

**BARCODE DNA PADA TANAMAN GAMBIR**  
*(Uncaria gambir (Hunter) Roxb.) BERDASARKAN GEN*  
*Internal Transcribed Spacer-1 (ITS-1)*

SKRIPSI



Oleh :

MELLY  
NIM : 1604040

PROGRAM STUDI SI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA  
PADANG  
2021

**PERNYATAAN ORISINILITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Melly

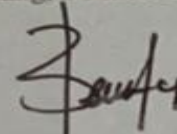
NIM : 1604040

Judul Skripsi : *BARCODE* DNA PADA TANAMAN GAMBIR (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) BERDASARKAN GEN *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1)

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi yang saya tulis merupakan hasil karya saya sendiri, terhindar dan unsure plagiarism, dan data beserta seluruh isi skripsi tersebut adalah benar adanya.
2. Saya menyerahkan hak cipta dari skripsi tersebut Universitas Perintis Indonesia Padang untuk dapat dimanfaatkan dalam kepentingan akademis.

Padang, 2 Maret 2021

  
MELLY

Lembar Pengesahan Skripsi

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

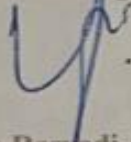
Nama : Melly

NIM : 1604040

Judul Skripsi : *BARCODE* DNA PADA TANAMAN GAMBIR (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) BERDASARKAN GEN *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1)

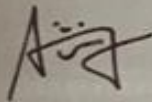
Telah diuji dan disetujui skripsinya sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) melalui ujian sarjana yang diadakan tanggal 02 Maret 2021 berdasarkan ketentuan yang berlaku

Ketua Sidang



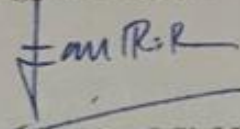
apt. Yahdian Raswadi, M. Farm

Pembimbing I



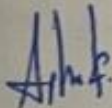
Epi Supri Wardi, M. Si

Anggota Penguji I



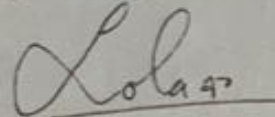
apt. Farida Rahim, S.Si, M. Farm

Pembimbing II



Muthia Miranda Zaunit, S. Pd., M.Si

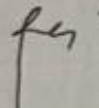
Anggota Penguji II



Apt. Lola Azyenela, M. Farm

Mengetahui :

Ketua Program Studi S1 Farmasi



apt. Revi Yenti, M.Si

## PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*"Sungguh atas kehendak Allah semua ini terwujud, tiada kekuatan kecuali dengan pertolongan Allah" (QS. Al-Kahfi : 39)*

*"Niscaya Allah akan mengangkat (derajat) orang-orang yang diberi ilmu beberapa derajat" (QS. Al-Mujadilah : 11)*

*Syukur alhamdulillah penulis ucapkan kepada Allah SWT yang telah mengizinkan, memberikan kesempatan dan kelancaran dalam menyelesaikan pendidikan S1 farmasi ini. Semoga ilmu yang penulis dapatkan atas ridho-Mu ya Allah . . .*

*Teruntuk Orang tua Tercinta Papa (M. Zailendra) Mama (Mardianis) . .*

*Terimakasih telah memberikan bunsu semangat dan dukungan dalam melalui hari-hari ini, kini telah bunsu gapai sebuah cita-cita yang bunsu persembahkan untuk mama dan papa, semua ini berkat do'a dan air mata disetiap sujud engkau kepada Allah SWT. Tak dapat bunsu temui tulus kasih sayang setulus kasih sayang yang mama dan papa berikan kepada bunsu. Terimakasih telah menjadi pahlawan yang hebat dan luar biasa dalam hidup bunsu. Apapun yang bunsu lakukan dan berikan tidak akan dapat membalas semua jasa dan kasih sayang yang papa dan mama berikan kepada bunsu. Tak banyak yang bisa bunsu lakukan, Semoga dengan tercapai cita-cita bunsu menjadi Sarjana Farmasi bisa membuat papa dan mama bangga. Skripsi ini bunsu Persembahkan untuk Papa dan Mama tercinta . .*

*Teruntuk keluargaku . .*

*Terima kasih atas segala kasih sayang serta dukungan yang engkau berikan kepadaku, engkau menjadikan ku kuat di setiap langkah ku . .*

*Teruntuk semua dosen dan staf Universitas Perintis Indonesia terimakasih untuk ilmu yang sangat berarti semoga berguna dimasa depan. Teristimewa kepada Ibu Epi Supri Wardi, M. Si dan Ibu Muthia Miranda Zaunit, S. Pd., M.Si, sebagai pembimbing yang telah banyak membimbing penulis dengan penuh kesabaran dari awal sampai saat ini serta Bapak apt. Yuhdian Rasyadi, M. Farm sebagai pembimbing akademik yang sudah sangat membantu, membimbing serta menasehati penulis selama ini.*

*Untuk sahabatku "Windi Wildaningsih, Yuni Sapitri, Tika Apriliani, Nissa Pipia, Inesya Ananda, Ayuni norriky akhar" terimakasih untuk kenangan-kenangan selama kita kenal terima kasih banyak atas bantuannya selama ini mulai dari awal sampai mey mendapatkan gelar sarjana. Do'a terbaik dari mey selalu untuk kalian semoga kita bisa menggapai semua cita-cita kita .*

*Untuk abang "Ridho khas illahi" terimakasih banyak atas semangat dan support yang abg berikan untuk mey, udah mau dengarin keluh kesah mey, udah sabar sama mey dan mau nemanin mey kemana pun, terimakasih juga udah nemanin mey sampai mey mendapatkan gelar sarjana (^\_^)*

*Waktu adalah hal yang paling berharga dalam hidup kita dan orang-orang yang rela mengorbankan waktu mereka untuk orang lain pantas mendapatkan rasa hormat dan terima kasih. Terimakasih atas keterlibatan dan waktunya .*

*Untuk teman-temanku "Angkatan 16 (VERENIGEN)" terimakasih telah memberikan semangat, dukungan, nasehat dan membantu penulis dalam menyelesaikan pendidikan S1 Farmasi ini. Dan juga memberikan banyak kenangan suka dan duka selama kita kenal hingga saat ini.*

*Terimakasih ya Allah karena engkau telah mempertemukanku kepada mereka yang selalu setia menemaniku disini. Semoga kita bisa bersahabat selamanya dimanapun kita berada dan semoga ini bukan akhir dari persahabatan kita...*

*Mengeluh hanya akan membuat kita semakin tertekan sedangkan bersyukur akan senantiasa membawa kita pada jalan kemudahan dan syukurilah apapun yang kau miliki saat saat ini karena kau tak akan pernah tau kapan kau akan kehilangannya (^\_^)*

*Once again thanks for all who have helped and supported all this time...*

*Padang 2 maret 2021*

*Mey-Mey*

v

## KATA PENGANTAR



Puji syukur Alhamdulillahrabbi'l'amin penulis ucapkan kehadiran Allah SWT karena berkat rahmat dan kasih sayang-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Shalawat beserta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW serta kepada umatnya hingga akhir zaman, Aamiin.

Penulisan skripsi ini diajukan untuk memenuhi syarat program pendidikan sarjana strata satu di Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia Padang. Judul yang penulis buat adalah "**BARCODE DNA TANAMAN GAMBIR (*Uncaria gambir (Hunter) Roxb.*) BERDASARKAN GEN *Internal Transcribed Spacer-1 (ITS-1)***" Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, dan tidak akan terwujud tanpa partisipasi dan kontribusi dari berbagai pihak. Maka pada kesempatan ini perkenankanlah penulis dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat untuk mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tidak terhingga kepada :

1. Bapak alm. Prof. Dr. apt. Elfi Sahlan Ben selaku Rektor universitas Perintis Indonesia.
2. Ibu Dr. apt. Eka Fitrianda, M.Farm selaku Dekan S1 Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia

3. Ibu apt. Revi Yenti, M.Si selaku Ketua Prodi S1 Farmasi Universitas Perintis Indonesia
4. apt. Yahdian Rasyadi, M.Farm selaku Penasehat Akademik yang telah memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis selama perkuliahan.
5. Ibu Epi Supri Wadi, M.Si sebagai dosen Pembimbing I dan Ibu Muthia Miranda Zaunit, S.Pd, M.Si sebagai dosen pembimbing II yang telah berkenan meluangkan waktu, memberikan petunjuk, ilmu, nasehat, arahan serta bimbingan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
6. Bapak/Ibu Dosen yang telah mendidik dan mencurahkan ilmu selama ini kepada penulis serta Analis Labor Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang telah memberikan kemudahan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Semoga Allah SWT membalas dan melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini. Penulis berharap semoga skripsi ini menjadi sumbangan yang bernilai ilmu pengetahuan dan bermanfaat bagi kita semua. Kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan penyempurnaan skripsi ini. Akhirnya, hanya kepada Allah SWT penulis serahkan segalanya mudah-mudahan dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi kita semua.

Padang, 22 Maret 2021

Penulis

## ABSTRAK

Gambir adalah ekstrak kering dari ranting dan daun tanaman *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. Gambir merupakan tumbuhan yang termasuk dalam famili Rubiaceae dan komoditas perkebunan rakyat memiliki banyak manfaat dan telah digunakan sebagai obat. Identifikasi tumbuhan dilakukan secara morfologi memiliki banyak kelemahan, dengan adanya perkembangan teknologi elektronika dan genetika saat ini telah dikembangkan suatu metode terbaru dalam identifikasi spesies tumbuhan dan hewan, yaitu teknologi *Barcode* DNA yang menggunakan potongan DNA pendek standar. Tujuan penelitian ini adalah Untuk mengetahui kemampuan *Barcode* DNA *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1) dalam mengidentifikasi 4 varietas tanaman gambir: gambir udang, gambir mancik, gambir riau dan gambir cubadak. Produk PCR amplifikasi gen ITS1 dengan primer U1 dan U4 pada 4 varietas gambir menghasilkan pita DNA yaitu 600 bp. Hasil amplifikasi PCR 100%. Hasil Alignment dari sampel gambir primer ITS-U1 didapatkan perbedaan pada rantai DNA: Gambir Cubadak pada urutan 13 bp dan 66 bp dan Gambir Udang Pada urutan 66 bp dan 693 bp. *Barcode* ITS-1 dapat digunakan untuk membedakan varietas *Uncaria gambir* (hunter) Roxb.

**Kata Kunci:** *barcode* DNA, ITS1, *Uncaria gambir*



## ABSTRACT

Gambir is a dry extract from the twigs and leaves of the *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb plant. Gambir is a plant that is included in the Rubiaceae family and community plantation commodities have many benefits and have been used as medicine. Plant identification carried out morphologically has many weaknesses, with the development of electronic and genetic technology when it has developed a new method in the identification of plant and animal species, namely DNA Barcode technology that uses standard short pieces of DNA. The purpose of this study was to determine the ability of the DNA Barcode Internal Transcribed Spacer-1 (ITS-1) in identifying 4 varieties of gambier plants: Gambier Shrimp, Gambier Mancik, Gambier Riau and Gambier Cubadak. The PCR product amplification of the ITS1 gene with primers U1 and U4 on 4 varieties of gambier produced a DNA band of 600 bp. The result of 100% PCR amplification. Alignment results from the primary gambier sample ITS-U1 obtained differences in the DNA chain: Gambier Cubadak on the order of 13 bp and 66 bp and Gambier Shrimp on the order of 66 bp and 693 bp. The ITS-1 barcode can be used to distinguish the *Uncaria gambir* (hunter) Roxb varieties.

**Keywords:** DNA *barcode* , ITS1, *Uncaria gambir*

## DAFTAR ISI

<b>JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>PERNYATAAN ORISINILITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA ..</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PERSEMBAHAN .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>1</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Gambir .....	6
2.1.1 Klasifikasi Gambir .....	6
2.1.2 Nama Daerah .....	7
2.1.3 Deskripsi Tanaman Gambir .....	7
2.1.4 Kandungan Kimia Tanaman Gambir .....	8
2.2 DNA Tumbuhan .....	10
2.2.1 Pengertian DNA .....	10
2.2.2 Struktur DNA .....	10
2.2.3 Isolasi DNA .....	11
2.3 Polymerasi Chain Reaction (PCR) .....	14
2.3.1 Komponen PCR .....	17
2.3.2 Tahapan PCR .....	20
2.4 Elektroforesis .....	22
2.4.1 Pengertian dan Prinsip Kerja Elektroforesis .....	22
2.4.2 Teknik Elektroforesis .....	23
2.4.3 Kegunaan Elektroforesis .....	24
2.6 DNA Barkoding .....	24
2.6.1 Pengertian DNA Barkoding .....	24
2.6.2 Analisis DNA Barkoding .....	26
2.6.3 Manfaat DNA Barkoding .....	26
<b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>27</b>
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan .....	27
3.2 Alat dan Bahan .....	27
3.2.1 Alat Penelitian .....	27
3.2.2 Bahan Penelitian .....	27
3.3 Metoda Penelitian .....	28

3.3.1 Pengambilan Sampel .....	28
3.3.2 Identifikasi Sampel .....	28
3.3.3 Isolasi DNA .....	28
3.3.4 Elektroforesis DNA .....	29
3.3.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	30
3.3.6 Sequencing DNA .....	31
3.3.7 Analisis Barkod DNA .....	31
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Hasil .....</b>	<b>32</b>
4.2 Pembahasan .....	33
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>43</b>
5.1 Kesimpulan .....	43
5.2 Saran .....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>44</b>

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Tanaman gambir .....	6
2. Struktur Katekin .....	9
3. Hasil isolasi DNA .....	36
4. Visualisasi gen ITS1 .....	39
5. Hasil identifikasi Morfologi Gambir.....	47
6. Tanaman gambir.....	48
7. Gen ITS1 Primer U1 .....	49
8. Gen ITS1 Primer U4 .....	50
9. Hasil isolasi DNA .....	51
10. Hasil Isolasi DNA Gambir Uncaria ITS-U1 dan ITS-U4 .....	52
11. Hasil Squensing Forword Gambir Uncaria ITS-U1 .....	53
12. Hasil Squensing Forword Gambir Uncaria ITS-U4.....	54

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Hasil Blast Untuk Sekuens ITS1 Sampel Gambir Riau .....	59
2. Hasil Blast Untuk Sekuens ITS1 Sampel Gambir Mancik .....	60
3. Hasil Blast Untuk Sekuens ITS1 Sampel Gambir Cubadak .....	61
4. Hasil Blast Untuk Sekuens ITS1 Sampel Gambir Udang.....	62
5. Makrokopis tanaman Gambir.....	63

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Bagan Alur Penelitian .....	47
2. Hasil Identifikasi morfologi Sampel Gambir riau .....	48
3. Tanaman Gambir .....	49
4. Gen ITS Primer U1.....	50
5. Gen ITS Primer U4.....	51
6. Hasil Isolasi DNA.....	52
7. Hasil Isolasi DNA Gambir Uncaria ITS-U1 dan ITS-U4.....	53
8. Hasil Squensing Forward Gambir Uncaria ITS-U1 .....	54
9. Hasil Squensing Forward Gambir Uncaria ITS-U4 .....	55
10. Hasil Blast sampel Gambir Riau Gadang.....	56
11. Hasil Blast sampel Gambir Mancik .....	57
12. Hasil Blast sampel Gambir Cubadak .....	58
13. Hasil Blast sampel Gambir udang.....	59
14. Hasil Blast Untuk Sekuens ITS1 Sampel Gambir Riau .....	60
15. Hasil Blast Untuk Sekuens ITS1 Sampel Gambir Mancik.....	61
16. Hasil Blast Untuk Sekuens ITS1 Sampel Gambir Cubadak.....	62
17. Hasil Blast Untuk Sekuens ITS1 Sampel Gambir Udang .....	63
18. Makrokopis tanaman Gambir .....	64
19. Skema Kerja Isolasi DNA .....	65
20. Skema Kerja Isolasi DNA.....	66
21. PCR dan Elektroforesis.....	67

## BAB I.

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Gambir adalah ekstrak kering dari ranting dan daun tanaman *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. Gambir merupakan tumbuhan yang termasuk dalam famili Rubiaceae dan komoditas perkebunan rakyat. Selain digunakan sebagai campuran makanan sirih, gambir juga dapat digunakan sebagai campuran obat tradisional sampai dalam campuran obat bahkan telah dimanfaatkan juga dalam proses industri (Amos, 2004)

Tanaman gambir merupakan tanaman perdu, termasuk salah satu di antara famili *Rubiace* (kopi-kopian) yang memiliki nilai ekonomi tinggi, yaitu dari ekstrak (getah) daun dan ranting. Tanaman gambir mengandung *asam katechu tannat (tanin), katekin , pyrocatecol, florisin, lilin, fixed oil*. Thorper dan Whiteley (1921) mengemukakan bahwa kandungan utama gambir adalah *asam katechu tannat (20-50%), katekin(7-33%), dan pyrocatechol (20-30%)*, sedangkan yang lainnya dalam jumlah terbatas. Bachtiar (1991) menyatakan bahwa kandungan kimia gambir yang paling banyak dimanfaatkan adalah katekin dan tannin.

