

**DESAIN PRIMER DAN DETEKSI GEN CHS
(*CHALCONE SYNTHASE*) PADA TANAMAN
GAMBIR (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) TIPE
RIAU MANCIK**

SKRIPSI



Oleh:

FADILLATUL ZIKRI
NIM :1604055

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA
PADANG
202**

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya juaah penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini. Shalawat beriringan salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah mengantarkan manusia dari zaman kegelapan hingga ke zaman yang terang benderang saat ini.

Penulisan skripsi ini diajukan untuk memenuhi syarat program pendidikan sarjana farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia. Judul yang penulis buat adalah **“DESAIN PRIMER DAN DETEKSI GEN GEN CHS (CHALCONE SYNTHASE) PADA TANAMAN GAMBIR (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) TIPE RIAU MANCIK”**.

Penulisan skripsi ini tentunya mendapatkan banyak bantuan dari berbagai pihak yang telah membimbing dan mendukung penulis. Oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Ibu Epi Supri Wardi, M.Si selaku dosen Pembimbing I dan Ibu Miftahur Rahmi, S.Pd, M.Pd selaku Pembimbing II yang dengan penuh kesabaran serta perhatian yang telah meluangkan waktu untuk memberikan petunjuk, arahan dan nasehat dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Dr. apt. Eka Fitrianda, M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia.
3. Ibu Epi Supri Wardi, M.Si yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam kegiatan akademis penulis.
4. Bapak/Ibu Dosen yang telah mendidik serta mencurahkan ilmu selama ini kepada penulis.
5. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

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

Padang, 09 September 2020

Hormat Saya

Penulis

ABSTRAK

Gambir merupakan salah satu tanaman yang menghasilkan katekin. Kandungan katekin merupakan parameter dalam menentukan mutu gambir. Salah satu gen yang terlibat dalam pembentukan katekin adalah gen CHS (*Chalcone synthase*). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan primer yang dapat digunakan untuk mendeteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir tipe Riau Mancik serta untuk melihat *binding site* dengan hasil isolasi DNA tanaman gambir terhadap primer yang telah didesain. Pendesainan primer dilakukan dengan mengalignment 21 data tanaman yang mengandung sekuen gen CHS yang terdapat di NCBI. Hasil desain primer didapatkan 8 pasang primer degeneratif dengan 4 primer forward dan 2 primer reverse. Primer yang memiliki *binding site* dengan hasil isolasi DNA yaitu pasangan primer A1F dengan C1R menghasilkan produk dengan estimasi 724 bp.

Kata Kunci : *Chalcone synthase*, DNA, Gambir, Katekin, PCR

ABSTRACT

Gambir is a plant that produces catechins. Catechin content is a parameter in determining the quality of gambier. One of the genes involved in the formation of catechins is CHS gene (*Chalcone synthase*). This study aims to obtain a primer that can be used to detect the CHS (*Chalcone synthase*) gene in the Riau Mancik gambier plant and to see the binding site with the results of DNA isolated from the gambier plant against the designed primers. The primer design was carried out by aligning 21 plant data containing the CHS gene sequences contained in NCBI. The primary design results obtained 8 pairs of degenerative primers with 4 forward primers and 2 reverse primers. The primer that has a binding site with the results of DNA isolated is the primer pair of A1F and C1R produces a product with an estimated 724 bp.

Keywords : *Chalcone synthase*, DNA, gambir, catechins, PCR

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN ORSINILITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan Botani (<i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb.).....	5
2.1.1 Klasifikasi.....	5
2.1.2 Nama Daerah	5
2.1.3 Morfologi Tumbuhan.....	6
2.1.4 Asal dan Tempat Tumbuh.....	9
2.1.5 Kandungan Kimia	9
2.1.6 Khasiat dan Kegunaan Gambir	12
2.2 Desain Primer Degeneratif.....	13
2.3 Isolasi Gen Berbasis PCR pada Tanaman.....	15
2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	16
2.4.1 Prinsip Umum PCR	19
2.4.2 Proses PCR.....	20
2.5 Elektroforesis	21
BAB III METODE PENELITIAN	23
3.1 Tempat dan Waktu	23
3.2 Alat dan Bahan	23
3.3 Metode Penelitian.....	23
3.4 Pelaksanaan Penelitian	24
3.4.1 Pengambilan Sampel.....	24
3.4.2 Identifikasi Morfologi di Herbarium.....	24
3.4.3 Disain Primer Degeneratif dan Amplifikasi Gen	24

3.4.4 Isolasi DNA.....	27
3.4.5 Elektroforesis	28
3.4.6 PCR dan Elektroforesis	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Hasil	31
4.2 Pembahasan.....	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	42
5.1 Kesimpulan	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN.....	47

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik Morfologi dan Komponen Hasil Empat Tipe Gambir	7
2. Kelebihan dan Kekurangan PCR	18
3. Lambang Nukleotida dalam Penyusunan Sekuen Primer Degeneratif Menurut IUPAC	25
4. Cocktail PCR untuk Amplifikasi DNA.....	29
5. Kondisi PCR untuk Amplifikasi DNA	30
6. Hasil Desain Primer Degeneratif CHS (<i>Chalcone synthase</i>).....	33
7. Kode Sekuen untuk Pendisainan Primer.....	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman Gambir	6
2. Struktur Kimia Katekin	9
3. Skema Biosintesis Flavonoid	11
4. Proses Kerja PCR	21
5. Sekuen Gen CHS Hasil Penelusuran pada NCBI	25
6. Hasil Multialignment 21 Sekuen Gen CHS	25
7. Laman Awal Situs IDT	26
8. Hasil <i>Analyze</i> Primer pada Situs IDT	26
9. Hasil Isolasi DNA	38
10. Hasil Amplifikasi PCR	40
11. Hasil Amplifikasi PCR	41
12. Tanaman Gambir Tipe Riau Mancik	47
13. Hasil Identifikasi Tanaman Gambir	48
14. Skema Desain Primer Degeneratif	49
15. Skema Isolasi DNA Daun Gambir	51
16. Skema Proses Elektroforesis	52
17. Skema Proses PCR dan Elektroforesis	53
18. Alat Inkubator	54
19. Alat Sentrifugasi	54
20. Alat PCR	54
21. Alat Elektroforesis	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Tanaman Gambir (<i>Uncaria gambir</i> (Hunter)Roxb.).....	47
2. Hasil Identifikasi Tanaman Gambir	48
3. Skema Proses Desain Primer Degeneratif	49
4. Tabel Kode Sekuen untuk Pendisainan Primer.....	50
5. Skema Proses Isolasi DNA Daun Gambir	51
6. Skema Proses Elektroforesis Hasil Isolasi DNA Tanaman Gambir.....	52
7. Skema Proses PCR dan Elektroforesis	53
8. Alat-alat yang digunakan	54

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gambir merupakan ekstrak daun dan ranting tanaman *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb yang dikeringkan. Gambir mempunyai nilai komersil yang tinggi. Indonesia merupakan pemasok utama gambir di dunia dan lebih dari 80% produksi gambir Indonesia berasal dari daerah Sumatera Barat. Daerah utama penghasil gambir di Sumatera Barat yaitu Kabupaten Lima Puluh Kota dan Kabupaten Pesisir Selatan (Nazir, 2000). Gambir diekspor ke berbagai negara yang permintaan ekspornya terus meningkat sepanjang tahun dan selama periode lima tahun (2000-2004) peningkatan volume ekspornya mencapai 87,49% dan nilainya meningkat 17,16% (Denian *et al*, 2000).

Di Sumatera Barat ada empat tipe jenis gambir. Keempat jenis gambir tersebut adalah tipe udang, tipe riau mancik, riau gadang dan tipe cubadak (Nazir, 2000). Umumnya hasil identifikasi dan seleksi terhadap empat tipe tanaman gambir menunjukkan nilai kadar katekin yang bervariasi. Kadar katekin gambir tipe udang 25,89%, gambir tipe riau mancik 16,95%, gambir tipe riau gadang 18,11% dan gambir tipe cubadak 12,81% (Ferita *et al*, 2011). Dimana gambir tipe riau mancik merupakan salah satu dari empat tipe jenis gambir yang ada di Sumatera Barat yang memiliki kadar katekin lebih rendah dibandingkan gambir tipe udang dan gambir tipe riau gadang.

Ekstrak tanaman gambir mengandung beberapa senyawa flavonoid yaitu katekin (7-33%), pirokatekol (20-30%), kuersetin (2-4%) (Parkash *et al*, 2007). Menurut (Balentine *et al*, 1997). Katekin merupakan komponen terbanyak dalam tanaman gambir dan sangat bermanfaat dalam dunia farmasi antara lain untuk

pembuatan obat-obatan hipertensi B, obat antidiare dan obat kumur (Gerhard, 2004). Selain itu kandungan katekin juga dimanfaatkan sebagai antioksidan sehingga potensial dijadikan minuman fungsional yang baik bagi kesehatan (Dharma, 1985). Kandungan katekin merupakan parameter dalam menentukan mutu gambir. Dimana karakteristik mutu gambir tidak hanya didasarkan pada mutu fisik tetapi juga mutu kimianya (Gumbira *et al.*, 2009).

Dalam pengembangan produktivitas gambir sampai saat ini masih banyak permasalahan yang dihadapi, baik dari segi teknologi bercocok tanam, pengolahan pasca panen, perencanaan bisnis dan pemasaran serta aspek sosial ekonomi budaya. Hal ini dikarenakan cara bercocok tanam petani yang masih tradisional, jenis dan mutu produk tidak banyak mengalami perubahan dari waktu ke waktu, pasar yang sempit serta proses pemasaran yang dikuasai oleh konsumen. Bagi wilayah Provinsi Sumatera Barat gambir merupakan komoditas spesifik yang produktivitas dan mutunya belum mencapai seperti yang diharapkan (Nazir, 2000). Mengingat besarnya manfaat katekin, maka perlu usaha untuk memperoleh katekin dalam jumlah yang banyak dengan waktu yang singkat salah satunya dengan cara rekayasa genetik sehingga perlu dideteksi gen pembentukan katekin pada tanaman gambir.

Katekin disintesa melalui jalur fenilpropanoid dan flavonoid. Salah satu enzim yang berperan penting dalam mengkatalisis langkah pertama jalur fenilpropanoid menuju flavonoid adalah CHS (*Chalcone synthase*) (Wang *et al.*, 2017). Dimana pada awal jalur biosintesis flavonoid enzim CHS (*Chalcone synthase*) melakukan kondensasi satu molekul 4-coumaroyl-CoA dan tiga molekul malonyl-CoA untuk menghasilkan narigenin chalcone (Stafford, 1990). Ada

korelasi yang kuat antara ekspresi gen CHS dan kandungan flavonoid di banyak tanaman (Kamiishi *et al.*, 2012; Morita *et al.*, 2012; Dare *et al.*, 2013). Selain itu CHS (*Chalcone synthase*) merupakan enzim yang berpengaruh dalam banyak proses fisiologis termasuk, pengembangan buah/benih, pigmentasi bunga, penyerbukan dan ketahanan terhadap tekanan biotik dan abiotik pada tanaman (Dao *et al.*, 2011).

Menggandakan jumlah molekul DNA dapat dilakukan melalui teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Muladno, 2010). Kemajuan teknologi amplifikasi DNA secara in-vitro atau disebut juga dengan teknik PCR (*polymerase chain reaction*) dengan segala kemudahan yang bisa ditawarkannya, salah satu diantaranya kemudahan terhadap isolasi gen target. Menurut Jamsari (2013) sekuen gen-gen tersebut dapat diamplifikasi menggunakan primer degeneratif. Pendisainan primer dilakukan pada daerah yang lestari (*conserved*) yakni posisi sekuen yang memiliki banyak persamaan basa setelah dilakukan *multialignment*.

Maka pada penelitian ini peneliti tertarik untuk melakukan pendesainan primer degeneratif untuk mendeteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir tipe riau mancik. Primer tersebut diharapkan memiliki *binding site* dari DNA fungsional tanaman gambir dimana gen tersebut merupakan katalisator pembentukan flavonoid. Ada atau tidaknya gen tersebut dapat memberikan informasi awal tentang proses biosintetis katekin tanaman gambir.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana desain primer degeneratif yang dapat digunakan didalam kegiatan isolasi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik?

2. Apakah primer yang telah didesain dapat mendeteksi gen CHS (*Chlacone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mendapatkan primer degeneratif yang dapat digunakan didalam kegiatan isolasi gen CHS (*Chlacone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik.
2. Untuk melihat primer yang telah didesain dapat mendeteksi gen CHS (*Chlacone synthase*) tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik.

