

BATASAN JENIS *Costus afer* dan *Costus
lucanusianus* BERDASARKAN SEKUEN
INTERNAL TRANSCRIBED SPACER

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagai Syarat Guna
Memperoleh Gelar Sarjana Sains dalam Ilmu Biologi



Oleh : **Rifqinur Mahmudah**

NIM: 1808016028

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI UNIVERSITAS
ISLAM NEGERI WALISONGO SEMARANG

2021

BATASAN JENIS *Costus afer* dan *Costus
lucanusianus* BERDASARKAN SEKUEN
INTERNAL TRANSCRIBED SPACER

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagai Syarat Guna
Memperoleh Gelar Sarjana Sains dalam Ilmu Biologi



Oleh : **Rifqinur Mahmudah**

NIM: 1808016028

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI UNIVERSITAS ISLAM
NEGERI WALISONGO SEMARANG

2021

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Rifqinur Mahmudah

NIM : 1808016028

Program studi : Biologi

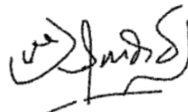
Menyatakan bahwa Skripsi yang berjudul:

“BATASAN JENIS *Costus afer* dan *Costus lucanusianus* BERDASARKAN SEKUEN *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER*”.

Secara keseluruhan adalah hasil penelitian/karya saya sendiri, kecuali bagian tertentu yang dirujuk sumbernya.

Semarang, 12 Desember 2021

Pembuat Pernyataan



Rifqinur Mahmudah

NIM: 1808016028



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
Jl. Prof. Dr. Hamka Ngalayan Semarang
Telp.024-7601295 Fax. 7615387

PENGESAHAN

Naskah skripsi berikut ini:

Judul : Batasan Jenis *Costus afer* dan *Costus lucanusianus*
Berdasarkan Sekuen Internal Transcribed Spacer

Penulis : **Rifqinur Mahmudah**

NIM : 1808016028

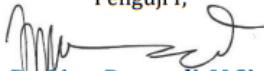
Jurusan : S1 Biologi

Telah diujikan dalam sidang *tugas akhir* oleh Dewan Penguji Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo dan dapat diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana dalam ilmu Biologi.

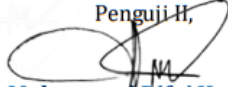
Semarang, 29 Desember 2021

DEWAN PENGUJI


Penguji I,


Dr. Ling. Rusmadi, M.Si.
NIDN. 2026018302

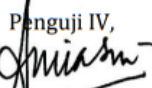
Penguji II,


Muhammad Rifqi H., M.Si.
NIP. 199005212018011004


Penguji III,


Baiq Farhatul Wahidah, M.Si.
NIP. 1975022220091226000


Penguji IV,


Arnia Sari Mukaromah, M.Sc.
NIP. 198709112018012001

Pembimbing I,


Dr. Ling. Rusmadi, M.Si.
NIDN. 2026018302

Pembimbing II,


Muhammad Rifqi H., M.Si.
NIP. 199005212018011004

NOTA DINAS

Semarang, 12/12/2021

Yth. Ketua Program Studi Biologi
Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Walisongo Semarang
Assalamu'alaikum. wr. wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : **BATASAN JENIS *Costus afer* dan *Costus lucanusianus* BERDASARKAN SEKUEN *INTERNAL TRANSCRIBED SPACER***

Penulis : Rifqinur Mahmudah

NIM : 1808016028

Program studi : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang *Munaqasyah*.

Wassalamu'alaikum. wr. wb.

Pembimbing I



Dr. Ling. Rusmadi, M.Si.

NIDN. 2026018302

NOTA

Semarang, 12/12/2021

Yth. Ketua Program Studi Biologi
Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Walisongo Semarang

Assalamu'alaikum. wr. wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : **BATASAN JENIS *Costus afer* dan *Costus lucanusianus* BERDASARKAN SEKUEN INTERNAL TRANSCRIBED SPACER**

Penulis : Rifqinur Mahmudah

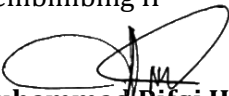
NIM : 1808016028

Program studi : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang *Munaqasyah*.

Wassalamu'alaikum. wr. wb.

Pembimbing II


Muhammad Rifqi Hariri, M.Si.

NIP.199005212018011004

MOTTO

مَنْ تَأَنَّى نَالَ مَا تَمَّى

“Barang siapa yang berhati-hati maka dia akan
mendapatkan apa yang dia impikan”

ABSTRAK

Nama : Rifqinur Mahmudah
NIM : 1808016028
Program studi : Biologi
Judul : **BATASAN JENIS *Costus afer* dan *Costus lucanusianus* BERDASARKAN SEKUEN INTERNAL TRANSCRIBED SPACER**

Costus afer dan *C. lucanusianus* adalah dua spesies koleksi Kebun Raya Bogor. Kedua tanaman tersebut memiliki karakter dan bentuk morfologi yang mirip, sehingga banyak yang menganggap kedua tanaman tersebut sama. DNA *barcoding* diaplikasikan sebagai bagian dari kegiatan konservasi genetik yang dilakukan pada *C. afer* dan *C. lucanusianus*. Salah satu region yang digunakan adalah ITS. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui karakter nukleotida pada sekuen ITS guna menentukan batasan jenis *C. afer* dan *C. lucanusianus*. Data diperoleh dari isolasi DNA sampel *C. afer* dan *C. lucanusianus* koleksi Kebun Raya Bogor dengan mengikuti prosedur *kit (TIANGEN)*. Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 35 kali, dilanjutkan elektroforesis dan sekuensing DNA di 1st BASE DNA Singapura. Analisis data dilakukan menggunakan software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X)*. alignment dilakukan menggunakan ClustalW dan dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* pada laman *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan *Pair Group Method with Arithmetic Average*

(UPGMA) dan nilai *bootstrap* 1000. Analisis lanjutan menggunakan *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP). Hasil penelitian menunjukkan DNA *C. afer* dan *C. lucanusianus* teramplifikasi baik menggunakan primer ITS. Pita DNA yang dihasilkan tebal, tunggal, dan jelas. Hasil pohon filogenetik menunjukkan semua jenis *C. afer* dan *C. lucanusianus* yang diambil dari NCBI terkonfirmasi sebagai *C. afer*. Nilai *Threshold distance* ASAP menunjukkan bahwa semua jenis partisi berada di bawah 0.01 kecuali jenis *C. afer* (AY994744) yang memiliki nilai *Threshold distance* 0.0127 sehingga spesies yang diujikan merupakan jenis yang sama.

Kata Kunci : *Costus afer*, *Costus lucanusianus*, ITS, *Barcoding*

ABSTRAK

Nama : Rifqinur Mahmudah
NIM : 1808016028
Program studi : Biologi
Judul : **BATASAN JENIS *Costus afer*
dan *Costus lucanusianus*
BERDASARKAN SEKUEN
INTERNAL TRANSCRIBED
SPACER**

Costus afer and *C. lucanusianus* are two species from the Bogor Botanical Gardens collection. The two plants have similar morphological characters and forms, so many consider the two plants the same. DNA barcoding was applied as part of genetic conservation activities carried out on *C. afer* and *C. lucanusianus*. One of the regions used is ITS. The purpose of this study was to determine the character of the nucleotides in the ITS sequence in order to determine the type limits of *C. afer* and *C. lucanusianus*. Data were obtained from DNA isolation of *C. afer* and *C. lucanusianus* samples from the Bogor Botanical Gardens collection by following the kit procedure (TIANGEN). PCR amplification was performed 35 times, followed by electrophoresis and DNA sequencing at Singapore's 1st BASE DNA. Data analysis was performed using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) software. alignment was performed using ClustalW and analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) on the National

Center for Biotechnology Information (NCBI) page. The phylogenetic tree was reconstructed using Pair Group Method with Arithmetic Average (UPGMA) and bootstrap value of 1000. Further analysis used Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP). The results showed that the DNA of *C. afer* and *C. lucanusianus* was well amplified using ITS primers. The resulting DNA band is thick, single, and clear. The results of the phylogenetic tree showed that all species of *C. afer* and *C. lucanusianus* taken from NCBI were confirmed as *C. afer*. The ASAP threshold distance value indicates that all partition types are below 0.01 except for *C. afer* (AY994744) which has a threshold distance value of 0.0127 so that the dujikan species are the same species.

Keywords: *Costus afer*, *Costus lucanusianus*, ITS, *Barcoding*

TRANSLITERASI ARAB-LATIN

Pedoman penulisan skripsi ini mengikuti pedoman transliterasi huruf arab latin SKB (Sesuai Keputusan Bersama) Menteri Agama dan Menteri Pendidikan dan Menteri Kebudayaan R.I. Nomor: 158 tahun 1987 dan Nomor: 0543b/U/1987 sebagai berikut:

ا	A	ط	T
ب	B	ظ	Z
ت	T	ع	'
ث	S	غ	G
ج	J	ف	F
ح	H	ق	Q
خ	KH	ك	K
د	D	ل	L
ذ	Z	م	M
ر	R	ن	N
ز	Z	و	W
س	S	ها	H
ش	SY	ء	'
ص	S	ي	Y
ض	D		

Keterangan: penulisan kata sandang (al-) dalam teks ditulis menyesuaikan rujukan.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“BATASAN JENIS *Costus afer* dan *Costus lucanusianus* BERDASARKAN SEKUEN INTERNAL TRANSCRIBED SPACER”**. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk kelulusan di Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang.

Sholawat serta salam senantiasa penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah memberi teladan bagi umatnya untuk selalu berjuang mencari dan mengamalkan ilmu Allah. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari campur tangan banyak pihak dalam memberi bimbingan dan arahan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu, dengan penuh rasa hormat penulis sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan petunjuk, kesehatan, hidayah sehingga bisa menyelesaikan skripsi dengan baik;
2. Prof. Dr. H. Imam Taufiq, M.Ag. selaku Rektor UIN Walisongo Semarang, sekaligus pengasuh PP. Darul Falah Besongo yang memberi motivasi dan arahan selama nyanti dan kuliah;
3. Dr. Ismail, M.Ag. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Walisongo Semarang;

4. Ibu Baiq Farhatul Wahidah, M.Si. selaku Ketua Program Studi Biologi, Wali Dosen yang senantiasa memberi arahan dan dukungan;
5. Dr. Ling. Rusmadi, M.Si. selaku Dosen Pembimbing I yang senantiasa memberimotivasidankoreksi;
6. Muhammad Rifqi Hariri, M.Si. selaku Dosen Pembimbing II yang senantiasa mengajarkan, mengarahkan dan membantu dalam penelitian;
7. Ibu dan Bapak dosen, pegawai, dan civitas akademik UIN Walisongo yang telah membantu penulis selama proses perkuliahan;
8. Kepala Pusat Riset Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya-BRIN (Kebun Raya Bogor) yang telah memberikan kesempatan dan izin untuk belajar dan melaksanakan penelitian
9. Kedua orang tua saya Ibu Mastipah dan Bapak Sya'roni S.Pd yang telah mencurahkan doa dan dukungan yang sangat besar, kedua kaka saya Nailul Husna S.Pd dan saudara kembar saya Rifqanur Fadliyyah serta segenap keluarga besar yang senantiasa memberikan dukungansecaramateriil danmoril;
10. Teman dekatku M. Khoirully Yahya, Khaerun Nisa', Nafin Nihayati, Rasyida Rifa'ati Husna yang selalu

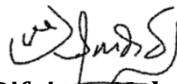
membersamai saat susah, maupun senang.