Sekarang gambir telah banyak diproduksi menjadi beberapa bentuk sediaan obat herbal karena manfaat dan kegunaannya yang bervariasi. Ada dalam bentuk ekstrak sari *uncaria* yang bermanfaat untuk menyembuhkan diabetes (kencing manis) yang telah di uji praklinis di departement farmakologi dan terapautik fakultas kedokteran USU (Unniversitas Sumatera Utara). Teh daun *uncaria* yang bermanfaat untuk menyembuhkan penyumbatan pembuluh darah, serangan jantung, memperbaiki pancreas dan sistem produksi insulin, diabetes dan lain-lainnya.

Gambir juga berfungsi sebagai antibakteri, karena itu gambir diproduksi sebagai obat kumur (Rahmawati *et al.* 2012).

Masyarakat mengenal tanaman *uncaria* gambir hanya satu jenis, sedangkan secara morfologi *uncaria* gambir ada empat varietas gambir, yaitu Udang, Cubadak, Riau, dan Mancik. Diantara empat varietas ini, yang merupakan varietas unggul adalah Udang, Riau, dan Cubadak. Ketiga varietas unggul ini di kenal pada tahun 2007. Potensi hasil (bobot getah kering) ketiga varietas unggul ini cukup tinggi, yaitu mencapai 1.200 kg/ha (Denian *et al.* 2004). Penelitian-penelitian tentang tanaman gambir sangat jauh tertinggal dibandingkan dengan komoditas pertanian lainnya. Saat ini industri gambir membutuhkan pengetahuan tentang varietas gambir yang paling unggul untuk mendapatkan gambir dengan kandungan terbaik.

Untuk mengetahui varietas tanaman gambir yang dilakukan identifikasi. Identifikasi *spesies* tumbuhan awalnya menggunakan metode morfologi yang diidentifikasi dari bentuk fisiknya (bunga, daun, batang, cabang dan biji) (Kalangi *et al.* 2014). Pada pengamatan morfologi membutuhkan seorang pakar taksonomi yang ahli (Sunaryo, 2015). Identifikasi morfologi hanya bisa dilakukan terhadap tanaman utuh, jika tanaman tersebut sudah dalam bentuk ekstrak atau sediaan tertentu tidak dapat lagi diidentifikasi secara morfologinya. Namun, dengan adanya perkembangan teknologi elektronik dan genetika saat ini telah dikembangkan suatu metode terbaru dalam identifikasi spesies tumbuhan dan hewan, yaitu teknologi *Barcode* DNA yang menggunakan potongan DNA pendek standar (Herbert *et al.* 2003).



*Barcode* DNA merupakan salah satu teknik yang di gunakan untuk mempercepat dan mempermudah proses identifikasi organisme menggunakan potongan gen tertentu (Rimbawanton *et al.* 2012). *Barcode* DNA memiliki prinsip dasar yaitu identifikasi menggunakan skuen DNA pendek "barcode" dari bagian standar genom dari spesimen yang sedang diteliti. Peneliti terdahulu sudah menggunakan *barcode* DNA gen *matK* dan *rbcL* untuk mengidentifikasi varietas gambir. Hasil penelitian sebelumnya primer *matK* maupun *rbcL* tidak ada yang dapat membedakan beberapa famili *Rubiaceae*, hanya dapat membedakan sampai tingkat genusnya saja. Berdasarkan Laporan Penelitian (Azma Risilvia Ningsih, 2019). pada Gen *matK* dan *rbcL* dapat disimpulkan bahwa *sequens barcode rbcL* sampel GC (Gambir Cubadak) menghasilkan tingkat kemiripan 99,81% dengan *Uncaria macrophylla*, dan sampel GR (Gambir Riau) menghasilkan tingkat kemiripan 96,84% dengan *Uncaria macrophylla*, sekuens *barcode matK* sampel GR (Gambir Riau) menghasilkan tingkat kemiripan 98,79% dengan *Nauclea diderrichii* dan sampel GK (Gambir Kapsul) menghasilkan tingkat kemiripan 99,75% dengan *Uncaria sp.1 MR-2013*. Dari hasil perbandingan menunjukkan bahwa gen *matK* dan *rbcL* terkonservasi dan tidakmampu untuk membedakan beberapa anggota famili *Rubiaceae* yang berkerabat dekat. Berdasarkan hasil yang didapatkan membuktikan bahwa tidak semua tanaman dapat dibedakan oleh gen *matK* dan *rbcL*.

Untuk mengidentifikasi *barcode* DNA *uncaria gambir* juga bisa menggunakan ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer-1*). ITS adalah daerah ( *non-coding* dan *variable*) gen rRNA 5.8s (pengkodean) yang berguna dalam menganalisis silsilah kekerabatan fungsi karena menunjukkan jauh lebih besar

perbedaan interspesifik dari gen rRNA 18s dan 25s, karena daerah ribosom berevolusi bersama-sama, maka menunjukkan bahwa interspesifik rendah polimorfismer dan variabilitas interspesifik tinggi karena terbukti sangat berguna untuk klasifikasi spesies *saccharomyces* (Zaroso *et al.*, 1999). Wilayah pengkodean ITS 1 dan ITS 2 memiliki evolusi yang lebih cepat bervariasi di antara *spesies* yang berbeda dalam genus. *Amplifikasi PCR* dapat menganalisis identifikasi wilayah ITS *sekuen* DNA dengan polimorfisme yang cukup sehingga berguna untuk mengidentifikasi *spesies* fungi (Chen *et al.*, 2000).

Berdasarkan hal tersebut peneliti tertarik untuk melakukan penelitian terhadap tumbuhan gambir menggunakan *Barcode* DNA dengan *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1) sebagai data inventaris identitas molekuler tanaman Gambir dari Sumatera Barat.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah *Barcode* DNA *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1) dapat mengidentifikasi dan membedakan 4 varietas tanaman gambir: gambir riau gadang, gambir mancik, gambir udang dan gambir cubadak.

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah Untuk mengetahui kemampuan *Barcode* DNA *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1) dalam mengidentifikasi 4 varietas tanaman gambir: gambir riau gadang, gambir mancik, gambir udang dan gambir cubadak.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang *barcode* DNA *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1) yang paling baik dalam mengidentifikasi tumbuhan gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) serta sebagai data inventaris molekuler tanaman dari daerah Sumatera Barat pada *BLAST* di *NCBI*.

**BAB II.**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

**2.1 Tinjauan Botani Tumbuhan Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.)**

**2.1.1 Klasifikasi Tumbuhan gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.)**



**Gambar 2.** Tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.)

Klasifikasi tanaman gambir yaitu sebagai berikut (Haryanto, 2009)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledon
Bangsa	: Rubiales
Family	: Rubiaceae
Marga	: Uncaria
Spesies	: <i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb.

### 2.1.2 Nama Daerah

Menurut Direktorat Obat Asli Indonesia (2007), ada beberapa nama daerah untuk gambir: Sumatera :*gambee, gani, kacu* (Aceh), *sontang* (Batak), *gambe* (Nias), *gambie, gambu, gimber* (Minangkabau), *sepelet* (Lampung). Jawa :*santun* (Jawa); *gambir* (Madura). Nusa Tenggara :*tagambe* (Bima), *gamur* (Sumba). Kalimantan :*kelare, abi, gamer, kamin, sori*. Sulawesi :*gambele, gambere, gambe*. Maluku :*nggame, kame, kampir, kambir, tagabere, gagabere, gabere, gambe*(Musdja, 2011).

### 2.1.3 Deskripsi Tanaman Gambir

Tanaman gambir dapat tumbuh pada ketinggian bervariasi antara 2-500 m dari permukaan laut dan memerlukan cahaya matahari yang banyak dan merata sepanjang tahun.<sup>4</sup> Tanaman ini dapat juga tumbuh dengan baik di daerah tebing dengan aliran air yang baik. Tanaman gambir dapat tumbuh dengan baik di daerah khatulistiwa dengan curah hujan 2.500-3.000 mm per tahun. Daerah penanaman gambir di Indonesia terutama di Sumatera Barat, Indragiri, Kepulauan Riau, Pantai Timur Sumatera, Pulau Bangka Belitung, dan Kalimantan Barat.

Tumbuhan gambir merupakan perdu, memanjat, batang bulat, tidak berambut, mempunyai kait di antara dua tangkai daun yang berhadapan, kecil, pipih. Daun lanset, ujung meruncing dasar tumpul membulat, dengan panjang 8,2–14 cm dan lebar 7,2–8,2 cm. Tangkai daun tidak berambut dengan panjang 0,5–0,8 cm, pertulangan primer pada permukaan daun sebelah bawah menonjol. Bunga majemuk, bentuk bongkol, berhadapan di ketiak daun, tangkai pipih, dengan panjang 0,5–4,2 cm dan diameter bongkol 4,7–5 cm, tabung mahkota pipih, merah, berambut halus, lobus mahkota krem keputihan, daun pelindung

tidak berambut dan langset. Buah berbentuk kapsul, sempit, panjang, dan terbagi menjadi dua belahan. Biji banyak, kecil, halus, berbentuk jarum dan bersayap, dengan panjang 0,4 cm (Sampurno dkk. 2007).

Tanaman gambir memiliki 4 varietas yaitu gambir riau gadang, gambir mancik, gambir cubadak dan gambir udang, yang memiliki perbedaan morfologi dari warna daun dan warna pucuknya. Gambir riau gadang memiliki warna daun hijau tua sedangkan pucuknya berwarna hijau muda permukaan daun kasar dan rucing, kualitas getah daun gambir riau gadang no 3. Gambir mancik Gambir memiliki warna daun hijau tua sedangkan pucuknya berwarna hijau kekuningan permukaan daun mengkilat dan pingir daun bergelombang tetapi daunnya lebih kecil dari gambir riau gadang, kualitas getah daun gambir mancik no 4. Gambir Cubadak memiliki warna daun hijau muda dan pucuknya berwarna hijau kekuningan, daunnya lebih lebar dan besar, permukaan daun agak kasar, pinggir daun bergelombang. Kualitas getah daun gambir no 2. Sedangkan Gambir Udang memiliki warna daun hijau kemerahan dan pucuknya juga berwarna hijau kemerahan, permukaan daun gambir udang mengkilat dan runcing sedangkan kualitas getah daun gambir paling banyak (Sampurno dkk., 2007).

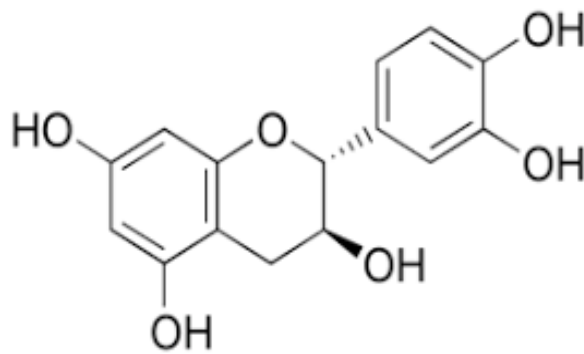
#### **2.1.4 Kandungan Kimia Tanaman Gambir**

Kandungan utama ekstrak Gambir adalah katekin sekitar 7-33%. Selain katekin ekstrak Gambir mengandung bermacam-macam komponen, antara lain : *Asam katechu tarmat* 20-55%, *pyrokatechol* 20-30 %, *gambir floresen* 1-3 %, *katechu merah* 35%, *quersetin* 2-4 %, *fixed oil* 1-2% dan *wax* 1-2 % . Ekstrak (getah) dari daun dan ranting mengandung *asam katechu tannat* (tannin), katekin, *pirokatekol*, *fluorescein*, lilin, minyak lemak. Adanya perbedaan kadar katekin

pada gambir dipengaruhi oleh kondisi daun yang diekstrak. Daun gambir muda memiliki rendemen ekstrak lebih tinggi daripada daun tua (Hilpiani, 2012).

Ekstrak Gambir mengandung senyawa fungsional yang termasuk dalam golongan senyawa polifenol dan senyawa ini merupakan hasil metabolit sekunder tanaman yang menyusun golongan tanin. Salah satu yang termasuk dalam senyawa polifenol adalah flavanoid. Katekin merupakan senyawa golongan tanin oligomeric procyanidin (OPC). Secara farmakologi, opc dan monomernya bersifat seperti flavonoid dan seringkali diklasifikasikan sebagai flavonoid.

Katekin ( $C_{15}H_{14}O_6$ ) merupakan ekstrak dari gambir yang berpotensi sebagai antiinflamasi, antioksidan, antibakteri, antitumor, dan antivirus (Nakagawa, 2005). Katekin terdiri dari katekin (C), epikatekin (EC), epikatekingalat (ECG), epigalokatekin (EGC) dan epigalokatekingalat (EGCG) (Hilpiani, 2012).



**Gambar 4.** Struktur Katekin (Nainggolan, 2013).

Katekin termasuk dalam golongan flavonoid, tidak berwarna, dan dalam keadaan murni sedikit larut dalam air dingin tetapi mudah larut dalam air panas, larut dalam alkohol dan etil asetat. Ketika katekin dipanaskan pada suhu  $110^{\circ}C$  atau dipanaskan dalam larutan alkali karbonat, maka katekin akan kehilangan

sebuah molekul air dan berubah menjadi asam katechu tannat atau tanin. Katekin hampir tidak larut dalam kloroform, benzene dan eter (Musdja, 2011).

Menurut Anggraini *et al.*, (2011) senyawa flavonoid memiliki efek antiinflamasi yang berfungsi sebagai antiradang dan mampu mencegah kekakuan dan nyeri. Katekin merupakan senyawa polifenol yang berpotensi sebagai antioksidan dan antibakteri. Katekin paling banyak terdapat pada tanaman gambir (*Uncaria gambir*).

## **2.2 DNA Tumbuhan**

### **2.2.1 Pengertian DNA**

DNA adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan merupakan pembawa informasi genetic yang diturunkan kepada jasad keturunannya. DNA merupakan materi yang membentuk kromosom-kromosom dan juga merupakan informasi genetik yang tersimpan dalam tubuh makhluk hidup. Informasi genetik ini pada dasarnya merupakan kumpulan instruksi/perintah yang mengatur sel untuk bisa melakukan hal-hal tertentu. DNA singkatan dari *Deoxyribonucleic Acid* atau dalam Bahasa Indonesia disebut dengan Asam Deoksiribosa Nukleat atau ADN. Kata deoxyrybo mengacu pada nama gula yang terkandung dalam DNA, yaitu deoxyrybose (deoksiribosa) (Tohib, 2012).

### **2.2.2 Struktur DNA**

Struktur molekul DNA terdiri atas dua rangkai nukleotida yang tersusun secara linier. Kedua rangkaian yang saling berikatan itu terbentuk seperti tali berpilin, sehingga molekul DNA dikatakan sebagai *double helix* (heliks ganda).

Pada tahun 1953, Watson dan Crick mengemukakan bahwa struktur molekul DNA merupakan rantai heliks ganda yang mempunyai diameter yang



sama dan memutar ke kanan berdasarkan atas foto difraksi sinar X yang dibuat oleh Rosalind Franklin dan Maurice Wilkins (Gaffar, 2007; Yuwono, 2008).