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan primer yang dapat digunakan dalam mendeteksi DNA gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik dan sebagai sumber informasi dalam perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi serta dalam mengaplikasinnnya guna mempermudah kedepannya dalam melakukan seleksi bahan perbanyakan pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) sehingga, dapat meminimalkan resiko penanaman tanaman gambir berproduksi rendah di lapangan.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

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

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi dari tumbuhan *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb adalah sebagai berikut (Haryanto, 2009) :

Kingdom	: Plantarum
Devisi	: Spermatophyta
Sub devisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Rubiales
Familiy	: Rubiaceae
Genus	: <i>Uncaria</i>
Spesies	: <i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb
Sinonim	: <i>Ourouparia gambir</i> Roxb.

2.1.2 Nama daerah

Di Indonesia *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb dikenal dengan beberapa nama daerah yaitu (Nazir, 2000) : Gambe, Gani (Aceh), Kacu (Gayo), Sontang (Batak), Gambie (Minangkabau), Pengilom, Sampelet (Lampung), Gambir (Jawa), Abi (Madura), Gambele (Gorontalo), Gambere (Ujung Pandang), Tagambe (Bima), Gamus (Sumba), Gambi (Sawu), Gambe (Flores), Nggame (Roti), Gabi (Halmahera), Gambe (Ternate).

2.1.3 Morfologi Tumbuhan



Gambar 1. Tanaman gambir tipe riau mancik (*Dokumentasi pribadi*)

Gambir termasuk ke dalam famili Rubiaceae. Ciri-ciri umum dari famili Rubiaceae adalah sebagai berikut : merupakan tanaman perdu dengan tinggi 1-3 m. Umumnya tumbuh memanjat pada pohon atau semak yang ada di sekitarnya dengan bantuan alat pengait. Batang tegak, berkayu, bulat, percabangan simplodial dan bewarna coklat pucat. Daun tunggal berbentuk lonjong, letak berhadapan, tepi bergerigi, pangkal bulat ujung meruncing, panjang 8-13 cm, lebar 4-7 cm, dan bewarna hijau. Bunga majemuk berbentuk lonceng, muncul di ketiak daun, panjang 5 cm. Mahkota bunga berjumlah 5 helai, berbentuk lonjong dan bewarna ungu. Buah berbentuk bulat telur, panjang sekitar 1,5 cm dan bewarna hitam (Utami *et al.*, 2008).

Sedangkan tangkai dari daun tidak berambut, panjang 0,5-0,8 cm, pertulangan primer pada permukaan daun sebelah bawah menonjol. Lobus dari mahkota krem keputihan, daun pelindung tidak berambut, langset, buah kapsul,

sempit dan panjang, terbagi menjadi 2 belahan. Biji banyak, kecil, halus, berbentuk jarum dan bersayap, panjang 0,4 cm, dan bewarna kuning (BPOM RI, 2007).

Simplisia umumnya berbentuk kubus tidak beraturan atau agak silindris pendek, kadang-kadang bercampur dengan bagian yang remuk, tebal 2-3 cm, ringan, mudah patah dan berliang renik-renik. Warna permukaan luar coklat muda sampai coklat tua kemerahan atau kehitaman, warna permukaan yang baru dipatahkan coklat muda sampai coklat kekuningan. Kadang-kadang terlihat garis-garis yang lebih gelap (BPOM RI, 2007).

Pengamatan morfologi terhadap beberapa karakter menunjukkan perbedaan yang mengindikasikan bahwa perbedaan tersebut disebabkan oleh faktor genetik. Karakter panjang dan lebar helaian daun pada keempat tipe gambar menunjukkan angka yang hampir sama, demikian juga dengan karakter panjang tangkai daun dan diameter tangkai daun (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik morfologi dan komponen hasil empat tipe gambar (Ferita *et al.*, 2013)

No	Karakter	Rata-Rata Sd			
		Udang	Cubadak	R. Mancik	R. Gadang
a	Daun				
	1. Panjang daun (cm)	11,99±1,6 1	11,7±1,8 4	10,58±1,3 9	10,98±0,8 4
	2. Lebar daun (cm)	6,05±0,47	6,43±0,7 2	5,82±0,72	5,79±0,55
	3. Diameter tangkai daun (cm)	0,23±0,02	1,15±0,1 6	0,84±0,22	0,8±0,05
	4. Tebal daun (cm)	0,36±0,06	0,21±0,0 3	0,19±0,04	0,22±0,03
	5. Panjang tangkai daun(cm)	0,8±0,12	0,18±0,0 3	0,29±0,15	0,17±0,03
	6. Bentuk helaian daun	Oval	Oval	Obl	Obl
	7. Basis	Acu	Acu	Acu	Acu
	8. Apek	Acu	Acu	Acu	Acu
	9. Warna daun *)	Merah	Hj muda	Hj tua	Hj tua

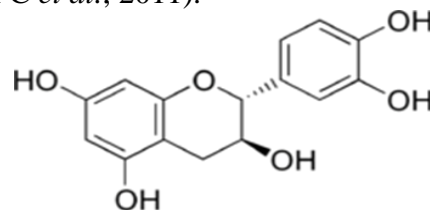
b	Cabang				
	10. Panjang ranting (cm)	49,1±8,66	52,9±9,5 7	46,02±6,8 7	52,68±12, 2
	11. Panjang ruas (cm)	6,46±1,01	7,0±1,30	6,3±1,03	6,6±0,86
	12. Jumlah ruas (buah)	7,38±1,30	8,09±1,1 9	6,9±1,29	7,5±1,37
	13. Sudut cabang (o)	65,6±4,38	70,6±5,7 6	65,0±5,3	71,4±4,33
	14. diameter ranting (cm)	0,38±0,04	0,38±0,1 4	0,34±0,06	0,38±0,04
	15. Jumlah kait (buah)	1,50±1,05	2,59±0,5 7	0,18±0,02	1,5±0,02
	16. Warna cabang *)	Hj coklat	Hj coklat	Hj tua	Hj tua
c	Bunga				
	17. Warna bunga *)	Hj merah	Hj mrh tua	Hj tua	Hj tua
	18. Diameter bunga (cm)	5,01±0,5	5,28±0,5 6	4,15±0,39	4,48±1,25
	19. Panjang tangkai bunga (cm)	3,77±0,82	3,73±0,8 8	3,38±0,7	2,16±0,42
	20. Diameter tangkai bunga (cm)	0,23±0,05	0,26±0,0 5	0,18±0,02	0,19±0,02
d	Buah				
	21. Panjang tangkai Buah (cm)	2,8±0,35	3,27±0,4 2	1,75±0,32	2,19±0,37
	22. Diameter tangkai buah (cm)	0,25±0,02	0,26±0,0 3	0,25±0,02	0,24±0,02
	23. Warna buah muda *)	Hj merah	Hj mrh tua	Hj tua	Hj tua
	24. Warna buah masak *)	Hj coklat	Cok tua	Cok hit	Cok hit
	25. Jumlah polong/tangkai (buah)	72,2±12,2	73,3±5,5 1	62,9±7,98	62,06±13, 6
	26. Panjang polong (cm)	3,45±0,40	3,15±0,4 2	3,07±0,24	3,19±0,24
e	Komponen Hasil				
	27. Jumlah cabang/batang (buah)	10,0±3,09	5,5±1,32	6,25±2,5	5,0±1,0
	28. Jumlah ranting/cabang (buah)	10,8±2,99	13,5±2,8 4	11,0±2,43	13,2±4,4
	29. Jumlah daun/ranting (buah)	13,2±2,24	15,5±2,1 4	11,06±2,0 4	13,9±3,4
	30. Berat 1 helai dun (g)	1,56±0,54	2,51±0,7 2	1,65±0,58	2,13±0,41
	31. Rendemen hasil (%)	6,7±0,39	5,87±0,5 8	6,12±0,50	5,8±0,8

2.1.4 Asal dan Tempat Tumbuh

Tanaman gambir ini merupakan tanaman perdu yang berasal dari daerah Sumatera dan Kalimantan. Tumbuhan ini tumbuh liar di hutan dan di tempat-tempat lain yang tingginya 200-900 m dari permukaan laut, tanahnya agak miring dan cukup mendapat sinar matahari. Di daerah Sumatera dan Kalimantan, tanaman gambir ini umumnya ditanam orang di kebun-kebun (Mardisiswojo *et al.*, 1968). Gambir tumbuh pada area terbuka di dalam hutan, kawasan hutan yang lembab, area terbuka bekas perladangan atau pinggir hutan (BPOM RI, 2007).

2.1.5 Kandungan Kimia

Kandungan kimia dari gambir (*Uncaria gambir* Roxb) adalah katekin, kuersetin, tannin, lendir, lemak dan malam. Gambir memiliki sifat khas pahit dan kelat (Utami *et al.*, 2008). Katekin merupakan bagian dari golongan flavonoid. Umumnya dikenal sebagai kelas Flavan-3-ols. Flavan-3-ols dilaporkan memiliki aktivitas farmakologi sebagai antioksidan, antibiotik, antivirus, antitumor dan juga meningkatkan system kekebalan tubuh. Katekin memiliki struktur streokimia (+)-(2R,3S)-katekin dan (-)-(2S,3R)-katekin, sebagai obat kiral yang menunjukkan efek berlawanan pada metabolisme glikosida dan pada fluiditas membran yang berpengaruh terhadap mekanisme farmakologi dan toksikologi. (-)-(2S,3R)-katekin memiliki aktivitas allelopati, tetapi tidak memiliki aktivitas antibakteri. Namun, (+)-(2R,3S)-katekin menunjukkan aktivitas antibakteri tetapi tidak memiliki aktivitas allelopati (Kwon C *et al.*, 2011).

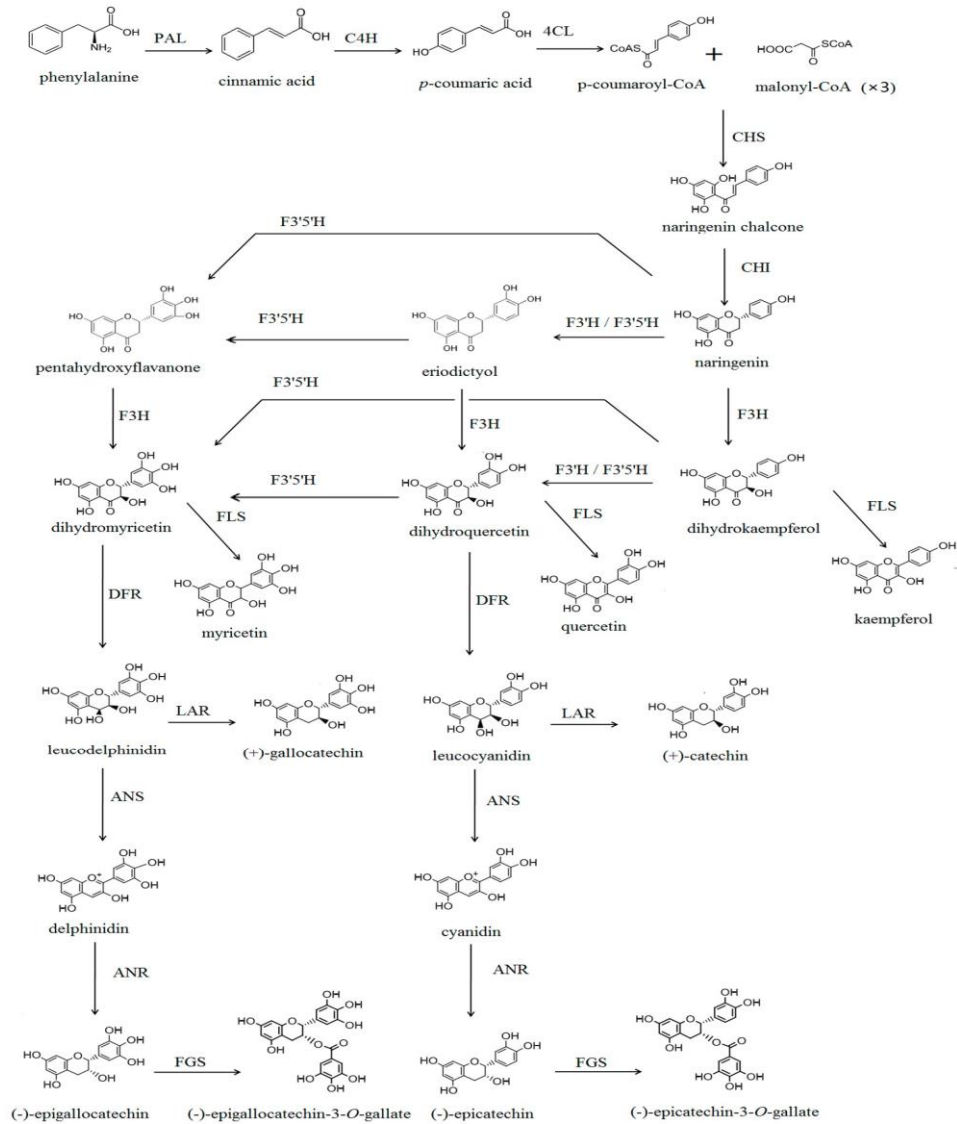


Gambar 2. Struktur kimia katekin (British Pharmacopoeia, 2001)

Thorpe *et al* (1921) mengemukakan bahwa kandungan utama gambir adalah asam kateku tannat (20-50%), katekin (7-33%), dan pirokatekol (20-30%), sedangkan yang lainnya dalam jumlah terbatas. Kandungan katekin yang sangat diharapkan dari tanaman gambir merupakan karakter kuantitatif yang mana banyak dikendalikan oleh beberapa gen. Katekin yang dihasilkan merupakan hasil dari metabolit sekunder yang banyak dipengaruhi oleh beberapa enzim yang disandikan oleh beberapa gen (Ferita, 2011). Katekin disintesis oleh berbagai cabang jalur biosintetik fenilpropanoid (Wang *et al.*, 2012). Sintesis kalson adalah langkah pertama dalam jalur biosintesis flavonoid, dan sintase chalcone gen (CHS) menyandikan enzim kunci untuk langkah ini. Ada korelasi kuat antara ekspresi gen CHS dan kandungan flavonoid di banyak tanaman (Kamiishi *et al.*, 2012; Morita *et al.*, 2012; Dare *et al.*, 2013).