11. Teman seperjuangan molekuler Riski Aprilianingsih, Devi Oktavia, Fauzi Akbar, dan Ramdhani Arfan.
12. Teman-teman Biosinapsis18 yang selalu membersamai selama kuliah, tempat bertanya, diskusi, dan tempat berbagi cerita;
13. Keluarga besar Pondok Darul Falah Besongo terkhusus Santri Aswaja 18 yang telah menemani perjalanan selama kuliah, mengaji dan mengerjakan skripsi;
14. Semua pihak yang telah membantu dalam proses penelitian dan penulisan baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini belum sempurna dan masih banyak kekurangan. Kritik dan saran penulis harapkan untuk menyempurnakan skripsi ini. Semoga segala bantuan yang telah diberikan kepada penulis dapat bermanfaat dan mendapat balasan oleh Allah SWT.

Semarang, 12 Desember 2021

Penulis



Rifqinur Mahmudah

NIM 1808016028

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	II
PERNYATAAN KEASLIAN	III
“BATASAN JENIS <i>Costus afer</i> dan <i>Costus lucanusianus</i> BERDASARKAN SEKUEN <i>INTERNAL TRANSCRIBED SPACER</i>”	III
NOTA DINAS	V
NOTA.....	VI
MOTTO.....	VII
ABSTRAK	VIII
TRANSLITERASI ARAB-LATIN.....	XII
KATA PENGANTAR.....	XIV
DAFTAR TABEL	XIX
DAFTAR GAMBAR.....	XX
DAFTAR LAMPIRAN	XXI
BAB I PENDAHULUAN	22
A. Latar Belakang.....	22
B. Rumusan Masalah	24
C. Tujuan Penelitian.....	25
D. Manfaat Penelitian	25
BAB II LANDASAN PUSTAKA	27
A. Kajian Teori.....	27
1. Tumbuhan <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i>	27
2. Ayat Al-Quran tentang tumbuhan.....	31
3. DNA Barcoding	32
B. Kajian Penelitian yang Relevan	35
C. Kerangka Berfikir	38
BAB III METODE PENELITIAN.....	40

A. Tempat dan Waktu Penelitian	40
B. Alat dan Bahan	40
C. Metode	41
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	48
A. Karakterisasi Sekuen ITS <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i>	48
1. Visualisasi Pita DNA Sekuen ITS <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i>	48
2. Hasil BLAST NCBI <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i>	50
3. Analisis Filogenetik Berdasarkan Region ITS	53
B. Analisis Batasan Jenis <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i>	57
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	58
A. Kesimpulan.....	58
B. Saran.....	58
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	68

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Perbandingan ciri morfologi <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i>	39
Tabel 4.1	Hasil BLAST NCBI sekuen ITS <i>C. afer</i>	51
Tabel 4.2	Hasil BLAST NCBI sekuen ITS <i>C. lucanusianus</i>	52
Tabel 4.3	Informasi sekuen <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i> dari <i>genbank</i> NCBI	53
Tabel 4.4	Grup partisi menggunakan <i>Assemble Species by Automatic Partitioning</i> (ASAP)	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	A. Habitus <i>C. afer</i> ; B. bunga <i>C. afer</i>	28
Gambar 2.2	A. bunga <i>C. Lucanusianus</i> ; B. Perawakan <i>C. Lucanusianus</i>	29
Gambar 2.3	Letak regian ITS	35
Gambar 2.4	Skema Kerangka Berpikir	39
Gambar 3.1	Peta Lokasi Kebun Raya Bogor	44
Gambar 4.1	Visualisasi produk PCR <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i> pada gel agarosa 1% menggunakan primer ITS. Kode 1 <i>C. afer</i> dan kode 2 <i>C. lucanusianus</i> .	49
Gambar 4.2	Pohon filogenetik <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i> dengan menggunakan UPGMA.	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Dokumentasi Penelitian	70
Lampiran 2	Kromatogram hasil sekuensing produk PCR dari sampel <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i> sekuen ITS	71
Lampiran 3	Sekuen hasil contig <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i>	72
Lampiran 4	hasil alignment sekuen sampel dan 8 sekuen <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i>	73
Lampiran 5	<i>Gap</i> hasil alignment sekuen sampel dan 8 sekuen <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i>	74
Lampiran 6	Komposisi nukleotida hasil alignment sekuen sampel dan 8 sekuen <i>C. afer</i> dan <i>C. lucanusianus</i>	75
Lampiran 7	Nilai Treshold distance menggunakan ASAP	76

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia kaya akan jenis-jenis tumbuhan yang memiliki ciri khas masing-masing. Identifikasi tumbuhan penting dilakukan untuk mengungkapkan keragamann tumbuhan. Salah satunya dengan identifikasi molekuler. Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikaji adalah *Costus* spp. Sebanyak 14 jenis *Costus* terdapat di Kebun Raya Bogor dan jenis yang menarik untuk dikaji adalah *Costus afer* dan *Costus lucanusianus*. Tanaman ini memiliki kenampakan morfologi yang mirip sehingga banyak yang menganggap kedua tanaman tersebut sama.

Costus L adalah anggota terbesar dalam suku Costaceae dengan jumlah jenis mencapai 24 jenis (Maas-van de Kamer *et al.*, 2016). Marga ini memiliki sebaran distribusi dari kawasan Afrika hingga Amerika Tropis. Suwandi (1995) mencatat dalam penelitian Irsyam, Irwanto, & Hariri (2019) bahwa di kawasan Malesia terdapat 11 jenis *Costus* yang diantaranya adalah *C. acanthocephalus*, *C. clemensiae*, dan *C. lucanusianus*. Tanaman *Costus* biasanya dijadikan sebagai tanaman hias seperti *C. woodsonii* (Ginger *et al.*, 2013). Persebaran *Costus* di Indonesia sendiri sudah

meluas salah satunya di wilayah Jawa. Irsyam, Irwanto, & Hariri (2019) melaporkan adanya jenis *C. afer* di Jawa Barat yang menurut kepercayaan masyarakat Kampung Adat Ciptagelar memiliki khasiat sebagai obat alami untuk mengobati gigitan ular, tunas tanaman dijadikan sebagai komponen minyak tradisional dan daunnya digunakan sebagai syarat dalam acara ritual *nyawen*.

Kajian tentang identifikasi morfologi tumbuhan telah dilakukan, namun karena adanya pengaruh faktor lingkungan menjadikan karakter morfologi yang dihasilkan kurang spesifik (Nurkholidah, 2019). Kesamaan ciri morfologi juga ditemukan pada *C. afer* dan *C. lucanusianus*. Irsyam, Irwanto, & Hariri (2019) melaporkan adanya perbedaan secara morfologi diantara kedua tanaman ini yaitu pada pangkal lidah daun *C. lucanusianus* memiliki rambut panjang, sedangkan pada *C. afer* tidak memilikinya. Hasil pencirian ini akan dijadikan sebagai pedoman dalam identifikasi molekuler.

Molekuler dipilih karena memiliki keunggulan keakuratannya yang tinggi, cepat, dan spesifik. Ada beberapa cara dalam identifikasi molekuler salah satunya menggunakan metode *barcoding*. Metode *barcoding* bisa digunakan dalam mengidentifikasi serta

menganalisis keragaman genetik jenis tumbuhan (Fattah *et al.*, 2014). Penanda yang digunakan adalah sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS). ITS dipilih karena memiliki keberhasilan yang tinggi saat amplifikasi, serta memiliki variasi yang tinggi (Nurkholidah, 2019). Metode analisis yang digunakan menggunakan rekonstruksi pohon filogenetik *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA) dan analisis batasan jenis menggunakan *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP). ASAP adalah metode baru untuk mengelompokkan partisi spesies dari data *barcod* (Puillandre, Brouillet, & Achaz, 2021).

Penelitian ini akan memberikan informasi secara mendetail hasil sekuen ITS dan rekonstruksi pohon pada *C. afer* dan *C. lucanusianus*. Hasil rekonstruksi dan analisis menggunakan ASAP diharapkan mampu menjawab batasan jenis pada *C. afer* dan *C. lucanusianus*. Lebih jauh lagi penelitian ini akan menambah informasi dalam kajian *Costus* spp.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah dipaparkan diatas, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimanakah karakter sekuen ITS pada *C. afer* dan *C. lucanusianus*?
2. Apakah pohon filogenetik yang direkonstruksi mampu membedakan *C. afer* dan *C. lucanusianus*?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mendeskripsikan karakter nukleotida pada sekuen ITS *C. afer* dan *C. lucanusianus*;
2. Mendeskripsikan kemampuan sekuen ITS dalam membedakan *C. afer* dan *C. lucanusianus* berdasarkan pohon filogenetik yang telah dikonstruksi.

D. Manfaat Penelitian

Ada beberapa manfaat yang bisa diperoleh dari penelitian ini, antara lain sebagai berikut:

1. Manfaat Teoritis
 - a. Informasi tentang karakter morfologi *C. afer* dan *C. lucanusianus* menjadi acuan dalam studi *Costus* spp.
 - b. Memberikan informasi data region ITS yang potensial untuk identifikasi pada *Costus* spp.
 - c. Memberikan informasi hubungan filogenetik *C. afer* dan *C. lucanusianus* yang bisa digunakan

untuk penelitian selanjutnya.

2. Manfaat Praktis

- a. Memberikan wawasan tentang karakter morfologi dan molekuler *C. afer* dan *C. lucanusianus* bagi pembaca.
- b. Menambah informasi tentang DNA barcoding dan filogenetik sebagai kontribusi penelitian selanjutnya.
- c. Memberikan kejelasan informasi kepada peneliti tentang identifikasi molekuler jenis *C. afer* dan *C. lucanusianus* menggunakan region ITS.

BAB II

LANDASAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

1. Tumbuhan *C. afer* dan *C. lucanusianus*

Costus afer dan *C. lucanusianus* adalah salah satu tumbuhan yang hidup didaerah tropis dan merupakan tumbuhan herba. Kedua tanaman tersebut masuk kedalam famili Costaceae. *Costus L.* merupakan tumbuhan yang hidup subur dan berumur panjang, tumbuhan ini berkecambah dengan biji (Chen dan Schemske, 2015).

Berikut klasifikasi tumbuhan *C. afer*:

Kingdom : Plantae

Phylum : Tracheophyta

Class : Liliopsida

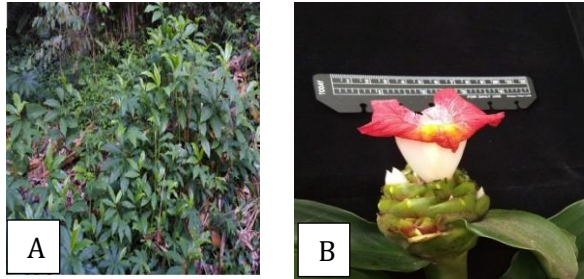
Order : Zingiberales

Family : Costaceae

Genus : *Costus L.*

Spesies : *Costus afer Ker Gawl.*

(GBIF 2021, diakses 4 November 2021)



Gambar 2.1 A. Habitus *C. afer* koleksi KRB; B. bunga *C. afer*
koleksi KRB

(Sumber : Dokumentasi pribadi)

Costus afer memiliki nama lokal “Pacing” dengan bentuk morfologi batang yang memiliki diameter 1-1,5 cm dan tumbuh panjang mencapai 4 meter. *C. afer* memiliki tangkai daun yang berbulu halus, daun yang tunggal, dan tersusun spiral. Bagian bunga muncul pada ujung tunas, berbentuk corong dan berwarna kemerahan dengan mahkota berwarna putih kekuningan (Maas-van de Kamer *et al.*, 2016).

Klasifikasi *C. lucansianus* :

Kingdom : Plantae

Phylum : Tracheophyta

Class : Liliopsida

Order : Zingiberales

Family : Costaceae

Genus : *Costus L.*

Spesies : *Costus lucanusianus* J.Braun & K. Schum (GBIF 2021, diakses 4 November 2021)



Gambar 2.2 A. bunga *C. Lucanusianus* koleksi KRB; B.

