



**LAPORAN HIBAH PENELITIAN
PROYEK DUE-LIKE BATCH III
TAHUN 2006**



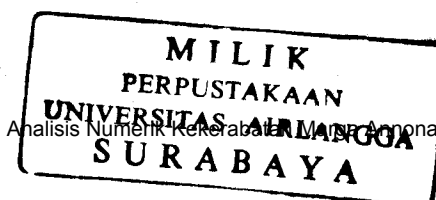
**Analisis Numerik Kekerabatan Marga *Annona* Sebagai
Upaya Konservasi**

Oleh :

**Hamidah
Sri Puji Astuti Wahyuningsih**

010307141

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**



**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
USULAN HIBAH PENELITIAN PROYEK DUE-Like BATCH III**

A. Judul : Analisis Numerik Kekerabatan Marga *Annona*
Sebagai Upaya Konservasi

B. Ketua Penelitian
a. Nama : Dra. Hamidah, M.Kes.
b. Jenis Kelamin : Wanita
c. Pangkat/Golongan/NIP : Pembina/IVa/131653456
d. Bidang Keahlian : Taksonomi Tumbuhan
e. Fakultas Jurusan : MIPA/Biologi
f. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

C. Tim Penelitian
a. Nama : Dra. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si.
Bidang keahlian : Biologi molekuler
Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi Unair
Tugas dalam Tim : Peneliti

D. Sedang melakukan penelitian: ya tidak

E. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian
Jangka Waktu : 6 bulan
Biaya yang disetujui : Rp 30.000.000,- (Tiga puluh juta rupiah)

Surabaya, 30 Nopember 2006

Mengetahui,
Dekan/~~Ketua Jurusan Biologi~~
Fakultas MIPA



(~~Abd. Latief Burhan, M.S.~~)

Ketua Peneliti

(Dra. Hamidah, M.Kes.)

Menyetujui,
Direktur Eksekutif LPIU DUE -Like
Universitas Airlangga



(~~Tjitjik Sri Tjahjandari, Ph.D~~)
NIP.131801672

Analisis Numerik Kekerbatan Marga *Annona* Sebagai Upaya Konservasi

Hamidah dan Sri Puji Astuti Wahyuningsih
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Airlangga

ABSTRAK

Informasi tentang keragaman genetik plasma nutfah sangat diperlukan untuk mendukung program pemuliaan dan upaya konservasi. Salah satu plasma nutfah yang perlu diperhatikan adalah marga *Annona*. Jenis-jenis anggota dari marga *Annona* yaitu : *Annona muricata*, *A. squamosa*, *A. cherimola*, *A. reticulata*, *A. diversifolia*, *A. purpurea*, *A. glabra*, dan *A. montan.*. Dari delapan jenis *Annona* yang dapat dijumpai di Indonesia adalah *A. muricata*, *A. squamosa*, dan *A. reticulata*. *Annona reticulata* merupakan salah satu anggota Annonaceae yang merupakan tumbuhan pada saat ini mulai sulit dijumpai (langka), bila dibandingkan dengan *A. muricata* dan *A. squamosa* yang lebih banyak dijumpai. Apabila tidak mendapatkan perhatian khusus, tidak mustahil akan punah.

Tujuan dari penelitian ini adalah : (1) mengetahui keragaman genetik plasma nutfah marga *Annona* dan mengidentifikasi variasi-variasi *Annona* melalui pendekatan morfologi dan teknik RAPD, (2) Menentukan variasi-variasi tersebut apakah menyebabkan terjadinya jenis (spesies) berbeda atau variasi berbeda melalui pendekatan morfologi dan teknik RAPD, (3) Menganalisis pengelompokan hubungan kekerabatan tumbuhan yang diteliti dengan menggunakan metode gugus dan ordinasi untuk menginterpretasikan variasi-variasi anggota marga *Annona* melalui pendekatan morfologi dan teknik RAPD.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian dengan pendekatan morfologi dan RAPD. Dari analisis program SPSS didapatkan hasil penelitian sebagai berikut. (1). Variasi-variasi morfologi yang terjadi pada masing-masing jenis (spesies) *Annona muricata*, *Annona squamosa* dan *Annona reticulata* merupakan variasi fenotip dan bukan variasi genotip. Sehingga tidak menyebabkan terjadinya jenis (spesies) yang berbeda., (2). Ada perbedaan analisis pengelompokan hubungan kekerabatan ketiga spesies *Annona muricata*, *Annona squamosa* dan *Annona reticulata* antara pendekatan morfologi dengan pendekatan molekuler (RAPD), (3) Analisis pengelompokan hubungan kekerabatan spesies *A. muricata*, *Annona squamosa* dan *Annona reticulata* adalah kekerabatan antara *Annona squamosa* lebih dekat dengan *Annona reticulata* bila dibanding dengan kekerabatan antara *Annona squamosa* dan *Annona muricata*.

Kata kunci : Kekerbatan, numerik

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah Subhanallahu wa ta'ala, atas segala rahmad, hidayah serta karuniah – Nya sehingga peneliti dapat menyelesaikan laporan penelitian ini. Penelitian dengan judul analisis numerik kekerabatan marga *Annona* sebagai upaya pelestariannya, merupakan upaya peneliti ingin mengungkapkan potensi marga *Annona* sehingga dapat diketahui manfaatnya bagi kepentingan manusia.

Peneliti mengucapkan terima kasih berbagai pihak yang ikut membantu pelaksanaan penelitian ini, yaitu :

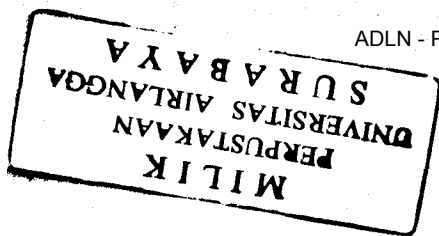
- (1) Proyek DUE Like Batch III yang telah memberikan bantuan dana penelitian melalui aktifitas hibah penelitian.
- (2) Ketua jurusan Biologi FMIPA Universitas Airlangga yang telah memberi izin penggunaan fasilitas peralatan untuk digunakan penelitian.
- (3) Mahasiswa Biologi Endah, Nevi dan Aneka yang telah membantu selama penelitian.

Peneliti berharap agar penelitian ini dapat bermanfaat bagi yang membaca, dan dapat memberikan sumbangan yang berarti bagi perkembangan ilmu pengetahuan serta dapat memberikan inspirasi bagi penelitian eksploratif lainnya.

Peneliti menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan. Untuk itu, saran dan masukan sangat peneliti harapkan demi kebaikan laporan penelitian ini.

Surabaya, 30 Nopember 20006

Peneliti



Halaman	
ii	LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
iii	ABSTRAK
iv	KATA PENGANTAR
v	DAFTAR ISI
vi	DAFTAR TABEL
vii	DAFTAR GAMBAR
viii	DAFTAR LAMPIRAN
	BAB I PENDAHULUAN
1	1.1. Latar Belakang Permasalahan
3	1.2. Rumusan Masalah
	BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN
4	2.1. Tujuan Penelitian
4	2.2. Manfaat Penelitian
	BAB III TINJAUAN PUSTAKA
5	3.1. Pertelesaian Spesies Taksonomi
5	3.2. Pertelesaian <i>Amnona sp.</i>
8	3.3. Pendekatan Morfologi
10	3.4. Keanekekaragaman genetik
11	3.5. Pertelesaian <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>
13	3.6. Pendekatan tehnik <i>Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)</i>
15	3.7. Pendekatan taksonomik Numerik
	BAB IV METODE
18	4.1. Bahan penelitian
19	4.2. Alat yang dipakai penelitian
19	4.3. Variabel penelitian
20	4.4. Jalan penelitian
25	4.5. Analisis data
	BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN
26	5.1. Kekeabatan <i>Amnona muricata</i> , <i>Amnona squamosa</i> dan <i>Amnona reticulata</i> Dengan Pendekatan Morfologi
29	5.2. Kekeabatan <i>Amnona muricata</i> , <i>Amnona squamosa</i> dan <i>Amnona reticulata</i> Dengan Pendekatan Molekuler
	BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN
42	6.1. Kesimpulan
42	6.2. Saran
	DAFTAR PUSTAKA
44	
	LAMPIRAN
48	

DAFTAR TABEL

No	Judul	Halaman
Tabel 4.1.	Komposisi campuran reaksi PCR untuk sampel DNA marga <i>Annona</i>	23
Tabel 4.2.	Daftar primer yang akan digunakan untuk amplifikasi DNA marga <i>Annona</i>	24
Tabel 5.1.	Analisis data numerik karakter (OTUS) pada <i>Annona muricata</i> , <i>A. squamosa</i> , dan <i>A. reticulata</i>	27
Tabel 5.2.	Matriks koefisien kesamaan "simple matching" dengan berbagai karakter pada tanaman <i>Annona muricata</i> , <i>A. squamosa</i> , dan <i>A. reticulata</i>	28
Tabel 5.3.	Jumlah pola larik DNA dari setiap primer RAPD yang digunakan dari 6 sampel <i>Annona muricata</i> , <i>A. squamosa</i> , dan <i>A. reticulata</i>	37
Tabel 5.4.	Matriks koefisien kesamaan "simple matching" dengan berbagai karakter pada tanaman <i>Annona muricata</i> , <i>A. squamosa</i> , dan <i>A. reticulata</i>	38

DAFTAR GAMBAR

No	Judul	Halaman
Gambar 5.1.	Dendrogram hasil analisis karakter morfologi marga <i>Annona</i>	29
Gambar 5.2.	Hasil amplifikasi DNA tiga spesies <i>Annona</i> oleh primer OPO-18	30
Gambar 5.3.	Hasil amplifikasi DNA tiga spesies <i>Annona</i> oleh primer Q-12	31
Gambar 5.4.	Hasil amplifikasi DNA tiga spesies <i>Annona</i> oleh primer OPP-12	32
Gambar 5.5.	Hasil amplifikasi DNA tiga spesies <i>Annona</i> oleh primer OPO-15	33
Gambar 5.6.	Hasil amplifikasi DNA tiga spesies <i>Annona</i> oleh primer OPP-4	34
Gambar 5.7.	Dendrogram hasil analisis SPSS dari marga <i>Annona</i> menggunakan primer OPO-18, Q-12, OPP-12, OPO-15, dan OPP-4	30



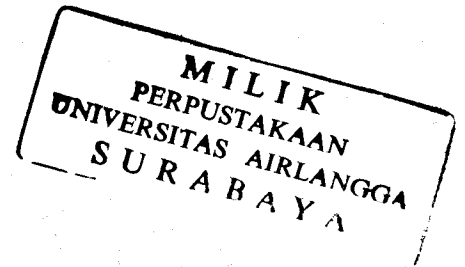
DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Karakter morfologi tanaman *Annona* di Surabaya
- Lampiran 2 Matrik data numerik interpretasi larik DNA hasil RAPD dengan primer OPO-18, Q-12, OPP-12, OPO-15, dan OPP-4
- Lampiran 3 Abstrak skripsi mahasiswa



BAB I

PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Permasalahan

Negara Indonesia termasuk satu di antara tujuh kawasan yang dikenal sebagai *mega biodiversity country* (Mogea *et al.*, 2001), dan sampai saat ini masih menduduki urutan kedua di dunia setelah Brazil (Noerjito & Maryanto, 2001). Annonaceae adalah tumbuhan berkayu yang merupakan salah satu anggota terbesar di daerah tropis.

