

**PENENTUAN *BARCODE* DNA BERDASARKAN LOKUS GEN
rbcL PADA *Zingiber loerzingii* VALETON**

SKRIPSI

LADIEZ RAHMAYANI SAGALA

0704163062



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUMATERA UTARA
MEDAN
2021**

**PENENTUAN *BARCODE* DNA BERDASARKAN LOKUS GEN
rbcL PADA *Zingiber loerzingii* VALETON**

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Sains

LADIEZ RAHMAYANI SAGALA

0704163062



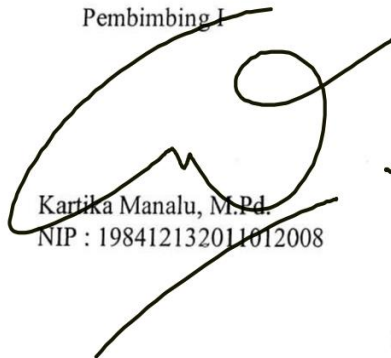
**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUMATERA UTARA
MEDAN
2021**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Judul : Penentuan *Barcode* DNA Berdasarkan Lokus Gen
rbcl pada *Zingiber loerzingii* Valetton
Penyusun : Ladiéz Rahmayani Sagala
NIM : 0704163062
Pembimbing I : Kartika Manalu, M.Pd.
Pembimbing II : Zahratul Idami, M.Sc.
Tanggal Sidang :


Disetujui Oleh :

Pembimbing I



Kartika Manalu, M.Pd.
NIP : 198412132011012008

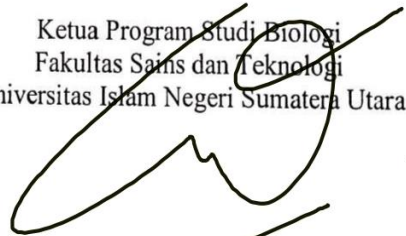
Pembimbing II



Zahratul Idami, M.Sc.
NIP : 198609142019032004

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Sumatera Utara



Kartika Manalu, M.Pd
NIP : 198412132011012008

PENETUAN *BARCODE* DNA BERDASARKAN LOKUS GEN *rbcL* PADA *Zingiber loerzingii* Valetton

ABSTRAK

Barcode DNA merupakan salah satu teknik molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasi makhluk hidup. *Zingiber loerzingii* Val. adalah salah satu tumbuhan langka dan endemik yang hanya terdapat di Sumatera Utara. Pengkajian ilmiah mengenai *Z. loerzingii* masih sangat sedikit yang sudah dilakukan sehingga informasi mengenai tumbuhan ini terbatas sementara identitas yang jelas pada suatu tumbuhan benar-benar diperlukan untuk dapat dimanfaatkan secara maksimal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik molekuler *Z. loerzingii* dengan menggunakan *barcode* DNA serta mengkaji hubungan filogenetiknya berdasarkan lokus gen *rbcL*. DNA diisolasi dengan kit komersial. Lokus gen *rbcL* pada genom kloroplas *Z. loerzingii* diamplifikasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* menghasilkan amplikon dengan panjang ± 600 bp. Penyatuan sekuens konsensus menghasilkan sekuens dengan panjang 576 bp. Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan metode *Neighbor-Joining* dan model perhitungan Kimura-2-Parameter menunjukkan *Z. loerzingii* termasuk dalam kelompok monofiletik dengan *Zingiber zerumbet* dan *Zingiber officinale* sebagai sister taxa. Hasil analisis keragaman molekuler *Z. loerzingii* menunjukkan bahwa pada seluruh sampel *Z. loerzingii* yang dikoleksi dari Cagar Alam Sibolangit tidak ada keragaman molekuler atau keragaman genetik. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa *barcode* DNA dengan lokus gen *rbcL* dapat digunakan sebagai metode untuk mengidentifikasi *Z. loerzingii* secara molekuler serta efisien dalam menentukan hubungan kekerabatannya dengan spesies lain.

Kata kunci : *Barcode* DNA, *Zingiber loerzingii*, *rbcL*

DETERMINATION OF DNA BARCODE BASED ON THE *rbcL* GENE LOCUS ON *Zingiber loerzingii* VALETON

ABSTRACT

DNA barcode is one of the molecular techniques used to identify and classify living things. *Zingiber loerzingii* Val. is currently reported as a rare and endemic plants that is only found in North Sumatra. Scientific studies for *Z. loerzingii* is measly done so that the information about this plant is limited while a clear identity on a plant is essential to discover the potential. This study aims to determine the molecular characteristics of *Z. loerzingii* by using DNA barcodes and assessing the phylogenetic relationship based on the *rbcL* gene locus. DNA was isolated with a commercial kit. The *rbcL* gene locus in the chloroplast genome of *Z. loerzingii* amplified using the Polymerase Chain Reaction technique to produce amplicon with the length approximately 600 bp. Consensus sequence merging generate a sequence with 576 bp length. The phylogenetic tree reconstruction was carried out using the Neighbor-Joining method and the Kimura-2-Parameter calculation model showed *Z. loerzingii* included in the monophyletic group with *Zingiber zerumbet* and *Zingiber officinale* as the sister taxa. The results for the molecular diversity analysis of *Z. loerzingii* point out that in all samples of *Z. loerzingii* which collected from Cagar Alam Sibolangit have no molecular diversity or genetic. Therefore, it can be concluded that DNA barcoding with the *rbcL* gene locus can be used as a method to identify *Z. loerzingii* molecularly and efficient in determining their phylogenetic with other species.

Key words : DNA barcode, *Zingiber loerzingii*, *rbcL*

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur dipanjatkan ke hadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunianya penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul “**Penentuan Barcode DNA Berdasarkan Lokus Gen *rbcL* Pada *Zingiber Loerzingii* Valetton**”. Penulisan skripsi ini bertujuan untuk menyelesaikan tugas akhir dalam pendidikan Strata-1 dan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, dukungan, dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih dan rasa hormat kepada :

1. Prof. Dr. Syahrin Harahap, M.A selaku Rektor Universitas Islam Negeri Sumatera Utara Medan.
2. Bapak Dr. H. Mhd. Syahnan, M.A selaku Dekan Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara.
3. Ibu Kartika Manalu, M.Pd selaku Ketua Program Studi Biologi dan dosen Pembimbing Skripsi I penulis yang telah memberikan bimbingan dalam penyusunan skripsi penulis.
4. Ibu Ulfayani Mayasari, M.Si selaku Sekretaris Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sumatera Utara.
5. Ibu Efrida Pima Sari Tambunan, M.Pd selaku dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan selama masa perkuliahan.
6. Ibu Zahratul Idami, M.Sc selaku dosen verifikator dan dosen Pembimbing Skripsi 2 yang banyak sekali memberikan bimbingan dan bantuan dalam penyusunan skripsi penulis.
7. Bapak Eko Prasetya, M.Sc selaku dosen penguji I sekaligus pembimbing yang sangat banyak memberikan arahan dan bimbingan baik dalam pengerjaan di laboratorium maupun penulisan skripsi

penulis. Terima kasih sedalam-dalamnya juga penulis ucapkan atas kesediaan untuk memfasilitasi penelitian penulis dalam semua aspek.

8. Ibu Melfa Aisyah Hutasuhut, M.Si selaku dosen penguji II yang bersedia memberikan koreksi dan saran pada skripsi penulis.
9. Seluruh dosen dan staff Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sumatera Utara (Ibu Husnarika Febriani, M.Pd, Ibu Rahmadina, M.Pd, Ibu Rasyidah, M.Pd, Ibu Syukriah, M.Sc dan Ibu Rizki Amelia Nasution, M.Si)
10. Keluarga penulis teristimewa rasa terimakasih dan cinta paling dalam untuk Ayahanda, Muhammad Hasbi Sagala, Ibunda Agusnimar Gee serta adik-adik penulis, Nela dan Febi yang telah membantu dalam memberikan semangat pada penulisan skripsi ini.
11. Teman-teman terkasih penulis Wahyu, Ulfa, Fatimah, Novita dan Tri serta seluruh mahasiswa Biologi Stambuk 2016.
12. Adik-adik Himpunan Mahasiswa Biologi Andaliman Periode 2018/2019 (Generasi Hiu).
13. Teman-teman Lembaga Penelitian dan Keilmuan Mahasiswa yang selalu memberikan inspirasi pada penulis.
14. Yayasan Karya Salemba Empat dan PT. Inalum (Persero) yang telah memberikan bantuan tunjangan finansial berupa Beasiswa kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa proposal skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan materi, teknik penyajian maupun dari isinya. Oleh karena itu dengan hati terbuka penulis menerima kritikan dan saran yang membangun untuk kesempurnaan.

Medan, September 2021

Penulis,

Ladiez Rahmayani Sagala
NIM.0704163062

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Batasan Masalah	3
1.4. Tujuan Penelitian	3
1.5. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. <i>Zingiber loerzingii</i> Valetton.....	5
2.2. DNA <i>Barcoding</i>	7
2.3. Gen <i>rbcL</i> (RuBisCo).....	9
2.4. Isolasi DNA	11
2.5. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	12
2.6. Elektroforesis	14
2.7. Sekuensing	15
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	17
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.2. Alat dan Bahan	17
3.3. Prosedur Penelitian.....	18
3.3.1. Koleksi Sampel.....	18
3.3.2. Isolasi DNA.....	18
3.3.3. Analisis Kualitatif DNA.....	20

3.3.4. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	21
3.3.5. Sekuensing	22
3.3.6. Analisis Data	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1. Karakteristik Molekuler Sekuens Lokus Gen <i>rbcL</i> pada Tumbuhan <i>Zingiber loerzingii</i> Valetton.....	23
4.1.1. Hasil Isolasi DNA <i>Zingiber loerzingii</i> Valetton.....	23
4.1.2. Hasil Amplifikasi dengan PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)..	24
.....	24
4.1.3. Sekuens DNA <i>Zingiber loerzingii</i> Valetton.....	27
4.1.4. DNA <i>Zingiber loerzingii</i> Valetton	31
4.2. Keanekaragaman Molekuler Tumbuhan <i>Zingiber loerzingii</i> Valetton menggunakan <i>Barcode</i> DNA berdasarkan Lokus gen <i>rbcL</i>	34
4.2.1. Analisis Variasi dan Persentase <i>AT content</i> dan <i>GC Content</i> ...	34
.....	34
4.2.2. Koefisien Similaritas (Jarak Genetik) Sampel dan <i>Out-Groups</i> (<i>Pairwise Distance</i>).....	36
4.2.3. Analisis Keragaman <i>Haplotype</i> (Hd) dan Keragaman Nukleotida (π).....	38
4.2.4. Analisis <i>Variable Site</i> dan <i>Parsimony Site</i>	38
4.3. Analisis Hubungan Filogenetik <i>Zingiber loerzingii</i> Valetton berdasarkan Lokus Gen <i>rbcL</i>	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	47
5.1. Kesimpulan	47
5.2. Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Nama Gambar	Halaman
2.1.	<i>Zingiber loerzingii</i> Valetton	6
2.2.	Bunga <i>Zingiber loerzingii</i> Valetton	6
2.3.	Kandidat Region <i>Barcode</i> pada Kingdom Plantae	10
2.4.	Tahapan <i>Polymerase Chain Reaction</i>	13
2.5.	Alat Elektroforesis.....	15
4.1.	DNA <i>Z. loerzingii</i> (L ₁ , L ₂ , L ₃ dan L ₄) hasil isolasi	24
4.2.	Profil Pita DNA <i>Z. loerzingii</i> (L ₁ , L ₂ , L ₃ dan L ₄) hasil amplifikasi PCR	26
4.3.	Kromatogram Sampel DNA <i>Z. loerzingii</i> Sampel L ₁	28
4.4.	Kromatogram Sampel DNA <i>Z. loerzingii</i> Sampel L ₂	28
4.5.	Kromatogram Sampel DNA <i>Z. loerzingii</i> Sampel L ₃	29
4.6.	Kromatogram Sampel DNA <i>Z. loerzingii</i> Sampel L ₄	29
4.7.	Ilustrasi Nukleotida DNA dengan Warna yang Berbeda	34
4.8.	Hasil <i>Alignment</i> sekuens <i>rbcL</i> sampel <i>Z. loerzingii</i> dengan Sampel lain dari GenBank	44
4.9.	Pohon Filogenetik <i>Z. loerzingii</i> dengan metode <i>Neighbor-Joining</i> berdasarkan lokus gen <i>rbcL</i>	45

DAFTAR TABEL

Tabel	Nama Tabel	Halaman
3.1.	Daftar Primer	18
3.2.	Tahapan Amplifikasi DNA.....	21
4.1.	Persentase Basa Nukleotida <i>Z. loerzingii</i> (L ₁ , L ₂ , L ₃ dan L ₄) hasil sekuensing.....	30
4.2.	Urutan nukleotida DNA <i>Z. loerzingii</i> sampel L ₁ , L ₂ , L ₃ dan L ₄ hasil sekuensing.....	31
4.3.	Analisis Variasi dan Persentase <i>AT Content</i> dan <i>GC Content</i>	35
4.4.	Koefisien Similaritas Sampel dan <i>out-group (Pairwise Distance)</i>	37
4.5.	Hasil Analisis <i>Variable site</i>	39
4.6.	Posisi <i>Parsimony Site</i>	39
4.7.	Perbandingan Sekuens Sampel dengan Sekuens <i>rbcL</i> beberapa spesies Zingiberaceae dan <i>out-group</i> pada GenBank	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul Lampiran
1.	Identifikasi <i>Z. loerzingii</i>
2.	Surat Izin Masuk Kawasan Konservasi (SIMAKSI)
3.	Diagram Kegiatan Secara umum
4.	Alur Tahap Isolasi DNA <i>Plant DNA Mini Kit</i> Merk Geneaid
5.	Pengoleksian sampel <i>Zingiber loerzingii</i> Valetton
6.	Hasil BLAST pada NCBI
7.	Tahap Isolasi DNA
8.	Tahap Elektroforesis
9.	Tahap PCR
10.	Alat dan Bahan

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Zingiberaceae merupakan salah satu famili dari Ordo Zingiberales yang pada sebagian besar spesiesnya dimanfaatkan rimpangnya untuk berbagai keperluan. Famili Zingiberaceae terkenal dengan sebutan jahe-jahean dan memiliki nilai pengobatan yang besar (Tushar, 2010). Zingiberaceae terdistribusi terutama pada hutan-hutan tropis di seluruh dunia. Pemanfaatan Zingiberaceae semakin meningkat seiring dengan berkembangnya ilmu pengetahuan yang mendukung luasnya pengkajian tumbuhan-tumbuhan dari famili ini (Dewi, 2012).

Genus *Zingiber* yang merupakan anggota dari Famili Zingiberaceae menjadi salah satu penyusun tumbuhan bawah (terna) di hutan tropis. *Zingiber* bersifat abadi atau hidup sepanjang tahun (perennial), ditemukan terutama pada tempat-tempat lembab dan pada hutan sekunder (Thelaide, 1996). Salah satu spesies dari Genus *Zingiber* adalah *Zingiber loerzingii* Valetton. *Z. loerzingii* adalah salah satu tanaman herba dengan status rawan langka (*Vurnarable*) berdasarkan daftar *International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List* (IUCN, 2019). Status rawan langka diberikan karena tumbuhan ini sulit untuk didapat dan jumlah populasinya yang sedikit di alam. *Z. loerzingii* tersebar disepanjang Bukit barisan antara Kecamatan Ketambe, Aceh hingga ke Cagar Alam Sibolangit, Sumatera Utara (Rugayah, *et al.*, 2017).

Zingiber loerzingii Valetton belum banyak dikaji dan diteliti sehingga informasi mengenai spesies ini masih sangat sulit didapat. Penelitian mengenai karakter morfologi dan molekuler *Z. loerzingii* dilakukan oleh Dewi (2012) dengan mengamati filogenetik *Z. loerzingii* menggunakan analisis biomolekuler gen *Internal Transcribed Spacer (ITS)*. Sampai saat ini, belum ada publikasi ilmiah mengenai penelitian DNA *barcoding* dari tanaman *Z. loerzingii* dengan menggunakan lokus gen *rbcL* yang tersimpan pada BOLD (*Barcode of Life Database*) Systems.

Pengidentifikasian terhadap *Z. loerzingii* sangat dibutuhkan untuk membantu upaya konservasi dan mencegah tumbuhan tersebut punah sebelum diketahui identitasnya. Proses pengidentifikasian konvensional dengan mengacu pada morfologi suatu organisme membutuhkan waktu yang lama dan terkendala dengan ahli taksonomi yang terbatas dibanding dengan jumlah spesimen yang harus diidentifikasi (Chase & Fay, 2009; Li, *et al.*, 2011) dan hanya dapat mengidentifikasi ketika spesimen masih dalam keadaan yang utuh (Rahayu & Jannah, 2019). Upaya konservasi dengan tujuan mengungkapkan dan mempertahankan biodiversitas Indonesia diperlukan untuk menjamin keberlangsungan suatu jenis makhluk hidup atau spesies langka terhadap ekosistem. Strategi yang dapat dilakukan untuk hal ini diantaranya dengan mengusahakan penemuan dan pengidentifikasian spesies baru di alam dengan waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan mengidentifikasi makhluk hidup berdasarkan ciri morfologi tubuhnya, mengoreksi kesalahan pada identifikasi sebelumnya dan menentukan hubungan filogeni antar spesies di alam (Rahayu & Nugroho, 2015). Kajian karakterisasi makhluk hidup tidak hanya dapat dilakukan dengan melihat perbandingan morfologi saja. Pengkajian secara molekuler juga sangat dibutuhkan karena menjanjikan hasil yang lebih cepat, otomatis dan akurat (Hubert & Hanner, 2015).

Teknik pengkajian molekuler yang dapat digunakan untuk identifikasi tumbuhan dapat dilakukan dengan pengujian *barcode* DNA (Kress *et al.*, 2005; Youm, *et al.*, 2016). *Barcode* DNA dewasa ini menjadi alat bantu yang memiliki manfaat sangat penting bagi taksonomi terutama dalam pengungkapan spesies-spesies langka dan endemik (Kim, *et al.*, 2014; Hashim, *et al.*, 2020; Alaklabi, *et al.*, 2021). *Barcode* DNA memiliki potensi yang besar untuk diterapkan pada tumbuhan Famili Zingiberaceae terutama dalam bidang konservasi (Vinitha *et al.*, 2014). *Barcode* DNA digunakan untuk mengonfirmasikan identitas makhluk hidup secara molekuler dengan menggunakan region gen yang spesifik dan terstandarisasi dari sekuens pendek DNA (Hebert, *et al.*, 2003; Hollingsworth, 2011; Liu, *et al.*, 2012). *Barcode* DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi semua tingkatan kehidupan bahkan potongan tubuh yang tidak utuh (Zein &

Prawiradilaga, 2013). *Barcode* DNA sejauh ini diketahui memberikan dampak yang besar dalam pengkajian keanekaragaman hayati dan keperluan analisis variasi genetik makhluk hidup di alam (Rahayu & Jannah, 2019).

Berdasarkan latar belakang diatas, penulis kemudian tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul “Penentuan *Barcode* DNA berdasarkan lokus Gen *rbcL* pada *Zingiber loerzingii* Valetton” untuk mendapatkan DNA *barcode* dari tumbuhan *Z. loerzingii* Pada penelitian ini, penulis akan menggunakan primer untuk lokus gen *rbcL* yang dalam penggunaannya lebih mudah untuk dilakukan proses amplifikasi.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Bagaimana karakteristik molekuler sekuens lokus gen *rbcL* pada tumbuhan *Z. loerzingii*?
2. Bagaimanakah keragaman molekuler (keragaman genetik) tumbuhan *Z. loerzingii* menggunakan *barcode* DNA berdasarkan lokus gen *rbcL*?
3. Bagaimana hubungan filogenetik *Z. loerzingii* dengan menggunakan lokus gen *rbcL*?

1.3 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah dalam penelitian ini adalah menentukan bagaimana *barcode* DNA pada tumbuhan *Z. loerzingii*. Penelitian ini menggunakan lokus gen *rbcL* sebagai salah satu lokus standar untuk *barcoding* DNA tumbuhan. Sampel penelitian berasal dari Cagar Alam Sibolangit, Kabupaten Deli Serdang, Provinsi Sumatera Utara.

1.4 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah :

1. Untuk mendapatkan karakteristik molekuler sekuens lokus gen *rbcL* dari tumbuhan *Z. loerzingii*.

2. Untuk mengetahui keragaman molekuler (keragaman genetik) tumbuhan *Z. loerzingii* menggunakan *barcode* DNA berdasarkan lokus gen *rbcL*.
3. Untuk melihat hubungan filogenetik *Z. loerzingii* dengan menggunakan lokus gen *rbcL*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini diantaranya dapat dijadikan sebagai sumber informasi tambahan, bahan rujukan dan data ilmiah bagi mahasiswa, dosen, peneliti maupun masyarakat umum mengenai data molekuler tumbuhan *Z. loerzingii* terutama dalam penentuan *barcode* DNA berdasarkan lokus gen *rbcL*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Zingiber loerzingii* Valetton

Zingiber loerzingii Valetton adalah salah satu tumbuhan yang termasuk kedalam Famili Zingiberaceae. Menurut Govaerts R (2017), Taksonomi *Z. loerzingii* adalah :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Zingiber</i>
Spesies	: <i>Zingiber loerzingii</i> Valetton

Zingiberaceae merupakan famili terbesar dari Ordo Zingiberales yang terdiri dari 50 genus dan lebih dari 1.300 spesies diseluruh dunia dengan pusat keanekaragamannya terdapat di daerah tropis Asia Selatan dan Asia Tenggara (Wu & Larsen, 2000). Sistem klasifikasi untuk Zingiberaceae pertama kali diperkenalkan pada tahun 1889 dengan didasarkan pada perbedaan karakteristik morfologi seperti perbedaan jumlah lokul, bentuk plasenta di dalam ovari dan perbungaan (Kress, *et al.*, 2002; Shi, *et al.*, 2011). Klasifikasi Genus *Zingiber* yang dipakai sekarang diperkenalkan oleh Schumann pada tahun 1904 dan Valetton pada tahun 1918. Spesies *Zingiber* yang telah diidentifikasi hingga saat ini sekitar 135 spesies (Theilade, 1996).