Perawakan *C. Lucanusianus*

(Sumber : A. Dokumentasi Pribadi B. Sajala GBIF, 2019, diakses 4 November 2021)

Penampakan morfologi *C. lucanusianus* adalah tumbuhan herba dengan perawakan tegak, tinggi mncapai 1-5 m. Daun pada *C. lucanusianus* berwarna hijau, daun yang tumbuh banyak serta pada bagian pangkal terdapat bulu seperti jarum. Ciri morfologi bunga berwarna merah tua dan bagian dalamnya berwarna putih, berbentuk corong dan tumbuh pada ujung tunas tanaman (Maas-van de Kamer *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian Irsyam, Irwanto, & Hariri, (2019) perbedaan ciri morfologi *C. afer* dan *C.*

lucanusianus akan ditampilkan pada tabel 2.1. Perbedaan yang paling menonjol dari karakter morfologi kedua tanaman ini adalah pangkal lidah daun yang ada pada *C. lucanusianus* memiliki rambut halus, sedangkan pada *C. afer* tidak memilikinya.

Tabel 2.1 Perbandingan ciri morfologi *C. afer* dan *C. lucanusianus* (Irsyam, Irwanto, & Hariri, 2019).

No	Ciri	<i>C. afer</i>	<i>C. lucanusianus</i>
1	Pangkal lidah daun	Gundul	Berambut seperti jarum
2	Helai daun	Menjorong lanset	Menjorong
3	Pangkal daun	Menjantung dangkal hingga membaji	Menjantung hingga menumpul
4	Warna abaksial daun	Hijau pucat	Keperakan
5	Indumen abaksial daun	Gundul	Berambut tegak
6	Bentuk bunga	Membulat hingga melonjong	Membulat hingga membulat telur
7	Cuping daun	Tegak	Horizontal
8	Warna bibir bunga	Putih dengan bagian tengah berwarna kuning tepian berwarna merah muda.	Putih dengan tepian berwarna merah dan bagian tengah berwarna jingga

2. Ayat Al-Quran tentang tumbuhan

Al-Quran banyak menyebutkan tentang ayat-ayat yang berkaitan dengan tumbuhan. Allah begitu mengistimewakan tumbuhan karena banyak manfaat yang bisa diambil. Keragaman hayati memiliki kedudukan penting dalam ajaran agama Islam sebagaimana Allah berfirman Surat az-Zumar ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ فَيَسَلُّهُ يَنْبِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ
ثُمَّ يَهْبِطُ فَتَذَرُوهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَامًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ؕ

Artinya : *“Apakah engkau tidak memperhatikan, bahwa Allah menurunkan air dari langit, lalu diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi, kemudian dengan air itu ditumbuhkan-Nya tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, kemudian menjadi kering, lalu engkau melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sungguh, pada yang demikian itu terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal sehat”*.

Al-Quran menjelaskan tentang bagaimana Allah mengatur sumber kehidupan di bumi dan

menumbuhkan berbagai macam tumbuhan tanaman (Lestariningsih dan Mulyono, 2017). Ibnu Katsir (2008) menafsirkan Allah menumbuhkan tumbuhan dengan menurunkan air dari langit dan menjadikan penciptaan yang bermacam-macam meliputi warna, bentuk, rasa, bau dan manfaatnya. Tanda-tanda kekuasaan Allah ini terdapat pembelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal (*ulil albab*). *Ulil albab* adalah orang yang berfikir, mengkaji, dan melakukan riset untuk merenungkan ciptaan Allah untuk diambil pelajaran (Firdaus, 2021).

Ciptaan Allah yang begitu beragam menjadikan pemahaman tentang adanya pengaruh faktor yang memunculkan karakter baik secara morfologi maupun secara genetik. Identifikasi jenis *C. afer* dan *C. lucanusianus* adalah bagian dari salah satu prinsip kerja *Ulil albab* sesuai konsep yang ada di dalam Al-Quran. Manfaat dari kajian dan riset ini tidak lain adalah sebagai bentuk pembelajaran dan pengingat akan nikmat yang Allah berikan kepada manusia.

3. DNA Barcoding

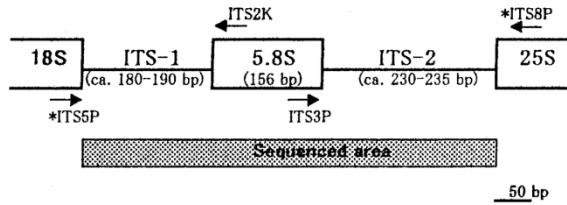
DNA barcoding adalah salah satu teknik yang digunakan dalam identifikasi jenis dengan

membandingkan informasi genetik berupa sekuen DNA berdasarkan barkode biologi yang sudah terstandarisasi (Fitrian dan Madduppa, 2020). Ciri sekuen DNA yang dapat digunakan sebagai DNA barcoding adalah memiliki kesamaan yang banyak dalam spesies dan memiliki perbedaan yang nyata antar spesies (Zein dan Prawiradilaga, 2013). Barcode DNA digunakan sebagai alat pengidentifikasi spesies yang berbeda. (Parveen *et al.*, 2017). Teknik ini memiliki manfaat dalam membantu mengidentifikasi spesies yang belum diketahui jenisnya.

DNA barcoding menggunakan potongan gen standar yang ada pada tumbuhan yang akan dijadikan penanda Barcode DNA (Fattah *et al.*, 2014). Barcode DNA harus memiliki sifat yang universal sehingga bisa digunakan sebagai identifikasi semua tanaman. Kelebihan barcode ini adalah lebih efektif dan mudah karena bisa digunakan semua jenis (Maulidya, 2020) contohnya pada Zingiberaceae (Sukarjo, 2021); Malvaceae (Alponsin, 2020); Oxalidaceae (Senjaya *et al.*, 2021); Ericaceae (Amrullah *et al.*, 2020) dan Myrtaceae (Wati, 2020). Teknik ini lebih cepat untuk mengidentifikasi

tumbuhan, teknik ini mudah dan jauh lebih murah dengan menggunakan sekuen pendek dari genom inti (Nurkholidah, 2019).

Salah satu region yang digunakan dalam barcode tumbuhan adalah ITS. Ekasari, Retnoningsih & Widiанти (2012) menjelaskan bahwa ITS memiliki karakteristik yang lebih unggul yang mana memiliki ukuran 700 bp dan banyak disalin di dalam genom inti. Dalam amplifikasi PCR ITS ini memiliki keberhasilan yang tinggi yang mana sekuennya dua arah (*forward* dan *reverse*), dan tingkat variasinya tinggi tiap jenisnya (Nurkholidah, 2019). Sekuen ini baik digunakan untuk identifikasi dan direkomendasikan oleh The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) sebagai salah satu kandidat barcode universal pada tanaman (Perwitasari *et al.*, 2020). Takano dan Okada (2002) menyebutkan letak region ITS berada di antara 18S rRNA dan 25S rRNA terdapat pada Gambar 2.3. Vikassa'adah (2021) menambahkan daerah ITS terdiri dari ITS1 dan ITS2, memiliki kisaran panjang pada 300-900 bp, dan tingkat laju mutasinya tinggi.



Gambar 2.3 Letak region ITS
(Sumber : Takano dan Okada, 2002)

B. Kajian Penelitian yang Relevan

Catatan awal identifikasi keberadaan *Costus* dijelaskan dalam penelitian Maas (1972) yang menjelaskan dimulainya penelitian pada tahun 1962 tentang identifikasi tanaman Zingiberaceae untuk “Flora Suriname”. Dalam perjalanan tersebut ditemukan masalah dalam taksonomi, sehingga dilakukan ekspedisi lebih lanjut tentang penggalian informasi jenis-jenis tanaman yang ada di Suriname, Trinidad dan Jamaika. Sebanyak 24 jenis *Costus* L. terungkap salah satunya *Costus uniflorus*. Penemuan jenis ini menjadikan gerbang awal identifikasi dan revisi pada taksonomi *Costus* L yang masuk pada famili Costaceae. Maas (1977) dalam penelitiannya “Monograph for Flora Neotropica” membagi *Costus* menjadi beberapa subgenus dengan berdasarkan penyerbukan dari lebah, dan burung kolibri.

Penelitian identifikasi tanaman *Costus* ini berkembang dengan ditemukannya jenis-jenis baru seperti *Costus dirzoi* dan *Costus pictus* dari Mexico (Garcia, 1991). Banyaknya penelitian-penelitian yang menemukan spesies baru menjadikan perlunya identifikasi untuk merekonstruksi leluhur, dan menemukan asal muasal biogeografis dari genus *Costus*. Penelitian menggunakan teknik molekuler mampu menjawab persoalan sistematika dengan merekonstruksi filogenetik (Li *et al.*, 2019). Penelitian awal secara molekuler pada *C. afer* dilakukan Kay *et al.*, (2005) yang mengungkapkan data sekuen *C. afer* untuk dianalisis evolusinya menggunakan ITS dan ETS.

Salzman *et al.*, (2015) melakukan investigasi secara molekuler filogenetik untuk mengungkapkan asal usul dan evolusi bunga pada genus *Costus* salah satunya *C. afer* dan *C. lucanusianus*. Penelitian ini menggunakan penanda *ITS*, *ETS*, *rps16*, *trnL-F*, dan *CaM*. Penelitian molekuler semakin berkembang dengan lebih memperdalam lagi obyek penelitiannya ketingkat jenis. Salah satunya penelitian yang dilakukan Li *et al.*, (2019) yang mengkarakterisasi serta menganalisis genom kloroplas pada *Costus viridis*.

Maas-van de Kamer *et al.*, (2016) dalam penelitiannya melakukan revisi pada penelitian sebelumnya terhadap 24 jenis *Costus* yang sudah diakui,

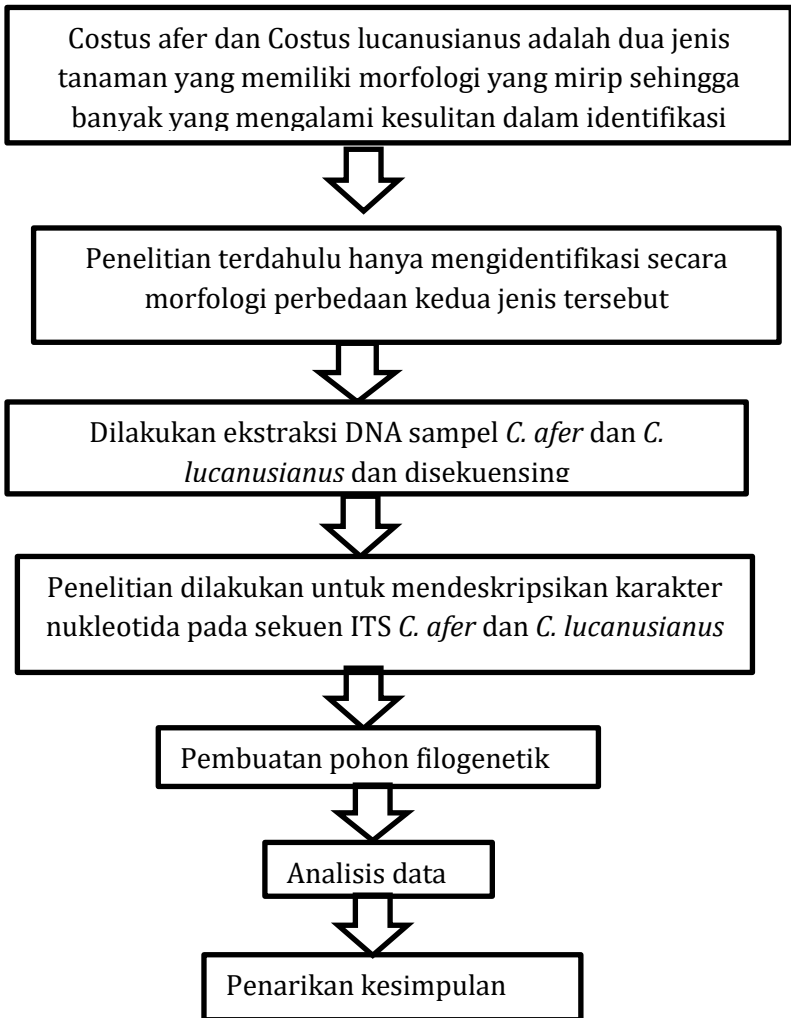
dan 8 jenis diantaranya diberi nama baru. Dalam penelitian ini menyebutkan bahwa *C. afer* dan *C. lucanusianus* adalah dua jenis tanaman yang berbeda namun memiliki kemiripan pada morfologinya. Edeoga dan Okoli (1998) melakukan analisis pendekatan secara anatomi untuk membedakan kedua jenis tanaman tersebut. Irsyam, Irwanto, & Hariri, (2019) mencatat keberadaan *C. afer* yang telah ditemukan di Jawa. Dalam penelitiannya dijelaskan bahwa *C. afer* memiliki kemiripan secara morfologi dengan *C. lucanusianus* dan ciri pembeda diantara kedua jenis ini terletak pada rambut yang muncul pada pangkal lidah daun yang mencirikan *C. lucanusianus*.