Pada tahun 1950, Chargaff dan koleganya mengemukakan bahwa di dalam hampir semua DNA, terdapat aturan dimana jumlah adenin sama dengan jumlah timin ( $A=T$ ), dan jumlah sitosin sama dengan jumlah guanin ( $C=G$ ). Hasilnya, jumlah keseluruhan purin ( $A+G$ ) sama dengan jumlah keseluruhan pirimidin ( $T+C$ ) (Purves *et al.*, 2003; Raven dan Johnson, 2002). Basa A dari satu nukleotida selalu berikatan dengan basa T dari nukleotida lainnya, sedangkan basa G selalu berikatan dengan basa C. Pasangan A dan T terbentuk dengan dua ikatan hidrogen, sedangkan pasangan G dan C terbentuk dengan tiga ikatan. Oleh karena itu pasangan G dan C lebih stabil dari pada pasangan A dan T (Purves *et al.*, 2003; Yuwono, 2009; Muladno, 2010).

Monomer nukleotida mempunyai gugus hidroksil pada posisi karbon 3', gugus fosfat pada posisi karbon 5' dan basa pada posisi karbon 1' molekul gula. Nukleotida satu dengan lainnya berikatan melalui ikatan fosfodiester antara gugus 5' fosfat dengan 3' hidroksil (Gaffar, 2007; Raven dan Johnson, 2002).

### **2.2.3 Isolasi DNA**

Kemajuan yang telah dicapai dalam bidang bioteknologi dan teknik DNA rekombinan telah membantu mempercepat dan meningkatkan berbagai penelitian menuju kearah pemahaman tentang biosintesis dari metabolit sekunder. Berbagai penelitian telah berhasil mengidentifikasi beberapa enzim yang berperan penting dalam jalan metabolisme, dan telah berhasil dilakukan rekayasa dan manipulasi terhadap enzim-enzim tersebut (Radji, 2005).

Gen adalah unit hereditas suatu organisme hidup. Gen ini dikode dalam materi genetis organisme yang kita kenal sebagai molekul DNA atau RNA pada beberapa virus. Ekspresi gen dipengaruhi oleh lingkungan internal dan eksternal seperti perkembangan fisik atau perilaku dari organisme itu. Gen tersusun atas urutan basa nukleotida, yang terdiri dari daerah yang mengkode suatu informasi genetik (ekson), daerah yang tidak mengkode informasi genetik (intron), serta bahagian yang mengatur ekspresi gen yaitu sekuens pengontrol ekspresi gen (*regulatory sequence*) (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Isolasi DNA merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi analisis DNA yang diperoleh dari kromosom inti maupun dari organel, yaitu mitokondria dan kloroplas. Langkah-langkah yang diperlukan terdiri dari pemecahan membran sel dan membran inti yang dilanjutkan dengan pemisahan DNA dari berbagai komponen sel lain. Isolat DNA harus dijaga agar tidak rusak dan didapatkan dalam bentuk rantai yang panjang (Fatchiyah *et al.* 2011)

Untuk mengisolasi secara spesifik DNA yang mencakupi gen tertentu, dapat dilakukan beberapa teknik, yaitu :

1. Isolasi DNA genom dan dilanjutkan dengan pemotongan DNA genom menggunakan enzim edonuklease restriksi.
2. Mengisolasi m RNA yang merupakan hasil transkripsi gen yang dimaksud kemudian dilanjutkan dengan membuat turunan (complementary DNA/cDNA)
3. Menyintesis nukleotida yang menyusun gen tersebut dengan teknik sintesis kimiawi.

4. Melakukan amplifikasi DNA dengan teknik PCR (Polymerase chain reaction)(Yuwono, 2016).

Tanaman dilindungi oleh membran sel dan dinding sel yang kuat. Membran sel terdiri dari ikatan antara protein dan lemak, sedangkan dinding sel tersusun atas polisakarida. Dinding sel dan membran sel harus dipecah untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel. Penghancuran sel dapat dilakukan dengan cara mekanik, kimiawid an enzimatik. Proses penghancuran sel dipengaruhi oleh jumlah bahan (kuantitas), kondisibahan (kualitas), dan proses penghancuran itu sendiri.(Sri Pujiyanto, 2014)

Materi genetic sering diperlukan sebagai sumber gen untuk diklon. Untuk keperluan ini, proses isolasi mutlak dilakukan sebab isolasi materi genetic merupakan proses untuk mengekstrak (memisahkan) materi genetic dari sel yang mengandung berbagai komponen seperti plasma sel, organel sel, dinding sel, dan membran sel. Proses isolasi RNA secara garis besar terdiri atas tiga tahap yaitu pemecahan sel dan solubilisasi membran, isolasi dan pemurnian RNA, dan pemekatan RNA.(Eskundari, Biokimia, Matematika, Ilmu, & Alam, 2010).

Tahap pemecahan sel dan solubilisasi membran sebaiknya dilakukan secara cepat dan tuntas. Bufer lisis hendaknya secepat mungkin dapat mencapai isi sel untuk menginaktifkan kerja ribonuklease. Tahap isolasi dan pemurnian RNA membutuhkan larutan untuk menghilangkan kontaminan seperti protein dan DNA. Ekstraksi fenol dan kloroform dapat menghilangkan kontaminan protein sedangkan penghilangan kontaminan DNA dapat dilakukan dengan presipitasi litium klorida (LiCl). Pemekatan RNA merupakan tahap akhir dalam proses pemurnian RNA. Cara yang paling efektif untuk memekatkan RNA adalah melalui

presipitasi menggunakan berbagai kombinasi garam dan alkohol. Asam nukleat akan membentuk kompleks dengan garam sehingga membantu pengendapan oleh etanol (Liu et al. 1998).

Hasil isolasi DNA dapat berupa DNA genom, yaitu keseluruhan DNA yang terdapat dalam suatu sel atau DNA fragmen, keduanya dapat digunakan untuk analisis molekuler lanjutan. Tujuan dari isolasi yaitu menghasilkan DNA yang berkualitas serta dapat diukur konsentrasi dan tingkat kemurniannya. DNA yang berkualitas memiliki kontaminan yang rendah dan dapat divisualisasi pada saat elektroforesis (Putri 2010).

Berdasarkan berbagai informasi analisis molekuler gen-gen pembungaan dan perkembangan data-data berupa urutan DNA dan protein, maka penggunaan ilmu komputer dan teknologi informasi sangat penting untuk menganalisis data, khususnya gen-gen yang berupa informasi molekuler (urutan DNA atau protein) sehingga dapat menghasilkan suatu informasi baru (Sartika, 2006).

### **2.3 PCR**

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama, yaitu DNA cetakan, Oligonukleotida primer, Deoksiribonukleotidatriphosfat (dNTP), Enzim DNA Polimerase, dan Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. (Zuhriana K. Yusuf, 2010).

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. PCR ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis. Amplifikasi DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut

amplimers. Primer DNA suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA. PCR memungkinkan dilakukannya pelipatgandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA template (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipat gandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik. Enzim DNA polimerase merupakan enzim termostabil Taq dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. *Deoksiribonukleotida trifosfat* (dNTP) menempel pada ujung 3' primer ketika proses pemanjangan dan ion magnesium menstimulasi aktivasi polimerase (K. Yusuf 2010).

PCR merupakan teknik sederhana yang digunakan untuk memperbanyak molekul DNA secara *in vitro* di dalam laboratorium. Hasil perbanyakan molekul DNA sangat banyak, karena jumlah perbanyakan molekul DNA bertambah secara eksponensial. Oleh sebab itu, ribuan molekul DNA dapat dibuat dalam waktu yang singkat. PCR dapat diaplikasikan dalam analisis genetik, seperti: diagnosis medis, dan forensik. PCR merupakan metode yang sangat sensitif sehingga dari satu pasang molekul DNA dapat diperbanyak menjadi jutaan kali lipat setelah 30-40 siklus PCR. Adapun komponen yang dibutuhkan dalam reaksi PCR adalah DNA target, primer, DNA polimerase, dinukleotida (dNTP), dan buffer PCR (Mullis, 1990).

PCR digunakan untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut melalui bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu *thermocycle*. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit sepasang primer. Primer yang

berada sebelum daerah target disebut primer forward dan yang berada setelah daerah target disebut primer reverse. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA yang baru dikenal disebut enzim polimerase. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP (Muladno, 2010).

PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan, yaitu pemisahan (denaturasi) rantai DNA template, penempelan (*annealing*) pasangan primer pada DNA target dan pemanjangan (*extension*) primer atau reaksi polimerisasi yang dikatalisis oleh DNA polymerase (Gaffar, 2007).

Pada akhir siklus pertama, suatu molekul DNA untai ganda dilipat gandakan jumlahnya menjadi dua molekul DNA untai ganda. Dua molekul DNA untai ganda hasil amplifikasi pada siklus pertama menjadi DNA target dan dilipat gandakan menjadi empat molekul DNA, dan selanjutnya empat molekul baru ini dilipatgandakan lagi jumlahnya menjadi delapan dan seterusnya (Muladno, 2010).

Keberhasilan proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Secara umum suhu denaturasi DNA templat berkisar antara 93 – 95°C, suhu *annealing* yang digunakan berkisar antara 37 - 60°C. Proses ekstensi primer pada proses PCR selalu dilakukan pada suhu 72°C karena suhu tersebut merupakan suhu optimum

polimerase DNA yang biasa digunakan untuk proses PCR (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

### **2.3.1 Komponen PCR**

Beberapa komponen penting yang dibutuhkan dalam reaksi PCR adalah DNA template, sepasang primer oligonukleotida, DNA polymerase, *deoksinukleosida trifosfat* (dNTP), dan larutan buffer (Muladno, 2010; Gaffar, 2007; Sulistyaningsih, 2007):

#### **1. DNA Template**

DNA Template adalah molekul DNA untai ganda yang mengandung sekuen target yang akan diamplifikasi. Ukuran DNA bukan merupakan faktor utama keberhasilan PCR, berapapun panjangnya jika tidak mengandung sekuen yang diinginkan maka tidak akan berhasil proses suatu PCR, namun sebaliknya jika ukuran DNA tidak terlalu panjang tapi mengandung sekuen yang diinginkan maka PCR akan berhasil. Konsentrasi DNA juga dapat mempengaruhi keberhasilan PCR. Jika konsentrasinya terlalu rendah maka primer mungkin tidak dapat menemukan target dan jika konsentrasi terlalu tinggi akan meningkatkan kemungkinan mispriming. Disamping itu perlu diperhatikan kemurnian template karena akan mempengaruhi hasil reaksi.

#### **2. Primer**

Susunan primer merupakan salah satu kunci keberhasilan PCR. Pasangan primer terdiri dari 2 oligonukleotida yang mengandung 18 - 28 nukleotida dan mempunyai 40-60% GC content. Sekuen primer yang lebih pendek akan memicu amplifikasi produk PCR non spesifik. Ujung 3' primer penting dalam menentukan spesifisitas dan sensitivitas PCR. Ujung ini tidak boleh

mempunyai 3 atau lebih basa G atau C, karena dapat menstabilisasi annealing primer non spesifik. Disamping itu ujung 3' kedua primer tidak boleh komplementer satu dengan yang lain, karena hal ini akan mengakibatkan pembentukan primer-dimer yang akan menurunkan hasil produk yang diinginkan. Ujung 5' primer tidak terlalu penting untuk annealing primer, sehingga memungkinkan untuk menambahkan sekuen<sup>14</sup> tertentu misalnya sisi restriksi enzim, start codon ATG atau sekuen promoter. Konsentrasi primer biasanya optimal pada 0,1-0,5  $\mu$ M. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan menyebabkan mispriming (penempelan pada tempat yang tidak spesifik) dan akumulasi produk non spesifik serta meningkatkan kemungkinan terbentuk primer-dimer, sebaliknya bila konsentrasi primer terlalu sedikit maka PCR menjadi tidak efisien sehingga hasilnya rendah.

### 3. DNA polymerase

DNA polymerase adalah enzim yang mengkatalisis polimerisasi DNA. Dalam perkembangannya, kini banyak digunakan enzim Taq DNA polymerase yang memiliki keaktifan pada suhu tinggi sehingga penambahan enzim tidak perlu dilakukan disetiap siklus dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin (Gaffar, 2007).

Enzim Taq DNA polymerase terdiri atas dua macam yaitu enzim alami yang diisolasi dari sel bakteri *Thermus aquaticus* dan enzim rekombinan yang disintesis didalam sel bakteri *Escherichia coli* (Muladno, 2010). Enzim ini masih mempunyai aktivitas eksonuklease dari 5' ke 3' tetapi tidak mempunyai aktivitas eksonuklease dari 3' ke 5'. Konsentrasi enzim yang dibutuhkan untuk PCR biasanya 0,5-2,5 unit. Kelebihan jumlah enzim mengakibatkan



akumulasi produk non spesifik, sedangkan jika terlalu rendah maka dihasilkan sedikit produk yang diinginkan (Sulistyaningsih, 2007).

#### 4. *Deoxynucleotide Triphosphate* (dNTP)

*Deoxynucleotide Triphosphate* merupakan material utama untuk sintesis DNA dalam proses PCR yang terdiri dari dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP. Konsentrasi dNTP masing-masing sebesar 20-200  $\mu$ M dapat menghasilkan keseimbangan optimal antara hasil, spesifisitas dan ketepatan PCR. Konsentrasi masing-masing dNTP harus seimbang meminimalkan penggabungan.

*Deoxynucleotide Triphosphate* akan menurunkan  $Mg^{2+}$  bebas sehingga mempengaruhi aktivitas polymerase dan menurunkan annealing primer. Konsentrasi dNTP yang rendah akan meminimalkan mispriming pada daerah non target dan menurunkan kemungkinan perpanjangan nukleotida yang salah. Oleh karena itu spesifisitas dan ketepatan PCR meningkat pada konsentrasi dNTP yang lebih rendah (Sulistyaningsih, 2007).

#### 5. Larutan buffer

Larutan buffer yang biasa digunakan untuk reaksi PCR mengandung 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, dan 1,5 mM  $MgCl_2$ . Optimalisasi konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  merupakan hal yang penting (Sulistyaningsih, 2007).

#### 6. Kofaktor Ion Metal

Magnesium klorida merupakan kofaktor esensial untuk DNA polymerase yang digunakan di dalam PCR dan konsentrasinya harus dioptimasi untuk setiap sistem primer: template Keberadaan ion magnesium yang bebas penting sebagai kofaktor enzim dalam PCR. Konsentrasi ion ini

mempengaruhi beberapa hal yaitu annealing primer, suhu pemisahan untai template dan produk PCR, spesifisitas produk, pembentukan primer-dimer serta aktivitas dan ketepatan enzim Taq Polymerase. Konsentrasi ion magnesium harus melebihi total konsentrasi dNTP. Biasanya, untuk memulai proses optimasi, sebanyak 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ditambahkan ke dalam PCR yang didalamnya terdapat 0.8 mM dNTP, sehingga terdapat sekitar 0.7 mM magnesium bebas untuk DNA polymerase. Secara umum, ion magnesium harus divariasikan dalam seri konsentrasi dari 1.5-4.0 mM (Sulistyaningsih,2007).

### **2.3.2 Tahapan PCR**

Berikut ini merupakan tahapan yang terjadi pada proses PCR (Muladno, 2010; Gaffar, 2007; Sulistyaningsih, 2007):

#### **1. Denaturasi**

Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusnya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan (Gaffar, 2007). Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu 90-95°C selama 3 menit untuk meyakinkan bahwa molekul DNA yang ditargetkan ingin dilipat gandakan jumlahnya benar-benar telah terdenaturasi menjadi untai tunggal. Untuk denaturasi berikutnya, waktu yang diperlukan hanya 30 detik pada suhu 95°C atau 15 detik pada suhu 97°C (Muladno, 2010).

Suhu denaturasi dipengaruhi oleh sekuen target. Jika sekuen target kaya akan G-C maka diperlukan suhu yang lebih tinggi. Suhu denaturasi yang

terlalu tinggi dan waktu denaturasi yang terlalu lama mengakibatkan hilangnya atau berkurangnya aktivitas enzim Taq polymerase. Waktu paruh aktivitas enzim tersebut adalah >2 jam pada suhu 92,5°C, 40 menit pada 95°C dan 5 menit pada 97,5°C (Muladno, 2010 dan Sulistyaningsih, 2007).