Zingiberaceae terkenal dengan rimpang yang beraroma kuat dan bentuknya besar sehingga menyerupai umbi. Daun tumbuhan yang termasuk dedalam famili ini memiliki pertulangan daun sejajar, tersusun berseling dan terdiri atas helaian daun, tangkai dan upih. Batang terdapat di atas tanah dengan ukuran yang sangat pendek (Tjitrosoepomo, 1994). *Zingiber* termasuk kedalam salah satu genus dari famili Zingiberaceae dengan ciri berupa tubuhan herba yang hijau sepanjang tahun. Pada genus *Zingiber*, bunga terpisah dari daun, tersusun

dengan kepala yang berbentuk kerucut letaknya bertumpu pada batang (Brickell, 2012). *Z. loerzingii* merupakan tumbuhan dengan perawakan berupa terpa dengan tinggi sekitar 1,5-2,5 m. Salah satu karakteristik tumbuhan ini adalah rimpang dengan warna putih keabu-abuan (Rugayah, *et al.*, 2017). Bunga memiliki tekstur berlendir dengan warna umumnya putih kekuningan kecuali pada bagian bibir bunga dan kepala sari yang berwarna jingga tua.



Gambar 2.1. *Zingiber loerzingii* Valetton
(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2021)



Gambar 2.2. Bunga *Zingiber loerzingii* Valetton
(Sumber : IUCN, 2019)

Zingiberaceae merupakan jenis tumbuhan herba yang habitat alaminya berada pada hutan tropis. Klasifikasi *Zingiber* yang berasal dari Famili Zingiberaceae termasuk kedalam tumbuhan langka dan rawan punah terlebih habitat dari tumbuhan ini yang juga sebagian besar berada di lereng-lereng bukit sehingga menyebabkan tumbuhan-tumbuhan ini jadi sulit untuk dikoleksi dan

dibuat dokumentasi lebih lanjut. Identifikasi pada Zingiberaceae juga termasuk sulit untuk dilakukan karena tidak beragamnya perbedaan morfologi dan siklus perbungaan yang pendek (Vinitha, *et al.*, 2014). Habitat dan penyebaran *Z. loerzingii* terdapat di daerah lembah dengan lingkungan yang basah dan membutuhkan naungan serta masih ditemukan hanya di daerah Sumatera (Dewi, 2012).

Famili Zingiberaceae lebih sering digunakan sebagai tanaman obat, rempah-rempah, sayuran, pestisida alami dan juga tanaman hias (Kala, 2005; Tushar, *et al.*, 2010; Shi, *et al.*, 2011). Pemanfaatan Zingiberaceae sangat besar terutama pada bidang kesehatan seperti penggunaan rimpang *Zingiber montanum* J.König dalam mencegah dan mengurangi gejala *Covid-19* (Musdja, 2021), pemanfaatan *Zingiber Officinale* Rosc. untuk suplemen anti kanker pada pankreas manusia (Wang, *et al.*, 2021), pewarna alami dan parfum (Jantan, *et al.*, 2003). Genus *Zingiber* merupakan anggota dari Zingiberaceae yang dibudidayakan untuk dimanfaatkan rimpangnya (Brickell, 2012). Salah satu spesies dari genus *Zingiber* yang belum dikaji secara maksimal adalah *Z. loerzingii*. *Z. loerzingii* belum memiliki informasi dan publikasi ilmiah yang cukup untuk dijadikan sebagai data.

2.2. DNA Barcoding

DNA Barcoding atau *Barcode* DNA merupakan metode yang diterima secara universal dalam mengidentifikasi spesies dengan cara yang cepat dan akurat tanpa menyertakan ciri morfologis (Hebert, *et al.*, 2003; Wattoo, *et al.*, 2016; Hu, *et al.*, 2019). *Barcode* DNA menggunakan perbedaan nukleotida yang terdapat pada lokus gen tertentu yang sifatnya mudah untuk diamplifikasi dan unik pada tiap spesies sebagai dasar penentuan perbedaan makhluk hidup (Maloukh, *et al.*, 2017; Hashim, *et al.*, 2020). Gen ini didata pada perpustakaan digital (untuk data urutan sekuens *barcode*) dan kemudian dapat digunakan untuk mengidentifikasi makhluk hidup yang belum diketahui identitasnya. Pengaplikasian *Barcode* DNA tidak hanya untuk mengidentifikasi tapi juga mengklasifikasi makhluk hidup sama seperti fungsi *barcode* UPC (*Universal Product Code*) yang dipindai pada produk-produk di supermarket (Blaxter, 2003).

Barcode DNA pertama kali dikenal pada kalangan ilmuwan ketika Hebert, *et al.* (2003) dari *Guelph University*, Kanada mempublikasikan jurnal mereka yang berjudul “*Biological Identification through DNA Barcodes*” dengan mengevaluasi potensi gen COI (*Cytochrome C Oxidase I*) sebagai alat bantu untuk taksonomi. Hebert dan timnya melakukan tes terhadap kemampuan gen tersebut untuk mengidentifikasi invertebrata dari kelas *Lepidoptera*. Hebert juga menyarankan pembuatan inventaris *barcode* molekuler untuk taksa-taksa yang telah diketahui dan menjadi pusat data bagi identifikasi taksonomi.

Barcode DNA sebagai alat identifikasi bergantung pada basis data sekuens yang telah dibuat (de Vere *et al.*, 2012). Pangkalan data sekuens DNA untuk *barcode* DNA makhluk hidup tersimpan di *Barcode of Life Database*. Sekuens *barcode* dari spesimen yang belum diketahui identitasnya kemudian dibandingkan dengan data sekuens pada CBOL (Hajibabaei, *et al.*, 2007). Data yang tersimpan dapat dijadikan acuan untuk pengidentifikasian makhluk hidup, informasi spesies kriptik (belum diketahui identitasnya), pencegahan eksploitasi spesies langka dan inventaris data molekuler makhluk hidup (Kress, 2017).

Penggunaan *Barcode* DNA secara luas dapat ditemukan pada bidang ekologi, biomedikasi, epidemiologi, evolusi, konservasi dan bio-industri. *Barcode* DNA telah digunakan sebagai alat dalam mengidentifikasi makhluk hidup secara tepat meskipun keadaan tubuhnya tidak utuh, mengidentifikasi spesies yang belum dikenali (Liu, *et al.*, 2011), memonitor kualitas air (Kaur, 2015), mengidentifikasi polen (serbuk sari) yang terkumpul pada tubuh hewan serangga polinator, memonitor perdagangan hewan dan tumbuhan langka dan dilindungi (Baker, 2008), mengidentifikasi tumbuhan obat (El-Atroush, *et al.*, 2015) dan pemeriksaan produk-produk kesehatan herbal serta suplemen makanan (Lo & Shaw, 2018; Sarvananda, 2018). *Barcode* DNA sangat membantu dalam mengungkapkan *mislabeling* dan *food fraud* (pemalsuan bahan baku makanan) seperti pada *seafood* (Minoudi, *et al.*, 2020; Pardo & Jiménez, 2020) dan produk hasil susu (Uncu & Uncu, 2020). Produk hasil dari tumbuhan dan hewan seperti madu (Valentini, *et al.*, 2010) teh herbal (Uncu, *et al.*, 2015), minyak Zaitun

(Kumar, *et al.*, 2010) dan sirip ikan Hiu (Holmes, *et al.*, 2009) juga dapat diverifikasi dengan *Barcode* DNA.

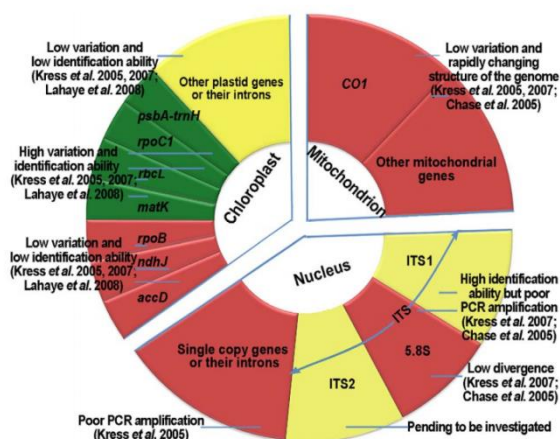
Barcode DNA yang ideal harus terdiri dari sekuens pendek dengan panjang sekitar 400-800 bp (*basepair*) yang telah terstandardisasi secara internasional dan dapat digunakan untuk mengkarakterisasi semua jenis makhluk hidup (Savolainen *et al.*, 2005; Kress & Erickson, 2012). Karakteristik yang juga harus dimiliki *barcode* DNA diantaranya lokus gen yang digunakan memiliki tingkat kemiripan yang tinggi untuk individu pada spesies yang sama tetapi berbeda pada tiap spesies. Region gen yang digunakan harus memiliki informasi filogenetik yang cukup agar spesies yang belum diketahui dapat dimasukkan kedalam kelompok taksonomi yang sesuai. Region gen tersebut juga harus sangat kuat serta dapat diamplifikasi dan disekuensing dengan mudah (Valentini, *et al.*, 2008; Bruni, *et al.*, 2010).

Barcode DNA pada awal publikasinya masih didesain dan diaplikasikan untuk hewan (Maia, *et al.*, 2012). *Barcode* DNA untuk tumbuhan tidak seketika berhasil dan diterima oleh komunitas ilmuan hingga beberapa tahun kemudian. Lokus gen COI tidak sesuai untuk dilakukan *barcode* DNA pada hampir semua tumbuhan darat (Chase, *et al.*, 2005). CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*) Working Group menyetujui penggunaan lokus gen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* dan *ITS* sebagai lokus standard untuk aplikasi *barcode* DNA pada tumbuhan (Kress, 2017). Kombinasi dari lokus gen *matK* dan *rbcL* adalah yang disarankan sebagai lokus gen universal untuk identifikasi dan autentikasi bagi tumbuhan darat dan tumbuhan berbunga (Liu, *et al.*, 2011; Yan, *et al.*, 2015; Wattoo, *et al.*, 2016).

2.3. Gen *rbcL* (RuBisCO)

Plastida merupakan sumber utama yang digunakan pada *barcode* DNA untuk tumbuhan karena laju substitusi nukleotida yang rendah pada DNA mitokondria tumbuhan (Maia, *et al.*, 2012; Meena *et al.*, 2020). Dua region gen dari genom plastida yaitu gen *rbcL* (*Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase large subunit gene* sering disebut dengan gen RuBisCO) dan gen *matK* (*maturase K*) ditetapkan sebagai sekuens utama dalam *barcode* DNA untuk untuk

tumbuhan pada tahun 2009 oleh 3rd *World DNA Barcode Conference* (Yu, *et al.*, 2021). Region gen *rbcL* telah digunakan secara luas untuk *barcoding* DNA pada tumbuhan darat karena memiliki tingkat universalitas yang tinggi dan mudah untuk diamplifikasi (Newmaster, *et al.*, 2006). Gen *rbcL* sangat membantu dalam perbandingan dan analisis data karena dimiliki oleh banyak tumbuhan darat (Cumming, *et al.*, 2013). Salah satu keuntungan Gen *rbcL* yang menjadikannya lokus terstandar adalah tingkat keberhasilan yang tinggi untuk dilakukan *bidirectional sequencing* (sekuensing dua arah dengan menggunakan primer *reverse* dan *forward*) (Basith, 2015).



Gambar 2.3. Kandidat Region *Barcode* pada Kingdom Plantae (Sumber : Chen, *et al.*, 2010)

Gen *rbcL* merupakan region *barcoding* yang paling banyak dikarakterisasi pada *GenBank* dengan lebih dari 17.000 sekuens *rbcL* dari tumbuhan darat yang telah tersimpan (Newmaster, 2006). Gen *rbcL* memiliki panjang sekitar 500-1400 bp dan sesuai jika dilakukan studi filogenetik (CBOL, 2009). Gen *rbcL* memiliki tingkat kemiripan yang tinggi antar-spesies dan memiliki tingkat mutasi yang rendah. Hal ini menyebabkan studi variasi genetik dan filogenetik makhluk hidup dapat dilakukan secara mendalam dengan menggunakan region gen ini (Basith, 2015; Nurhasanah & Papuangan, 2019).

2.4. Isolasi DNA

DNA memiliki informasi genetik yang diturunkan secara hereditas pada makhluk hidup sehingga dapat dijadikan salah satu media untuk identifikasi (Fatih, 2009). DNA dapat diambil dari bagian tubuh makhluk hidup, pada tumbuhan DNA bisa diisolasi terutama dari daun (Maftuchah, *et al.*, 2014). Isolasi DNA pada umumnya terdiri dari beberapa tahapan yaitu isolasi sel, lisis (penghancuran) dinding dan membran sel, ekstraksi dalam larutan, purifikasi (pemurnian) dan presipitasi. Prinsip dasar dari isolasi DNA adalah mendapatkan DNA murni yang terpisah dari organel-organel sel, karbohidrat, protein dan lipid (Murtyaningsih, 2017).

Tahap pertama dari isolasi DNA adalah dengan menghancurkan (lisis) dinding dan membran sel tumbuhan. Lisis dapat dilakukan baik dengan secara fisik melalui penggerusan, *freeze thaw* dan *beadmill homogenization* serta secara kimia dengan menggunakan senyawa SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) yang biasanya terdapat pada *detergent* dan CTAB (*Cetyltrimethylammonium Bromide*) (Murtyaningsih, 2017). Pelisisan jaringan tumbuhan dilakukan dengan mengaplikasikan enzim pencerna yang pada umumnya menggunakan Proteinase-K yang mendegradasi protein dan menonaktifkan enzim nuklease dengan cepat sehingga mempermudah proses selama isolasi dan purifikasi DNA (Knebelberger & Stöger, 2012). Tahap kedua yaitu menghilangkan protein dari DNA. Tahap ketiga dilakukan dengan menghilangkan RNA menggunakan enzim RNase. Tahapan terakhir adalah dengan presipitasi DNA dengan menggunakan dua jenis alkohol yaitu isopropanol dan etanol (Puspitaningrum, *et al.*, 2018).

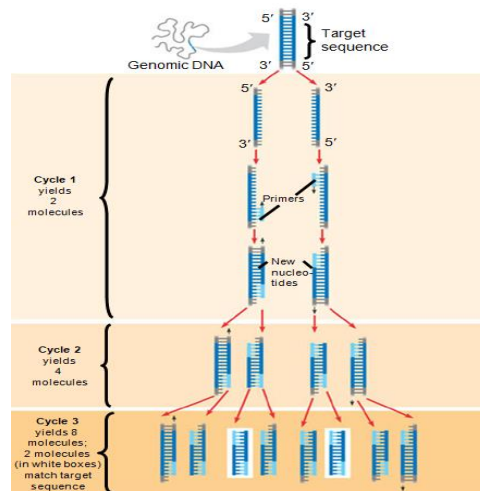
Metode yang dilakukan dalam mengisolasi DNA tumbuhan bergantung pada jenis tumbuhan, morfologi dan fisiologi tumbuhan yang ingin diisolasi. Teknik isolasi DNA yang umum digunakan pada tumbuhan annual (tahunan) memerlukan beberapa modifikasi dari metode yang sudah ada, contohnya dengan menambahkan antioksidan polivinilpolipiridilidon (PVPP) dan merkaptoetanol juga menggunakan nitrogen cair untuk menghancurkan jaringan dan membantu memperpanjang masa simpan sampel sebelum dipurifikasi (Syafaruddin, *et al.*, 2011). DNA yang baru diisolasi memiliki banyak kontaminan berupa polisakarida

dan senyawa metabolit sekunder yang berisiko menghambat pengamatan DNA. Pita-pita DNA yang terbentuk dalam elektogram bisa tidak terlihat dengan jelas. Untuk menghindari masalah tersebut maka sangat diperlukan teknik isolasi DNA yang tepat untuk tiap tumbuhan agar didapat DNA dengan kualitas yang baik sehingga mudah untuk dilakukan proses amplifikasi (Dewi, 2012).

2.5. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Polymerase Chain Reaction atau reaksi berantai polimerase adalah sebuah teknik saintifik dalam ilmu biologi molekuler dimana sekuens nukleotida tertentu pada DNA diamplifikasi (diperbanyak secara terus-menerus) secara *in-vitro* menggunakan sistem suhu dan bantuan enzim (Maftuchah, *et al.*, 2014). Singkatnya, reaksi berantai polimerase dapat dikatakan sebagai mesin “fotokopi molekuler”. *Polymerase Chain Reaction* dikembangkan oleh Kary Mullis, seorang ahli biokimia Amerika pada tahun 1983 dan mengantarkannya meraih Nobel pada tahun 1993 (Bartlett & Stirling, 2003). Pada dasarnya *Polymerase Chain Reaction* menggunakan prinsip penggandaan untai DNA dengan bantuan dua primer yang sebelumnya telah dideskripsikan oleh Gobin Khorana pada tahun 1971. Teknik PCR telah sangat umum digunakan terutama pada bidang kesehatan dan penelitian biologi molekuler (Joshi & Despande, 2010).

PCR dapat bekerja dengan sangat cepat untuk menganalisis campuran DNA yang kompleks dan dapat dilakukan meskipun isolasi DNA sebelumnya menggunakan teknik sederhana (Dewi, 2012). PCR memungkinkan penggandaan sekuens DNA tertentu dalam jumlah yang sangat besar dan memiliki tingkat efisiensi yang tinggi. Satu molekul DNA dapat diperbanyak menjadi dua, empat, delapan dan seterusnya. Penggandaan yang selalu berkelanjutan pada proses PCR dibantu oleh enzim polimerase yang dapat mengikat tiap untai DNA yang digandakan membentuk untai yang lebih panjang. Pada PCR juga dibutuhkan primer yang akan menempel pada kedua ujung untai DNA yang digandakan untuk membentuk untai baru yang lebih panjang (Joshi & Despande, 2010).



Gambar 2.4. Tahapan *Polymerase Chain Reaction* (Sumber : Campbell, 2008)

Komponen yang sangat esensial dalam melakukan PCR diantaranya Templat DNA yang berisi genom DNA sampel yang akan diperbanyak, primer yang merupakan oligonukleotida pendek, berantai tunggal, dan melengkapi ujung-ujung templat DNA, larutan *buffer* untuk mempertahankan pH, *Taq DNA Polymerase*, dan *Deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs) standard yang terdiri atas *Deoxycytidine triphosphate* (dCTP), *deoxythymidine triphosphate* (dTTP), *Deoxyadenosine triphosphate* (dATP), dan *Deoxyguanosine triphosphate* (dGTP) (Etisham, 2016). Reaksi PCR standard membutuhkan 0,1-0,5 μm primer untuk tiap ujung DNA yang dapat digunakan untuk 30 kali siklus amplifikasi atau perbanyakkan untai DNA. *Taq DNA Polymerase* harus stabil terhadap suhu tinggi dan tidak mengalami denaturasi pada suhu 94-95°C. PCR membutuhkan larutan *buffer* yang mengandung MgCl_2 karena konsentrasi ion Mg^{2+} dapat mempertahankan tingkat pH pada kisaran 8,3-8,8 dan meningkatkan aktivitas enzim secara maksimal (Dewi, 2012). Untuk pengamplifikasian segmen DNA yang memiliki panjang untai lebih dari 500 bp (*basepair*), diperlukan 50mM larutan KCl (Ruano & Kid, 1991).

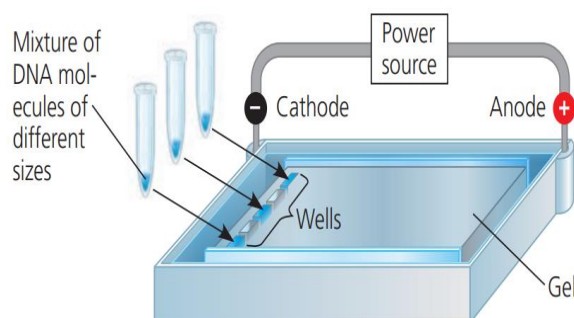
Tahapan pada PCR terdiri atas Denaturasi, *Annealing* atau penempelan primer dan *Extension (Elongation)* atau tahap pemanjangan. Pada tahap denaturasi DNA untai ganda dibuka untuk menjadi templat DNA untai tunggal. Tahapan ini memerlukan suhu sekitar 94-95°C dalam waktu 5 menit sehingga DNA menjadi

tidak stabil dan ikatan hidrogen terputus sehingga terjadi denaturasi. Tahap kedua yaitu tahap *annealing* dilakukan pada kisaran suhu 50-60°C dan merupakan tahapan dimana primer menempel pada templat DNA dibagian yang urutan biasanya komplementer. Tahap *Extension* atau pemanjangan biasanya menggunakan *Taq Polymerase* yang memulai aktivitasnya untuk memperpanjang DNA primer dari ujung 3' dan dilakukan pada suhu 72°C. Setelah tahap pemanjangan selesai, siklus PCR kembali diulang dari tahap pertama (Joshi & Despande, 2011; Dewi, 2012).

2.6. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan molekul berdasarkan ukuran, muatan dan bentuk pada suatu medium yang dialiri listrik (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Konsep elektroforesis ditemukan beberapa abad lalu ketika Ruess melakukan sebuah percobaan dengan mengalirkan arus listrik melalui suspensi tanah liat di dalam air dan menemukan adanya perpindahan partikel menuju katoda (kutub negatif) (Chin, *et al.*, 2013). Arne Tiselius, pada tahun 1937, menganalisis protein dengan menggunakan elektroforesis batas gerak (*Zone-boundary electrophoresis*) (Roberts & Dryden, 2013). Elektroforesis berkembang secara signifikan dan digunakan oleh ilmuwan bidang genetika ketika Hunter dan Moller melakukan eksperimen terhadap enzim sebagai katalisator untuk melihat pengaruh kimia histologinya (Harahap, 2018).

Salah satu tujuan dilakukannya elektroforesis adalah untuk menguji kualitas DNA dengan menganalisis fragmen-fragmen DNA yang telah dipotong oleh enzim restriksi dan mengukur panjang untaianya (Yuwono, 2010). Molekul yang memiliki muatan akan bergerak ke medan elektroda yang berlawanan. Molekul DNA yang bermuatan negatif karena adanya gugus fosfat (Roberts & Dryden, 2013) bergerak menuju anoda (kutub positif) dalam medan listrik. Pada proses perpindahannya, matriks gel menyebabkan molekul yang memiliki untaian lebih panjang sulit bergerak sehingga DNA terpisah berdasarkan panjang untaianya (Campbell, *et al.*, 2008).



Gambar 2.5. Alat Elektroforesis
(Sumber : Campbell, 2008)

Elektroforesis memerlukan media penyangga sebagai tempat molekul DNA bermigrasi dan mencegah terjadinya difusi karena panas yang timbul dari aliran listrik (Fatchiyah, *et al.*, 2011). Media penyangga yang digunakan tergantung pada bahan yang akan dianalisis. Gel agarosa adalah media penyangga yang paling umum digunakan untuk elektroforesis molekul DNA (Wastermeier, 2016). Agarosa merupakan polisakarida linear alami D-galaktosa dan 3,6-anhidrigalaktosa, diekstrak dari rumput laut dan ketika dipanaskan dengan buffer dapat membentuk matriks gel dari ikatan hidrogen (Magdeldin, 2012). Pita DNA dalam gel dapat diamati sebagai fluoresensi dengan bantuan sinar ultra violet.

