarkan penanda gen *rbcL*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menjelaskan pengelompokan klon mangga madu berdasarkan karakter morfologi.
2. Menjelaskan variasi genetik dan hubungan kekerabatan klon mangga madu berdasarkan penanda gen *rbcL*.
3. Menjelaskan estimasi waktu divergensi dari klon mangga madu berdasarkan penanda gen *rbcL*.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Menyediakan informasi yang dapat digunakan untuk sertifikasi klon mangga madu.
2. Memberikan kontribusi untuk perkembangan sistem klasifikasi tanaman mangga madu berdasarkan DNA barcode gen *rbcL* utamanya di Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian (IP2TP) Cukurgondang, Pasuruan, Jawa Timur.
3. Informasi tentang keragaman genetik dan hubungan kekerabatan klon mangga madu dapat digunakan sebagai ilmu dasar dalam perkembangan pemuliaan dan konservasi tanaman.
4. Sebagai salah satu referensi mengenai diversifikasi dan evolusi klon mangga madu.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini diantaranya adalah:

1. Sampel tanaman yang digunakan diantaranya, 8 klon mangga madu sebagai *in-group* dan 3 klon mangga kuweni sebagai *out-group*.
2. Sampel yang digunakan diambil dari kebun koleksi mangga di Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian (IP2TP) Cukurgondang, Pasuruan, Jawa Timur.
3. Organ yang diamati merupakan keragaman morfologi adalah organ pohon dan daun mangga madu.
4. Sampel yang digunakan untuk isolasi DNA adalah daun muda.
5. Sekuen DNA yang diperoleh berasal dari sampel DNA yang dikirim ke 1st BASE DNA Sequencing, Singapura.

BAB II KAJIAN PUSTAKA

2.1 Botani Mangga Madu

2.1.1 Taksonomi dan Morfologi Klon Mangga Madu

Taksonomi mangga madu menurut APG (2016) dan Cronquist (1981) tergolong dalam Angiospermae, divisi Magnoliophyta, kelas Magnoliopsida, subkelas Magnoliidae, ordo Sapindales, suku Anacardiaceae, marga *Mangifera*. Ordo Sapindales memiliki 15 suku dan sekitar 5400 spesies, salah satunya adalah suku Anacardiaceae (Cronquist, 1981). Anacardiaceae adalah suku pohon tropis dan secara historis ditempatkan pada ordo Sapindales atau Rurales (APG IV, 2016; Cronquist, 1981). Anacardiaceae terdiri dari sekitar 77 marga dan 700 spesies yang habitatnya di daerah tropis, subtropis, dan beriklim sedang, dengan jumlah spesies yang lebih kecil terdapat di subtropis dan iklim sedang (Salehi *et al.*, 2019).

Klon merupakan kultivar tanaman yang memiliki penamaan sendiri dan berasal dari perbanyakan secara aseksual (Venkateswarlu, 2013). Berbeda dengan kultivar atau varietas yang merupakan tanaman budidaya dan dikembangbiakkan secara seksual maupun aseksual (Korir *et al.*, 2013). Terdapat 298 klon dan 1.568 pohon mangga yang dibudidayakan di Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian (IP2TP) Cukurgondang, Pasuruan, Jawa Timur (Sembiring dkk., 2020). Salah satu klon mangga yang terdapat di IP2TP Cukurgondang adalah mangga madu. Klon mangga madu yang telah ditanam pada kebun tersebut antara lain madu 65, madu 67, madu 139, madu

179, madu 225, madu 311, madu *seedling* atau Z, dan madu banjar (Komunikasi Pribadi, 2021).

Mangga madu memiliki habitus berupa pohon dan jarang herba (Gambar 2.1) (Cronquist, 1981; Oktavianto dkk., 2015; Prasetyo, 2012), dimana karakter tersebut merupakan salah satu ciri ordo Sapindales. Selain itu, hampir semua spesies *Mangifera indica* L. memiliki getah pada bagian kulit batang, yang akan keluar apabila dipotong atau dilukai (Kostermans & Bompard, 1993). Getah tersebut merupakan cairan yang mengandung resin atau latisifer, yang dapat menyebabkan alergi (Kostermans & Bompard, 1993; Yadav *et al.*, 2018). Getah resin ini merupakan salah satu ciri khusus dari suku Anacardiaceae (Cronquist, 1981; Simpson, 2006). Perbungaan pada mangga madu umumnya berada di terminal atau aksilar. Bunganya biseksual ataupun kelamin tunggal dengan kelopak bunga berjumlah lima sepal dan lima petal (Simpson, 2006).



Gambar 2.1. Morfologi pohon mangga madu (*Mangifera indica* L. cv. Madu) (Dokumentasi Pribadi, 2021)

Mangga madu memiliki tipe daun tunggal, yang tersusun berlawanan atau berseling (Gambar 2.2A) (Cronquist, 1981; Oktavianto dkk., 2015). Variasi morfologi daun dapat berupa oval, lanset, atau *elliptic*. Ujung daunnya berkisar dari tumpul sampai meruncing, serta tepi daun sedikit bergelombang (Gambar 2.2B). Panjang daun berkisar antara 17 sampai 24 cm dan lebarnya antara 3–7 cm, variasi ini bergantung jenis klon mangga madu (Komunikasi Pribadi, 2021). Tangkai daun memiliki panjang bervariasi antara 2,5–6 cm. Tangkai daun mangga madu memiliki *pulvinatus* pada bagian pangkalnya. Duduk daun (*phyllotaxis*) biasanya 3/8, tetapi karena daunnya tersusun rapat, maka tampak seperti lingkaran. Tajuk pohon biasanya berbentuk oblong atau *semi-circular* (Komunikasi Pribadi, 2021; Kostermans & Bompard, 1993; Mukherjee & Litz, 2009; Yadav *et al.*, 2018).



Gambar 2.2. Morfologi daun mangga madu. Gambar A) susunan daun berseling atau berlawanan, B) tepi daun bergelombang (Dokumentasi Pribadi, 2021)

Warna daun muda bervariasi antara klon mangga madu, yaitu berwarna hijau semburat coklat dan merah bata muda (Gambar 2.3A dan B) (Komunikasi

Pribadi, 2021). Daun muda mangga akan berubah secara bertahap menjadi terang dan kemudian menjadi hijau tua seiring bertambahnya usia (Mukherjee & Litz, 2009; Yadav *et al.*, 2018). Permukaan atas daun mengkilap dan berwarna hijau tua, sedangkan permukaan bawah berwarna hijau muda. Apabila diremas, daun mangga madu akan mengeluarkan aroma berbau seperti terpenin. Daun Mangifera mengandung senyawa mangiferin (turunan dari *xanthone*) yang tinggi (Yadav *et al.*, 2018).



Gambar 2.3. Variasi warna daun muda mangga madu. Gambar A) warna daun muda hijau semburat coklat dan B) warna daun merah bata muda (Dokumentasi Pribadi, 2021)

Perbungaan pada mangga madu merupakan bunga malai bercabang yang berebentuk piramida runcing dan terletak pada terminal (Gambar 2.4A) (Mukherjee & Litz, 2009; Ramírez & Davenport, 2016; Yadav *et al.*, 2018). Bentuk perbungaan ini merupakan ciri khusus anggota Anacardiaceae (Simpson, 2006). Perbungaan bersifat kaku dan tegak, dengan panjang berkisar 23,5–39 cm dan bercabang. Bunga berwarna kuning dan memiliki jumlah antara 15 hingga 20 kuntum pada setiap tandan (Keputusan Menteri Pertanian, 2007). Perbungaan

biasanya lebat dan terdapat ratusan bunga kecil, bahkan sebanyak 3000–4000 bunga yang berdiameter 5-10 mm (Mukherjee & Litz, 2009; Ramírez & Davenport, 2016; Yadav *et al.*, 2018). Sebagian besar bunga bersifat jantan (25-98%), selebihnya bersifat biseksual dan menghasilkan buah (Yadav *et al.*, 2018). Setiap bunga kecil umumnya terdiri dari lima petal dan sepal yang berbentuk bulat telur hingga lanset (Gambar 2.4B dan C). Warna petal bervariasi, diantaranya berwarna putih, merah muda, atau bahkan kuning bergantung pada waktu sejak bunga mekar. Sepal bunga juga bervariasi, dapat berwarna hijau, kuning atau merah (Kostermans & Bompard, 1993; Ramírez & Davenport, 2016). Benang sari terletak di tengah, berjumlah 5–10, satu atau dua diantaranya fertil, dan lainnya steril. Ovarium berwarna kuning dan memiliki satu ruang yang berisi satu bakal biji (ovule). Kedudukan ovulum (bakal biji) mengangguk (*anatropus*) dan letaknya terjumbai. Penyerbukan silang terkadang dibantu oleh lalat (Mukherjee & Litz, 2009; Ramírez & Davenport, 2016; Simpson, 2006).



Gambar 2.4. Susunan perbungaan pada mangga madu. Gambar A) bunga malai berbentuk piramida, B) bunga jantan, dan C) bunga biseksual (Dokumentasi Pribadi, 2021)

Buah mangga madu merupakan buah batu berair (*drupe*) berbentuk lonjong dan pangkalnya membulat (Gambar 2.5A) (Keputusan Menteri Pertanian, 2007; Kostermans & Bompard, 1993; Yadav *et al.*, 2018). Buah tumbuh di ujung batang panjang seperti tali (bekas malai), terdapat dua atau lebih buah pada satu batang. Panjang buah berkisar antara 10–10,4 cm, dan memiliki berat mulai dari beberapa gram sampai 1,8-2,26 kg (Keputusan Menteri Pertanian, 2007; Yadav *et al.*, 2018). Warna kulit buah matang yaitu hijau kekuningan, sedangkan warna daging buahnya adalah putih kekuningan. Buah mangga madu memiliki rasa manis segar dan beraroma harum. Kulit buahnya tipis (0,2-0,4 cm) dan memiliki tekstur daging buah yang berserat halus (Keputusan Menteri Pertanian, 2007; Kostermans & Bompard, 1993).

Buah mangga memiliki tiga lapisan, yaitu mesokarp, eksokarp, dan endokarp (Gambar 2.5B). Mesokarp merupakan bagian yang dapat dimakan, sedangkan eksokarp merupakan kulit terluarnya. Endokarp merupakan biji tunggal berkayu, tebal, dan berserat. Serat pada mesokarp berasal dari endokarp (Mukherjee & Litz, 2009). Allah telah berfirman pada Al-Qur'an surah Al-An'am ayat 141 tentang keanekaragaman buah-buahan, yang berbunyi:

وَهُوَ الَّذِي أَنشَأَ جَنَّاتٍ مَّعْرُوشَاتٍ وَغَيْرَ مَعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا
أُكْلُهُ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُتَشَابِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ كُلُوا مِنْ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ
وَاتُّوا حَقَّهُ يَوْمَ حَصَادِهِ وَلَا تُسْرِفُوا إِنَّهُ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ

“Dan Dialah yang menjadikan tanaman-tanaman yang merambat dan yang tidak merambat, pohon kurma, tanaman yang beraneka ragam rasanya, zaitun dan delima yang serupa (bentuk dan warnanya) dan tidak serupa (rasanya). Makanlah buahnya apabila ia berbuah dan berikanlah haknya (zakatnya) pada waktu memetik hasilnya, tapi janganlah berlebih-lebihan. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang berlebih-lebihan”.

Ayat tersebut menjelaskan perihal penciptaan Allah yaitu tanaman yang beraneka macam dan menghasilkan buah-buahan. Dimana buah-buahan tersebut ada yang serupa bentuk dan warnanya, namun tidak serupa rasanya. Menurut tafsir Ibnu Katsir (2014), tumbuhan meskipun serupa dalam hal bentuk dan warnanya, tetapi ada yang memiliki rasa manis, masam, pahit, dan berbagai jenis lainnya. Arti ayat yang berbunyi, *“Makanlah buahnya apabila ia berbuah”*, memiliki arti bahwasannya dari buah tersebut dapat dimanfaatkan manusia untuk dikonsumsi, dan dipergunakan untuk manfaat lainnya. Kalimat selanjutnya yaitu, *“dan berikanlah haknya (zakatnya) pada waktu memetik hasilnya”*, menurut tafsir Al-Mahalli (2008), maksud arti ayat tersebut adalah sebagai manusia hendaklah kita melaksanakan kewajiban setelah mendapatkan hak berupa buah-buahan yang dimakan tersebut dengan menyedekahkan hasil setelah panen buah kepada orang fakir dan miskin. Seperti halnya dengan variasi genetik pada mangga yang ditandai dengan adanya hubungan kekerabatan diantara mangga, adanya domestikasi dan persebaran mangga yang terjadi di muka bumi ini, sudah selayaknya menjadi kajian yang wajib untuk dipelajari. Hal tersebut merupakan tanda-tanda kekuasaan Allah SWT bagi orang-orang yang memperhatikan serta memikirkan ciptaan-Nya.



Gambar 2.5. Kenampakan buah mangga madu. Gambar A) buah *drupe* berbentuk lonjong dan pangkal membulat, B) lapisan pada buah mangga (Lauricella *et al.*, 2017)

2.1.2 Habitat dan Distribusi Mangga Madu

Sebagian besar spesies *Mangifera indica* L. tersebar di wilayah tropis Asia dan meluas sampai ke utara dan timur di Kepulauan Caroline. Mangga liar tumbuh di beberapa wilayah, seperti India, Sri Lanka, Bangladesh, Myanmar, Thailand, Kamboja, Vietnam, Laos, Cina bagian selatan, Malaysia, Singapura, Indonesia, Brunei, Filipina, Papua Nugini, Kepulauan Solomon dan Caroline. Keanekaragaman spesies tertinggi terdapat di Malaysia bagian barat, terutama di Semenanjung Malaysia, Kalimantan, Jawa, dan Sumatera, yang merupakan pusat dari sebaran distribusi mangga (Mukherjee & Litz, 2009). Berdasarkan tingkat keragaman genetik yang diamati, tanaman ini awalnya berasal dari daerah Indo-Burma (Kostermans & Bompard, 1993; Singh *et al.*, 2016; Tasliah dkk., 2013), yang kemudian menyebar ke negara lainnya, seperti Brazil, Amerika Latin, Afrika, hingga kawasan Asia Tenggara, termasuk ke Indonesia (Tasliah dkk., 2013).

Mangga madu dapat tumbuh baik di daerah dataran rendah yang cuacanya panas (Sanjaya & Rosadi, 2018), atau di daerah yang umum dikenal sebagai

“tropis kering”, dimana musimnya terjadi secara teratur seperti di wilayah Asia (Mukherjee & Litz, 2009). Salah satu kebun buah mangga terbesar di Asia Tenggara adalah Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian (IP2TP) Cukurgondang, Pasuruan (Tasliyah *et al.*, 2016). Terdapat 298 klon dan 1.568 pohon mangga yang dibudidayakan di IP2TP Cukurgondang (Sembiring dkk., 2020). Salah satu koleksi klonnya adalah mangga madu. Koleksi mangga madu tersebut didapatkan dari berbagai daerah, diantaranya dari Pasuruan, Probolinggo dan Banjarbaru Kalimantan Selatan. Klon yang berasal dari Kalimantan Selatan adalah madu banjar, sedangkan mangga yang berasal dari Probolinggo adalah madu 139, madu 65, madu 67, madu 179, madu 225, madu 311, dan madu *seedling* atau Z berasal dari Pasuruan (Komunikasi Pribadi, 2021).

2.1.3 Manfaat Mangga (*Mangifera indica* L.)

Mangifera indica L. (mangga) dikenal sebagai “*the king of fruits*” karena merupakan buah paling populer di daerah tropis (Lauricella *et al.*, 2017). Mangga memiliki khasiat *nutraceutical* karena daun, akar, kulit batang, bijinya, dan kulitnya digunakan dalam pengobatan tradisional. Beberapa penyakit yang dapat disembuhkan termasuk disentri, ambeien, perdarahan, anemia, diare, asma, sakit gigi, batuk, bronkitis, hipertensi, keputihan, dan rematik (Zhang *et al.*, 2020). Studi menunjukkan mangga memiliki sifat antidiabetik, antioksidan, antivirus, kardiotonik, hipotensi, anti-inflamasi. Berbagai efek seperti antibakteri, antijamur, antiparasit, antitumor, anti HIV, resorpsi antibone, antispasmodik, antipiretik,

antidiare, antialergi, imunomodulasi, hipolipidemik, antimikroba, hepatoprotektif, gastroprotektif juga telah diteliti (Parvez, 2016).

Mangga juga salah satu sumber polifenol yang sangat kaya, kelompok beragam mikronutrien organik yang ditemukan pada tanaman yang memberikan manfaat kesehatan. Polifenol yang diidentifikasi dalam mesocarp mangga termasuk mangiferin, asam galat, gallotannin, kuersetin, isokuersetin, asam ellagic, dan β -glukogallin. Lebih lanjut, hingga 25 karotenoid beragam telah diidentifikasi dalam mesocarp, seperti provitamin A, lutein, α -karoten, dan β -karoten yang menyebabkan warna kekuningan pada bagian buah ini (Lauricella *et al.*, 2017).

2.2 Variasi Genetik

Keragaman genetik yaitu, perbedaan hereditas molekuler di dalam atau antar populasi dan menjadi dasar dari perubahan evolusioner (Nevo & Avigdor, 2011). Menurut teori evolusi molekuler, tingkat variasi genetik menunjukkan keseimbangan antara terjadinya mutasi gen dan hilangnya variasi genetik karena pengambilan gamet secara acak dalam suatu populasi. Sederhananya, laju pergeseran genetik berbanding terbalik dengan ukuran populasi (Leffler *et al.*, 2012). Variasi genetik antar spesies maupun dalam genom memiliki dampak penting bagi evolusi dan konservasi spesies. Data genom saat ini memungkinkan untuk menggambarkan proses evolusi yang terjadi, terutama bagaimana variasi dalam skala populasi tersebut dapat mengatur keragaman genetik (Ellegren & Galtier, 2016).

Keragaman genetik dapat dianggap mencerminkan keseimbangan antara kemunculan dan hilangnya genetik varian (alel). Alel baru muncul pada setiap generasi melalui mutasi spontan karena kesalahan replikasi DNA atau kerusakan DNA yang disebabkan mutagen. Keragaman genetik juga diatur oleh tingkat kehilangan dan fiksasi alel (Ellegren & Galtier, 2016). Secara khusus, keragaman genetik berkontribusi pada kemampuan spesies merespon perubahan lingkungan, strategi peningkatan produktivitas hewan ternak, sumber keanekaragaman genetik dalam pemuliaan tanaman, dan konservasi spesies yang terancam punah (Ellegren & Galtier, 2016; Henderson & Salt, 2017).

2.3 Kekerabatan Tumbuhan

Kekerabatan dalam sistemik tumbuhan dapat diartikan sebagai pola hubungan atau total kesamaan antara kelompok tumbuhan berdasarkan sifat atau ciri tertentu dari masing-masing kelompok tumbuhan tersebut (Jayanti, 2020). Hubungan kekerabatan dikaji melalui pendekatan fenetik berdasarkan sejumlah ciri yang sama dan dibandingkan dengan hasil pengelompokannya (Rahmawati dkk., 2016). Selanjutnya, analisis cluster digunakan untuk meringkas data dengan mengelompokkan taksa-taksa berdasarkan kesamaan morfologinya. Semakin besar jumlah indeks similaritas yang dimiliki, maka semakin dekat hubungan kekerabatan antar tumbuhan satu dengan lainnya (Hasanuddin, 2018).