Identifikasi jenis *C. afer* dan *C. lucanusianus* sudah dilakukan sejak dahulu hingga sekarang. Dimulai dari identifikasi secara morfologi, hingga analisis secara anatomi untuk bisa membedakan kedua tanaman tersebut. Perbedaan penelitian *C. afer* dan *C. lucanusianus* yang akan dilakukan adalah analisis teknik molekuler dengan mengungkapkan karakter nukleotida pada sekuen ITS dengan membandingkan hasil penelitian morfologi yang telah dilakukan guna membedakan kedua jenis *C. afer* dan *C. lucanusianus*. Penelitian berjudul “Batasan Jenis *Costus afer* dan *Costus lucanusianus* Berdasarkan Sekuen *Internal Transcribed Spacer*” yang bertempat di Kebun Raya Bogor

diharapkan mampu menambah khasanah pengetahuan mengenai identifikasi secara molekuler lebih khusus pada *C. afer* dan *C. lucanusianus*.

C. Kerangka Berfikir

Penelitian ini dilakukan dengan mengajukan surat izin untuk masuk ke Kebun Raya Bogor bersamaan dengan kegiatan Kerja Praktik (KP), kemudian dilanjutkan dengan observasi dan terjun lapangan. Setelah itu, penelitian dimulai dengan mengamati obyek penelitian dan diambil sampel dari daun untuk selanjutnya dibawa ke Laboratorium Molekuler Treub Kebun Raya Bogor untuk diekstraksi hingga diperoleh hasil penelitian. Tahap selanjutnya yaitu analisis data penelitian dan olah data sehingga di peroleh tujuan penelitan yaitu batasan jenis *C. afer* dan *C. lucanusianus* berdasarkan sekuen ITS



Gambar 2.4 Skema Kerangka Berpikir

BAB II

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan Laboratorium Treub, Pusat Riset Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya, Badan Riset dan Inovasi Nasional, pada bulan Januari hingga Desember 2021. Peta lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 3.1.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam kegiatan ini terdiri dari mortar, pestle, micropipet (Eppendorf) ukuran 2,5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 1000 μ l, *vortex mixer* (VWR), *heat block* (VWR), sentrifuge (Spectrafuge 24D), perangkat elektroforesis (Nyxtechnik Voltronix), cetakan dan sisir gel agarose, mesin PCR (Takara), timbangan analitik (Precisa XT220A), enlenmeyer (Iwaki) 100 ml, microwave (Sharp), dan perangkat Gel Doc (EZ Imager Bio-RAD).

Bahan yang digunakan terdiri dari sampel daun *C. afer* (XI.B.V.125) dan *C. lucanusianus* (XI.B.II.33) koleksi Kebun Raya Bogor, Kit Tiangen DP305, pasir silika, my Taq Bioline Master Mix Promega M7122, ddH₂O, primer *forward* 17SE 5' - ACG AAT TCA TGG TCC GGT GGA GTG TTC G - 3' dan *reverse* 26SE 5' - TAG AAT TCC CCG GTT

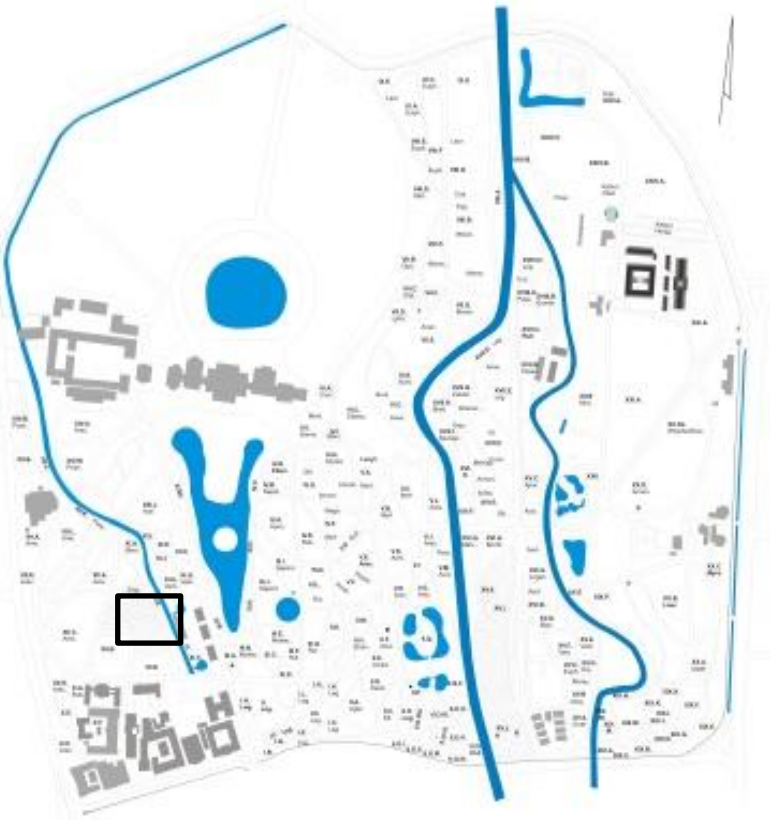
CGC TCG CCG TTA C - 3' (Sun *et al.*, 1994), gel agarose (Thermoscientific R049), TAE (Thermoscientific 50X HB49), Biotium GelRed 41003, Ladder 1 kb (SM0311 Thermoscientific).

C. Metode

1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara langsung di Kebun Raya Bogor vak XI.B (Gambar 3.1). Sampel yang diambil berupa cabang *Costus* yang tidak terkena penyakit dan memiliki organ lengkap berupa cabang daun yang memiliki bunga, data lokasi dan ciri morfologi dicatat (Rugayah *et al.*, 2004). Sampel dikumpulkan sebagai spesimen dan dibagi menjadi dua, satu bagian untuk pengamatan morfologi sedangkan bagian lain berupa daun digunakan sebagai ekstraksi DNA. Data yang dicatat adalah lokasi, no. koleksi, dan asal (Balgooy, 1987).

KEBUN RAYA BOGOR
SKALA 1:5000



Gambar 3.1 Peta Lokasi Pengambilan Sampel vak XI.B
Kebun Raya Bogor
(sumber : Bidang Registrasi Kebun Raya Bogor)

2. Ekstraksi DNA

DNA *Costus* diekstraksi dengan mengikuti prosedur standar yang tertera pada kit Tiangen. Sampel daun digerus menggunakan *mortar* dan *pestle* dengan ditambahkan pasir silika. Serbuk sampel dimasukkan ke dalam tube berukuran 1,5 ml. Sebanyak 700 μ l GP1 ditambahkan kedalam tabung kemudian divortex selama 10 detik agar serbuk dan reagen homogen, selanjutnya diinkubasi pada suhu 65 °C selama 20 menit. Reagen dan sampel dihomogenkan kembali setiap 5 menit. Sebanyak 700 μ l klorofom dihomogenkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi, supernatan dipindahkan ke tabung baru yang selanjutnya ditambahkan larutan buffer GP2 sebanyak 700 μ l dan dihomogenkan. Setengah volume campuran dimasukkan kedalam *Spin Column* CB3 dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Filtrat yang berada di pengumpul dibuang dan sebagian campuran dimasukkan kembali ke *Spin Column* untuk disentrifugasi kembali. Kemudian ditambahkan *Buffer* GD sebanyak 500 μ l dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Lalu ditambahkan PW 700 μ l ke *Spin Column*

untuk mencuci membran dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Filtrat dibuang dan ditambahkan lagi PW 500 μ l dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Kemudian sisa penyangga dibuang dan campuran yang bersih dipindah kedalam tabung sentrifugasi 1,5 ml dibuka dan diinkubasi pada suhu kamar hingga membran mengering. Kemudian ditambahkan buffer TE 50 μ l diinkubasi pada suhu ruang selama 2-5 menit lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit untuk dielusi.

3. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan dengan membuat PCR mix yang terdiri dari 5 μ l DNA sampel, 1,5 μ l *forward* dan 1,5 μ l *reverse* Primer ITS , 17 μ l ddH₂O, dan 25 μ l My Taq. Tahapan PCR yang digunakan terdiri dari denaturasi awal pada suhu 95° C selama 3 menit, kemudian dilanjutkan amplifikasi sebanyak 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 58 °C selama 45 detik, dan *extension* pada suhu 72°C selama 45 detik. Tahap akhir merupakan *final extension* pada suhu 72 °C selama 5 menit.

4. Elektroforesis dan Visualisasi pita DNA

Sebanyak 0,8 gram agarosa diletakkan di gelas enlenmeyer 100 ml ditimbang kemudian ditambahkan dengan TAE 1X hingga volume mencapai 80 ml. Erlenmeyer berisi agarose dan TAE 1X dihomogenkan dan dipanaskan selama 2 menit. Sebanyak 1 μ l GelRed dimasukkan ke dalam Erlenmeyer berisi larutan agarosa kemudian dihomogenkan. Larutan agarosa dituangkan ke dalam cetakan dan dibiarkan selama 5 sampai memadat. Gel yang sudah padat ditempatkan pada alat elektroforesis kemudian DNA ladder berukuran 1 kb diletakkan sebanyak 3 μ l di sumuran paling tepi. Selanjutnya Produk PCR dimasukkan kedalam sumuran gel agarose sebanyak 5 μ l dengan urutan *C. afer* dilanjut *C. lucanusianus*. Proses elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 V selama 30 menit. Visualisasi pita DNA dilakukan menggunakan Gel Doc EZ Imager Bio-Rad.

5. Sekuensing

Sekuensing DNA dilakukan di 1st Base, Singapura, dengan mengirimkan produk PCR melalui jasa PT Genetika Science Indonesia.

6. Analisis Data

Hasil sekuen yang diperoleh diproses dengan pengolahan data penyatuan (*contig*) sekuen menggunakan MEGA X untuk mendapatkan sekuen dari DNA *forward* dan *reverse*. Langkah awal proses *contig* adalah pemotongan (*trimming*) dari DNA *forward* dan *reverse*. Pada ujung sekuens yang memiliki kualitas kurang bagus, setelah dipotong kemudian disatukan (*assemble*) sehingga menghasilkan satu sekuen yang utuh dari DNA *forward* dan *reverse* (Nurkholidah, 2019).

Analisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool Blast* (BLAST) secara *online* di laman NCBI (Dash *et al.*, 2021). BLAST bertujuan untuk mencari kemiripan dengan tingkat kesamaan 80-100% yang menunjukkan spesies yang ditemukan adalah berdekatan atau sama (Nurkholidah, 2019). Data hasil BLAST diunduh dan disimpan untuk dianalisis dengan *multiple alignment* di MEGA X bertujuan untuk mengurutkan dan mengetahui kesamaan tiap sekuen DNA (Kumar *et al.*, 1994; Mello, 2018). Selanjutnya dibuat konstruksi pohon dendogram menggunakan *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA) (Firdausi dan Waluyo, 2021) yang

bertujuan untuk merekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak evolusi minimum atau berdasarkan nenek moyang terdekat (Saitou dan Nei 1987). dengan koefisien korelasi Kimura 2-parameter. Analisis batasan jenis *C. afer* dan *C. lucanusianus* dilakukan menggunakan *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP) (Puillandre, Brouillet, & Achaz, 2021). Secara umum, alur penelitian disajikan pada Gambar lampiran 1.