2.7. Sekuensing

Sekuensing DNA adalah sebuah metode analisis yang digunakan untuk membaca informasi genetik yang tersedia pada sekuens DNA (Rosenberg, 2017). Sekuensing DNA pertama kali dikembangkan oleh Frederick Sanger dan timnya dengan membuat metode sekuens *dideoxy* yang didasarkan pada perpanjangan untai DNA oleh enzim DNA polimerase. Metode sekuens kedua dipelopori oleh Maxam dan Gilbert pada rentang waktu yang berdekatan dengan Sanger. Metode Maxam dan Gilbert dilakukan dengan mendegradasi fragmen DNA secara kimia (Pierce, 2016). Sekuensing DNA Sanger pada akhirnya digunakan sebagai prosedur standar yang lebih banyak digunakan karena penggunaannya yang lebih mudah dan lebih cepat secara teknis (Graham & Hill, 2001; McGinn & Gut, 2012).

Metode sekuensing Sanger berpedoman pada proses replikasi. Pada metode ini digunakan substrat khusus untuk mensintesis DNA. DNA umumnya

disintesis dari *deoxyribonucleoside triphosphates* (dNTPs), akan tetapi pada metode Sanger, DNA disintesis dengan *dideoxyribonucleoside triphosphate* (ddNTP) (Pierce, 2016). Sekuensing DNA dengan metode Sanger membutuhkan beberapa komponen seperti DNA target; primer; campuran ddNTP yang terdiri dari ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP dan enzim polimerase (Graham & Hill, 2001).

Metode sekuensing Sanger juga disebut dengan *cycle sequencing* karena reaksinya dilakukan dengan metode siklus pada *thermocycler*. Campuran dari sampel dimasukkan kedalam *thermocycler* yang akan memanaskan campuran pada suhu 96°C, dimana pada suhu ini templat sampel DNA akan mengalami denaturasi. Selanjutnya, suhu diturunkan sehingga primer dapat menempel pada templat DNA dan suhu kemudian menyesuaikan untuk proses sintesis salinan DNA oleh DNA polimerase sampai ddNTP bergabung (Clark, 2019). Hasil akhir dari reaksi sekuensing adalah sejumlah potongan DNA dengan panjang untaian yang bervariasi. Untai DNA memiliki akhiran nukleotida yang beragam sesuai dengan campuran pada dNTP. DNA akan berakhir dengan nukleotida A jika dNTP dicampur dengan ddATP, berakhir dengan nukleotida T jika dicampur dengan ddTTP, berakhir dengan nukleotida C jika dicampur dengan ddCTP dan berakhir dengan nukleotida G jika dNTP dicampur dengan ddGTP (Dewi, 2012).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan bulan Mei 2021. Sampel dikoleksi dari Cagar Alam Sibolangit, Kabupaten Deli Serdang. Pengerjaan proses DNA *Barcoding* dilaksanakan di laboratorium Bioselmolekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Medan.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain plastik klip kedap udara (plastik *zip-lock*), spidol atau penanda permanen, gunting, pinset, kamera digital, *gloves*, kertas parafilm, labu erlenmeyer 500 ml (Pyrex), *Tube Eppendorf* 300 μ l dan 1,5 ml, labu ukur 100, 250 dan 500 ml, *aluminium foil*, spatula, lumpang dan alu, mikro pipet (Rainin) dengan volume 10 μ l ; 20 μ l ; 100 μ l ; dan 1000 μ l, tip mikro pipet kuning ; biru dan putih, rak tip, spatula, botol reagen, lemari es, *Ice box*, *vortex* (Biosan Multi-Vortex V-32), *microcentrifuge* (Kitman K24) *sentrifuge*, tabung UV (*Ultra violet*), PCR *gradient* : Labcycler (SensoQuest), (*Polymerase Chain Reaction*), tabung PCR, mini horizontal *electrophoresis* HU10 (*Scie-Plas*), alat *Gel Documentation* (BIOSTEP), PTC (*Programmer Thermal Cycler*), dan *freezer*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian *Barcode* DNA pada tumbuhan *Z. loerzingii*, diantaranya sampel jaringan daun tumbuhan *Z. loerzingii* yang diambil dari Cagar Alam Sibolangit, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara, alkohol 70%, akuades steril, *loading dye* (*Thermo-scientific*), RNase (*Thermo-scientific*), TBE (*tris HCl*, asam borat, dan *EDTA*) 10x (1st Base), *DNA Ladder* 100 bp (Geneaid), *primer reverse* dan *forward* (Tabel 3.1.), *DNA loading dye*, *Gel Agarose* (Infitrogen), *red gel stain* (Infitrogen), *Taq Polymerase*, KIT PCR (*Myfi mix* Bioline), DNA Mini Kit (*Plant*) Geneaid dan ddH₂O (*deionized water*) atau akuabides.

Tabel 3.1. Daftar Primer

Identifikasi Primer	Sequence (5'-3')	Referensi
<i>rbcLaf</i>	5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-3'	(El-Atroush, <i>et al.</i> , 2015; Dechbumroong, <i>et al.</i> , 2018; Arif <i>et al.</i> , 2019; Hashim, <i>et al.</i> , 2021)
<i>rbcLa-rev</i>	5'-GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG-3'	(El-Atroush, <i>et al.</i> , 2015; Arif, <i>et al.</i> , 2019; Hashim, <i>et al.</i> , 2021)

3.3. Prosedur Penelitian

Karakterisasi molekuler tumbuhan *Z. loerzingii* dilakukan dengan tahapan : pengoleksian sampel, isolasi dan ekstraksi DNA, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), elektroforesis, sekuensing dan analisis hasil sekuens. Karakterisasi morfologi tumbuhan *Z. loerzingii* dilakukan dengan pengamatan karakter morfologi yang terlihat dan studi literatur.

3.3.1. Koleksi Sampel

Penelitian *Barcode* DNA pada tumbuhan *Z. loerzingii* ini menggunakan sampel jaringan daun *Z. loerzingii* yang diambil dari Cagar Alam Sibolangit. Bagian tumbuhan yang dipakai adalah daun yang telah dewasa dan masih segar. Sampel daun segar disemprot dengan alkohol 70%, disimpan dalam plastik kedap udara (*zip-lock*) dan dimasukkan gel silika untuk mencegah pembusukan dengan menyerap kelebihan air, lalu semua sampel daun disimpan dengan suhu rendah (-20°C) agar masa penyimpanan bisa lebih panjang.

3.3.2. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *Plant DNA Mini Kit* komersil dengan merek Geneaid dan prosedur isolasi mengikuti protokol yang telah tersedia. Daun sampel sebanyak 100 mg dihaluskan dengan menggunakan lumpang dan alu. Sampel yang telah halus dimasukkan kedalam tabung *microcentrifuge* 1,5 ml, lalu ditambahkan larutan *buffer* GP 1 sebanyak 400 µl dan RNase 5 µl. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*

selama 10 detik lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Selama masa inkubasi, campuran sampel divortex tiap 5 menit selama 10 detik.

Larutan *Elution buffer* sebanyak 200 µl/sampel dipanaskan pada suhu 60°C selagi menunggu inkubasi selesai. Larutan ini akan digunakan pada tahap akhir isolasi DNA. Sampel yang telah selesai diinkubasi ditambahkan 100 µl *buffer* GP2 dan divortex selama 10 detik. Sampel kemudian diinkubasi kembali kedalam es selama 3 menit. Selama inkubasi, *filter column* ditempatkan dalam 2 ml *collection tube*. Sampel hasil inkubasi dimasukkan kedalam *filter column* lalu disentrifuge dengan kecepatan 1000 x g (kali gravitasi) selama 1 menit. *Filter column* kemudian dibuang dan cairan pada *collection tube* dipindahkan 300 µl ke mikrosentrifuge *tube* kemudian ditambahkan 400 µl *buffer* GP3 sebanyak volume cairan. Campuran divortex selama 10 detik.

Setelah campuran selesai divortex, ditempatkan *GD column* pada *collection tube* dan cairan yang terdapat pada *microcentrifuge tube* dipindahkan sebanyak 700 µl kedalam *GD column*. Campuran disentrifuge dengan kecepatan 16000 x g selama 2 menit. Larutan pada *collection tube* dibuang dan *GD column* diletakkan kembali. Campuran sampel disentrifuge lagi dengan kecepatan 16000 x g selama 30 detik kemudian larutan yang terdapat pada *collection tube* dibuang dan *GD column* diletakkan kembali.

Larutan *buffer* W1 ditambahkan sebanyak 400 µl ke *GD column* lalu disentrifuge dengan kecepatan 16000 x g selama 30 detik. Larutan yang ada pada *GD column* dibuang kedalam *collection tube*. Larutan *Wash buffer* ditambahkan kedalam *GD column* sebanyak 600 µl lalu disentrifuge dengan kecepatan 16000 x g selama 30 detik, lalu larutan yang terdapat dalam *GD column* dibuang kembali kedalam *collection tube*. Campuran disentrifuge lagi dengan kecepatan 16000 x g selama 3 menit.

Tahap selanjutnya, *GD column* dipindahkan ke mikrosentrifuge tube 1,5 ml steril. Larutan *Elution buffer* yang telah dipanaskan pada tahap awal ekstraksi ditambahkan kedalam *GD column* sebanyak 100 µl dan didiamkan selama 5 menit. Campuran disentrifuge dengan kecepatan 16000 x g selama 30 detik. Larutan

yang terdapat dalam *mikrosentrifuge tube* merupakan DNA murni. DNA murni disimpan pada suhu -20°C .

3.3.3. Analisis Kualitatif DNA

Analisis kualitatif DNA dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa menggunakan *Mini Horizontal Electrophoresis – HU10* (DNA). Analisis ini bertujuan untuk mengetahui kualitas hasil isolasi DNA genom total maupun amplifikasi DNA. Amplifikasi diawali dengan pembuatan gel agarosa 0,8% dengan melarutkan 0,8 gr agarosa kedalam 10 ml larutan TBE buffer dan 90 ml akuades. Larutan dipanaskan pada suhu medium sampai muncul gelembung. Agarosa harus larut sepenuhnya dan warna larutan dipastikan tetap bening. Setelah agarosa larut dengan sempurna, larutan dibiarkan menghangat, lalu ditambahkan *red gel stain* sebanyak 5 μl . Larutan gel dituang kedalam cetakan yang telah dilengkapi dengan sisir lalu didiamkan hingga mengeras. Gel kemudian dimasukkan kedalam alat elektroforesis dan direndam dengan campuran larutan buffer TBE 30 ml dan 270 ml akuades, lalu dilepaskan sisir secara perlahan.

Marker DNA ladder 100 bp sebanyak 5 μl dimasukkan kedalam sumur yang berada pada bagian paling kiri. Larutan sampel DNA yang telah diamplifikasi diambil sebanyak 8 μl lalu dicampurkan dengan 2 μl *loading dye* di atas kertas parafilm dan dimasukkan kedalam sumur elektroforesis. Setelah seluruh sampel selesai dimasukkan, mesin elektroforesis melakukan *running* selama 45 menit dengan voltase sekitar 70 V dan arus 100 mA. Marker DNA digunakan sebagai acuan untuk mengukur panjang pita DNA. Selanjutnya, gel diamati dengan menggunakan bantuan sinar ultraviolet. Proses visualisasi hasil elektroforesis DNA dilakukan dengan bantuan *Gel documentation*. Profil DNA yang terlihat kemudian disimpan dalam perangkat dokumentasi gel. Perangkat dokumentasi gel adalah alat yang terdiri atas kotak berbahan metal tempat penyinaran sinar ultraviolet yang dihubungkan dengan kamera digital. Kamera digital tersebut terpasang pada komputer dengan kelengkapan program yang dapat menyimpan fotografi dari hasil elektroforesis. Dokumentasi gel berfungsi untuk

mengambil foto gel hasil elektroforesis kemudian menyimpannya dalam bentuk data fotografi.

3.3.4. Amplifikasi atau PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Pada proses PCR dilakukan amplifikasi yang bertujuan untuk memperbanyak DNA di daerah lokus yang akan digunakan untuk proses *barcoding*. Amplifikasi sampel DNA menggunakan dua jenis primer yaitu primer *reverse* dan primer *forward*. Volume untuk pembuatan *master mix* PCR (untuk satu reaksi PCR) adalah 50 μ l dengan komposisi larutan yaitu, 5 μ l primer *forward* dan 5 μ l primer *reverse* (Tabel 3.1), 5 μ l larutan DNA sampel, 10 μ l akuabides, 25 μ l KIT PCR (Myfi Mix Bioline) yang dimasukkan kedalam tabung eppendorf 300 μ l. Sampel dimasukkan kedalam alat PCR gradient untuk diamplifikasi.

Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus. Tahapan amplifikasi pada tiap primer umumnya sama, hanya terdapat perbedaan pada proses *annealing*. Pada tahap awal *hot start* dilakukan pada suhu 97°C selama 4 menit. Tahapan selanjutnya dilakukan masing-masing 35 siklus. Pada primer *rbcL*, Denaturasi dilakukan dengan suhu 94°C selama 45 detik, penempelan primer (*annealing*) dilakukan pada suhu 52°C selama 50 detik dan Pemanjangan DNA (*Extension*) memerlukan suhu 72°C selama 1 menit. Pita DNA hasil dari PCR kemudian dielektroforesis menggunakan agarosa 1% dan divisualisasikan dengan menggunakan UV transluminator. Tahapan Amplifikasi yang lebih jelas dan singkat dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Tahapan Amplifikasi DNA

Tahapan	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Siklus
<i>Hot Start</i>	97	240	1
Denaturasi	94	45	35
Annealing	<i>rbcLaF</i>	52	
	<i>rbcL rev</i>	52	
Extension	72	60	
Final Extension	72	420	1

3.3.5. Sekuensing

Sekuensing DNA *Z. loerzingii* berguna untuk memperoleh data urutan nukleotida pada lokus gen yang diamati dari sampel *Z. loerzingii*. Sekuensing pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan jasa perusahaan Biologi Molekuler 1st BASE Malaysia. Produk hasil amplifikasi DNA *Z. loerzingii* dijadikan sebagai sampel dalam reaksi sekuensing.

3.3.6. Analisis Data

Hasil sekuensing berupa kromatogram diedit menggunakan aplikasi Geneious Prime versi *trial* untuk melihat kualitas basa dan aplikasi Bioedit versi 7.2.5 untuk memperoleh sekuens konsensus berdasarkan sekuens konservatif yang dihasilkan dari sekuensing primer *rbcLaf* dan *rbcLa-rev*. Sekuens konsensus yang telah diperoleh kemudian *dialignment* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dari *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Data dengan similaritas yang tinggi dengan sampel diikutkan dalam analisis pohon filogenetik. Pohon filogenetik dibangun dengan menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) X. Analisis dilakukan untuk menghitung persentase similaritas, *GC Content* dan jarak genetik. Keragaman genetik antar sampel *Z. loerzingii* diidentifikasi dengan aplikasi DnaSP versi 6. Pengilustrasian nukleotida DNA hasil sekuensing dilakukan dengan bantuan website <http://biorad-ads.com/DNABarcodeWeb/>.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Karakteristik Molekuler Sekuens lokus gen *rbcL* pada tumbuhan *Zingiber loerzingii* Valetton.

Karakteristik molekuler pada tumbuhan *Z. loerzingii* dapat diamati dari hasil sekuensing dan *barcoding* DNA menggunakan lokus gen *rbcL*. Berikut ini hasil tahapan dari karakteristik molekuler yang telah dilakukan terhadap tumbuhan *Z. loerzingii*.

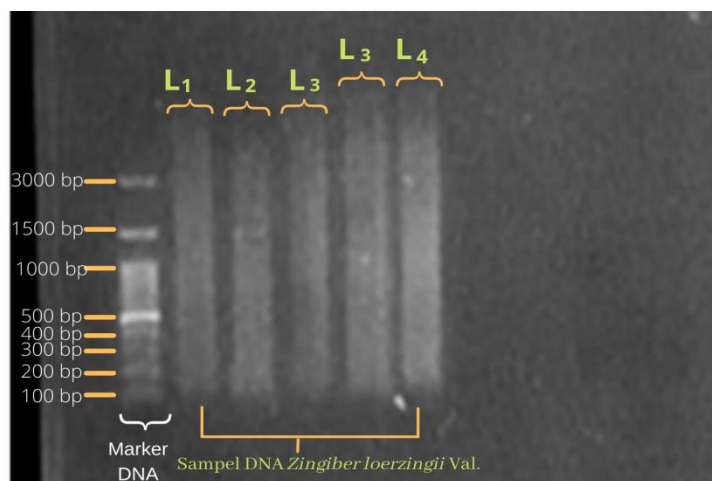
4.1.1. Hasil Isolasi DNA *Zingiber loerzingii* Valetton

Identifikasi molekuler terhadap *Z. loerzingii* diawali dengan tahapan isolasi DNA yang bertujuan untuk mengekstraksi DNA murni yang kemudian digunakan pada proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan Sekuensing. DNA berkualitas tinggi sangat dibutuhkan untuk keakuratan identifikasi menggunakan *Barcode* DNA. Isolasi DNA harus dilakukan dengan sangat teliti, cepat, praktis dan menggunakan peralatan yang steril untuk mencegah DNA terdegradasi dan menghindari kontaminasi yang bisa menghambat reaksi pada proses PCR serta dapat digunakan dalam berbagai analisis molekuler (Moyo, *et al.*, 2008; Chen, *et al.*, 2014). Untuk mendapatkan hasil DNA murni dengan cepat dan tingkat kontaminasi yang rendah, isolasi dilakukan dengan menggunakan Kit isolasi komersial. Metode isolasi dengan menggunakan Kit komersial dilakukan berdasarkan penelitian sebelumnya terhadap isolasi DNA Famili Zingiberaceae (Shi, *et al.*, 2011; Basak, *et al.*, 2019; Saha, *et al.*, 2020; Yang, *et al.*, 2020).

DNA diisolasi dari daun dengan menggunakan Kit komersial dari Geneaid yang dioptimalkan untuk memurnikan baik DNA genom, DNA mitokondria maupun DNA kloroplas yang berasal dari berbagai spesies tumbuhan (Geneaid Protocol, 2020). Proses isolasi DNA diawali dengan pelisisan membran dan dinding sel dengan menggunakan buffer GP1. DNA diikat pada *GD Column* menggunakan buffer GP3. Residu-residu seperti RNA dibersihkan dengan RNase

dan protein dibersihkan dengan buffer W1. DNA murni didapatkan dari hasil elusi menggunakan *elution buffer* (Rau, *et al.*, 2018).

Hasil isolasi DNA diuji kualitas pitanya dengan menggunakan uji elektroforesis dengan gel agarosa 0,8%. Pengujian kualitas DNA dilakukan untuk mengetahui tingkat keberhasilan pada tahap isolasi DNA. Gel agarosa konsentrasi 0,8% memiliki kisi-kisi serat polimer yang tidak sepadat gel agarosa pada konsentrasi 1%. Penggunaan konsentrasi sebanyak 0,8% bertujuan untuk menghindari sulitnya molekul DNA dengan pita berukuran panjang untuk turun ke arah kutub positif.



Gambar 4.1. DNA *Zingiber loerzingii* (L₁, L₂, L₃ dan L₄) hasil isolasi metode Kit komersial.

Pada penelitian ini, informasi mengenai kualitas DNA hasil isolasi terlihat baik, dimana hasil pembacaan pada *Gel Documentation* menunjukkan terdapat DNA dengan panjang lebih dari 3000 bp. *Smear* yang terdapat pada hasil isolasi DNA isolasi tumbuhan *Z. loerzingii* diakibatkan oleh konsentrasi DNA yang relatif tinggi dengan berbagai ukuran panjang basa sehingga DNA tersebar pada sepanjang jalur elektroforesis (Komalasari, 2009).

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

Tahapan amplifikasi DNA pada penelitian ini dilakukan dengan bantuan pasangan primer *rbcLa-rev* dan *rbcLaf* sebagai primer spesifik untuk membatasi daerah region DNA yang akan diamplifikasi. Primer *rbcLaf* (primer *forward*) dan

rbcLa-rev (primer *reverse*) merupakan primer yang berguna sebagai penanda untuk daerah genom pada kloroplas (*cpDNA*). Primer *rbcL* telah digunakan untuk identifikasi molekuler pada tumbuhan dari Famili Zingiberaceae (Ahmad, *et al.*, 2008; Basak, *et al.*, 2019; Li, *et al.*, 2019; Gui, *et al.*, 2020). Sekuens pada lokus gen *rbcL* memiliki efisiensi yang tinggi dengan tingkat keberhasilan pada amplifikasi hampir mendekati 100% dan menyajikan keuntungan berupa tingkat universalitas yang tinggi (Shi, *et al.*, 2019; Newmaster, *et al.*, 2006) menjadi alasan kuat digunakannya lokus gen *rbcL* pada analisis molekuler *Z. loerzingii*.

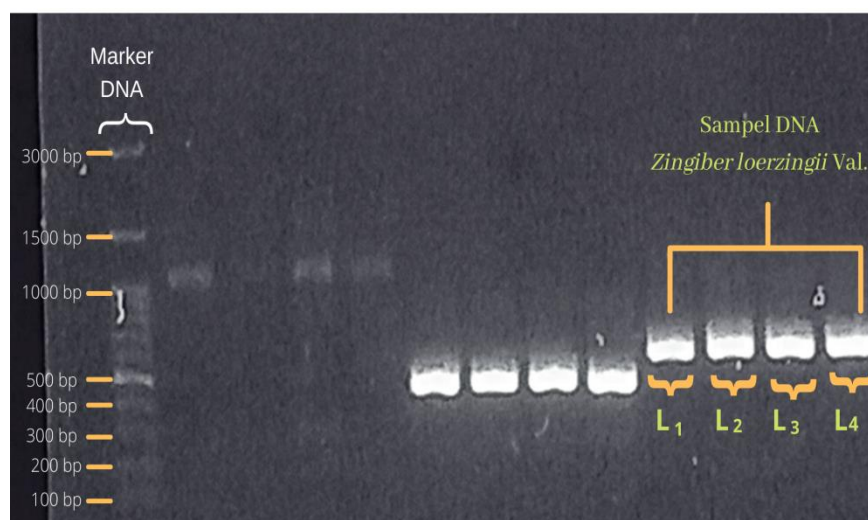
Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan dengan tiga tahapan utama yaitu Denaturasi, *Annealing* dan *Extension*. Proses PCR sangat bergantung pada ketepatan suhu dan waktu yang digunakan pada tiap tahapan. Pada tahap awal dilakukan tahapan *Hot-start* dengan suhu 97°C dan waktu 4 menit (240 detik) sebagai awal dari Denaturasi. Denaturasi dilakukan pada suhu 94°C dan waktu 45 detik sebagai tahap untuk mengurai untai ganda pada DNA sehingga terbentuk cetakan DNA tunggal. Waktu Denaturasi tidak boleh terlalu lama karena dapat merusak kualitas DNA. Setelah melalui denaturasi, amplifikasi dilanjutkan dengan penempelan dan pengenalan (*Annealing*) primer untuk mendapatkan lokus gen target. Suhu untuk *annealing* dilakukan pada angka 52°C dengan waktu 50 detik. Kesesuaian suhu saat *annealing* mempengaruhi keberhasilan amplifikasi, suhu terlalu rendah (dibawah 37°C) atau terlalu tinggi (diatas 60°C) akan mengakibatkan *mispriming* dan primer tidak dapat menempel (Fatchiyah, *et al.*, 2011).