## 2. *Annealing*

Pada tahap penempelan primer (*annealing*), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing* ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada template. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 50-60 °C. Spesifisitas PCR sangat tergantung pada *temperature melting* ( $T_m$ ) primer, yaitu suhu dimana separuh jumlah primer menempel pada template. Temperatur penempelan yang digunakan biasanya 5 °C di bawah  $T_m$ , dimana formula untuk menghitung  $T_m = 4\text{ °C (G+C)} + 2\text{ °C (A+T)}$ . Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya (Muladno, 2010). Selanjutnya, DNA polimerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya (Gaffar, 2007). Suhu dan lamanya waktu yang dibutuhkan untuk *annealing* primer juga tergantung pada komposisi basa, panjang, dan konsentrasi primer (Sulistyaningsih, 2007).

## 3. Reaksi polimerisasi

Umumnya reaksi polimerisasi (*extension*) atau perpanjangan rantai, terjadi pada suhu 72 °C karena merupakan suhu optimum Taq polymerase. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi

3'nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan template oleh DNA polymerase (Gaffar, 2007).

Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan antara 35 sampai 100 nukleotida per detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam, dan molekul DNA target. Dengan demikian, untuk produk PCR sepanjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap pemanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR, waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit, sehingga seluruh produk PCR diharapkan berbentuk DNA untai ganda (Muladno, 2010).

## **2.4 Elektrofisis**

### **2.4.1 Pengertian dan Prinsip kerja elektroforesis**

Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimiawi dari molekul (Titrawani, 1996). Pemisahan dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran berat molekul dan muatan listrik yang dikandung oleh makro-molekul tersebut. Bila arus listrik dialirkan pada suatu medium penyangga yang telah berisi protein plasma maka komponen-komponen protein tersebut akan mulai bermigrasi (Ricardson *dkk.* 1986).

Elektroforesis adalah suatu teknik yang mengukur laju perpindahan atau pergerakan partikel-partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Prinsip kerja dari elektroforesis berdasarkan pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), dalam hal tersebut DNA, yang bergerak menuju kutub positif (anode),

sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (anode). Hasil DNA elektroforesis harus dibandingkan dengan DNA marker. Marker adalah segmen DNA yang spesifik dan telah diketahui ukurannya. Marker berfungsi sebagai acuan untuk mengetahui ukuran DNA hasil ampifikasi. DNA Marker yang terdapat di dalam ruang elektroforesis berfungsi sebagai penanda posisi pasangan basa dari molekul DNA yang bermigrasi (Thopsonm & Fritchman 2012: 124 – 144).

Lokasi fragmen DNA yang terbentuk seperti pita – pita pada elektroforesis dapat diamati secara spesifik dengan menggunakan pewarna. Pewarna tersebut dapat berupa etidium bromida atau gel red. Etidium bromida memiliki kelebihan yaitu mudah digunakan dan akan menghasilkan warna terang apabila terpapar sinar UV. Kelebihan gel red yaitu tidak memiliki sifat mutagen seperti etidium bromida (Thopsonm& Fritchman 2012: 124 – 144).

#### **2.4.2 Teknik elektroforesis**

Teknik elektroforesis dapat dibedakan menjadi dua cara, yaitu: elektroforesis larutan (*moving boundary electrophoresis*) dan elektroforesis daerah (*zone electrophoresis*). Pada teknik elektroforesis larutan, larutan penyangga yang mengandung makromolekul ditempatkan dalam suatu kamar tertutup dan dialiri arus listrik. Kecepatan migrasi dari makromolekul diukur dengan jalan melihat terjadinya pemisahan dari molekul (terlihat seperti pita) di dalam pelarut. Sedangkan teknik elektroforesis daerah adalah menggunakan suatu bahan padat yang berfungsi sebagai media penunjang yang berisi (diberi) larutan penyangga (Thopsonm & Fritchman 2012: 124 – 144).

Media penunjang yang biasa dipakai adalah gel agarose, gel pati, gel poliakrilamida dan kertas selulose poliasetat. Elektroforesis daerah disebut sebagai elektroforesis gel dengan dua buah model yaitu horizontal dan vertikal. Metode yang biasa digunakan adalah model horizontal, karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu peralatan yang digunakan sangat sederhana, relatif murah dan pemisahan untuk enzim tertentu dapat menghasilkan pemisahan yang lebih baik.

### **2.4.3 Kegunaan elektroforesis**

Elektroforesis digunakan untuk mengamati hasil amplifikasi dari DNA. Hasil elektroforesis yang terlihat adalah terbentuknya band yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi dan menunjukkan potongan-potongan jumlah pasangan basanya (Klug & Cummings 1994: 397).

## **2.5 Barkod DNA**

### **2.5.1 Pengertian Barkod DNA**

DNA *barcoding* merupakan salah satu teknik yang di gunakan untuk mempercepat dan mempermudah proses identifikasi organisme menggunakan potongan gen tertentu (Rimbawanton *et al.* 2012). DNA *barcoding* memiliki prinsip dasar yaitu identifikasi menggunakan skuen DNA pendek "*barcode*" dari bagian standar genom dari spesimen yang sedang diteliti. Urutan *barcode* akan di bandingkan dengan pustaka sekuen *barcode* yang telah diketahui identitasnya. Apabila hasil perbandingan antara sekuen yang diteliti sesuai dengan pustaka, maka specimen tersebut diidentifikasi sebagai specimen dari pustaka. Namun jika tidak sesuai, maka dapat mengarah kepada sekuen baru untuk spesies baru (Hajibabeei *et al.*, 2007). Identifikasi spesies berbasis DNA merupakan metoda

yang cepat dan konsisten sehingga dapat dipertanggung jawabkan ( Irawan *et al*, 2016). Hal tersebut dikarenakan karakter DNA yang relatif lebih konstan dibandingkan karakter morfologi (Hidayat *et al*,2008).

Hebert *et al* (2003) menjelaskan bahwa Barkod DNA merupakan teknik untuk membedakan *spesies* dan mengidentifikasi suatu spesimen dengan menggunakan sekuen pendek dari sebuah gen yang posisinya di dalam genom yang telah terstandarisasi (disepakati bersama) yang disebut sebagai "DNA Barkoding". Menurut Krees dan Erickson (2009) Barcode DNA adalah proses dimana satu atau lebih sekuen gen pendek yang diambil dari bagian genom standar suatu spesies yang kemudian digunakan untuk mengidentifikasi spesies tersebut. Barcode DNA adalah sebuah teknik identifikasi organisme dengan menggunakan potongan gen tertentu yang telah teruji kemampuannya untuk membedakan pada tingkat spesies.

*Barcode* DNA adalah sebuah sistem baru yang dirancang untuk memberikan yang cepat, akurat, dan identifikasi spesies automatable dengan menggunakan singkat, daerah gen standar sebagai tag spesies internal. Sebagai akibatnya, akan membuat sistem taksonomi Linnaean lebih mudah diakses, dengan manfaat bagi ekologi, konservasi, dan keanekaragaman lembaga dibebankan dengan pengendalian hama, spesies invasif, dan keamanan pangan. Secara lebih luas, DNA *barcode* memungkinkan akan memiliki akses mudah ke nama dan atribut biologis dari setiap spesies di planet ini. Selain menugaskan spesimen untuk spesies yang diketahui, *Barcode* DNA akan mempercepat laju penemuan spesies dengan memungkinkan taksonomi dengan cepat mengurutkan spesimen dan dengan menyorot taksa yang berbeda yang mungkin merupakan

spesies baru. Dengan meningkatkan kemampuan mereka dengan cara ini, *Barcode* DNA menawarkan taksonomi kesempatan untuk memperluas, dan akhirnya selesai, persediaan global keanekaragaman kehidupan (Hebert *et al.*, 2003).

### **2.5.2 Analisis Barkod DNA**

Penganalisaan *Barcode* DNA pada tanaman dilakukan dengan mengisolasi dan mengamplifikasi gen-gen genom kloroplas yaitu gen *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *ITS1* dan *ITS2*. Semakin banyak jumlah perbedaan urutan basa DNA dua organisme, maka jarak kekerabatan/hubungan filogenetik mereka semakin jauh. Hasil dari *sequencing* terhadap ruas pendek gen-gen tersebut yang kemudian dimasukkan dalam data base yang meliputi seluruh tanaman ataupun hewan yang telah terkarakterisasi urutan basanya pada sekuen pendek gen-gen, serta informasi taksonomi tanaman atau hewan yang bersangkutan.

### **2.5.3 Manfaat Barkod DNA**

Manfaat Barkod DNA yaitu (Savolainen V *et al* 2005) :

1. Sumber alat identifikasi standar dan teknologi tinggi, misalnya untuk biomedis (parasit dan vektor), pertanian (hama), pengujian lingkungan dan adat (perdagangan spesies yang terancam punah)
2. Meringankan beban besar identifikasi dari taksonomi, sehingga mereka dapat fokus pada tugas yang lebih penting seperti pembatasan taksa, menyelesaikan hubungan mereka dan menemukan dan mendeskripsikan spesies baru.
3. Menyediakan alat bio-keaksaraan bagi masyarakat umum
4. Dapat mencegah terjadinya tindakan kriminal seperti penyelundupan satwa liar, pemalsuan.



## **BAB III. METODE PENELITIAN**

### **3.1 Waktu Dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus 2020 – Maret 2021 bertempat di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan adalah mortal, geneJET genomic DNA purification columns pre assembled with collection tube, lemari pendingin 20°C,-80° C dan 15°C, collection tube (2 ml), gelas ukur (Iwaki<sup>®</sup>), timbangan digital (ADAM<sup>®</sup>), autoklaf (Hirayama<sup>®</sup>), sentrifugator (Corning<sup>®</sup>), mikropipet dan mikrotip (eppendorf<sup>®</sup>), apparatus elektroforesis (Power-Rad<sup>™</sup>), mesin PCR (Bio Rad<sup>®</sup>), Nanodrop, aluminium foil, label, spatel, UV transiluminator, alat sekuensing DNA.

#### **3.2.2 Bahan**

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah daun gambir, primer ITS1 forward ITS- U1 5'- GGA AGK ARA AGT CGT AAC AAG G -3' dan reverse ITS- U4 5'- RGT TTC TTT TCC TCC GCT TA -3' . Master mix untuk PCR *mytag<sup>™</sup>HS Red mix bioline*, Primer ITS U1(reverse) dan ITS U4 (forward), *Agarose*, aquadest, ddH<sub>2</sub>O PCR, GelRed,TBE, 2x buffer CTAB, β-*Mercaptoethanol*, *Phenol*, *Chloroform*,*Isoamylalkohol*, *Isopropanol*, natrium asetat, etanol 99% dingin, etanol 70%, 1x Buffer TE, *Agarose*, 0,5x TBE, *ethidium bromide*, λ DNA 50ng, sampel DNA, 10x BPB,DNA *template*.

### **3.3 Metoda Penelitian**

#### **3.3.1. Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel daun gambir sebanyak 10 helai masing-masing varietas(riau,mancik,cubadak,udang)dilakukan di Siguntur Pesisir Selatan.( lampiran 2,gambar 3 )

#### **3.3.2 Identifikasi Gambir**

Daun Gambir diidentifikasi di Herbarium ANDA Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Andalas. .( lampiran 1,gambar 1 )

#### **3.3.3 Isolasi DNA**

Isolasi DNA tanaman gambir menggunakan metode CTAB yang dikembangkan oleh Doyle (1987) dengan sedikit modifikasi oleh (Muhammad Fadli, 2016). Dipipet CTAB 5 mL dimasukkan kedalam *beaker glass*, dipipet  $\beta$ -*Mercaptoethanol* 1% 1/10 CTAB (50 $\mu$ l) dicampurkan, ditutup dengan Alumenium Foil inkubasi 65°C hingga panas. DNA diisolasi dari daun muda tanaman gambir.Daun tanpa tulang daun dimbil sebanyak 10 lembar digerus dengan mortal sampai halus, lebih cepat lebih baik. Sekitar 300 mg jaringan yang sudah digerus dimasukkan ke dalam *tube eppendorf* 2ml yang steril. Ditambahkan 1 mL 2x buffer ekstraksi CTAB +  $\beta$ -*Mercaptoethanol* 1% hangat dan dibolak balik. Divortex sampai semuanya tercampur rata, kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dan dibolak-balik setiap 10 menit sekali. Ditambahkan 500  $\mu$ l Campuran Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) kemudian diratakan dengan cara membolak balik selama 1 menit.

Disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Dilakukan pemisahan supernatan ke dalam *tube eppendorf* 2 ml yang baru dan steril.

Ditambahkan 500  $\mu$ l chloroformisoamilakohol (24:1), tabung dibolak balik selama 10 menit. Dilakukan sentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke *tube eppendorf* 1,5 ml baru yang steril dan ditambahkan 1/10 kali volume larutan natrium asetat dan 1ml ethanol 99% dingin, kemudian tabung dibolak balik selama 1 menit sampai terlihat benang-benang halus.

Untuk mendapatkan DNA pada dasar *tube eppendorf* dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Larutan dibuang dan pelet DNA dicuci dengan 500  $\mu$ l ethanol 70% dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, larutan ethanol dibuang. DNA dikeringkan pada suhu ruang di atas tissue. Dilarutkan kembali dengan 1x Buffer TE 100 $\mu$ l dan disimpan sebagai stok pada suhu -20°C.

#### **3.3.4 Elektroforesis**

Hasil Isolasi DNA diperiksa menggunakan gel agarosa 1.5%. Gel dibuat dengan melarutkan 1 gram bubuk agarosa dalam 100 mL 0,5x TBE buffer kemudian dihomogenkan dan dipanaskan dengan *microwave* hingga mendidih. Setelah agarose larut, ke dalam botol Scott ditambahkan 1 tetes ethidium bromida, kemudian kocok sebentar. Selanjutnya dituangkan pada cetakan gel yang sebelumnya telah ditempatkan *comb* (sisir) untuk membuat lubang/sumur dan didiamkan hingga gel mengeras. Gel agarose yang sudah beku direndam secara submarine atau direndam dalam *running buffer*. DNA hasil isolasi di pipet 2 $\mu$ l dan 1 $\mu$ l loading buffer (BPB) ke dalam masing-masing *tube eppendorf*, dicampurkan dan dimasukkan ke dalam sumur gel, penanda berat molekul di satu sumur lainnya diisidengan standar lamda ( $\lambda$ ) 3  $\mu$ l, lalu siap untuk diload pada

gel agarosa 1.5% dalam buffer TBE 0,5X.. Seterusnya gel agarose dijalankan dengan teknik elektroforesis pada tegangan 120 volt selama 60 menit. Setelah itu hasil elektroforesis didokumentasikan dengan *gel doc* (Biometra Jerman).

### 3.4.5 PCR dan Elektroforesis

Setelah primer disusun dan disintesis, kemudian dilakukan kegiatan amplifikasi DNA yang telah diisolasi. Amplifikasi menggunakan primer yang telah desain dilakukan dengan teknik PCR Gradient (Biometra Jerman). Reaksi PCR menggunakan *KOD Master Mix Blue*. Kondisi akhir tiap reaksi yaitu:

**Tabel I.** Amplikasi DNA dan komposisi reaksi PCR gen ITS-U1 dan ITS-U4

No	Komponen PCR	Konsentrasi awal	Konsentrasi awal	Volume ( $\mu$ L)
1	MyTaq <sup>TM</sup> HS Red Mix Bioline	2x	1x	12,5
2	Primer ITS $\mu$ 1	10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	1
3	Primer ITS $\mu$ 4	10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	1
4	ddH <sub>2</sub> O	-	-	9,5
5	Sampel DNA	-	-	1
Volume Akhir				25

**Tabel II.** Program Running PCR

No	Tahapan PCR	Suhu ( $^{\circ}$ C)	Durasi	siklus
1	Denaturasi Awal	95	1 menit	35 kali
2	Denaturasi Akhir	95	15 detik	
3	Annealing	50	15 detik	
4	Elongasi	72	10 detik	
5	Elongasi Akhir	72	10 menit	

Setelah reaksi PCR selesai, dilakukan elektroforesis kembali DNA hasil amplifikasi dipipet dimasukan kedalam sumur sebanyak 3  $\mu$ l dan penanda berat molekul di satu sumur lainnya diisi dengan 3  $\mu$ L DNA Ladder 1 kb. Setelah lubang-lubang pada gel selesai diisi, tangki elektroforesis diberi aliran listrik. Sisi

yang berisi hasil amplifikasi diberi arus negatif. Proses elektroforesis dijalankan selama 60 menit pada voltase 120 volt. Setelah proses *running* selesai, gel diamati di atas UV trans-illuminator dan didokumentasikan dengan kamera digital (Fatimi, 2010).