Pada awal jalur biosintesis flavonoid enzim chalcone synthase (CHS) melakukan kondensasi satu molekul 4-coumaroyl-CoA dan tiga molekul melonyl-CoA untuk menghasilkan naringenin chalcone. Chalcone diisomerisasi ke flavanon melalui enzim chalcone flavanone isomerase (CHI). Berbagai perantara tengah ini, jalur terbagi menjadi beberapa cabang samping, masing-masing menghasilkan kelas yang berbeda flavonoid. 3-hidroksi stereospesifik (2S)-flavon dikatalisis menjadi dihidroflavonol oleh flavanon-3-hidroksilase (F3'H). Untuk biosintesis antosianin, dihidroflavonol dikatalisis menjadi flavan-3,4-diol (leucoanthocyanins) oleh dihydroflavonol reductase (DFR), kemudian leucoanthocyanidins dikonversi menjadi antosianidin oleh anthocyanidin sintase (ANS). glukosida dikatalisis oleh glukosa-flavonoid 3-O-glukosil UDP transferase (UFGT), yang menstabilkan antosianidin dengan 3-Oglukosilasi. Biosintesis PA

dan anthocyanin dimulai dengan hal yang sama. Leucocyanidin dikatalisis oleh enzim LAR (*Leucoanthocyanidin reductase*) untuk membentuk katekin sedangkan cyanidin dikatalisis oleh enzim ANR (*Anthocyanidin reductase*) untuk membentuk epikatekin (Stafford, 1990). Jalur biosintesis flavonoid dapat dilihat pada Gambar 3 di bawah ini.



Gambar 3. Skema biosintesis flavonoid (Zhou *et al.*, 2016)

2.1.6 Khasiat dan kegunaan gambir

Gambir memiliki banyak kegunaan. Secara tradisional gambir digunakan sebagai pelengkap makanan sirih dan obat-obatan. Rebusan daun muda dan tunasnya digunakan sebagai obat diare, disentri dan obat kumur pada sakit kerongkongan. Sedangkan secara modern, gambir banyak digunakan sebagai bahan baku industri farmasi dan makanan, diantaranya bahan baku permen yang melegakan kerongkongan bagi peroko di Jepang, karena gambir mampu menetralkan nikotin (Suherdi *et al.*, 1991). Sedangkan di Singapura gambir digunakan sebagai bahan baku obat sakit perut dan sakit gigi (Nazir, 2000).

Kegunaan gambir sebagai antidiare dimungkinkan karena gambir tannin yang dapat mengendapkan protein. Tannin juga dapat menciutkan mukosa dan membentuk lapisan pada permukaan untuk melindungi lapisan dibawahnya dari serangan bakteri, iritasi oleh zat-zat kimia mekanik. Selain itu tannin dalam jumlah kecil dapat menghalangi pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan dalam jumlah besar dapat berfungsi sebagai antibakteri dengan cara mengumpulkan protoplasma yang terdapat pada bakteri. Namun demikian, terhadap mukosa, tannin akan berakibat terjadinya pengumpulan lapisan yang lebih dalam sehingga bisa mengakibatkan iritasi dan muntah-muntah (Bakhtiar, 1991).

Tannin yang ada pada gambir juga dapat digunakan sebagai penawar racun alkaloid dan logam, karena ia dapat mengendapkan racun tersebut. Di laboratorium, tannin juga digunakan untuk reaksi pengenal alkaloid, protein dan garam-garam logam berat. Getah gambir dapat digunakan sebagai zat penyamak kulit. Pada proses penyamakan, katekin dan asam kateku tannin mengendapkan sisa-sisa protein yang tertinggal di kulit. Dengan bebasnya kulit dari protein maka

kulit tidak bisa lagi ditumbuhi mikroorganisme, sehingga kulit menjadi lemas dan tidak mudah busuk (Nazir, 2000).

Penelitian mengenai aktivitas ekstrak gambir telah banyak dilakukan diantaranya aktivitas antioksidan dan antibakteri dari ekstrak etanol daun gambir (Miller, 1996; Arakwa *et al.*, 2004), sebagai antiseptik mulut (Lucida *et al.*, 2007), dan gambir sebagai immunomodulator (Ismail, 2009). Selain itu juga telah diteliti kemampuan ekstrak gambir sebagai penghambat sintesa asam lemak (Shu-Yan *et al.*, 2008).

2.2 Desain Primer Degeneratif

Primer yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA template. Keberhasilan suatu 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 hidrosi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk diproses eksistensi DNA. Pasangan primer terdiri dari 2 oligonukleotida yang mengandung 18-28 nukleotida dan mempunyai kandungan G-C sekitar 40-60%. Ujung 3' primer penting untuk menentukan spesifitas dan sensitivitas PCR, ujung ini tidak boleh mempunyai 3 atau lebih basa G (guanine) atau C (Cytosine), karena dapat menstabilisasi penempelan primer yang tidak spesifik. Disamping itu ujung 3' kedua primer tidak boleh komplementer satu dengan yang lain, karena hal ini akan menurunkan hasil dari produk yang diinginkan. Spesifitas PCR sangat tergantung pada suhu *melting* (T_m) primer, yaitu suhu dimana setengah dari jumlah primer menempel pada *template*. T_m dapat dihitung dengan rumus : $[2(A+T) + 4(C+G)]$. Hasil PCR akan baik jika T_m

kedua primer sama dan T_m yang baik antara 50-65°C. konsentrasi primer yang digunakan harus optimal. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan menyebabkan penempelan pada tempat yang tidak spesifik dan akumulasi produk yang tidak spesifik serta meningkatkan kemungkinan terbentuk primer– dimer, sebaliknya jika konsentrasi terlalu rendah maka hasil PCR juga akan rendah. DNA polymerase adalah enzim yang mengkatalisis polimerisasi DNA. Biasanya digunakan *Taq polymerase* yang stabil pada suhu yang tinggi karena enzim ini diisolasi dari *Thermus aquaticus* yang hidup pada sumber air panas. Enzim ini mempunyai aktivitas eksonuklease dari 5' ke 3' tapi tidak mempunyai aktivitas eksonuklease dari 3' ke 5'. Konsentrasi enzim yang dibutuhkan untuk PCR biasanya 0,5 sampai 2,5 unit. Kelebihan jumlah enzim mengakibatkan akumulasi produk yang tidak spesifik, sedangkan jika terlalu rendah maka hanya sedikit produk yang dihasilkan (Handoyo *et al.*, 2000; Sulistyaniingsih, 2007).

Primer yang dibuat secara degeneratif dapat digunakan untuk bahan cloning berbasis PCR. Hal ini didasari atas adanya kesamaan sekuens gen dari organisme baik yang masih satu spesies maupun sudah berbeda genus ataupun familinya. Selama gen-gen dari organisme yang berbeda tersebut memiliki kesamaan sekuens, maka sekuens gen dari organisme-organisme berbeda tersebut dapat diamplifikasi. Primer degeneratif adalah primer yang mengandung nukleotida non spesifik atau nukleotida selain A (Adenine), C (Cytosine), T (Thymine), dan G (Guanine). Primer degeneratif biasanya menggunakan lambang nukleotida degeneratif selain dari lambang A (Adenine), C (Cytosine), T (Thymine) dan G (Guanine). Nukleotida degeneratif dimaksudkan untuk bisa dipakai pada beberapa sekuens yang berbeda. Ada beberapa tingkatan

degeneratifitas lambang nukleotida. Ada yang mewakili dua nukleotida yang berbeda dan ada yang mewakili tiga nukleotida yang berbeda (Jamsari, 2013).

2.3 Isolasi Gen Berbasis PCR pada Tanaman

Bioteknologi tanaman pada dasarnya adalah perluasan dari teknik pemuliaan tanaman tradisional. Akan tetapi, tidak seperti pemuliaan tanaman tradisional yang dalam kegiatannya melibatkan ratusan bahkan ribuan gen, maka bioteknologi memungkinkan transfer satu atau beberapa gen saja yang dikehendaki. Teknik bioteknologi memiliki tingkat akurasi yang lebih tinggi dan lebih terkendali sehingga memungkinkan para pemulia tanaman bekerja dengan lebih tepat untuk mengembangkan karakter-karakter yang menguntungkan dan menghindari karakter-karakter yang tidak dikehendaki (Jamsari, 2007).

Gen merupakan unit hereditas suatu organisme hidup. Gen ini dikode dalam materi genetik 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). Molekul DNA membawa informasi hereditas dari sel. Komponen protein (molekul-molekul histon) dari kromosom mempunyai fungsi penting dalam pengemasan dan pengontrolan molekul DNA yang sangat panjang sehingga dapat dimuat di dalam nukleus dan mudah diakses ketika dibutuhkan (Fatchiyah *et al.*, 2011).

Perbanyakan molekul DNA tidak hanya dapat dilakukan dengan memanfaatkan mekanisme kehidupan mikroorganisme. Menggandakan jumlah molekul DNA dapat juga dilakukan melalui teknik PCR (Polymerase Chain Reaction) (Muladno, 2010). Menggunakan teknik PCR pada setiap materi genetik apapun dapat ditentukan dengan tepat dan direplikasikan dalam jumlah banyak dengan cara menentukan sepasang primer yang mengapit sekuens DNA yang dikehendaki (Stanfield *et al.*, 2003).

Dalam pelaksanaan PCR, material yang digunakan adalah molekul DNA yang akan dianalisis, molekul DNA ini berfungsi sebagai template untuk pembentukan molekul DNA selanjutnya. Dibutuhkan pula primer berupa oligonukleotida, enzim DNA polymerase yang bebas yang terdapat pada larutan reaksi dan larutan buffer yang mengandung larutan magnesium chloride (MgCl₂), deoxynucleotide triphosphates (dNTPs). Ion magnesium dibutuhkan sebagai kofaktor enzim DNA polymerase (Jamsari, 2007).

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR (Polymerase Chain Reaction) adalah suatu teknis sintesis dan amplifikasi DNA secara in-vitro. Teknik ini ditemukan oleh Kary Mulis pada tahun 1985, merupakan prosedur yang efektif untuk amplifikasi sekuens DNA target in-vitro dan dapat memperoleh 10^6 - 10^7 kali jumlah DNA target awal. Reaksi polymerase berantai atau dikenal sebagai (Polymerase Chain Reaction) merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara in-vitro. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan memperoleh 2ⁿ kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana

cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target meminimalkan amplifikasi urutan non-target. Proses ini mirip dengan proses replikasi DNA dalam sel. Amplifikasi menghasilkan lebih dari sejuta kali DNA asli (Sudjadi, 2008).

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 polymerase. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP (nukleotida berbasis Adenine), dCTP (Sitosin), dGTP (Guanine), dan dTTP (Timin) (Muladno, 2010).

Metoda PCR telah banyak dikembangkan dan telah digunakan dalam berbagai bidang, sampai sekarang metoda ini digunakan dalam berbagai bidang antara lain(Sudjadi, 2008) :

1. Mengkloning gen yang telah diketahui proteinnya

Primer bisa dirancang dari rantai asam amino atau rantai gen. Hasil amplifikasinya dapat digunakan untuk mengetahui rantai panjang suatu gen dari DNA maupun genom DNA.

2. Amplifikasi DNA yang sudah lama

Amplifikasi yang dilakukan pada fosil maupun benda-benda museum dapat digunakan para arkeolog untuk mengetahui atau menelusuri sejarah maupun evolusi yang terjadi.