Tahap amplifikasi DNA selanjutnya adalah tahap pemanjangan atau *Extension*. Pada tahapan ini, untai baru terbentuk dimulai dari posisi basa nukleotida yang ditempel oleh primer mulai dari ujung 5' menuju ke ujung 3'. Tahap *Extension* dilakukan pada suhu 72°C dan waktu 60 detik. Tahap akhir setelah semua siklus berakhir adalah tahapan *Final Extension* yang bertujuan untuk memastikan semua basa nukleotida pada untai DNA dari lokus gen target sudah terbentuk. *Final Extension* berlangsung selama 7 menit (420 detik) dengan suhu 72°C. Seluruh siklus amplifikasi pada PCR, dilakukan berulang-ulang

sebanyak 35 siklus untuk memenuhi jumlah kelipatan segmen DNA yang diperlukan (Fatchiyah, *et al.*, 2011).

Hal lain yang berpengaruh pada keberhasilan proses amplifikasi adalah pemilihan primer yang tepat. Penggunaan dan pemilihan primer sangat krusial dalam reaksi PCR. Primer berfungsi sebagai agen yang menginisiasi proses amplifikasi DNA pada sampel secara *in-vitro* dengan menandai template DNA yang diinginkan. Kesalahan dalam memilih primer akan menyebabkan primer menempel pada bagian lain dari DNA dan amplicon yang dihasilkan tidak sesuai dengan yang diharapkan (Rahayu & Jannah, 2019).

Amplifikasi DNA dengan menggunakan primer *rbcL* diuji secara kualitatif dengan metode elektroforesis gel agarosa 1% dan menghasilkan amplicon berupa pita / *band* DNA yang sangat baik. Amplicon *Z. loerzingii* sampel L₁, L₂, L₃ dan L₄ yang terlihat pada media gel agarosa terlihat tebal dan jelas. Profil pita DNA yang terlihat berpendar jelas dan tebal merupakan salah satu syarat DNA yang bisa untuk disekuensing karena semakin tebal dan terang pita DNA yang terlihat menunjukkan bahwa amplicon yang terbentuk semakin banyak. Dari hasil pembacaan melalui *Gel-Doc* (gambar 4.2.), terlihat profil pita DNA memiliki panjang fragmen dengan kisaran 600 bp.

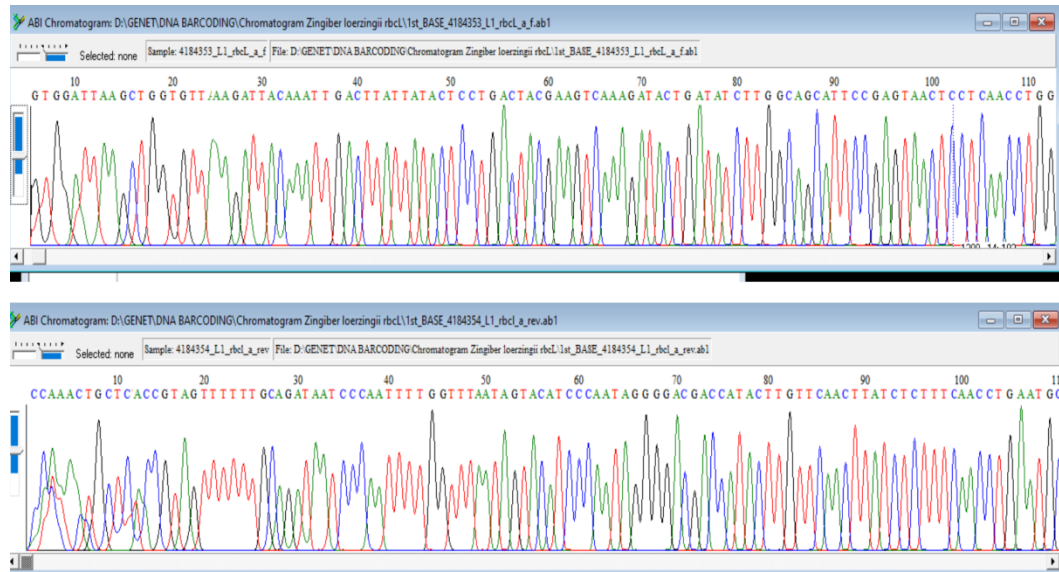


Gambar 4.2. Profil Pita DNA *Z. loerzingii* (L₁, L₂, L₃ dan L₄) hasil amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

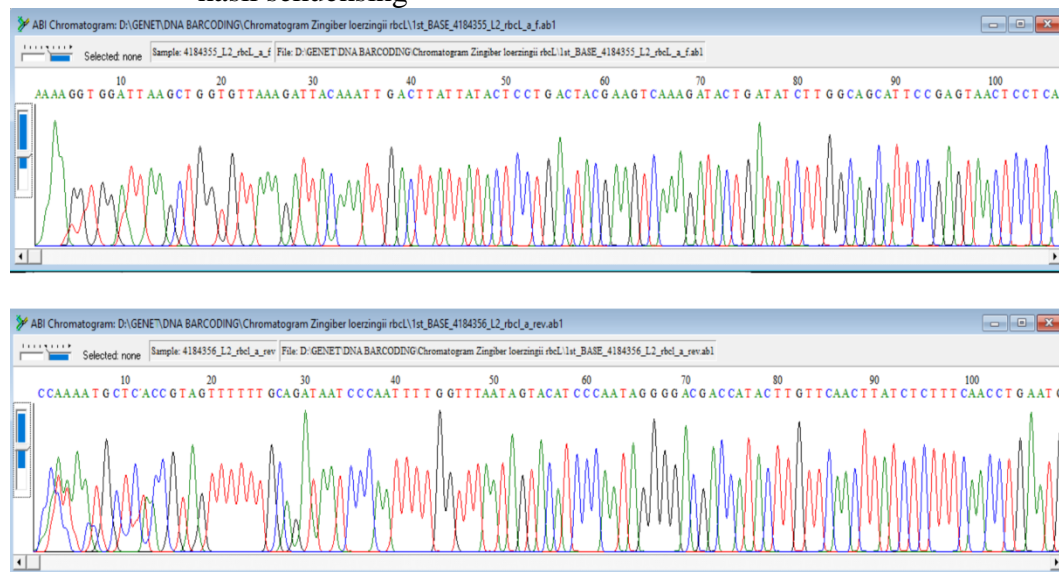
4.1.3. Sekuens DNA *Zingiber loerzingii* Valetton

DNA sampel *Z. loerzingii* (L₁, L₂, L₃ dan L₄) disekuensing dengan menggunakan bantuan perusahaan penyedia jasa sekuensing *1st Base* di Malaysia. Amplikon sampel *Z. loerzingii* (L₁, L₂, L₃ dan L₄) dipurifikasi dan disekuensing dengan menggunakan sepasang primer yaitu *rbcLaf* (5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-3') (El-Atroush, *et al.*, 2015; Dechbumroong, *et al.*, 2018; Arif *et al.*, 2019; Hashim, *et al.*, 2021) sebagai primer *forward* dan *rbcLarev* (5'-GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG-3') (El-Atroush, *et al.*, 2015; Arif *et al.*, 2019; Hashim, *et al.*, 2021) sebagai primer *reverse*. Purifikasi bertujuan untuk memurnikan dan benar-benar membersihkan fragmen DNA amplikon dari kontaminan, sisa kelebihan primer *forward* dan *reverse* pada PCR serta sisa debris sel tumbuhan yang kemungkinan masih ada. DNA disekuensing untuk membaca urutan nukleotida dari DNA amplikon (Rahayu & Jannah, 2019). Hasil pembacaan sekuens kemudian digunakan sebagai bahan untuk penentuan *Barcode DNA*, karakteristik molekuler dan analisis filogenetik pada *Z. loerzingii*.

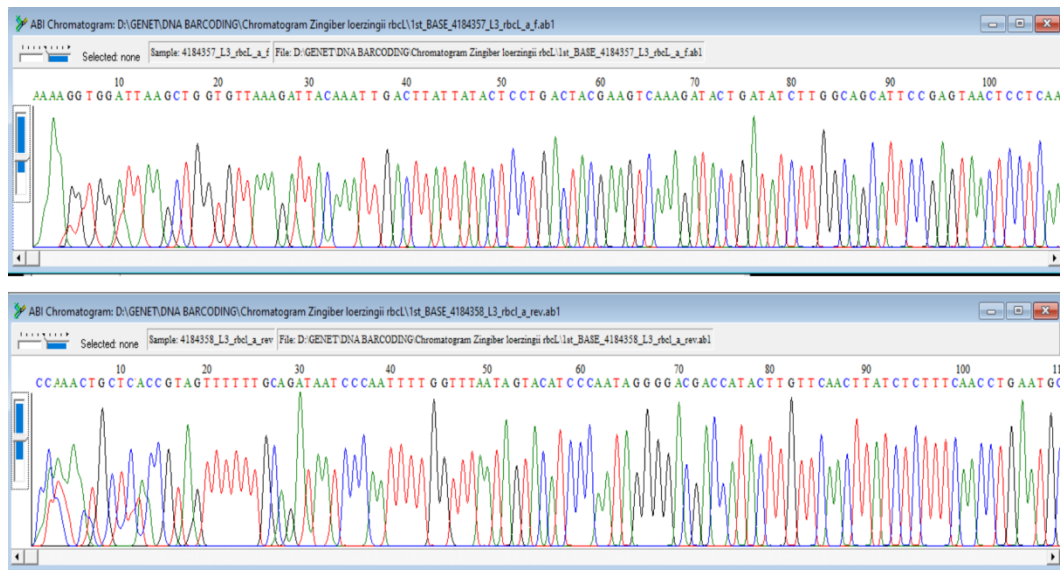
Hasil sekuens sampel *Z. loerzingii* (L₁, L₂, L₃ dan L₄) didapatkan berupa kromatogram dengan bentuk file berformat .AB1 yang terdiri dari pembacaan dua arah dari primer *forward* dan *reverse* secara terpisah. Kromatogram DNA sampel dibaca sebagai grafik berupa elektroferogram yang mewakili seluruh nukleotida hasil pembacaan mesin. Basa-basa nitrogen pada DNA (A,C,G,T) diterjemahkan dari puncak (*peak*) untuk analisis hasil sekuens. Kualitas DNA yang baik adalah ketika *peak* pada grafik tinggi dan tidak saling tumpang tindih.



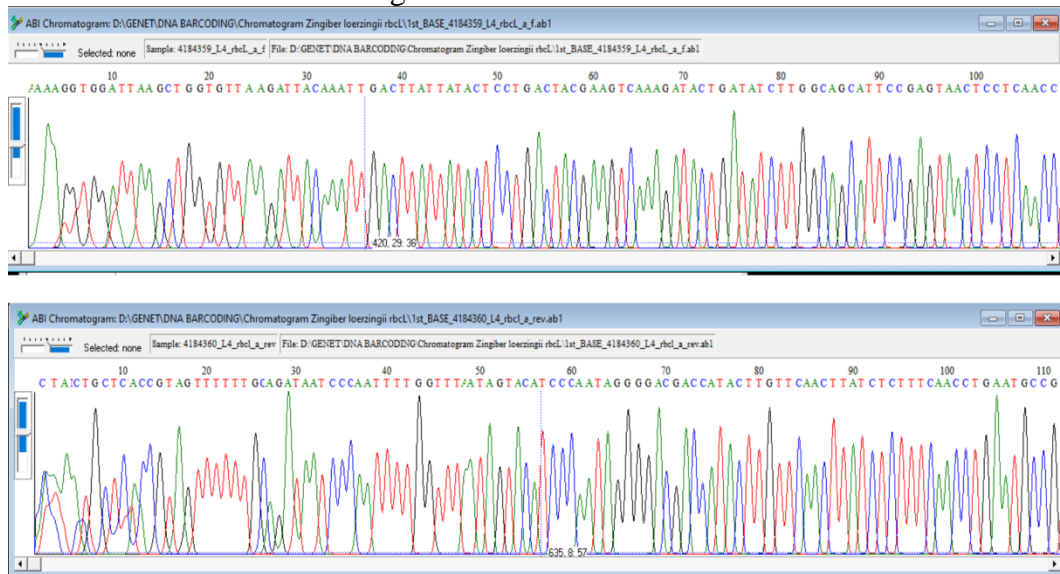
Gambar 4.3. Kromatogram sampel DNA *Z. loerzingii* sampel L₁ hasil sekuensing



Gambar 4.4. Kromatogram sampel DNA *Z. loerzingii* sampel L₂ hasil sekuensing.



Gambar 4.5. Kromatogram sampel DNA *Z. loerzingii* sampel L₃ hasil sekuensing.



Gambar 4.6. Kromatogram sampel DNA *Z. loerzingii* sampel L₄ hasil sekuensing.

Kurva pada grafik hasil pembacaan sekuens DNA terdiri dari beberapa warna untuk memudahkan penentuan basa nukleotida. Adenin (A) ditandai dengan kurva berwarna hijau, Timin (T) ditandai dengan kurva berwarna merah, Guanin (G) ditandai dengan kurva berwarna hitam dan Sitosin (C) ditandai dengan kurva berwarna biru. Dari gambar diatas terlihat bahwa kromatogram hasil sekuensing sampel *Z. loerzingii* (L₁, L₂, L₃ dan L₄) menunjukkan kualitas yang

baik dengan *peak* yang tinggi dan kurva pada grafik hampir seluruhnya tidak saling tumpang tindih kecuali pada bagian ujung awal dan ujung akhir. Beberapa nukleotida yang memiliki kurva tumpang tindih di bagian awal dan akhir tidak terlalu berpengaruh pada analisis DNA *Z. loerzingii* selanjutnya. Dari kromatogram sampel *Z. loerzingii* juga dapat dilihat persentase *GC content* dan *AT content* yang memperlihatkan persentase komposisi nukleotida sampel (disajikan pada Tabel 4.1.) pada lokus gen *rbcL*.

Tabel 4.1. Persentase Basa Nukleotida *Z. loerzingii* (L₁, L₂, L₃ dan L₄) hasil sekuensing.

Sampel	Basa Nukleotida (%)				A+T (%)	G+C (%)
	A	T	G	C		
<i>L1_rbcL_a_f</i>	27.83	29.57	22.96	19.65	57,39	42,61
<i>L1_rbcl_a_rev</i>	29.57	27.83	20.35	22.26	57,39	42,61
<i>L2_rbcL_a_f</i>	27.83	29.57	22.96	19.65	57,39	42,61
<i>L2_rbcl_a_rev</i>	29.74	27.83	20.35	22.09	57.57	42.43
<i>L3_rbcL_a_f</i>	27.65	29.57	23.13	19.65	57.22	42.78
<i>L3_rbcl_a_rev</i>	29.62	27.87	20.21	22.30	57.49	42.51
<i>L4_rbcL_a_f</i>	27.70	29.62	23.00	19.69	57.32	42.68
<i>L4_rbcl_a_rev</i>	29.27	28.05	20.38	22.13	57.32	42.51

Kromatogram yang didapatkan dari hasil pembacaan mesin sekuensing masih merupakan sekuens konservatif yang berasal dari pembacaan primer *forward* dan *reverse* secara terpisah sehingga harus diperoleh sekuens konsensus untuk memudahkan analisis molekuler. Untuk mendapatkan sekuens konsensus, sekuens *forward* dan *reverse* dari masing-masing sampel disatukan agar didapatkan satu sekuens yang utuh dan lengkap. Penyatuan (*Contig*) sekuens dilakukan dengan menggunakan aplikasi Bioedit versi 7.2.5. *Contig* diawali dengan memotong bagian ujung setiap sekuens yang memiliki kualitas kurang baik dengan indikator kualitas berupa posisi kurva yang tumpang tindih, *peak* yang rendah dan kualitas *Qscore* basa dibawah standard 40. Kualitas basa dilihat menggunakan aplikasi Geneious prime versi *trial*. *Contig* dilakukan dengan modifikasi terhadap sekuens dengan melakukan *reverse complement* pada kedua

sekuen sampai didapatkan sekuen konsensus yang digunakan pada tahap analisis molekuler selanjutnya.

4.1.4. DNA Barcoding *Zingiber loerzingii* Valetton

Barcode DNA telah diakui sebagai salah satu metode yang kuat dalam identifikasi dan menemukan kekerabatan genetik pada makhluk hidup (Hashim, *et al.*, 2020). Identifikasi secara molekuler dengan menggunakan metode *barcode* DNA telah berhasil dilakukan pada beberapa tumbuhan dari Famili Zingiberaceae (Shi, *et al.*, 2011; Vinitha, *et al.*, 2014; Zhang, *et al.*, 2014; Wijayasiriwardene, *et al.*, 2017). Meskipun begitu, publikasi mengenai *barcode* DNA yang spesifik pada genus *Zingiber* masih cukup sulit untuk ditemukan karena keterbatasan data. Hasil sekuensing pada keempat sampel *Z. loerzingii* menunjukkan urutan dan komposisi nukleotida dengan tingkat *similaritas* 100% (Tabel 4.2.) sehingga dapat digunakan sebagai *barcode* DNA.

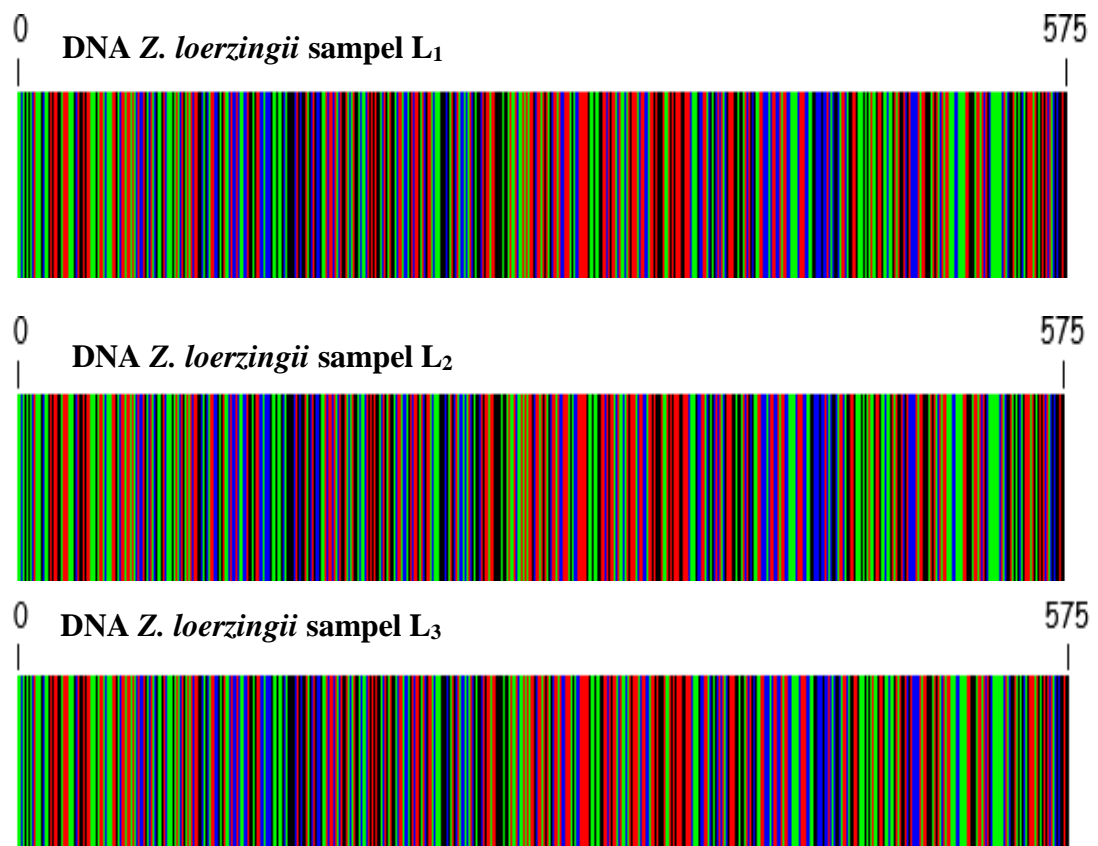
. Tabel 4.2. Urutan nukleotida DNA *Z. loerzingii* sampel L₁, L₂, L₃ dan L₄ hasil sekuensing.