#### **3.4.6. Sequencing DNA**

Proses sekuensing hasil PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dilakukan dengan mengirim sampel ke *FirstBase* Singapura.

#### **3.4.7 Analisis barkod DNA**

Kromatogram DNA hasil *sekuensing* disunting menggunakan *software BioEdit*. Bagian awal DNA dihapus kira-kira 30 bp dan pembacaan nukleotida yang keliru diperbaiki berdasarkan tingkat keakuratan terbaca. Untuk keakuratan amplifikasi gen target diuji dengan memprediksi urutan asam amino berdasarkan sekuens *Internal Transcribed spacer-1* (ITS-1) dilakukan identifikasi melalui *BLAST* ke *NCBI*.

## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil

Dari Penelitian yang telah dilakukan di dapatkan hasil

1. Secara morfologi sampel diidentifikasi di laboratorium Herbarium Fakultas Biologi Universitas ANDA menunjukkan spesies *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. dengan family *Rubiceae* (lampiran 1).
2. Primer yang digunakan dalam *forward* ITS- U1 5'- GGA AGK ARA AGT CGT AAC AAG G -3' dan *reverse* ITS- U4 5'- RGT TTC TTT TCC TCC GCT TA -3' (Lampiran 3, Gambar 7 ; Lampiran 4, Gambar 8)
3. Hasil Isolasi DNA dari 4 tumbuhan *Uncaria gambir* (gambir riau gadang, gambir mancik, gambir cubadak dan gambir udang) berupa larutan jernih tidak berwarna (bening). (lampiran 5, gambar 9)
4. Hasil amplifikasi DNA sampel gambir untuk gen ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer-1*) dengan primer ITS-U1 dan ITS-U4 dari 4 tumbuhan gambir uncaria (gambir riau gadang, gambir mancik, gambir cubadak dan gambir udang) diperoleh ukuran panjang fragmen DNA pada rentang 600 bp (gambar 5).
5. Hasil *sequencing* dari produk PCR gen ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer-1*) dengan primer ITS-U1 dan ITS-U4 menghasilkan kromatogram yang mempunyai nilai HQ 99,29% untuk sampel Gambir Riau gadang , 98,89% untuk sampel Gambir mancik , 99,02% untuk sampel Gambir Cubadak dan 98,89% untuk gambir udang.

Produk PCR amplifikasi gen ITS-1 dengan primer ITS-U1 dan ITS-U4 pada varietas gambir menghasilkan pita DNA yaitu 600 bp.

6. Hasil *alignment* dari sampel gambir primer ITS-U1 (forward) didapatkan perbedaan pada rantai basa DNA gambir Cubadak 13 dan 66 bp, pada rantai basa DNA gambir Udang 66 dan 693 bp.(tabel V)

## 4.2 Pembahasan

Sampel *uncaria* gambir (gambir riau gadang, gambir mancik, gambir cubadak dan gambir udang) yang digunakan diambil dari daerah di Siguntur kabupaten Pesisir Selatan. Setelah pengambilan sampel dilakukan identifikasi menggunakan metode morfologi konvensional yang diidentifikasi dari bentuk fisiknya seperti bunga, daun, batang, cabang, dan biji (Kalangi *et al.*, 2014). Hasil identifikasi yang dilakukan di laboratorium Herbarium ANDA Fakultas Biologi Universitas Andalas sampel yang telah diambil adalah Tumbuhan *Uncaria* gambir (Hunter) Roxb. untuk sampel gambir yang diujikan (Gambir Riau Gadang, Gambir Mancik, gambir Cubadak dan Gambir Udang). Metode identifikasi konvensional memiliki kelemahan yaitu membutuhkan waktu yang lama, relatif mahal, dipengaruhi oleh lingkungan sehingga keragaman identifikasi yang diperoleh terbatas, tidak bisa mengidentifikasi tumbuhan jika sudah dalam bentuk sediaan dan tidak konsisten serta hanya bisa diterapkan pada tanaman dewasa. Selain itu pengamatan morfologi membutuhkan seorang pakar taksonomi yang sampai saat ini jumlahnya sangat terbatas (Virgilio *et al.*, 2012). Setelah sampel diidentifikasi kemudian baru dilakukan isolasi DNA.

Bagian tumbuhan yang diambil adalah daun. Bagian daun yang dipilih untuk digunakan dalam isolasi DNA karena di dalam DNA pada daun terdapat kloroplas yang mengandung gen ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer-1*). Daun diambil tanpa tulang daun untuk memudahkan proses penggerusan, sebelum proses penggerusan sampel daun gambir diperkecil dengan cara dipotong agar ukuran partikelnya kecil dan ditambahkan dengan nitrogen cair agar teksturnya menjadi renyah dan memudahkan dalam proses penggerusan.

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *KIT GeneJET Plant Genomic DNA Purification columns pre assembled*. Prinsip dari isolasi ini yaitu, penambahan *Lysis Buffer* untuk proses penghancuran membran dan dinding sel dari daun tersebut, pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA (Giacomazzi *et al.*, 2005). Pada proses lisis dengan menggunakan detergen, sering digunakan sodium dodecyl sulphate (SDS) sebagai tahap pelisisan membran sel. Detergen tersebut selain berperan dalam melisis membran sel juga dapat berperan dalam mengurangi aktivitas enzim nuklease yang merupakan enzim pendegradasi DNA (Switzer, 1999).

Kualitas DNA dapat ditentukan oleh keberadaan kontaminasi RNA, protein, lipid, dan konstituen sel lainnya yang berhubungan dengan enzim restriksi, ligase, dan DNA termotabil, yang lebih penting adalah preparasi harus terbebas dari polymerase DNA yang dapat merusak DNA (Merante *et al.*, 1998). *KIT GeneJET Plant Genomic DNA Purification columns pre assembled* menggunakan *Precipitation Solution* untuk mengendapkan protein-protein yang terbawa pada saat proses lisis DNA, dan penambahan



*Wash Buffer* berfungsi untuk proses pencucian atau pemurnian DNA yang didapatkan. Kemudian ditambahkan *Elution Buffer* untuk menarik dan melarutkan DNA yang terdapat di dalam *Spin Coloum (Ependorf)*.

Hasil isolasi DNA tanaman gambir di nanodrop untuk menguji konsentrasi DNA dengan DNA/RNA calculator.

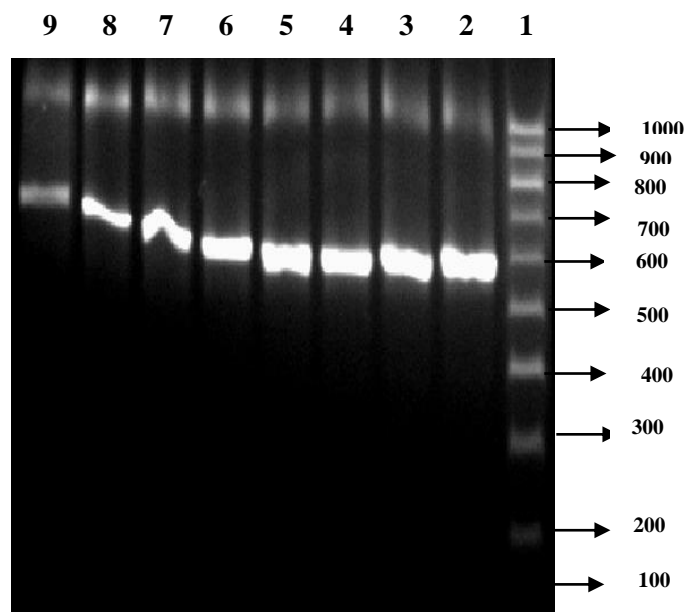
**Tabel III.** Hasil isolasi DNA

No	Sampel ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	Sampel Type
1	DNA 1	172,8	ng/μl	1,23	DNA
2	DNA 1	171,7	ng/μl	1,23	DNA
3	DNA 2	132	ng/μl	1,11	DNA
4	DNA 2	125,2	ng/μl	1,1	DNA
5	DNA 3	133,6	ng/μl	1,35	DNA
6	DNA 3	134,5	ng/μl	1,36	DNA
7	DNA 4	97,7	ng/μl	1,05	DNA
8	DNA 4	97,8	ng/μl	1,04	DNA

Dari hasil pengukuran tingkat kemurnian hasil isolasi DNA pada (tabel III) diatas menunjukkan bahwa sampel keempat sampel gambir (riau gadang, mancik, cubadak, udang) menghasilkan DNA yang masih mengandung kontaminan. Menurut Fatchiyah *et al.*, 2011 Hasil isolasi DNA murni (tidak kontaminan) sekitar 1,7 - 1,8 ng/μl namun hasil isolasi DNA yang diperoleh tidak ada yang mencapai rentang tersebut. Penyebabnya terlalu sedikit DNA yang terambil sehingga DNA berbobot berat tidak terambil dan jumlah DNA yang terambil pun menjadi sedikit , serta adanya kontaminasi terhadap hasil isolasi DNA yang telah dipakai sebelumnya.

Hasil isolasi DNA yang sudah di tambahkan dengan primer ITS-U1 dan ITS-U4 berupa larutan jernih tidak berwarna (bening) yang menunjukkan bahwa tidak adanya klorofil daun yang larut dalam larutan buffer yang digunakan selama proses isolasi DNA (lampiran 6,gambar 10).

Hasil isolasi berupa DNA dilihat visualisasinya menggunakan elektroforesis dengan gel agarose 1,5 % dan dialiri listrik dengan voltase 120 volt selama 60 menit. Prinsip kerja dari proses elektroforesis yaitu sampel ditempatkan didalam sumur kemudian ditambah larutan penyangga dan dialiri oleh aliran listrik, molekul sampel akan bergerak ke matrik salah satu kutub listrik yang sesuai dengan muatannya. Untuk DNA akan bergerak dari muatan negatif ke muatan positif karena DNA bermuatan negatif. Setelah proses *running* selesai maka untuk melihat hasil elektroforesis media agar ditempatkan dibawah lampu UVtrans-illuminator 250 nm dan dilihat dengan menggunakan computer.



**Gambar 5.** hasil isolasi DNA gambir, ket: 1=Marker, 2&3= Gambir Riau Gadang+barcod, 4&5= Gambir Mancik+barcod, 6&7= Gambir Cubadak+barcod, 8&9= Gambir Udang+barcod

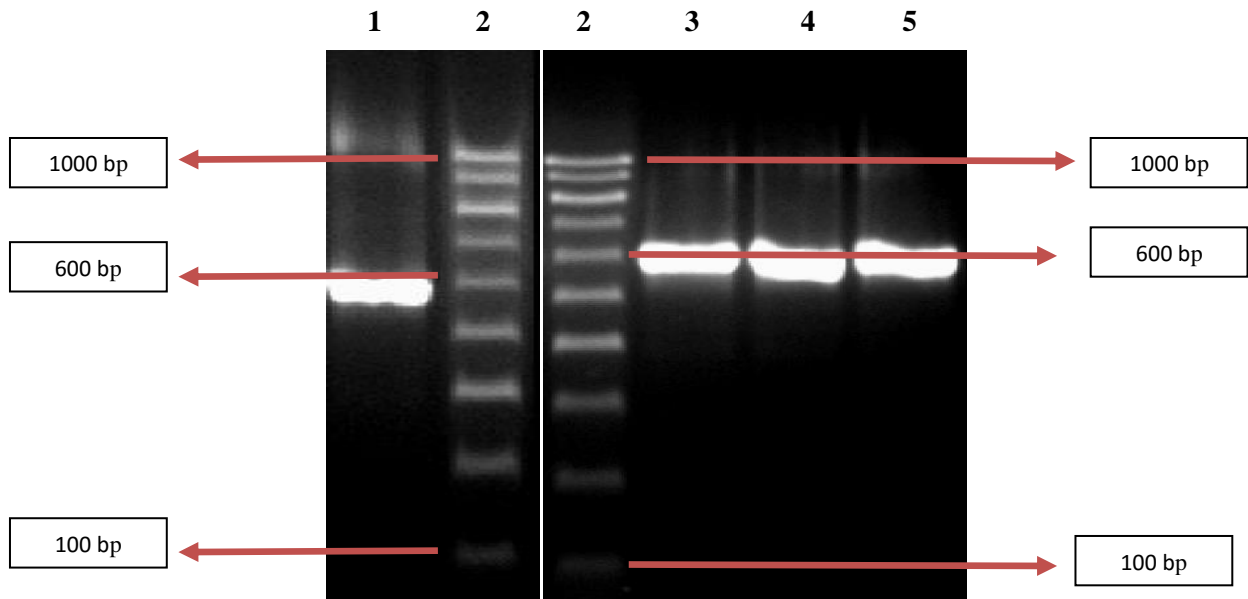
Terbentuknya pita DNA pada hasil elektroforesis menunjukkan adanya DNA(Gambar 5). Hasil elektroforesis yang digunakan adalah Gambir Udang karena panjang urutan ITS-1 primer U1 dan U4 pada urutan basa 600 bp . Hasil visualisasi isolasi DNA dengan menggunakan gel agarose 1.5% kemudian

dilakukan Pengenceran. Pengenceran dilakukan agar pita yang didapatkan sama tebalnya dengan DNA Marker sehingga memiliki konsentrasi yang kurang lebih sama dengan DNA marker. Setelah dilihat adanya DNA pada proses elektroforesis kemudian dilanjutkan dengan proses PCR untuk menggandakan DNA yang terbentuk. Untuk mendapatkan fragmen DNA target, yaitu ITS-1 dengan Primer U1 dan U4 maka DNA hasil isolasi, diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan *Dream Taq Green Master Mix* untuk sampel tumbuhan gambir. PCR digunakan untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut melalui bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu *thermocycle* (Muladno, 2010).

Pada proses PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan, yaitu pemisahan (*denaturasi*) rantai DNA template, penempelan (*annealing*) pasangan primer pada DNA target dan pemanjangan (*extension*) primer atau reaksi polimerisasi yang dikatalisis oleh DNA polimerase (Gaffar, 2007). Produk PCR dikirim untuk sekuensing ke 1<sup>st</sup> Base singapura didapatkan hasil sekuensing yang di BLAST ke NCBI. Beberapa factor yang mempengaruhi keberhasilan amplikasi PCR adalah kemurnian DNA hasil ekstrasi primer spesifik yang digunakan efisiensi dan optimasi kondisi PCR yang tepat terutama pada proses *annealing* (penempelan primer) (Ekman 1990).

Tingkat keberhasilan dari proses PCR untuk ke 4 varietas tanaman gambir dengan menggunakan *barcode* ITS-1 dengan primer U1 dan U4 adalah 100 %. Dimana *barcode* ITS-1 ini didapatkan hasil PCR untuk varietas tanaman gambir.

Dibandingkan dengan *barcode* DNA tumbuhan yang digunakan sebelumnya yaitu *rbcL* dan *matK*.



**Gambar 6.** Visualisasi gen ITS (*Internal Transcribed spacer*) Ket:1. *Uncaria gambir* riau gadang, 2. Merker, 3. *uncaria gambir* mancik, 4. *uncaria gambir* cubadak, 5. *uncaria gambir* udang

Hasil elektroforesis PCR menunjukkan untuk primer ITS-1 (*Internal Transcribed spacer-1*) Gambir Riau Gadang, Gambir Mancik, Gambir Cubadak, Gambir Udang berada pada rentang antara 600 bp. Dari hasil visualisasi diatas *Uncaria gambir* riau gadang pada urutan basa DNA 600 bp, *Uncaria gambir* mancik, *Uncaria gambir* cubadak, dan *Uncaria gambir* udang pada urutan basa DNA 600 bp (gambar 6). Tingkat keberhasilan PCR dapat di tuliskan dalam bentuk persentase keberhasilan PCR dimana di hitung dengan jumlah berapakai suatu sampel berhasil di amplifikasi dibagi dengan total amplifikasi yang dilakukan dan didapatkan hasil untuk sampel Gambir Riau Gadang persentasenya 99.29%, untuk sampel Gambir Mancik 98.89%, untuk Gambir Cubadak 99.02%, sedangkan untuk Gambir Udang persentasenya 98.89%.