Annonaceae tersusun atas lebih dari 2000 jenis yang tergolong dalam 130 marga. Salah satu anggota marganya adalah *Annona* (Heyne, 1950; Watson and Dalwitz, 1992). Dari seluruh anggota marga Annonaceae, 17 marga terdistribusi di daerah tropis. Dari anggota Annonaceae hanya 4 marga, yaitu *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria*, dan *Ansimina* yang menghasilkan buah yang dapat dimakan (Samson, 1986).

Jenis-jenis anggota dari marga *Annona* yaitu : *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. cherimola*, *A. reticulata*, *A. diversifolia*, *A. purpurea*, *A. glabra*, dan *A. montan* (Samsom, 1986). Dari delapan jenis *Annona* yang dapat dijumpai di Indonesia adalah *A. muricata*, *A. squamosa*, dan *A. reticulata*. *Annona reticulata* merupakan salah satu anggota Annonaceae yang merupakan tumbuhan pada saat ini mulai sulit dijumpai (langka), bila dibandingkan dengan *A. muricata* dan *A. squamosa* yang lebih banyak dijumpai. Apabila tidak mendapatkan perhatian khusus, tidak mustahil akan punah.

Hasil pengamatan di lapangan pada habitat yang berbeda, beberapa tumbuhan marga *Annona* antara lain *A. muricata* mempunyai keanekaragaman yang menyolok seperti pada ukuran daun, bentuk daun, dan ukuran polen. Bentuk-bentuk

keanekaragaman tersebut apakah merupakan suatu variasi genetik atau variasi fenotip ? Menurut Turesson (1922) variasi-variasi tersebut bisa merupakan suatu variasi genetik, apabila mempunyai kemiripan yang jauh (banyak perbedaan secara genetik).

Selama ini penelitian mengenai hubungan kekerabatan jenis-jenis dari marga *Annona*, masih sedikit dilakukan. Bridg (2005) meneliti kemampuan mikropropagasi dan kekerabatan dengan metode RAPD pada *A. muricata* dan *A. cherimola*. Sedangkan Royero *et al.* (2004) meneliti kemiripan genetik dari variasi genetik *A. muricata*. Penelitian mengenai hubungan kekerabatan jenis *A. muricata*, *A. squamosa*, dan *A. reticulata* pada habitat yang berbeda belum pernah dilakukan.

Pendekatan penelitian taksonomi pada akhir-akhir ini bukan hanya dengan pendekatan morfologi ataupun pendekatan kemotaksonomi tetapi juga dengan pendekatan molekular. Teknik-teknik molekular merupakan sarana yang sangat mendukung pembuktian homologi genetik. Konsep dasar homologi morfologi diperluas menjadi homologi genetik dengan menggunakan bukti-bukti genetik yang langsung diperoleh antara lain DNA. Salah satu metode amplifikasi fragmen DNA adalah teknik RAPD. RAPD marker dapat menganalisis variasi genom suatu spesies dengan cepat dan efisien dari pada *isozyme* marker (Ronning and Schnell, 1995)

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk menjawab permasalahan penelitian. Dalam penelitian ini digunakan pendekatan morfologi dan molekular. Kedua pendekatan tersebut akan menghasilkan data yang dapat merefleksikan bentuk baik kekhususan secara morfologi dan genetik (molekular).

Penggunaan analisis dengan metode numerik berdasarkan pendekatan morfologi, dan teknik RAPD-PCR (molekular) merupakan pendekatan yang belum pernah

dilakukan sebelumnya untuk memecahkan permasalahan pengelompokan kekerabatan pada tiga jenis marga *Annona*, yaitu *A. muricata*, *A. squamosa*, dan *A. reticulata*.

1.2. Permasalahan penelitian

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka permasalahan yang diajukan adalah sebagai berikut.

- (1) Bagaimanakah keragaman genetik plasma nutfah marga *Annona* dan mengidentifikasi variasi-variasi *Annona* melalui pendekatan morfologi dan teknik *random amplified polimorphic DNA*(RAPD) ?
- (2) Bagaimanakah variasi-variasi tersebut apakah menyebabkan terjadinya jenis (spesies) berbeda atau variasi berbeda melalui pendekatan morfologi dan teknik RAPD ?
- (3) Bagaimanakah pengelompokan hubungan kekerabatan tumbuhan yang diteliti dengan menggunakan metode gugus dan ordinasi untuk menginterpretasikan variasi-variasi anggota marga *Annona* melalui pendekatan morfologi dan teknik RAPD.?

BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

Tujuan yang hendak dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- (1) Mengetahui keragaman genetik plasma nutfah marga *Annona* dan mengidentifikasi variasi-variasi *Annona* melalui pendekatan morfologi dan teknik *random amplified polymorphic DNA*(RAPD).
- (2) Menentukan variasi-variasi tersebut apakah menyebabkan terjadinya jenis (spesies) berbeda atau variasi berbeda melalui pendekatan morfologi dan teknik RAPD
- (3) Menganalisis pengelompokan hubungan kekerabatan tumbuhan yang diteliti dengan menggunakan metode gugus dan ordinasi untuk menginterpretasikan variasi-variasi anggota marga *Annona* melalui pendekatan morfologi dan teknik RAPD.

2.2. Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapatkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut .

- (1) untuk memberikan informasi, apakah terjadi varietas baru, sub spesies (sub jenis) atau jenis baru marga *Annona* akibat habitat yang berbeda.
- (2) untuk mendapatkan informasi sidik jari DNA jenis-jenis dari marga *Annona*.
- (3) untuk menyajikan informasi dasar mengenai keanekaragaman hayati marga *Annona*.
- (4) untuk memberikan informasi dasar dalam pengelolaan/konservasi tumbuhan marga *Annona*.

BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Pertelaan Spesies Taksonomi

Spesies (jenis) adalah sekelompok individu yang secara morfologi dan ekologi di populasi alam dimana mungkin atau tidak mungkin berkembang biak dan reproduksinya terisolasi dari kelompok lain. Ada tiga aspek dari klasifikasi yang digabungkan dalam definisi spesies di atas, yaitu : morfologi, perilaku berkembang biak, dan habitat.

Darwin (1920) dalam Barbour (1987) mengemukakan bahwa suatu spesies dapat memperluas distribusinya dengan beradaptasi terhadap faktor pembatas lingkungan seperti temperatur. Pendapat tersebut didukung oleh Turesson (1922) dalam Barbour (1987) yang menyatakan bahwa adaptasi lokal pada tumbuhan dapat mengakibatkan diversitas keturunan suatu spesies tidak ada yang *exis* (selalu berubah).

3.2. Pertelaan *Annona sp*

Annona merupakan tumbuhan berkayu dengan daun tunggal yang duduknya tersebar atau berseling, tanpa daun penumpu. Bunga banci, jarang berkelamin tunggal, *aktinomorf*, berbilangan 3, seringkali mempunyai 2 lingkaran daun-daun mahkota. Benang sari banyak, bakal buah 1 sampai banyak, bebas satu sama lain, masing-masing berisi banyak atau satu bakal biji saja, letaknya pada kampuh perut atau basal, tiap bakal biji mempunyai 2 integumen. Buah kebanyakan berupa buah buni, kadang-kadang buah ganda. Biji dengan endosperm berbelah dan lembaga yang kecil (Tjitrosoepomo, 2000).

Menurut Royero *et al.* (2004) menyatakan bahwa dalam plasma nutfah *Annona muricata*, 45 sampel penelitian di Colombia menunjukkan ada 141 pita DNA, jumlah pita tiap individu 41 – 58, 8 pita monomorfik dan sisanya kemiripan genetiknya tinggi. Menurut Bridg (2005) menyatakan bahwa perbandingan pola pita pada RAPD marker diaplikasikan untuk menentukan kemantapan genetik pada micropropagasi tunas dari *A. cherimola* dan *A. muricata* pada varietas 4 *colombian* dan 2 *chile*. 29 primer diseleksi, terdapat 5 primer yang memberikan pita reproduibel yang jernih. Tidak ada variasi pola pita pada RAPD di antara tunas-tunas yang diuji. Hasil ini membuktikan stabilitas genetik dari *in vitro* regenerasi dan teruji bahwa propagasi dengan tipe *true to type*.

Beberapa studi telah menunjukkan bahwa daun, batang, kulit batang, akar, dan ekstrak biji *A. muricata* bersifat antibakteri melawan sejumlah mikroba patogen secara *in vitro* (de Feo, 1992; Bories, *et al.*, 1991) dan kulit batangnya bersifat *fungisidal* (Lopez-Abraham, *et al.*, 1979). Ekstrak daun *A. muricata* menunjukkan reaksi positif melawan *Plasmodium* malaria. Turunan isokuinolina ditemukan dalam buah sirsat (*A. muricata*) mempunyai fungsi sebagai anti depresif pada binatang (Hasrat *et al.*, 1997). Ekstrak metanolik asetogenin dari biji *A. muricata* dan *A. cherimola* yang telah diisolasi dan diuji mempunyai kemampuan aktivitas terhadap parasit dari larva *Molinema desetae* (Bories *et al.*, 1991). Aktivitas sitostatik dari ekstrak pelarut air, alkohol, dan aseton dari ekstrak *A. muricata* telah diuji pada fungi (Ascomycetes) menghambat persentase pertumbuhan (Lopesz *et al.*, 1979). Kulit batang dan biji dari *A. muricata* mengandung alkaloid seperti anonina, muricina, dan muricinina yang digunakan sebagai insektisida, hal ini menghasilkan asam hidrosianik. Kulit batang digunakan untuk penyamakan, sedang daun dan kulit biji telah digunakan sebagai racun

ikan. Bijinya yang mengandung 45% minyak tak jenuh merupakan racun iritan dan pestisida efektif melawan *Lice* dan *Aphid* (Morton, 1987).

Senyawa bioaktif dari *A. muricata* adalah *muricatocins* A dan B, 2,4 *trans*-10R *annonacin-A-one*, 2,4 *Cis* R *annonacin-A-one* dan N-4, dan *coumaroyl-tyramine* mempunyai efek signifikan mempertinggi sitotoksik melawan A-549 sel tumor paru-paru manusia dan MCF-7 sel tumor payudara manusia (Wu *et al.*, 1995). Beberapa studi ilmiah telah menunjukkan sifat-sifat antikanker beberapa turunan fitokimia dari daun, batang, dan biji, *A. muricata* berfungsi sitotoksik melawan sel kanker (Zeng *et al.*, 1996). Isolasi monotetrahidrofurannya dari asetogenin *A. muricata* adalah sitotoksik melawan adenocarcinoma kolon, yang mencapai 10.000 kali potensi adriamicin (doxorubicin) obat kemoterapi beberapa tipe kanker (Rieser *et al.*, 1996). Menurut Galvis *et al.* (1999), ekstrak dari *A. muricata*, *A. cherimola*, dan *Rollinia membranacea* mempunyai kemampuan sebagai antitumor dan antiviral dengan aktivitas yang signifikan. Menurut Zhang *et al.* (2004), diterpenoid yang diisolasi dari *Annona glabra* L mempunyai kemampuan menghambat proliferasi sel kanker HLC *cell line* SMMC-7721. Fraksi protein biji *A. squamosa* menunjukkan sifat sitotoksik yang selektif terhadap beberapa sel kanker (Sismindari *et al.*, 2001).