Kekerabatan dapat dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu kekerabatan fenetik dan kekerabatan filogenetik. Kekerabatan fenetik adalah persamaan sifat yang dimiliki setiap kelompok tumbuhan dengan menghiraukan sejarah nenek

moyangnya. Berbeda dengan kekerabatan fenetik, kekerabatan filogenetik didasarkan pada evolusi, yang digunakan sebagai acuan utama. Dalam beberapa penelitian, kekerabatan fenetik lebih sering digunakan daripada kekerabatan filogenetik. Hal ini disebabkan karena sulitnya menemukan bukti evolusioner pendukung, seperti fosil, yang representatif untuk menerapkan klasifikasi secara filogenetik. Apabila cukup banyak bukti, maka kemungkinan kekerabatan fenetik juga dapat menggambarkan kekerabatan filogenetik (Jayanti, 2020). Penanda molekuler dan morfologi dapat digunakan untuk menilai hubungan kekerabatan berbagai tanaman buah, khususnya mangga madu (Khan *et al.*, 2015).

2.4 Barcode DNA

Barcode DNA didefinisikan sebagai urutan penanda genetik pendek yang berasal dari genom standar (Likhitha *et al.*, 2016). Barcode DNA berfungsi untuk mengidentifikasi organisme atau spesies tertentu. Selain dalam proses identifikasi, barcode DNA juga digunakan dalam upaya penentuan taksonomi ataupun klasifikasi suatu spesies (Letchuman, 2018). Barcode yang baik harus memenuhi setidaknya tiga kriteria yaitu, universalitas (kemudahan dalam sekuensing dan amplifikasi), kualitas sekuen, dan kemampuan membedakan spesies (Hollingsworth *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017). Barcode universal mampu mengamplifikasi semua taksa menggunakan primer standar dan menghasilkan urutan DNA yang baik (von Cräutlein *et al.*, 2011).

Barcode DNA, “subunit sitokrom oksidase c gen mitokondria (CO1)” adalah penanda genetik molekuler yang paling efektif dan umum digunakan untuk

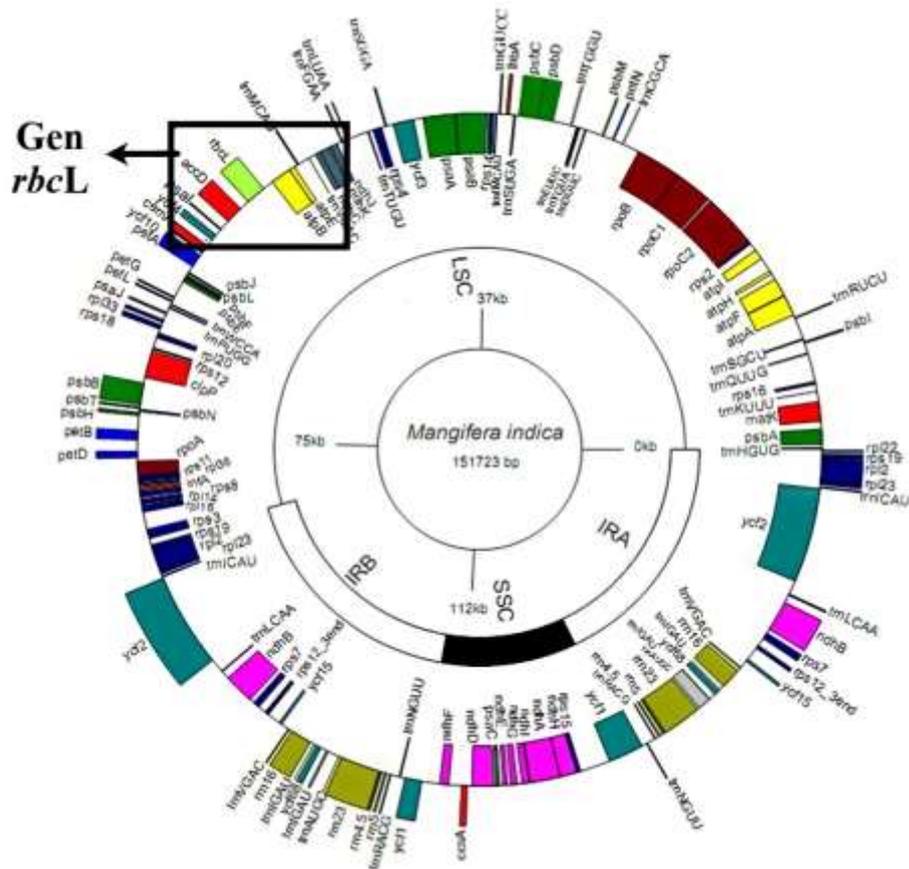
barcode DNA pada hewan (Gross, 2012; Imtiaz *et al.*, 2017). Namun, CO1 memiliki kemampuan diskriminasi pada spesies tanaman sangat rendah, sehingga gen tersebut tidak digunakan (Letchuman, 2018). Pencarian penanda barcode DNA yang universal dan konsisten sangat sulit dilakukan pada spesies tanaman. Hasilnya, banyak barcode DNA tanaman dengan efisiensi berbeda untuk spesies tanaman yang berbeda seperti *internal transcribed spacer* (ITS1 dan ITS2), *chloroplast intergenic spacers* (*trnH-psbA*, *atpF-atpH*, dll.) dan daerah *chloroplast coding* (*rbcL*, *matK*, dll.) (Hollingsworth *et al.*, 2011). Di antara barcode tanaman ini, *rbcL* dan *matK* serta kombinasi keduanya direkomendasikan dan digunakan sebagai barcode utama untuk spesies tumbuhan (CBOL, 2009). Gen *rbcL* mampu melacak hubungan evolusi spesies tumbuhan serta mudah diamplifikasi dan diurutkan (Hollingsworth *et al.*, 2011).

2.5 Gen *rbcL*

Gen *rbcL* merupakan salah satu gen yang paling dilestarikan dalam genom kloroplas, sehingga dapat digunakan untuk melihat hubungan evolusioner kelompok tumbuhan yang menyimpang dari waktu ke waktu (Hollingsworth *et al.*, 2011). Gen *rbcL* mempunyai panjang sekitar 1400 bp (*base pair*) yang berfungsi untuk mengkode subunit besar *ribulose-1,5-bifosfat karboksilase/oksigenase* (rubisco) (Letchuman, 2018). Gen *rbcL* terletak diantara gen *atpB* dan *accD* (Gambar 2.6) (Azim *et al.*, 2014). Gen ini memiliki keunggulan yaitu, tingkat mutasi yang rendah dibandingkan dengan barcode cpDNA lainnya. Oleh karena itu, studi tentang variasi genetik dan filogenetik

intraspesies dapat dilakukan dengan gen ini (Basith, 2015; Nurhasanah *et al.*, 2019). Gen *rbcL* memiliki tingkat keberhasilan amplifikasi yang tinggi dan mudah disekuensing, meskipun memiliki tingkat kemampuan diskriminasi yang rendah (Hollingsworth *et al.*, 2011).

Gen *rbcL* merupakan gen dengan ciri terbaik, dan mampu membedakan antar spesies. Berdasarkan evaluasi kualitas barcode DNA, *rbcL* menempati kedudukan tertinggi dalam hal kualitas sekuensingnya (CBOL, 2009). Penanda ini ditetapkan oleh *Barcode of Life Database* (BOLD) sebagai barcode sekuens DNA untuk menganalisis keragaman genetik suatu spesies dan bersifat universal pada semua gen tanaman (Nurhasanah *et al.*, 2019; Trivedi *et al.*, 2018).



Gambar 2.6. Diagram yang menunjukkan posisi urutan gen *rbcL* (Azim *et al.*, 2014)

2.6 Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik adalah penentuan bagaimana suatu taksa tersebut kemungkinan diturunkan selama evolusi. Analisis filogenetik juga dapat digunakan untuk menganalisis perubahan evolusi yang terjadi pada spesies yang berubah dengan cepat, misalnya virus. Hubungan evolusioner antar sekuen digambarkan dengan menempatkan sekuen tersebut sebagai cabang luar pada pohon filogenetik. Hubungan percabangan di bagian dalam pohon kemudian mencerminkan sejauh mana urutan sekuen tersebut memiliki kesamaan. Tujuan

dari analisis filogenetik untuk menemukan semua hubungan percabangan pada pohon dan panjang cabang (Lemey, 2009).

Prosedur untuk analisis filogenetik umumnya meliputi, penyelarasan urutan (*alignment*), penyusunan pohon filogenetik, dan evaluasi pohon filogenetik (Lemey, 2009; Mount, 2001). Penyelarasan urutan adalah hipotesis tentang kesamaan beberapa gen dalam urutan sekuen nukleotida. Oleh karena itu, gen yang selaras diasumsikan telah menyimpang dari keadaan leluhur yang sama. Panjang urutan setelah disejajarkan akan berbeda, karena pada tahap ini akan menghasilkan beberapa *gap* untuk mencapai kesejajaran (Lemey, 2009). *Gap* pada *alignment* dapat dianggap mewakili perubahan mutasi dalam urutan ataupun penyusunan ulang materi genetik seperti insersi atau delesi (Lemey, 2009; Mount, 2001).

Berdasarkan jenis datanya, terdapat dua metode untuk merekonstruksi pohon, yaitu metode *character state* dan *distance matrix*. Metode *character state* berupa kumpulan data karakter, seperti karakter morfologis, fisiologis, maupun data urutan sekuen. Metode ini meliputi *Maximum Parsimony* (MP), *Maximum Likelihood* (ML), dan *Bayesian Inference* (BI). Sedangkan metode *distance matrix* menggunakan model evolusioner dan menghilangkan *character state* asli dari suatu taksa yang diamati. Metode ini didasarkan pada perbandingan jarak perbedaan antara dua sekuen (disebut juga *p-distance*). Semakin tinggi jarak perbedaan kedua sekuen (*p-distance*), maka semakin jauh kekerabatannya. Keuntungan metode ini adalah tidak mahal secara komputasi dan cocok untuk

menganalisis data yang relatif besar dengan cepat. Metode *distance matrix* meliputi *clustering* UPGMA dan *Neighbor-joining* (NJ) (Lemey, 2009).

Maximum parsimony (MP) merupakan pendekatan berbasis *character state* untuk merekonstruksi pohon filogenetik dari data molekuler (Kannan & Wheeler, 2012; Lemey, 2009). Metode ini akan menghasilkan topologi pohon yang baik selama jumlah divergensi lebih sedikit dibandingkan jumlah mutasi. Kelebihan metode MP adalah kecepatannya dalam menganalisis banyak urutan (Holder & Lewis, 2003).

Maximum likelihood (ML) merekonstruksi secara akurat hubungan antar sekuen taksa yang telah terpisah dalam kurun waktu yang lama. Metode ini mengoreksi kejadian mutasi di beberapa lokasi (Lemey, 2009). ML mengasumsikan bahwa urutan DNA spesies leluhur sama dengan spesies yang masih ada, dan menghitung perubahan evolusi untuk menjelaskan perbedaan di antara urutan yang diamati (Miyamoto & Cracraft, 1991). Metode ML memiliki kelemahan yaitu pemrosesan data yang membutuhkan waktu lama (Felsenstein, 1985).

Bayesian Inference (BI) adalah metode berbasis *character state* yang menggunakan kriteria optimalitas, tetapi secara konseptual metode ini sangat berbeda dengan MP dan ML. Metode Bayes juga menggunakan konsep kemungkinan, tetapi dengan mencari sekumpulan pohon yang mendekati sesuai untuk data yang dianalisis (Lemey, 2009). Metode ini memiliki kelebihan yaitu dapat mengolah data lebih cepat dibandingkan metode *character state* lainnya.

Metode BI menggunakan algoritma MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) (Holder & Lewis, 2003).

Metode *Neighbor-joining* (NJ) tergolong metode baru yang digunakan sebagai analisis filogenetik (Holder & Lewis, 2003). NJ merekonstruksi pohon dengan mengelompokkan urutan yang saling berdekatan secara bertahap. Setiap langkah pengelompokkannya, metode ini meminimalkan jumlah panjang cabang pohon. NJ dikenal konsisten secara statistik, dalam arti jika *pairwise distance* benar tanpa kesalahan statistik, maka NJ akan merekonstruksi pohon yang benar (Tamura *et al.*, 2004). Metode NJ merupakan metode tercepat diantara metode rekonstruksi pohon lainnya (Holder & Lewis, 2003) dan lebih akurat dalam kumpulan data yang lebih kecil. Namun, keakurasian pohon NJ akan menurun seiring dengan banyaknya data sekuen yang diproses (Tamura *et al.*, 2004).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif dan studi literatur tentang variasi morfologi dan molekuler mangga madu. Objek penelitian merupakan klon mangga koleksi dari Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian (IP2TP) Cukurgondang, Pasuruan.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan April hingga Juli 2021. Pengambilan data morfologi dan sampel mangga madu dilaksanakan di kebun koleksi plasma nutfah IP2TP Cukurgondang, Pasuruan, Jawa Timur. Isolasi DNA sampel, PCR, elektroforesis, dan analisis data dilakukan di Laboratorium Genetika dan Molekuler, Griya Sains, Kelurahan Merjosari, Kecamatan Lowokwaru, Kota Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari kamera, penggaris, meteran, laptop, lembar karakterisasi, *tube microcentrifuge* 0,5 mL dan 1,5 mL, rak tube, mortar dan alu, *waterbath*, *hot plate magnetic stirrer*, mikropipet (5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l), *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, *vortex*,

sentrifuge, spatula, neraca analitik, gelas ukur, *erlenmeyer*, cetakan agar, perangkat elektroforesis, *gel documentation system*, dan *thermal cycler* (PCR).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daun muda mangga madu dan mangga kuweni 100 mg, nitrogen cair, ethanol 70%, *Biospin Plant Omni Genomic DNA Extraction Kit*, bubuk gel agarose, *peqGreen*, *Nuclease Free Water*, $\frac{1}{2}$ x Tris-Boric EDTA (TBE), 2x MyTaq HS Red PCR Mix, *loading dye*, DNA ladder 1 kbp Plus, DNA ladder 100 bp Plus, dan primer *rbcL* 1 (*forward*) (TGT-CAC-CAA-AAA-CAG-ACT) dan *rbcL* 2 (*reverse*) (TTC-CAT-ACT-TCA-CAA-GCA-GC).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Karakterisasi Morfologi dan Pengambilan Sampel

Pengamatan morfologi menggunakan tabel karakterisasi morfologi menurut IPGRI (2006), dengan 20 karakter yang diamati (Tabel 3.1). Berikut adalah karakter morfologi mangga yang diamati:

Tabel 3.1 Daftar karakter morfologi mangga yang diamati

No.	Karakter
1.	Tipe pohon
2.	Bentuk kanopi pohon
3.	Bentuk pertumbuhan pohon
4.	Bentuk helaian daun
5.	Susunan daun terhadap batang
7.	Panjang daun
7.	Lebar daun
8.	Panjang tangkai daun
9.	Tipe pelvinus
10.	Sudut antara tulang daun primer dan sekunder
11.	Lekukan pada tulang daun sekunder
12.	Terkstur daun
13.	Bentuk ujung daun
14.	Bentuk pangkal daun
15.	Bentuk tepi daun
16.	Warna daun muda
17.	Warna permukaan atas daun tua
18.	Warna permukaan bawah daun tua
19.	Indumentum daun
20.	Aroma daun

Sampel klon mangga madu yang digunakan merupakan koleksi dari kebun plasma nutfah mangga IP2TP Cukurgondang, Pasuruan, Jawa Timur (Tabel 3.2). Daun yang digunakan untuk analisis molekuler adalah daun yang masih muda. Sampel daun muda kemudian disimpan dalam kantong plastik *zipper lock* yang berisi *silica gel* dan diberi nama sesuai sampel.

Tabel 3.2 Daftar nama klon mangga koleksi dari IP2TP Cukurgondang

No.	Nama Spesies	Klon	Asal
1.	<i>Mangifera odorata</i> Lour.	Kuweni Laki	Kalimantan Selatan
2.	<i>M. odorata</i> L.	Kuweni Bini	Kalimantan Selatan
3.	<i>M. odorata</i> L.	Kuweni 51	Gunung Gangsir, Pasuruan
4.	<i>M. indica</i> L.	Madu 65	Klanggrend, Pasuruan
5.	<i>M. indica</i> L.	Madu 67	Bayeman, Pasuruan
6.	<i>M. indica</i> L.	Madu 139	Banjarsari, Probolinggo
7.	<i>M. indica</i> L.	Madu 225 (unggulan)	Pucangan, Pasuruan
8.	<i>M. indica</i> L.	Madu 179	Karanganyar, Pasuruan
9.	<i>M. indica</i> L.	Madu 311	Bukir, Pasuruan
10.	<i>M. indica</i> L.	Madu Banjar	Banjarbaru, Kalimantan Selatan
11.	<i>M. indica</i> L.	Madu Z (<i>seedling</i>)	Cukurgondang, Pasuruan

3.4.2 Karakterisasi Molekuler

3.4.2.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan *Biospin Plant Omni Genomic DNA Extraction Kit*. Sampel daun muda (100 mg) dihaluskan menggunakan mortar dengan bantuan nitrogen cair. Serbuk daun dipindahkan dalam tube 1,5 mL. Ditambahkan 450 μ L LP plus buffer, dicampur hingga rata, kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit (tube divortex setiap 2-3 kali selama inkubasi). Ditambahkan 150 μ L DA buffer dan dihomogenkan, kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam *freezer*. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit untuk mendapatkan fase atas atau supernatan (*aqueous phase*). Kemudian, supernatan dipindahkan dalam 1,5 mL tube sentrifugasi baru. Ditambah 750 μ L P binding buffer dan dihomogenkan, kemudian campuran

dipindahkan ke tube *spin column*. Disentrifugasi pada kecepatan 11.000 rpm selama 1 menit, kemudian dibuang cairan di bagian tube. Ditambahkan 500 μ L G binding buffer ke tube *spin column*, kemudian di sentrifugasi pada 11.000 rpm selama 30 detik dan dibuang cairan di bagian tube. Ditambahkan 600 μ L *washing buffer* ke *spin column* dan disentrifugasi pada 14.000 rpm selama 30 detik, diulangi langkah ini satu kali. Disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit dan dipindahkan *spin column* ke tube 1,5 mL baru. Ditambahkan 100 μ L *elution buffer*, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 1 menit, buffer pada tube mengandung DNA, kemudian disimpan pada suhu ruang -20°C .