Hasil PCR kemudian disekuensing di *FirstBase* di Singapura. Tujuan dari *sequencing* adalah untuk menentukan urutan basa DNA dalam *seqmen* molekul DNA yang relatif pendek sehingga memungkinkan untuk mengetahui kode genetik dari molekul DNA. Prinsip dari *sequencing* DNA adalah memproduksi seperangkat fragmen DNA yang berbeda-beda ukurannya tetapi salah satu ujungnya selalu sama kemudian fragmen tersebut dipisahkan menggunakan Elektroforesis Gel Poliakrilamid atau *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) agar pembacaan sequens dapat dilakukan. Amplikon yang berhasil diurutkan di laboratorium *FirstBase* Singapura diperoleh urutan basa nukleotida dari masing-masing sampel, merupakan hasil yang baik, hal ini menyatakan bahwa proses *sequencing* yang dilakukan berhasil.

Kromatogram dari hasil *sekuensing* yang berkualitas tinggi, dimana puncak yang dihasilkan jelas dan tidak saling tumpang tindih antara puncak yang satu dengan yang lainnya. Nilai HQ merupakan nilai yang menggambarkan tentang kualitas dari puncak kromatogram hasil *sekuensing*. Dimana semakin tinggi nilai HQ suatu kromatogram maka semakin bagus pula bentuk pucak kromatogram tersebut (Kolondam, *et.al*). Angka yang tertera pada puncak-puncak kromatogram tersebut menunjukkan panjang dari basa nukleotida DNA yang didapatkan. Nilai % HQ kromatogram menunjukkan nilai 100% untuk gen ITS-1 sampel Gambir Riau Gadang, untuk sampel Gambir mancik menunjukkan nilai HQ 98%, untuk sampel Gambir Cubadak menunjukkan nilai HQ 97%, sedangkan untuk sampel Gambir Udang menunjukkan nilai HQ 98%.

Pada hasil *alignment uncaria* gambir (gambir riau, gambir mancik, gambir cubadak dan gambir udang) dengan primer ITS-U1 perbedaan dapat di lihat pada (lampiran 3,gambar 7).

**Tabel IV.** Hasil BLAST di NCBI

NO	Nama Varietas Gambir	Hasil BLAST	Kemiripan
1.	Gambir Riau Gadang	Lampiran 8	99.29 %
2.	Gambir Mancik	Lampiran 9	98.89%
3.	Gambir Cubadak	Lampiran 10	99.02%
4.	Gambir Udang	Lampiran 11	98.89%

Pada hasil BLAST di NCBI sampel gambir uncaria dari ke 4 sampel diatassecara berurutan gambir (riau, mancik, cubadak dan udang) dapat dilihat dengan jelas bahwa *sequens barcode* ITS-1 sampel Gambir Riau Gadang menghasilkan tingkat kemiripan 99,29% dengan *Uncaria macrophylla*, sampel Gambir Mancik menghasilkan tingkat kemiripan 98,89% dengan *Uncaria macrophylla*, sampel Gambir Cubadak menghasilkan tingkat kemiripan 99,02% dengan *Uncaria macrophylla*, dan sampel Gambir Riau Gadang menghasilkan tingkat kemiripan 98,89% dengan *Uncaria macrophylla* (table IV). Di NCBI tidak ada hasil data sekuens *uncaria* gambir yang menyatakan kemiripan dengan *Uncaria macrophylla*. Karna belum ada yang meneliti barcode DNA pada tanaman gambir (*uncaria* gambir (hunter) roxb.) berdasarkan gen *internal transcribed spacer-1* (ITS-1).

**Tabel V.** Perbedaan pada hasil *alignment*

Nama/ bp	1	3	13	14	15	22	23	32	36	66	692	693	697
Gambir Riau	-	T	C	N	C	N	T	C	C	C	-	G	C
Gambir Mancik	-	T	C	N	C	N	T	C	C	C	-	G	C
Gambir cubadak	G	N	G	G	A	T	-	-	A	T	A	G	A
Gambir udang	G	N	C	G	A	T	-	-	A	A	A	A	A

Pada hasil *alignment uncaria* gambir dari ke 4 sampel diatas secara berurutan gambir (riau, mancik, cubadak dan udang) dapat dilihat dengan jelas perbedaannya pada urutan panjang 1 bp basa DNA - -GG ini mungkin disebabkan karna ada pengotor. urutan panjang 3 bp basa DNA T T N N, urutan panjang 31 bp basa DNA C C G C Perbedaan terlihat jelas di gambir cubadak, urutan panjang 14bp basa DNA N N G G, urutan panjang 15 bp basa DNA C C A A, urutan panjang 22 bp basa DNA N N T T, urutan panjang 23 bp basa DNA T T - - ,urutan panjang 32 bp basa DNA T T - -, urutan panjang 36 bp basa DNA C C A A, urutan panjang 66 bp basa DNA C C T A, urutan panjang 692 bp basa DNA - - A A, urutan panjang 693 bp basa DNA G G G A Perbedaan terlihat jelas A pada gambir udang , urutan panjang 697 bp basa DNA C C A A (tabel V)

Peneliti terdahulu sudah menggunakan barcode DNA gen *matK* dan *rbcL* untuk mengidentifikasi varietas gambir. Hasil penelitian sebelumnya primer *matK* maupun *rbcL* tidak ada yang dapat membedakan beberapa famili *Rubiaceae*, hanya dapat membedakan sampai tingkat genusnya saja. Berdasarkan Laporan Penelitian (Azma Risilvia Ningsih, 2019). pada Gen *matK* dan *rbcL* dapat disimpulkan bahwa *sequens* barkod *rbcL* sampel GC (Gambir Cubadak)

menghasilkan tingkat kemiripan 99,81% dengan *Uncaria macrophylla*, dan sampel GR (Gambir Riau) menghasilkan tingkat kemiripan 96,84% dengan *Uncaria macrophylla*, sekuens barkod matK sampel GR (Gambir Riau) menghasilkan tingkat kemiripan 98,79% dengan *Nauclea diderrichii* dan sampel GK (Gambir Kapsul) menghasilkan tingkat kemiripan 99,75% dengan *Uncaria sp.1 MR-2013*. Dari hasil perbandingan menunjukkan bahwa gen matK dan rbcL terkonservasi dan tidak mampu untuk membedakan beberapa anggota famili *Rubiaceae* yang berkerabat dekat. Berdasarkan hasil yang didapatkan membuktikan bahwa tidak semua tanaman dapat dibedakan oleh gen matK dan rbcL.

Hasil identifikasi melalui *Blast* di *NCBI* menunjukkan bahwa sampel tanaman Gambir (*Uncaria Gambir* (Hunter) Roxb.) memiliki 4 varietas gambir (riau, mancik, cubadak dan udang). Produk PCR amplifikasi gen ITS-1 dengan primer U1 dan U4 pada varietas gambir menghasilkan pita DNA yaitu 600 bp. Hasil amplifikasi PCR 100%. Hasil Alignment dari sampel gambir primer ITS-U1 5'- GGA AGK ARA AGT CGT AAC AAG G -3' (*forward*) didapatkan perbedaan pada rantai DNA: Gambir Cubadak pada urutan 13 bp dan 66 bp dan Gambir Udang Pada urutan 66 bp dan 693 bp. karna hasil perbandingan menunjukkan bahwa Gen *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1) mampu untuk membedakan beberapa Varietas (*Uncaria Gambir* (Hunter) Roxb.) yaitu gambir cubadak dan gambir udang. Berdasarkan hasil yang didapatkan membuktikan bahwa tanaman Gambir (*Uncaria Gambir* (Hunter) Roxb.) dapat dibedakan oleh Gen *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1) .



## BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa sekuens *barcode* ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer-1*) yang digunakan pada *uncaria* gambir (riau gadang, mancik, cubadak dan udang) menunjukkan hasil amplifikasi PCR 100%. Hasil *Alignment* dari sampel gambir primer ITS- U1 5'- GGA AGK ARA AGT CGT AAC AAG G -3' (*forward*) didapatkan perbedaan pada rantai DNA: Gambir Cubadak pada urutan 13 bp dan 66 bp dan Gambir Udang Pada urutan 66 bp dan 693 bp. *Barcode* ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer-1*) Primer *forward* ITS- U1 5'- GGA AGK ARA AGT CGT AAC AAG G -3' dan *reverse* ITS- U4 5'- RGT TTC TTT TCC TCC GCT TA -3 dapat digunakan untuk membedakan varietas *Uncaria gambir (hunter) Roxb.*

### 5.2 Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk mengoptimalkan penggunaan *barcode* ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer-1*), seperti memperluas daerah ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer-1*) yang diamplifikasi sehingga bisa meningkatkan kemampuan diferensiasi *barcode* ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer-1*)

## DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, Tai, Yoshino, Itani. 2011. Antioxidative Activity, and Catechin Content of Four Kinds of *Uncaria Gambir* Extracts from West Sumatra Indonesia. *African Journal of Biochemistry Research* 5(1): 33-38.
- Amos. 2004. *Teknologi Pasca Panen Gambir*. Jakarta: BPPT Press
- Azma Risilvia ningsih (2019) Barkod DNA pada tanaman gambir (*uncariagambir*(hunter) roxb.) Berdasarkan gen *matk* dan *rbcl*
- Bakhtiar, A 1991. Manfaat Tanaman Gambir. Makalah Penataran Petani dan Pedagang Pengumpul Gambir di Kecamatan Pangkalan Kab. 50 Kota 29-30 November 1991. FMIPA Unand. Padang 23 hal.
- Denian, A., Daswir, Andria, Nurmansyah, Z. Hasan, Jamalius, I. Kusuma, Jarnaris dan Hadad EA., 2004. Penampilan Tiga Calon Varietas Unggul Gambir di Sumatra Barat. Prosiding Simposium IV Hasil Penelitian Tanaman Perkebunan. Bogor 28-30 September 2004. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Bogor.
- Eskundari ratna dewi. 2010. Isolasi dan karakterisasi fragmen gen Leafy dari bantalan Bungan kakao. Institute Pertanian Bogor.
- Fatimi, Humairah. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Palembang: Program studi Ilmu Biomedik, Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya.
- Fatchiyah, E.L., Arumingtyas, S, Widyarti., dan S, Rahayu. 2011. *BiologiMolekuler Prinsip Dasar Analisa*. Penerbit Erlangga.Malang.191 hal.
- Frinanda, Efrizal dan Rahayu. 2014. “Efektivitas Gambir ( *Uncaria Gambir* Pada, *Roxb .) Sebagai Anti Hiperkolesterolemia Dan Stabilisator Nilai Darah Uncaria, Mencit PutihJantan ( Mus Musculus ) Effectivity of Gambier ( Hyperc, Gambir Roxb .)as Anti Value, Holesterolemic and Stabilizer.*” Pp.231 – 237.
- Gaffar, S. 2007. *Diktat Buku Ajar Lekul, Bioteknologi Molekul*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert1, P. D. N. & Hickey, D. A. (2007). DNA Barcoding: How it Complements Taxonomy, Molecular Phylogenetics and Population Genetics. *Trends in Genetics*, 23(4).
- Haryanto, S. 2009. *Ensiklopedi Tanaman Obat Indonesia*. Yogyakarta: Palmal.
- Hebert, Cywinska, Ball, and Waard. 2003. Identifications and Biological Royal, Through DNA Barcodes. *Proceedings of the Science., Society B: Biological* 313 – 321.
- Hidayat, T. & Pancoro, A. (2008). Kajian Filogenetik Molekuler dan Peranannya

dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal Agro Biogen*. 4(1), 3540.

Hidayat, T., Kusumawaty, D., Kusdianti., Yati, D. D., Muchtar, A. A. & Mariana, D. (2008). Analisis Filogenetik Molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) Menggunakan Urutan Basa DNA Daerah Internal Transcribed Spaces (ITS). *Jurnal Matematika dan Sains*,13(1), 16-21.

Hilpiani, D. 2012. Uji Toksisitas Akut Isolat Katekin Gambir Dari Fase Etil Asetat Terhadap Mencit Putih Jantan Secara In Vivo. *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif.

Irawan, P. D., Tallei, T. E. & Kolondam, B. J. (2016). Analisis Sekuen dan Filogenetik Beberapa Tumbuhan *Syzygium* (Myrtaceae) di Sulawesi Utara berdasarkan Gen matK. *Jurnal Ilmiah Sains*, 16(2), 43-50.

Kalangi C dan Kumaunang M. 2014. DNA Tanaman Leilem Minahassae L.) Berdasarkan Gen MatK. *Clerodendrum*. 3(2), Pp.108 – 112.

Klug and Cummings. 2003. *Genetics a Molecular Perspective* . Upper Saddle River. NJ: Pearson Education, Inc.

Kress and Erickson. 2008. Barcoding: Genes Genomics And Bioinformatics. *Proceedings Of The USA, National Academy of SciencesDNA*. 105: 2761 – 2762.”

Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika, Edisi Kedua*. Bogor: IPB Press.

Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 3:56-65.

Musdja, Yanisand Peter. 2012. *Efek Imunomodulator, Aktifitas Antibakteri Bahan Dan Atsiri, Campuran Bahan Menyirih Serta Perbandingan Komposisi Minyak Menyirih, Daun Sirih Dengan Campuran Bahan, . Disertasi*. Jakarta: UI FakultasKedokteran.

Nainggolan dan Parhusip. 2013. *Gambir, Teknologi Perbenihan Tanaman . Utara*, Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sumatera.

Purves *et al*. 2003. *Biology*. Life: The Science of USA, Barnes & Nobles.

Radji, M. (2005). Peranan Bioteknologi Dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2(3), 113–126. <https://doi.org/10.7454/psr.v2i3.3388>

Rahmawati, Bakhtiar, dan Putra. 2012. *Isolasi Katekin Dari Gambir (Uncaria Gambir ( Hunter ). Roxb ) Untuk Sediaan Farmasi*, 1(September), Pp.6 – 10.

Raven and Johnson. 2002. *Biology*. McGraw, 6th Ed. New York: - Hill Companies, Inc.

Rimbawanto, A., B. Leksono, dan widyatmoko.2012. bioteknologi hutan untuk

produksi dan konservasi sumber daya hutan. prosiding balai besar penelitian bioteknologi dan pemuliaan tanaman hutan ; yogyakarta 9 oktober 2012. seminar nasional bioteknologi hutan. hlm 11-20.

Sampurno, Ketut, Niniek, Evie, Sidik, Masjihoer, Suwidjio, Wahjo, Sri, Purbandin, Pudjiasih T, Ebet D, Isnaeni, any K. 2007. *Acuan Sediaan Herbal, Deputi Bidang Pengawasan Obat Tradisional, Kosmetik Dan Produk Komplemen*. Jakarta: Badan POM RI.”

Sri Pujiyanto, R. S. F. (2014). *Buku guru menjelajah dunia biologi* (jilid 3; Eka Sandra Aryani, Ed.). solo: Tiga Serangkai Pustaka Mandiri.

Savolainen, Cowan, Vogler, Roderick and Lane. 2005. Towards Writing the Encyclopaedia of Life: An Introduction to DNA Barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 360:1805–1811.

Suherdi, A. Denian dan H. Syamsu. 1991. Budidaya dan pasca panen gambir serta permasalahannya. Biro Bina Pengembangan Sarana Perekonomian, Dati I Sumbar. Padang.

Sulistyaningsih, E. 2002. Polymerase Chain Reaction: Era Baru Diagnosis Dan Manajemen Penyakit Infeksi. *Biomedis*, 1 (1) : 17 – 25.”

Sunaryo, W. 2015. *Review : Aplikasi DNA Barcoding Untuk Analisis Keragaman Genetik Durian ( Durio Zibethinus x Kutejensis ) Asal Kalimantan Timur,*” 1(September), Pp.1273 – 1277.

Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Tohib. 2012. “*Macam Metode Isolasi DNA*. [Http://Www.Tohib.Web.Id](http://Www.Tohib.Web.Id). Diakses Pada Tanggal 17 Maret 2014, Pada Pukul 23.00 WITA.

Thompson and Fritchman.2012. *Illustrated guide to home biology experiments: All lab, no lecture*. California, O’Reilly Media Inc.

Thorpe, JF., Whiteley, MA. 1921. Thorpe’s Dictionary of Applied Chemistry. Fourth edition, Vol. II. Longmans, Green and Co. London, 434-438

Walker and Ralph. 2008. “*Molecular Biomethods Handbook*.”

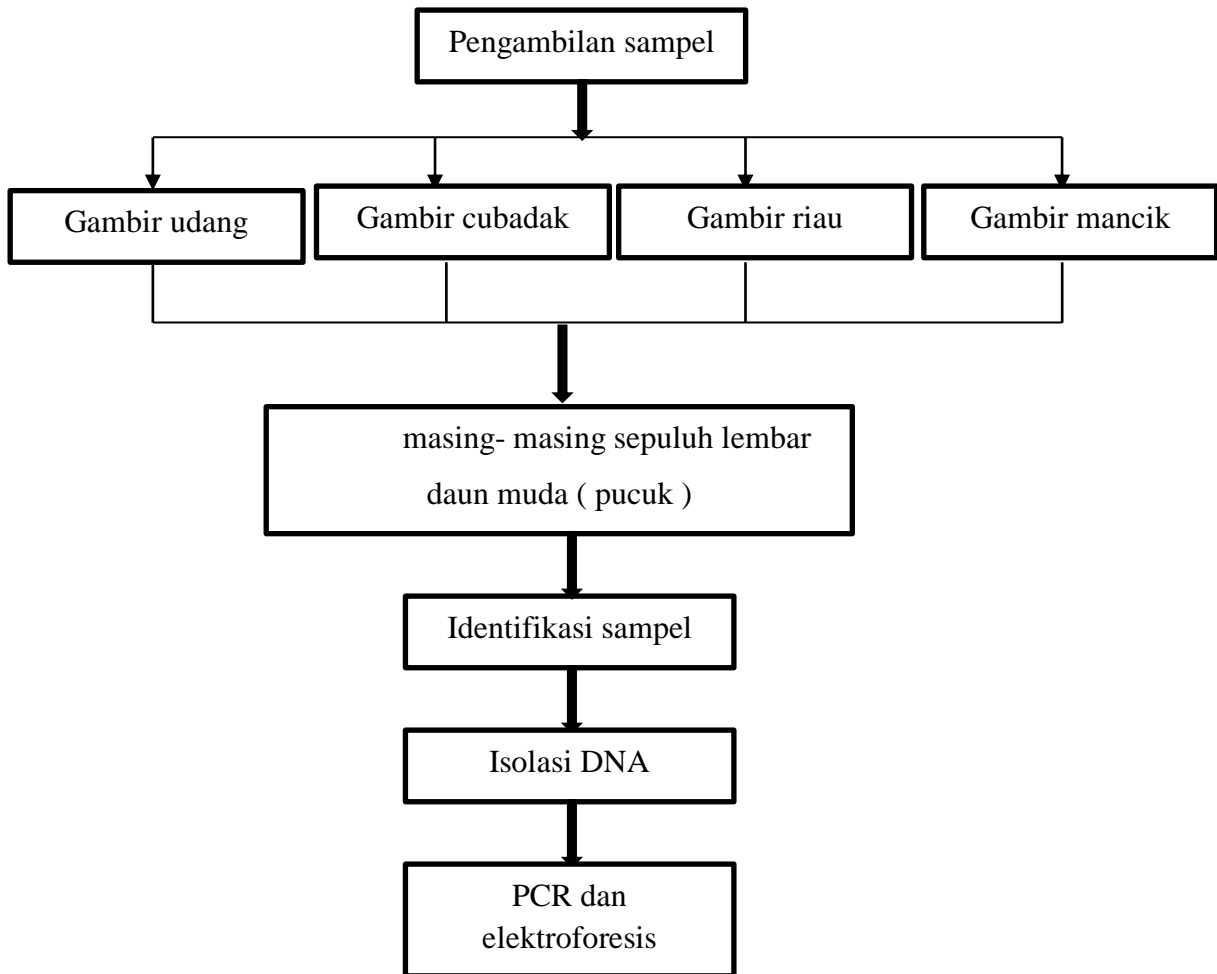
Yusuf, ZK. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Saintek* 5(6): 1–6.

Yuwono, T. 2009. *Biologi Molekuler*. Erlangga. Jakarta.”


Yuwono, T. (2016). *bioteknologi pertanian* (A. Tarigan, Ed.). yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Zarzoso, B. E., C. Belloch, F. Uruburul, dan A. QueroI. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49:329-337.

**Lampiran 1. Bagan alur Penelitian**



## Lampiran 2. Hasil Identifikasi Morfologi Sampel Gambir

 **HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)**  
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar  
Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. \*811 e-mail: [nas\\_herb@yahoo.com](mailto:nas_herb@yahoo.com);  
[herbariumandaunand@gmail.com](mailto:herbariumandaunand@gmail.com)

---

Nomor : 237/K-ID/ANDA/VII/2020  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada yth,  
Melly  
Di Tempat

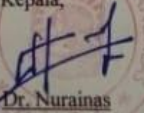
Dengan hormat,  
Sehubungan dengan surat mengenai bantuan untuk "Identifikasi Tumbuhan" di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah membantu mengidentifikasi tumbuhan yang dibawa, atas nama:

Nama : Melly  
No. BP : 1604040  
Instansi : STIFI Perintis Padang

Berikut ini diberikan hasil identifikasi yang dikeluarkan dari Herbarium Universitas Andalas.

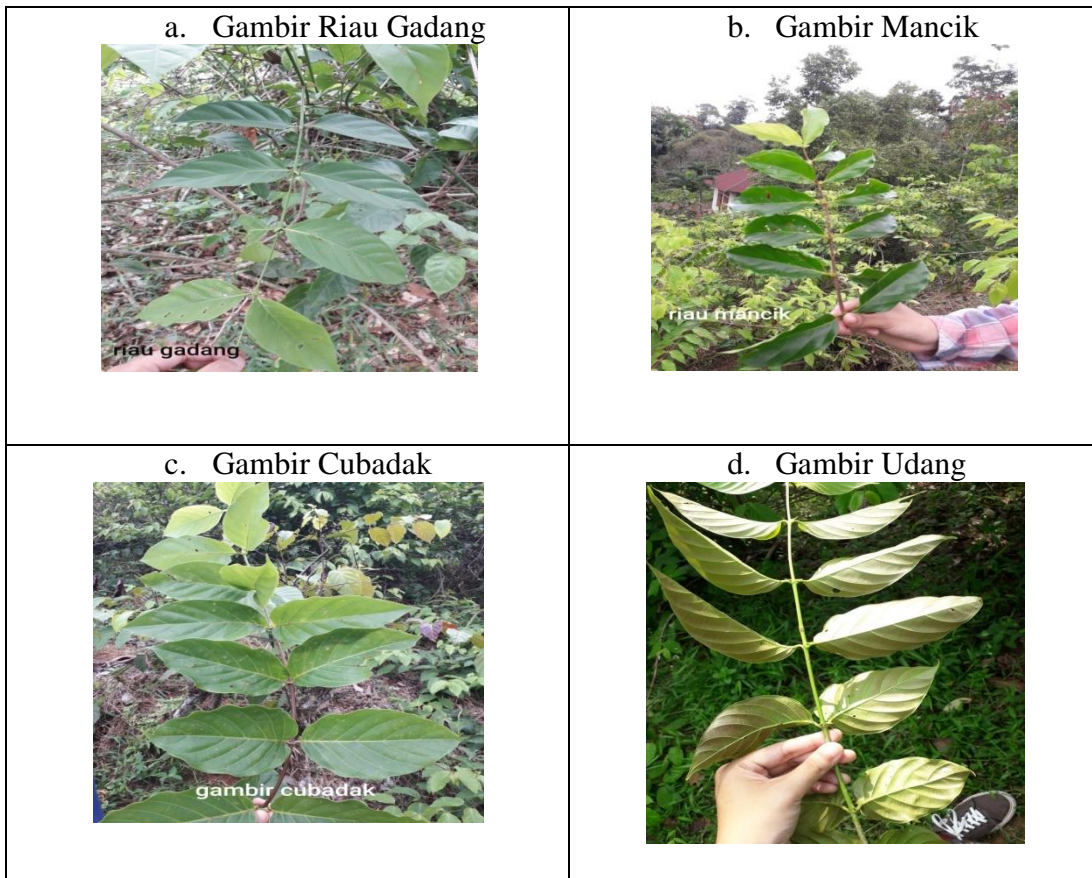
No	Family	Spesies	Ver. Name
1.	Rubiaceae	<i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb.	- Gambir Mancik Riau, - Gambir Cubadak, - Gambir Riau Gadang, - Gambir Udang

Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

Padang, 20 Juli 2020  
Kepala,  
  
Dr. Nurainas  
NIP. 196908141995122001

**Gambar 1.** Hasil Identifikasi Morfologi Sampel Gambir

### Lampiran 3 Tanaman Gambir



**Gambar 3 .** perbedaan tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.)

## Lampiran 4 Gen ITS Primer U1

www.idtdna.com

**12-Aug-2020**      Order No. **8880105**  
 Ref. No. **103675869**

Sequence - ITS-u1      25 nmole DNA Oligo, 22 bases

**5'- GGA AGK ARA AGT CGT AAC AAG G -3'**

Properties	Amount Of Oligo	Shipped To
<i>T<sub>m</sub></i> (50mM NaCl)*: 53.2 °C	4.5 = 18.9 = 0.13	EPI SUPRI WARDI
GC Content: 45.5%	OD260    nmoles    mg	FAKULTAS FARMASI UPERTIS
Molecular Weight: 6,886	For 100 µM: add 189 µL	JLN. ADINEGORO/SIMP. KALUMPANG K
nmoles/OD260: 4.2		PADANG, SUMATERA B 25173
ug/OD260: 28.8		INDONESIA
Ext. Coefficient: 238,750 L/(mole·cm)		085274269009
		Customer No. 4445613    PO No. PTGEN-9415-R

**Secondary Structure Calculations**  
 Lowest folding free energy (kcal/mole): 0.01 at 25 °C  
 Strongest Folding T<sub>m</sub>: 24.8 °C

Oligo Base Types	Quantity	Disclaimer
DNA Bases	22	See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties
Modifications and Services	Quantity	

Gambar 7 Primer U1



## Lampiran 5 Gen ITS Primer U4

**IDT** | YOUR ADVOCATE  
INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES | FOR THE GENOMICS AGE

www.idtdna.com

**SPECIFICATION SHEET**

12-Aug-2020

Order No. **8880105**

Ref. No. **103675870**

Sequence - ITS-u4

25 nmole DNA Oligo, 20 bases

**5'- RGT TTC TTT TCC TCC GCT TA -3'**

Properties	Amount Of Oligo	Shipped To
<i>T<sub>m</sub></i> (50mM NaCl)*: 52.1 °C	3.5 = 20.3 = 0.12	EPI SUPRI WARDI
GC Content: 42.5%	OD260 nmole	FAKULTAS FARMASI UPERTIS
Molecular Weight: 6,007.9	mg	JLN. ADINEGORO/SIMP. KALUMPANG K
nmole/OD260: 5.8	For 100 µM: add 203 µL	PADANG, SUMATERA B 25173
µg/OD260: 34.9		INDONESIA
Ext. Coefficient: 172,100 L/(mole·cm)		085274269009
		Customer No. 4445613 PO No. PTGEN-9415-R

**Secondary Structure Calculations**

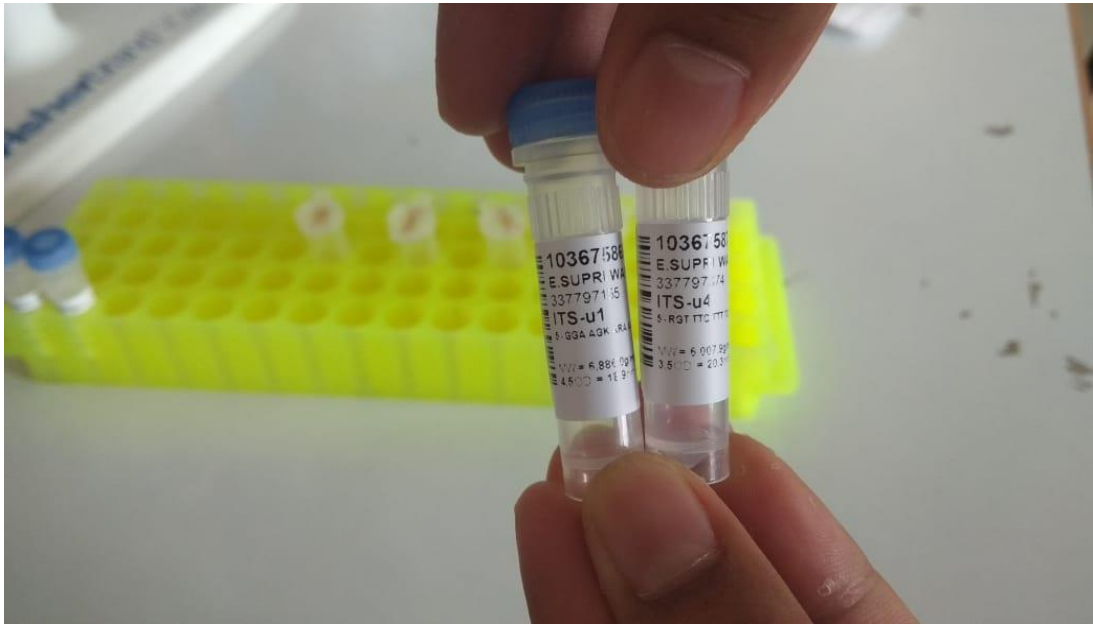
Lowest folding free energy (kcal/mole): 2.85 at 25 °C

Strongest Folding T<sub>m</sub>: -42.6 °C

Oligo Base Types	Quantity	Disclaimer
DNA Bases	20	See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties
<b>Modifications and Services</b>	Quantity	
Standard Desalting	1	