Sudjadi (2004) menyatakan bahwa biji *A. squamosa* mengandung dua RIP (*Ribosome Inactivating Protein*) dengan ukuran 28,6 kDa dan 37 kDa yang terelusi dari kolom CM-Sepharose CL-6B pada konsentrasi natrium klorida 0,2 dan 0,3 M. RIP adalah sekelompok protein yang terdapat pada tumbuhan yang mampu menghambat sintesis protein mamalia. Protein ini mempunyai aktivitas RNA N-glikosidase dengan kemampuannya depurinasi dengan memotong ikatan glikosidik-N pada posisi A-4324

28S rRNA dari ribosom 60S. Depurinasi ini menyebabkan faktor perpanjangan 2 (EF 2) tidak dapat berikatan dengan ribosom (Endo *et al.*, 1987). RIP bekerja secara enzimatik, dan sekitar 10 molekul mampu membunuh sel hewan. Semua RIP menginaktivasi ribosome hewan (Lord *et al.*, 1991). RIP pada *A. squamosa* mempunyai kemampuan memotong DNA superkoil menjadi nik-sirkuler pada kadar protein rendah, dan menjadi linier pada kadar protein lebih tinggi (Sismindari *et al.*, 1998). Dari homologi diketahui bahwa semua RIP mempunyai sisi aktif yang sama. Oleh karena itu, sifat biokimia RIP dengan sifat toksisitasnya, sebagai toksin rekombinan yang dapat menuju ke sel tertentu misalnya sel kanker dengan mengikatkan RIP pada antibodi, hormon, atau lektin (Sudjadi, 2004).

3.3. Pendekatan morfologi

Pendekatan morfologi merupakan pendekatan yang memberikan jalan tercepat untuk mengetahui variasi keanekaragaman tumbuhan dibandingkan dengan pendekatan yang lain terutama bagi taksonomis yang bertumpuh pada spesimen herbarium (Davis and Heywood, 1963). Data morfologi membantu setiap jenjang pada hirarkhi taksonomi, yaitu dari forma sampai ke jenjang divisi. Selain itu, data morfologi memberikan gambaran yang jelas antara faktor genetika dan evolusinya terutama pada karakter bunga serta memberikan petunjuk cara-cara tumbuhan mengadaptasikan dirinya terhadap lingkungan.

3.3.1. Kandungan alkaloid pada Annonaceae

Kandungan alkaloid pada Annonaceae tergolong dalam kelompok benzilisokuinolina. Selanjutnya ditemukan derivat dari kelompok benzilisokuinolina

pada Annonaceae adalah *benziltetrahydroisokuinolintypus* (*reticulina*), *aphorphyntypus* (*annonaina*, *annolobina*, *artabotrina*, *suavolina*, *artabotrinina*, *xylopina*), *bisbenziltetrahydroisokuinolintypus* (*phaeanthina*, *phaeanthanina*), *tetrahydroberberintypus* (*xylopinina*, *discretina*, *discretinina*, *discretamina*) dan *berberintypus* (*palmatina*) (Hegnauer, 1964; Gleye, 1998; Yu *et al.*, 1998)

Struktur alkaloid pada Annonaceae bersifat spesifik yang mencirikan kandungan pada marganya, yaitu :

- Annona* : *annonaina*, *reticulina*.
- Asimina* : *annolobina*.
- Artobotrys* : *artabotrina*, *suavolina*, *artabotrinina*.
- Xylophia* : *xylopinina*, *discretina*, *discretinina*, *discretamina*.
- Phaeanthus* : *phaeanthina*, *phaeanthanina*.
- Enantia* : *palmatina*.

3.3.2. Kandungan flavonoid pada Annonaceae

Diperkirakan sekitar 2 % dari seluruh karbon hasil fotosintesis di dalam tanaman diubah menjadi senyawa flavonoid atau turunannya. Bila dihitung dalam bobot bisa mencapai 10^9 ton/tahun (Smith, 1972). Oleh karena itu, flavonoid merupakan golongan fenol alam yang terbesar. Flavonoid dapat ditemukan dalam semua tumbuhan hijau. Flavonoid sebenarnya bagian dari glikosida, karena terdiri dari glikon senyawa sakarida dan aglikon yang merupakan flavonoidnya sendiri. Senyawa aglikon mempunyai struktur umum yang terdiri dari 3 kerangka cincin yang berupa aromatik C₆-C₃-C₆ (Markham, 1988; Robinson, 1983).

Variasi dari struktur flavonoid yang sering ditemukan adalah terletak pada jumlah dan posisi gugus hidroksil, metil, dan isoprenoidnya. Flavonoid pada tumbuhan sering dijumpai dalam bentuk flavon, pigmen antosianin, flavonol, dan isoflavon sebagai bentuk isomer dari flavon (Harborne, 1971).

Penggunaan data flavonoid telah banyak digunakan dalam analisis fenetik khususnya dengan menggunakan pola bercak yang dihasilkan oleh kromatogram dwi arah. Data kandungan flavonoid digunakan pada taksonomi untuk tiga aras, yaitu kelompok senyawa flavonoid, kandungan aktual pada tumbuhan, dan struktur molekul flavonoid yang dikandung (Richardson, 1983). Sebagai contoh, posisi gula pada struktur kerangka flavonoid dapat berguna bagi interpretasi kekerabatan infra generik (Saleh, 1979). Beberapa jenis tumbuhan yang memiliki kandungan flavon dinyatakan lebih primitif dibandingkan dengan tumbuhan yang mengandung senyawa flavon-glikosida (Averett *et al.*, 1986). Kekerabatan flavon dan flavonol dalam suatu tumbuhan penting artinya dalam analisis kekerabatan (Harborne, 1967; Inuma & Mizuno, 1989).

3.4. Keanekaragaman genetik

Studi keaneragaman genetik pada prinsipnya bertujuan untuk mengkaji komposisi genetik individu di dalam atau antar populasi dan untuk mengetahui faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya modulasi atau dinamika keaneragaman genetik dari suatu populasi. Secara umum keaneragaman genetik pada suatu populasi dapat terjadi karena gen mengalami mutasi, rekombinasi, dan perpindahan sekelompok populasi dari suatu tempat ke tempat lain (Griffiths *et al.*, 1996). Struktur genetik dari suatu populasi

dipengaruhi pula oleh beberapa faktor lain seperti besarnya populasi, cara reproduksi yang diteliti, aliran gen, dan seleksi (Mc Donald and Mc Dermott, 1993).

Keanekaragaman merupakan suatu fenomena normal pada makhluk hidup, baik dalam kehidupan tumbuhan, hewan maupun manusia. Ciri-ciri fisik luar pada setiap makhluk hidup yang tampak secara visual akan mudah dikenali karena tidak memerlukan alat bantu. Pada ciri-ciri fisik dalam sampai aras molekuler hanya dapat dikenali dengan alat-alat bantu atau teknik-teknik pemeriksaan laboratorium tertentu yang kadang memerlukan ketelitian yang tinggi (Sofro, 1991). Organisme dapat berbeda dalam bentuk individu (polimorfisme fenotipe), bentuk organ, enzim (polimorfisme protein), substansi darah (polimorfisme biokimia) dan perbedaan urutan nukleotida (polimorfisme DNA) (Passarge, 1994).

Studi keanekaragaman genetik berdasarkan sidik jari DNA dapat dilakukan dengan berbagai metode, tergantung pada tujuan dan kemudahan dalam menginterpretasi data. Metode yang sering dipakai dalam analisis keragaman adalah analisis keragaman berbasis hibridisasi dan analisis keragaman berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Weising *et al.*, 1993). Metode biologi molekuler yang berbasis pada molekul DNA dapat digunakan untuk analisis keragaman, karena masing-masing individu memiliki urutan DNA yang berbeda. Informasi urutan ini dapat digunakan untuk mempelajari perbedaan genetik dan hubungan kekerabatan di antara organisme (Weising *et al.*, 1993).

3.5. Pertelaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu metode amplifikasi fragmen DNA secara artifisial. Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada

tahun 1985, seorang peneliti di perusahaan Cetus corporation (Innes *et al.*, 1990). Setelah beberapa teknik baru dikembangkan untuk analisis polimorfisme dengan berbasis PCR seperti PCR dengan primer spesifik, PCR primer semi spesifik (rep-PCR), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLPs) (Weising *et al.*, 1993). Amplifikasi fragmen DNA dengan *thermocycler* menghasilkan data sidik jari tanpa melakukan pemindahan fragmen ke membran seperti RFLP, sehingga relatif singkat dan murah (Innes *et al.*, 1990). Analisis dengan teknik ini memerlukan *thermocycler*, DNA *template*, primer, Taq polimerase, dNTP, dan bufer PCR (Sambrook *et al.*, 1989). Amplifikasi DNA memerlukan primer. Primer adalah suatu oligonukleotida pendek sebagai awal sintesis rantai DNA dengan membentuk komplementer pada DNA *template* terdenaturasi. Primer akan membentuk ikatan hidrogen pada daerah komplementer dengan *template*. Perancangan primer spesifik untuk analisis polimorfisme biasanya menggunakan urutan lokus minisatelit atau mikrosatelit. Primer tersebut akan mengamplifikasi daerah yang diapit oleh minisatelit atau mikrosatelit. Strategi lain yang digunakan semi spesifik primer. Primer dibuat berdasarkan komplementasi dengan elemen DNA repetitif seperti *Alu repeat*. Data polimorfisme ini biasanya digunakan untuk studi populasi genetik atau pemetaan genom (Weising *et al.*, 1993). Untuk merancang primer yang cocok dibutuhkan informasi urutan DNA target agar *template* dan primer dapat komplementer. Hal ini merupakan kendala tersendiri karena memerlukan waktu dan biaya yang cukup besar (William *et al.*, 1990).

Kendala yang muncul pada studi polimorfisme menggunakan primer spesifik atau semi spesifik mendorong berkembangnya metode-metode baru yang menggunakan



primer acak (*arbitrary primer*). Metode yang berkembang pada penggunaan primer acak ada 2, yaitu :

- (1) *Arbitrary Primer-PCR* (AP-PCR), dikembangkan oleh Welsh dan Mc Celland pada tahun 1990 (Haymer, 1995).
- (2) *Random Amplified Polymorphic DNA-PCR* (RAPD-PCR) dikembangkan oleh William *et al.* (1990).

Kedua metode tersebut menganalisis langsung DNA. Pola yang dihasilkan merupakan pola sidik Jari DNA dengan variabel yang kompleks, pola tersebut dapat digunakan untuk membedakan genotipe (William *et al.*, 1990; Weising *et al.*, 1993).