BAB IV

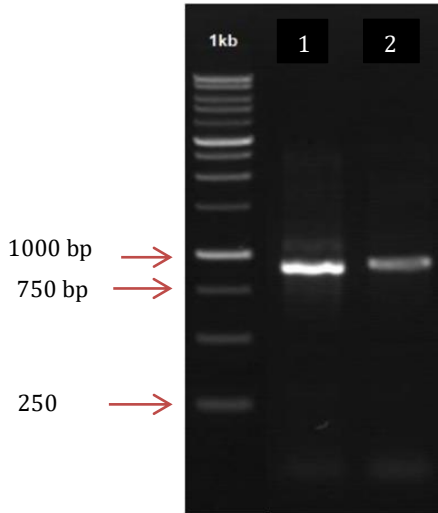
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Karakterisasi Sekuen ITS *C. afer* dan *C. lucanusianus*

1. Visualisasi Pita DNA Sekuen ITS *C. afer* dan *C. lucanusianus*

DNA *C. afer* dan *C. lucanusianus* teramplifikasi dengan baik menggunakan primer ITS dapat dilihat pada Gambar 4.1. Pita DNA *C. afer* yang dihasilkan tebal. Ketebalan ini dikarenakan konsentrasi DNA yang tinggi. Hal ini sesuai yang disampaikan oleh Indriyani (2017) bahwa ketebalan suatu pita dipengaruhi oleh tingginya konsentrasi DNA. Sedangkan pita DNA *C. Lucanusianus* yang muncul tebal, tunggal dan jelas.

Beberapa faktor yang memengaruhi keberhasilan dalam amplifikasi PCR menurut Ekman (1999) adalah kemurnian hasil ekstraksi, primer yang spesifik, efisiensi, dan ketepatan saat proses *annealing*. Pita DNA *C. afer* yang berhasil teramplifikasi berada pada posisi 900 bp, sedangkan *C. lucanusianus* berada 920 bp seperti pada Gambar 4.1. Perwitasari *et al.*, (2020) yang menyebutkan umumnya primer ITS terampifikasi pada kisaran 900 bp.



Gambar 4.1 Visualisasi produk PCR *C. afer* dan *C. lucanusianus* pada gel agarosa 1% menggunakan primer ITS. Kode 1 *C. afer* dan kode 2 *C. lucanusianus*.

Produk PCR hasil amplifikasi sekuen ITS *C. afer* dan *C. lucanusianus* selanjutnya disekuensing agar bisa dibaca. Data hasil sekuensing dikirim dalam bentuk AB1 sebanyak dua file yaitu sekuen *forward* dan *reverse*. Data berupa kromatogram disajikan pada Gambar lampiran 2. Empat macam basa hasil sekuensing *C. afer* dan *C. lucanusianus* terdiri dari adenin (A), guanin (G), timin (T), dan sitosin (C). Hasil kromatogram diedit dan digabung menjadi sekuen tunggal (contig) menggunakan *software* MEGA X.

Sekuen hasil contig dari sekuen *forward* dan *reverse* seperti yang tersaji pada Lampiran 3.

2. Hasil BLAST NCBI *C. afer* dan *C. lucanusianus*

Berdasarkan analisis BLAST, menunjukkan semua sekuen yang muncul berasal dari genus *Costus*. Sekuen yang diambil sebanyak 10 yang memiliki nilai tertinggi dapat dilihat pada Tabel 4.1. dan Tabel 4.2. Hasil BLAST jenis yang di ambil berdasarkan nilai *Perc. Ident*, *E- value*, dan *Query Cover* tertinggi dengan jenis yang berbeda. Semakin tinggi tingkat kemiripan (*Perc. Ident*) maka semakin tinggi tingkat homologi kedua jenis. Nilai dugaan (*E-value*) yang bernilai nol (0) menunjukkan pensejajaran semua sekuen signifikan. Hal ini sesuai dengan Frederick *et al.*, (2003) bahwa nilai *E-value* <0,05 maka bersifat signifikan.

Hasil BLAST sekuen ITS *C. afer* pada 10 jenis yang teratas menunjukkan bahwa ITS mampu membedakan secara genetik sampel sampai tingkat jenis/inter-spesies dapat dilihat pada Tabel 4.1. Hasil BLAST menunjukkan *C. afer* memiliki kesamaan/homologi dengan spesies *C. pulverulentus* (AY673070) dengan nilai kemiripan 97.73%, nilai

dugaan (*E-value*) nol (0) dan nilai kueri 88%. Sedangkan *C. lucanusianus* disajikan pada Tabel 4.2 memiliki kemiripan yang sama dengan *C. pulverulentus* (AY673070) dengan nilai kemiripan (*perc. Ident*) 98.00%, nilai dugaan (*E-value*) bernilai nol (0) dan nilai kueri 88%.

Tabel 4.1 Hasil BLAST NCBI sekuen ITS *C. afer*

Spesimen	No Akses	% ID	Nilai - E	Nilai Kueri
<i>Costus pulverulentus</i>	AY673070	97.73%	0.0	88%
<i>Costus afer</i>	KJ011425	98.61%	0.0	85%
<i>Costus claviger</i>	AY994740	98.18%	0.0	84%
<i>Costus lucanusianus</i>	KJ011455	98.18%	0.0	84%
<i>Costus vinosus</i>	KJ011472	98.44%	0.0	83%
<i>Costus quasi-appendiculatus</i>	KJ011463	98.16%	0.0	83%
<i>Costus erythrophyllus</i>	KJ011437	98.16%	0.0	83%
<i>Costus deistelii</i>	AY994752	98.70%	0.0	82%
<i>Costus wilsonii</i>	KJ011473	97.88%	0.0	83%
<i>Costus stenophyllus</i>	AY994720	97.62%	0.0	84%

Tabel. 4.2. Hasil BLAST NCBI sekuen ITS *C. lucanusianus*

Spesimen	No Akses	% ID	Nilai E	Nilai Kueri
<i>Costus pulverulentus</i>	AY673070	98.00%	0.0	88%
<i>Costus afer</i>	KJ011425	99.17%	0.0	85%
<i>Costus lucanusianus</i>	KJ011455	98.46%	0.0	84%
<i>Costus claviger</i>	AY994740	98.18%	0.0	84%
<i>Costus vinosus</i>	KJ011472	98.44%	0.0	83%
<i>Costus quasi-appendiculatus</i>	KJ011463	98.16%	0.0	83%
<i>Costus erythrophyllus</i>	KJ011437	98.16%	0.0	83%
<i>Costus stenophyllus</i>	AY994720	97.62%	0.0	84%
<i>Costus malortieanus</i>	AY994732	97.35%	0.0	84%
<i>Costus wilsonii</i>	KJ011473	97.60%	0.0	83%

Hasil dari BLAST dilakukan penyejajaran (*alignment*) untuk mengetahui kemiripan antar sekuen baik inter-spesifik maupun intra-spesifik dengan membandingkan homologi dan variasi genetik (Meshoul *et al.*, 2005). Informasi sekuen yang digunakan untuk penyejajaran diambil dari data data *GenBank, National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Informasi jumlah dan nomor aksesori spesimen yang akan dianalisis disajikan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Informasi sekuen *C. afer* dan *C. lucanusianus* dari genbank NCBI

No	No Akses	Nama Spesies	Ukuran Sekuen	Disubmit Oleh
1	AY9729 34	<i>C. afer</i>	684 pasang basa	Kay, K. M., Reeves, P. A., Olmstead, R. G. and Schemske, D. W.
2	AY9729 35	<i>C. lucanusian us</i>	686 pasang basa	Kay, K. M., Reeves, P. A., Olmstead, R. G. andSchemske,D.W.
3	AY9947 44	<i>C. afer</i>	617 pasang basa	Specht, C. D
4	AY9947 49	<i>C. lucanusian us</i>	666 pasang basa	Specht, C. D.
5	KJ01142 5	<i>C. afer</i>	719 pasang basa	Salzman, S. M., Driscoll, H. E., Renner, T., Andre, T., Shen, S. and Specht, C. D.
6	KJ01145 4	<i>C. lucanusian us</i>	671 pasang basa	Salzman, S., Driscoll, H. E., Renner, T., Andre, T., Shen, S. and Specht, C. D.
7	KJ01145 5	<i>C. lucanusian us</i>	715 pasang basa	Salzman, S., Driscoll, H. E., Renner, T., Andre, TShen, S. and Specht, C. D.
8	KU2150 39	<i>C. lucanusian us</i>	627 pasang basa	Janssens, S. B., Vandelook, F., De Langhe, E., Verstraete, B., Smets, E., Vandenhouwe, I. and Swennen, R.

3. Analisis Filogenetik Berdasarkan Region ITS

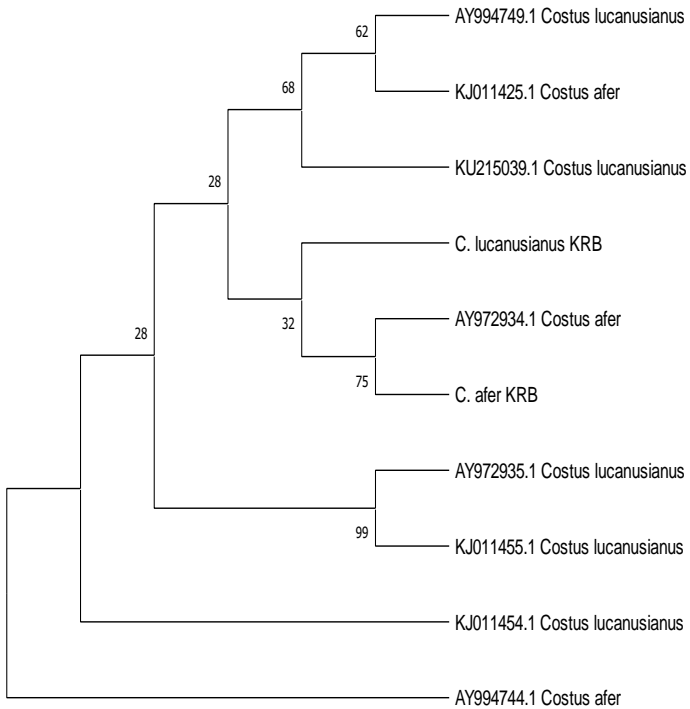
Hasil penyejajaran sebanyak 693 bp menunjukkan terdapat *Gap* pada DNA sekuen. Hasil

penyejajaran akan ditampilkan pada Gambar lampiran 4. *Gap* muncul karna adanya *variasi* dan *conserv* pada sekuen ITS. Variasi yang muncul sebanyak 32 sedangkan *conserv* sebanyak 658 seperti yang tersaji pada Gambar lampiran 5. *Gap* muncul merepresentasikan adanya insersi, delesi, maupun penyusunan ulang materi genetik dari satu atau lebih karakter sekuen (Dharmayanti, 2011). Komposisi nukleotida akan tersaji pada Gambar Lampiran 6. Berdasarkan hasil penyejajaran pada Lampiran 4 menggunakan ITS menunjukkan variasi DNA yang dihasilkan banyak pada tiap jenis dapat dilihat Gambar lampiran 5. Variasi ini muncul karena region ITS yang digunakan berasal dari lokus inti (Su'udi, 2018).