3. Mendeteksi infeksi yang disebabkan oleh virus maupun bakteri

PCR lebih sensitif dan lebih cepat dari teknik biasa.

4. Diagnose penyakit secara genetik

-Diagnose penyakit turunan seperti diabetes mellitus, hemofili A dan B

-Diagnosa dan memonitor terapi kanker

-penentuan golongan darah.

5. Penggunaan di bidang forensik

Penggunaan PCR di bidang forensic bisa digunakan untuk menemukan pelaku suatu kejahatan. DNA yang diambil bisa dari darah yang ada pada baju korban atau bagian lain.

Tabel 2. Kelebihan dan Kekurangan PCR (Sulistyaningsih, 2007)

Kelebihan	Kekurangan
Sensitivitas tinggi	Teknik prosedur yang kompleks, memerlukan beberapa tahapan
Spesifitas tinggi	Peralatan yang mahal
Reproduksifitas baik	Reagen mahal
Sangat cepat, dapat memberikan hasil pada hari yang sama	
Dapat mendeteksi dan membedakan variasi gen	

Gen yang dideteksi bisa yang sudah diproses	
---	--

2.3.1 Prinsip Umum PCR

Komponen komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah DNA, sepasang primer, dNTPs (deoxynucleotide triphosphates), magnesium klorida, buffer PCR, dan enzim polymerase DNA (Handoyo *et al.*, 2000). Template DNA merupakan molekul DNA untai ganda yang mengandung sekuen target yang akan diamplifikasi. Template ini berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA target yang dituju. Penyiapan DNA template untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid dengan menggunakan metode standar yang ada. Pemilihan metode yang digunakan di dalam penyiapan DNA *template* tergantung dari tujuan eksperimen (Handoyo *et al.*, 2000; Sulistyaningsih, 2007).

dNTPs (deoxynucleotide triphosphates) merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses PCR dNTPs bertindak sebagai *building block* DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTPs akan menempel pada gugus –OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA template. Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan untuk menghasilkan keseimbangan optimal antara hasil, spesifitas dan ketepatan PCR. dNTPs akan menurunkan Mg^{2+} bebas sehingga mempengaruhi aktivitas

polymerase dan menurunkan penempelan primer. Konsentrasi dNTPs yang rendah akan meminimalkan *mispriming* pada daerah non target dan menurunkan kemungkinan perpanjangan nukleotida yang salah, oleh karena itu spesifitas dan ketepatan PCR meningkat pada konsentrasi dNTP yang lebih rendah (Handoyo *et al.*, 2000; Sulistyaningsih, 2007).

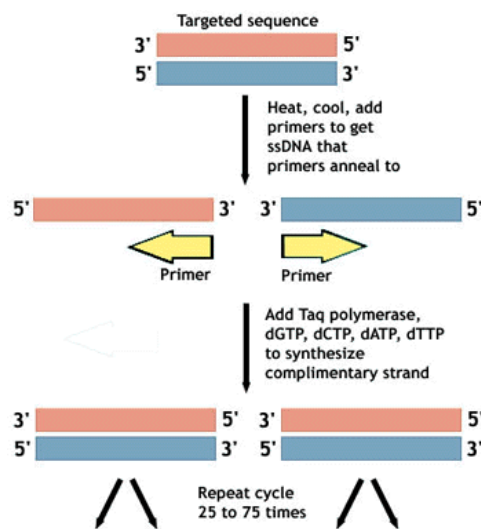
Optimalisasi konsentrasi Mg^{2+} merupakan hal yang sangat penting yang diperoleh dari $MgCl_2$. $MgCl_2$ bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polymerase. Konsentrasi ion ini mempengaruhi penempelan primer, suhu pemisahan *template* dan produk PCR, spesifitas produk, pembentukan primer-dimer serta aktivasi dan ketepatan enzim. Ion Mg^{2+} bebas akan mengikat DNA *template*, primer akan membentuk kompleks terlarut dengan dNTP untuk membuat substrat yang akan dikenali oleh enzim *Taq polymerase*. Konsentrasi yang lebih tinggi akan meningkatkan produk PCR tetapi menurunkan spesifitasnya. Konsentrasi ion ini tergantung pada konsentrasi bahan-bahan yang mengikatnya seperti dNTP, EDTA dan fosfat. Selain itu diperlukan buffer untuk menjamin pH medium. Umumnya buffer PCR sudah mengandung senyawa $MgCl_2$ yang diperlukan (Handoyo *et al.*, 2000; Sulistyaningsih, 2007).

2.3.2 Proses PCR

Proses PCR meliputi beberapa tahap yaitu denaturasi, annealing dan extension (Hapsari *et al.*, 2007)). Denaturasi merupakan proses putusnya rantai ikatan ganda (*double stranded*) menjadi rantai tunggal (*single stranded*), masing-masing akan menjadi template DNA pada proses PCR. Proses denaturasi terjadi pada suhu $95^{\circ}C$ selama 30 detik (Sahilah *et al.*, 2012).

Sedangkan annealing adalah proses pelekatan primer pada template DNA karena penurunan suhu 55°C selama 30 detik (Sahilah *et al*, 2012). Besarnya suhu tergantung dari panjang primer serta kandungan basa G dan C. setelah proses ini selesai maka akan dinaikkan kembali untuk mengaktifkan Taq DNA polymerase (Hapsari *et al.*, 2007).

Extension adalah proses perpanjangan nukleotida dengan bantuan Tag DNA polymerase. Suhu yang digunakan adalah 72°C selama 30 detik (Sahilah *et al*, 2012).dimulai dari ujung 5'α-fosfat ke ujung 3' hidroksil (Hapsari *et al.*, 2007).



Gambar 4. Proses Kerja PCR (Azizah, 2009)

2.4 Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul seluler berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan (Hapsari *et al.*, 2007). Elektroforesis dapat dilakukan menggunakan gel agarosa atau gel poliakrilamid

(Hapsari *et al.*, 2007). Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 bp dan dijalankan secara horizontal, sedangkan elektroforesis gel poliakrilamid dapat memisahkan 1 bp dan dijalankan secara vertical. Elektroforesis poliakrilamid biasanya digunakan untuk menentukan urutan DNA atau sekuensing. Cara kerja keduanya berdasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyanggah matriks stabil dibawah pengaruh medan listrik (Gaffar, 2007).

Setelah proses elektroforesis selesai, selanjutnya dilakukan proses pewarnaan (*staining*) agar molekul sampel yang telah terpisah dapat dilihat (Windiastika, 2012) Untuk gel agarosa, deteksi posisi migrasi fragmen DNA dilakukan dengan menggunakan pewarna *ethidium bromide*. Cara pendeteksian menggunakan *ethidium bromide* merupakan cara yang paling sederhana dan relatif murah (Jamsari, 2007).

Larutan DNA yang bermuatan negatif dimasukkan kedalam sumur-sumur yang terdapat dalam gel agarosa dan diletakkan di kutub negatif, apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan *buffer* yang sesuai maka DNA akan bergerak ke kutub positif. Laju migrasi DNA dalam medan listrik berbanding terbalik dengan massa DNA. Migrasi DNA terutama ditentukan oleh ukuran panjang dan bentuk DNA. Fragmen DNA yang berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibanding yang berukuran besar, sehingga elektroforesis mampu memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran panjangnya (Gaffar, 2007).

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. Percobaan dilakukan dari bulan Maret sampai Juli 2020.

3.2 Alat Bahan dan

Alat yang digunakan adalah mortal, pistil, tube eppendorf 2ml, tube eppendorf 1.5 ml, vortex, waterbath, centrifuge, lemari pendingin -200°C, botol scott, tube falcon, microwave, gel tray, comb 8 slot, penghambat gel, thermometer, lemari asam, unit elektroforesis (Mupid-Ex-Jepang), gel documentation system (Cybertech-Jerman), UV-transluminator (Biometra-Jerman), dan mesin PCR (Biometra-Jerman).

Bahan utama yang digunakan pada kegiatan penelitian ini adalah daun muda (pucuk) gambir. Bahan kimia yang dipakai dalam kegiatan penelitian ini adalah 2x buffer CTAB, β -Mercaptoethanol, Phenol, Chloroform, Agarose, 0.5x TBE, Ethidium bromide, λ DNA 50 mg, sampel DNA, kappa 2G, 10x BPB, ddH₂O, PCR, buffer PCR, dNTPs, *Taq polymerase*, primer, DNA template.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu eksperimen dan deskriptif. Metode eksperimen dilakukan untuk menguji spesifitas dari primer degeneratif yang digunakan pada isolasi gen penyandi CHS (*Chlacone synthase*) berbasis PCR. Sedangkan metode deskriptif dilakukan untuk menjelaskan hasil pengujian primer pada isolasi gen penyandi CHS (*Chlacone synthase*).

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel

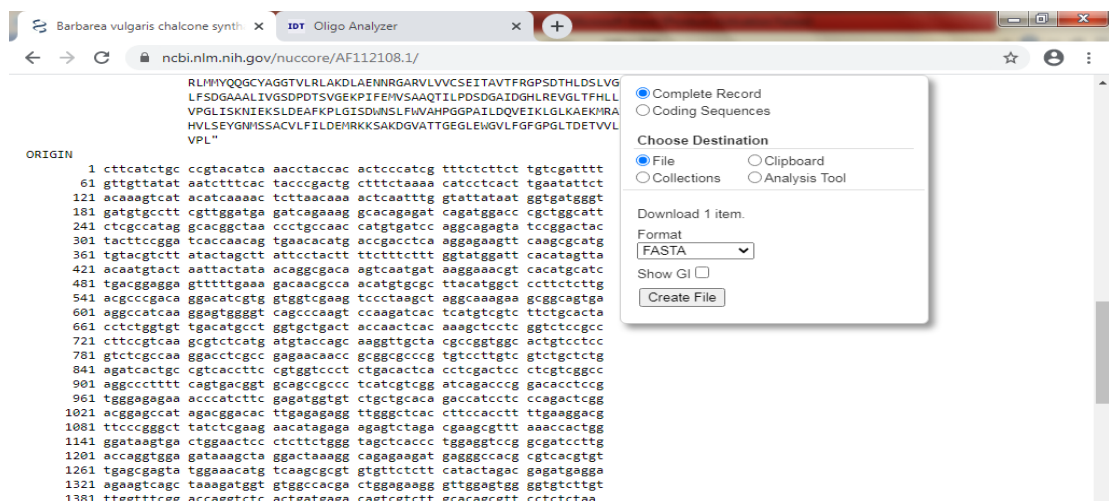
Kegiatan pengambilan sampel gambir tipe Riau Mancik diambil di Siguntur, Kabupaten Pesisir Selatan. Bagian tanaman yang diambil yaitu bagian pucuk daun muda tanaman gambir.

3.4.2 Identifikasi Morfologi di Herbarium

Kegiatan identifikasi sampel daun gambir dilakukan di Herbarium FMIPA Universitas Andalas. Karakterisasi morfologi mengacu kepada mengamati karakter daun. Struktur anatomi diamati terhadap 7 karakter ; kutikula (atas dan bawah), epidermis (atas dan bawah), palisade, spons, dan tebal daun pada gambir tipe riau mancik.

3.4.3 Desain Primer Degeneratif

Pada tahapan pendisainan primer degeneratif diawali dengan membuka situs NCBI (National Center for Biotechnology Information), setelah itu mencari sekuen gen tanaman yang mengandung gen CHS (*Chalcone synthase*), data-data yang terdapat pada NCBI (National Center for Biotechnology Information) disimpan dalam bentuk FASTA.



Gambar 5. Sekuen gen CHS hasil penulisan pada NCBI

Data 21 sekuen tanaman yang mengandung gen CHS (*Chalcone synthase*) tersebut dilakukan *multialignment* dengan menggunakan *software* ClustalW dari BioEdit.



Gambar 6. Hasil multialignment 21 sekuen gen CHS

Setelah dilakukan *multialignment* kemudian primer disusun dengan menggunakan penyusun sekuen primer menurut IUPAC seperti yang terdapat pada Tabel 3.