3.6. Pendekatan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)

RAPD adalah sebuah teknik berdasar PCR dengan rangkaian random DNA yang diamplifikasi dengan menggunakan primer tunggal dari rangkaian nukleotida yang tidak beraturan. RAPD marker diturunkan dengan cara mendelian (William *et al.*, 1990)

Keuntungan RAPD dapat menganalisis variasi genom suatu spesies dengan cepat dan efisien (Haymer, 1995). Seluruh tahapan kerja dari ekstraksi DNA sampai dokumentasi dapat dilakukan dalam waktu ± 24 jam. Hal ini jauh lebih efektif dan efisien jika dibanding RFLP, juga tidak memerlukan suatu bahan kimia berbahaya seperti radioaktif dan memungkinkan untuk memproses sampel secara serentak (Kambhampati *et al.*, 1992).

Metode RAPD menggunakan oligonukleotida pendek sebagai primer ± 10 mer dengan urutan acak, persentasi GC suatu primer adalah 60-70%, hal ini akan memperkuat ikatan primer dengan DNA *template* pada daerah yang komplementer. Suhu perlekatan

primer (*annealing*) relatif rendah yaitu $\leq 37^{\circ}\text{C}$ dan reaksi PCR ini hanya akan mengamplifikasi dengan arah yang berlawanan dengan tempat pelekatan primer (*primer site*) dengan panjang ± 3000 bp (Loxdale and Lushai, 1998). Tempat pelekatan primer adalah urutan nukleotida yang dapat dikenali oleh suatu primer, yang selanjutnya disebut lokus RAPD. Primer yang digunakan untuk RAPD tidak dirancang untuk mengamplifikasi urutan DNA target spesifik, maka lokus yang diamplifikasi tersebut di sepanjang genom (William *et al.*, 1990; William *et al.*, 1993). Penentuan primer acak untuk analisis RAPD biasanya dilakukan melalui studi pustaka atau studi pendahuluan, dari studi tersebut diperoleh informasi primer-primer mana yang cocok untuk analisis polimorfisme.

Analisis polimorfisme genetik pada lokus RAPD dilakukan dengan melihat ada atau tidak adanya pita-pita DNA dengan berat molekul tertentu yang teramplifikasi oleh suatu primer pada sampel (Grosberg *et al.*, 1996). Pita DNA yang muncul pada seluruh sampel tersebut sebagai monomorfisme dan yang muncul hanya pada beberapa sampel tetapi pada sampel lain tidak disebut polimorfisme. Polimorfisme di antara individu dalam suatu populasi dapat disebabkan oleh mutasi, migrasi, adaptasi, dan seleksi alam (Vera cruz *et al.*, 1996). Analisis RAPD cocok untuk studi keanekaragaman genetik, hubungan kekerabatan genetik, dan peta genetik karena RAPD dengan mudah mendeteksi adanya perubahan satu basa dalam genom DNA (William *et al.*, 1990).

Metode RAPD sangat baik dipakai untuk identifikasi suatu spesies dan membedakan di antara kospesifik populasi. Metode ini dapat dipakai untuk mengatasi permasalahan di mana sifat morfologis tidak memungkinkan lagi untuk identifikasi (Kambhampati *et al.*, 1992). Analisis RAPD dapat juga dipakai sebagai marker atau

penanda genetik (William *et al.*, 1990; Kambhampati *et al.*, 1992). Analisis keragaman genetik dengan metode RAPD menghasilkan data yang spesifik dan tidak kodominan, di mana homosigot tidak dapat dibedakan dengan heterosigot (Weising *et al.*, 1993; Kambhampati *et al.*, 1992). Metode RAPD banyak dipilih karena secara luas untuk identifikasi berbagai organisme yang meliputi bakteri, tumbuhan tingkat tinggi, vertebrata, dan invertebrata (Willerson *et al.*, 1993).

3.7. Pendekatan taksonomi numerik

Studi pendekatan yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah menerapkan dua jenis metode fenetik multivariat yaitu analisis *cluster* (gugus) dan ordinasi.

Analisis *cluster* (gugus) merupakan sebuah kelas teknik numeris untuk menentukan kelompok-kelompok sampel yang berhubungan (disebut *Operasional Taxonomic Units*= OTU) berdasarkan koefisien persamaan (Sokal and Sneath, 1963). Dengan definisi ini, anggota sebuah *cluster* dihubungkan oleh beberapa jenis hubungan internal dan dipisahkan oleh beberapa hubungan negatif yang sebanding dari semua elemen lain (Williams, 1971). Hasil analisis *cluster* ditampilkan dalam bentuk dendrogram, yaitu diagram pohon dua dimensi yang menggambarkan penggabungan atau pemisahan obyek-obyek dan kelompok-kelompok obyek (Dillon and Goldstein, 1984).

Teknik pengelompokan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode berkelompok bertingkat (*hirarkhi agglomerative method*). Metode ini melakukan serangkaian penggabungan berkelanjutan dari obyek-obyek yang berhubungan, sehingga setiap *cluster* yang diperoleh pada setiap tingkat merupakan gabungan *cluster-cluster* pada tingkat sebelumnya (Williams, 1971; Gnanadesikan, 1977). Kekurangan dalam

analisis *cluster* yang berkaitan dengan fungsi interpretasi pengelompokan adalah tidak diketahuinya peranan dari tiap set karakter yang digunakan dalam pengelompokan (Chandler and Crips, 1998). Salah satu strategi dalam analisis gugus adalah metode rerata aritmatik pasangan kelompok tanpa pembobot atau metode UPGMA. Metode ini dipandang mampu memberikan distorsi terkecil dari matrik similaritas (Sneath and Sokal, 1973; Wolf and Whitkus, 1987) dan paling akurat antara metode jarak, probabilitas dan parsimoni untuk data penetak maupun data polimorfis (Wiens and Servedio, 1998).

Analisis ordinasi merupakan suatu peta obyek-obyek dalam ruang dimensi yang rendah, biasanya dimensi dua atau tiga, dan ada jarak antara poin-poin yang menunjukkan ketidaksamaan antar obyek-obyek tersebut (Abbott *et al.*, 1985; Clarke and Warwick, 1994). Banyak metode ordinasi yang disediakan untuk penggunaan data kategorial biner ataupun data bersifat ganda (*multistate*) termasuk salah satunya *principal component analysis* (PCA).

PCA dikembangkan sebagai sebuah teknik ordinasi untuk mengurangi dimensionalitas data multivariat dengan menghilangkan interkorelasi antar variabel (Broschat, 1979). Menurut Gil dan Cubero (1993) menjelaskan bahwa PCA bermanfaat dalam identifikasi karakter-karakter yang memberi kontribusi sebagian besar pada keragaman total kelompok tumbuhan dengan mengevaluasi besar muatan karakter tumbuhan pada masing-masing komponen pokok.

Penggunaan koefisien similaritas dalam analisis numerik ditujukan untuk mendapatkan rasio antara karakter yang dimiliki bersama dengan total karakter yang dibandingkan. *Simple Matching Coefficient* (S_{sm}) dari Sokal-Michener yang digunakan dalam penelitian ini memiliki perbedaan dengan koefisien similaritas yang lain yang

mempertimbangkan perlunya penggunaan karakter yang tidak muncul bersama-sama (*mismatch negative*) dalam dua OTU yang diperbandingkan (Clifford dan Stephenson, 1975; Sneath dan Sokal, 1973). Koefisien S_{sm} memberikan pembobotan yang seimbang terhadap kehadiran dan ketidakhadiran suatu karakter di dalam OTU.



BAB IV

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan bulan Nopember 2006. Lokasi penelitian dilakukan di dua tempat yaitu jurusan biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga Surabaya untuk penelitian di bidang morfologi dan di jurusan Biologi Institut Teknologi Bandung untuk penelitian di bidang molekuler.

4.1. Bahan penelitian

4.1.1. Bahan penelitian pendekatan morfologi

Bahan utama penelitian ini adalah spesimen segar tanaman jenis-jenis *Annona* yang hidup di Surabaya.

4.1.2. Bahan penelitian pendekatan tehnik RAPD-PCR

Bahan utama penelitian ini adalah (1) daun segar jenis-jenis *Annona*, (2) bahan kimia yang terdiri dari : Dapar I (0,35 M Sorbitol, 0,1m Tris-HCl, 5 mM EDTA), 0,02 M natrium bisulfite, Dapar II [0,2M Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM EDTA(pH 7,5), 2 M NaCl, 2% CTAB], 5% *Sodium N-Lauryl sarcosine*, *Chloroform/Isoamylalcohol* (24:1), 96% etanol, natrium asetat, 70% etanol, TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0), RNase.

4.2. Alat yang dipakai penelitian

4.2.1. Alat penelitian yang digunakan dengan pendekatan morfologi

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : pinset, jarum bertangkai, pisau kecil, gunting, kaca pembesar, jangka sorong, dan mikroskop.

4.2.2. Alat penelitian yang digunakan dengan pendekatan tehnik RAPD-PCR

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : seperangkat alat gelas, pipet mikro, spektrofotometer (Beckman DU-65), Thermocycler (COY), pH meter (Mert Ohm), dan sentrifugasi (Beckman).

4.3. Variabel penelitian

Penelitian ini dilakukan secara deskriptif bukan eksperimental, sehingga variabel yang diamati adalah :

- 1) karakter-karakter morfologi : daun, bunga, buah, batang, akar, dan biji.
- 2) sidik jari DNA.

Replikasi dalam penelitian ini ada dua kelompok yaitu :

- a) Sampel penelitian morfologi, replikasinya ada 3 ulangan untuk tiap satu jenis *Annona* dan lokasi penelitian, penelitian ini dilakukan di jurusan Biologi FMPA Unair.
- b) Sampel penelitian teknik RAPD-PCR, replikasinya ada 2 ulangan untuk tiap satu jenis *Annona* dan lokasi penelitian, penelitian ini dilakukan di laboratorium Genetika Molekuler di jurusan Biologi ITB Bandung.

Dalam penelitian ini spesimen marga *Annona* akan dipersoalkan untuk menaksir variabilitas morfologi dan genetik (RAPD). Variasi morfologi akan ditaksirkan berdasarkan karakter vegetatif dan bunga. Variasi genetik akan diperiksa sidik jari DNA dengan menggunakan RAPD. Analisis ini akan dibandingkan satu dengan lainnya untuk melihat kesesuaian pola, yang diharapkan dapat merefleksikan bentuk baik kekhususan secara morfologi dan genetik.

4.4. Jalan penelitian

4.4.1. Jalan penelitian dengan pendekatan morfologi

Karya taksonomi ini menggunakan metode deskriptif morfologi, yaitu suatu karya penelitian yang datanya diperoleh dengan cara memeriksa sifat-sifat morfologi tumbuhan termaksud tanpa memberikan perlakuan percobaan. Sifat-sifat morfologi yang diperiksa meliputi bagian vegetatif dan generatif. Bagian vegetatif misalnya ciri-ciri ranting, daun penumpu, tangkai daun, dan daun. Dari ciri-ciri vegetatif tersebut diamati masing-masing organ tumbuhan seperti daun, yang diamati adalah bentuk, tekstur, ukuran, dan indumentum. Bagian generatif yang diamati sifat-sifat bunga, buah, dan biji.

Langkah penelitian yang akan dilakukan menurut Rifai (1976), Vogel (1987), dan Sinclair (1955) dengan langkah sebagai berikut :

1. Pemilihan takson dan penentuan ruang lingkup yang akan dikerjakan
2. Pengumpulan bahan penelitian sesuai dengan pendekatan morfologi dan teknik RAPD-PCR yang digunakan.
3. Penelusuran pustaka dan pencatatan nama yang pernah dipublikasikan.