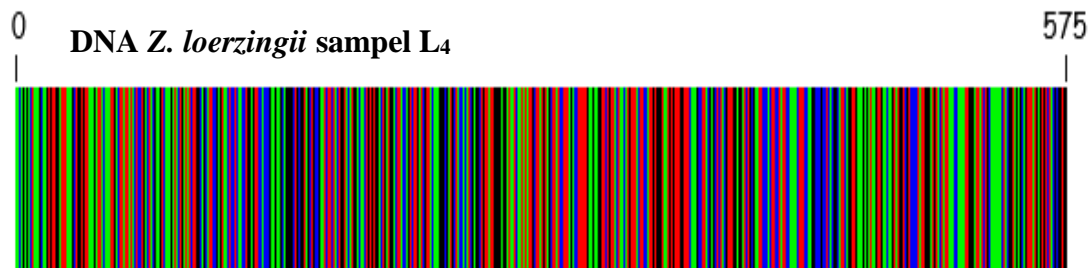
Sampel	Urutan Sekuens
DNA <i>Z. loerzingii</i> sampel L ₁	AACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTTAAAGCTGGTGTAA AGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAGTCAA AGATACTGATATCTTGGCAGCATTCGAGTAACTCCTCAACC TGGAGTTCCACCCGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCCGA ATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACTGATGGACT TACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATCGA GGCTGTTATTGGGGAGGATAATCAATATATTGCTTATGTAGC TTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACAT GTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTGTTTGGTTTCAAAGCCTT ACGAGCTCTACGTTTGGAGGATCTGCGAATTCCTCACTTCCTA TTCCAAAACCTTCCAAGGCCCGCTCACGGCATTACAGGTTGA AAGAGATAAGTTGAACAAGTATGGTCGTCCCTATTGGGATG TACTATTAACCAAATTGGGATTATCTGCAAAAAACTACGG TAGAGCAGTTTATGAGTGTCTACGCGGTGG
DNA <i>Z. loerzingii</i> sampel L ₂	AACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTTAAAGCTGGTGTAA AGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAGTCAA AGATACTGATATCTTGGCAGCATTCGAGTAACTCCTCAACC TGGAGTTCCACCCGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCCGA ATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACTGATGGACT TACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATCGA GGCTGTTATTGGGGAGGATAATCAATATATTGCTTATGTAGC TTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACAT GTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTGTTTGGTTTCAAAGCCTT

	ACGAGCTCTACGTTTGGAGGATCTGCGAATTCCTCACTTCCTA TTCCAAAACCTTTCCAAGGCCCGCCTCACGGCATTTCAGGTTGA AAGAGATAAGTTGAACAAGTATGGTCGTCCCTTATTGGGATG TACTATTAACCAAATTTGGGATTATCTGCAAAAAACTACGG TAGAGCAGTTTATGAGTGTCTACGCGGTGG
DNA Z. <i>loerzingii</i> sampel L ₃	AACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTTAAAGCTGGTGTAA AGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAGTCAA AGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACC TGGAGTTCCACCCGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCCGA ATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACTGATGGACT TACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATCGA GGCTGTTATTGGGGAGGATAATCAATATATTGCTTATGTAGC TTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACAT GTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTGTTTGGTTTCAAAGCCTT ACGAGCTCTACGTTTGGAGGATCTGCGAATTCCTCACTTCCTA TTCCAAAACCTTTCCAAGGCCCGCCTCACGGCATTTCAGGTTGA AAGAGATAAGTTGAACAAGTATGGTCGTCCCTTATTGGGATG TACTATTAACCAAATTTGGGATTATCTGCAAAAAACTACGG TAGAGCAGTTTATGAGTGTCTACGCGGTGG
DNA Z. <i>loerzingii</i> sampel L ₄	AACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTTAAAGCTGGTGTAA AGATTACAAATTGACTTATTATACTCCTGACTACGAAGTCAA AGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACC TGGAGTTCCACCCGAAGAAGCAGGGGCTGCGGTAGCTGCCGA ATCTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACTGATGGACT TACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACCACATCGA GGCTGTTATTGGGGAGGATAATCAATATATTGCTTATGTAGC TTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACAT GTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTGTTTGGTTTCAAAGCCTT ACGAGCTCTACGTTTGGAGGATCTGCGAATTCCTCACTTCCTA TTCCAAAACCTTTCCAAGGCCCGCCTCACGGCATTTCAGGTTGA AAGAGATAAGTTGAACAAGTATGGTCGTCCCTTATTGGGATG TACTATTAACCAAATTTGGGATTATCTGCAAAAAACTACGG TAGAGCAGTTTATGAGTGTCTACGCGGTGG

Barcode DNA dapat dilakukan dengan menggunakan region lokus pada nukleus maupun pada organel (*organellar genome*) (Hebert, *et al.*, 2003). Pada penelitian ini *Barcode* DNA dilakukan dengan menggunakan *organellar genome* pada kloroplas (*cpDNA*) di lokus *rbcL* (*ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase large subunit gene*). Genom pada kloroplas memiliki keuntungan seperti diturunkan dari parental tunggal (gen hanya diturunkan dari gen maternal) dan tidak adanya rekombinasi (Xu, *et al.*, 2021). Gen yang diturunkan secara maternal memiliki sifat yang jauh lebih stabil dan lebih mudah untuk disekuensing (Chase & Fay, 2009).

Barcode DNA pada tumbuhan *Z. loerzingii* ditentukan dari urutan nukleotida yang didapatkan dari hasil sekuensing (Tabel 4.2.). Pada penelitian ini, lokus gen *rbcL* berhasil digunakan dalam pembuatan *Barcode* DNA untuk tumbuhan *Z. loerzingii*. Lokus gen *rbcL* mudah untuk dilakukan proses amplifikasi dan sekuensing, panjang urutan nukleotida pada fragmen DNA ampikon 575 bp dan mudah untuk dilakukan pensejajaran dalam analisis filogenetik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wang, *et al.* (2017) bahwa ciri yang perlu dimiliki pada *barcode* DNA diantaranya adalah memiliki urutan nukleotida yang pendek (<1000 bp), mudah untuk dilakukan amplifikasi dan sekuensing serta mudah untuk dilakukan pensejajaran (*alignment*) tanpa harus dilakukan pengeditan manual.





Gambar 4.7. Ilustrasi nukleotida DNA dengan warna berbeda (A=hijau, T=merah, C=biru dan G=hitam) dan angka yang menunjukkan panjang dari sekuen DNA yang dapat digunakan sebagai informasi sekuen DNA *Z. loerzingii* yang jelas.

4.2. Keragaman Molekuler (Keragaman Genetik) *Zingiber loerzingii* Valeton menggunakan *barcode* DNA berdasarkan lokus gen *rbcL*

Berdasarkan hasil analisis seluruh sekuen dengan *alignment* menunjukkan terdapat 476 karakter yang dapat diobservasi. Terdapat 429 karakteristik yang terkonservasi. Daerah terkonservasi merupakan daerah yang posisi pada dasarnya tidak ada perubahan apapun. Daerah ini merupakan daerah plesiomorfik. Selain itu terdapat juga 47 karakter *variable*, 24 karakter parsimony dan 23 karakter *singleton*. Pada analisis keragaman molekuler parameter yang dilihat berupa analisis variasi dan persentase *AT content* dan *GC content*, koefisien similaritas sampel dan *out-groups* (*Pairwise Distance*) analisis *haplotype* dan keragaman nukleotida dan analisis *single nucleotide polymorphism*.

4.2.1. Analisis Variasi dan Persentase *AT Content* dan *GC Content*

Hasil analisis komposisi nukleotida dari seluruh sampel dalam penelitian menunjukkan keempat sampel *Z. loerzingii* memiliki *AT content* (56,51%) dan *GC content* (43,49%) yang sama. Jumlah komposisi nukleotida pada sampel memiliki kesamaan dengan spesies *outgroup* *Pontederia cordata* dan *Dilatria ixioides*. Komposisi *AT content* dan *GC content* pada *Z. loerzingii* juga hampir mirip dengan komposisi *AT content* dan *GC content* pada *Zingiber officinale*. Diantara seluruh spesies, *Z. zerumbet* (b) memiliki jumlah persentase *GC content* paling rendah sedangkan *Z. officinale* memiliki persentase yang paling tinggi.

Tabel 4.3. Analisis Variasi dan Persentase *AT Content* dan *GC Content*

No	Species	Komposisi Nukleotida (%)					
		T	C	A	G	A+T	C+G
1	<i>Z. loerzingii</i> (L4)	29,83	21,43	26,68	22,06	56,51	43,49
2	<i>Z. loerzingii</i> (L3)	29,83	21,43	26,68	22,06	56,51	43,49
3	<i>Z. loerzingii</i> (L2)	29,83	21,43	26,68	22,06	56,51	43,49
4	<i>Z. loerzingii</i> (L1)	29,83	21,43	26,68	22,06	56,51	43,49
5	<i>C. longa</i>	29,64	20,46	27,53	22,37	57,17	42,83
6	<i>C. longa</i>	29,47	20,53	27,38	22,62	56,85	43,15
7	<i>C. zedoaria</i>	29,52	20,57	27,43	22,48	56,95	43,05
8	<i>C. zedoaria</i>	29,47	20,53	27,38	22,62	56,85	43,15
9	<i>H. coronarium</i>	29,13	19,82	27,93	23,12	57,06	42,94
10	<i>H. coronarium</i>	29,20	20,41	27,47	22,92	56,67	43,33
11	<i>Z. officinale</i>	29,62	21,22	26,68	22,48	56,30	43,70
12	<i>Z. officinale</i>	29,62	21,22	26,68	22,48	56,30	43,70
13	<i>Z. officinale</i>	29,62	21,22	26,68	22,48	56,30	43,70
14	<i>Z. officinale</i>	29,62	21,22	26,68	22,48	56,30	43,70
15	<i>Z. zerumbet</i> (a)	29,85	20,72	26,81	22,62	56,66	43,34
16	<i>Z. zerumbet</i> (b)	30,30	20,20	26,99	22,52	57,29	42,72
17	<i>P. cordata</i>	30,04	21,64	26,47	21,85	56,51	43,49
18	<i>D. ixioides</i>	29,20	22,27	27,31	21,22	56,51	43,49
	Avg.	29,64	20,93	27,04	22,39	56,68	43,32

Pada tabel dapat dilihat persentase *AT content* lebih tinggi dibandingkan dengan persentase *CG content*. Hal ini disebabkan karena komposisi nukleotida pada kloroplas sebagian besar tersusun atas basa nukleotida *Adenine* (A) dan *Tymine* (T) (Li, 1997). Analisis komposisi nukleotida bertujuan untuk mengetahui tingkat keprimitifan makhluk hidup melalui laju evolusi dan laju mutasi. mengetahui tingkat keprimitifan makhluk hidup melalui laju evolusi dan laju mutasi dibandingkan pasangan basa nukleotida *Adenosine* (A) dan *Tymine* (T) pada untai DNA (Claverie & Notradame, 2007). Genom yang memiliki jumlah basa nukleotida *Guanine* (G) dan *Cytosine* (C) lebih tinggi memiliki tingkat densitas gen, laju mutasi dan level rekombinasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan genom yang jumlah *Guanine* (G) dan *Cytosine* (C) lebih rendah (Niu, *et al.*, 2017). Rendahnya persentase *CG content* juga menunjukkan spesies tersebut lebih primitif (Hapsari, 2015). Variasi *GC content* pada beberapa spesies *Zingiber*

dengan menggunakan lokus gen *rbcL* berkisar 35,75%-36,27% (Li, *et al.*, 2020) dan 44% (Osathanunkul, *et al.*, 2017).

4.2.2. Koefisien Similaritas (Jarak Genetik) Sampel dan *Out-groups* (*Pairwise Distance*)

Perhitungan *pairwise distance* bertumpu pada perbedaan nukleotida antar sekuens dengan menunjukkan ada tidaknya substitusi transisi maupun substitusi transversasi (Hall, 2018). Perhitungan nilai *pairwise distance* memperkuat analisis filogenetik dan digunakan untuk menjelaskan status tiap spesies pada takson (Jarulis, *et al.*, 2021). Jarak genetik antara populasi yang lebih dari (>) 3,0% menunjukkan bahwa spesies yang dibandingkan merupakan spesies yang sangat berbeda dan tidak termasuk kedalam populasi takson yang diamati (Hebert, *et al.*, 2003). Jarak genetik antar populasi yang sama umumnya berkisar dibawah (<) 1,0% atau dibawah (<) 2,0% (Xiong, 2006). *Pairwise distance* dapat dihitung dengan berbagai model yang berbeda (Higgs & Attwood, 2005). Pada penelitian ini, model yang digunakan adalah Kimura-2-Parameter.

Tabel 4.4. menunjukkan nilai jarak genetik (*Pairwise distance*) pada seluruh spesies yang dianalisis. Hasil perhitungan *pairwise distance* pada seluruh spesies berkisar antara 0,0 hingga 0,073. Nilai *pairwise distance* diantara Famili Zingiberaceae berkisar antara 0,0 hingga 0,011. Pada keempat sampel *Z. loerzingii* nilai *pairwise distance* adalah 0,0. Hal ini menunjukkan bahwa seluruh sampel *Zingiber loerzingii* similar dan tidak ada jarak genetik. Nilai *pairwise distance* berbanding terbalik dengan dekatnya kekerabatan antar spesies, nilai angka yang tinggi menunjukkan semakin jauh kekerabatan antar spesies sedangkan nilai yang mendekati 0,0 menunjukkan kekerabatan dan jarak genetik yang semakin dekat. Hasil perhitungan *pairwise distance* pada seluruh sampel *Z. loerzingii* menandakan tidak adanya jarak genetik pada seluruh sampel. Nilai *pairwise distance* antara *Z. loerzingii* dengan *Z. zerumbet* menunjukkan angka 0,004 sedangkan pada *Z. officinale* berkisar 0,006 yang mengindikasikan jarak genetik antara *Z. loerzingii* lebih dekat dengan *Z. zerumbet* dibandingkan dengan *Z. officinale*.

4.2.3. Analisis Keragaman *Haplotype* (Hd) dan Keragaman Nukleotida (π)

Analisis keragaman genetik dengan menentukan nilai *haplotype* dan keragaman nukleotida dilakukan dengan bantuan aplikasi DnaSP versi 6. *Haplotype* merupakan sekelompok gen yang tidak mengalami rekombinasi atau pindah silang sehingga terletak sangat berdekatan dan diturunkan bersamaan dari satu parental pada satu kromosom (Lesk, 2002). Hasil analisis menunjukkan pada keempat sampel *Z. loerzingii* terdapat 1 jumlah *haplotype* dengan nilai keragaman *haplotype* (Hd) 0,0 dan nilai keragaman nukleotida (π) 0,0. Nilai keragaman *haplotype* (Hd) dan keragaman nukleotida (π) *Z. loerzingii* dari hasil analisis menunjukkan tidak adanya keragaman genetik pada sampel *Z. loerzingii* yang dikoleksi dari Cagar Alam Sibolangit. Hal ini dapat disebabkan karena *Z. loerzingii* merupakan salah satu tumbuhan langka dengan daerah penyebaran yang sangat sempit (endemik) dan populasi yang sedikit sehingga tidak memungkinkan terjadinya peristiwa kawin silang (*interbreeding*) dan aliran gen (*gene flow*).

4.2.4. Analisis *Variable Site* dan *Parsimony Site*

Analisis keragaman genetik dapat juga dilakukan dengan melihat variasi *variable site* dan *parsimony site*. *Variable site* dan *parsimony site* dianalisis pada aplikasi MEGA X dan dilakukan pengecekan pada aplikasi DnaSP versi 6 untuk memperkuat perolehan data. *Variable site* merupakan daerah pada nukleotida yang terdapat perubahan. Beberapa *variable site* dapat berupa *Single Nucleotide Polymorphism* atau *Parsimony Site*. Posisi yang tidak termasuk sebagai *variable site* termasuk kedalam *conserved site*. Pada hasil analisis didapatkan untuk spesies *Z. loerzingii* tidak terdapat *variable site* yang artinya tidak ada perbedaan apapun pada keempat sampel yang dianalisis. Pada tingkat genus, *variable site* terletak pada posisi nukleotida nomor 366, 448, 450, 475 dan 476. Hasil analisis untuk tingkat famili pada Zingiberaceae menunjukkan *variable site* terdapat pada nukleotida dengan posisi nomor 11, 81, 102, 204, 366, 448, 450, 475 dan 476.

Tabel 4.5. Hasil Analisis *Variable Site*

Sampel	Posisi Nukleotida								
	10	80	101	203	365	447	449	474	475
<i>C. longa</i>	A	T	A	A	C	C	A	T	T
<i>C. longa</i>
<i>H. coronarium</i>	C	C	G	C
<i>H. coronarium</i>	C	C	G	C
<i>C. zedoaria</i>
<i>C. zedoaria</i>
<i>Z. zerumbet</i>	C	.	.	C	.	T	T	.	.
<i>Z. zerumbet</i>	C	.	.	C	.	T	T	.	.
<i>Z. officinale</i>	C	.	.	C	T	.	.	G	G
<i>Z. officinale</i>	C	.	.	C	T	.	.	G	G
<i>Z. officinale</i>	C	.	.	C	T	.	.	G	G
<i>Z. officinale</i>	C	.	.	C	T	.	.	G	G
<i>Z. loerzingii (L4)</i>	C	.	.	C
<i>Z. loerzingii (L3)</i>	C	.	.	C
<i>Z. loerzingii (L2)</i>	C	.	.	C
<i>Z. loerzingii (L1)</i>	C	.	.	C

Tabel 4.6. Hasil Analisis *Parsimony Site*

Sampel	Posisi Nukleotida								
	10	80	101	203	365	447	449	474	475
<i>C. longa</i>	A	T	A	A	C	C	A	T	T
<i>C. longa</i>
<i>H. coronarium</i>	C	C	G	C
<i>H. coronarium</i>	C	C	G	C
<i>C. zedoaria</i>
<i>C. zedoaria</i>
<i>Z. zerumbet</i>	C	.	.	C	.	T	T	.	.
<i>Z. zerumbet</i>	C	.	.	C	.	T	T	.	.
<i>Z. officinale</i>	C	.	.	C	T	.	.	G	G
<i>Z. officinale</i>	C	.	.	C	T	.	.	G	G
<i>Z. officinale</i>	C	.	.	C	T	.	.	G	G
<i>Z. officinale</i>	C	.	.	C	T	.	.	G	G
<i>Z. loerzingii (L4)</i>	C	.	.	C
<i>Z. loerzingii (L3)</i>	C	.	.	C
<i>Z. loerzingii (L2)</i>	C	.	.	C
<i>Z. loerzingii (L1)</i>	C	.	.	C

Karakter parsimony sangat penting untuk merekonstruksi topologi pohon filogenetik. Karakter parsimony memiliki dua basa yang muncul dua kali pada tiap posisi (Hidayat & Pancoro, 2008). Pada keempat sampel *Z. loerzingii* ditemukan dua posisi parsimony yaitu pada nomor 447 dan 449. Karakter parsimony ini membantu dalam mengelompokkan sampel dengan spesiesnya sendiri dan mencegahnya bergabung dengan spesies *Zingiber* lain pada pohon filogenetik. Karakter parsimony untuk analisis pada tingkat genus terdapat sebanyak 5 nukleotida pada posisi 365, 447, 449, 474 dan 475. Pada tingkat Famili karakteristik parsimony terdapat sebanyak 9 posisi dengan urutan nukleotida nomor 10, 80, 101, 203, 365, 447, 449, 474 dan 475. Karakter parsimony pada tingkat genus memisahkan Genus *Zingiber* dengan genus lain pada Famili Zingiberaceae dan memisahkan Famili Zingiberaceae dengan kelompok *out-groups* pada pohon filogenetik.

Selain karakter *variable site* dan *parsimony site*, dianalisis juga *single nucleotide polymorphism* dan *conserved site*. *Single Nucleotide polymorphism* (SNP) merupakan tipe variasi genetik yang paling sederhana dan paling melimpah pada genom makhluk hidup (Mukhopdhyay, *et al.*, 2018). SNP termasuk salah satu marka molekuler yang sering diamati. Polimorfisme terjadi dikarenakan mutasi berupa basa yang tertukar, bertambah atau terhapus pada untai DNA (Lesk, 2002). Pada SNP mutasi yang terjadi adalah mutasi titik (*point mutation*) yang menyebabkan adanya variasi pada urutan DNA. SNP terjadi setidaknya 1% pada suatu populasi (Choudhuri & Kotewicz, 2014).

Pada hasil analisis SNP keempat sampel *Z. loerzingii* tidak ditemukan adanya *single nucleotide polymorphism* yang berarti pada urutan nukleotida sampel di lokus gen *rbcL* tidak terjadi mutasi atau polimorfisme. Hal ini juga menunjukkan tidak adanya keragaman *Z. loerzingii* yang dikoleksi dari Cagar Alam Sibolangit. Untuk tingkatan genus dan famili juga tidak ditemukan adanya *single nucleotide polymorphism site*.

Conserved site merupakan daerah pada sekuens nukleotida yang tidak terdapat perubahan pada basanya. Daerah *conserved* biasanya mengindikasikan hubungan evolusioner antar spesies (Choudhuri & Kotewicz, 2014). Pada hasil

analisis, dikarenakan *conserved site* adalah daerah yang tidak mengalami perubahan, maka *conserved site* adalah semua nukleotida yang ada pada seluruh sekuens kecuali nukleotida yang ada pada *variable site*. Pada keempat sekuens *Z. loerzingii* sampel seluruh nukleotidanya termasuk kedalam *conserved site*. Pada Genus *Zingiber* semua nukleotida merupakan *conserved site* kecuali pada nukleotida nomor 365, 447, 449, 474 dan 475. Pada Famili Zingiberaceae semua nukleotida merupakan *conserved site* kecuali nukleotida dengan urutan nomor 10, 80, 101, 203, 365, 447, 449, 474 dan 475.

4.3. Analisis Hubungan Filogenetik *Zingiber loerzingii* Valetton berdasarkan lokus gen *rbcL*

Analisis Filogenetik atau analisis hubungan kekerabatan merupakan kajian sejarah evolusi makhluk hidup yang digunakan untuk mengevaluasi tingkatan sistematika organisme dengan menggunakan perbandingan molekuler (genetik) maupun perbandingan morfologi (fenetik). Analisis filogenetik bertujuan untuk menjelaskan hubungan kekerabatan makhluk hidup beserta dengan keanekaragamannya menggunakan diagram yang menyerupai pohon untuk mewakili silsilah sistematikanya (Xiong, 2006). Diagram ini disebut pohon filogenetik. Pada filogenetik, terdapat prinsip bahwa seluruh organisme berkerabat satu sama lain dan memiliki variasi tidak terbatas yang diturunkan oleh nenek moyang (*common ancestor*) yang sama (Hidayat & Pancoro, 2008; Hall, 2018).

Analisis hubungan filogenetik pada *Z. loerzingii* dimulai dengan *alignment* (penyejajaran) keempat sampel dengan spesies lain. Untuk mendapatkan sekuens DNA dari spesies lain, sekuens DNA *Z. loerzingii* sampel dilakukan analisis penyejajaran di *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> untuk membandingkan sekuens sampel dengan data yang tersimpan di GenBank. Nilai similaritas atau homologi yang digunakan dalam analisis filogenetik pada penelitian ini adalah sekuens yang memiliki nilai homologi $\geq 92\%$ (Chen, *et al.*, 2012). Data hasil analisis BLAST tersaji pada tabel 4.3. Data yang memiliki nilai similaritas tinggi pada Genus *Zingiber* dan Famili

Zingiberaceae akan diambil sebagai kelompok *in-group* serta data sekuens yang memiliki nilai similaritas tinggi diluar Famili Zingiberaceae diambil sebagai kelompok *out-group*.

Tabel 4.7. Perbandingan Sekuens Sampel dengan sekuen *rbcL* beberapa spesies Zingiberaceae dan outgroup pada GenBank.