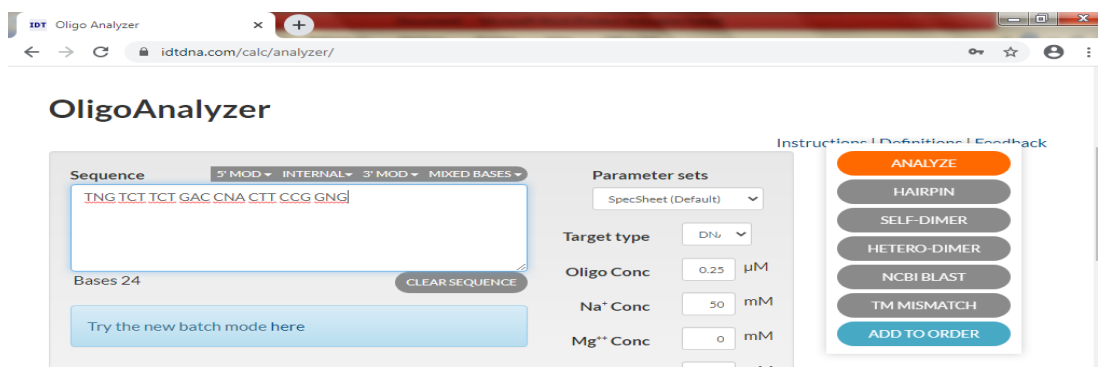
Tabel 3. Lambang nukleotida yang digunakan dalam penyusunan sekuen primer degeneratif menurut IU

Lambang	Basa/nukleotida	Lambang	Basa/Nukleotida
A	<i>Adenosine</i>	M	A C (aMino group)
C	<i>Cytosine</i>	S	G C (S tr ong interaction)
G	<i>Guanine</i>	W	A T (W e ak interaction)
T	<i>Thymine</i>	B	G T C (bukan A) (B l setelah A)
U	<i>Uracil</i>	D	G A T (bukan C) (D l setelah C)
R	G A(<i>puRine</i>)	H	A C T (bukan G) (H l setelah G)

Y	T C(<u>pYrimidine</u>)	V	G C A (bukan T, bukan U) (<u>V</u> setelah U)
K	G T(<u>Ketone</u>)	N	A G C T (<u>zNy</u>)

Sumber: (Jamsari, 2013)

Setelah primer disusun dengan menggunakan penyusun primer menurut IUPAC kemudian dilihat apakah desain primer tersebut sesuai dengan syarat yang dapat dilihat pada *software* IDT, selanjutnya dimasukkan sekuen primer yang telah di desain.



Gambar 7. Laman awal situs IDT

Kemudian klik *Analyze*, maka akan muncul GC dan TM pada primer yang telah di desain.



Gambar 8. Hasil *analyze* primer pada situs IDT

Primer yang disintesis kemudian diuji terhadap DNA hasil isolasi , dengan melakukan optimasi pada suhu annealingnya.

3.4.4 Isolasi DNA

DNA diisolasi menggunakan metode CTAB yang dikembangkan oleh (Doyle dan Doyle,1987) dengan sedikit modifikasi oleh (Fadli, 2016) pada bagian jumlah dan waktu yang digunakan.

1. DNA diisolasi dari daun muda (pucuk) tanaman gambir. Sebanyak 1 lembar daun digerus dengan mortal sampai halus, lebih cepat lebih baik.
2. Sekitar 400 mg jaringan yang sudah digerus dimasukkan ke dalam *tube eppendorf* 2 ml yang steril.
3. Ditambahkan 1 ml 2x buffer ekstraksi CTAB + β -Mercaptoethanol 1% dan dibolak-balik.
4. Divortex sampai semuanya tercampur rata, kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dan dibolak-balik setiap 10 menit sekali.
5. Ditambahkan 500 μ l Campuran Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) kemudian diratakan dengan cara membolak-balik selama 1 menit.
6. Disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm.
7. Dilakukan pemisahan supernatan ke dalam tube eppendorf 2 ml yang baru dan steril.
8. Ditambahkan 500 μ l chloroform:isoamilakohol (24:1) tabung dibolak-balik selama 10 menit, dilakukan sentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.

9. Supernatan dipindahkan ke tube eppendorf 1,5 ml baru yang steril dan ditambahkan 1/10 kali volume larutan natrium asetat dan 1 ml ethanol 99% dingin, kemudian tabung dibolak balik selama 1 menit sampai terlihat benang-benang halus.
10. Untuk mendapatkan DNA pada dasar *tube eppendorf* dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit.
11. Larutan dibuang dan pelet DNA dicuci dengan 500 μ l ethanol 70% dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, larutan etanol dibuang.
12. DNA dikeringkan pada suhu ruang di atas tissue.
13. Dilarutkan kembali dengan 1x Buffer TE dan disimpan sebagai stok pada suhu -20°C .

3.4.4 Elektroforesis

Metode yang digunakan untuk identifikasi, pemisahan, dan purifikasi fragmen DNA adalah menggunakan gel agarosa 1%. 1 gr agarose ditimbang dan ditambahkan 100 ml 0,5x TBE dan dimasukkan ke dalam botol Shcott. Dimasak menggunakan microwave dengan suhu medium hight selama 1,5 menit. Tutup botol Scott harus dalam keadaan longgar saat dimasak, proses pemasakan dilakukan sampai Agarose benar-benar mencair (larut). Gel tray, Comb 8 slot, dan penghambat gel dipasang, yang akan digunakan selama running DNA. Gel agarose yang masih mencair ditambahkan ethidium bromide sebanyak 5 μ l (10 mg/ml), diaduk sampai merata dengan menggunakan batang pengaduk. Agarosa dituangkan ke dalam gel tray dan dibiarkan sampai mengeras pada lemari asam sekitar 30 menit. Selagi menunggu gel membeku atau padat cocktail elektroforesis

disiapkan. Pembuatan cocktail elektroforesis terdiri dari marker standar lamda 1 μl dan 2 μl bpb, sampel DNA masing-masing 2 μl . Pada lamda DNA dan sampel DNA ditambah 10x BPB sebanyak 1 μl .

Setelah agar membeku, gel tray dan penghambat gel dibuka. Pada bak elektroforesis diisi buffer 0,5x TBE, sampai permukaan gel terbenam, sekitar beberapa mm dari permukaan buffer TBE. Sampel DNA dan standar lamda dimasukkan ke dalam well (lubang) paling kiri dengan hati-hati dan jangan sampai merusak sumur gel. Sistem di running dengan menggunakan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah selesai, gel diletakkan di atas UV transiluminator, dan didokumentasikan dengan gel doc (Biometra, Jerman). Data disimpan dalam bentuk digital. Analisa kualitas dan kuantitas dilakukan dengan membandingkannya dengan kontrol lamda DNA yang digunakan.

3.4.6 PCR dan Elektroforesis

Setelah primer disusun dan disintesis, kemudian dilakukan kegiatan amplifikasi DNA yang telah diisolasi. Amplifikasi menggunakan primer degeneratif hasil desain dilakukan dengan teknik PCR Gradient (Biometra-Jerman).

Tabel 4. Coctail PCR untuk amplifikasi DNA

KOD I mix blue	25 μl
Primer forward	1,5 μl (kosentrasi 10 pmol/ μl)
Primer reverse	1,5 μl (kosentrasi 10 pmol/ μl)
DNA template	8,2 μl
Water (ddH ₂ O)	13,8 μl
Volume akhir	50 μl

Tabel 5. Kondisi PCR untuk amplifikasi fragmen

No	Step	Suhu	Waktu	Go To	Loop	dT
1.	Pre-denaturasi	95°C	3 menit			
2.	Denaturasi	95°C	30 detik			
3.	Annealing	75°C	30 detik			-1
4.	Ekstension	72°C	2 menit	2	14	
5.	Denaturasi	95°C	30 detik			
6.	Annealing	60°C	30 detik			
7.	Ekstension	70°C	2 menit	5	24	
8.	Ekstensi akhir	72°C	5 menit			
9.	Pause	8°C	0			

Setelah reaksi PCR selesai, DNA hasil amplifikasi dianalisa lebih lanjut dengan elektroforesis untuk diload pada gel agarosa 1 % dalam buffer TBE 0,5 X. Masing- masing produk PCR sebanyak 3 µl dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis dengan mengikutsertakan 3 µl DNA 1 kb ladder (100 ng/µl) pada sumur pertama. Seterusnya gel agarose dijalankan dengan teknik elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah itu hasil elektroforesis didokumentasikan dengan gel doc (Biometra Jerman).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 HASIL

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut:

1. Secara morfologi sampel diidentifikasi di Herbarium ANDA Fakultas Biologi Universitas Andalas menunjukkan spesies *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. dengan family Rubiaceae (lampiran 2).
2. Didapatkan 8 pasangan primer degeneratif yaitu 4 primer *forward* dan 2 primer *reverse* yang dapat digunakan dalam kegiatan isolasi DNA tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik (Tabel 6).
3. Hasil isolasi DNA tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik berupa larutan jernih tidak berwarna (bening).
4. Profil pita DNA hasil isolasi tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik sesuai dengan standar lamda (λ), gambar (5).
5. Hasil amplifikasi DNA tanaman gambir menggunakan primer degeneratif A1F dengan C1R diperoleh panjang fragmen DNA pada rentang 724 bp (gambar 7).

4.2 PEMBAHASAN

Primer degeneratif merupakan primer yang sekuennya memiliki basa-basa selain dari basa penyusun nukleotida DNA (Jamsari, 2013). Primer degeneratif yang digunakan didesain secara manual. Primer yang digunakan terdiri atas 2 primer yakni primer *forward* dan primer *reverse*. Primer *forward* merupakan oligonukleotida yang memiliki sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA

cetakan pada ujung 5'-fosfat. Sedangkan primer *reverse* merupakan oligonukleotida yang memiliki sekuen identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 3'-OH (Yuwono, 2006).

Perancangan primer perlu memperhatikan syarat dan kriteria primer yang optimal. Hal ini dikarenakan primer merupakan penentu kesuksesan amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (Viljoen *et al.*, 2005). Menurut (Singh, 2001) kandungan GC 50-60% adalah kandungan yang disarankan. Hal ini disebabkan karena primer dengan persen GC yang rendah diperkirakan tidak dapat berkompetisi untuk menempel secara efektif pada target yang dituju sehingga akan menurunkan efisiensi proses PCR, sedangkan persen GC yang tinggi akan meningkatkan T_m serta suhu *annealing* PCR (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Selanjutnya yang harus diperhatikan adalah *temperature melting* (T_m). Kriteria T_m yang ideal adalah 55-65°C. primer dengan T_m rendah tidak akan dapat bekerja pada temperature tinggi. Temperatur ini akan berpengaruh pada suhu *annealing* dalam proses PCR (Handoyo dan Rudiretna, 2000). T_m merupakan suhu dimana 50% untaian ganda DNA telah terpisah.

Hal yang harus diperhatikan selanjutnya adalah panjang primer. Umumnya panjang primer tersebut hanya berkisar 18-30 basa, panjang primer yang lebih dari 30 basa tidak akan meningkatkan spesifitas primer dan hanya akan meningkatkan harganya yang cukup mahal, sedangkan untuk primer yang berukuran pendek akan meningkatkan terjadinya *mispriming* (Handoyo, D., & Rudiretna, 2000).

Pendisainan primer degemerartif dimulai dari mencari sekuen gen CHS pada tanaman yang di akses di *gene bank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Kemudian 21 data tanaman yang mengandung

sekuen gen CHS di BLAST dan disimpan dalam bentuk FASTA. Sekuen-sekuen gen yang digunakan untuk mendesain primer ini dapat dilihat pada Lampiran 7. Selanjutnya dilakukan *multialignment* dengan menggunakan program Clustal W dari software BioEdit. Semua data sekuen yang berkaitan dengan sekuen gen CHS di *alignment* menggunakan bantuan program ini.