4. Pemeriksaan spesimen yang terkumpul berdasarkan sifat-sifat yang tampak dipilah-pilah dalam satu takson.
5. Pemeriksaan tiap spesimen dalam setiap satuan berdasarkan pendekatan morfologi dilakukan secara teliti dan detil untuk mendapatkan data morfologi.
6. Pengujian sifat-sifat yang dipakai oleh peneliti sebelumnya dan pemeriksaan apakah korelasi yang ada di antara berbagai sifat dapat dikukuhkan atau tidak.
7. Pemeriksaan batasan marga dan jenis sesuai dengan hasil penelitian dan pengujian sifat-sifat baru yang ditemukan.
8. Penentuan hubungan kekerabatan jenis-jenis dalam marga *Annona* dan "outgroup" dengan menggunakan program SPSS 13.

4.4.2. Jalan penelitian dengan pendekatan teknik RAPD - PCR

4.4.2.1. Ekstraksi/ isolasi DNA

- a) Daun segar jenis *Annona sp* sebanyak 100 mg dikoleksi dalam sebuah tabung eppendorf 2 ml dan dibekukan dalam cairan nitrogen.
- b) Sampel digiling sampai menjadi serbuk halus dengan tangkai stainless steel.
- c) Kemudian 300 µl Buffer I (0,35 M Sorbitol, 0,1M Tris-HCl, 5 mM EDTA sampai pH 7,5) dan 0,02 M natrium bisulfite (ditambahkan sebelum dipakai) dan 300 µl Buffer II [0,2M Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM EDTA(pH 7,5), 2 M NaCl, 2% CTAB] ditambahkan pada serbuk daun.
- d) Campuran dikocok dengan sangat kuat selama beberapa detik pada suhu kamar. 120 µl 5% *Sodium N-Lauryl sarcosine* ditambahkan dan campuran dikocok

dengan sangat kuat lagi, lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit. Sesudah didinginkan campuran tersebut selama 5 -10 menit.

- e) Campuran di atas disentrifuga dengan kecepatan 13.000 rpm. Supernatan diekstraksi 2 kali volume dengan *chloroform/isoamylalcohol* (24:1).
- f) Campuran disentrifuga dengan kecepatan maksimum selama 10 menit pada suhu 4°C , menghasilkan dua lapisan dan lapisan atas diambil, sedangkan pada lapisan bawah dibuang dan lapisan atas ditambahkan 800 μl (2 volume 96% etanol, 1/10 volume natrium asetat, pH 5,2). Tabung dibolak balik beberapa kali selama 5 menit pada suhu kamar.
- g) Kemudian disentrifuga dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C dan dihasilkan pelet (DNA). Pelet kemudian dicuci 2 kali dengan etanol p.a dingin dan dikeringanginkan.
- h) Pelet dilarutkan dalam dapar TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0). RNA dihilangkan dengan menambahkan 0,1 volume RNAase A (10 mg/ml) dan sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

4.4.2.2. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Hasil isolasi DNA genom sampel jenis-jenis *Annona* yang telah diisolasi kemudian ditentukan konsentrasinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. Reaksi polimerisasi terdiri dari DNA genome, dNTP, bufer PCR, MgCl_2 , primer, Taq DNA Polimerase dan dH_2O dengan konsentrasi tertentu (Tabel 4.1). Primer yang akan digunakan terdapat pada tabel 4. 2 . Total volume reaksi adalah 25 μl .

Tabel 4.1. Komposisi campuran reaksi PCR untuk sampel DNA marga *Annona*

Bahan	Konsentrasi akhir
DNA	0,255 – 400 ng
dNTP	200 μ M
Bufer PCR 5x	Bufer PCR 1x
MgCl ₂	2 mM
Primer	24 ng
Taq DNA Polimerase	2,5 U
dH ₂ O	sampai volume 25 μ l

Sebelum dimasukkan ke alat *thermocycler* (COY) dilakukan penambahan minyak mineral sebanyak 30 μ l kedalam tabung untuk mencegah penguapan. Siklus reaksi polimerisasi yang digunakan adalah satu kali siklus suhu 94⁰C selama 3 menit dilanjutkan 40 siklus, denaturasi 94⁰C selama 1 menit, penempelan primer 35⁰C selama 1 menit, polimerasi 72⁰C selama 3 menit dilanjutkan satu kali suhu 72⁰C selama 10 menit.

4.4.2.3. Elektroforesis

Hasil amplifikasi dipisahkan dengan menggunakan gel agarose berkonsentrasi 1,2%. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan dapar TAE 1x (40 mM Tris-asetat, 1 mM EDTA pH 8,0) (Sambrook *et al.*, 1989), yang telah ditambah *Ethidium Bromide* dengan konsentrasi akhir 1 ng.ml⁻¹. Hasil amplifikasi sebanyak 20 μ l dielektroforesis. Penanda yang digunakan 1 kb *ladder* (Promega) dipakai sebagai standart berat molekul. Elektroforesis dilakukan pada beda potensial 30 v selama \pm 3,5 jam. Pengamatan pita DNA divisualisasi pada UV *transiluminator*. Dokumentasi dilakukan dengan film Polaroid 667. Untuk memudahkan analisis semua pita DNA diplotkan pada plastik

transparan, kemudian dilakukan analisis pada hasil plot pada plastik transparan dan hasil foto.

Tabel 4.2. Daftar primer yang akan digunakan untuk amplifikasi DNA marga *Annona*

No	Primers	Urutan Basa
1	OPA-18	5'-AGG TGA CCG T-3'
2	Q-12	5'-AGT AGG GCA C-3'
3	OPP-12	5'-AA GGG CGA GT-3'
4	OPP-15	5'-TG GCG TCC TT-3'
5	OPP-4	5'-GT GTC TCA GG-3'
6	D-01	5'-ACC GCG AAG G-3'
7	E7	5'-AGA TGC AGC C-3'
8	E19	5'-ACG GCG TAT G-3'
9	F2	5'-GAG GAT CCC T-3'

4.4.2.4. Perhitungan ukuran hasil amplifikasi pita DNA

Berat fragmen DNA hasil polimerasi dihitung berdasarkan jarak migrasi dibandingkan dengan DNA standart (1 kb *ladder*). Jarak migrasi DNA standar 1 kb *ladder* diukur dari sumuran sampai tempat migrasi DNA pada gel. Ukuran fragmen DNA standar dibuat logaritmanya dan dipakai sebagai sumbu y, sedang jarak migrasi DNA standar terukur dipakai sebagai sumbu x. Ukuran pita-pita DNA hasil polimerisasi ditentukan berdasarkan persamaan garis tersebut.

4.4.2.5. Koefisien kesamaan

Semua pita-pita DNA hasil polimerisasi sepanjang masih bisa dideteksi dinilai berdasarkan ada tidaknya fragmen yang terbentuk. Pita-pita yang dihasilkan pada setiap isolat dari hasil polimerisasi dan elektroforesis pada agarose diberi nilai, dengan indikasi

kalau ada pita diberi nilai 1 dan bila tidak ada pita diberi nilai 0. Data yang diperoleh dianalisis dengan program SPSS 10.

4.5. Analisis data

Untuk menjawab permasalahan dan tujuan penelitian, maka data yang telah diperoleh dari pendekatan morfologi dan tehnik RAPD-PCR dianalisis dengan metode gugus dan ordinasi melalui program SPSS 10.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Keanekaragaman dan kekerabatan *Annona muricata*, *A. squamosa* dan *A. reticulata* dengan pendekatan morfologi

Karakter OTUS yang diamati dalam pendekatan morfologi meliputi empat kelompok, yaitu kebiasaan tumbuh, batang, daun, dan bunga. Untuk masing-masing karakter dapat dilihat pada lampiran 1. Pada saat pengambilan sampel untuk *Annona reticulata* mendapatkan kendala yaitu hanya didapatkan satu jenis sampel di lokasi Surabaya, hal ini menunjukkan mulai sulit ditemukan atau dengan kata lain mulai langka. Sedangkan pada sampel untuk *A. muricata* dan *A. squamosa* tidak ada kendala.

Hasil pengamatan morfologi pada sampel dapat dilihat di lampiran 1. Pengamatan sifat karakter kebiasaan tumbuh pada ketiga spesies tidak bervariasi banyak. Pada pengamatan sifat karakter batang di ketiga spesies *Annona* sangat bervariasi, sedang pengamatan sifat karakter daun dan bunga juga sangat bervariasi.

Data numerik yang dihasilkan pada tabel 5.1. dihitung koefisien kesamaannya menggunakan koefisien kesamaan "Simple Matching". Koefisien kesamaan (C_{μ}) memiliki nilai yaitu , $0,00 \leq C_{\mu} \leq 1,00$, dengan pengertian bahwa nilai kesamaan mendekati angka 1,00 menunjukkan kedua objek yang dibandingkan semakin identik atau sama, dan nilai kesamaan mendekati angka 0,00 menunjukkan bahwa kedua objek yang dibandingkan semakin tidak identik atau tidak sama. Koefisien kesamaan "Simple Matching" memperhitungkan kehadiran dan ketidakhadiran larik pada dua objek yang dibandingkan (Marmey *et. al.*, 1994).

Tabel 5.1. Analisis data numerik karakter OTUS pada *Annona muricata*, *A. squamosa* dan *A. reticulata*