Setelah dilakukan penyejajaran, dilanjutkan dengan menganalisis dengan membuat pohon filogenetik. Rekonstruksi ini menggunakan metode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA) dapat dilihat pada Gambar 4.2. Anggota yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat akan menggabung menjadi satu klaster. Pohon filogenetik dapat menggambarkan adanya kekerabatan antar jenis dengan nenek moyang dari

jenis yang dibandingkan sehingga dapat diketahui kedekatannya (Su'udi, 2018). Analisis yang digunakan menggunakan pengulangan *bootstrap* 1000 dan perhitungan jarak evolusi menggunakan Kimura 2-parameter (Felsenstein, 1985; Kumar, Stecher, & Tamura, 2018).

Berdasarkan hasil pembuatan dendrogram pada Gambar 4.2 analisis menggunakan UPGMA *C. afer* KRB berkerabat dekat dengan *C. afer* (AY972934) dengan nilai *bootstrap* 75. Sampel *C. lucanusianus* KRB menyatu dengan *clade C. afer* (AY972934) dengan nilai *bootstrap* 32. Dari identifikasi pohon filogenetik untuk *C. lucanusianus* KRB terkonfirmasi sebagai *C. afer* KRB sesuai dengan pengamatan morfologi yang telah dilakukan. Hasil *C. lucanusianus* (AY972935) dan *C. lucanusianus* (J011455) adalah satu jenis yang sama dengan nilai *bootstrap* 99. Nilai *bootstrap* lebih dari 90 menunjukkan adanya hubungan kepercayaan cabang yang terbentuk. Kress *et al.*, (2002) menyatakan nilai *bootstrap* yang kuat apabila lebih dari 85%, nilai tersebut memperlihatkan tingkat kepercayaan cabang yang terbentuk.



Gambar 4.2 Dendrogram *C. afer* dan *C. lucanusianus* dengan menggunakan UPGMA.

Berdasarkan hasil analisis pohon filogenetik diambil kesimpulan semua jenis yang diambil dari NCBI terkonfirmasi sebagai *C. afer*. Adapun *C. afer* (AY994744) yang memisah menjadi satu *clade*

dikarenakan DNA sekuen yang dianalisis lebih pendek daripada DNA sekuen yang lain.

B. Analisis Batasan Jenis *C. afer* dan *C. lucanusianus*

Analisis *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP) ini menghasilkan dua grup *partition* dapat dilihat pada Tabel 4.4. Berdasarkan nilai *Threshold distance* yang tersaji pada Tabel lampiran 7 semua jenis partisi memiliki nilai dibawa 0.01 kecuali jenis *C. afer* (AY994744) yang memiliki nilai *Threshold distance* 0.0127 sehingga bisa dianggap semua spesies yang analisis menggunakan ASAP adalah jenis yang sama. Magoga, Fontaneto, & Montagna (2021) menjelaskan ambang batasan minimal jarak untuk determinasi jenis adalah 3% atau 0.03.

Tabel 4.4 Grup partisi menggunakan ASAP

GRUP 1	GRUP 2
<p><i>C. lucanusianus</i> (AY972935), <i>C. lucanusianus</i> (KJ0114555), <i>C. lucanusianus</i> (KU215039), <i>C. lucanusianus</i> (AY994749), <i>C. lucanusianus</i> (KJ011425), <i>C. afer</i> (AY972934), <i>C. afer</i> KRB, <i>C. lucanusianus</i> KRB, <i>C. lucanusianus</i> (KJ011454).</p>	<p><i>C. afer</i> (AY994744)</p>

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Hasil amplifikasi PCR DNA *C. afer* dan *C. lucanusianus* teramplifikasi dengan baik menggunakan primer ITS. Pita DNA yang dihasilkan tebal, tunggal, dan jelas.
2. Berdasarkan hasil analisis pohon filogenetik diambil kesimpulan semua jenis yang diambil dari NCBI terkonfirmasi sebagai *C. afer*. Adapun *C. afer* (AY994744) yang memisah menjadi satu *clade* baru dikarenakan DNA sekuen yang dianalisis lebih pendek daripada DNA sekuen yang lain. Analisis lanjutan menggunakan ASAP nilai *Threshold distance* dibawah 0.01 sehingga bisa diambil kesimpulan semua jenis yang diujikan adalah *C. afer*.

B. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya agar menghasilkan data yang lebih baik yaitu:

1. Penelitian lanjutan dengan *barcoding* bisa dilakukan pada jenis *C. lucanusianus* yang secara morfologi terkonfirmasi jenisnya;

2. Melakukan penelitian molekuler menggunakan tanaman jenis lain *Costus* spp yang ada di Indonesia lebih khusus di Pulau Jawa.

DAFTAR PUSTAKA

- Alponsin, A. 2020. *Hubungan Kekerbatan Durio spp. di Pulau Siberut Berdasarkan Penanda Internal Transcribed Spacer (ITS) dan Ribulose-1, 5-Bisphospate Carboxylase / Oxygenase Large Subunit (rbcL)*. Universitas Andalas: Doctoral dissertation
- Amrullah, M. H., Sholikhah, A., Dian, F. A., Khasna, E. N., Ardana, I. K. K. G., Zakiyah, A. S., & Listyorini, D. 2020. *Phylogenetic study of Cantigi Ungu (Vaccinium varingifolium) based on universal internal transcribed spacer (ITSu) DNA barcoding*. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2260, No. 1, p. 020018). AIP Publishing LLC.
- Chen, G. F., & Schemske, D. W. 2015. *Ecological differentiation and local adaptation in two sister species of Neotropical Costus (Costaceae)*. Ecology, 96(2), 440-449.
- Dash, S., Rahman, S. R., Hines, H. M., & Feng, W. C. 2021. *iBLAST: Incremental BLAST of new sequences via automated e-value correction*. PloS one, 16(4), e0249410.
- Dharmayanti, I. 2011. *Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi*. WARTAZOA, 21(1), 1-10

- Edeoga, H. O., & Okoli, B. E. 1998. *Anatomy and systematics in the Costus afer-C. lucanusianus complex (Costaceae)*. Acta phytotaxonomica et geobotanica, 48(2), 151-158.
- Ekasari, T. W. D., Retnoningsih, A., & Widiarti, T. 2012. *Analisis keanekaragaman kultivar pisang menggunakan penanda PCR-RFLP pada Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA ribosom*. Indonesian Journal of Mathematics and Natural Sciences, 35(1).
- Ekman, S. 1999. *PCR Optimization and Troubleshooting, with Special Reference to the Amplification of Ribosomal DNA in Lichenized Fungi*. Lichenologist. 31 (5), 517- 531.
- Fattah, Y. R., Kamu, V. S., Runtuwene, M. R., & Momuat, L. I. 2014. *Identifikasi barcode tumbuhan gedi merah (Abelmoschus manihot L. medik) dan gedi hijau (Abelmoschus moschatus) berdasarkan gen matK*. Jurnal MIPA, 3(2), 120-124.
- Felsenstein J.1985. *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap*. Evolution 39:783-791.
- Firdaus, D. H. 2021. *Ulul Albab Perspektif Al-Qur'an (Kajian Maudlu'iy dan Integrasi Agama Dan Sains)*. Jurnal Ats-Tsaqofi, 3(1), 97-114.
- Firdausi, F., & Waluyo, B. 2021. *Karakterisasi dan Penilaian Variabilitas Morfologi Bunga Telang (Clitoria ternatea*

- L.) *Asal Pulau Berbeda di Indonesia. Jurnal Produksi Tanaman*, 9(3).
- Frederick, M.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts, John Wiley & Sons, Inc.
- Garcia-Mendoza, A. 1991. *A new species of Costus (Costoideae, Zingiberaceae) from Veracruz, Mexico*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 78(4), 1081-1084.
- Ginger, T. T., Ridley, H. N., & Holttum, R. E. 2003. *A Guide to Ginger Garden at Singapore Botanic Gardens A Guide to Ginger Garden at Singapore Botanic Gardens*. 1–5.
- Indriyani R. 2017. *Keanekaragaman Genetik Padi (Oryza Sativa L.) Lokal Sumatera Utara dengan Menggunakan Penanda Simple Sequence Repeat (SSR)* [skripsi]. Medan: Departemen Biologi FMIPA USU.
- Irsyam, A. S. D., Irwanto, R. R., & Hariri, M. R. 2019. *Catatan Keberadaan Costus afer Ker Gawl. (Costaceae) di Pulau Jawa*. *Floribunda*, 6(2), 64–71.
- Katsir, I. 2008. *Tafsir Ibnu Katsir*. Jakarta: Pustaka Imam Asy Syafi'i.
- Kay, K. M., Reeves, P. A., Olmstead, R. G., & Schemske, D. W. 2005. *Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in neotropical Costus subgenus*

- Costus (Costaceae): evidence from nrDNA ITS and ETS sequences*. American Journal of Botany, 92(11), 1899-1910.
- Kementrian Agama. 2012. *Tafsir al-Quran Tematik Pelestarian Lingkungan Hidup*. Jakarta : Lajnah Pentashih Mushaf Al-Qur'an.
- Kimura M. 1980. *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.
- Lestariningsih, N., & Mulyono, Y. 2017. *Integrasi Nilai-Nilai Keislaman Dalam Kurikulum Dan Perkuliahan Program Studi Tadris Biologi*. Edu Sains: Jurnal Pendidikan Sains dan Matematika, 5(2), 39-49.
- Li, D. M., Wu, W., Liu, X. F., & Zhao, C. Y. 2019. *Characterization and phylogenetic analysis of the complete chloroplast genome sequence of Costus viridis (Costaceae)*. Mitochondrial DNA Part B, 4(1), 1118-1120.
- Maas, P. J. 1972. *Costoideae (Zingiberaceae)*. Flora Neotropica, 8, 1-139.
- Maas, P. J. 1977. *Renealmia (Zingiberaceae-Zingiberoideae) Costoideae (Additions)(Zingiberaceae)*. Flora Neotropica, 18, 1-218.

- Maas-van de Kamer, H., Maas, P. J. M., Wieringa, J. J., & Specht, C. D. 2016. *Monograph of African Costaceae*. Blumea: Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography, 61(3).
- Magoga, G., Fontaneto, D., & Montagna, M. 2021. *Factors affecting the efficiency of molecular species delimitation in a species-rich insect family*.
- Maulidya, N. 2020. *Karakteristik DNA Barcode Anggrek (Phalaenopsis delicata Rchb.f.)*. Universitas Jember.
- Mello, B. 2018. *Estimating timetrees with MEGA and the TimeTree resource*. Molecular Biology and Evolution, 35(9), 2334-2342.
- Meshoul, S., Layeb, A. & Batouche, M. 2005. *A Quantum Evolutionary Algorithm for Effective Multiple Sequence Alignment*. In: Bento, C., Cardoso, A. & Dias, G. (eds.) *Progress in Artificial Intelligence*. 3808 LNCS, Berlin, Springer, pp. 260-271.
- Mulyani, M., Gardens, B., International, C., Husaini, I. P. A., Damayanti, I., Hariri, M. R., & Gardens, B. 2019. *Identifikasi dini jenis-jenis phyllanthus secara in silico*.
- Nurkholidah. 2019. *Karakterisasi Morfologi Dan Barcoding DNA Globba atrosanguinea Teijsm. & Binn. (ZINGIBERACEAE)*. Akses Repository.Uinjkt.Ac.Id.
- Perwitasari, D. A. G., Rohimah, S., Ratnasari, T., Sugiharto, B., & Su'udi, M. 2020. *DNA Barcoding of Medicinal Orchid*

- Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar Using *rbcl* and *ITS* genes. Buletin Penelitian Tanaman Rempah Dan Obat, 31(1), 8.
- Perwitasari, D. A. G., Rohimah, S., Ratnasari, T., Sugiharto, B., & Su'udi, M. 2020. *DNA barcoding anggrek obat Dendrobium discolor* Lindl. Tanimbar menggunakan *gen rbcl* dan *ITS*. Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, 31(1), 8-20.
- Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. 2021. *ASAP: assemble species by automatic partitioning*. Molecular Ecology Resources, 21(2), 609-620.
- Rahayu, D.A., & Nugroho, E.D. 2015. *Biologi Molekuler dalam Perspektif Konservasi*. Yogyakarta, Indonesia: Plantaxia.
- Rugayah, Retnowati, A., Windadri, F. I., & Hidayat, A. 2004. *Pengumpulan Data Taksonomi*. In: Rugayah, Widjaja, E.A., & Praptiwi (eds.). *Pedoman Pengumpulan Data Keanekaragaman Flora*. Bogor: Puslit-LIPI
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. *The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees*. Molecular Biology and Evolution. 4 (4), Oxford University Press (OUP), 406-425
- Salzman, S., Driscoll, H. E., Renner, T., André, T., Shen, S., & Specht, C. D. 2015. *Spiraling into history: a molecular phylogeny and investigation of biogeographic origins and*

- floral evolution for the genus Costus*. Systematic Botany, 40(1), 104-115.
- SBG staff. 2013. *Gardenwise : The Magazine Of The Singapore Botanic Gardens*. Vol. 41. Singapore.
- Senjaya, S. K., Wulansari, T. Y. I., & Astuti, I. P. 2021. *DNA Barcode Arcode of Wild Averrhoa and Interspecific Relationship of The Genus Averrhoa Inferred From Nuclear INTERNAL TRANSCRIBED SPACER AND trnL-F REGIONS*. Buletin Kebun Raya, 24(1), 42-50.
- Sukarjo, I. 2021. *Autentikasi Zingiber album Tumbuhan Endemik Sumatera Menggunakan Penanda Molekuler Internal Transcribed Spacer (ITS)*. Doctoral dissertation, UNIVERSITAS ANDALAS.
- Sun, Y., Skinner, D. Z., Liang, G. H., & Hulbert, S. H. 1994. *Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA*. Theoretical and applied genetics, 89(1), 26-32.
- Su'udi, M. 2018. *Studi in silico potensi DNA barcode pada anggrek langka Paphiopedilum*. BIOSFER: Jurnal Biologi dan Pendidikan Biologi, 3(1), 20-26.
- Suwandi TRR. 1995. *Revisi Marga Costus Linnaeus (Zingiberaceae) di Malesia*. Tesis Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Urmila, N. 2021. *Keragaman Genetik Tumbuhan Kosambi*

(Schleichera oleosa) Berdasarkan Penanda Molekuler ISSR (Internal Simple Sequence Repeat) di Wilayah Malang Raya. UIN Malang

van Balgooy, M.J. 1987. 'Collecting', in de Vogel EF (ed). *Manual of Herbarium Taxonomy Theory and Practice*, pp.14–19, Jakarta: UNESCO for Southeast Asia.

Van, H. T., Nguyen-Phi, N., & Luu, H. T. 2020. *The phylogenetic position of aglaodorum schott (Araceae – aroideae – aglaonemateae)*. *Thaiszia Journal of Botany*, 30(1), 93–101.

Vikassa'adah, A. 2021. *Optimasi Amplifikasi PCR pada Isolat Khamir dari Pencernaan Lebah Madu Apis mellifera menggunakan Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS)*. Doctoral dissertation, UIN Sunan Ampel Surabaya).

LAMPIRAN

Lampiran 1 Dokumentasi Penelitian

Keterangan : A. Pengambilan sampel; B. Ekstraksi DNA; C. PCR; D. Elektroforesis; E. Visualisasi Pita DNA



A



B



C



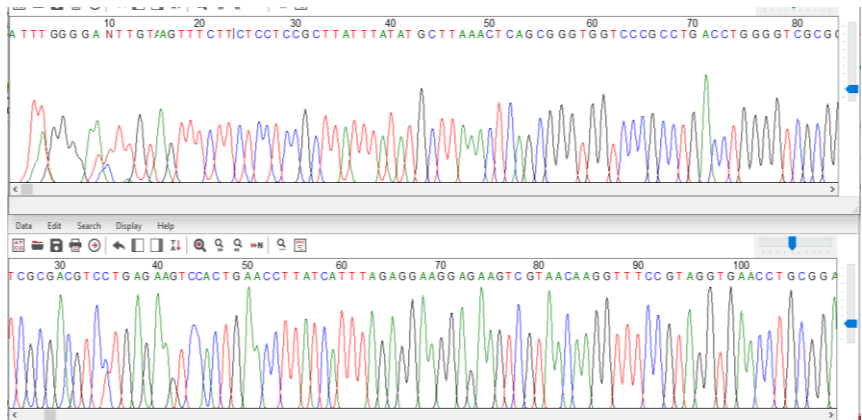
D



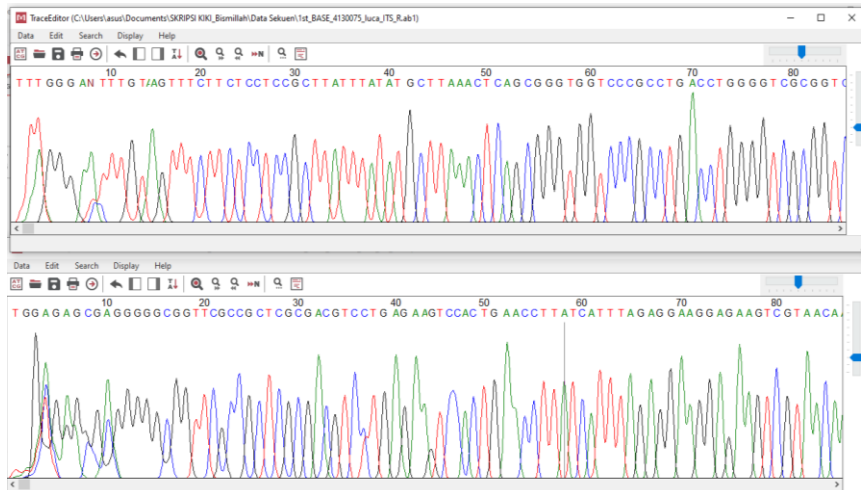
E

Lampiran 2 Kromatogram hasil sekuensing produk PCR dari sampel *C. afer* dan *C. lucanusianus* sekuen ITS

a. *C. afer*



b. *C. lucanusianus*



Lampiran 3 Sekuen hasil contig *C. afer* dan *C. lucanusianus*

a. *C. afer*

GTGGAGTGTTCGGATCGAGGCGACGGGGGCGGTTCGCCGC
TCGCGACGTCCTGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGA
AGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAG
GATCATTTGTCGAGACCTACAAGGAATGACTGCGAATACGTAAA
CCAAGTGTCACTGTTGGCTTTGGCGGGCAAGGTCCCCTTTGGCC
CAGTGGCTTCGTGCGCCAATCCCATCTCATCCCATTGGGGTCG
GATGGGTAGGACGAACCATGAAAGCCCGGCGCAATGGGCGCAA
GGAACACAAACCTCGGGGGCACATGTTTGGGGCCATGTTGGCCT
CTAATGCACTCCCGTGTATGAATCCAAACCTCACATGACTCTCG
GCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAA
ATGTGATATTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAG
TCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCCTTGC GGCTAAGGGCAC
GCCTGCCTGGGCGTCACGCTATCAACGCTCCACACCCATCCCAT
GGCATGGGCAAAGGATGCGGAAGTTGGCCCCCGTGTGCGAGTC
TCCCTTGCAATTTGGTTCGGCCAAAGACTTTGGCTATCGCGTGTCC
CCAAGGACATGATGGGTGGTGGATGCCCTTGAGCATGCTTAAAC
ATTATGCCTTGACACGTGTGCGGCCACGCAGTAACCCCATATTT
GGACCGGACCCCAGGTCAGGCGGGACCACCCGCTGAGTTTAAAG
CATATAAATAAGCGGATGAGAAGAACTTACAAAGATTCCCCT
ATTAACGGCGAGCCA

b. *C. lucanusianus*

TGGAGTGTTCGGATCGAGGCGACGGGGCGGTTTCGCCGCT
CGCGATGTCTTGAGAAGTCCACTGAACCTTATCATTTAGAGGAA
GGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGG
ATCATTGTTCGAGACCCTACAAGGAATGACTGCGAATACGTAAAC
CAAGTGTCACTGTTGGCTTTGGCGGGCAAGGTCCCCTTTGGCCC
AGTGGCTTCGTGCGCCCCATCCCATCTCATCCCATTGGGGTTCGG
ATGGGTAGGACGAACCATGAAAGCCCGGCGCAATGGGCGCCAAG
GAACACAAACCTCGGGGGCACATGTTTGGGGCCATATTGGCCTC
TAATGCACTCCCGTGTATGAATCCAAACCTCACATGACTCTCGG
CAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAA
TGTGATATTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGT
CTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTGCGGCTAAGGGCACG
CCTGCCTGGGCGTCACGCTATCAACGCTCCACACCCATCCCATG
GCATGGGCAAAGGATGCGGAAGTTGGCCCCCGTGTGCGAGGCT
TCCTTGCATTTGGTTCGGCCAAAGACTTTGGCTATCGCGTGTCCC
CAAGGACATGATGGGTGGTGGATGCCCTTGAAGCATGCTTAAACA
TTATGCCTTGACACGTGTTTCGGCCACGACTAACCCCATATTTG
GACCGGACCCAGGTCAGGCGGGACCACCCGCTGAGTTTAAGC
ATATAAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAAGATTCCCCTA
GTAACGGCGAGCG

Lampiran 4 hasil alignment sekuen sampel dan 8 sekuen *C. afer* dan *C. lucanusianus*

Alignment: C:\Users\asus\Downloads\afer-luca.fas

```

          .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                10         20         30         40         50
AY972935.1  ----TTTCGG TAGGTGAACC TGCGGAAGGA TCATTGTCGA GACCCTACAA
KU215039.1  -----TCGA GACCCTACAA
KJ011454.1  -----ACC TGCGGAAGGA TCATTGTCGA GACCCTACAA
AY994749.1  CAGGTTTCCG TAGGTGAACN TGCGGAAGGA TCATTGTCGA GACCCTACAA
KJ011425.1  AAGGTTTCCG TAGGTGAACC TGCGGAAGGA TCATTGTC-A GACCCTACAA
KJ011455.1  AAGGTTTCCG TAGGTGAACC TGCGGAAGGA TCATTGTCGA GACCCTACAA
AY972934.1  ----TTTCGG TAGGTGAACC TGCGGAAGGA TCATTGTCRA GACCCTACAA
AY994744.1  --GGTTTCCG TAGGTGAACC TGCGGAAGGA TCATTGTCGA GACCCTACAA
C. afer KR  AAGGTTTCCG TAGGTGAACC TGCGGAAGGA TCATTGTCGA GACCCTACAA
C. lucanus  AAGGTTTCCG TAGGTGAACC TGCGGAAGGA TCATTGTCGA GACCCTACAA

```

```

          .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                60         70         80         90         100
AY972935.1  GGAATGACTG CGAATACGTA AACCAA-GTG TCACTGTTGG CTTTGGCGGG
KU215039.1  GGAATGACTG CGAATACGTA AACCAA-GTG TCACTGTTGG CTTTGGCGGG
KJ011454.1  GGAATGACTG CGAATACGTA AACCAA-GTG TCACTGTTGG CTTTAGCGGG
AY994749.1  GGAATGACTG CGAATACGTA AACCAAAGTG TCACTGTTGG CTTTGGCGGG
KJ011425.1  GGAATGACTG CGAATACGTA AACCAA-GTG TCACTGTTGG CTTTGGCGGG
KJ011455.1  GGAATGACTG CGAATACGTA AACCAA-GTG TCACTGTTGG CTTTGGCGGG
AY972934.1  GGAATGACTG CGAATACGTA AACCAA-GTG TCACTGTTGG CTTTGGCGGG
AY994744.1  GGAATGACTG CGAATACGTA AACCAA-GTG TCACTGTTGG CTTTGGCGGG
C. afer KR  GGAATGACTG CGAATACGTA AACCAA-GTG TCACTGTTGG CTTTGGCGGG
C. lucanus  GGAATGACTG CGAATACGTA AACCAA-GTG TCACTGTTGG CTTTGGCGGG