Tabel 6. Hasil desain primer gen CHS (*Chalcone synthase*)

No	Nama Primer	Sekuen Nukleotida (5->3)	Jumlah Basa	Estimasi Produk	%GC	Tm (°C)
1	CHS-A1F	TNG TCT TCT GAC CNA CTT CCG GNG	24	724	56,2%	61,3
	CHS-C1R	CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT	24		59,7%	63,6
2	CHS-B3F	RGA AAC GNC ACA TGC ABB TGA CNG ARG AG	29	906	52,9%	63,7
	CHS-C1R	CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT	24		58,7%	63,6
3	CHS-B1F	GAC ATN GTG GTG GTN GAR GTC CCH AAG C	28	815	56,5%	63,8
	CHS-C1R	CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT	24		58,7%	63,6
4	CHS-B2F	ATG ATG TAC CAR CAA GGT TGC TTC GCC G	28	632	51,8%	63,7
	CHS-C1R	CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT	24		58,7%	63,6
5	CHS-A1F	TNG TCT TCT GAC CNA CTT CCG GNG	24	272	56,2%	61,3
	CHS-A1R	CRT CAC TGA AGA GNG CYT GNC CNA CAN	27		55,6%	63,3
6	CHS-B3F	RGA AAC GNC ACA TGC ABB TGA CNG ARG AG	29	454	52,9%	63,7
	CHS-A1R	CRT CAC TGA AGA GNG CYT GNC CNA CAN	27		55,6%	63,3
7	CHS-B1F	GAC ATN GTG GTG GTN GAR GTC CCH AAG C	28	363	56,5%	63,8
	CHS-A1R	CRT CAC TGA AGA GNG CYT GNC CNA CAN	27		55,6%	63,3
8	CHS-B2F	ATG ATG TAC CAR CAA GGT TGC TTC GCC G	28	180	51,8%	63,7
	CHS-A1R	CRT CAC TGA AGA GNG CYT GNC CNA CAN	27		55,6%	63,3

Hasil dari *multialignment* diperoleh 4 primer *forward* (A1F, B3F, B1F, B2F) dan 2 primer *reverse* (C1R dan A1R) yang akan digunakan pada kegiatan amplifikasi DNA gen CHS menggunakan mesin PCR. Pemilihan primer ini memperhatikan T_m dan persen GC antara primer *forward* dan primer *reverse* serta daerah lestarinya. Pendisainan primer *forward* didisain dari sekuen yang berada pada posisi awal dari *multialignment*, sedangkan pendisaianan primer *reverse* didisain pada posisi akhir dari *multialignment* sehingga deretan antara primer *forward* dan primer *reverse* merupakan estimasi produk yang nantinya dihasilkan dari kegiatan amplifikasi PCR penyandi gen CHS. Dari nilai estimasi produk yang diperkirakan tersebut juga dapat dijadikan sebagai tolak ukur keberhasilan dari kegiatan amplifikasi penyandi gen CHS selain dari ada tidaknya *binding site* dan perbandingan konsentrasi antara primer dengan DNA *template*. Primer yang telah didisain tersebut memiliki basa-basa degeneratif seperti, S, Y, R, C, D, hal ini dikarenakan pada daerah tersebut terdapat banyak perbedaan basa. Sehingga mengharuskan mengganti basa-basa yang tidak sama tersebut dengan basa degeneratif pada setiap primer degeneratif yang dikeluarkan IUPAC. Basa-basa degeneratif tersebut diharapkan agar basa pengganti yang terdapat pada primer dapat menempel pada *template* sehingga memperbesar kemungkinan primer menempel pada *binding site* nya. Melalui analisis menggunakan IDT (*Integrated DNA Technologies*) hasil pendisainan primer telah memenuhi kriteria primer yang baik.

Setelah primer didesain, dilakukan kegiatan isolasi DNA genom tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.). Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat.

Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Corkill & Rapley, 2008; Dolphin, 2008). Kegiatan isolasi DNA diawali dengan mempersiapkan sampel yaitu bagian pucuk daun muda tanaman gambir yang diambil dari Kabupaten Pesesir Selatan tepatnya di Siguntur. Pucuk yang digunakan dalam keadaan segar yang disimpan di kantong plastik didalam box steroform yang diberi es batu guna menjaga kesegaran serta memudahkan dalam proses transportasi. Menggunakan bagian pucuk tanaman gambir bertujuan untuk mempermudah dalam kegiatan penggerusan. Hal ini dikarenakan pucuk tanaman gambir merupakan bagian terlunak dari jaringan tanaman gambir. Menurut Jamsari (2007), salah satu hal yang harus diperhatikan dalam kegiatan isolasi DNA adalah efektifitas isolasi, karena jaringan-jaringan tanaman tertentu memiliki spesifitas struktur fisikokimia yang berbeda-beda. Terlalu lama didalam proses penggerusan akan mengaktifkan enzim *DNAse* sehingga akan menguraikan molekul-molekul DNA. Apabila menggunakan bagian jaringan yang keras ataupun jaringan tua akan membutuhkan waktu yang lama dalam penggerusan.

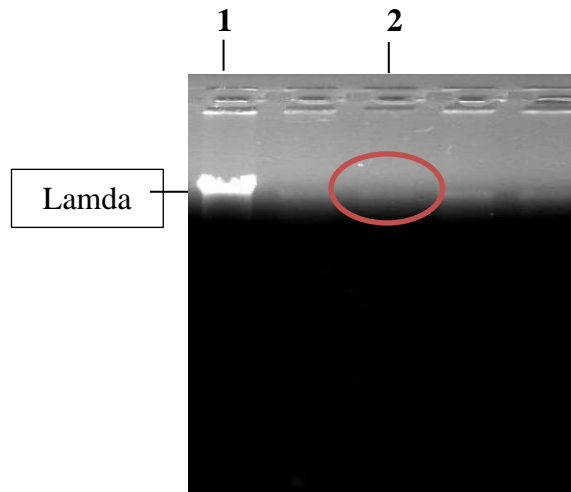
DNA diisolasi menggunakan metode CTAB yang dikembangkan oleh (Doyle dan Doyle, 1987) dengan sedikit modifikasi oleh (Fadli, 2016). CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA genom tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol (Lumaret *et al.*, 1998). Ada tiga tahapan proses isolasi DNA yaitu proses pemecahan (lisis), ekstraksi dan presipitasi. Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi

sel (Holme dan Hazel, 1998). Proses lisis dengan menggunakan CTAB sering dipakai untuk melisiskan membran sel pada isolasi DNA tumbuhan (Bettelheim & Landesberg, 2007). Dalam Kegiatan ini pemecahan sel dilakukan secara mekanis yaitu dengan melakukan penggerusan dan proses lisis dengan 2x CTAB. Dalam penggunaan buffer CTAB sering kali ditambahkan 2-mercaptoethanol yang berfungsi untuk menghilangkan kandungan senyawa polifenol dalam sel tumbuhan. Larutan 2-mercaptoethanol dapat menghilangkan polifenol dalam sel tanaman dengan cara membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa polifenol yang kemudian akan terpisah dengan DNA (Lodhi *et al.*, 1994). Senyawa polifenol perlu dihilangkan agar diperoleh kualitas DNA yang baik. Polifenol juga dapat menghambat reaksi dari enzim Taq polimerase pada saat dilakukan amplifikasi. Disamping itu polifenol akan mengurangi hasil ekstraksi DNA serta mengurangi tingkat kemurnian DNA (Porebski *et al.*, 1997).

Pada tahapan ekstraksi DNA terjadi deproteinase dengan menambahkan Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:4:1). Fenol digunakan sebagai pendenaturasi protein, ekstraksi dengan menggunakan fenol menyebabkan protein kehilangan kelarutannya dan mengalami presipitasi yang selanjutnya dapat dipisahkan dari DNA melalui sentrifugasi (Karp, 2008). Sedangkan Kloroform tidak dapat bercampur dengan air dan kemampuannya untuk mendeproteinisasi berdasarkan kemampuan rantai polipeptida yang terdenaturasi untuk masuk atau ke dalam fase antara kloroform – air. Proses ini dapat dilakukan dengan membentuk emulsi dari air dan kloroform dengan sentrifugasi. Isoamil alkohol berfungsi sebagai emulsifier dapat ditambahkan ke kloroform untuk membantu pembentukan emulsi dan meningkatkan luas permukaan kloroform-air yang mana

protein akan mengalami presipitasi (Surzycki, 2000). Untuk memekatkan DNA dilakukan proses presipitasi dengan menggunakan etanol absolut yang bertujuan untuk mempresipitasi DNA dan menggumpalkan sehingga terbentuk pelet setelah dilakukan sentrifugasi (Surzycki, 2000). Pada tahapan ini, DNA yang terpresipitasi akan terpisah dari residu-residu RNA dan protein yang masih tersisa.

DNA *template* hasil isolasi tersebut selanjutnya dielektroforesis untuk melihat keberhasilan dari proses isolasi. Elektroforesis merupakan pergerakan zat akibat adanya pengaruh medan listrik. Salah satu gel yang dapat digunakan adalah gel agarose.. gel tersebut berfungsi memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Pada pembuatan gel agarose ditambahkan *ethidium bromide* yang bertujuan agar hasil isolasi DNA dapat teramati secara visual. Etidium bromida akan menyisip ke dalam DNA sehingga apabila dilihat di bawah sinar UV pita-pita DNA menjadi terlihat karena etidium bromida akan memendarkan sinar UV. Sampel DNA memerlukan loading buffer sebelum dimasukkan ke dalam sumur, loading buffer ini berfungsi sebagai pewarna dan meningkatkan densitas sampel sehingga fragmen tersebut berada di dasar sumur dan tidak menyebar. Marker atau penanda yang digunakan pada elektroforesis merupakan campuran molekul dengan ukuran berbedabeda yang digunakan untuk menentukan ukuran molekul dalam pita sampel (Clark & Cristopher, 2008). Kemudian di *running* dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Hasil isolasi dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 9. Hasil isolasi DNA tanaman gambir tipe Riau Mancik, 1=Standar lamda, 2= Sampel DNA gambir tipe riau mancik.

Dari hasil visualisasi isolasi DNA terlihat pada hasil isolasi DNA terdapat pita yang sangat tipis. Hal ini menunjukkan bahwa DNA dari tanaman gambir tipe Riau Mancik memiliki ketajaman yang kurang jelas, hal ini bisa disebabkan karena konsentrasi DNA hasil ekstraksi kecil. Menurut (Langga *et al.*, 2012) dalam kegiatan isolasi DNA tanaman akan berbeda satu dengan yang lainnya. Selain itu inkubasi dan ekstraksi DNA dipengaruhi oleh kandungan polifenol dan metabolit sekunder lainnya seperti tanin yang dapat menurunkan kemurnian DNA. (Pharmawati, 2009) menyatakan bahwa keberhasilan ekstraksi DNA dipengaruhi oleh jenis tanaman serta kandungan yang terdapat pada daun tanaman tersebut. Dalam penelitian ini hasil isolasi DNA gambir tipe riau mancik digunakan untuk kegiatan penelitian selanjutnya.

Setelah primer didesain selanjutnya dilakukan kegiatan PCR. Adapun komponen PCR yang digunakan adalah KOD 1 mix blue 25 μ l, primer forward 1,5 μ l, primer reverse 1,5 μ l, template DNA 8,2 μ l, water 13,8 μ l, sehingga total nya 50 μ l satu kali reaksi. Setiap bahan memiliki fungsi masing-masing. Penggunaan KOD 1 mix blue memiliki kelebihan yaitu, dapat memberikan hasil

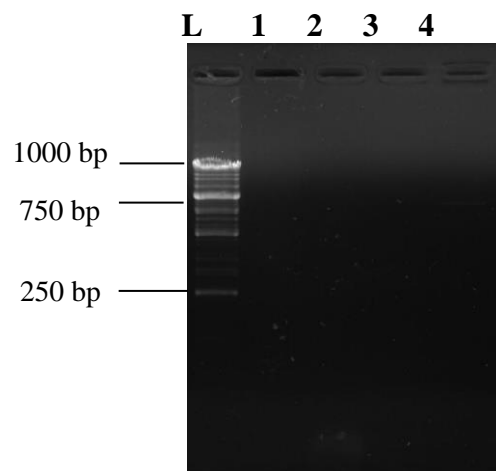
yang cepat, mudah digunakan dan efisiensi yang tinggi. (Handoyo & Rudiretna, 2000) menyatakan bahwa, sampel DNA berfungsi sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA. Sedangkan *nuclease free water* (NFW) berfungsi sebagai *buffer* untuk menjaga pH campuran medium.

Penentuan suhu annealing dilakukan dengan PCR-*gradien* biometra buatan Jerman. Suhu annealing ini sangat penting karena pada tahapan tersebut terjadi penempelan primer pada *binding site* nya. Sehingga dalam proses amplifikasi yang bertujuan dalam kegiatan isolasi gen CHS dapat menghasilkan fragmen atau produk. Dalam penentuan suhu pada saat amplifikasi primer degeneratif dilakukan dengan menjadikan suhu T_m yang tertinggi sebagai suhu maksimal dan T_m terendah untuk suhu minimal. Settingan suhu tertinggi dan terendah dimasukkan dalam data yang terdapat didalam program mesin PCR gradient dan secara otomatis mesin PCR gradient mengatur rentang suhu annealing.

Proses PCR meliputi 40 siklus berulang (tabel 5). Beberapa tahapannya yaitu denaturasi, annealing dan extension (Hapsari *et al*, 2007)). Proses PCR dimulai dari pra-denaturasi yang terjadi pada suhu 95°C selama 3 menit untuk memutuskan rantai ikatan ganda (*double stranded*) menjadi rantai tunggal (*single stranded*). Kemudian dilanjutkan dengan proses denaturasi selama 30 detik pada suhu 95°C. pada tahapan annealing terjadi proses pelekatan primer pada template DNA karena penurunan suhu 75°C selama 30 detik. Selanjutnya proses extension

adalah proses perpanjangan nukleotida dengan bantuan primer. Suhu yang digunakan adalah 70°C selama 2 menit.