3.4.2.2 Uji Kualitatif DNA

Kualitas DNA hasil ekstraksi diuji menggunakan elektroforesis gel agarose 1%. Tahap awal yaitu pembuatan gel agarose, sebanyak 0,2 gram serbuk gel agarose dilarutkan dalam 20 mL $\frac{1}{2}$ x Tris-Boric EDTA (TBE). Larutan gel agarose dipanaskan dengan *hot plate magnetic stirrer* sampai larutan mendidih dan menjadi bening. Larutan ditambahkan pewarna *peqGreen* sebanyak 2,5 μ L dan dihomogenkan. Larutan gel dicetak pada *gel tray* (cetakan agar) dan dipastikan cetakan bersih serta pada posisi rata. Selanjutnya, dipasang sisir cetakan *wells* dan ditunggu selama 25 menit hingga gel menjadi padat. Gel yang sudah memadat dimasukkan dalam *chamber* (tangki) elektroforesis dan dituangkan buffer TBE 25 mL. Diambil 5 μ L sampel DNA dan dicampurkan dengan 3 μ L *loading dye*, dicampurkan secara perlahan menggunakan pipet.

Campuran tersebut dipipet dan ditungkan pada sumuran gel agarose. Dimasukkan DNA ladder 1 Kbp Plus sebanyak 2 μ L untuk menentukan panjang pita DNA genom. Waktu untuk *running* sampel diatur selama 25 menit dan daya tegangan sebesar 50 volt. Hasil visualisasi dapat dilihat menggunakan *gel documentation system*.

3.4.2.3 Amplifikasi dan Sequencing Gen *rbcL*

Amplifikasi DNA dilakukan dengan mesin PCR dalam total larutan 30 μ l yang terdiri dari 15 μ l PCR Master Mix, 3 μ l sampel DNA template, 6 μ l *Nuclease Free Water*, 3 μ l setiap primer (10 pmol setiap primer forward dan reverse). Primer yang digunakan dalam amplifikasi PCR adalah *rbcL* 1 (*forward*) (TGT-CAC-CAA-AAA-CAG-ACT) dan *rbcL* 2 (*reverse*) (TTC-CAT-ACT-TCA-CAA-GCA-GC). Suspensi sampel dibersihkan dari gelembung sebelum dimasukkan dalam alat PCR. Amplifikasi dilakukan dengan pengaturan suhu sebagai berikut: pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit, diikuti dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama 30 detik, dan *extention* pada suhu 72°C selama 120 detik. Selanjutnya dilakukan proses *post-extention* dengan suhu 72°C selama 7 menit. Setelah proses amplifikasi, hasilnya dikonfirmasi dengan elektroforesis gel agarose 2%. Proses sekuensing dilakukan untuk mengetahui urutan sekuen DNA yang didapat dari hasil amplifikasi. Sekuensing dilakukan dengan mengirim sampel DNA ke jasa *sequencing* 1st BASE DNA Sequencing, Singapura.

3.5 Analisis Data

3.5.1 Analisis Variasi Morfologi

Data hasil pengamatan morfologi mangga yang berupa data nominal kemudian dikonversi menjadi data ordinal dengan skala interval. Pengolahan data dilakukan menggunakan program PAST (*Paleontological Statistics*) versi 4.02. Matriks similaritas dikomputasi dengan memperhitungkan jarak antar takson secara kualitatif (*Similarity and distance indices* dalam PAST). *Clustering* (pengelompokan) dikomputasi dengan program *Clustering* dalam PAST menggunakan metode UPGMA dengan indeks similaritas menggunakan koefisien persamaan Bray-Curtis untuk menghasilkan pohon dendrogram.

3.5.2 Analisis Sekuen dan Variasi Genetik

Data hasil sekuensing dianalisis menggunakan *software Sequence Scanner* versi 1.0. *Alignment* hasil sekuensing menggunakan *software* MEGA 6 dengan *default* parameter. Kemudian, data disimpan dalam format FASTA dan NEXUS. Hasil *alignment* digunakan untuk mengetahui variasi genetik dan urutan DNA yang mengalami mutasi, meliputi jenis, letak, jumlah mutasi, serta distribusi haplotipe yang dianalisis menggunakan *software* DnaSP versi 6.0. Visualisasi haplotipe menggunakan aplikasi Network versi 10.2.

3.5.3 Analisis Hubungan Kekerbatan dan Estimasi Waktu Divergensi

Pohon filogenetik direkonstruksi berdasarkan sekuen yang telah disejajarkan. Sekuen DNA terdiri dari *outgroup* dan *in-group* (*rooting tree*).

Outgroup terdiri dari sekuen gen *rbcL* Klon Mangga Kuweni Laki, Kuweni Bini, dan Kuweni 51. Sekuen di *alignment* menggunakan MEGA 6 pada menu ClustalW. Setelah proses *alignment* selesai, kemudian dilakukan pemotongan pada *gap* di setiap ujung sekuen. Rekonstruksi pohon filogenetik diperkirakan menggunakan metode *Neighbor-Joining* (NJ), *Maximum Parsimony* (MP) dan *Bayesian Evolutionary*. Analisis NJ dan MP menggunakan aplikasi MEGA 6 dengan metode replikasi *bootstrap* 1000 ulangan. Analisis NJ dilakukan dengan menentukan model substitusi yang sesuai terlebih dahulu. Penentuan model terbaik untuk urutan DNA gen *rbcL* menggunakan software MEGA 6 (Kumar *et al.*, 2018). Pada pilihan *Models*, pilih find best DNA/protein models. Penentuan model berdasarkan nilai BIC (*Bayesian Information Criterion*).

Metode *Bayesian Evolutionary* dianalisis melalui serangkaian aplikasi *BEAUti* dan *BEAST*. Metode *Bayesian* menggunakan algoritma MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) (Holder & Lewis, 2003). Pohon *Bayesian* dianalisis menggunakan *BEAUti* untuk setiap 10.000.000 generasi. Perkiraan waktu divergensi genetik dilakukan menggunakan aplikasi *BEAST* versi 1.8.4. Kemudian, hasil pohon evolusi diamati menggunakan aplikasi *Figtree* versi 1.4.4.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakterisasi Klon Mangga Madu Berdasarkan Karakter Morfologi

4.1.1 Hasil Karakterisasi Morfologi Klon Mangga Madu

Klon mangga madu koleksi IP2TP Cukurgondang memiliki beberapa karakter morfologi yang beragam dan seragam (Lampiran 16). Terdapat 11 karakter beragam dari total 20 karakter morfologi yang diamati. Karakter-karakter beragam tersebut antara lain tipe pohon (Lampiran 1), bentuk kanopi pohon (Lampiran 2), bentuk pertumbuhan pohon (Lampiran 3), susunan daun terhadap batang (Lampiran 5), panjang daun (Lampiran 6), lebar daun (Lampiran 7), panjang tangkai daun (Lampiran 8), bentuk ujung daun (Lampiran 9), bentuk pangkal daun (Lampiran 10), aroma daun, dan warna daun muda (Lampiran 12). Selain memiliki beberapa karakter yang beragam tersebut, klon mangga koleksi IP2TP juga memiliki karakter yang seragam. Sebagaimana yang telah dijelaskan dalam firman Allah pada surah Al-An'am ayat 99 yang berbunyi:

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

“Dan Dialah yang menurunkan air dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan, maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau, Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang kurma, mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya pada waktu berbuah, dan menjadi masak. Sungguh, pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.”

Ayat di atas memperlihatkan kekuasaan Allah SWT tentang penciptaan berbagai macam tumbuhan melalui air hujan. Allah menumbuhkan bermacam tumbuhan dengan keberagaman morfologi, fisiologi, dan genetiknya. Kemudian Allah SWT memerintahkan ummat manusia untuk memperhatikan segala jenis tumbuhan ketika sudah berbuah, penampakan dari perbedaan bunganya, warna, dan perbedaan tumbuhan dengan bentuk yang bermacam-macam (Jawhari, 1929). Disebutkan dalam ayat 99 surah Al-An'am, "*Kami keluarkan pula zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa*", penggalan ini menjelaskan bahwa setiap buah, termasuk zaitun dan delima, memiliki ciri masing-masing dimana terdapat perbedaan tetapi juga memiliki kesamaan (Al-Baidhawi, 2000). Seperti halnya pada penelitian ini, setiap klon mangga madu maupun kuweni memiliki ciri morfologi yang bermacam-macam, meskipun dalam satu marga yaitu Mangifera. Karakter yang menjadi pembeda antara kedua klon mangga tersebut adalah pada morfologi daunnya. Selain itu, juga terdapat karakter-karakter seragam antara keduanya. Keragaman morfologi tumbuhan tersebut telah dijelaskan dalam Al-Qur'an surah Asy-syu'ara' ayat 7, yang berbunyi:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

"Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?"

Ayat tersebut menjelaskan perihal penciptaan Allah SWT terhadap tumbuhan yang bermacam di bumi. Terdapat kata yang ditekankan dalam ayat

tersebut, yaitu pada lafadz يَرُؤَا, yang bermakna memperhatikan. Maksud lafadz tersebut adalah untuk mengarahkan pandangan manusia untuk memperhatikan seluruh bumi, tumbuh-tumbuhan dan segala keajaiban yang terdapat pada tumbuhan. Kemudian lafadz زُوجٍ, yang artinya tumbuh-tumbuhan (Al-Qurthubi, 2006). Setiap tumbuhan memiliki perbedaan dalam segala hal, termasuk bunganya. Bahwasannya, dalam satu bunga tersebut ada dua jenis kelamin, jantan dan betina. Hal ini merujuk pada pembagian bentuk tubuh tumbuhan atau yang disebut morfologi tumbuhan (Jawhari, 1929). Seperti halnya pada penelitian ini, selain dari penampakan morfologinya, keragaman tumbuhan juga ditunjukkan dengan materi genetik yang tersusun di setiap individu tumbuhan mangga. Dimana setiap tumbuhan memiliki ciri khasnya masing-masing dan kemudian dapat mengelompokkan tumbuhan ke dalam kelompoknya masing-masing (Shihab, 2006). Penciptaan Allah terkait dengan tumbuh-tumbuhan dapat dipahami oleh orang-orang yang menggunakan akalannya untuk memperhatikan, memikirkan, serta mengkajinya lebih dalam. Seperti halnya pada surah Ali Imran ayat 190, yang berbunyi:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ

“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal”.

Kandungan ayat QS. Ali Imran : 190, Allah SWT menjelaskan bahwa untuk memperoleh pengetahuan sebagai kebenaran yang objektif, maka manusia harus berakal. *Ulul albab* berasal dari dua kata, yaitu *uluu* yang berarti *yang memiliki*, dan *al-albab* merupakan jamak dari *al-lubb*, yang berarti *bagian penting dari sesuatu* atau *saripati sesuatu* (Shihab, 2011). Al-Maraghi (2006),

menafsirkan bahwa *ulul albab* merupakan orang-orang yang mampu menggunakan pikirannya dalam mengambil faedah dan hidayah serta menggambarkan keagungan karunia-Nya dalam segala sikap. Salah satu tanda keagungan Allah adalah diciptakannya variasi klon dalam mangga, serta pengelompokan yang terbentuk berdasarkan ciri morfologinya yang tampak. Sebagai orang yang mampu berpikir dan memiliki pengetahuan luas, para *ulul albab* seharusnya dapat mengamalkan dan menerapkan keilmuannya dalam mengelola bumi sebaik-baiknya (Shihab, 2011).

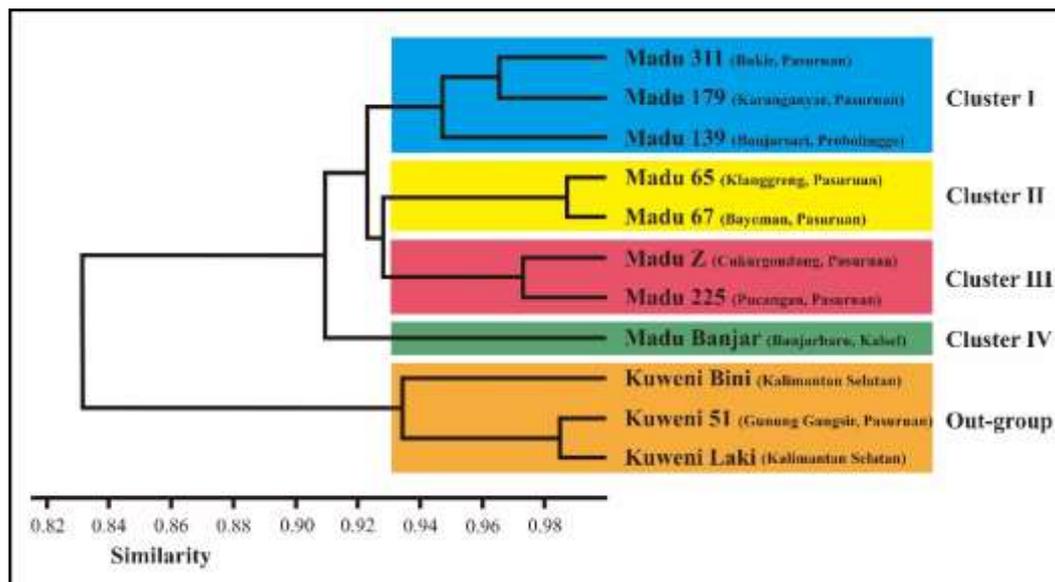
Terdapat karakter khas pada semua klon mangga kuweni yang membedakannya dengan klon mangga madu. Karakter tersebut terletak pada morfologi daunnya, klon mangga kuweni bentuk helai daun *elliptic*, tepi daun rata, tekstur daun kasar (*coriaceous*) (Lampiran 10A). Klon mangga madu memiliki bentuk helai daun *lanceolate*, tepi daun bergelombang, tekstur daun seperti kertas (*chartaceous*) (Lampiran 10B). Hal tersebut dikarenakan klon mangga kuweni termasuk dalam *Mangifera odorata*, sehingga memiliki karakter yang berbeda dengan klon mangga madu (*Mangifera indica* L. cv. Madu). Bentuk helai daun *Mangifera indica* memiliki beberapa variasi, tetapi umumnya berbentuk jorong dengan ukuran 8-40 cm x 2-10 cm dan tepi daun bergelombang dengan ujung daunnya meruncing (Oktavianto dkk., 2015).

Sebanyak 11 klon mangga koleksi IP2TP Cukurgondang memiliki beberapa karakter morfologi yang seragam. Diantaranya yaitu karakter tipe pelvinus tebal dan menyudut, sudut antara tulang daun primer dan sekunder yaitu lebih besar daripada 60°, terdapat lekukan pada tulang daun sekunder, tidak ada indumentum pada daun, permukaan atas daun tua berwarna hijau tua, dan

permukaan bawah daun tua berwarna hijau pucat. Karakter-karakter ini menjadi karakter sinapomorfi, karena seluruh aksesi memiliki semua karakter tersebut. Karakter sinapomorfi merupakan karakter unik yang diturunkan dari nenek moyang dan dimiliki seluruh anggota taksa atau klade (Turjak & Trontelj, 2012). Menurut Orwa *et al.* (2009), mangga umumnya memiliki salah satu karakter berupa tulang daun sekunder mengarah ke ujung daun, sehingga membentuk sudut. Sudut ini berukuran lebih dari 60° .

4.1.2 Pengelompokan dan Nilai Similaritas Klon Mangga Madu

Penentuan jumlah cluster didasarkan pada nilai minimum similaritas. Nilai minimum similaritas pada penelitian ini adalah ≥ 0.93 . Apabila nilai similaritasnya ≥ 0.93 , maka mangga tersebut dianggap sebagai satu kelompok. Sebaliknya, apabila nilai similaritas < 0.93 , maka mangga tersebut dianggap tidak satu kelompok. Sebelas klon mangga terbagi menjadi 4 cluster *in-group* dan 1 cluster *out-group* (Gambar 4.1). Cluster I ditempati oleh klon madu 311 (Bukir, Pasuruan), madu 179 (Karanganyar, Pasuruan), madu 139 (Banjarsari, Probolinggo). Dimana pada cluster tersebut memiliki 14 karakter yang seragam (synapomorphy). Karakter sinapomorfi tersebut diantaranya adalah panjang daun, lebar daun, dan bentuk tepi daun bergelombang (Gambar 4.2). Terdapat karakter pembeda pada cluster ini, yang membedakannya dengan cluster lain yaitu bentuk kanopi pohon *semi-circular*.



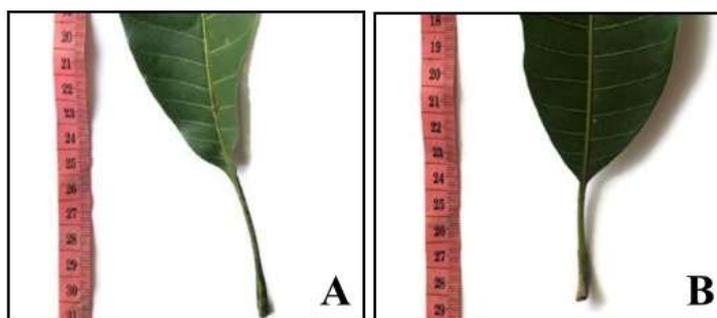
Gambar 4.1. Fenogram klon mangga madu berdasarkan karakter morfologi menggunakan indeks similaritas Bray-curtis

Cluster II terdiri dari klon madu 65 (Klanggrog, Pasuruan) dan madu 67 (Bayeman, Pasuruan). Klon mangga tersebut berkelompok menjadi satu cluster dikarenakan terdapat 19 karakter seragam. Kedua klon mangga tersebut memiliki kekerabatan yang dekat, dengan dibuktikan oleh nilai koefisien similaritasnya sebesar 0,99 (Tabel 4.1). Karakter sinapomorfi pada cluster ini diantaranya adalah tipe pelvinus tebal dan menyudut, panjang dan lebar daun tergolong sedang (skoring karakter pada interval 2), dan panjang tangkai daun tergolong sedang (3,5-5 cm) (Gambar 4.3). Terdapat karakter pembeda pada cluster ini yaitu bentuk kanopi pohon oblong. Kelompok III ditempati oleh klon mangga madu 225 (Pucangan, Pasuruan) dan madu Z (Cukurgondang, Pasuruan). Kedua klon tersebut berkelompok menjadi satu cluster dikarenakan memiliki 18 karakter yang seragam. Cluster ini memiliki nilai koefisien similaritas sebesar 0,97. Klon tersebut memiliki karakter sinapomorfi diantaranya adalah bentuk helai daun

lanceolate, bentuk pertumbuhan pohon *erect*, susunan daun terhadap batang *semi-erect* (terangkat) (Gambar 4.4).



Gambar 4.2. Karakter seragam pada Cluster I (bentuk tepi daun bergelombang). A) daun mangga madu 311 (Bukir, Pasuruan); B) daun mangga madu 179 (Karanganyar, Pasuruan), dan C) daun mangga madu 139 (Banjarsari, Pasuruan).

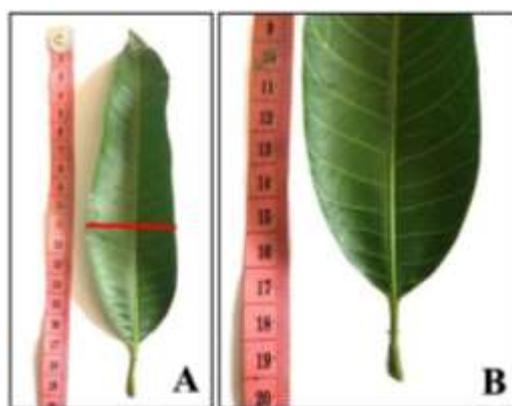


Gambar 4.3. Karakter seragam pada Cluster II (panjang tangkai daun tergolong sedang). A) mangga madu 65 (Klanggeng, Pasuruan); B) mangga madu 67 (Bayeman, Pasuruan).