```



```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            110         120         130         140         150
AY972935.1 CAAGGTCCCC TTTGGCCCAG TGGCTTCGTG CGCCCCATCC CATCTCATCC
KU215039.1 CAAGGTCCCC TTTGGCCCAG TGGCTTCGTG CGCCCCATCC CATCTCATCC
KJ011454.1 CAAGGTCCCC TTTAGCCCAG TGGCTTCGTG CGCCCCAATCC CATCTCATCC
AY994749.1 CAAGGTCCCC TTTGGCCCAG TGGCTTCGTG CGCCCCATCC CATCTCATCC
KJ011425.1 CAAGGTCCCC TTTGGCCCAG TGGCTTCGTG CGCCCCATCC CATCTCATCC
KJ011455.1 CAAGGTCCCC TTTGGCCCAG TGGCTTCGTG CGCCCCATCC CATCTCATCC
AY972934.1 CAAGGTCCCC TTTGGCCCAG TGGCTTCGTG CGCCCCMATCC CATCTCATCC
AY994744.1 CAAGGTCCCC TTTGGCCCAG TGGCTTCGTG CGCCCCATCC CATCTCATCC
C. afer KR CAAGGTCCCC TTTGGCCCAG TGGCTTCGTG CGCCCCAATCC CATCTCATCC
C. lucanus CAAGGTCCCC TTTGGCCCAG TGGCTTCGTG CGCCCCATCC CATCTCATCC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            160         170         180         190         200
AY972935.1 CATTGGGGTC GGATGGGTAG GACGAACC-A TGAAGCCCG GCGCAATGGG
KU215039.1 CATTGGGGTC GGATGGGTAG GACGAACC-A TGAAGCCCG GCGCAATGGG
KJ011454.1 CATTGGGGTC GGATGGGTAG GACGAACC-A TGAAGCCCG GCGCAATGGG
AY994749.1 CATTGGGGTN GGATGGGTAG GACGAACCCA TGAAGCCCG GCGCAATGGG
KJ011425.1 CATTGGGGTC GGATGGGTAG GACGAACC-A TGAAGCCCG GCGCAATGGG
KJ011455.1 CATTGGGGTC GGATGGGTAG GACGAACC-A TGAAGCCCG GCGCAATGGG
AY972934.1 CATTGGGGTC GGATGGGTAG GACGAACC-A TGAAGCCCG GCGCAATGGG
AY994744.1 CATTGGGGTC GGATGGGTAG GACGAACC-A TGAAGCCCG GCGCAATGGG
C. afer KR CATTGGGGTC GGATGGGTAG GACGAACC-A TGAAGCCCG GCGCAATGGG
C. lucanus CATTGGGGTC GGATGGGTAG GACGAACC-A TGAAGCCCG GCGCAATGGG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            210         220         230         240         250
AY972935.1 CGCCAAGGAA CACAAACCTC GGGGGGCACAT GTTTGGGGCC ATATTGGCCT
KU215039.1 CGCCAAGGAA CACAAACCTC GGGGGGCACAT GTTTGGGGCC ATATTGGCCT
KJ011454.1 CGCCAAGGAA CACAAACCTC GGGGGGCACAT GTTTGGGGCC ATGTTGGCCT
AY994749.1 CGCCAAGGAA CACAAACCTC GGGGGGCACAT GTTTGGGGCC ATATTGGCCT
KJ011425.1 CGCCAAGGAA CACAAACCTC GGGGGGCACAT GTTTGGGGCC ATATTGGCCT
KJ011455.1 CGCCAAGGAA CACAAACCTC GGGGGGCACAT GTTTGGGGCC ATATTGGCCT
AY972934.1 CGCCAAGGAA CACAAACCTC GGGGGGCACAT GTTTGGGGCC ATRITGGCCT
AY994744.1 CGCCAAGGAA CACAAACCTC GGGGGGCACAT GTTTGGGGCC ATGTTGGCCT
C. afer KR CGCCAAGGAA CACAAACCTC GGGGGGCACAT GTTTGGGGCC ATGTTGGCCT
C. lucanus CGCCAAGGAA CACAAACCTC GGGGGGCACAT GTTTGGGGCC ATATTGGCCT

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            260         270         280         290         300
AY972935.1 CTATAATGCA CTCCCGTGTA TGAATCCAAA CCTCACATGA CTCTCGGCAA
KU215039.1 CTA--ATGCA CTCCCGTGTA TGAATCCAAA CCTCACATGA CTCTCGGCAA
KJ011454.1 CTA--ATGCA CTCCCGTGTA TGAATCCAAA CCTCACATGA CTCTCGGCAA
AY994749.1 CTA--ATGCA CTCCCGTGTA TGAATCCAAA CCTCACATGA CTCTCGGCAA
KJ011425.1 CTA--ATGCA CTCCCGTGTA TGAATCCAAA CCTCACATGA CTCTCGGCAA
KJ011455.1 CTATAATGCA CTCCCGTGTA TGAATCCAAA CCTCACATGA CTCTCGGCAA
AY972934.1 CTA--ATGCA CTCCCGTGTA TGAATCCAAA CCTCACATGA CTCTCGGCAA
AY994744.1 CTA--ATGCA CTCCCGTGTA TGAATCCAAA CCTCACATGA CTCTCGGCAA
C. afer KR CTA--ATGCA CTCCCGTGTA TGAATCCAAA CCTCACATGA CTCTCGGCAA
C. lucanus CTA--ATGCA CTCCCGTGTA TGAATCCAAA CCTCACATGA CTCTCGGCAA

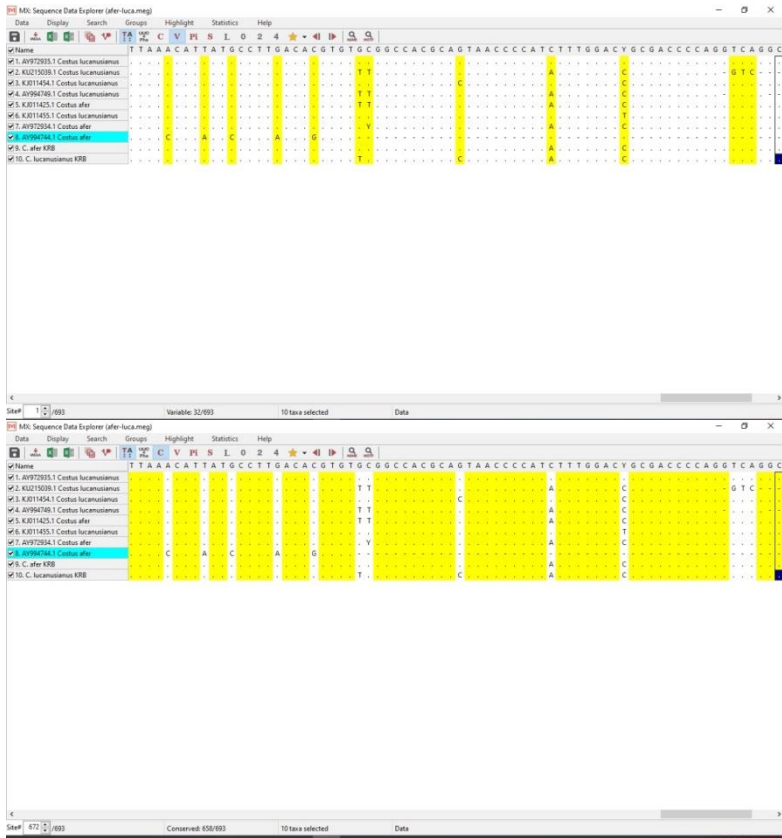
```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ...
            660         670         680         690
AY972935.1 GGACCGCGAC CCCAGGTCAG GCGGGACCAC CCGCTGAGTT TAA
KU215039.1 GGACCGCGAC CCCAG-GTC- -----
KJ011454.1 GGACCGCGAC CCCAGGTCAG GCGGGACCAC CCGCTGAGTT TAA
AY994749.1 GGACCGCGAC CCCAG-TCAG -----
KJ011425.1 GGACCGCGAC CCCAGGTCAG GCGGGACCAC CCGCTGAGTT TAA
KJ011455.1 GGACTGCGAC CCCAGGTCAG GCGGGACCAC CCGCTGAGTT TAA
AY972934.1 GGACCGCGAC CCCAGGTCAG GCGGGACCAC CCGCTGAGTT TAA
AY994744.1 -----
C. afer KR GGACCGCGAC CCCAGGTCAG GCGGGACCAC CCGCTGAGTT TAA
C. lucanus GGACCGCGAC CCCAGGTCAG GCGGGACCAC CCGCTGAGTT TAA

```

Lampiran 5 bagian *Gap variasi* dan *conserve* hasil alignment sekuen sampel dan 8 sekuen *C. afer* dan *C. lucanusianus*.



Lampiran 6 Komposisi nukleotida hasil alignment sekuen sampel dan 8 sekuen *C. afer* dan *C. lucanusianus*

```

1
2 Data Filename: afer-luca.meg
3 Data Title: ITS
4 Nucleotide Frequencies
5 Sites Used: All selected
6 All frequencies are given in percent.
7 Domain: Data
8
9 AY972935.1 Costus lucanusianus      T(U)  C    A    G    total
10 KU215039.1 Costus lucanusianus      21.8  28.1  22.1  28.1  684
11 KJ011454.1 Costus lucanusianus      21.7  28.5  21.9  27.9  627
12 AY994749.1 Costus lucanusianus      21.5  28.8  21.9  27.9  671
13 KJ011425.1 Costus lucanusianus      21.6  28.1  22.2  28.1  662
14 KJ011425.1 Costus afer              21.7  27.9  22.1  28.2  687
15 KJ011455.1 Costus lucanusianus      21.7  27.8  22.2  28.3  690
16 AY972934.1 Costus afer              21.6  28.4  21.9  28.1  676
17 AY994744.1 Costus afer              21.9  27.6  22.0  28.5  617
18 C. afer KRB                          21.5  28.1  22.2  28.2  688
19 C. lucanusianus KRB                  21.7  28.2  22.2  27.9  688
20 Avg.                                  21.7  28.1  22.1  28.1  669
21

```

Lampiran 7 Nilai Treshold distance menggunakan ASAP

Nb of species	Asap score	Treshold dist
6	3.00	0.005350
7	3.00	0.003919
3	4.50	0.008182
10	5.00	0.000000
8	5.00	0.002979
9	5.00	0.001467
4	6.50	0.007336
2	6.50	0.012745

Riwayat Hidup

A. Identitas Diri

1. Nama lengkap : Rifqinur Mahmudah
2. Tempat tanggal lahir : Kudus, 23 Juni 2000
3. Alamat Rumah : Pladen RT 002/RW 005
Kecamatan Jekulo Kabupaten
Kudus
4. No. Hp : 085799782389
5. Email : rifkimahmudah440@gmail.com

B. Riwayat Pendidikan

1. Pendidikan Formal
 - a. MI Raudlatut Tholibin Sidomulyo Kudus
 - b. MTS NU Nurul Ulum Jekulo Kudus
 - c. MA Raudlatul Ulum Guyangan Tragkil Pati
2. Pendidikan Non Formal
 - a. Madin Tarbiyatul Aulad Jekulo Kudus
 - b. PP. Raudlatul Ulum Guyangan Pati
 - c. PP. Darul Falah Besongo Semarang

C. Prestasi

1. Juara 2 MTQ Kabupaten Kudus
2. Juara 1 Olimpiade Ke-NU-an
3. Penerima Beasiswa Bank Indonesia

D. Organisasi

1. HMJ Biologi 2018-2019/2019-2020
2. UKM Risalah FST 2018-2019/2019-2020
3. Komunitas GenBI 2020 dan 2021
4. Wakil Lurah PP. Darul Falah Besongo Semarang 2020-2021

5. PMII FST UIN Walisongo Semarang.