No	Sample	Accession code	Max score	Total Score	Query Cover	E-Value	Per. Ident	Acc. Ident
1	<i>Z. zerumbet</i>	KX756185.1	1048	1048	99%	0.0	99,65%	575
2	<i>Z. zerumbet</i>	MH069864.1	1048	1048	99%	0.0	99,65%	575
3	<i>Z. officinale</i>	KU043478.1	939	939	88%	0.0	99,80%	514
4	<i>Z. officinale</i>	KU043479.1	939	939	88%	0.0	99,80%	514
5	<i>Z. officinale</i>	KU043480.1	939	939	88%	0.0	99,80%	514
6	<i>Z. officinale</i>	KU043481.1	939	939	88%	0.0	99,80%	514
7	<i>C. longa</i>	KX832045.1	1048	1048	99%	0.0	99,65%	573
8	<i>C. longa</i>	KX758495.1	1048	1048	99%	0.0	99,65%	573
9	<i>C. zedoaria</i>	KM977980.1	1037	1037	98%	0.0	99,65%	567
10	<i>C. zedoaria</i>	KM977978.1	1035	1035	98%	0.0	99,65%	566
11	<i>H. coronarium</i>	KX344697.1	1007	1007	96%	0.0	99,46%	662
12	<i>H. coronarium</i>	KX344696.1	1002	1002	95%	0.0	99,46%	688
13	<i>P. cordata</i>	MK526404.1	815	815	94%	0.0	93,59%	549
14	<i>D. ixioides</i>	KP110257.1	837	837	95%	0.0	94,02%	552

Hasil BLAST yang menunjukkan tingkat homologi *Z. loerzingii* dengan sekuens pada GenBank. Nilai *Max Score* menunjukkan nilai keakuratan berupa skor tertinggi hasil alignment DNA sampel dengan sekuens yang terdapat pada database. Nilai *Total Score* merupakan jumlah nilai alignment dari semua segmen yang sejajar pada DNA sampel dan sekuens database. Nilai <50 pada *Total Score* menunjukkan tidak adanya kemiripan antar sekuen. Kesamaan nilai pada *Total Score* dan *Max Score* juga merupakan indikasi semakin miripnya sekuens sampel dengan sekuens pada database (Clavarie & Notradame, 2007; Hall, 2018).

Query Coverage menunjukkan seberapa besar (%) kesamaan panjang sekuens nukleotida sampel dengan yang terdapat pada database. Tingkat homologi akan semakin tinggi apabila nilai persentase *Query Coverage* juga semakin tinggi (Mukhopadhyay, *et al.*, 2018). Nilai *E-Value* (*Expectation Value*) merupakan nilai hipotesis yang menunjukkan signifikansi tingkat homologi sekuens sampel dengan sekuens pada database. Semakin dekat nilai *E-Value* dengan 0, maka sampel semakin homolog dengan sekuens dari database. *Percentage of Identification* merupakan angka yang menunjukkan seberapa besar tingkat

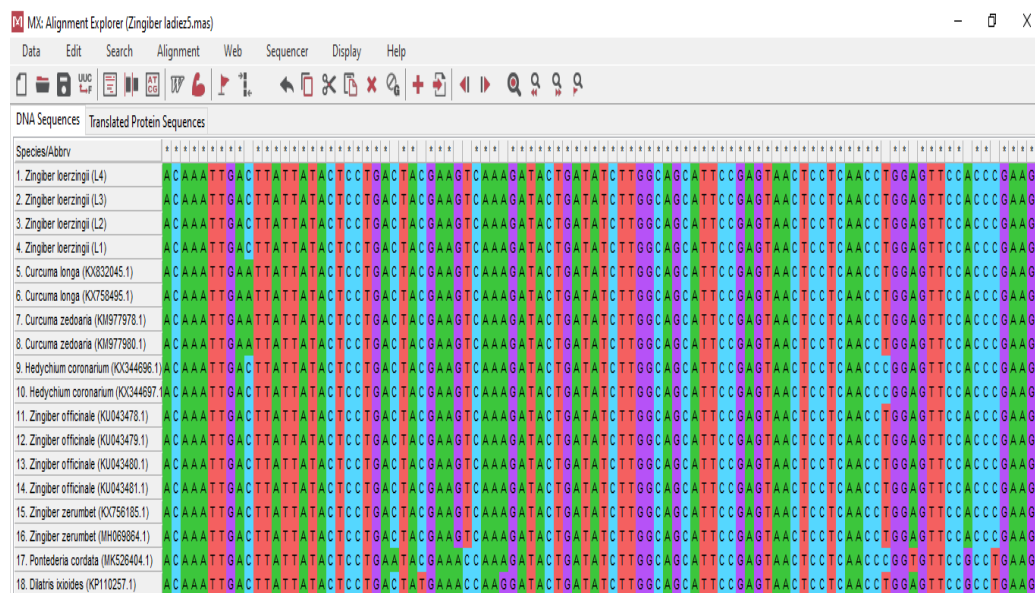
similaritas sekuens sampel dengan sekuens pada database (Clavarie & Notradame, 2007; Hall, 2018).

Sekuens DNA yang disertakan dalam analisis filogenetik diambil sebanyak 4 sekuens *Z. loerzingii*, 6 sekuens *Zingiber* serta 8 sekuens dari genus lain. Seluruh sekuens *dialignment* (sejajarkan) dengan menggunakan program *ClustalW* yang terintegrasi aplikasi MEGA X (Kumar, *et al.*, 2018). *ClustalW* umum digunakan untuk *alignment* pada sejumlah nukleotida yang bersifat homolog. *Alignment* dilakukan untuk menentukan tingkat homologi dari seluruh sekuens DNA yang dianalisis dan menjadikan setiap set sekuens nukleotida menjadi ekuivalen. Pada hasil *alignment* terdapat *gap* berupa garis putus-putus yang mengindikasikan adanya proses mutasi (Dewi, 2012).

Pohon filogenetik direkonstruksi berdasarkan hasil *alignment* seluruh sekuens DNA. Pohon filogenetik diuji dengan menggunakan metode *Neighbor-Joining* (Kumar, 2000). Penentuan *genetic pairwise distance* (jarak genetik) dilakukan dengan model Kimura-2-Parameter (Tamura, *et al.*, 2011). Model Kimura-2-Parameter merupakan salah satu model yang sesuai untuk jarak yang kecil dan menyediakan model perhitungan yang lebih realistis dengan menganalisa baik tingkat substitusi transisi maupun transversasi (Xiong, 2006; Gogoi & Bhau, 2018). Hasil rekonstruksi pohon filogenetik kemudian dilakukan uji statistik dengan metode *bootstrap* (Felsenstein, 1985) untuk menentukan tingkat kepercayaan (*reliability*) dengan prinsip distribusi data sangat dipengaruhi oleh efek acak (*pseudorepeats*) (Hall, 2018). Pengujian *bootstrap* dilakukan sebanyak 1000 kali ulangan.

Pohon filogenetik untuk melihat kekerabatan *Z. loerzingii* direkonstruksi dengan metode *Neighbor-Joining*. Metode *Neighbor-Joining* merupakan salah satu metode yang luas dipakai karena menghasilkan pohon yang relatif lebih akurat dan tingkat komputasi yang cepat (Kumar, 2000; Claverie & Notradame, 2007). Metode *Neighbor-Joining* juga merupakan metode yang standard untuk digunakan bagi pemula. *Neighbor-Joining* mengacu pada nilai jarak evolusioner dan jarak filogenetik antar taksa yang mengasumsikan bahwa setiap percabangan memiliki laju evolusi yang berbeda (Hills, 1996; Xiong, 20016). Model kalkulasi

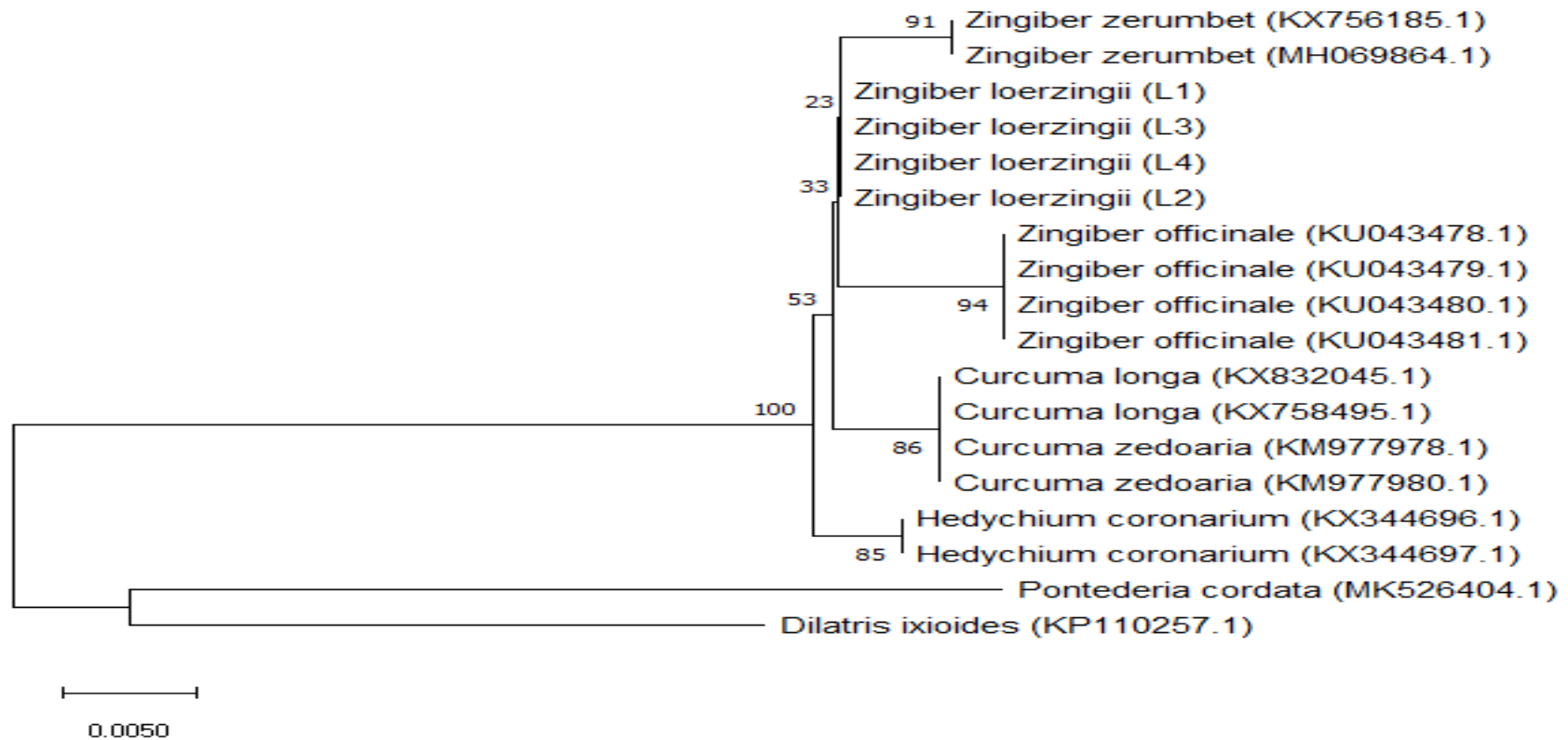
distance pada *Neighbor-Joining* bisa dipilih sesuai data dan bisa diaplikasikan dengan berbagai jenis data ketika jarak genetiknya diketahui. Metode ini tidak membangun kluster tapi secara langsung menghitung jarak ke nodus internal (Hall, 2018).



Gambar 4.8. Hasil *alignment* sekuens *rbcL* sampel *Z. loerzingii* dengan sampel lain dari database GenBank didapatkan jumlah nukleotida sebanyak 476 bp setelah alignment.

Rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan menambahkan spesies *P. cordata* (Pontederiaceae) dan *D. ixoides* (Haemodoraceae) (Smith, *et al.*, 1993) yang berperan sebagai kelompok *out-group*. Kelompok *out-group* sangat dibutuhkan dalam menghasilkan polarisasi karakter pada kladistik. Polarisasi karakter dapat berupa plesiomorfik yang dimiliki oleh kelompok *out-group* dan karakter apomorfik yang dimiliki oleh kelompok *in-group*. Karakter plesiomorfik merupakan sifat primitif yang dipertahankan dari nenek moyang (*common ancestor*) sepanjang evolusi. Karakter apomorfik adalah karakter yang berubah secara independen pada satu kelompok organisme tertentu (Hidayat & Pancoro, 2008).

Hasil rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan lokus gen *rbcL* menunjukkan bahwa seluruh spesies pada pohon membentuk 3 klad dengan *P. cordata* (Pontederiaceae) dan *D. ixoides* terpisah menjadi *out-group*. Genus



Gambar 4.9. Pohon Filogenetik *Z. loerzingii* dengan kerabatnya beserta *out-group* berdasarkan lokus gen *rbcL* direkonstruksi dengan metode *Neighbour-Joining* berdasarkan model Kimura-2-Parameter.

Zingiber membentuk klad tersendiri yang mengindikasikan bahwa *Zingiber* termasuk kedalam kelompok monofiletik. Kelompok monofiletik merupakan kelompok yang semua taksanya diturunkan dari satu nenek moyang (*common ancestor*) yang sama, tidak pada garis keturunan atau taksa yang lain (Hall, 2018). Genus *Zingiber* terpisah pada klad yang berbeda dengan genus *Hedychium* yang merupakan sesama anggota Famili Zingiberaceae. Pada pohon filogenetik dapat dilihat bahwa genus *Curcuma* berkerabat lebih dekat dengan Genus *Zingiber* dibandingkan dengan genus *Hedychium*.

Kekerabatan antar spesies *Zingiber* juga dapat dilihat pada pohon filogenetik yang telah direkonstruksi. *Z. loerzingii* berada pada satu klad dengan *Z. zerumbet* dan *Z. officinale* sebagai *sister taxa*. *Sister taxa* adalah spesies yang bersifat monofiletik dan berada dalam satu taksa sehingga memiliki kekerabatan yang sangat dekat dibandingkan dengan spesies lain yang ada pada pohon (Higgs & Attwood, 2005; Xiong, 2006).

BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka didapat kesimpulan sebagai berikut :

1. Berdasarkan hasil analisis molekuler keempat *Zingiber loerzingii* Val. didapatkan hasil sekuens sepanjang 576 bp dengan urutan nukleotida yang serupa. Hasil penyatuan (*contig*) pada sekuens konservatif untuk mendapatkan sekuens konsensus juga didapatkan 4 sekuens konsensus yang serupa sehingga sesuai untuk dijadikan *Barcode DNA* pada tumbuhan *Z. loerzingii*
2. Sekuens *Z. loerzingii* dianalisis dengan aplikasi MEGA X dan DnaSP versi 6 untuk melihat tingkat keragaman genetik. Dilakukan perhitungan jarak genetik (*pairwise distance*), perhitungan *GC content*, *variable site*, *parsimony site*, *single nucleotide polymorphism*, *conserved site* serta analisis perhitungan *haplotype* dan keragaman nukleotida. Perhitungan *GC content* menunjukkan nilai *GC content* pada *Z. loerzingii* lebih rendah dibandingkan *AT content* yang mengindikasikan spesies *Z. loerzingii* sifatnya lebih primitif. Hasil dari analisis *single nucleotide polymorphism* serta analisis perhitungan *haplotype* dan keragaman nukleotida didapatkan nilai 0,0 yang menunjukkan bahwa tidak adanya keragaman molekuler atau keragaman genetik pada seluruh sampel *Z. loerzingii* yang dikoleksi dari Cagar Alam Sibolangit, Kabupaten Deli Serdang, Provinsi Sumatera Utara.
3. Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik, didapatkan seluruh spesies terbagi menjadi 3 klad besar dimana *Z. loerzingii* berada dalam satu kelompok monofiletik dengan *Zingiber zerumbet* dan *Zingiber officinale* sebagai *sister taxa*.

5.2. Saran

Beberapa saran yang dapat dilakukan untuk penelitian selanjutnya :

1. Penelitian ini hanya menggunakan marka molekuler *rbcL* dengan panjang sekuens 576 bp sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan *complete sequence rbcL* dan perlu juga untuk dilakukan penelitian dengan menggunakan *whole genome* untuk mendapatkan data yang lengkap mengenai karakter molekuler *Z. loerzingii*.
2. Metode rekonstruksi pohon filogenetik pada penelitian ini dilakukan dengan hanya menggunakan metode *Neighbor-Joining* sehingga perlu dilakukan analisis lebih lanjut mengenai hubungan filogenetik dengan menggunakan metode lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, D., Kikuchi, A., Jatoi, S. A., Mimura, M., & Watanabe, K. N. (2009). Genetic variation of chloroplast DNA in Zingiberaceae taksa from Myanmar assessed by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *Annals of Applied Biology*, 155(1), 91–101.
- Alaklabi, A., Ahamed, A., Al-Qthanin, R. N., Arif, I. A., Panneerselvam, A., Al-Khulaidi, A. W. 2021. Molecular Characterization of Endangered Endemic Plant *Aloe pseudurobroviolacea* using Chloroplast *matK* and *rbcL* gene. *Saudi Journal of Biological Science*, 28: 1123-1127.
- Arif, M. F., Aristya, G. R., Subositi, D., Sari, A. N., and Kasiamdari, R. S. 2019. *rbcL* and *matK* Chloroplast DNA Composition of Green Chireta (*Andrographis paniculata*) from Indonesia. *Biodiversitas*, 20(12): 3575-3583.
- Baasanmunkh, S., Nyamgerel, N., Bayarmaa, G-A., Oyuntsetseg, B., Oyundelger, K., and Choi H.J. 2020. A New Record of Critically Endangered *Saussurea bogedaensis* (Asteraceae) from Dzungarian Gobi, Mongolia. *PhytoKeys*, 160: 109–121.
- Baker, S. C. 2008. A Truer Measure of the Market: The Molecular Ecology of Fisheries and Wildlife Trade. *Molecular Ecology*, 17: 3985–3998.
- Bartlett, J. M. S., and Stirling, D. 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular Biology*, 226: 3-6.
- Basak, S., Moolam, R. A., Parida, A., Mitra, S., and Rangan, L. 2019. Evaluation of Rapid Molecular Diagnostics for Differentiating Medicinal *Kaempferia* Species From its Adulterants. *Plant Diversity*, 41: 206-211.
- Basith, A. 2015. Peluang Gen *rbcL* sebagai *DNA Barcode* Berbasis DNA Kloroplas untuk Mengungkap Keanekaragaman Genetik Padi Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) Lokal Indonesia. *Biologi, Sains, Lingkungan, dan Pembelajarannya*. 938-941.
- Blaxter, M. 2003. Molecular Systematics - Counting Angels with DNA. *Nature*, 421: 122–124.
- Brickell, C. (ed). 2012. *Encyclopedia of Plants and Flowers*. Dorling Kindersley. New York.
- Campbell, N. A., dan Reece, J. B. 2008. *Biologi, Edisi Kedelapan Jilid 1*. Terjemahan : Damaring Tyas Wulandari. Erlangga. Jakarta.

- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA Barcode for Land Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 12794-12797.
- Chase, M. W., and Fay, M. F. 2009. Barcoding of Plants and Fungi. *Science*, 325: 682–683.
- Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haidar, N., and Savolainen, Vincent. 2005. Land Plants and DNA Barcodes: Short-term and Long-term Goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 1889–1895.
- Chen, C.W., Huang, Y.M., Kui, L.Y., Nguyen, Q. D. N., Uu, H. T., Callado, J. R., Ferraradan, D. R., and Chiou, W. L. 2012. trnL-F is Powerful Marker for DNA Applition of Field Vittarioid Gametophyte (Pteridaceae). *Annals. of Botany*, 111(4): 663-673.
- Chen, S., Pang, X., Song, J., Shi, L., Yao, H., Han, J., and Leon, C. 2014. A Renaissance in Herbal Medicine Identification: From Morphology to DNA. *Biotechnology Advances*, 32: 1237-1244.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C, Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., and Leon C. 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS One*, 5(1): 1-8.
- Chin, K. J., Yuen, K. H., Sieo, C. C., and Yiap, B. C. 2013. Electrophoresis: What does a century old technology hold for the future of separation science. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 7(4): 213-221.
- Choudhuri, S., and Kotewicz, M. 2014. *Bioinformatics for Beginners : Genes, Genoms, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools*. Elsevier, Inc. Maryland.
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., and McGehee, M. R. 2019. *DNA Sequencing. Molecular Biology*. Elsevier, Inc.
- Claverie, J-M., and Notradame, C. 2007. *Bioinformatics for Dummies*. Wiley Publishing, Inc. Indianapolis.
- Cumming, M. P., Nugent, J. M., Olmstead, R. G. and Palmer, J. D. 2003. Phylogenetic Analysis Reveals Five Independent Transfer of the Chloroplast Gene *rbcL* to the Mitochondrial Genome in Angiosperms. *Curr Genet*, 43: 131- 138.

- de Vere, N, Rich T. C. G., Ford, C. R., Trinder, S. A., Long, C., Moore, C. W., Satterthwaite, D., Davies, H, Allainguillaume, J., Ronca, S., Tatarinova, T., Garbett, H., Walker, K., and Wilkinson, M. J. 2012. DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of Wales. *PLoS ONE*, 7(6): 1-12.
- Dechbumroong, P., Aumnouypol, S., Denduangboripant, J., and Sukrong, S. 2018. DNA barcoding of *Aristolochia* plants and development of species-specific multiplex PCR to aid HPTLC in ascertainment of *Aristolochia* herbal materials. *PLoS ONE*, 13(8): 1-16.
- Dewi, C.L.H. 2012. Analisis Biomolekuler Gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dalam Studi Filogenetik *Zingiber loerzingii* Valetton (Zingiberaceae). *Skripsi*. Departemen Biokimia FMIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- El-Atroush, H, Magdy, M., and Werner, O. 2015. DNA Barcoding of two endangered medicinal Plants from Abou Galoom protectorate. *Life Science Journal*, 12(9): 101-109.
- Etisham, M. 2016. Polymerase Chain Reaction (PCR) : Back to Basics. *Indian Journal of Contemporary Dentistry* 4(2): 30-34.
- Faatih, M. 2009. Isolasi Dan Digesti DNA Kromosom. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, 10(1): 61 – 67.
- Fatchiyah, Arumingtyas, E. L., Widyarti, S., dan Rahayu, S. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence Intervals on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783–791.
- Geneaid. 2020. *Geneaid™ Genomic DNA Extraction and Purification Protocol*. Geneaid Biotech Ltd. <http://www.geneaid.com>
- Gogoi, B. and Bhau, B. S. 2018. DNA Barcoding of the Genus *Nepenthes* (Pitcher Plant): a Preliminary Assesment Towards its Identification. *BMC Plant Biology*, 18:1-7.
- Graham, C. A., and Hill, A. J. M. 2001. *DNA Sequencing Protocols*. Springer Protocol. 167: 1-12.
- Gui, L., Jiang, S., Xie, D., Yu, L., Huang, Y., Zhang, Z., & Liu, Y. (2020). Analysis of Complete Chloroplast Genomes of *Curcuma* and the Contribution to Phylogeny and Adaptive Evolution. *Gene*, 732: 1-10.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., and Hickey, D. A. 2007. DNA Barcoding : How It complements Taksonomy, Molecular Phylogenetics and Population Genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4): 168-172.