Gambar 4.4. Karakter seragam pada Cluster III (susunan daun terhadap batang *semi-erect*). A) mangga madu 225 (Pucangan, Pasuruan); B) mangga madu Z (Cukurgondang, Pasuruan).

Cluster IV terdiri dari satu klon yaitu madu banjar (Banjarbaru, Kalimantan Selatan). Klon ini memiliki karakter yang membedakannya dengan klon mangga madu lainnya yaitu lebar daun tergolong pendek sekitar 3-5 cm, dan panjang tangkai daun juga pendek sekitar 2-3,5 cm (Gambar 4.5). Karakter ini merupakan karakter autapomorfi dimana terdapat karakter unik atau khas pada sebuah taksa (Choudhuri, 2014). Cluster V yang terdiri dari 3 klon mangga *out-group* yaitu kuweni bini (Kalimantan Selatan), kuweni 51 (Gunung Gangsir, Pasuruan), dan kuweni laki (Kalimantan Selatan). Pengelompokan dari ketiga klon tersebut yang berkerabat dekat adalah kuweni 51 dan kuweni laki dengan nilai similaritas sebesar 0,99. Ketiga *out-group* tersebut berkelompok menjadi satu cluster karena memiliki 16 karakter morfologi yang sama. Karakter daun yang paling khas pada klon mangga kuweni yang membedakannya dengan klon *in-group*. Cluster *out-group* ini memiliki bentuk helai daun *elliptic* (Lampiran 4B), tekstur daun kasar (*coriaceous*), bentuk tepi daun rata (Gambar 4.5), dan warna daun muda cokelat kemerahan (Lampiran 12C).



Gambar 4.5. Karakter pembeda pada cluster IV (madu banjar dari Kalimantan Selatan). A) lebar daun tergolong pendek (3-5 cm), dan B) panjang tangkai daun pendek (2-3,5 cm).



Gambar 4.6. Karakter seragam pada Cluster V (bentuk tepi daun rata). A) daun mangga kuweni 51 (Gunung Gangsir, Pasuruan); B) daun mangga kuweni laki (Kalimantan Selatan); C) daun mangga kuweni bini (Kalimantan Selatan).

Hubungan kekerabatan antara klon mangga dapat ditunjukkan dengan nilai koefisien similaritas berdasarkan indeks Bray-Curtis (Tabel 4.1). Nilai similaritas menunjukkan bahwa klon mangga tersebut memiliki hubungan kekerabatan berdasarkan hasil analisis morfologi. Fungsi dari nilai koefisien ini adalah untuk menentukan jarak kekerabatan antar taksa berdasarkan jumlah kemiripan ciri morfologinya. Nilai koefisien similaritas dari seluruh klon mangga berada pada rentang nilai 0,78 hingga 0,99. Nilai similaritas terendah dari seluruh aksesi dimiliki antara mangga madu 139, madu banjar dan madu Z dengan kuweni bini yaitu sebesar 0,78. Hal ini menunjukkan bahwa klon mangga madu tersebut memiliki jarak kekerabatan yang jauh dengan kuweni bini. Kuweni bini termasuk dalam spesies *Mangifera odorata*, sehingga kekerabatannya jauh dengan madu 139, madu banjar dan madu Z yang termasuk dalam spesies *Mangifera indica*.

Nilai koefisien terendah dalam *in-group* adalah madu banjar dan madu 311, dengan nilai similaritas sebesar 0,88, dan memiliki 12 karakter sinapomorfi. Nilai koefisien kemiripan berhubungan dengan ukuran kedekatan atau jarak kekerabatan suatu taksa (Azizah *et al.*, 2019). Suatu taksa dapat dikatakan berhubungan jauh apabila memiliki nilai koefisien similaritas kurang dari 0,60 atau 60%. Sebaliknya, jika suatu taksa dikatakan berhubungan dekat, maka taksa

tersebut akan memiliki nilai koefisien yang tinggi (mendekati nilai 1.0) (Trimanto, 2012).

Nilai koefisien similaritas tertinggi pada *in-group* dimiliki oleh mangga madu 65 dengan madu 67 yaitu sebesar 0,99. Selain dalam *in-group*, nilai koefisien similaritas tertinggi pada *out-group* juga dimiliki oleh kuweni laki dan kuweni 51 yaitu sebesar 0,99. Hal ini menunjukkan bahwa klon mangga madu dan kuweni tersebut memiliki jarak kekerabatan yang dekat. Keberagaman suatu populasi ditunjukkan dengan adanya hubungan kekerabatan antar jenis atau kultivar. Semakin dekat jarak kekerabatan, maka semakin rendah keberagaman dalam suatu populasi itu yang disebabkan oleh rendahnya jumlah karakter yang beragam (Gusmiati, 2018).

Tabel 4.1 Koefisien similaritas klon mangga berdasarkan karakter morfologi

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
A	1										
B	0,99	1									
C	0,91	0,93	1								
D	0,92	0,93	0,95	1							
E	0,95	0,94	0,94	0,91	1						
F	0,93	0,94	0,94	0,97	0,93	1					
G	0,92	0,91	0,91	0,91	0,97	0,93	1				
H	0,92	0,94	0,94	0,89	0,92	0,88	0,89	1			
I	0,89	0,88	0,83	0,81	0,86	0,82	0,83	0,83	1		
J	0,86	0,85	0,78	0,81	0,81	0,79	0,78	0,78	0,94	1	
K	0,87	0,84	0,84	0,82	0,87	0,83	0,84	0,82	0,99	0,93	1

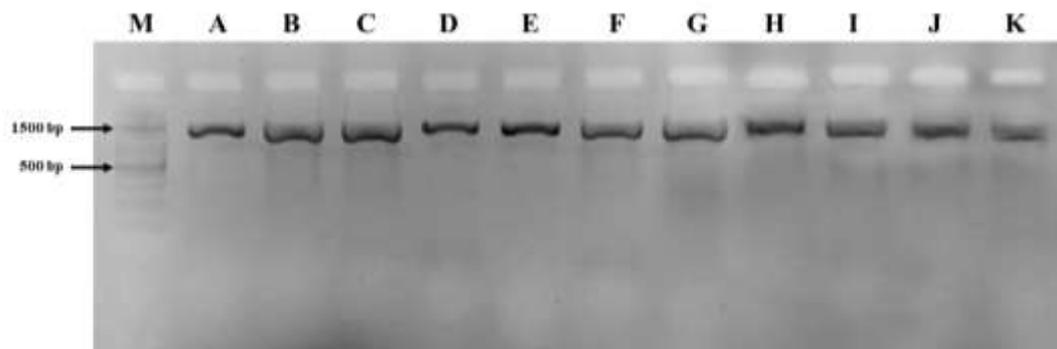
Keterangan: A (Mangga Madu 65); B (Mangga Madu 67); C (Mangga Madu 139); D (Mangga Madu 179); E (Mangga Madu 225); F (Mangga Madu 311); G (Mangga Madu *Seedling/Z*); H (Mangga Madu Banjar); I (Kuweni Laki); J (Kuweni Bini); K (Kuweni 51).

4.2 Karakterisasi Klon Mangga Madu Berdasarkan Gen *rbcL*

4.2.1 Analisis Hasil Amplifikasi

Sebelas klon mangga berhasil diisolasi dan diamplifikasi menggunakan primer gen *rbcL* 1 dan 2. Dimana dari total 11 klon tersebut terdiri dari 8 klon *in-group* (A-H) dan 3 klon *outgroup* (I-K) (Gambar 4.6). Hasil amplifikasi dapat dianalisis kualitasnya dengan uji kualitatif DNA menggunakan elektroforesis gel agarose. Adapun beberapa faktor yang mempengaruhi hasil visualisasi band (pita) DNA diantaranya adalah panjang gelombang UV, reagen atau buffer yang digunakan, kondisi UV transilluminator, waktu dan tegangan selama elektroforesis berlangsung (Lee *et al.*, 2012).

Sebelas sampel DNA yang telah diuji menunjukkan hasil dengan panjang sekuen yang hampir sama, yaitu berkisar pada panjang 1500 bp (*base pair*). Hal ini sesuai dengan pendapat Letchuman (2018), bahwa gen *rbcL* mempunyai panjang penuh sekitar 1400 bp (*base pair*). Hasil visualisasi amplifikasi DNA sampel diperoleh pita tunggal (Gambar 4.6). Pita tunggal yang muncul tersebut mengonfirmasi bahwa primer yang digunakan telah spesifik menempel pada target gen *rbcL*. Faktor yang mempengaruhi keberhasilan amplifikasi DNA antara lain kualitas DNA genom, primer yang digunakan, pengaturan suhu pada saat siklus PCR berlangsung terutama suhu *annealing*, kontaminan DNA, dan degradasi DNA (Kadri, 2019; Lorenz, 2012).



Gambar 4.7. Visualisasi hasil amplifikasi menggunakan primer *rbcL* 1 dan 2. M) Marker; A) Madu 65; B) Madu 67; C) Madu 139; D) Madu 179; E) Madu 225; F) Madu 311; G) Madu *Seedling* (Z); H) Madu Banjar; I) Kuweni Laki; J) Kuweni Bini; K) Kuweni 51

4.2.2 Analisis Hasil Sekuensing

Analisis hasil sekuensing sampel DNA dilakukan menggunakan aplikasi *Seqscanner* versi 2.0. Aplikasi *Seqscanner* menyediakan lampiran data berupa nilai QV (*Quality Value*), CRL (*Contiguous Read Length*), nilai QV20+, *electrophenogram*, *sequence view*, data Raw dan EPT. Nilai QV merupakan perkiraan akurasi per-basa pada sekuen sampel (Gaffar & Sumarlin, 2020). Data yang disajikan berupa *bar chart* (grafik batang) berwarna dan angka yang terdapat diatas basa nukleotida pada laporan *electrophenogram*. Tinggi dan warna bar menunjukkan nilainya, semakin tinggi bar maka semakin tinggi pula nilai QV (Applied Biosystems, 2012). Warna biru menunjukkan *pure base* dengan nilai QV ≥ 20 dengan peluang kesalahan (*Probability error/Pe*) sebesar 1%. Warna kuning menunjukkan komposisi *pure base* medium (15-19), dan warna merah memiliki komposisi *pure base* yang rendah (≤ 15) (Gaffar & Sumarlin, 2020). Hasil analisis sekuen gen *rbcL* 11 sampel mangga diperoleh data basa dengan nilai QV20+ rata-rata 1090 dari panjang rata-rata 1187 basa (Lampiran 13).

Analisis *electrophenogram* memuat informasi data yang menggambarkan intensitas setiap sinyal *fluorescent*. *Electrophenogram* menunjukkan visual berupa grafik gelombang (Lampiran 14). Warna-warna yang muncul pada setiap gelombang menandakan jenis basanya. Warna biru menunjukkan basa sitosin (C), warna hijau untuk adenine (A), hitam untuk guanine, dan merah untuk basa timin (T) (Applied Biosystems, 2012). Data yang menunjukkan nilai tinggi memiliki kriteria, diantaranya: resolusi puncak gelombang yang jelas dan terdefinisi dengan baik, fluoresensi minimal tumpang tindih dari satu puncak ke puncak berikutnya, jarak puncak konsisten di semua urutan basa. Ketinggian puncak mencirikan urutan kualitas yang baik. Puncak yang rendah menunjukkan nilai QV yang rendah pula (Futschik *et al.*, 2009; McGrath, 2014).

4.2.3 Variasi Genetik Klon Mangga Madu

Sebelas sampel klon mangga koleksi IP2TP dianalisis homologi nukleotidanya dengan melakukan BLAST. Hasil BLAST menyajikan data berupa persentase nilai *Query cover*, nilai *E-value*, dan nilai *Identity*. Setiap sampel memiliki nilai *E-value* 0.0, dimana nilai tersebut menunjukkan tingkat homologi antara sampel dengan data GenBank (Bagus dkk., 2019). Nilai *E-value* yang kecil (lebih kecil dari 0.01), menunjukkan bahwa homologi antara sekuen dengan database semakin tinggi. Sebaliknya, apabila nilai *E-value* lebih besar dari 0.0, maka kedua sekuen memiliki kemiripan yang rendah (Claverie & Notredame, 2003). Selain nilai *E-value*, terdapat data yang menunjukkan kemiripan antar sampel dengan database yaitu nilai *Query cover*. *Query cover* merupakan persentase nilai yang menunjukkan jumlah urutan yang selaras dengan database.

Nilai *Query cover* yang mendekati 100% memiliki kemiripan yang tinggi antar sekuen sampel dan database (Newell *et al.*, 2013). Hasil BLAST menunjukkan nilai *Query cover* tertinggi mencapai 99% pada sampel A sampai J, dan terendah adalah 92% pada sampel I (kuweni laki) (Tabel 4.2).

Nilai *Identity* menunjukkan seberapa mirip urutan sampel dengan sekuen database yang telah diselaraskan. Semakin tinggi nilai persen *Identity*, maka semakin signifikan kemiripannya. Semua sampel menunjukkan nilai *Identity* yang mendekati 100%, yaitu berkisar antara 97% sampai 99%. Sampel A-G yaitu klon mangga madu, menunjukkan hasil BLAST yang sesuai dengan database, yaitu termasuk dalam spesies *Mangifera indica*. Namun, hal tersebut tidak berlaku pada sampel H yaitu madu banjar. Sampel H seharusnya memiliki kemiripan dengan *Mangifera indica*, namun setelah proses BLAST, sampel tersebut menunjukkan kemiripan yang tinggi (98%) dengan spesies *Mangifera longipes*. Hal tersebut juga terjadi pada klon *out-group*, yaitu sampel I (kuweni laki), J (kuweni bini), dan K (kuweni 51). Dimana seharusnya ketiga sampel klon kuweni tersebut memiliki kecocokan dengan *Mangifera odorata*, namun setelah BLAST memiliki kemiripan dengan spesies *Mangifera longipes*. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan terdapat kesalahan penamaan pada klon mangga koleksi IP2TP. Oleh karena itu, perlu adanya tinjauan ulang mengenai perbaikan tata nama pada beberapa klon mangga tersebut, tujuannya supaya tidak terjadi kesalahan dalam penyebutan klon.

Tabel 4.2 Hasil BLAST sekuen *rbcL* dari 11 klon mangga

Code	Mango Clone	Description	Query cover	E-value	Identity (%)	Accession number
A	Madu 65	Mangifera indica chloroplast, complete genome	99%	0.0	99.26	MN711724.1
B	Madu 67	Mangifera indica chloroplast, complete genome	99%	0.0	98.28	MN711724.1
C	Madu 139	Mangifera indica chloroplast, complete genome	99%	0.0	99.21	MN711724.1
D	Madu 179	Mangifera indica chloroplast, complete genome	99%	0.0	99.01	MN711724.1
E	Madu 225	Mangifera indica chloroplast, complete genome	99%	0.0	98.69	MN711724.1
F	Madu 311	Mangifera indica chloroplast, complete genome	99%	0.0	98.93	MN711724.1
G	Madu Z	Mangifera indica chloroplast, complete genome	99%	0.0	99.32	MN711724.1
H	Madu Banjar	Mangifera longipes plastid, complete genome	99%	0.0	98.02	MN917210.1
I	Kuweni Laki	Mangifera longipes plastid, complete genome	92%	0.0	97.87	MN917210.1
J	Kuweni Bini	Mangifera longipes plastid, complete genome	99%	0.0	98.37	MN917210.1
K	Kuweni 51	Mangifera longipes plastid, complete genome	99%	0.0	98.32	MN917210.1

Komposisi basa nukleotida sekuen *rbcL* dari 11 klon mangga ditunjukkan pada Tabel 4.3. Sebelas sampel klon mangga memiliki nilai rata-rata basa timin (T) sebesar 28,9%, sitosin (C) 19,8%, adenin (A) 28,1%, dan guanin (G) 23,2% (Tabel 4.3). Berdasarkan data tersebut, diketahui bahwa persentase tertinggi

komposisi basa adalah timin dan adenine. Hal ini juga sesuai dengan jurnal Awomukwu *et al.* (2015), yang menjelaskan bahwa komposisi nukleotida pada marker *rbcL* yang menunjukkan jumlah tertinggi adalah basa timin dan adenine. Menurut Manurung *et al.* (2018), pada daerah DNA kloroplas, *non-coding* maupun *coding region*, komposisi nukleotida yang paling banyak adalah adenine dan timin.

Sekuen gen *rbcL* telah disejajarkan dari 11 klon mangga dengan panjang basa yaitu sekitar 1117 *base pair*. Hal ini sesuai dengan pendapat Bell *et al.* (2017), bahwa panjang pasang basa pada sekuen *rbcL* berkisar pada 501-1500 bp. *Conserved region* (daerah monomorfik) berjumlah 1088 bp, yang terdiri dari tiga region. Region 1 berada pada urutan basa ke 5 sampai 395, region 2 di urutan ke 410-632, dan region 3 pada urutan ke 799-926. Menurut Nagar & Hahsler (2013), *conserved region* menunjukkan adanya kesamaan urutan basa antar segmen atau wilayah yang sangat mirip pada beberapa urutan basa nukleotida. *Variable sites* (daerah polimorfik) berjumlah 22 bp, yang terdiri dari 10 bp *singleton variable site* dan 12 bp *parsimony informative sites*. Terdapat urutan basa dengan *missing data* atau *alignment gaps* berjumlah 7 bp.

Variable sites juga dapat menunjukkan jumlah total mutasi pada urutan basa tersebut. Menurut Rachma (2017), *singleton* merupakan autopomorfik dalam sekuen basa nukleotida, dimana *singleton* ini menunjukkan variasi perubahan basa yang hanya terjadi pada satu urutan basa dan satu individu saja. Sedangkan *parsimony informative sites* menunjukkan adanya perbedaan jumlah substitusi untuk menjelaskan variasi pada urutan basa tersebut yang terjadi karena evolusi dalam jangka waktu yang panjang (Retnaningati, 2017). *Singleton variable*

berjumlah 10 bp ini berada pada urutan basa nomor 3, 649, 798, 970, 987, 1049, 1067, 1068, 1089, dan 1116. Kemudian *parsimony informative* berjumlah 12 bp berada pada basa urutan ke 396, 409, 633, 722, 724, 734, 750, 754, 785, 927, 1062, dan 1073. Berdasarkan hasil analisis mutasi basa nukleotida tersebut, sekuen DNA *rbcL* menunjukkan variabilitas yang rendah. Sekuen *rbcL* merupakan daerah pengkodean cpDNA yang memiliki tingkat polimorfisme atau mutasi yang rendah, sehingga sekuen ini memiliki nilai variasi genetik yang rendah pula (Mursyidin *et al.*, 2021). Wilayah ini memiliki nilai *conserved region* yang tinggi dan substitusi nukleotida yang rendah, sehingga menyebabkan sedikit terjadi perubahan basa (Wang *et al.*, 2013).