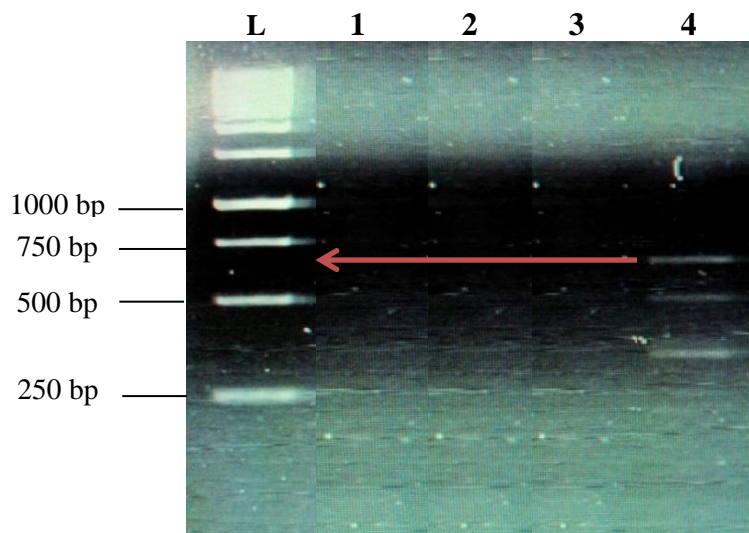
Setelah proses PCR selesai, DNA hasil amplifikasi divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 1% dalam buffer TBE 0,5 x. DNA yang bermuatan negatif dimasukkan kedalam sumur-sumur yang terdapat dalam gel agarosa, apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan buffer TBE maka DNA akan bergerak ke kutub positif. Masing-masing produk PCR sebanyak 3 µl dan 1 kb ladder 3 µl. Selanjutnya dijalankan proses elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Hasilnya diamati dengan UV transilluminator dan didokumentasikan dengan gel doc. Hasil amplifikasi dapat dilihat pada gambar 6 dan gambar 7.



Gambar 10. Hasil amplifikasi DNA tanaman gambir tipe Riau Mancik, L=ladder, 1=A1F-A1R, 2=B3F-A1R, B1F-A1R, B2F-A1R

Hasil dari amplifikasi kombinasi pasangan primer A1F, B3F, B1F, B2F dengan A1R menunjukkan bahwa tidak ada pita sama sekali. Hal ini menandakan bahwa primer yang telah didisain tidak dapat mendeteksi gen target. Sedangkan amplifikasi DNA tanaman gambir menggunakan kombinasi pasangan primer B3F-C1R, B1F-C1R, B2F-C1R (Gambar 7) tidak terdapat pita yang sesuai dengan

estimasi produk. hal ini menunjukkan tidak terjadi *binding site* pada tahapan annealing sehingga produk yang dihasilkan tidak jelas yang ditandai dengan tidak adanya pita DNA tunggal hasil amplifikasi. Adanya *false priming* atau kesalahan penempelan primer diluar suhu annealing akan mengakibatkan kesalahan pembentukan produk pada suhu tertentu sehingga hasil yang diinginkan tidak sesuai (Luh *et al.*, 2015).



Gambar 11. Hasil amplifikasi CHS, L=Ladder, 1= B3F-C1R, 2= B1F-C1R, 3=B2F-C1R, 4=A1F-C1R

Sedangkan untuk pasangan primer A1F-C1R terdapat pita DNA berada pada rentang 500-750 bp. Produk yang dihasilkan sesuai dengan estimasi yaitu 724 bp dan pita yang dihasilkan lebih tegas dan jelas. Hal ini menunjukkan bahwa kemurnian dan kualitas DNA berpengaruh terhadap hasil amplifikasi. Kualitas dan kemurnian DNA yang kurang baik, kemungkinan masih mengandung polisakarida, senyawa fenolik ataupun senyawa kontaminan lainnya. Kandungan fenol dan metabolit sekunder lainnya dapat mempengaruhi ekstraksi DNA dan mempengaruhi hasil kegiatan PCR.

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Didapatkan 8 pasangan primer degeneratif untuk mengisolasi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik. Pasangan primer A1F dengan C1R merupakan kombinasi primer yang paling bagus hasilnya.
2. Primer degeneratif A1F dan C1R dapat mendeteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik menghasilkan produk dengan estimasi sebesar 724 bp.

5.2 Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk melakukan kegiatan sekuensing untuk memastikan bahwa pita DNA yang didapatkan merupakan gen CHS (*Chalcone synthase*) dan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui gen-gen lain yang terlibat didalam proses biosintesis katekin seperti, F3H, LAR, ANS, ANR dan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Bakhtiar, A. 1991. Manfaat Tanaman Gambir. In *Makalah Penataran Petani dan Pedagang Pengumpul Gambir di Kecamatan Pangkalan Kabupaten 50 Kota 29-30 November 1991*. Padang.
- Balentine DA, Wiseman SA, B. L. 1997. The Chemistry of Tea Flavonoids. *CRir Rev Food Sci Nutr*, 37(8), 693–704.
- BPOM RI. 2007. *Acuan Sediaan Herbal Volume Ketiga Edisi Pertama*. Jakarta: Direktorat Jenderal Penhawasan Obat dan Makanan.
- British Pharmacopoeia 2001. www.pharmacopoeia.org.uk.
- Chuanhong Wang, Shuang Zhi , Changying Liu, Fengxiang Xu, Aichun Zhao, Xiling Wang, Xing Tang, Zhengang Li, P. H., & Maode, Y. 2017. *Isolation and characterization of a novel chalcone synthase gene family from mulberry*.
- Dao, T.T.H.; Linthorst, H.J.M.; Verpoorte, R. 2011. *Chalcone synthase and its functions in plant resistance*. 10, 397.
- Dare AP, Tomes S, Jones M, McGhie TK, Stevenson DE, Johnson RA, G., & DR, H. R. 2013. Phenotypic changes associated with RNA interference silencing of chalcone synthase in apple (*Malus × domestica*). *Plant J*, 74, 398–410.
- Denian, Irfan, A.J.P.Tamsin, & B. 2000. Teknologi Budidaya dan Pengolahan Gambir. *Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sukarami*.
- Dharma AP. 1985. *Tanaman Obat Tradisional Indonesia*. Jakarta: PN Balai Pustaka.
- Dolphin, W. D. 2008. *Biological Investigations*.
- Doyle, J. J. and J. L. D. 1987. *Isolation of Plant DNA from Fress Tissue*. 13–15.
- Fadli, M. 2016. *Isolasi Gen Dfr (Dihydroflavonol 4-Reductase) Pada Tanaman Gambir (Uncaria Gambir (Hunter) Roxb.) Berbasis Pcr (Polymerase Chain Reaction)*. Universitas Andalas Padang.
- Fatchiyah, E.L., Arumingtyas, S, Widyarti., dan S, R. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisa*. Malang: Penerbit Erlangga.
- Ferita, I. 2011. *Studi Hubungan Karakter Morfologi, Anatomi, dan Molekuler Terkait Potensi Kadar Katekin Pada Tanaman Gambir (Uncaria gambir(Hunter) Roxb)*. Padang: Disertasi Fakultas Pertanian Universitas Andalas.

- Gaffar, S. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Bandung: Universitas Padjajaran.
- Gerhard L. 2004. *Advances in Chemistry and Bioactivity of the Genus Uncaria Phytotherapy Research*.
- Gumbira et al. 2009. *Agroindustri dan Bisnis Gambir Indonesia*. IPB Press. Bogor, 118 hal.
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. 2000. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Unitas.
- Hapsari, A., & Misrianti, R. 2007. *Gen Cytochrome b sebagai Penanda Molekuler untuk Mendeteksi Cemaran Daging Tikus pada Bakso* (L. P. B. Molekuler, Ed.). Bogor: Lembaga Penelitian Institut Pertanian Bogor.
- Haryanto, S. 2009. *Ensiklopedia Tanaman Obat Indonesia*. Yogyakarta: Palmall.
- Istino Ferita, Jamsari, Irfan Suliansyah, G. 2013. Studi Hubungan Karakter Morfologi, Anatomi, dan Molekuler Terkait Potensi Kadar Katekin pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir*(Hunter)Roxb.). In *Didertasi Fakultas Pertanian Universitas Andalas*. Padang.
- Jamsari. 2007. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Amplifikasi Analisis Molekuler*. Pekanbaru: Unri Press.
- Jamsari. 2013. *Rekayasa Genetika untuk Analisa Genom dan Produksi Organisme Transgenik*. Riau: UR Press.
- Kamiishi Y, Otani M, Takagi H, Han DS, Mori S, Tatsuzawa F, O. H., & Kobayashi H, N. M. 2012. Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene. *Mol Breed*, 30, 671–680.
- Kwon, C., Daham, J., & Jung, S. 2011. *Chiral Separation of Catechin by Capillary Electrophoresis with α -cyclophorooctadecaoase Isolated from Rhodobacter Sphaeroides as Chiral Selectors*. Vol 32 No.(Korean Chem Soc).
- Langga, I, F., M, Restu., T, K. 2012. *Optimasi Suhu dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitti (Vitex cofassus Reinw.) Serta Analisa Keragaman Genetik dengan Teknik RAPD-PCR*. 3, 265 – 276.
- Luh Ketut Budi Maitriani, I Nengeh Wirajana, S. C. Y. 2015. DesainPrimer untuk amplifikasi Fragmen Gen inhA Isolat 134 Multidrug resistance Tuberculosis(MDR-TB) denfan Metode PCR. *Cakra Kimia*, 3.
- Lumaret, R., H. Michaud, J.P. Ripoll, and L. T. 1998. *Chloroplast DNA extraction procedure for species high in phenolics and polysaccharides*. In A. Karp, P.G.

- Mardisiswojo, S. dan H. R. 1968. *Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang Cetakan ke 2*. Jakarta: Depkes RI.
- Morita Y, Saito R, Ban Y, Tanikawa N, Kuchitsu K, Ando T, Yoshikawa M, N., & M. 2012. Tandemly arranged chalcone synthase A genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia hybrida*. *Plant J*, 70, 739–749.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika Edisi kedua*. Bogor: IPB press.
- Nazir, N. 2000a. *Budidaya, Pengolahan dan Prospek Diversifikasinya* (Gambir). Penerbit Hutanku.
- Nazir, N. 2000b) *Gambir Budidaya Pengolahan dan Prospek Diversifikasinya*. In *Yayasan Hutanku*. Padang: Yayasan Hutanku.
- Nazir, N. 2000c. *Gambir Budidaya Pengolahan dan Proyek Difraksi*. Padang: Yayasan Hutanku.
- Parkash A, Rigelhof F, M. E. 2007. Antioxidant Activity. Retrieved April 16, 2016, from Medallion Labs website: <http://medallionlabs.com/>
- Pharmawati, M. 2009. Optimization of DNA Extraction and PCR-RAPD Condition of *Grevillea* spp. (Proteaceae). *ISSN*, 1410 5292.
- Sahilah, A.M., Mohd. Fadly, L., Norrakiah, A.S. Aminah, A., Wan Aida, W. M. Ma'rif, A.G & Mohd. Khan, A. (2012). Halal Market Surveillance of Soft and Hard Gel Capsules in Pharmaceutical Products using PCR and Southern-Hybridization on The Biochip Analysis. *International Food Research Journal*, 19(1), 371–375.
- Sambrook J, Fritsch EF, M. T. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. USA: CSH Laboratory Pr.
- Singh, V. K. A. A. K. 2001. PCR Primer Design. *Molecular Biology Today*, 2, 27–32.
- Stafford HA. 1990. *Pathway to proanthocyanidins (condensed tannins), flavan-3-ols and unsubstituted flavans* (Flavonoid). Boca raton, Florida: CRC Press.
- Stanfield, DW., Jaimes SC., Raul, J. 2003. *Biologi Molekuler dan Sel*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Suherdi, A., D. & H. S. 1991. budidaya dan pasca panen gambir serta permasalahannya. *Biro Bina Pengembangan Sarana Perekonomian, Dati I Sumbar. Padang*.
- Thorpe, JF., Whiteley, M. 1921. *Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry*

(Fourth Edi). London: Green and Co.

Utami, P., Novi. W., Nina. W., Dewi. D., Agung. S., Tinton D. P., Hadi. L., Lukito. A.M., U. dan I. 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat 431 Jenis Tanaman Penggempur Aneka Penyakit*. Jakarta: PT. Agromedia Pustaka.

Viljoen GJ, Nel LH, C. J. 2005. *Moleculer Diagnostic PCR Handbook* (Dordrecht (NL), Ed.). Springer.

Wang Y, Gao L, Wang Z, Liu Y, Sun M, Yang D, Wei C, Shan Y, X. T. 2012. Lightinduced expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthetic pathways in callus of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Scientia Hort*, 133, 72–83.

Windiastika, G. 2012. *Metode Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa*. Surabaya: Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan.

Yuwono T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: Penerbit Andi.

Zhou, T. S., Zhou, R., Yu, Y. Ben, Xiao, Y., Li, D. H., Xiao, B., ... Yang, Y. J. 2016. Cloning and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase gene from tea plant (*Camellia sinensis*). *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms17020261>

Lampiran 1. Tanaman Gambir



Gambar 12. Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.)