No.	Karakter	Jenis tanaman <i>Annona</i>							Keterangan
		1	2	3	4	5	6	7	
Kebiasaan tumbuh									
1	Habitus	2	1	2	1	1	1	2	1=pohon kecil 2=pohon sedang 3=pohon tinggi
2	Tinggi	2	1	2	1	1	1	2	1=2-3m 2=3-4m 3=4-5m 4=5-6m
3	Kerapatan daun	2	1	0	2	1	0	1	0=jarang 1=sedang 2=rindang 3=sangat rindang
4	Arah tumbuh batang	1	1	1	1	1	1	1	0=rebah 1=legak
Batang									
1	Jumlah percabangan	2	3	2	1	3	3	0	0= <30 1= 30-40 2= 41-51 3= ≥51
2	Permukaan	1	1	1	1	1	1	1	0= halus 1= beralur
3	Panjang lingkaran batang	4	2	2	3	2	1	4	1=<20cm 2=20-25cm 3=25<x≤30cm 4=>30cm
4	Warna batang	1	1	1	1	1	1	2	1=coklat tua 2=coklat muda
5	Arah pertumbuhan cabang	1	3	3	1	2	2	2	1=30-45° 2=45° 3=45-90°
6	Tinggi bekas cabang pertama	3	1	2	2	2	1	1	1=6-13cm 2=14-19cm 3=20-23cm
Daun									
1	Leaf attitude	1	1	1	1	1	1	1	0=melengkung 1=tegak
2	Posisi daun pada ranting	3	2	2	1	2	2	3	1=30-45° 3=45° 3=45-60°
3	Rambut pada permukaan daun	0	0	0	0	0	0	1	0=tidak berambut 1=berambut
4	Warna permukaan atas	2	2	2	3	3	3	2	1=hijau 2=hijau tua cerah 3=hijau tua gelap
5	Warna permukaan bawah	1	1	1	2	2	2	3	1=hijau pupus 2=hijau kelabu 3=hijau
6	Bangun daun	1	3	2	3	3	2	4	1=bulat telur terbalik 2=jorong 3=memanjang 4=lanset
7	Tepi daun	0	0	0	0	0	0	0	0=tidak bertoreh/rata 1=bertoreh
8	Ujung daun	1	1	1	2	1	2	3	1=acuminate 2=acute 3=attenuate
9	Pangkal daun	1	1	1	1	1	1	1	1=tumpul 2=meruncing
10	Panjang daun	3	4	3	3	2	1	5	1=6-7cm 2=8-9cm 3=9-11cm 4=11-12cm 5=14-16cm
11	Lebar daun	1	2	2	1	1	1	2	1=2,5-3cm 2=3-4,8cm
12	Urut daun permukaan atas	1	1	1	1	1	1	1	0=tidak jelas 1=jelas
13	Tulang daun permukaan bawah	1	1	1	1	1	1	1	0=tidak menonjol 1=menonjol
14	Pola venasi	1	1	1	3	3	3	2	1=agak jauh dari tepi 2=dekat tepi 3=hampir dekat tepi
15	Daging daun	2	2	2	1	1	1	1	1=tipis lunak 2=tipis kertas
16	Keadaan permukaan daun	1	1	1	0	0	0	0	0=gundul 1=licin
17	Rumus daun	1	1	1	1	1	1	1	1=½ 2=selain ½
18	Kontur permukaan	0	0	0	1	1	1	1	0=tidak berkerut 1=berkerut
Bunga									
1	Bentuk	1	1	1	2	2	2	2	1=seperti katup kubah 2=katup memanjang
2	Bentuk sepal	1	1	1	1	1	1	1	0=melingkar 1=segitiga
3	Warna sepal	0	0	0	0	0	0	0	0=hijau 1=selain hijau
4	Jumlah sepal	0	0	0	0	0	0	0	0=tiga 1=lebih dari tiga
5	Bentuk petal	2	2	2	1	1	1	1	1=segitiga 2=jantung
6	Susunan petal	2	2	2	1	1	1	1	1=sejajar 2=seperti genting
7	Warna petal	3	3	3	1	1	1	2	0=hijau 1=hijau kekuningan 2=kuning kehijauan 3=kuning
8	Jumlah petal	2	2	2	1	1	1	1	1=tiga 2=enam
9	Tebal petal	1	1	1	1	1	1	2	1=0,14-0,2cm 2=2-2,8cm
10	Lebar petal	2	2	2	1	1	1	1	1=0,4-0,61cm 2=1,8-2,7cm
11	Tinggi petal	2	2	2	1	2	1	2	1=1,6-1,8cm 2=2,1-2,2cm
12	Panjang stamen	4	4	3	2	1	2	3	1=1,02-1,05mm 2=1,13-1,26mm 3=1,36-1,44 mm
13	Warna stamen	1	1	1	1	1	1	1	0=putih 1=krem
14	Permukaan pistillum	1	1	1	1	1	1	1	0=tidak lengket 2=lengket
15	Warna pistillum	0	0	0	1	1	1	1	0=putih 1=krem 2=krem kecoklatan
16	Jumlah ruang ovarium	0	0	0	0	0	0	0	0=satu 1=lebih dari satu
17	Kedudukan ovarium	2	2	2	2	2	2	2	1=inferus 2=superus

Keterangan:

1. *Annona muricata* 1
2. *Annona muricata* 2
3. *Annona muricata* 3
4. *Annona squamosa* 1
5. *Annona squamosa* 2
6. *Annona squamosa* 3
7. *Annona reticulata*

Perhitungan koefisien kesamaan "Simple Matching" dalam data numerik ditunjukkan pada tabel 5.2.. Data numerik kelompok ini diterjemahkan dari 45 karakter (OTUS) Koefisien kesamaan tertinggi dengan nilai 0,860 dimiliki oleh *A. squamosa* 2 dan *A. squamosa* 3, artinya bahwa masing-masing jenis mempunyai sifat yang kemiripannya banyak. Koefisien kesamaan dengan nilai 0,796 dan 0,653 dimiliki oleh *A. squamosa* 1 dan *A. squamosa*2; *A. squamosa*1 dan *A. squamosa* 3, yang artinya masing-masing jenis mempunyai kemiripan relatif banyak. Koefisien kesamaan *A. muricata* berturut-turut dengan nilai 0,908; 0,795; dan 0,744 dimiliki oleh *A. muricata* 2 dan *A. muricata*3; *A. muricata* 1 dan *A. muricata* 3; *A. muricata* 1 dan *A. muricata* 2, yang artinya masing-masing jenis mempunyai sifat yang kemiripannya banyak.

Tabel 5.2. Matriks Koefisien Kesamaan "Simple Matching" Dengan Berbagai Karakter Pada Tanaman *Annona muricata*, *A. squamosa*, dan *A. reticulata*

Case Processing Summary

Cases					
Valid		Missing		Total	
N	Percent	N	Percent	N	Percent
45	100.0%	0	.0%	45	100.0%

Proximity Matrix

	Correlation between Vectors of Values						
	AM1	AM2	AM3	AS1	AS2	AS3	AR
AM1		.744	.795	.524	.430	.324	.539
AM2	.744		.908	.505	.550	.505	.591
AM3	.795	.908		.437	.516	.487	.562
AS1	.524	.505	.437		.796	.653	.761
AS2	.430	.550	.516	.796		.860	.560
AS3	.324	.505	.487	.653	.860		.457
AR	.539	.591	.562	.761	.560	.457	

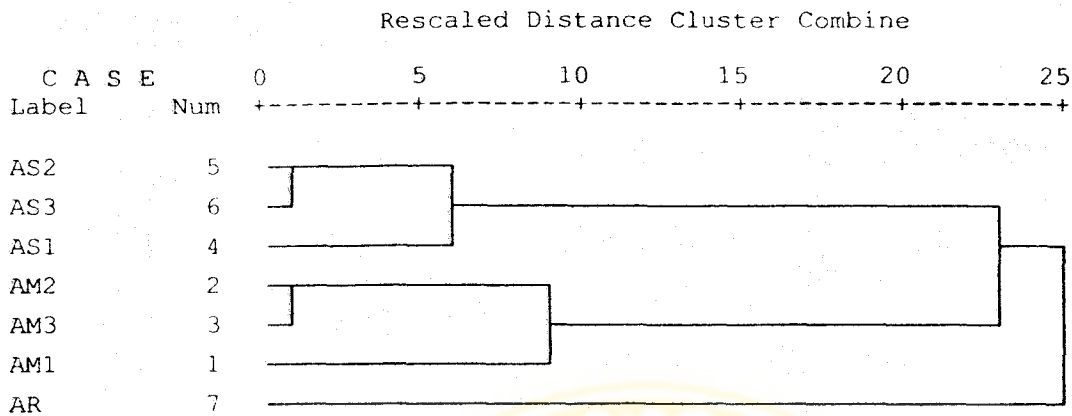
This is a similarity matrix

Berdasarkan data tersebut di atas maka dilakukan analisis kluster dengan program SPSS dan dihasilkan dendrogram yang ditunjukkan pada gambar 5.1.

Dendrogram

* * * * * H I E R A R C H I C A L C L U S T E R A N A L Y S I S * * * * *

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

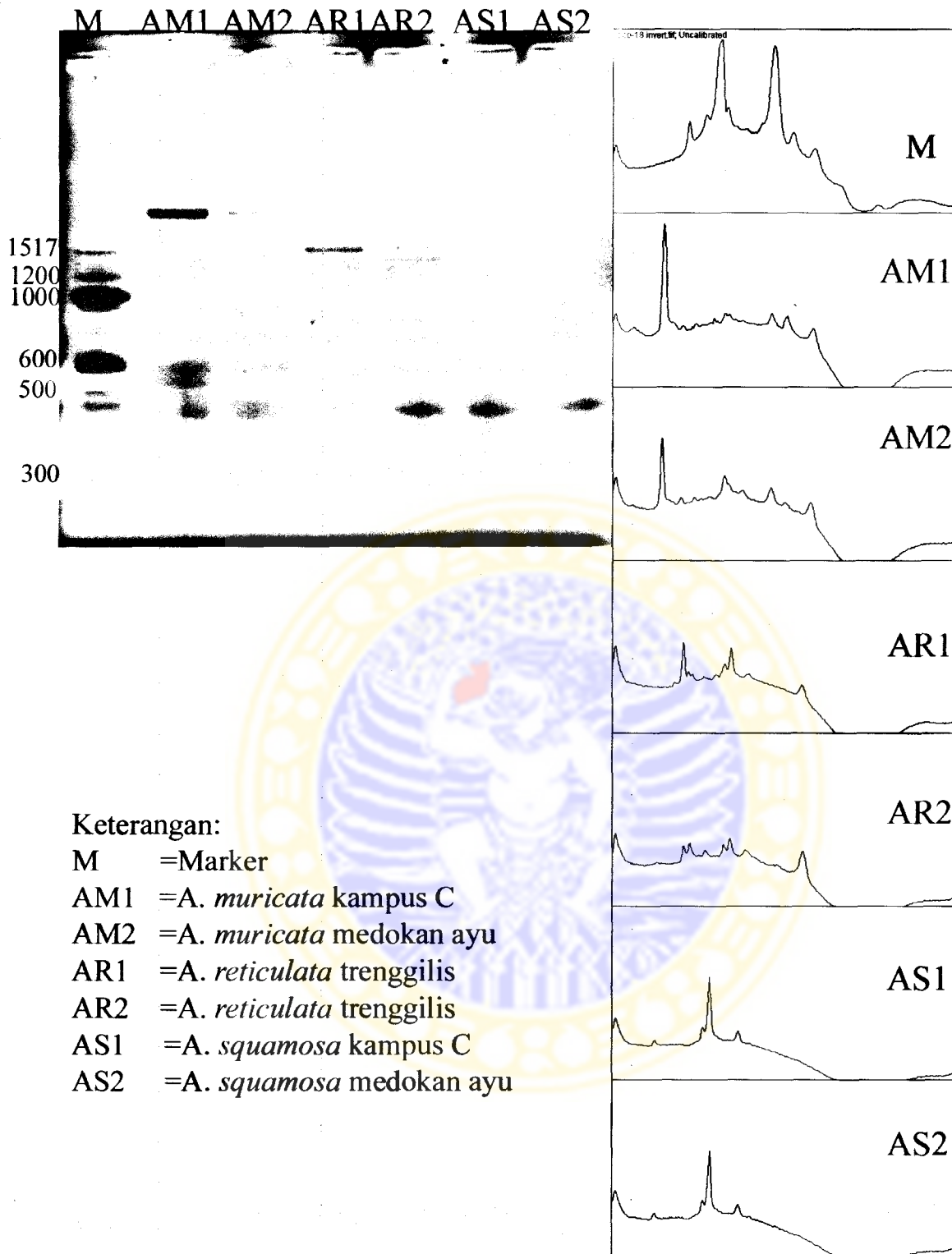


Gambar 5.1. Dendrogram hasil analisis karakter morfologi marga *Annona*

Dari dendrogram tersebut dapat dijelaskan bahwa *A. squamosa* mempunyai kekerabatan yang lebih dekat dengan *A. muricata*, dan bila dibandingkan dengan *A. reticulata*. Variasi-variasi yang terjadi merupakan variasi fenotip, karena masing-masing spesies mempunyai nilai koefisien kesamaan lebih dari 60 % yang artinya bahwa variasi tersebut tidak menyebabkan sampai terjadinya spesies baru (Singh, 1999).