Tabel 4.3 Komposisi basa nukleotida sekuen *rbcL* dari 11 klon mangga

Klon Mangga	Persen Basa (%)				Total Basa Sekuen
	T(U)	C	A	G	
Madu 65	28,9	19,8	28,2	23,1	1117,0
Madu 67	28,9	19,7	27,9	23,5	1116,0
Madu 139	28,9	19,9	28,2	23,0	1117,0
Madu 179	28,9	19,9	28,1	23,0	1116,0
Madu 225	29,0	19,9	28,2	22,9	1117,0
Madu 311	29,1	19,8	28,0	23,0	1116,0
Madu Z	28,9	19,8	28,1	23,2	1117,0
Madu Banjar	28,8	19,8	27,9	23,5	1117,0
Kuweni Laki	28,9	19,7	28,1	23,3	1117,0
Kuweni Bini	28,8	19,8	28,0	23,3	1114,0
Kuweni 51	28,7	19,7	28,0	23,6	1116,0
Rata-rata	28,9	19,8	28,1	23,2	1116,4

Analisis mutasi diungkapkan dalam Tabel 4.4, bahwa variasi genetik sekuen *rbcL* pada 11 klon mangga ini sebagian besar disebabkan karena adanya mutasi titik berupa substitusi. Mutasi titik merupakan perubahan pada susunan

basa dalam satu gen tunggal (DNA). Mutasi dapat terjadi karena kerusakan nukleotida pada molekul DNA atau kesalahan selama proses replikasi berlangsung. Mutasi titik terbagi dalam 2 kategori, yaitu transisi dan transversi. Transisi dapat diartikan dengan penggantian basa yang sejenis. Basa purin digantikan dengan basa purin lain (A, G), begitu juga dengan basa pirimidin digantikan oleh basa pirimidin lain (T, C) (Marks *et al.*, 1996). Substitusi transisi pada 11 klon mangga tersebut terjadi sebanyak 14 posisi, sedangkan substitusi transversi terjadi sebanyak 11 posisi. Transversi dapat diartikan sebagai penggantian basa pirimidin dengan basa purin ataupun sebaliknya. Diantara kedua jenis mutasi titik, transisi lebih sering terjadi daripada transversi (Sutapa dkk., 2016).

Mutasi paling banyak terjadi pada klon mangga madu banjar, kuweni laki, kuweni bini, dan kuweni 51 (Tabel 4.4). Keempat klon mangga tersebut memiliki hasil BLAST yang kemiripannya mencapai 99% dengan spesies *Mangifera longipes*, sedangkan klon mangga madu memiliki kemiripan dengan *Mangifera indica*. Hasil rekonstruksi pohon dengan pendekatan algoritma NJ dan MP juga mengungkapkan bahwa keempat klon tersebut berada dalam percabangan yang sama. Namun, madu banjar tidak termasuk satu cabang dengan klon kuweni. Menurut Warschefsky & von Wettberg (2019), perbanyakan klonal secara efektif dapat menghentikan proses domestikasi pada mangga dan melestarikan keragaman genetik dalam klon tersebut, yang menyebabkan mutasi pada tingkat klon tergolong rendah. Variasi dapat ditunjukkan dengan adanya perbedaan satu pasang basa nukleotida dari aksesori yang berbeda lokasi asal (Kairupan dkk., 2015).

Tabel 4.4 Variasi singletone sekuen *rbcL* dari 11 klon mangga

No.	Klon Mangga	Urutan Basa	Mutasi Basa	Total
1.	Madu 65			
2.	Madu 67	3, 4, 724, 970, 1095	A→G, A→G, A→T, A→G, T→G	5
3.	Madu 139	4, 987, 1062, 1116	A→G, G→A, A→C, G→A	4
4.	Madu 179	4, 724, 785, 1073	A→G, A→T, G→C, G→A	4
5.	Madu 225	4, 724, 750, 785, 1073	A→G, A→T, G→A, G→C, G→A	5
6.	Madu 311	4, 724, 750, 798	A→G, A→T, G→A, A→T	4
7.	Madu Z	4	A→G	1
8.	Madu Banjar	4, 396, 409, 649, 722, 734, 736, 750, 754, 927, 1089	A→G, G→T, C→G, A→G, T→G, A→G, T→G, G→A, C→T, A→C, T→C	11
9.	Kuweni Laki	396, 409, 633, 722, 734, 736, 754, 927	G→T, C→G, G→A, T→G, A→G, T→G, C→T, A→C	8
10.	Kuweni Bini	4, 396, 409, 633, 722, 734, 736, 754, 927, 1062	A→G, G→T, C→G, G→A, T→G, A→G, T→G, C→T, A→C, A→C	10
11.	Kuweni 51	4, 396, 409, 633, 722, 734, 736, 754, 927, 1049, 1067, 1068, 1095	A→G, G→T, C→G, G→A, T→G, A→G, T→G, C→T, A→C, T→G, A→G, G→A, T→G	13

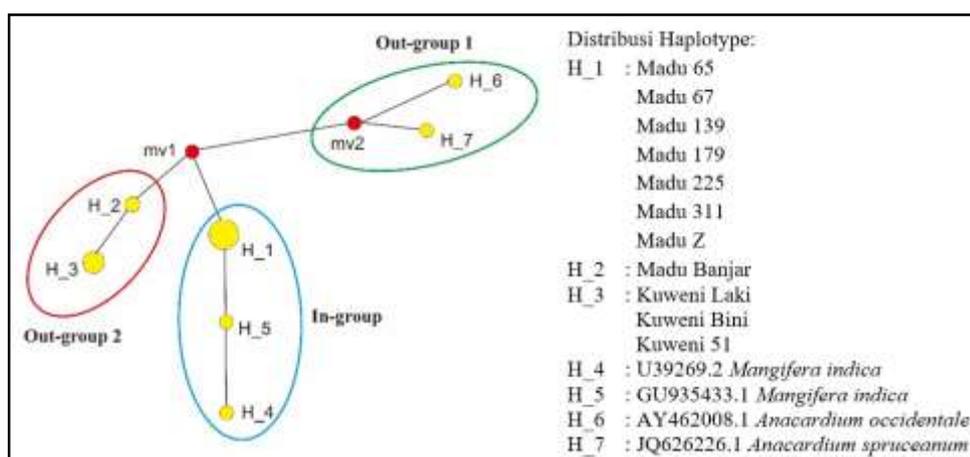
Gambar 4.8 menunjukkan jarak genetik dari 11 klon mangga. Jarak genetik dengan nilai terendah yaitu sebesar 0.000 dimiliki oleh madu Z dengan madu 65. Sedangkan nilai jarak genetik tertinggi yaitu 0.013 yang dimiliki oleh kuweni 51 dengan madu 225. Madu banjar dengan klon madu lainnya memiliki tingkat kesamaan genetik yang rendah, yaitu rentang nilai 0.008-0.011. Hal ini juga diungkapkan pada hasil BLAST dan pohon filogenetik, yang menunjukkan bahwa madu banjar berkerabat dekat dengan klon kuweni dan masih dalam satu spesies yang sama. Keekerabatan yang lebih dekat ditunjukkan dengan nilai genetik yang lebih kecil. Jadi, semakin tinggi jarak genetik, maka tingkat kesamaan genetik antar aksesori semakin rendah (Ramlah dkk., 2018).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Madu_65											
2. Madu_67	0.003										
3. Madu_139	0.003	0.005									
4. Madu_179	0.003	0.004	0.005								
5. Madu_225	0.004	0.005	0.006	0.001							
6. Madu_311	0.003	0.004	0.005	0.004	0.003						
7. Madu_Z	0.000	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003					
8. Madu_Banjar	0.008	0.011	0.011	0.011	0.010	0.009	0.008				
9. Kuweni_Laki	0.006	0.009	0.009	0.009	0.010	0.009	0.006	0.004			
10. Kuweni_Bini	0.007	0.010	0.008	0.010	0.011	0.010	0.007	0.005	0.001		
11. Kuweni_51	0.009	0.012	0.012	0.012	0.013	0.012	0.009	0.006	0.003	0.004	

Gambar 4.8. Jarak genetik 11 klon mangga

Hubungan haplotipe digambarkan menggunakan metode *median-joining network*. Metode tersebut menghasilkan deskripsi variasi klon mangga menjadi 7 haplotipe dengan 3 haplogroup (Gambar 4.9). Analisis keragaman haplotipe terbentuk mulai dari *out-group* pertama yaitu H_7 (*Anacardium spruceanum*) dan H_6 (*Anacardium occidentale*). Kemudian dari *out-group* tersebut mengalir ke jaringan *in-group* dan *out-group* kedua. Jaringan *in-group* terdiri dari H_1 yang semua aksesinya berasal dari Pasuruan (madu 65, madu 67, madu 179, madu 225, madu 311, dan madu Z) dan Probolinggo (madu 139), H_5 (U39269.2 *Mangifera indica*), dan H_4 (GU935433.1 *Mangifera indica*). Jaringan *out-group* kedua terdiri dari H_2 yang aksesinya berasal dari Banjarbaru, Kalimantan Selatan (madu banjar) dan H_3 yang aksesinya berasal dari Kalimantan Selatan (kuweni laki dan kuweni bini) dan Pasuruan (kuweni 51). Menurut Leitwein *et al.* (2020), informasi haplotipe dapat digunakan untuk mengestimasi aliran gen yang berasal dari *common ancestor* (nenek moyang). Berdasarkan hasil analisis keragaman tersebut, aliran jaringan dimulai dari haplotipe 6 dan 7 yang merupakan *out-group* dari genebank dengan marga *Anacardium*. Kemudian mengalir ke jaringan *out-group* kedua yaitu haplotipe 2 dan 3 yang terdiri dari semua klon kuweni dan

madu banjar, dimana klon tersebut termasuk dalam spesies *Mangifera longipes* (berdasarkan data BLAST). Kemudian aliran *in-group* yaitu haplotipe 1, 4, dan 5 yang terdiri dari seluruh klon madu kecuali madu banjar, dan termasuk dalam spesies *Mangifera indica*. Menurut Fitmawati dan Hayati (2018), *common ancestor* dari marga *Mangifera* berasal dari family *Anacardiaceae*, yang didalamnya terdapat 77 marga. Proses domestikasi pada tanaman mangga dapat menyebabkan terjadinya evolusi genom, diversifikasi, dan aliran gen yang berdampak pada keragaman genetik pada mangga (Warschefsky & von Wettberg, 2019).



Gambar 4.9. Distribusi haplotipe 11 klon mangga

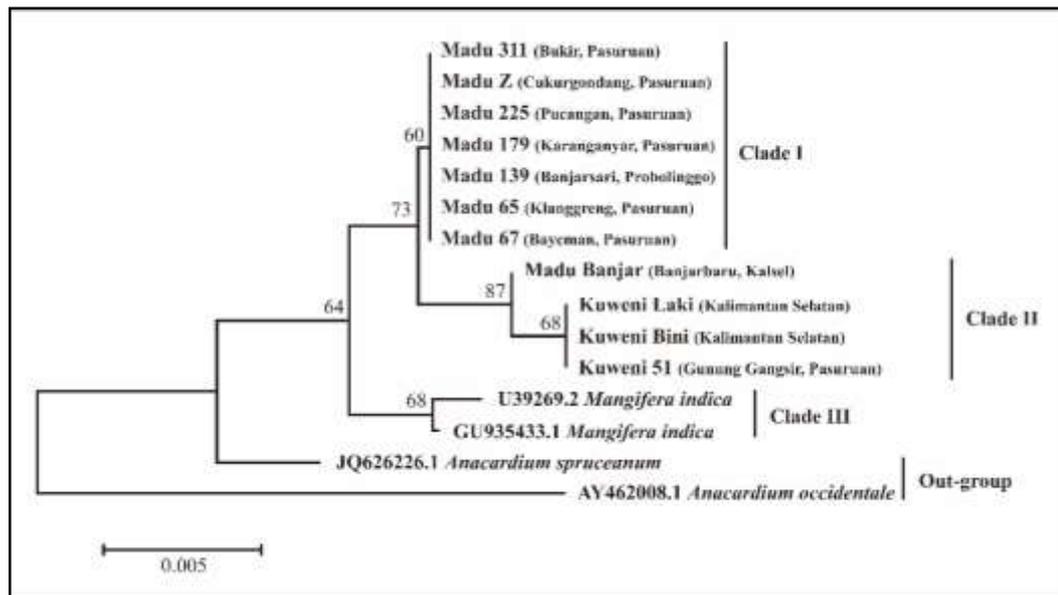
4.2.4 Hubungan Kekerabatan Klon Mangga Madu

Analisis filogenetik klon mangga madu menggunakan 2 macam algoritma, yaitu *Neighbor-Joining* (NJ) dan *Maximum Parsimony* (MP). Hasil rekonstruksi pohon disajikan pada Gambar 4.10 dan Gambar 4.11, dimana setiap pohon memiliki nilai bootstrap yang berbeda. Nilai bootstrap merupakan nilai yang menunjukkan kualitas atau kredibilitas suatu topologi pohon filogenetik.

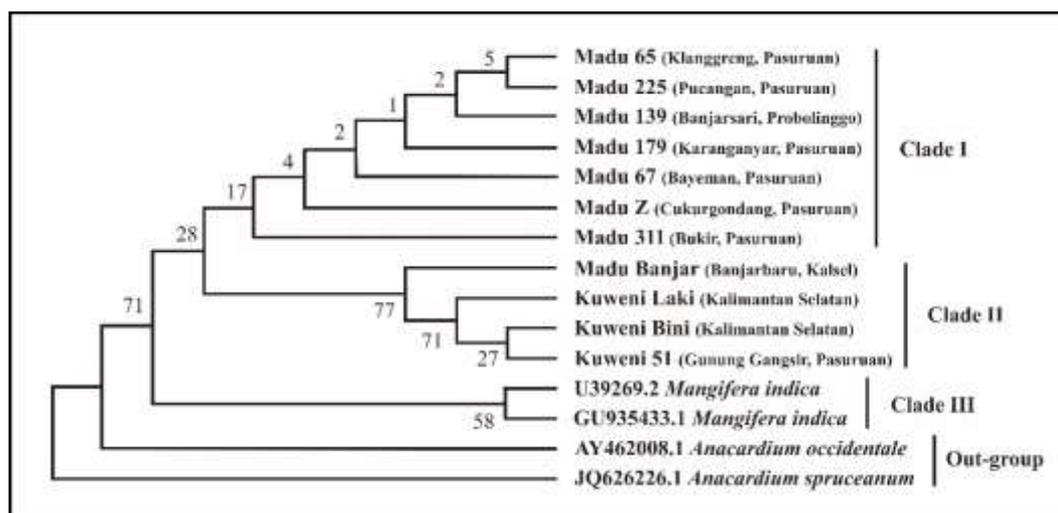
Umumnya ditafsirkan sebagai nilai probabilitas perkiraan pohon filogenetik yang mewakili filogeni yang sebenarnya. Suatu pohon filogenetik dikategorikan memiliki kredibilitas tinggi apabila memiliki nilai bootstrap $\geq 70\%$ (Bull dan Hillis, 1993). Nilai bootstrap dapat dikategorikan menjadi empat kategori, yaitu tinggi ($>85\%$), moderat (70-85%), lemah (50-69%), atau sangat lemah ($<50\%$) (Lestari dkk., 2018).

Analisis hubungan genetik klon mangga madu menggunakan algoritma NJ dan MP menghasilkan pohon yang terbagi menjadi 3 clade *in-group* dan 1 clade *out-group*. Clade pertama terdiri dari seluruh klon madu kecuali madu banjar. Clade kedua terdiri dari semua klon kuweni dan madu banjar. Kemudian clade ketiga terdiri dari 2 sekuen *Mangifera indica* yang diambil dari NCBI. Clade *out-group* terdiri dari 2 sekuen marga *Anacardium* yang juga diambil dari NCBI. Berdasarkan evaluasi nilai bootstrap, pada pohon NJ menunjukkan nilai bootstrap berada pada kisaran moderat hingga lemah (60-87%). Nilai bootstrap pada pohon MP berada pada kisaran moderat hingga sangat lemah (77-1%). Tinggi rendahnya nilai bootstrap dapat dipengaruhi oleh jumlah karakter polimorfisme (*singleton* dan *parsimony informative*) pada sekuen gen tersebut (Lestari dkk., 2018). Terdapat beberapa percabangan pohon yang membentuk politomi pada pohon NJ. Diantaranya pada percabangan klon madu dan klon kuweni. Hal ini dapat terjadi dikarenakan kurangnya *character state* pada urutan *alignment* yang dapat membedakan setiap taksa. Pohon politomi merupakan pohon yang tidak mampu memisahkan taksa satu dengan taksa lainnya, sehingga terbentuk lebih dari dua keturunan yang dekat pada satu nodus internal (Hidayat & Pancoro, 2008). Selain itu, penanda gen *rbcL* ini hanya sedikit menjelaskan tentang hubungan antar klon

pada mangga, namun peranannya dalam hal pemisahan clade untuk setiap marga cukup baik. Menurut Erkens dkk. (2007), penanda *coding* sekuen hanya sedikit berkontribusi dalam pengelompokan hubungan filogenetik.



Gambar 4.10. Rekonstruksi pohon filogenetik dengan metode *Neighbor-joining*



Gambar 4.11. Rekonstruksi pohon filogenetik dengan metode *Maximum Parsimony*

Diantara kedua metode rekonstruksi pohon tersebut yang memiliki kredibilitas nodus yang cukup baik adalah pohon NJ. Hal ini berdasarkan evaluasi nilai bootstrap dan pengelompokan klon mangga. Pohon NJ mampu memisahkan kelompok klon madu dan kuweni, meskipun terdapat satu klon madu yaitu madu banjar yang menjadi satu kelompok dengan klon kuweni. Hal ini dikarenakan madu banjar memiliki kemiripan yang tinggi dengan sekuen spesies *Mangifera longipes* berdasarkan hasil BLAST dan variasi *singleton* yang telah dijelaskan pada sub-bab sebelumnya. Meskipun pohon MP memiliki kisaran nilai bootstrap yang lebih rendah dibandingkan NJ, tetapi masih dapat memisahkan klon madu dan klon kuweni, sehingga dapat dikatakan bahwa pohon ini bersifat dikotom. Dimana sifat pohon dikotom merupakan topologi pohon yang dapat diterima (Lestari dkk., 2018).