- Hall, B. G. 2018. *Phylogenetic Tree Made Easy : A How-to Manual*. Oxford University Press. Oxford.
- Hapsari, L. 2015. *Keragaman dan Kekerabatan Genetik Pisang (Musa l.) di Jawa Timur berdasarkan sekuen daerah Internal Transcribed Spacer*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Harahap, M. R. 2018. Elektroforesis : Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT : Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1): 21-26.
- Hashim, A. M., Alatawi, A., Al-Taf, F. M., Qari, S. H., Elhady, M. E., A., Osman, G. H., Abouseadaa, H. H. 2020. Phylogenetic Relationship and DNA barcoding of Nine Endangered Medicinal Plant Species Endemic to Saint Katherine Protectorate. *Saudi Journal of Biological Science*, 28: 1123-1127.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., and DeWaard, J. R. 2003. Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 313–321.
- Hidayat T, Pancoro A. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen*, 4: 35-40.
- Higgs, P. J., and Attwood, T. K. 2005. *Bioinformatics and Molecular Evolution*. Blackwell, Ltd. Oxford.
- Hills, D. M., C. Moritz, and Mable, B. K. 1996. *Molecular Systematic*. Sinauer Associates. Sunderland.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., and Little, D.P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS one*, 6: e19254.
- Hollingsworth, P. M. 2011. Refining the DNA Barcode for Land Plants. *PLoS ONE*, 6(5): 137-145.
- Holmes, B. H., Steinke, D., and Ward, R. 2009. Identification of Shark and Ray Fins Using DNA Barcoding. *Fisheries Research*, 95(2): 280-288.
- Hu, S. J., Hu, H. Y., Gao, H., Xia, L., and Chen, S. L. 2019. DNA Barcoding and Rapid Identification of the Precious Herb Herba Anoectohili. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 17(10): 738-745.
- Hubert, N., and Hanner, R. 2015. DNA Barcoding, Species Delineation and Taksonomy: A Historical Perspective. *De Gruyter Open*, 3: 44–58.

- Jantan, I.B., Yassin, M.S.M., Chin, C.B., Chen, L.L., Sim, N.L., 2003. Antifungal Activity of the Essential Oils of Nine Zingiberaceae Species. *Pharmaceutical Biology*, 41: 392–397.
- Jarulis, Muslim, C., Kamilah, S. N., Utama, A. F., Permana, D., Sari, M. M., Prayitno, A. H. and Jannah, I. M. 2021. DNA barcode of Enggano hill myna, *Gracula religiosa enganensis* (Aves: Sturnidae) based on mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I. *Biodiversitas*, 22(3): 1635-1643.
- Joshi, M., and Deshpande, J. D. 2010. Polymerase Chain Reaction : Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 1(5): 81-97.
- Kala, C. P. 2005. Ethnomedicinal Botany of the Apatani in the Eastern Himalayan Region of India. *Journal of Ethnobiol Ethnomed*, 1: 1–8.
- Kaur, K. 2015. DNA Barcoding and Its Applications *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(2): 602-604.
- Kim, H. M., Oh, S. H., Bhandari, G. S., Kim, C. S., and Park, C. W. 2014. DNA Barcoding of Orchidaceae in Korea. *Molecular Ecology Resources*, 14: 455-507.
- Knebelsberger, T. and Stöger, I. DNA Extraction, Preservation, and Amplification. *Methods in Molecular Biology*, 858: 311-338.
- Komalasari K. 2009. Pengaruh perbandingan volume darah dan lisis buffer serta kecepatan sentrifugasi terhadap kualitas produk DNA pada sapi Friesian holstein (FH). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kress, W. J. 2017. Plant DNA barcodes: Applications Today and in the Future. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4): 291–307.
- Kress, W. J. and Erickson, D.L. 2012. DNA Barcodes: Methods and Protocols. *Springer Protocol*, 858: 03-08.
- Kress, W.J., Prince, L.M., and Williams, K.J. 2002. The Phylogeny and a New Classification of Ginger (Zingiberaceae): Evidence from Molecular Data. *American Journal of Botany*, 89: 1682-1696.
- Kress, W.J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., and Janzen, D. H. 2005. Use of DNA Barcodes to Identify Flowering Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23): 8369-8374.

- Kumar, S., and Gadagkar, S. R. Efficiency of the Neighbor-Joining Method in Reconstructing Deep and Shallow Evolutionary Relationships in Large Phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, 51:544–553.
- Kumar, S., Kahlon, T., Chaudhary, S. 2011. A rapid Screening for Adulterants in Olive Oil using DNA Barcodes. *Food Chemistry*, 127: 1335–1341.
- 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.
- Lesk, A. M. 2002. *Introduction to Bioinformatics*. Oxford University Press. Oxford.
- Li, D. Z., Liu, J. Q., hen, Z. D., Wang, H., Ge, X. J., Zhou, S. L., Gao, L. M., Fu, C. X., and Chen. S. L. 2011. Plant DNA Barcoding in China. *J. Syst. E.* 49:165-168.
- Li D-M, Ye Y-J, Xu Y-C, Liu J-M, Zhu G-F. 2020. Complete Chloroplast Genomes of *Zingiber Montanum* and *Zingiber zerumbet*: Genome Structure, Comparative and Phylogenetic Analyses. *PLoS ONE*, 15(7):1-19.
- Li, D-M., Zhao, C-Y., Li, X-F. 2019. Complete Chloroplast Genome Sequences of *Kaempferia Galanga* and *Kaempferia Elegans*: Molecular Structures and Comparative Analysis, *Molecules*, 24:1-18.
- Li, W. H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland.
- Liu, J., Moller, M., Gao, L.M., Zhang, D.Q., and Li, D.Z. 2011. DNA Barcoding for the Discrimination of Eurasian Yews (*Taxus* L., Taksaceae) and the Discovery of Cryptic Species. *Molecular Ecology Resources*, 11: 89-100.
- Liu, Z., Zeng, X., Yang, D., Chu, G., Yuan, Z., and Chen, S. 2012. Applying DNA Barcodes for Identification of Plant Species in the Family Araliaceae. *Gene*, 499: 76-80.
- Lo, Y. T., and Shaw, P. 2018. DNA-Based Techniques for Authentication of Processed Food and Food Supplements. *Food Chemistry*. 240: 767-774.
- Maftuchah, Winaya, A., dan Zainuddin, A. 2014. *Teknik Dasar Analisis Biologi Molekuler*. Penerbit DeePublish. Yogyakarta.
- Magdeldin, S. (ed). 2012. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. InTech. Croatia.
- Maia, V.H., da Mata, C. S., Franco, L. O., Cardoso, M. A., Cardoso, S. R. S., Hemerly, A. S., and Ferreira, P. C. G. 2012. DNA Barcoding Bromeliaceae : Achievements and Pitfalls. *PLoS One*, 7(1): 1-6.

- Maloukh, L., Kumarappan, A., Jarrar, M., Salehi, J., El-wakil, H., and Lakshmi, T. V. R. 2017. Discriminatory power of *rbcL* barcode locus for authentication of some of United Arab Emirates (UAE) native plants. *Biotech*, 7(144); 1-7.
- McGinn, S., & Gut, I. G. 2013. DNA sequencing – spanning the generations. *New Biotechnology*, 30(4), 366–372.
- Meena, R. K., Negi, N., Uniyal, N., Shamoan, A., Bhandari, M. S., Pandey, S., Negi, R. K., Sharma, R., and Ginwal, H. S. 2020. Chloroplast-based DNA barcode Analysis Indicates High Discriminatory Potential of *matK* Locus in Himalayan Temperate Bamboos. *3 Biotech Journal, Springer*, 10 (534): 1-13.
- Minoudi, S., Karaiskoua, N., Margaritis, A., Gkagkavouzisa, K., Tarantilid, P., Triantafyllidoud, D., Palilisc, L., Avramopoulouc, V., Tsiklirase, A., Barmpersic, K., and Triantafyllidis, A. 2020. Seafood Mislabeled in Greek Market Using DNA Barcoding. *Food Control*, 113: 1-8.
- Moyo, M., Amoo, S.O., Bairu, M.W., Finnie, J.F., and Van Staden, J. 2008. Optimising DNA Isolation for Medicinal Plants. *South African Journal of Botany*, 74: 771–775.
- Mukhopadhyay, C. S., Choudhary, R. K. Iquebal, M. A. 2018. *Basic Applied Bioinformatics*. Jhon Wiley & Sons, Inc. USA
- Murtyaningsih, H. 2017. Isolasi DNA Genom dan Identifikasi Kekerabatan Genetik Nanas menggunakan RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*). *Jurnal Agritop*, 15(1): 83-93.
- Musdja, M. Y. 2021. Potential bangle (*Zingiber montanum* J.König) Rhizome Extract as a Supplement to Prevent and Reduce Symptoms of Covid-19. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28:1-9.
- Newmaster, S. G., Fazekas, A, J. and Ragupathy, S. 2006. DNA Barcoding in Land Plants : Evaluation of *rbcL* in a Multigene Tiered Approach. *Canadian Journal of Botany*, 84: 335-341.
- Niu, Z., Xue, Q., Wang, H., Xie, X., Zhu, S., Liu, W. & Ding, X. 2017. Mutational Biases and GC-Biased Gene Conversion Affect GC Content in the Plastomes of *Dendrobium* Genus. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11): 2307.
- Nurainas and Ardiyani, M. 2019. *Zingiber loerzingii*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2019:e.T117465518A124284822. <https://dx.doi.org/1.0.2305/IUCN.UK.2019.2.RLTS.T117465518A124284822.en>. Diakses pada 08 February 2021.

- Nurhasanah, S. and Papuangan, N. 2019. Amplification and Analysis of *rbcL* Gene (Ribulose-1,5- Bisphosphate Carboxylase) of Clove in Ternate Island. *International Conference on Life Sciences and Technology*, 276: 1-8.
- Osathanunkul M, Ounjai S, Osathanunkul R, Madesis P. 2017. Evaluation of a DNA-Based Method for Spice/herb Authentication, So You Do Not Have to Worry about What Is in Your Curry, Buon Appetito! *PLoS ONE*, 12(10):1-12.
- Pardo, M. A., and Jiménez, E. 2020. DNA Barcoding Revealing Seafood Mislabeling in Food Services from Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 91: 1-8.
- Pierce, B. A. 2016. *Genetics, A Conceptual Approach*. W. H. Freeman & Company. New York.
- Puspitaningrum, R., Adhiyanto, C., dan Solihin. 2018. *Genetika Molekuler dan Aplikasinya*. Penerbit DeePublish. Yogyakarta.
- Rahayu, D.A., dan Nugroho, E. D. 2015. *Biologi Molekuler dalam Perspektif Konservasi*. Plantaxia. Yogyakarta.
- Rahayu, D.A., dan Jannah, M. 2019. *DNA Barcode Hewan dan Tumbuhan Indonesia*. Yayasan Inspirasi Ide Berdaya. Jakarta.
- Rau, C. H., Yudistira, A., dan Simbala, H. E. I. 2018. Isolasi, Identifikasi Secara Molekuler Menggunakan Gen 16s rRNA, dan Uji Aktivitas Antibakteri Bakteri Simbion Endofit yang Diisolasi dari Alga *Halimeda opuntia*. *PHARMACON : Jurnal Ilmiah Farmasi*, 7(2): 53-61.
- Roberts, G. A., and Dryden, D. T. F. 2013. DNA Electrophoresis: Historical and Theoretical Perspectives. *Springer Protocol*, 1054 (1): 01-09.
- Rosenberg, E. 2017. *DNA Sequencing and PCR. It's in Your DNA*. Elsevier, Inc.
- Ruano, G., and Kidd, K. K. 1991. Coupled Amplification and Sequencing of Genomic DNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 88(7): 15-24.
- Rugayah, Yulita, K.S., Arifiani, D., Rustiami, H., dan Girmansyah, D. (eds). 2017. *Tumbuhan Langka Indonesia : 50 Jenis Tumbuhan Terancam Punah*. LIPI PRESS. Jakarta.
- Saha, K., Dholakia, B. B., Sinha, R. K., and Sinha, S. 2020. DNA barcoding of selected Zingiberaceae species from North-East India. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29: 494–502.

- Sarvananda, L. 2018. Short Introduction of DNA Barcoding. *International Journal of Research*, 5(4): 673-683.
- Savolainen, V., Cowan, R.S., and Vogler, A.P. Roderick, G. K., and Lane, R. 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1850–1811.
- Shi, L.C., Zhang, J., Han, J.P., Song, J.Y., Yao, H., Zhu, Y.J., Li, J.C., Wang, Z.Z., Xiao, W., and Lin, Y.L. 2011. Testing the potential of proposed DNA barcodes for species identification of Zingiberaceae. *Journal of Systematic Evolution*, 49: 261–266.
- Smith, J. F., Kress, W. J., and Zimmer, E. A. 1993. Phylogenetic of the Zingiberales based on *rbcL* Sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80(3) :620-630.
- Syafaruddin, Randriani, E., dan Santoso, T.J. 2011. Efektivitas dan Efisiensi Teknik Isolasi dan Purifikasi pada Jambu Mete. *Bulletin RISTRI*, 2(2): 151-160.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, And Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28:2731–2739.
- Theilade I. 1996. Revision of the genus *Zingiber* in Peninsular Malaysia. *The Gardens' Bulletin Singapore*, 48: 207-236.
- Tjitrosoepomo, G. 1994. *Morfologi Tumbuhan*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Tushar, Basak, S., Sarma, G.C., and Rangan, L. 2010. Ethnomedical uses of Zingiberaceous plants of Northeast India. *J Ethnopharmacol*, 132: 286–296.
- Uncu, A. T., Uncu, A. O., Frary, A., and Doganlar, S. 2015. Authentication of Botanical Origin in Herbal Teas by Plastid Noncoding DNA length Polymorphisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 5920-5929.
- Uncu, A. O., and Uncu, A. T. 2020. A Barcode-DNA Analysis method for the Identification of Plant oil Adulteration in Milk and Dairy Products. *Food Chemistry*, 326: 2-8.
- Valentini, A., Miquel, C., and Taberlet, P. 2010. DNA Barcoding for Honey Biodiversity. *Diversity*, 2: 610-617.

- Valentini, A., Pompanon, F., and Taberlet, P. 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2): 110-117.
- Valeton, T. 1918. New note of the Zingiberaceae of Java and Malaya. *Bull. Jard. Bot. Buitenz.*, 2: 1-163.
- Vinitha, M.R., Kumar, U.S., Aishwarya, K., Sabu, M., and Thomas, G. 2014. Prospects for Discriminating Zingiberaceae Species in India Using DNA Barcodes. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(8): 760-773.
- Wang, D-Y., Wang, Q., Wang, Y-L., Xiang, X-G., Huang, L-Q., and Jin, X-H. 2017. Evaluation of DNA Barcodes in *Codonopsis* (Campanulaceae) and in some Large Angiosperm Plant Genera. *PLoS ONE*, 12(2):1-14.
- Wang, Y., Chinnathambi, A., Nasif, O., and Alharbi, S. 2021. Green Synthesis and Chemical Characterization of a Novel Anti-human Pancreatic Cancer Supplement by Silver Nanoparticles containing *Zingiber officinale* Leaf Aqueous Extract. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(4):1-12.
- Wastermeier, R. 2016. *Electrophoresis in Practice A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Germany.
- Wattoo, J.I., Saleem, M. Z., Shahzad, M. S., Arif, A., Hameed, A., and Saleem, M. A. 2016. DNA Barcoding: Amplification and Sequence Analysis of *rbcL* and *matK* Genome Regions in Three Divergent Plant Species. *Adv. Life Sci*, 4(1): 03- 07.
- Wijayasiriwardene T. D. C. M. K., Herath H. M. I. C. and Premakumara G. A. S. 2017. Identification of Endemic *Curcuma Albiflora* Thw. by DNA Barcoding Method. *Sri Lankan Journal of Biology*, 2(1):23-30.
- Wu, D.L., and Larsen, K. 2000. *Flora of China*. Science Press. Beijing.
- Xiong, J. 2006. *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press. New York.
- Xu, J., Zang, F., Wu, Q., Wang, Y., Wang, B., Huang, P., Zang, D., Ma, Y., Zheng, Y. 2021. Analysis of the Genetic Diversity and Molecular Phylogeography of the Endangered Wild Rose (*Rosa Rugosa*) in China Based on Chloroplast Genes. *Global Ecology and Conservation*, 28:1-12.
- Yan, L. J., Liu, J., Möller, M., Zhang, L., Zhang, X. M., Li, D. Z., and Gao, L. M. 2015. DNA Barcoding of *Rhododendron* (Ericaceae), the Largest Chinese Plant Genus in Biodiversity Hotspots of the Himalaya-Hengduan Mountains. *Molecular Ecology Resources*, 15: 932-944.

- Yang, Li., Feng, C., Cai, M., Chen, J., Ding, P. 2020. Complete Chloroplast Genome Sequence of *Amomum Villosum* and Comparative Analysis with Other Zingiberaceae Plants. *Chinese Herbal Medicine*, 12: 375-383.
- Youm, J. W., Han S. W., Seo, S. W., Lim, C. U., and Oh, S. H. 2016. DNA Barcoding of Schisandraceae in Korea. *Korean Journal Of Plant Taksonomy*, 46(3): 273-282.
- Yu, J., Wu, X., Liu, C., Newmaster, S., Ragupathy, S., and Kress, W. J. 2021. Progress in the Use of DNA Barcodes in the Identification and Classification of Medicinal Plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208: 1-7.
- Yuwono, T. 2010. *Biologi Molekular*. Erlangga. Jakarta.
- Zhang, D. Duan, L., and Zhou, N. 2014. Application of DNA barcoding in *Roscoea* (Zingiberaceae) and a primary discussion on taksonomic status of *Roscoea cautleoides* var. Pubescen. *Biochemical Systematics and Ecology*, 52:14-19.
- Zein, M. S. A., dan Prawiradilaga, D. M. 2013. *DNA Barcode Fauna Indonesia*. Kencana. Jakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Identifikasi *Z. loerzingii*



**HERBARIUM MEDANENSE
(MEDA)
UNIVERSITAS SUMATERA UTARA**

Jl. Bioteknologi No.1 Kampus USU, Medan – 20155
Telp. 061 – 8223564 Fax. 061 – 8214290 E-mail. nursaharapasaribu@yahoo.com

Medan, 31 Maret 2021

No. : 5798/MEDA/2021
Lamp. : -
Hal : Hasil Identifikasi

Kepada YTH,
Sdr/i : Ladiez Rahmayani Sagala
NIM : 0704163062
Instansi : Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara

Dengan hormat,
Bersama ini disampaikan hasil identifikasi tumbuhan yang saudara kirimkan ke Herbarium Medanense, Universitas Sumatera Utara, sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Monocotyledoneae
Ordo : Zingiberales
Famili : Zingiberaceae
Genus : Zingiber
Spesies : *Zingiber loerzingii* Valetton
Nama Lokal: -

Demikian, semoga berguna bagi saudara.

Kepala Herbarium Medanense.

Dr. Nursahara Pasaribu, M.Sc
NIP. 196301231990032001

Lampiran 2. Surat Izin Masuk Kawasan Konservasi (SIMAKSI)



KEMENTERIAN KEHUTANAN
DIREKTORAT JENDERAL PERLINDUNGAN HUTAN DAN KONSERVASI ALAM
BALAI BESAR KONSERVASI SUMBER DAYA ALAM SUMATERA UTARA
Jl. Sisingamangaraja KM 5,5 No. 14 Marechal, Medan Telp. : (061) 7860606
Fax (061) 7853749, Kode Pos 20147, E-mail : bbksdasumut@yahoo.co.id

SURAT IJIN MASUK KAWASAN KONSERVASI (SIMAKSI)

Nomor. SI. 1329 /BBKSDA SU-2/2021

Dasar : 1. Peraturan Menteri Kehutanan Nomor P.02/Menhut-II/2007 tanggal 1 Februari 2007 tentang organisasi dan Tata Kerja Unit Pelaksana Teknis Konservasi Sumber Daya Alam;
2. Peraturan Direktur Jenderal PHKA Nomor P.07/IV-SET/2011 Tanggal 9 Desember 2011 tentang Tata Cara Masuk Kawasan Suaka Alam, Kawasan Pelestarian Alam dan Taman Baru;
3. Keputusan Kepala Balai Besar KSDA Sumatera Utara Nomor SK.27/BBKSDA SU-2/2008 Tentang Prosedur Penerbitan Surat Izin Masuk Kawasan Suaka Alam, Kawasan Pelestarian Alam dan Taman Baru (SIMAKSI) untuk tujuan Penelitian dan Pengembangan Ilmu Pengetahuan dan Pendidikan, Pembuatan Foto Komersial dan Ekspedisi Bagi Warga Negara Indonesia;
4. Surat Permohonan dari Universitas Islam Negeri Medan Fakultas Sains dan Teknologi No. B.243/ST.I/ST.V.2/TL.003/2021 tanggal 17 Maret 2021 Hal. Izin Riset.