5.2. Keanekaragaman dan kekerabatan *Annona muricata*, *A. squamosa* dan *A. reticulata* dengan pendekatan molekuler

Amplifikasi DNA yang telah dilakukan menggunakan sembilan primer yaitu OPA-18, Q-12, OPP-12, OPP -15, OPP-4, D-01, E-7, E-19, dan F-2. Dari kesembilan primer yang menghasilkan hasil amplifikasi yang baik adalah primer OPA-18, Q-12, OPP-12, OPP -15, dan OPP-4 (gambar 5.2 - 5.6). Hasil amplifikasi DNA dengan lima primer tersebut menghasilkan 31 pola larik dengan ukuran molekul berkisar antara 300 - > 1517 pb.



Keterangan:

- M =Marker
- AM1 =*A. muricata* kampus C
- AM2 =*A. muricata* medokan ayu
- AR1 =*A. reticulata* trenggilis
- AR2 =*A. reticulata* trenggilis
- AS1 =*A. squamosa* kampus C
- AS2 =*A. squamosa* medokan ayu

Gambar 5.2. Hasil Amplifikasi DNA *Annona muricata*, *A. squamosa*, dan *A. reticulata* oleh primer OPO-18

penggunaan lebih banyak primer sangat dianjurkan. Meskipun demikian lima primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA pada penelitian ini berhasil memberikan pola larik yang dapat digunakan sebagai karakter dalam analisis hubungan kekerabatan genetik pada tiga spesies *Annona* yang dapat digunakan untuk penelitian kekerabatan pada anggota genus *Annona* lainnya





BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat dirumuskan kesimpulan sebagai berikut.

- (1). Keanekaragaman genetik plasma nutfah marga *Annona* ada perbedaan variasi- variasi morfologi..
- (2). Variasi morfologi yang terjadi pada masing-masing spesies (jenis) *Annona muricata* dan *Annona squamosa* merupakan variasi fenotip dan bukan variasi genotip, sehingga tidak menyebabkan terjadinya jenis (spesies) yang berbeda.
- (3) Analisis pengelompokan hubungan kekerabatan spesies *A. muricata*, *Annona squamosa* dan *Annona reticulata* adalah kekerabatan antara *Annona squamosa* lebih dekat dengan *Annona reticulata* bila dibanding dengan kekerabatan antara *Annona squamosa* dan *Annona muricata*. Kekerabatan antara *Annona muricata* dengan *Annona reticulata* lebih jauh dibanding dengan kekerabatan antara *Annona squamosa* dan *Annona reticulata*.

6.2. Saran

- (1) Perlu dilakukan peningkatan ketelitian dalam menentukan nilai karakter (OTUS).



DAFTAR PUSTAKA

- Abbott, L.A., Bisby, F.A. and Rogers, D.J., 1985, *Taxonomy Analysis in Biology : Computers, Models, and Databases*. Columbia University Press, New York.
- Adams R.P., T. Demeke.. 1993, Systematics Relationship in *Juniperus* based on Random Amplified Polymorfihic DNAs(RAPDs). *Taxon Volume 42*.
- Barbour, G.M., J.H. Burk, D. Pitts, 1987, *Terrestrial Plant Ecology*, The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc, California.
- Bridg , H., 2005, Citing Computer References, <http://www.google.com/DNA> *Annona* : Micropropagation and determination of the in vitro stability of *Annona cherimola* Mill and *Annona muricata*.L. (Access 23 Januari 2005).
- Broschat, T.K., 1979, Pricipal Component Analysis in Horticultural Research. *Hort.Science* 14(2): 114-117.
- Clarke, K.C. and Warwick, R.M., 1994, Change in Marine Communities : *An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*, Plymouth Marine Laboratory., UK.
- Clifford, H.T. and Stephenson, W., 1975, *An Introduction of Numerical Classification*, Academic Press, New York, p : 49-82.
- Davis, I.H and Heywood, V.H., 1963, *Principles of Angiosperm Taxonomy*, Robert E. Krienger Publishing Company Huntington, New York.
- Demeke, T and R.P. Adams, 1994, The Use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution, p: 179-191.
- Dillon, W.R. and Goldstein, M., 1984, *Multivariate Analysis : Method and Applications*, John Wiley & Sons, New York.
- Endo, Y.K., Mitsui, M., Motizuki, and Tsurugi, 1987, The mechanism of action of ricin and related toxic lectin on eukaryotic ribosome. The site and the charactertic of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins, *J.Biol.Chem*, 262: p: 5908-5912.
- Galvis, L.A., Saez, J., Granados, H., Salazar,A., Ossa, J.E., 1999, Antitumor and Antiviral activity of Colombian Medicinal Plant Extracts, *Mem Inst Oswaldo Crus*, 94(4) : 531-535.
- Gil, J. and Cubero, J.I., 1993, Multivariate Analysis of The *Vicia sativa* L. Aggregate. *Botanical Journal of Linnaean Society*, 113 :389-400.

- Gnanadesikan, R., 1977, *Method of Statistical Data Analysis of Multivariate Observation*, John Wiley & Sons, New York.
- Hamidah, M. Noer, dan Rosmanida (2001). Eksplorasi dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Suku Annonaceae Terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti*, Laporan Penelitian Diks Suplemen, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.
- Harris, D.S., 1995, Systematic and Random Amplified Polymorphic DNA in the Genus *Leucaena* (Leguminosae, Mimosideae) Pl. Sys. Vol. 197:195-208.
- Haymer, D.S., 1995, Genetic analysis of laboratory and wild strain of the melon fly (Diptera : Teptidse) using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction, *Ann Entomol Soc* 88 (S) pp: 531-536.
- Heyne, 1950, *De Nuttige Planten van Indonesie*. N.V.Uitgeverij van Gravenhage, Bandung.
- Kambhampati, S., Black, I.V., W.C., and Rai, K.S., 1992, Random-amplified polymorphic DNA of mosquito species and population, (Diptera : Culicidae) techniques , statistica analysis and application, *J. Met Entomol.* 29 : 929-945.
- Lord, J.M., Hartley, M.R., and Robert, 1991, Ribosome inactivating protein in plants, *Sem.Cell.Biol.* 2: 15-22
- Marmey, P., J.R. Beeching, S. Hamon, A. Charrier, 1994. Evaluation of Cassava (*Manihot esculenta* Crant) germplasm collections using RAPD markers. *Euphytica* 74: 203-209
- Passarge, E., 1994, *Color Atlas of Genetic*, Thieme, p : 156-160.
- Pramono, S., 1988, Identifikasi Kandungan Kimia Tanaman Obat Melalui Pendekatan Kemotaksonomi *Kaempheria galanga*. Laporan Penelitian PPOT-LIT-UGM. Hal 1, 15 -16.
- Ridley, M., 1991, *Masalah-Masalah Evolusi*, Gadjah Mada Univ. Press. Yogyakarta.
- Rifai, M.A. 1976. *Sendi-Sendi Botani Sistemika*. Lembaga Biologi Nasional-LIPI. Bogor.
- Royero, N., Jimenez, A.V., Gallego, G., Saavedra, R., Cabra, J., Tohme, J. , 2004, Citing Computer References, <http://www.google.com/DNA> *Annona* : Molecular and Agromorphological Characterization of the Genetic Variability of Soursop (*Annona muricata* L) Accession and related Annonaceus Species (Access 23 Januari 2005).

- Sinclair J. 1955. *A Revision of the Malayan Annonaceae*, *The Gardens' Bulletin* vol XIV, Printed at the government printing office, Singapore.
- Singh, G., 1999, *Plant Systematics*, Science Publishers Inc., USA. p : 1, 181-187.
- Sismindari, Husaana, A., Mubarika, S., 1998, Pemotongan DNA superkoil oleh ekstran *Annona squamosa* L. Secara in vitro, *Majalah Farmasi Indonesia*, 9 : 146-152.
- Sismindari, Mubarika, S., , and Sudjadi, 2001, Selective cytotoxic effects on cancer-lines of protein fraction isolated from *Annona squamosa* and Containing ribosom-inactivating proteins, *Indon.J.Biotech*: 459-463.
- Sneath, P.H. and Sokal, R.R., 1973, *Numerical Taxonomy*, W.H. Freeman Company, San Francisco. pp : 11, 201-259.
- Sofro, A.S.M., 1991, Keanekaragaman Genetik. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sokal, R.R. and Sneath, P.H.A., 1963, *Principles of Numerical Taxonomy*, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Stace, C.A., 1989, *Plant Taxonomy and Biosystematics*, Edward Arnold, London, p : 5-6, 86-98.
- Stermitz., F.R., Harris, G.H. Hugglind, K.M., and Wright, L.A., 1990, Pyrrolizidine Alkaloids from *Catsetum macualatum* Flowers. *Lindleyana* 5 (3) : 158-159.
- Sudjadi , 2004, Pemurnian Ribosome Inactivating Protein (RIP) Biji *Annona squamosa* dengan Kolum CM-Sepharose CL-6B, *Berkala Ilmiah Biologi*, UGM, 3(3) : 181-190.
- Vera cruz, C.M., Andales, E.Y., Skinner, D.Z., Talog, J., Nelson, R.J., Louws, F.J., Leung, H., Mew, T.W. and Learch, J.E., 1996, Measurement of haplotypic variation in X. *Oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses, *Phytopathology* , (86): 1352-1359.
- Virk, P.S., Newbury, M.T., Jackson, and B.V. Ford Liord, 1995, The identification of duplicate accesions wihtin a rice germplasm collection using RAPD analysis, *Theor Appl. Genet.* 90 : 1049-1055.
- Vogel, E.F. de. 1987. Guideline for the preparation of revision. In Vogel (ed) *Manual Herbarium Taxonomy Theory anf Practice*. UNESCO. Jakarta.pp : 76.
- Watson, L and Dalwitz, M.J.1992, *The Families of Flowering Plants : Descriptions, Illustrations, Identification and Information Retrieval*, version 19th August 1999, <http://www.biodiversity.uno.edu/delta/angio/www/annonace.htm>.