4.3 Estimasi Waktu Divergensi Klon Mangga Madu

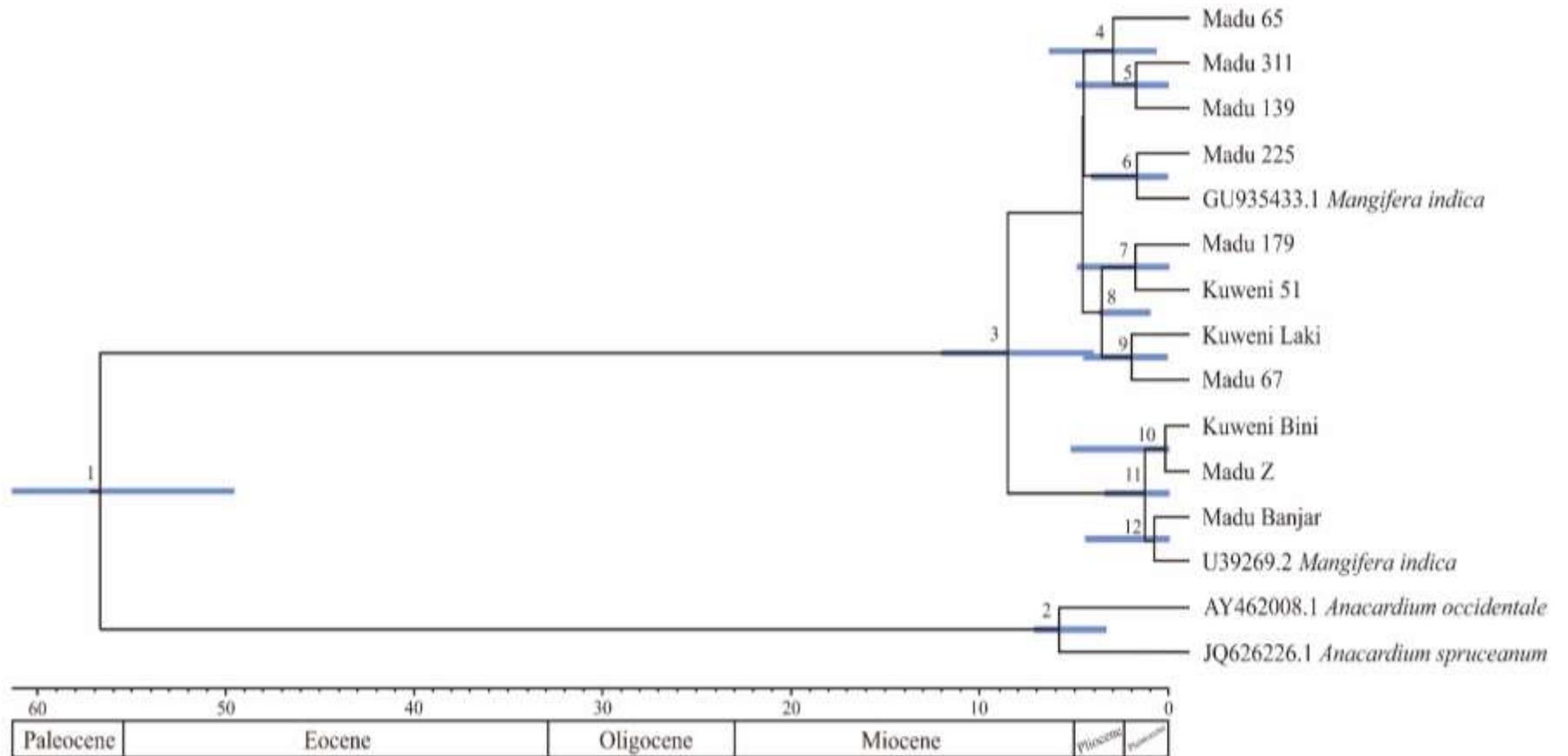
Hasil rekonstruksi pohon evolusi yang disimpulkan dari *BEAST* menunjukkan pemisahan antara marga *Mangifera* dengan *out-group* (*Anacardium*) terjadi pada zaman Paleocene atau sekitar 56,7 Mya (Gambar 4.12). Hasil estimasi waktu pemisahan spesies ini sesuai dengan penelitian Xie *et al.*, (2014). yang menjelaskan bahwa estimasi waktu divergensi antara marga *Anacardium* dan *Mangifera* diperkirakan pada 56,07 Mya (61-51,33 Mya). Fosil daun yang mirip *Mangifera* tertua ditemukan pada zaman Paleocene di timur laut India. Perkiraan fosil ini berevolusi di semenanjung India dan bermigrasi ke Asia. Kemudian terjadi diversifikasi di hutan hujan Malaysia dan Sumatra, setelah terbentuknya hubungan antara lempeng India dan Asia. Dalam hal ini, nenek moyang yang

berevolusi menjadi marga *Mangifera* modern tidak dapat dipastikan (Sawangchote *et al.*, 2009).

Demikian pula pada waktu divergensi antar marga *Mangifera* terjadi pada zaman Miocene yaitu pada 8,6 Mya (12-4 Mya) (Tabel 4.5). Estimasi ini sesuai dengan hasil penelitian dari Weeks *et al.* (2014), yang menyatakan pohon geografi evolusi pada *Anacardiaceae* mengungkapkan bahwa perpecahan antar marga *Mangifera* terjadi pada kisaran waktu 8-7 Mya. Zaman Miocene merupakan terbentuknya keanekaragaman hayati di wilayah Asia, karena iklim pada daerah ini relative hangat dan lembab sehingga mendukung tumbuhan untuk berkembang (Deng *et al.*, 2014). Pada zaman Miocene akhir tidak banyak terjadi diversifikasi mangga, tetapi seiring berjalannya waktu diversifikasi semakin banyak. Pliocene merupakan awal dari banyaknya diversifikasi mangga dan terus berlangsung sampai zaman Pleistocene. Pada *Pliocene epoch* kondisi bumi sedang mengalami periode hangat. Pertengahan Pliocene adalah periode terbaru dengan CO₂ atmosfer sebanding dengan saat ini, dengan suhu permukaan rata-rata 1-8 °C hingga 3,6 °C lebih hangat, mulai berkurang lapisan es, dan naiknya permukaan air laut (Burke *et al.*, 2018).

Tabel 4.5 Estimasi waktu divergen 11 klon mangga

Nodus	Waktu Divergensi	Keterangan
1	56,7 (CI 49.6 – 61.5 Mya)	Marga <i>Mangifera</i> / Marga <i>Anacardium</i>
2	5,9 (CI 3.4 – 7.1 Mya)	<i>Anacardium occidentale</i> / <i>Anacardium spruceanum</i>
3	8,6 (CI 4 – 12 Mya)	<i>Mangifera</i> group / <i>Mangifera</i> group
4	3 (CI 0.7 – 6.3 Mya)	Madu 65 / Madu 311 + Madu 139
5	1.8 (CI 0 – 5 Mya)	Madu 311 / Madu 139
6	1.8 (CI 0 – 4.1 Mya)	Madu 225 / GU935433.1 <i>Mangifera indica</i>
7	1.8 (CI 0 – 5 Mya)	Madu 179 / Madu 51
8	3.7 (CI 1.0 – 3.8 Mya)	Madu 179 + Kuweni 51 / Kuweni Laki + Madu 67
9	2 (CI 0 – 4.6 Mya)	Kuweni Laki / Madu 67
10	1.3 (CI 0 – 5.2 Mya)	Kuweni Bini / Madu Z
11	1.2 (CI 0 – 3.5 Mya)	Kuweni Bini + Madu Z / Madu Banjar + <i>Mangifera indica</i>
12	0.9 (CI 0 – 4.5 Mya)	Madu Banjar / U39269.2 <i>Mangifera indica</i>



Gambar 4.12. Pohon filogenetik estimasi waktu divergensi dari 11 klon mangga

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah:

1. Pengelompokan klon mangga madu berdasarkan karakter morfologi terbagi menjadi 5 cluster in-group dan 1 cluster out-group. Pengelompokan ini sedikit berbeda dengan molekuler, karena terdapat satu klon yaitu madu banjar, yang perlu diklarifikasi penamaan spesiesnya. berdasarkan hasil analisis molekuler, madu banjar berkerabat dekat dengan klon kuweni.
2. Variasi genetik klon mangga berdasarkan penanda molekuler tergolong rendah. Hal tersebut disebabkan karena sekuen gen *rbcL* memiliki wilayah *conserved* yang tinggi dan jumlah mutasi variasi singletone yang rendah. Hubungan kekerabatan klon mangga berdasarkan penanda *rbcL* terbagi menjadi 3 clade in-group dan 1 clade out-group. Semua klon madu berada dalam satu percabangan politomi, kecuali madu banjar. Dimana madu banjar berkelompok dengan klon kuweni.
3. Evolusi klon mangga dimulai pada zaman Miocene yaitu pada 8.6 Mya, atau berkisar antara 4 hingga 12 Mya. Awal dari terjadinya diversifikasi klon mangga terjadi pada zaman Pliocene (3-6 Mya) dan terus berlanjut sampai Pleistocene.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya perlu dilakukan dengan data yang lebih lengkap dan kajian mendalam mengenai klon mangga. Penggunaan sekuen gen *rbcL* ini dapat menganalisa hubungan kekerabatan, evolusi, serta biogeografi dari klon mangga tersebut. Selain itu, penggunaan penanda barcode DNA lainnya juga diperlukan untuk diteliti, guna menambah informasi mengenai hubungan kekerabatan antar klon mangga.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Baidhawi, Asy-Syirazi. (2000). **Tafsir Al-Baidhawi**. Beirut : Daar Ar-Risalah.
- Al-Mahalli, Jalaluddin & Jalaluddin As-Suyuti. 2008. **Tafsir Al-Jalalain, diterjemahkan Bahrin Abubakar, Terjemahan tafsir Jalalain Berikut Asbabun Nuzul, Jilid 1**. Bandung : Penerbit Sinar Baru Algensindo.
- Al-Maraghi, Ahmad Musthafa. (2006). **Tafsir al-Maraghi**. Beirut : Daar al-Fikr.
- Al-Qurthubi, Muhammad bin Ahmad abi Bakr Abi ‘Abdullah. 2006. **Tafsir al-Qurthubi al-Jami’ li Ahkam al-Qur’an Cetakan I**. Beirut : Daar Ar-Risalah.
- Anu, A., Prasad, B. D., Kumar, R., Kumar, P., Patel, V. B., & Jha, R. N. (2015). Clonal variability studies in ‘langra’ mango (*Mangifera indica* L.) using morphological, biochemical and molecular markers. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 8(3), 567.
- APG IV. (2016). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1–20.
- Applied Biosystems. (2012). *Applied biosystems DNA sequencing analysis software user guide*.
- Ariffin, Z., Md Sah, M. S., Idris, S., & Hashim, N. (2015). Genetic Diversity of Selected *Mangifera* Species Revealed by Inter Simple Sequence Repeats Markers. *International Journal of Biodiversity*, 2015, 1–8.
- Ath-Thabari. (2007). *Tafsir Ath-Thabari Jilid 21*. Pustaka Azam.
- Awomukwu, D. A., Nyananyo, B. L., & Uka, C. J. (2015). DNA Barcoding, identification and validation of the Genus *Phyllanthus* in Nigeria using plastid *rbcL* and *matK* genetic markers. *Global Journal of Science Frontier Research*, 15(1).
- Azim, M. K., Khan, I. A., & Zhang, Y. (2014). Characterization of mango (*Mangifera indica* L.) transcriptome and chloroplast genome. *Plant Molecular Biology*, 85(1–2), 193–208.
- Azizah, U. D. L., Yulianti, F., Adiredjo, A. L., & Sitawati, S. (2019). Genetic relationship analysis of strawberry (*Fragaria* Sp) germplasm based on morphology character and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *PLANTROPICA: Journal of Agricultural Science*, 4(1), 77–85.
- Bagus, W. I. D. A., Wirawan, I. P. G., & Adiartayasa, I. W. (2019). Analisis homologi fragmen DNA CVPDr dari Jeruk Kinkit *Trophasia trifolia* menggunakan BLAST protein dan BLAST nukleotida. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 8(4), 381–387.
- Basith, A. (2015). Peluang gen *rbcL* sebagai DNA barcode berbasis DNA kloroplas untuk mengungkap keanekaragaman genetik padi beras hitam (*Oryza sativa* L.) lokal Indonesia. *Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS*, 938–941.
- Begum, H., Reddy, M. T., Malathi, S., Reddy, B. P., Narshimulu, G., Nagaraju, J., & Siddiq, E. A. (2014). Morphological and microsatellite analysis of

- intravarietal heterogeneity in 'Beneshan' mango (*Mangifera indica* L.). *International Journal of Agricultural and Food Research*, 3(2), 16–33.
- Bell, K. L., Loeffler, V. M., & Brosi, B. J. (2017). An rbcL reference library to aid in the identification of plant species mixtures by DNA Metabarcoding. *Applications in Plant Sciences*, 5(3).
- BPS. (2020). Statistik Tanaman Buah-buahan dan Sayuran Tahunan Indonesia. Badan Pusat Statistika : Jakarta.
- Bull, James J & Hillis, David M. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*. 42(2).
- Burke, K. D., Williams, J. W., Chandler, M. A., Haywood, A. M., Lunt, D. J., & Otto-Bliesner, B. L. (2018). Pliocene and Eocene provide best analogs for near-future climates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(52), 13288–13293.
- CBOL. (2009). A DNA Barcode for Plants. *Pnas*, 1–7.
- Choudhuri, S. (2014). Fundamentals of Molecular Evolution. *Bioinformatics for Beginners*, 27–53.
- Claverie, J. M. dan Notredame, C. (2003). **Bioinformatics for Dummies**. US : Wiley Publishing.
- Cronquist, A. (1981). **An integrated system of classification of flowering plants**. New York : Columbia University Press.
- Deng X-D, Li J-W, Vasconcelos PM, Cohen BE, Kusky TM. (2014). Geochronology of the Baye Mn oxide deposit, southern Yunnan Plateau: implications for the late Miocene to Pleistocene paleoclimatic conditions and topographic evolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 139: 227–247.
- Dinesh, M. R., Vasanthaiah, H. K. N., Ravishankar, K. V, Thangadurai, D., Narayanaswamy, P., Ali, Q., Kambiranda, D., & Basha, S. M. (2011). *Mangifera*. In Wild crop relatives: genomic and breeding resources. In *Springer*. Berlin Heidelberg.
- Ellegren, H., & Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17(7), 422–433.
- Erkens, R.H.J., Chatrou, L.W., Maas J.W. & Pirie M.D. 2007. Phylogenetic relationships, saturation and marker use in the Long Branch Clade of Annonaceae. PhD Thesis. pp 25-41.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791.
- Fitmawati, F., Juliantari, E., & Sofiyanti, N. (2017). Phylogenetic Study of *Mangifera* Central Sumatra Based on rbcL Sequences. *Applied Science and Technology*, 1(1).
- Fitmawati dan Hayati, Ibna. (2018). **Mangifera of Sumatra**. Pekanbaru : UR Press.
- Fitmawati, Hartana, A., & Purwoko, B. S. (2009). Taksonomi mangga budidaya Indonesia dalam praktik. *Jurnal Agronomi Indonesia*, 37(2), 130–137.
- Fitmawati, Swita, A., Sofiyanti, N., & Herman. (2013). Analisis kekerabatan morfologi *Mangifera* dari Sumatera Tengah. *Floribunda*, 4(7), 169–174.

- Futschik, M. E., Kemmner, W., Schäfer, R., & Sers, C. (2009). The human transcriptome: Implications for the understanding of human disease. *Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease*, 123–149.
- Gaffar, S., & Sumarlin, S. (2020). Analisis sekuen mtDNA COI Pari Total Biru yang didaratkan di Tempat Pendaratan Ikan Kota Tarakan. *Jurnal Harpodon Borneo*, 13(2), 80–89.
- Gross, M. (2012). Barcoding biodiversity. *Current Biology*, 3(22), R73–R76.
- Gusmiati, Lutfiana & Hapsari, Lia & Wahyudi, Didik. 2018. Keberagaman dan pengelompokan morfologi 10 pisang olahan (*Musa* cv. Grup ABB) koleksi Kebun Raya Purwodadi - LIPI. *Floribunda*. 5:299-314.
- Hasanuddin. (2018). **Botani Tumbuhan Tinggi**. Banda Aceh : Syiah Kuala University Press.
- Hamka. (2007). **Tafsir Al-Azhar Jilid 6**. Jakarta : Pustaka Nasional.
- Henderson, I. R., & Salt, D. E. (2017). Natural genetic variation and hybridization in plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(20), 5415–5417.
- Hidayat, T, Pancoro A. (2008). Kajian filogenetika molekuler dan peranannya dalam menyediakan informasi dasar untuk meningkatkan kualitas sumber genetik anggrek. *Jurnal AgroBiogen*. 4.
- Hidayat, T., Pancoro, A., Kusumawaty, D., & Eiadthong, W. (2011). Molecular Diversification and Phylogeny of Mangifera (Anacardiaceae) in Indonesia and Thailand. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 1(1), 88.
- Holder, M., & Lewis, P. O. (2003). Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews Genetics*, 4(4), 275–284.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 6(5).
- Ichsan, M. C., & Wijaya, I. (2014). Karakteristik morfologis dan beberapa keunggulan Mangga Arumanis (*Mangifera indica* L.). *Agrotrop Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*, 1(3), 66–72.
- Imtiaz, A., Mohd Nor, S. A., & Md. Naim, D. (2017). Progress and potential of DNA barcoding for species identification of fish species. *Biodiversitas*, 18(4), 1394–1405.
- Jagarlamudi, S., G, R., Kurapati, R. K., & Pinnamaneni, R. (2011). Molecular identification of Mango, *Mangifera indica* L.var. totupura. *Bioinformation*, 5(10), 405–409.
- Jayanti, Umami Nur A. D. (2020). **Keanekaragaman Tumbuhan : Modul Inkuiri Berbasis Potensi dan Kearifan Lokal**. Malang : Multimedia Edukasi.
- Jawhari, Thanthawi. (1929). **Al-Jawahir fi Tafsir Al-Qur'an Al-Karim Cetakan 2 Jilid 4**. Mesir : Musthafa al Babi al-Halabi.
- Juliantari, E., Fitmawati, & Sofiyanti, N. (2018). Phylogeny of Mango (*Mangifera*) in Eastern Sumatra Using Molecular Markers of cpDNA *rbcL*. *International Journal of Science and Applied Technology Phylogeny*, 3(1), 17–24.
- Kadri, K. (2019). Polymerase chain reaction (PCR) and applications. *Synthetic Biology*, 1–17.