Dengan ini memberikan Ijin masuk kawasan konservasi kepada:

Nama : Lediex Rahmayani Sagala
NIM : 0704163062
Alamat : Lingk. XVI RT/RW 1 Sei Mati Kelurahan Sei Mati Kecamatan Medan Labuhan
Untuk : Kegiatan Penelitian "Penentuan Barcode DNA Berdasarkan Lokus Gen rbcl pada Zingiber loerzingii valetton.
Dilokasi : CA/TWA Sibolangit
Waktu : 24 - 27 Maret 2021, selama 4 (empat) hari
Jumlah : 3 (tiga) Orang

Dengan ketentuan :

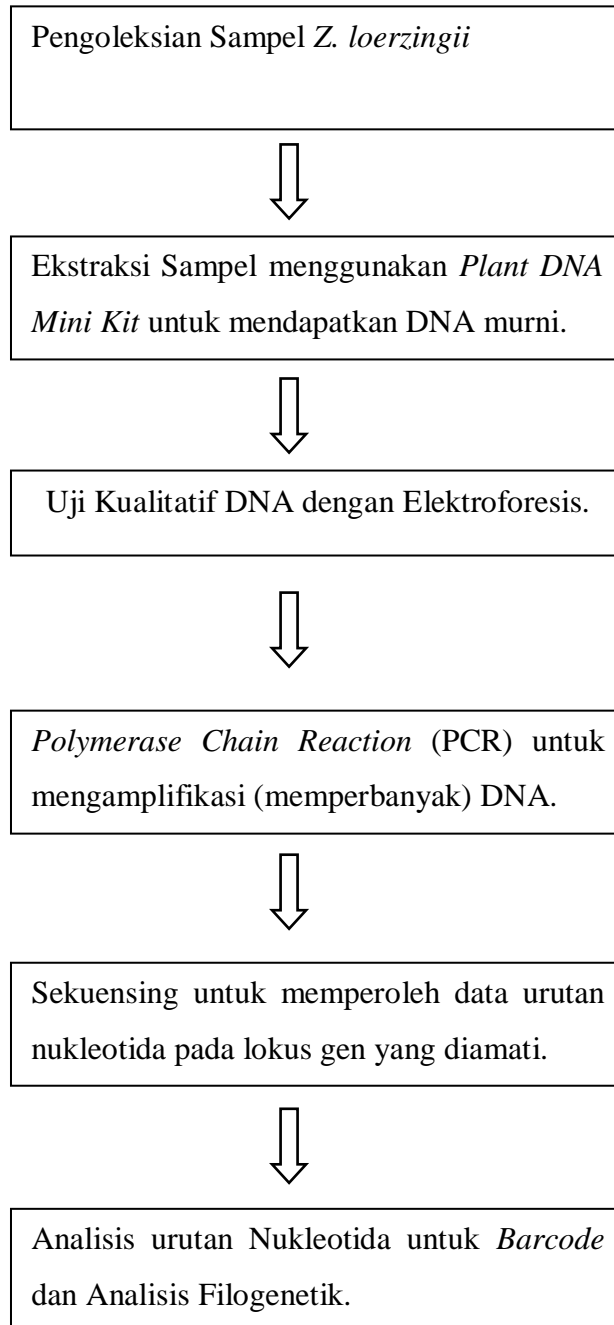
1. Permohonan Surat Ijin Masuk Kawasan Konservasi (SIMAKSI) wajib dilampiri dengan :
 - a. Proposal kegiatan
 - b. Fotocopi Tanda Pengenal
 - c. Surat Pernyataan tentang kesanggupan untuk mematuhi ketentuan peraturan perundangan
2. Permohonan Perpanjangan SIMAKSI untuk kegiatan Penelitian dan Pengembangan Serta Ilmu Pengetahuan dan Pendidikan diajukan oleh Pemohon kepada Balai Besar KSDA Sumatera Utara paling lambat 10 (sepuluh) hari kerja sebelum SIMAKSI berakhir, dengan melampirkan :
 - a. Laporan Data Kegiatan Penelitian
 - b. Perizinan dari Balai Besar KSDA Sumatera Utara yang masih berlaku
3. Sebelum memasuki lokasi wajib melapor kepada petugas resort/pos setempat;
4. Didampingi petugas Balai Besar KSDA kawasan yang dikunjungi dengan beban tanggung jawab dari pemegang SIMAKSI;
5. Dalam proses pengambilan gambar (shooting) tidak diperkenankan memberikan perlakuan (makan, dll) kepada satwa liar yang menjadi obyek dan atau perlakuan terhadap tumbuhan liar (pemotongan/ pohon untuk kepentingan dekorasi-dekorasi buatan);
6. Pemegang SIMAKSI berakhir, maka pemegang SIMAKSI berkewajiban menyerahkan kepada Direktorat Jenderal PHKA Cq. Balai Besar KSDA Sumut :
 - a. Mempresentasikan / ekspose hasil penelitian
 - b. Laporan tertulis hasil kegiatan Penelitian (skripsi) 1 (satu) bulan atau telah disahkan oleh Fakultas / Program Studi hasil penelitian (skripsi)
 - c. Menyerahkan copy film/vidio/foto jadi untuk pembuatan film/video/pengambilan foto;
7. Segala resiko yang terjadi dan timbul selama berada di lokasi sebagai akibat dari kegiatan yang dilakukan, menjadi tanggung jawab pemegang SIMAKSI;
8. Khusus untuk kegiatan pembuatan film/video wajib membuat tulisan Direktorat Jenderal PHKA dan logo Kementerian Kehutanan dalam film/video yang dibuat;
9. Selama melaksanakan Penelitian, pemegang SIMAKSI di larang antara lain : Melakukan Penebangan Pohon, Mengganggu Kesejahteraan Satwa, dan Memberikan Makanan Kepada Satwa yang Menjadi Objek kegiatan;
10. Komersialisasi hasil kegiatan (penggandaan buku hasil penelitian yang dijual kepada umum) harus seijin instansi yang berwenang.
11. Pengambilan sample/specimen tumbuhan atau satwa liar dan bagian-bagiannya dari kawasan konservasi harus mendapat ijin dari Menteri Kehutanan sesuai Peraturan Pemerintah Nomor. 7 Tahun 1999 tentang Pengawetan Jenis Tumbuhan dan satwa liar dan Peraturan Pemerintah Nomor. 8 Tahun 1999 tentang Pemanfaatan jenis dan Tumbuhan dan Satwa Liar;
12. Pengambilan dan pengangkutan sample/specimen berupa bagian-bagian Tumbuhan dan atau satwa liar dan atau hasil daripadanya untuk kepentingan penelitian harus mendapat izin dari Kepala Balai Besar KSDA Sumatera Utara sesuai dengan Keputusan Menteri Kehutanan Nomor SK. 284/menhut-II/2007 tanggal 16 Agustus 2007;
13. Sebelum melaksanakan kegiatan, pemegang SIMAKSI berkewajiban :
 - a. Membayar Pungutan Sesuai Ketentuan Perundang-undangan
 - b. Meminta Ijin atas Penggunaan atau Peminjaman Sarana dan prasarana Milik Negara Kepada Penerbit SIMAKSI
14. Berakhirnya SIMAKSI, Apabila
 - a. Jangka Waktu Berakhir
 - b. Dicabut oleh penerbit SIMAKSI;
 - c. Dan diserahkan kembali oleh pemegang SIMAKSI sebelum jangka waktu berakhir
15. SIMAKSI ini berlaku setelah pemohonan membunahkan materai Rp. 6.000 (enam ribu rupiah) dan menandatangani.

Demikian surat ijin masuk kawasan konservasi ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

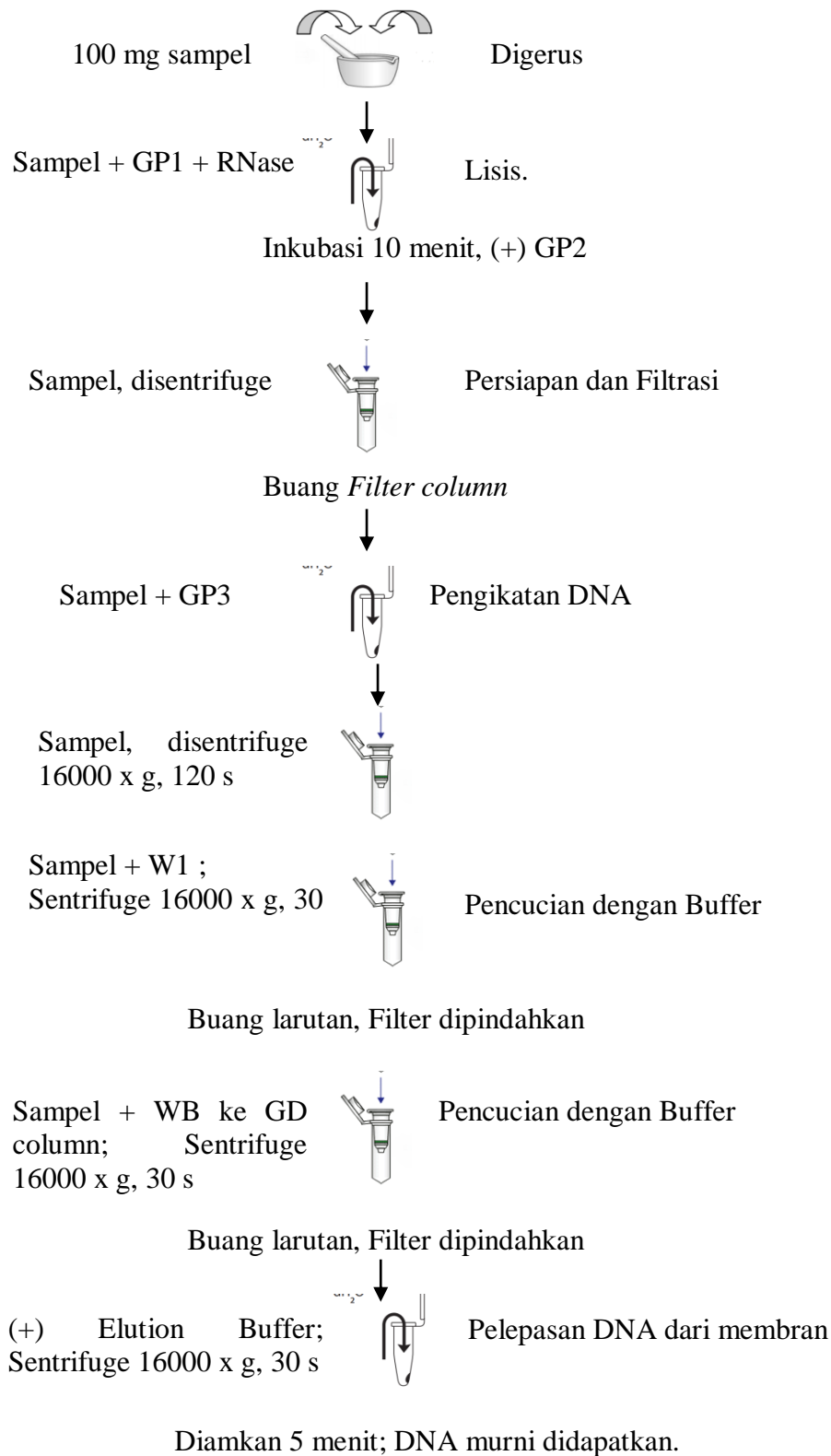
Pemegang Simaksi
METERAI TEMPEL
114805859
Lembar 1: Pemegang

Dikeluarkan di : Medan
Pada tanggal : 23 Maret 2021
Kepala Balai Besar,
Dr. Ir. H. H. Sianturi, M.Sc. For
NIP. 19621105 198903 2 003

Lampiran 3. Diagram Kegiatan Secara umum



Lampiran 4. Alur Tahap Isolasi DNA *Plant DNA Mini Kit* Merk Geneaid



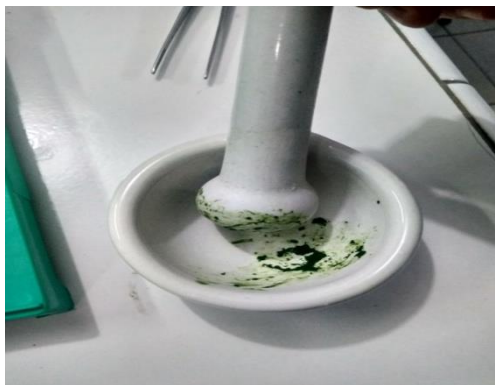
Lampiran 5. Pengoleksian sampel *Zingiber loerzingii* Valetton.



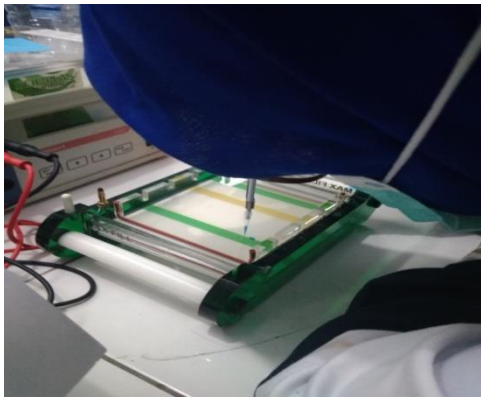
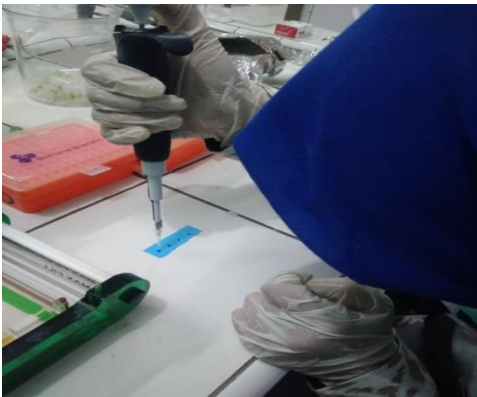
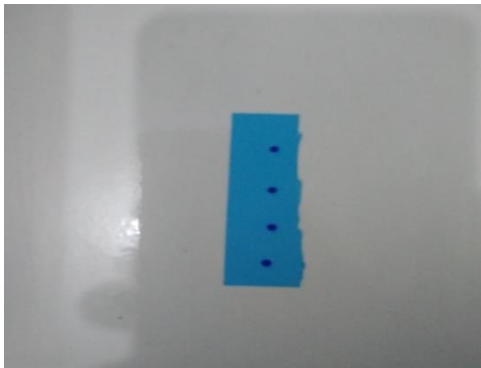
Lampiran 6. Hasil BLAST pada NCBI

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy	Download		New	Select columns	Show	100	?
Sequences producing significant alignments											
<input checked="" type="checkbox"/> select all 69 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer											
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber mioga isolate 1 chloroplast complete genome	Zingiber mioga	1059	1059	100%	0.0	99.83%	163541	MV285081.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber mioga chloroplast partial genome	Zingiber mioga	1059	1059	100%	0.0	99.83%	159868	MW067011.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber mioga chloroplast partial genome	Zingiber mioga	1059	1059	100%	0.0	99.83%	161698	MW067010.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber montanum chloroplast complete genome	Zingiber montan...	1059	1059	100%	0.0	99.83%	164464	NC_053656.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale chloroplast complete genome	Zingiber officinale	1053	1053	100%	0.0	99.65%	161519	MN736958.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale chloroplast complete genome	Zingiber officinale	1053	1053	100%	0.0	99.65%	162621	NC_044775.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale chloroplast complete genome	Zingiber officinale	1053	1053	100%	0.0	99.65%	162621	MH161428.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber spectabile isolate 95-825A plastid partial genome	Zingiber specta...	1053	1053	100%	0.0	99.65%	124767	MH603449.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate 90-1128 plastid partial genome	Zingiber officinale	1053	1053	100%	0.0	99.65%	124816	MH603448.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Zingiber officinale ribulose biphosphate carboxylase large chain (LOC122001764).mRNA	Zingiber officinale	1053	1053	100%	0.0	99.65%	1984	XM_0425926670.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber spectabile plastid complete genome	Zingiber specta...	1053	1053	100%	0.0	99.65%	155890	JX088661.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber zerumbet chloroplast complete genome	Zingiber zerumbet	1048	1048	100%	0.0	99.48%	169183	MT239400.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber zerumbet isolate Z11 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	Zingiber zerumbet	1048	1048	99%	0.0	99.65%	575	KX756185.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber zerumbet chloroplast complete genome	Zingiber zerumbet	1048	1048	100%	0.0	99.48%	163589	MK262726.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber zerumbet chloroplast complete genome	Zingiber zerumbet	1048	1048	100%	0.0	99.48%	169183	NC_049006.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber rubens isolate Z12 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	Zingiber rubens	1044	1044	99%	0.0	99.48%	574	KX756186.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber sp. MA-2017 voucher ADP 2767 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	Zingiber ultraim...	1042	1042	100%	0.0	99.31%	723	KU891637.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Zingiber officinale ribulose biphosphate carboxylase large chain-like (LOC122033398).mR	Zingiber officinale	1042	1042	100%	0.0	99.31%	1905	XM_042592405.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber sp. MA-2021 isolate W168 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl)	Zingiber sp. MA...	1042	1042	100%	0.0	99.31%	720	MT070786.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale voucher PS0523MT01 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	Zingiber officinale	1037	1037	98%	0.0	99.65%	703	GU180523.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber mioga voucher PS0528MT01 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl)	Zingiber mioga	1037	1037	98%	0.0	99.65%	703	GQ436408.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate G11 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	Zingiber officinale	1035	1035	97%	0.0	99.82%	565	KX756187.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber graminum ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcl) gene partial cds chloroplast gene for chlor	Zingiber gramin...	1018	1018	97%	0.0	99.29%	1328	AF243850.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale chloroplast gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	Zingiber officinale	1014	1014	95%	0.0	99.82%	552	LC461747.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber engganoensis voucher Enggano190 (BQ) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase larg	Zingiber enggan...	1009	1009	100%	0.0	98.26%	732	KT026199.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Zingiber officinale ribulose biphosphate carboxylase large chain-like (LOC121986535).mR	Zingiber officinale	1003	1003	100%	0.0	98.09%	631	XM_042540501.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber spectabile isolate 95948780 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl)	Zingiber specta...	985	985	93%	0.0	99.63%	539	JX978690.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Zingiber officinale ribulose biphosphate carboxylase large chain-like (LOC121979441).mR	Zingiber officinale	970	970	100%	0.0	97.05%	631	XM_042531432.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale voucher A2769 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl)	Zingiber officinale	968	968	92%	0.0	99.62%	605	MH059862.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber spectabile isolate 95948771 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl)	Zingiber specta...	966	966	90%	0.0	100.00%	523	JX978689.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber ottensii voucher A2392 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) ge	Zingiber ottensii	963	963	92%	0.0	99.43%	605	MH059863.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber montanum voucher ZSH01 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcl) gene part	Zingiber montan...	963	963	90%	0.0	99.81%	524	KC598029.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber sp. ZSH06 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcl) gene partial cds chloroplast Zingiber sp. ZS	Zingiber sp. ZS...	952	952	90%	0.0	99.43%	524	KC598034.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber zerumbet voucher ZSH04 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcl) gene part	Zingiber zerumbet	952	952	90%	0.0	99.43%	524	KC598032.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate Z10G8 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) g	Zingiber officinale	939	939	88%	0.0	99.80%	514	KU043481.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate Z9G10 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) g	Zingiber officinale	939	939	88%	0.0	99.80%	514	KU043480.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate Z8G11 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) ge	Zingiber officinale	939	939	88%	0.0	99.80%	514	KU043479.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate Z7G8 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) g	Zingiber officinale	939	939	88%	0.0	99.80%	514	KU043478.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate Z6G12 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) g	Zingiber officinale	939	939	88%	0.0	99.80%	514	KU043477.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale voucher KUFC2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcl) gene partial	Zingiber officinale	924	924	87%	0.0	99.60%	518	MN394898.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene partial cds	Zingiber officinale	924	924	88%	0.0	99.41%	509	MK244674.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate Z5G10 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) g	Zingiber officinale	863	863	82%	0.0	99.58%	476	KU043475.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate Z2G9 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) g	Zingiber officinale	863	863	82%	0.0	99.58%	477	KU043472.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate CS5d ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) ge	Zingiber officinale	852	852	80%	0.0	99.78%	464	MW509057.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber graminum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rbcl) gene partial cds chloroplast gene for c	Zingiber gramin...	848	848	96%	0.0	93.56%	1345	L05465.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate Z4G10 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) g	Zingiber officinale	780	780	74%	0.0	99.53%	436	KU043473.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate Z5G13 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) g	Zingiber officinale	774	774	74%	0.0	99.30%	428	KU043476.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate Z5G8 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) ge	Zingiber officinale	752	752	71%	0.0	99.52%	418	KU043474.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate MGGM_AGERI_224 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large su	Zingiber officinale	647	647	92%	0.0	88.58%	645	KU556652.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber parishii isolate Zn_34.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) ge	Zingiber parishii	422	422	40%	1e-116	99.57%	922	KF304181.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber odoriferum isolate Zn_23.5 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl)	Zingiber odorife...	422	422	40%	1e-116	99.57%	922	KF304180.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber odoriferum isolate Zn_23.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl)	Zingiber odorife...	422	422	40%	1e-116	99.57%	922	KF304178.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber nimmonii isolate Zn_3.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) g	Zingiber nimmonii	422	422	40%	1e-116	99.57%	922	KF304175.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber wightianum isolate 5.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcl) gene partia	Zingiber wightia...	366	366	34%	5e-100	99.50%	855	KM983477.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber wightianum isolate 5.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcl) gene partia	Zingiber wightia...	366	366	34%	5e-100	99.50%	855	KM983476.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber ligulatum isolate 4.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcl) gene partia	Zingiber ligulatum	366	366	34%	5e-100	99.50%	855	KM983475.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber ligulatum isolate 4.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcl) gene partia	Zingiber ligulatum	366	366	34%	5e-100	99.50%	855	KM983474.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber roseum isolate 21.3 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcl) gene partia	Zingiber roseum	366	366	34%	5e-100	99.50%	855	KJ871880.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber roseum isolate 21.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcl) gene partia	Zingiber roseum	366	366	34%	5e-100	99.50%	855	KJ871878.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber parishii isolate 34.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcl) gene partia	Zingiber parishii	366	366	34%	5e-100	99.50%	855	KJ871876.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber nimmonii isolate 3.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcl) gene partia	Zingiber nimmonii	366	366	34%	5e-100	99.50%	855	KJ871865.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber montanum isolate 16.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcl) gene partia	Zingiber montan...	366	366	34%	5e-100	99.50%	855	KJ871858.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber montanum isolate 16.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcl) gene partia	Zingiber montan...	366	366	34%	5e-100	99.50%	855	KJ871857.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber nimmonii ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene partia	Zingiber nimmonii	363	363	35%	6e-99	98.54%	905	KX938352.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber capitatum isolate 15.2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcl) gene partia	Zingiber capitatum	361	361	34%	2e-98	99.00%	855	KM983473.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber capitatum isolate 15.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcl) gene partia	Zingiber capitatum	361	361	34%	2e-98	99.00%	855	KM983472.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale isolate 35.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcl) gene partia	Zingiber officinale	361	361	34%	2e-98	99.00%	855	KJ871871.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber zerumbet isolate 1.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcl) gene partia	Zingiber zerumbet	355	355	34%	1e-96	98.51%	855	KJ871883.1		
<input checked="" type="checkbox"/>	Zingiber officinale partial rbcl gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit s	Zingiber officinale	274	274	25%	3e-72	100.00%	148	LS998955.1		

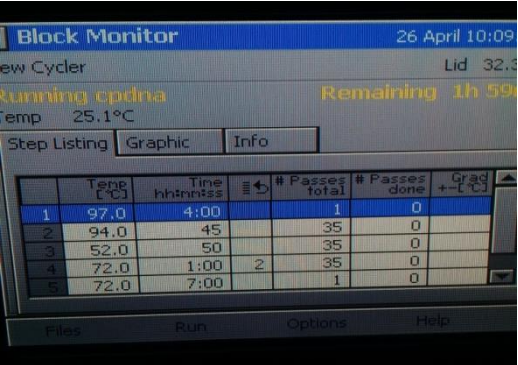
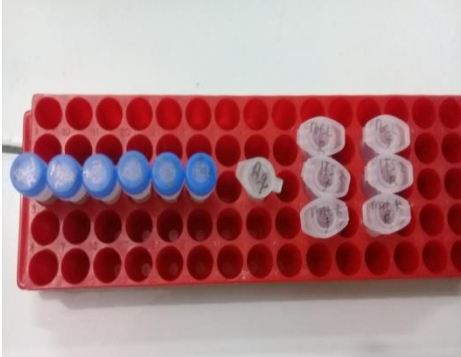
Lampiran 7. Tahap Isolasi DNA



Lampiran 8. Tahap Elektroforesis



Lampiran 9. Tahap PCR



Lampiran 10. Alat dan Bahan