Lampiran 2. Hasil Identifikasi Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.)



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;
herbariumandaunand@gmail.com

Nomor : 494/K-ID/ANDA/XII/2019
Lampiran : -
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada yth,
Fadillatul Zikri
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 : Fadillatul Zikri
No. BP : 1604055
Instansi : STIFI YP Padang

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

No	Family	Spesies
1.	Rubiaceae	<i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb.

Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

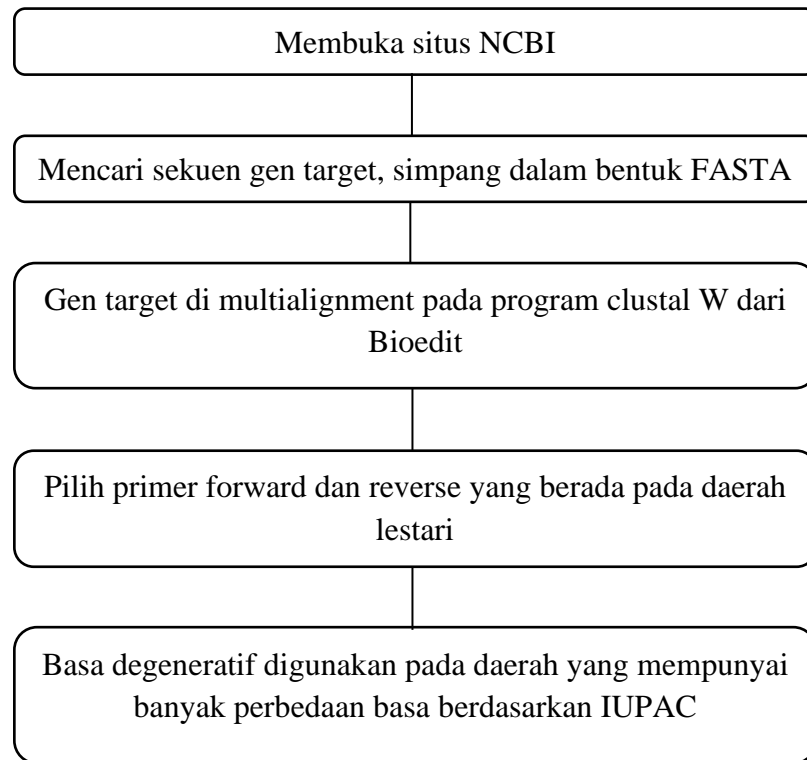


Padang, 21 Januari 2020
Kepala,


Dr. Nurainas
NIP. 196908141995122001

Gambar 13. Hasil identifikasi tanaman gambir

Lampiran 3. Skema desain primer degeneratif



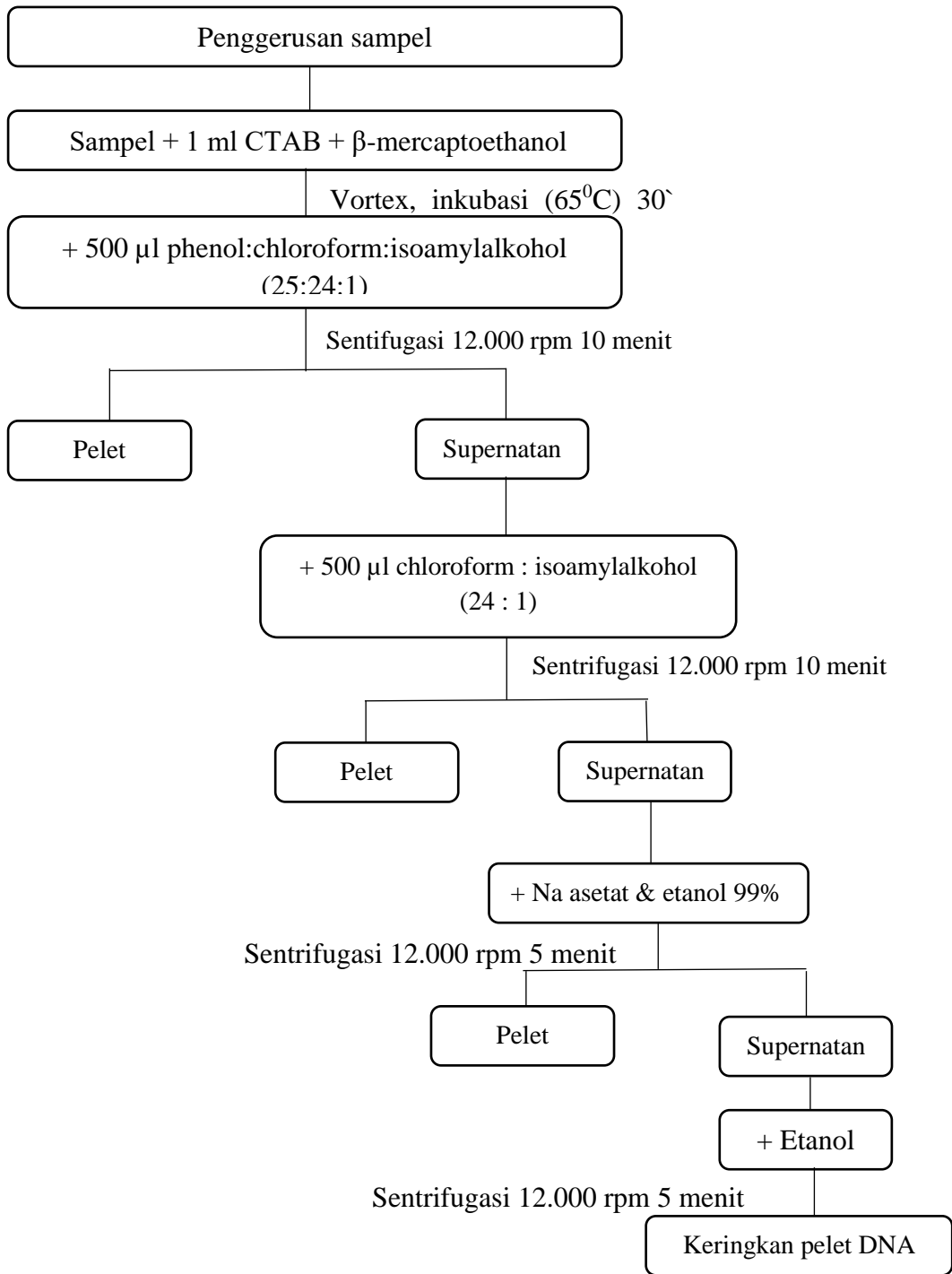
Gambar 14. Skema desain primer degeneratif

Lampiran 4. Tabel Kode Sekuen untuk Pendisainan Primer

Tabel 7. Kode Sekuen untuk Pendisainan Primer

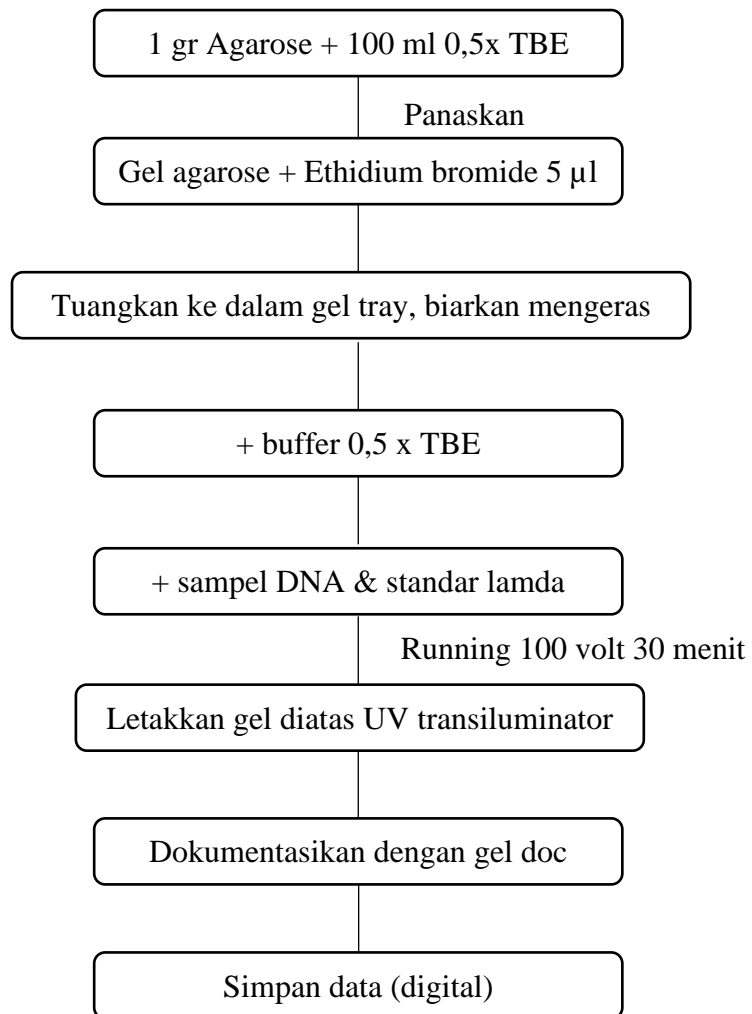
No	Kode Sekuen
1.	AF112108.1
2.	AJ427536.1
3.	AY044331.1
4.	DQ767948.1
5.	EF090266.2
6.	FJ601685.1
7.	GQ983006.1
8.	GQ983007.1
9.	GQ983009.1
10.	GQ983011.1
11.	GQ983014.1
12.	GQ983019.1
13.	GQ983021.1
14.	GQ983024.1
15.	GQ983038.1
16.	GQ983039.1
17.	GQ983040.1
18.	GQ983045.1
19.	GU169470.1
20.	HM149787.1
21.	XM_002263983.3

Lampiran 5. Skema proses isolasi DNA daun gambir



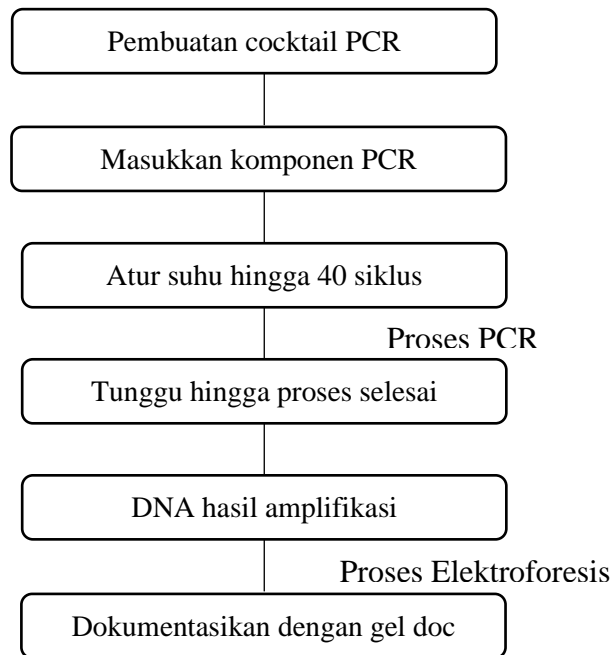
Gambar 15. Skema proses isolasi DNA daun gambir

Lampiran 6. Skema proses elektroforesis hasil isolasi DNA tanaman gambir



Gambar 16. Skema proses elektroforesis hasil isolasi DNA tanaman gambir

Lampiran 7. Skema proses PCR dan Elektroforesis



Gambar 17. Skema proses PCR dan Elektroforesis

Lampiran 8. Alat-alat yang Digunakan



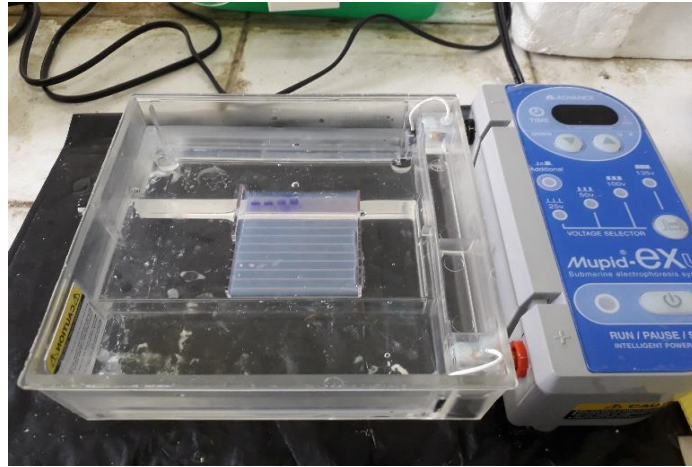
Gambar 18. Inkubator



Gambar 19. Alat Sentrifugasi



Gambar 20. Alat PCR



Gambar 21. Alat Elektroforesis