- Kairupan, Claudius F., Koneri, R., Tallei Trina E. (2015). Variasi genetik *Troides helena* (Lepidoptera: Papilionidae) berdasarkan gen CO1 (cytochrome C oxydase 1). *Jurnal MIPA UNSRAT*, 4 (2).
- Kannan, L., & Wheeler, W. C. (2012). Maximum Parsimony on Phylogenetic networks. *Algorithms for Molecular Biology*, 7(1), 1–10.
- Katsir, Ibnu. (2014). **Tafsir Ibnu Katsir Lengkap. Terj. M. Abdul Ghoffar dan Abu Ihsan. al-Atsari**. Jakarta : Pustaka Imam Syafi'i.
- Keputusan Menteri Pertanian. (2007). **Deskripsi Mangga Varietas Madu 225**. Nomor 481/Kpts/SR. 120/9/2007.
- Khan, A. S., Ali, S., & Khan, I. A. (2015). Morphological and molecular characterization and evaluation of mango germplasm: An overview. *Scientia Horticulturae*, 194, 353–366.
- Kheshin, M. A. El, Sayed, H. A., & Allatif, A. M. A. (2016). Morphological and molecular analysis of genetic diversity among some “Sukkary” mango (*Mangifera indica* L.) genotypes. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, 8(1), 1–10.
- Kishor, S., Dwivedi, D. H., Singh, N., Maji, S., & Sharma, M. K. (2019). Clonal variability in mango (*mangifera indica* l.) orchards cv. dashehari. *Annals of Plant and Soil Research*, 21(2), 193–199.
- Korir, N. K., Han, J., Shangguan, L., Wang, C., Kayesh, E., Zhang, Y., & Fang, J. (2013). Plant variety and cultivar identification: Advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(2).
- Kostermans, A. J. G. H., & Bompard, J. M. (1993). **The Mangoes : Their Botany, Nomenclature, Horticulture and Utilization**. Cambridge : Academic Press.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Kusmana, C., & Hikmat, A. (2015). Keanekaragaman Hayati Flora di Indonesia. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam Dan Lingkungan*, 5(2), 187–198.
- Lauricella, M., Emanuele, S., Calvaruso, G., Giuliano, M., & D'Anneo, A. (2017). Multifaceted health benefits of *Mangifera indica* L. (Mango): The inestimable value of orchards recently planted in sicilian rural areas. *Nutrients*, 9(5).
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62, 1–5.
- Leffler, E. M., Bullaughey, K., Matute, D. R., Meyer, W. K., Ségurel, L., Venkat, A., Andolfatto, P., & Przeworski, M. (2012). Revisiting an old riddle: what determines genetic diversity levels within species?. *PLoS Biology*, 10(9).
- Leitwein, M., Duranton, M., Rougemont, Q., Gagnaire, P. A., & Bernatchez, L. (2020). Using Haplotype Information for Conservation Genomics. *Trends in Ecology and Evolution*, 35(3), 245–258.
- Lemey, P. (2009). **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. 2nd Edition**. Britania

Raya : Cambridge University Press.

- Lestari, D. A., Azrianingsih, R., & Hendrian, H. (2018). Filogenetik Jenis-jenis Annonaceae dari Jawa Timur Koleksi Kebun Raya Purwodadi Berdasarkan Coding dan Non-coding sekuen DNA. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 3(1), 1.
- Letchuman, S. (2018). Short introduction of DNA barcoding. *International Journal of Research*, 5(4), 673–686.
- Likhitha, C. P., Ninitha, P., & Kanchana, V. (2016). DNA bar-coding: A novel approach for identifying an individual using extended levenshtein distance algorithm and STR Analysis. *International Journal of Electrical and Computer Engineering*, 6(3), 1133–1139.
- Limbongan, A. A., Susanti, D. S., & Siagian, D. P. (2016). Characterization of mango (*Mangifera indica* L.) in Rimba Jaya Village, Merauke Regency, Indonesia. *Jurnal Simbiosis IV*, 2, 42–45.
- Liu, Z. F., Ci, X. Q., Li, L., Li, H. W., Conran, J. G., & Li, J. (2017). DNA barcoding evaluation and implications for phylogenetic relationships in Lauraceae from China. *PLoS ONE*, 12(4), 1–20.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 1–15. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Marks, Dawn B., Allan D. Marks, Collen M. Smith. (1996). **Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach**. USA : William &Wilkins.
- Manurung, J., Prakarsa, H., Tanjung, U. J., & Harsono, T. (2018). Hubungan kekerabatan spesies dalam genus *Zanthoxylum* menggunakan sekuen gen maturase K (matK) DNA kloroplas. *Jurnal Biosains*, 4(3), 113–119.
- McGrath, K. (2014). Sanger sequencing troubleshooting guide (GNGFM00346) v1.1. *Australian Genome Research Facility*, 11.
- Miyamoto, M. M., & Cracraft, J. (1991). **Phylogenetic Analysis of DNA Sequence**. In *Oxford University Press*. Oxford University Press.
- Mount, D. W. (2001). **Bioinformatics : Sequence and Genome Analysis**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Muellner-Riehl, A. N., Weeks, A., Clayton, J. W., Buerki, S., Nauheimer, L., Chiang, Y. C., Cody, S., & Pell, S. K. (2016). Molecular phylogenetics and molecular clock dating of Sapindales based on plastid rbcL, atpB and trnL-trnF DNA sequences. *Taxon*, 65(5), 1019–1036.
- Mukherjee, S. K., & Litz, R. E. (2009). **The Mango : Botany, Production and Uses**. Wallingford : CABI Publisher.
- Mursyidin, D. H., Muhammad, G., Ahyar, Z., & Saputra, A. W. (2021). Genetic Diversity and Relationships of *Phalaenopsis* Based on the rbcL and trnL-F Markers : In Silico Approach. *13(2)*, 212–221.
- Nagar, A., & Hahsler, M. (2013). Fast discovery and visualization of conserved regions in DNA sequences using quasi-alignment. *BMC bioinformatics*. *14(11)*, 1-12.
- Nasution, I., Wardiyati, T., & Nawawi, M. (2014). Karakterisasi bunga mangga (*Mangifera indica* L.) hasil persilangan arumanis-143 dan podang urang. *Jurnal Produksi Tanaman*, 2(3), 180–189.

- Nevo, Eviatar & Avigdor, Beiles. (2011). Genetic variation in nature. *Scholarpedia*, 6(7):8821.
- Newell, P. D., Fricker, A. D., Roco, C. A., Chandrangsu, P., & Merkel, S. M. (2013). A Small-Group activity introducing the use and interpretation of BLAST. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 14(2), 238–243.
- Nilasari, A. N., Heddy, J. S., & Wardiyati, T. (2013). Identifikasi keragaman morfologi daun mangga (*Mangifera indica* L.) pada tanaman hasil persilangan antara varietas Arumanis 143 dengan Podang Urang umur 2 tahun. *Jurnal Produksi Tanaman*, 1(1), 61–69.
- Nurhasanah, Sundari, & Papuangan, N. (2019). Amplification and Analysis of RbcL Gene (Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase) of Clove in Ternate Island. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 276(1).
- Oktavianto, Y., Suryanto, & Sunaryo, A. (2015). Karakterisasi tanaman mangga (*Mangifera Indica* L.) cantek, ireng, empok, jempol di Desa Tiron, Kecamatan Banyakan Kabupaten Kediri. *Jurnal Produksi Tanaman*, 3(2), 91–97.
- Orwa, C., A. Mutua., Kindt, R., Jamnadas, R., S. Anthony. (2009). **Agroforestry Database: A Reference and Selection Guide**. Version 4.0.
- Parvez, M. (2016). Pharmacological activities of Mango (*Mangifera indica*): A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(3), 1–7.
- Prasetyo, E. (2012). Perbaikan sistem pengenalan jenis pohon Mangga menggunakan SVM dan FK-NNC. *Scan*, VII(3), 9–14.
- Rachma, R. A. (2017). Hubungan kekerabatan anggota marga pandanus koleksi Kebun Raya Purwodadi-Lipi berdasarkan karakter morfologi dan markah trn-L dan trn-F. Doctoral dissertation, Universitas Brawijaya.
- Rafidah, N., Fitmawati, F., Juliantari, E., & Sofiyanti, N. (2019). Variasi infraspecies macang (*Mangifera foetida*) berdasarkan sekuen gen rbcL. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 12(1), 1–7.
- Rahmawati, Hasanuddin, & Nurmaliah, C. (2016). Hubungan kekerabatan fenetik tujuh anggota familia Apocynaceae. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pendidikan Biologi*, 1(1), 1–9.
- Ramadani, A. H., Firdausi, M. R., Probojati, R. T., & Murtadlo, A. A. A. (2020). Spatial distribution and morphology character of Podang Mangoes (*Mangifera indica* L.) from five sub-district in Kediri Regency, East Java, Indonesia. *BIOTROPIC The Journal of Tropical Biology*, 4(1), 1–7.
- Ramírez, F., & Davenport, T. L. (2016). Mango (*Mangifera indica* L.) pollination: A review. *Scientia Horticulturae*, 203, 158–168.
- Ramlah, R., Aziz, I. R., Muthiadin, C., Masri, M., Mustami, M. K., & Pabendon, M. B. (2018). Genetic diversity of local maize germplasm of Tana Toraja South Sulawesi using SSR (Simple Sequence Repeat) Markers. *Ilmu Pertanian (Agricultural Science)*, 2(3), 144.
- Retnaningati, D. (2019). Hubungan Filogenetik Intraspecies Cucumis melo L. berdasarkan DNA Barcode Gen matK. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*. 2(2), 62-67.
- Rao, K. N. (2004). Plant genetic resources: Advancing conservation and use

- through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3(2), 136–145.
- Rugayah, Rahayu, M., Mulyadi, & Setijo Rahajoe, J. (2019). **Pulau Wawonii : Keanekaragaman Ekosistem, Flora, dan Fauna**. Jakarta : LIPI Press.
- Sadri, M., Adelina, E., & Samudin, S. (2017). Identifikasi karakter morfologi dan anatomi mangga lokal (*Mangifera* spp.) Morowali Di Desa Bente Dan Desa Bahomoleo Kecamatan Bungku Tengah. *J. Agroland*, 24(2), 138–145.
- Salehi, B., Gültekin-Özgülven, M., Kirkin, C., Özçelik, B., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Bezerra, C. F., Da Silva, T. G., Coutinho, H. D. M., Amina, B., Armstrong, L., Selamoglu, Z., Sevindik, M., Yousaf, Z., Sharifi-Rad, J., Muddathir, A. M., Devkota, H. P., Martorell, M., Jugran, A. K., ... Cho, W. C. (2019). Anacardium plants: Chemical, nutritional composition and biotechnological applications. *Biomolecules*, 9(9), 1–34.
- Sanjaya, C. B., & Rosadi, M. I. (2018). Klasifikasi buah Mangga berdasarkan tingkat kematangan menggunakan least-squares support vector machine. *Explore IT : Jurnal Keilmuan Dan Aplikasi Teknik Informatika*, 10(2), 1–8.
- Sawangchote, P., Grote, P. J., & Dilcher, D. L. (2009). Tertiary leaf fossils of *Semecarpus* (Anacardiaceae) from Li Basin, Northern Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)*, 38.
- Sembiring, M. B., Rahmi, D., Maulina, M., Tari, V., Rahmayanti, R., & Suwardi, A. B. (2020). Identifikasi karakter morfologi dan sensoris kultivar mangga (*Mangifera indica* L.) di Kecamatan Langsa Lama, Aceh, Indonesia. *Jurnal Biologi Tropis*, 20(2), 179.
- Shihab, M. Q. (2002). **Tafsir Al-Mishbah : Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an**. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, Quraish. (2006). **Tafsir Al-Mishbah (Pesan, Kesan, dan Keserasian AlQur'an)**. Jakarta: Lentera Hati.
- Simpson, M. G. (2006). **Plant Systematics**. Amsterdam : Elsevier Academic Press.
- Singh, N. K., Mahato, A. K., Jayaswal, P. K., Singh, A., Singh, S., Singh, N., Rai, V., V, A. M. S., Gaikwad, K., Sharma, N., Lal, S., Srivastava, M., Prakash, J., Kalidindi, U., Singh, S. K., Singh, A. K., Khan, K., Mishra, R. K., Shailendra, ... Sharma, T. R. (2016). Origin, diversity and genome sequence of Mango (*Mangifera indica* L.). *Indian Journal of History of Science*, 51(2.2), 355–368.
- Singh, S. K., Singh, A., Nath, V., Parthasarathy, V., Sthapit, B., Rajan, S., & Vinoth, S. (2015). Genetic diversity in seedling populations of mango. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, 28(1), 123–131.
- Sutapa, Gusti Ngurah & I Gede Antha Kasmawan. (2016). Efek induksi mutasi radiasi gamma ⁶⁰Co pada pertumbuhan fisiologis tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* L.). *Jurnal Keselamatan Radiasi dan Lingkungan*, 1(2), 5-11.
- Suparman, S., Pancoro, A., & Hidayat, T. (2013). Phylogenetic Analysis of *Mangifera* Base on rbcL Sequences, Chloroplast DNA. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*, LVII, 235–240.

- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11030–11035.
- Tasliyah, Karsinah, & Prasetyono, J. (2016). Keragaman sebelas klon mangga komersial Indonesia. *J. Hort.*, 26(1), 31–40.
- Tasliyah, T., Rijzaani, H., Hariyadi, T. Z. P., Yuriyah, S., Rebin, R., Ma;sumah, M., & Silitonga, T. S. (2013). Analisis keragaman genetik 161 aksesori mangga Indonesia menggunakan marka mikrosatelit. *Jurnal AgroBiogen*, 9(3), 125.
- Trimanto. (2012). Karakterisasi dan jarak kemiripan uwi (*Dioscorea alata* L.) berdasarkan penanda morfologi ubi. *Buletin Kebun Raya*, 15(1), 47–57.
- Trivedi, S., Rehman, H., Saggu, S., Panneerselvam, C., & Ghosh, S. K. (2018). DNA Barcoding and Molecular Phylogeny. In *Springer International Publishing*.
- Turan, C., E. Deniz, F. Turan, & M. Ergüden. 2004. Genetic and morphologic structure of *Liza abu* (Heckel, 1843). Populations from the Rivers Orontes, Euphrates and Tigris. *Turkish Journal Vet Anim Science*. 28. p. 729-734.
- Turjak, M., & Trontelj, P. (2012). A method for measuring support for synapomorphy using character state distributions on phylogenetic trees. *Cladistics*, 28(6), 627–638.
- Uji, T. (2007). Keanekaragaman jenis buah-buahan asli Indonesia dan potensinya. *Biodiversitas*, 8(2), 157–167.
- Venkateswarlu, K. (2013). Clonal variability studies in ‘Alphonso’ mango (*Mangifera indica* L.) by phenotypic characters and molecular markers. *International Journal of Pharmamedix India*, 1(2), 398–414.
- von Cräutlein, M., Korpelainen, H., Pietiläinen, M., & Rikkinen, J. (2011). DNA barcoding: A tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and Conservation*, 20(2), 373–389.
- Wang JF, Gong X, Chiang YC, Kuroda C. 2013. Phylogenetic patterns and disjunct distribution in *Ligularia hodgsonii* Hook. (Asteraceae). *J Biogeogr*. 40:1741–1754
- Warschefsky, E. J., & von Wettberg, E. J. B. (2019). Population genomic analysis of mango (*Mangifera indica*) suggests a complex history of domestication. *New Phytologist*, 222(4), 2023–2037.
- Weeks, A., Zapata, F., Pell, S. K., Daly, D. C., Mitchell, J. D., & Fine, P. V. A. (2014). To move or to evolve: Contrasting patterns of intercontinental connectivity and climatic niche evolution in “Terebinthaceae” (*Anacardiaceae* and *Burseraceae*). *Frontiers in Genetics*, 5.
- Xie, L., Yang, Z. Y., Wen, J., Li, D. Z., & Yi, T. S. (2014). Biogeographic history of *Pistacia* (*Anacardiaceae*), emphasizing the evolution of the Madrean-Tethyan and the eastern Asian-Tethyan disjunctions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 77(1), 136–146.
- Yadav, D., Yadav, K. S., & Singh, S. (2018). Mango: Taxonomy and botany. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 3253–3258.

Zhang, C., Xie, D., Bai, T., Luo, X., Zhang, F., Ni, Z., & Chen, Y. (2020). Diversity of a large collection of natural populations of mango (*Mangifera indica* Linn.) Revealed by agro-morphological and quality traits. *Diversity*, *12*(1).

LAMPIRAN



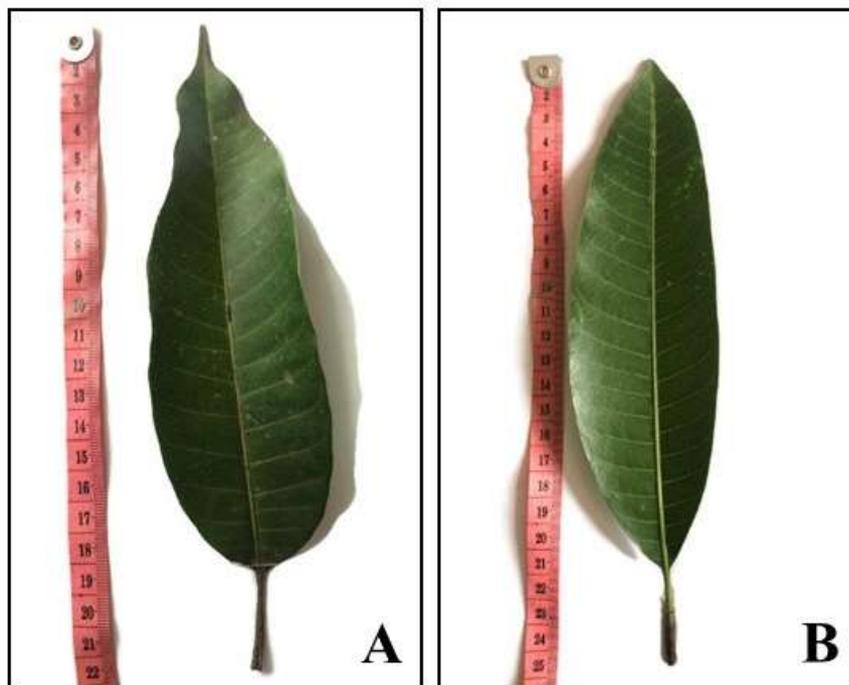
Lampiran 1. Variasi tipe pohon pada klon mangga madu. Keterangan : A) tipe pohon yang berasal dari bibit (*seedling*) pada Madu Z dan tipe pohon okulasi (*grafting*) pada B) Madu Madu 65, panah putih menunjukkan sambungan antara batang bawah dan batang atas hasil okulasi.



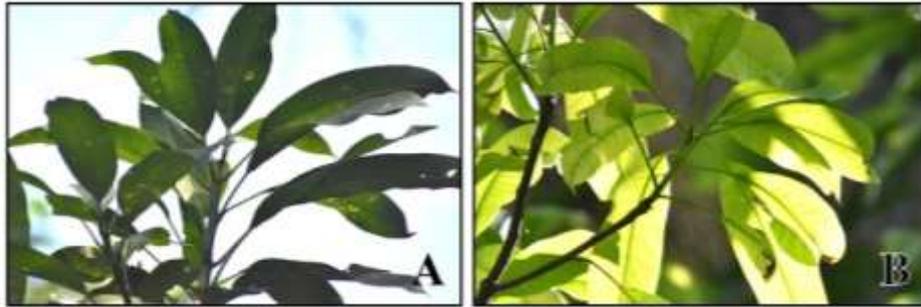
Lampiran 2. Variasi bentuk kanopi pohon. Ketereangan : A) bentuk kanopi pohon oblong pada Madu 65, dan B) bentuk kanopi pohon *semi-circular* pada Madu 311.



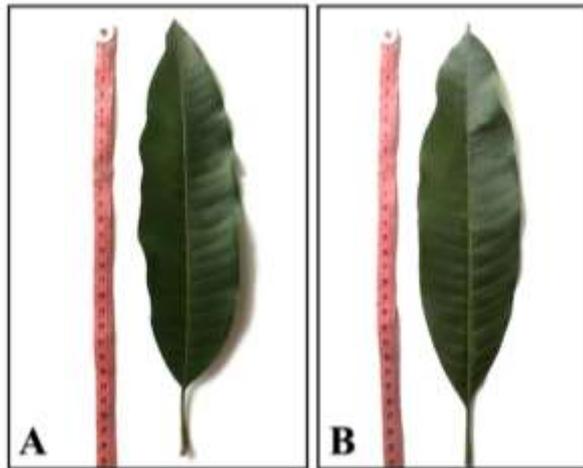
Lampiran 3. Variasi bentuk pertumbuhan pohon. Keterangan : A) bentuk pertumbuhan pohon tegak (*erect*) pada Madu 225, dan B) pertumbuhan pohon menyebar (*spreading*) pada Madu 311.