- Weising, K., Nybom, H., and Meyer, W., 1993, DNA Fingerprinting in Plant and Fungi, CRC Press., Florida. pp : 322
- Wiens, J.J. and Servedio, M.R., 1998, Phylogenetic Analysis and Intraspecific Variation : Performance of Parsimony, Likelihood and Distance Methodes, *Syst.Biol*, 47(2): 228-253.
- Willerson, R.C., Person, T.J., Albright, D.G. and Broun, M.J., 1993, Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) marker readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera : Culicidae : Anopheles), *Insect. Mol. Biol*, 1 (4) : 205-221 .
- William, J.G.K., Hanafey, M.K. Rafaski, J.A. and Tingen, S.V., 1993, Genetic analysis using random amplified polymorphic markers, *Method Enzymol*, 728 : 704-740.
- William, J.G.K, Kublik, A.R., Livak, K.J., Rafaski, J.A. and Tingen, S.V., 1990, DNA polymorphism amplified by arbitrary primers the useful as genetic marker, *Nucl.Acid. Res.* 22(18) : 6531-6535.
- Williams, W.T., 1971, *Principles of clustering, Annual Review of Ecology and Systematic* 2 : 303-326
- Wolf , S.J.. and Whitkus, R., 1987, A Numerical Analysis of Flavonoid variation in *Arnica* subgenus *Austromontana* (Asteraceae). *Amer.J.Bot.* 74(10): 1577-1584.
- Wu, F.E., Zhao, g.X, Zeng, l., Zhang, Y., Schawedler, J.T., Mclaghlin, J.L., and Sastrodihardjo, S., 1995, Additional bioactive acetogenins, annomutacion and (2,4-trans and cis) 10r-annonacin-a-one, from the leaves of *Annona muricata*, *Journal of Natural Products*, 58 : 1430-1437.
- Zeng, L. Wu, F.E., Oberlies, N.H. Mclaughlin, J.L., and Sastrodihardjo, S. 1996, Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from the leaf of *Annona muricata* (Annonaceae), *Journal of Natural Products* 59: 1035-1042.
- Zhang, Y.H., Peng,H.Y., Xia, G.H., Wang, M.Y., and Han, Y., 2004, Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* L., *Acta Pharmacol.Sin*, 25(7): 937-942.

LAMPIRAN 1 Karakter Morfologi tanaman *Annona* di Surabaya

No.	Karakter	Jenis Tanaman		
		<i>Annona squamosa</i>	<i>Annona reticulata</i>	<i>Annona muricata</i>
Kebiasaaan Tumbuh				
1.	Arah pertmbhn batang	Tegak	Tegak	Tegak
2.	Kerapatan daun	Rindang	Sedang	Rindang
3.	Habitus	Pohon	Pohon	Pohon
4.	Tinggi	2-3 m	3-4 m	3,5 m
Batang				
1.	Jumlah percabangan	37	13	49
2.	Jumlah lenti sel per cm ²	13	Tak terhitung	14
3.	Permukaan	Beralur	Berbingkul	Beralur
4.	Lingkar batang	26,5 cm	55,5 cm	51 cm
5.	Warna batang	Coklat tua	Coklat muda	Coklat tua
6.	Arah pertmbhn cabang	30-45°	45°	30-45°
7.	Tinggi bekas cab. pertama	15 cm	6 cm	28 cm
Daun				
1.	Leaf attitude	Tegak	Tegak	Tegak
2.	Posisi daun pada ranting	30-45°	60°	45-60°
3.	Rambut pada tulang daun	-	Ada	-
4.	Rambut pada urat daun	-	Ada	-
5.	Rambut pada permukaan daun	-	Ada	-
6.	Kepadatan rambut	-	Hirsutulous	-
7.	Permukaan atas	Hijau tua gelap	Hijau tua cerah	Hijau tua cerah
8.	Permukaan bawah	Hijau kelabu	Hijau	Hijau pupus
9.	Bangun daun	Memanjang	Lanset	Bulat telur terblk
10.	Tepi daun	Rata	Rata	Rata
11.	Ujung daun	Acute	Attenuate	Acuminate
12.	Pangkal daun	Tumpul	Tumpul	Tumpul
13.	Panjang daun	9-11 cm	14-16 cm	9-10 cm
14.	Lebar daun	3-4 cm	3-4,7 cm	3-4 cm
15.	Urat daun permk. atas	Jelas	Jelas	Jelas
16.	Tulang daun permukaan bawah	menonjol	Menonjol	menonjol
17.	Pola venasi	Persambungan tlng daun dgn atasnya sangat dekat ke tepi	Persambungan tlng daun dgn atasnya dekat ke tepi	Persambungan tlng daun dgn atasnya agak dekat ke tepi
18.	Daging daun	Tipis lunak	Tipis lunak	Seperti kertas
19.	Keadaan permk daun	Gundul	Gundul	Licin mengkilat

No.	Karakter	Jenis tanaman		
		<i>Annona squamosa</i>	<i>Annona reticulata</i>	<i>Annona muricata</i>
20.	Rumus daun	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
21.	Kontur permkn	berkerut	Berkerut	Tidak berkerut
Bunga				
1.	Bentuk bunga	Seperti katup memanjang	Seperti katup memanjang	Seperti katup
2.	Bentuk sepal	Segitiga	Segitiga	Segitiga
3.	Warna sepal	Hijau	Hijau	Hijau
4.	Jumlah sepal	3	3	3
5.	Bentuk petal	Segitiga	Segitiga	Jantung
6.	Susunan petal	Sajajar dalam 1 lingkaran	Sejajar dalam 1 lingkaran	Seperti genting
7.	Warna petal	Hijau kekuningan	Kuning kehijauan	Kuning
8.	Jumlah petal	3	3	6
9.	Tebal petal	0.14;0.18;0.18	0.29;0.28;0.29	0.3;0.335;0.345 0.27;0.245;0.27
10.	Lebar petal	0.52;0.53;0.42	0.503;0.535;0.51	2.27;2.76;2.45 1.855;2.2;1.9
11.	Tinggi petal	1.875;1.8;1.78	1.885;2.02;1.97	2.85;2.875;2.61 2.2;2.44;2.1
12.	Panjang stamen	1,18-1,26 mm	1,31-1,4	3-4 mm
13.	Warna stamen	Krem	Krem	Putih
14.	Permukaan pistillum	Lengket	Lengket	Lengket
15.	Warna pistillum	Krem	Krem	Putih
16.	Jumlah ruang ovarium	1	1	1
17.	Kedudukan bakal buah	Superus	Superus	Superus

LAMPIRAN 2

**MATRIK DATA NUMERIK INTERPRETASI LARIK DNA HASIL RAPD
DENGAN PRIMER OPO-18, OPO-15, OPP-4, OPP-12, DAN Q-12**

Primer-ukuran larik (pb)	Am1	Am2	Ar1	Ar2	As1	As2
OPO-18 > 1517	1	1	0	0	0	0
OPO-18 - 1517	0	0	1	1	0	0
OPO-18 - 900	1	1	1	1	1	1
OPO-18 - 800	0	0	1	1	1	1
OPO-18 - 700	1	1	1	1	1	1
OPO-18 - 500	1	1	0	0	0	0
OPO-18 - 400	1	1	0	0	0	0
OPO-18 - 300	1	1	1	1	1	1

Primer-ukuran larik (pb)	Am1	Am2	Ar1	Ar2	As1	As2
OPP-4 - >1517	1	1	0	0	0	0
OPP-4 - 1350	1	1	1	1	1	1
OPP-4 - 1200	1	1	0	0	0	0
OPP-4 - 1000	1	1	0	0	0	0
OPP-4 - 800	0	0	1	1	1	1
OPP-4 - 700	1	1	1	1	1	1

Primer-ukuran larik (pb)	Am1	Am2	Ar1	Ar2	As1	As2
OPP-12 - > 1517	1	1	0	0	0	0
OPP-12 - 1350	1	1	0	0	0	0
OPP-12 - 1200	1	1	1	1	1	1
OPP-12 - 1000	1	1	1	1	1	1
OPP-12 - 850	1	1	0	0	0	0
OPP-12 - 600	0	0	1	1	1	1

Primer-ukuran larik (pb)	Am1	Am2	Ar1	Ar2	As1	As2
OPO-15 - 1000	1	1	1	1	1	1
OPO-15 - 900	0	0	1	1	1	1
OPO-15 - 800	0	0	1	1	1	1
OPO-15 - 700	1	1	0	0	0	0
OPO-15 - 500	0	0	1	1	1	1

Primer-ukuran larik (pb)	Am1	Am2	Ar1	Ar2	As1	As2
Q - 12 - 1200	1	1	0	0	0	0
Q - 12 - 1000	1	1	0	0	1	1
Q - 12 - 800	1	1	1	1	1	1
Q - 12 - 700	0	0	0	0	1	1
Q - 12 - 600	0	0	1	1	1	1
Q - 12 - 500	1	1	1	1	1	1

Lampiran 3 Abstrak skripsi mahasiswa

Endah Prayekti, 2006. Analisis Kekerabatan *Annona muricata*, *Annona squamosa*, dan *Annona reticulata* dengan Menggunakan Pendekatan Morfologi. Skripsi di bawah bimbingan Dra. Hamidah M.Kes. dan Tri Nurhariyati S.Si., M.Kes., Jurusan Biologi Fakultas Matematika, dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Dengan menggunakan morfologi, ingin diketahui kekerabatan serta keanekaragamannya antara *Annona muricata*, *Annona squamosa*, dan *Annona reticulata*. Untuk mengetahui kekerabatannya, penelitian dilakukan dengan mengambil data-data morfologi yang dimiliki, yaitu dari daun, batang dan bunga dari ketiga jenis tanaman sedangkan untuk mengetahui keanekaragamannya dilakukan tiga kali ulangan untuk tiap spesies kecuali *Annona reticulata* yang mulai sulit dijumpai. Kekerabatan makin dekat bila semakin banyak persamaan yang ditunjukkan (Futuyma, 1998). Hasil analisis dengan menggunakan *simple matching* SPSS 10, didapatkan dendrogram yang menggambarkan hubungan kekerabatan dan keanekaragaman dari ketiga spesies yang diteliti. Dari dendrogram diketahui bahwa kekerabatan antara *Annona squamosa* lebih dekat dengan *Annona muricata* bila dibandingkan dengan kekerabatan antara *Annona squamosa* dan *Annona reticulata* atau antara *Annona muricata* dan *Annona reticulata*. Dalam keanekaragaman, dijumpai adanya variasi dalam tiap kelompok yaitu pada kelompok *Annona muricata* dan *Annona squamosa*.

Kata kunci: Kekerabatan, Morfologi, Dendrogram

Navy Husnul Chotimah, 2006. Analisis Keragaman Tanaman Sirsak (*Annona muricata*) melalui pendekatan morfologi. Skripsi dibawah bimbingan Dra. Hamidah, M. Kes dan Drs. Abdul Latif Burhan, M.S., Jurusan Biologi Fakultas Matematika, dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman tanaman sirsak (*Annona muricata*) melalui pendekatan morfologi, yang turut pula diukur faktor lingkungan. Pengambilan sampel dilakukan di Surabaya, Pandaan, dan Purwodadi dengan bagian tumbuhan yang diamati adalah daun, batang, dan bunga. Selanjutnya data yang diperoleh disusun dalam matrik Satuan Taksonomi Operasional (STO) vs karakter dan dianalisis menggunakan korelasi Pearson dalam program SPSS 10. Hasil analisis menunjukkan bahwa sampel yang diambil dari Pandaan dan Purwodadi memiliki variasi keragaman morfologi yang lebih mirip dari pada di Surabaya, hal ini berkaitan dengan lokasi ketinggian Pandaan dan Purwodadi yang tidak terlalu jauh serta kemiripan faktor lingkungan, seperti temperatur, kelembaban, dan pH tanah.

Kata kunci : Keragaman, Morfologi, Lingkungan