**Gambar 8 ITS Primer U4**

## Lampiran 6 Hasil Isolasi DNA



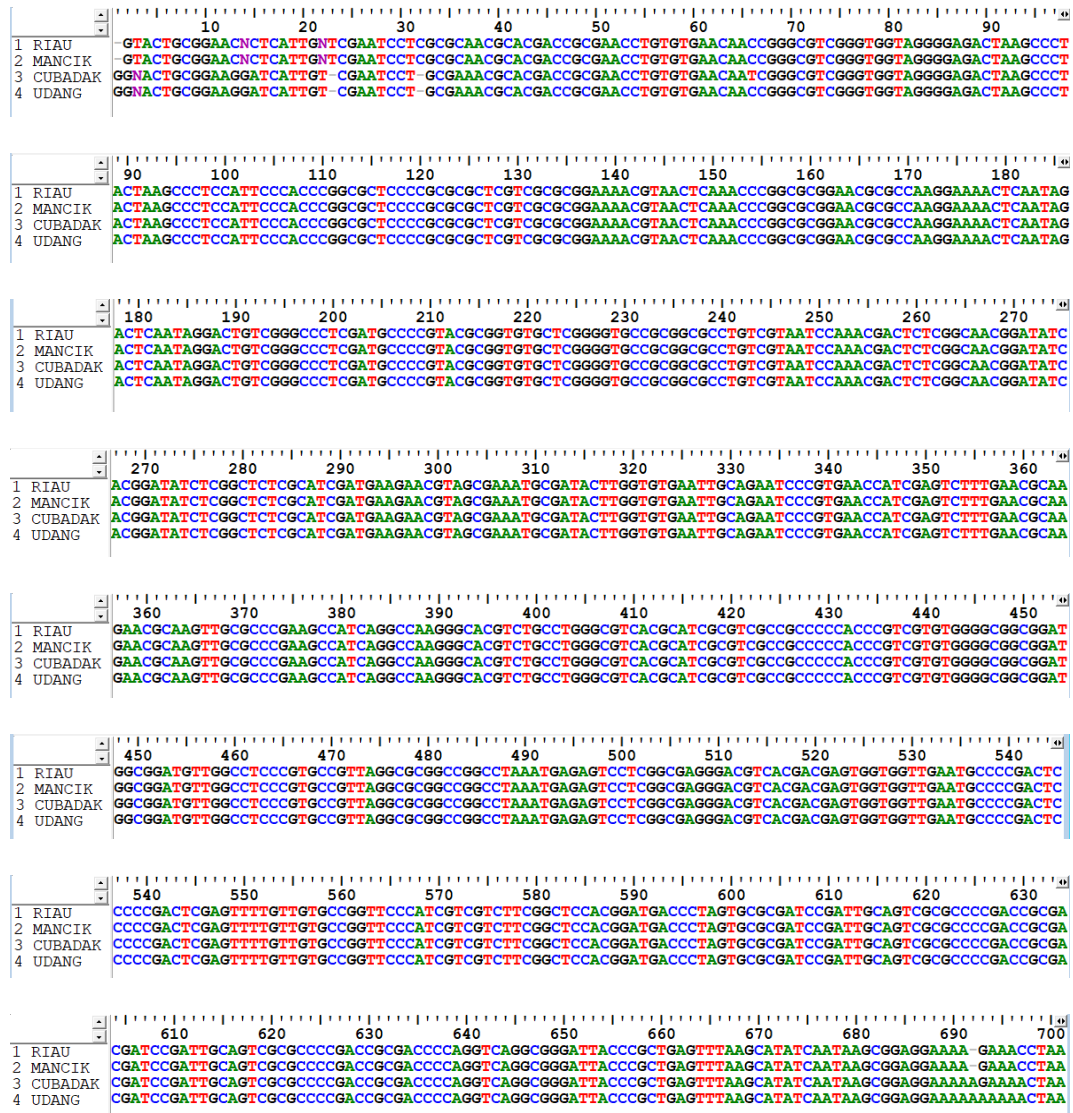
**Gambar 9 .Hasil Isolasi DNA**

**Lampiran 7. Hasil isolasi DNA Gambir uncaria ITS-U1 dan ITS-U4**



**Gambar 10.** Hasil isolasi DNA Gambir uncaria ITS-U1 dan ITS-U4

## Lampiran 8 Hasil Squensing Forword Gambir uncaria ITS-U1



Gambar 11. Hasil Squensing Forword Gambir Uncaria ITS-U1

## Lampiran 9 Hasil Squensing Forward Gambir uncaria ITS-U4



**Gambar 12.** Hasil Squensing Forward Gambir uncaria ITS-U4

**Lampiran 10 Hasil BLAST sampel Gambir Riau Gadang**

GGAAGGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA  
GGATCATTGTCTGAATCCTGCGAAACGCACGACCGCGAACCTGTGTGAA  
CAACCGGGCGTCGGGTGGTAGGGGAGACTAAGCCCTCCATTCCCACCC  
GGCGCTCCCCGCGCGCTCGTCGCGCGGAAAACGTAACCTCAAACCCGGC  
GCGGAACGCGCCAAGGAAAACCTCAATAGGACTGTCGGGGCCCTCGATG  
CCCCGTACGCGGTGTGCTCGGGGTGCCGCGGCGCCTGTCGTAATCCAA  
ACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT  
AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG  
AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCAAGGGCACGT  
CTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCGCCCCCACCCTCGTGTGGG  
GCGGCGGATGTTGGCCTCCCGTGCCGTTAGGCGCGGCCGGCCTAAATG  
AGAGTCCTCGGCGAGGGACGTCACGACGAGTGGTGGTTGAATGCCCC  
GACTCGAGTTTTTGTGTGCCGGTTCCCATCGTCGTCTTCGGCTCCACGG  
ATGACCCTAGTGCGCGATCCGATTGCAGTCGCGCCCCGACCGCGACCC  
CAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGA  
GGAAAAAAGAAAAC

**Gambar 13.** BLASTsampil Gambir Riau Gadang

**Lampiran 11 Hasil BLAST sampel Gambir Mancik**

GGAAGTAAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA  
GGATCATTGTTCGAATCCTNGCGAAACGCACGACCGCGAACCTGTGTGA  
ACAACCGGGCGTCGGGTGGTAGGGGAGACTAAGCCCTCCATTCCCACC  
CGGCGCTCCCCGCGCGCTCGTCGCGCGGAAAACGTA ACTCAAACCCGG  
CGCGGAACGCGCCAAGGAAA ACTCAATAGGACTGTCGGGCCCTCGAT  
GCCCCGTACGCGGTGTGCTCGGGGTGCCGCGGCGCCTGTCGTAATCCA  
AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG  
TAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATC  
GAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCAAGGGCAC  
GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCGCCCCCACCCGTCGTGTG  
GGGCGGCGGATGTTGGCCTCCCGTGCCGTTAGGCGCGGCCGGCCTAAA  
TGAGAGTCCTCGGCGAGGGACGTCACGACGAGTGGTGGTTGAATGCCC  
CGACTCGAGTTTTGTTGTGCCGGTTCCCATCGTCGTCTTCGGCTCCACG  
GATGACCCTAGTGCGCGATCCGATTGCAGTCGCGCCCCGACCGCGACC  
CCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGG  
AGGAAAAGAAACCTA

**Gambar 14.** BLAST sampel Gambir mancik

**Lampiran 12 Hasil BLASTs sampel Gambir Cubadak**

GGAAGGAAAAAATCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA  
GGATCATTGTCTGAATCCTGCGAAACGCACGACCGCGAACCTGTGTGAA  
CAATCGGGCGTCTGGGTGGTAGGGGAGACTAAGCCCTCCATTCCCACCC  
GGCGTCCCCGCGCGCTCGTCGCGCGGAAAACGTAACCTCAAACCCGGC  
GCGGAACGCGCCAAGGAAAACCTCAATAGGACTGTCGGGGCCCTCGATG  
CCCCGTACGCGGTGTGCTCGGGGTGCCGCGGCGCCTGTTCGTAATCCAA  
ACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGT  
AGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCG  
AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCAAGGGCACGT  
CTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCGCCCCACCCGTCGTGTGGG  
GCGGCGGATGTTGGCCTCCCGTGCCGTTAGGCGCGGCCGGCCTAAATG  
AGAGTCCTCGGCGAGGGACGTCACGACGAGTGGTGGTTGAATGCCCC  
GACTCGAGTTTTTGTGTCGCCGTTCCCATCGTCGTCTTCGGCTCCACGG  
ATGACCCTAGTGCGCGATCCGATTGCAGTCGCGCCCCGACCGCGANCC  
CCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGG  
AGGAAAAAGAAAATA

**Gambar 15.** BLAST sampel Gambir cubadak



**Lampiran 13 Hasil BLAST sampel Gambir Udang**

GGAAGGAAAAAATCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAG  
GATCATTGTCGAATCCTGCGAAACGCACGACCGCGAACCTGTGTGAAC  
AACCGGGCGTCGGGTGGTAGGGGAGACTAAGCCCTCCATTCCCACCCG  
GCGCTCCCCGCGCGCTCGTCGCGCGGAAAACGTAACCTCAAACCCGGCG  
CGGAACGCGCCAAGGAAAACCTCAATAGGACTGTCGGGCCCCTCGATGC  
CCCGTACGCGGTGTGCTCGGGGTGCCGCGGCGCCTGTCGTAATCCAAA  
CGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTA  
GCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGA  
GTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCAAGGGCACGTC  
TGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCGCCCCCACCCGTCGTGTGGGG  
CGGCGGATGTTGGCCTCCCGTGCCGTTAGGCGCGGCCGGCCTAAATGA  
GAGTCCTCGGCGAGGGACGTCACGACGAGTGGTGGTTGAATGCCCCG  
ACTCGAGTTTTGTTGTGCCGGTTCCCATCGTCGTCTTCGGCTCCACGGA  
TGACCCTAGTGCGCGATCCGATTGCAGTCGCGCCCCGACCGCGACCCC  
AGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAG  
GAAAAAAAAC

**Gambar 16.** BLAST sampel Gambir udang

**Lampiran 14. Hasil Blast untuk sekuens ITS1 sampel gambir riau**

**Tabel VI.** Penelusuran Blast untuk sekuens ITS1 sampel gambir riau

Rank	Phyllum	Class	Order	Family	Genus	Spesies	Kemiripan
1	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,29
2	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,29
3	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,15
4	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,15
5	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,15
6	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,13
7	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,27
8	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,27
9	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,13
10	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,27

**Lampiran 15. Hasil Blast untuk sekuens ITS1 sampel gambir Mancik**

**Tabel VII.** Penelusuran Bold System untuk sekuens ITS sampel gambir mancik

Rank	Phyllum	Class	Order	Family	Genus	Spesies	Kemiripan
1	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.89
2	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.89
3	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.75
4	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.75
5	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.75
6	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>vunnanensis</i>	99,14
7	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>vunnanensis</i>	99,00
8	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>lancifolia</i>	97.92
9	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99,13
10	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>rhynchoohyll oides</i>	97.78

**Lampiran 16. Hasil Blast untuk sekuens ITS1 sampel gambir cubadak**

**Tabel VIII.** Penelusuran Bold System untuk sekuens ITS1 sampel gambir cubadak

Rank	Phyllum	Class	Order	Family	Genus	Spesies	Kemiripan
1	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99.02
2	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.88
3	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.88
4	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.74
5	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.74
6	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>vunnanensis</i>	99,14
7	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>vunnanensis</i>	99,14
8	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>rhynchoohyll oides</i>	96.04
9	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>lancifolia</i>	97,28
10	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>rhynchoohyll oides</i>	97.90

**Lampiran 17 . Hasil Blast untuk sekuens ITS1 sampel gambir Udang**

**Tabel IX.** Penelusuran Bold System untuk sekuens ITS1 sampel Gambir Udang

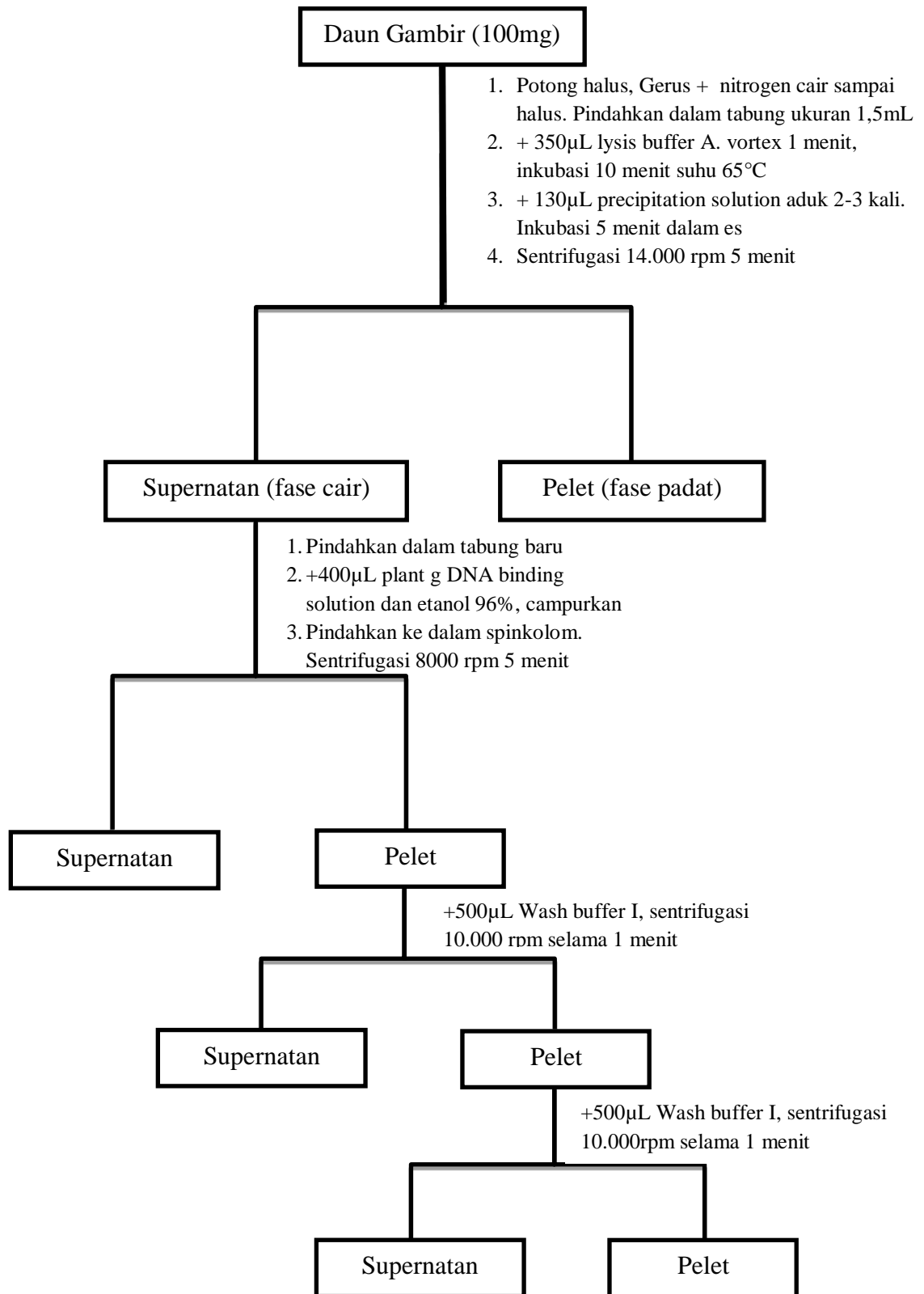
Rank	Phyllum	Class	Order	Family	Genus	Spesies	Kemiripan
1	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.89
2	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.89
3	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.75
4	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.75
5	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	98.75
6	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>vunnanensis</i>	99,14
7	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>vunnanensis</i>	99,14
8	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>macrophylla</i>	99.13
9	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>lancifolia</i>	97,52
10	Magnolio phyta	Magnoli opsida	Gentia nales	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>rhynchoohyll oides</i>	97.78

## Lampiran 18. Makroskopik Tanaman gambir

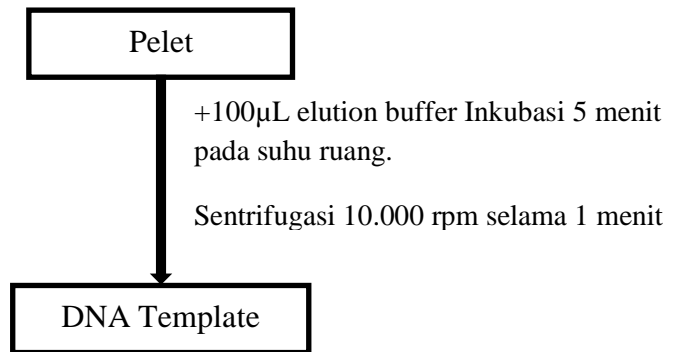
**Tabel X.** Makroskopik tanaman Gambir

keterangan	Gambir riau gadang	Gambir mancik	Gambir udang	Gambir cubadak
batang	Padatan berbentuk kubus atau silinder tak beraturan dan tidak berambut	Padatan berbentuk kubus atau silinder tak beraturan dan tidak berambut	Padatan berbentuk kubus atau silinder tak beraturan dan tidak berambut	Padatan berbentuk kubus atau silinder tak beraturan dan tidak berambut
daun	Hijau tua sedangkan pucuk hijau muda	Hijau tua sedangkan pucuk hijau kekuningan	Hijau tua sedangkan pucuk hijau kekuningan	Hijau kemerahan
Permukaan daun	Permukaan daun kasar, lebar dan runcing	Permukaan daun mengkilat, kecil dan runcing	Permukaan daun agak kasar, lebar dan berbentuk oval	Permukaan daun mengkilat, lebar dan runcing
Pinggir daun	lurus	bergelombang	bergelombang	lurus

**Lampiran 19 .Skema 6 Kerja Isolasi DNA Tumbuhan**



## Lampiran 20. Skema kerja Isolasi DNA





## Lampiran 21. Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Elektroforesis