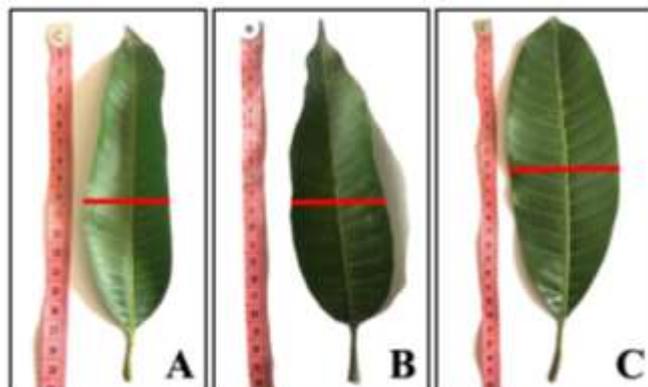
Lampiran 4. Bentuk helai daun. Keterangan : A) bentuk helai daun *lanceolate* pada Madu 139, dan B) bentuk helai daun *elliptic* pada Kuweni Laki.



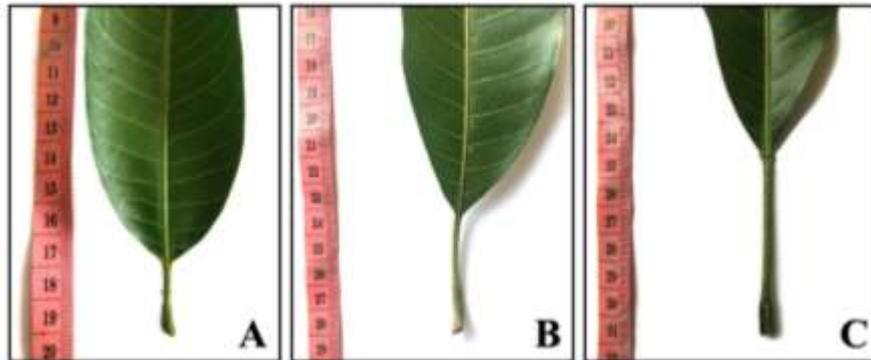
Lampiran 5. Susunan daun terhadap batang. Keterangan : A) susunan daun terhadap batang *semi-erect* (terangkat) pada Madu 311, sedangkan gambar B) susunan daun terhadap batang horizontal (mendatar) pada Madu 179.



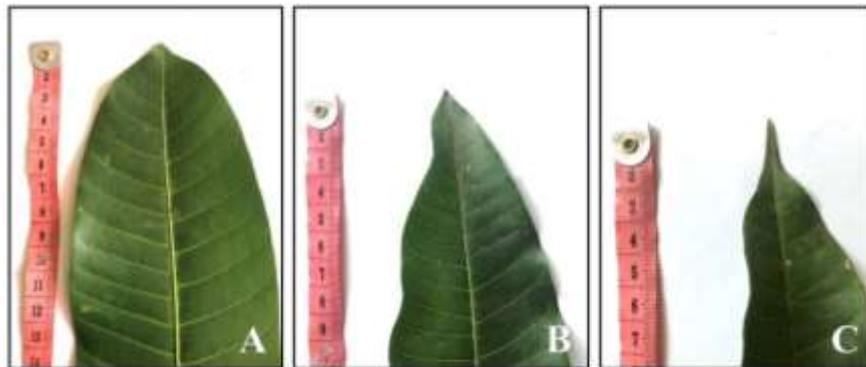
Lampiran 6. Variasi panjang daun. Keterangan : A) ukuran sedang (17-24 cm) pada Madu 67, dan B) ukuran panjang (24-32 cm) pada Madu 179.



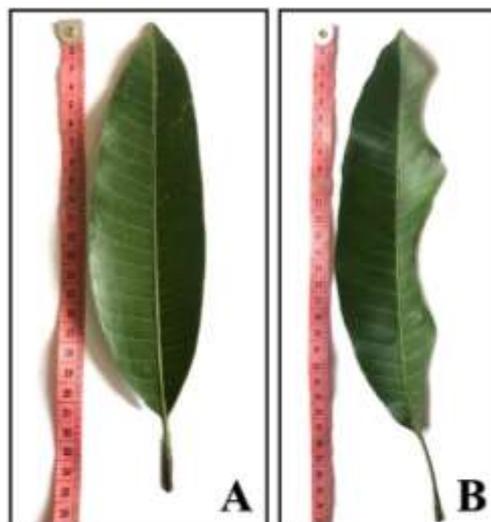
Lampiran 7. Variasi lebar daun. Keterangan : A) ukuran pendek (3-5 cm) pada Madu Banjar, B) ukuran sedang (5-7 cm) pada Madu 139, dan C) ukuran panjang (7-9 cm) pada Kuweni Bini.



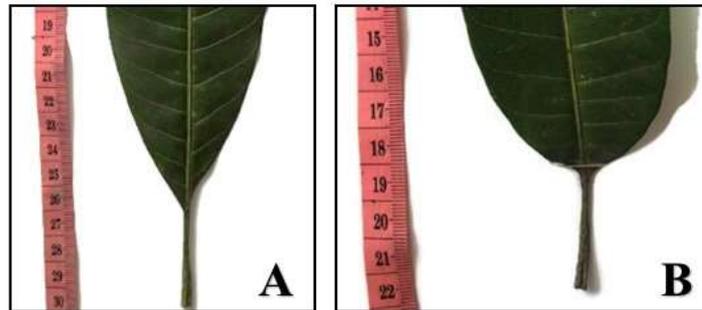
Lampiran 8. Variasi panjang tangkai daun. Keterangan : A) ukuran pendek (2-3,5 cm) pada Madu Banjar, B) ukuran sedang (3,5-5 cm) pada Madu 67, dan C) ukuran panjang (5-6,5 cm) pada Madu Z.



Lampiran 9. Variasi ujung daun. Keterangan : A) ujung daun tumpul pada Kuweni Bini, B) ujung daun runcing pada Madu 67, dan C) ujung daun meruncing pada Madu 139.



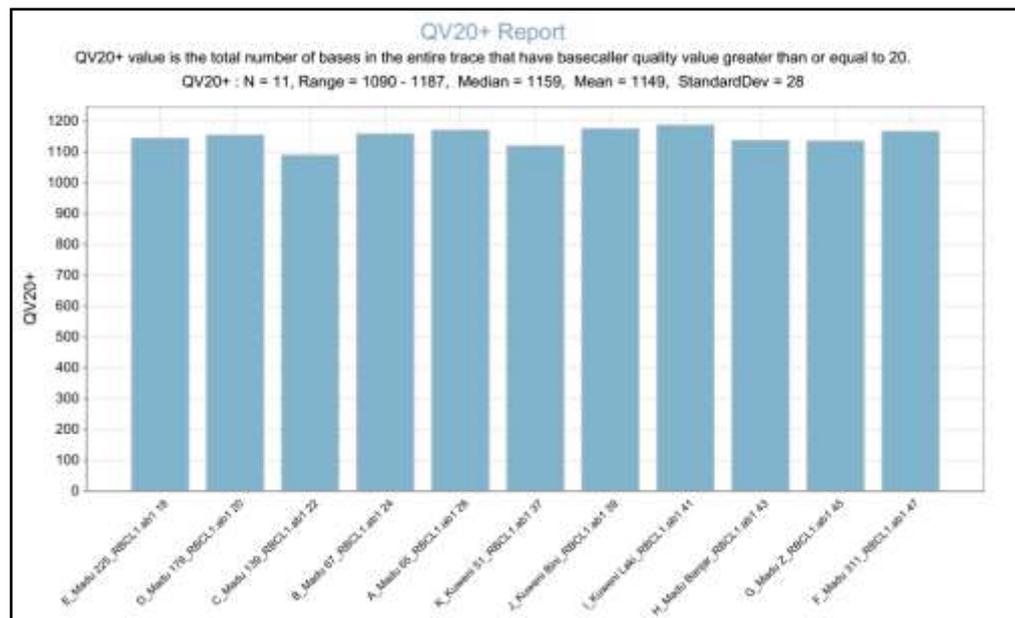
Lampiran 10. Variasi bentuk tepi daun. Keterangan : A) tepi daun rata pada Kuweni Laki, dan tepi daun bergelombang pada B) Madu 65.



Lampiran 11. Variasi bentuk pangkal daun. Keterangan : A) bentuk pangkal daun runcing pada Madu 179, dan tumpul pada B) Madu 139.

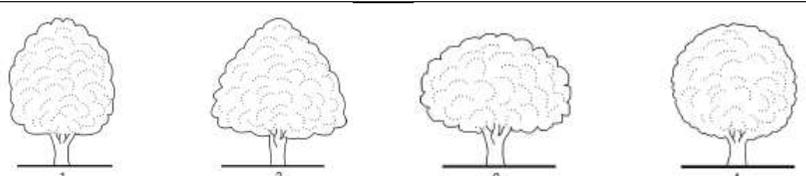
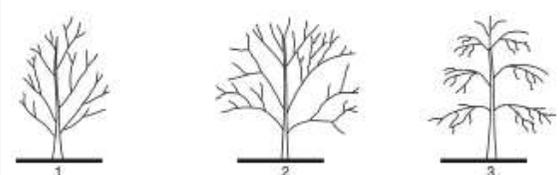
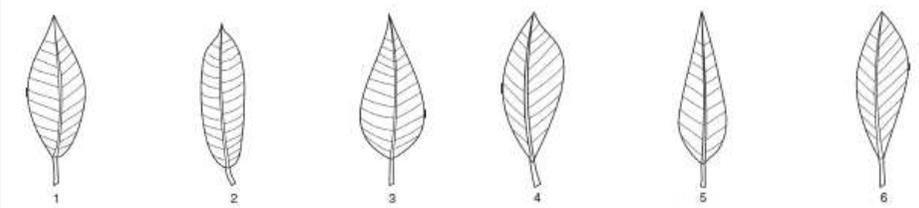


Lampiran 12. Variasi bentuk warna daun muda. Keterangan : A) warna daun muda hijau semburat coklat pada Madu 225, B) warna daun muda pada Madu 311 yaitu merah bata muda, dan C) warna daun muda coklat kemerahan pada Kuweni Laki.

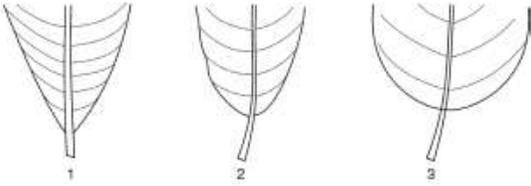
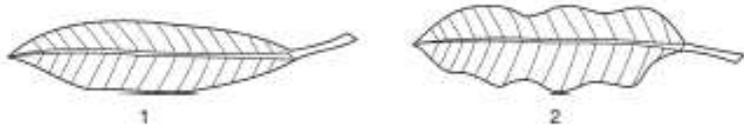


Lampiran 13. Nilai QV20+ dari 11 sekuen klon mangga.

Lampiran 15. Tabel karakter morfologi mangga berdasarkan morfologi

No.	Karakter Morfologi	Kode	Keterangan
1	Tipe pohon	TP	1) <i>Seedling</i> 2) <i>Grafted</i> (cangkok) 3) Lainnya
2	Bentuk kanopi pohon	BKP	 1) Oblong 2) Broadly pyramidal 3) Semi-circular 4) Spherical (bulat) 5) Lainnya
3	Bentuk pertumbuhan pohon	BPP	 1) Erect 2) Spreading 3) Drooping
4	Bentuk helaian daun	BHD	 1) Elliptic 2) Oblong 3) Ovate 4) Obovate 5) Lanceolate 6) Oblanceolate 7) Lainnya

5	Susunan daun terhadap batang	SDTB	 <p>1) Semi-erect (terangkat) 2) Horizontal (mendatar) 3) Semi-dropping</p>
6	Panjang daun	PD	1) Pendek (11-17 cm) 2) Sedang (17-24 cm) 3) Panjang (24-32 cm)
7	Lebar daun	LD	1) Pendek (3-5 cm) 2) Sedang (5-7 cm) 3) Panjang (7-9 cm)
8	Panjang tangkai daun	PTD	1) Pendek (2-3,5 cm) 2) Sedang (3,5-5 cm) 3) Panjang (5-6,5 cm)
9	Tipe pelvinus	TPv	1) Tipis 2) Tebal dan menyudut
10	Sudut antara tulang daun primer dan sekunder	SATD	1) Sempit ($<45^\circ$) 2) Sedang ($45-60^\circ$) 3) Luas ($>60^\circ$)
11	Lekukan pada tulang daun sekunder	LTDS	0) Tidak ada 1) Ada
12	Tekstur daun	TD	1) Coriaceous 2) Chartaceous 3) Membranous
13	Bentuk ujung daun	BUD	 <p>1) Tumpul 2) Runcing 3) Meruncing</p>

14	Bentuk pangkal daun	BPD	 1) Runcing 2) Tumpul 3) Membulat
15	Bentuk tepi daun	BTD	 1) Rata 2) Bergelombang
16	Indumentum daun	ID	0) Tidak ada 1) Ada
17	Warna permukaan atas daun tua	WADT	1) Hijau pucat 2) Hijau 3) Hijau tua 4) Lainnya
18	Warna permukaan bawah daun tua	WBDT	1) Hijau pucat 2) Hijau 3) Hijau tua 4) Lainnya
19	Aroma daun	AD	0) Tidak ada 1) Ringan 2) Kuat
20	Warna daun muda	WDM	1) Hijau muda 2) Hijau muda dengan semburat coklat 3) Merah bata muda 4) Coklat kemerahan 5) Cokelat kehitaman 6) Lainnya

Lampiran 16. Tabel karakterisasi mangga berdasarkan karakter morfologi

	TP	BKP	BPP	BHD	SDTB	PD*	LD*	PTD*	TP _v	SATD*	LTDS	TD	BUD	BPD	BTD	ID	WADT	WBDT	AD	WDM
MD 65	2	1	1	5	2	2	2	2	2	3	1	2	2	1	2	0	3	1	2	3
MD 67	2	1	2	5	2	2	2	2	2	3	1	2	2	1	2	0	3	1	2	3
MD 139	2	3	2	5	2	2	2	2	2	3	1	2	3	2	2	0	3	1	1	2
MD 179	2	3	2	5	2	3	2	3	2	3	1	2	3	1	2	0	3	1	2	2
MD 225	2	1	1	5	1	2	2	2	2	3	1	2	3	1	2	0	3	1	1	2
MD 311	2	3	2	5	1	2	2	3	2	3	1	2	3	1	2	0	3	1	2	3
MD Z	1	1	1	5	1	2	2	3	2	3	1	2	3	1	2	0	3	1	1	2
MD BJR	2	1	2	5	2	2	1	1	2	3	1	2	2	2	2	0	3	1	1	2
KW LK	2	1	1	1	2	2	2	2	2	3	1	1	2	1	1	0	3	1	1	4
KW BI	2	1	1	1	2	3	3	2	2	3	1	1	1	1	1	0	3	1	2	4
KW 51	2	1	1	1	2	2	2	2	2	3	1	1	3	1	1	0	3	1	1	4

Karakter bertanda (*) merupakan karakter kuantitatif dengan kriteria sebagai berikut:

Kriteria Skoring	PD	LD	PTD	SATD
1	11-17 cm	3-5 cm	2-3,5 cm	<45°
2	17-24 cm	5-7 cm	3,5-5 cm	45-60°
3	24-32 cm	7-9 cm	5-6,5 cm	>60°

Lampiran 17. Formulir checklist plagiasi



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

Form Checklist Plagiasi

Nama : Prisela Nadila Putri
NIM : 17620035
Judul : Sekuen Gen *rbcL* sebagai Barcode DNA dalam Menentukan Variasi Genetik Klon Mangga Madu (*Mangifera indica* L. cv. Madu).

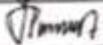
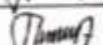
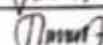
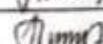
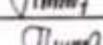
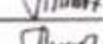
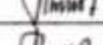
No	Tim Check plagiasi	Skor Plagiasi	Tanggal	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc			
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc			
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si			
4	Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD.Med.Sc	4%	6 Oktober 2021	

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi

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

Lampiran 18. Bukti konsultasi pembimbing biologi

	<p>KEMENTERIAN AGAMA UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI PROGRAM STUDI BIOLOGI Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933</p>
<p><u>KARTU KONSULTASI SKRIPSI</u></p>	
<p>Nama : NIM : Program Studi : Semester : Pembimbing : Judul Skripsi :</p>	<p>Prisela Nadila Putri 17620035 S1 Biologi Ganjil TA 2021/2022 Didik Wahyudi, M.Si Sekuen Gen <i>rbcL</i> sebagai Barcode DNA dalam Menentukan Variasi Genetik Klon Mangga Madu (<i>Mangifera indica</i> L.)</p>

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	13/02/2021	Pengajuan proposal skripsi (BAB 1, 2, 3)	
2.	20/02/2021	Simulasi seminar proposal	
3.	26/02/2021	Simulasi seminar proposal	
4.	03/03/2021	Revisi latar belakang BAB 1 dan BAB 3	
5.	22/03/2021	Acc proposal skripsi	
6.	09/07/2021	Bimbingan analisis data BAB IV	
7.	27/08/2021	Progress report BAB IV	
8.	04/09/2021	Progress report BAB IV	
9.	10/09/2021	Progres report BAB IV	
10.	17/09/2021	Konsultasi naskah skripsi	
11.	30/09/2021	Revisi naskah skripsi	
12.	04/10/2021	Acc naskah skripsi	

Pembimbing Skripsi,



Didik Wahyudi, M.Si
NIP. 19860102 201801 1 001

Malang, 4 Oktober 2021
Ketua Program Studi,



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

Lampiran 19. Bukti konsultasi pembimbing agama



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Prisela Nadila Putri
NIM : 17620035
Program Studi : SI Biologi
Semester : Ganjil TA 2021/2022
Pembimbing : Oky Bagas Prasetyo, M.PdI
Judul Skripsi : Sekuen Gen *rbcL* sebagai Barcode DNA dalam Menentukan Variasi Genetik Klon Mangga Madu (*Mangifera indica* L.)

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	25/02/2021	Pengajuan proposal skripsi	
2.	04/03/2021	Revisi integrasi BAB I & II	
3.	13/03/2021	Pengajuan revisi BAB I & II	
4.	31/03/2021	Acc proposal	
5.	18/09/2021	Pengajuan naskah skripsi	
6.	21/09/2021	Revisi integrasi ayat ulul albab	
7.	23/09/2021	Acc skripsi	

Pembimbing Skripsi,

Oky Bagas Prasetyo, M.PdI
NIP. 19890113 20180201 1 244

Malang, 1 Oktober 2021
Ketua Program Studi,

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