

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

SKRIPSI



Oleh :

AMELIA SAPUTRI
NIM : 1604047

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA
PADANG
2020**

PERNYATAAN ORISINILITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Amelia Saputri
NIM : 1604047
Judul Skripsi : Desain Primer dan Deteksi Gen CHS (*Chalcone synthase*)
pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (hunter) roxb.)
Tipe Riau Gadang

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Padang, 16 September 2020

Amelia Saputri

Lembar Pengesahan Skripsi

Dengan ini dinyatakan bahwa :

Nama : Amelia Saputri
NIM : 1604047
Judul Skripsi : Desain Primer dan Deteksi Gen CHS (*Chalcone synthase*) pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (hunter) *roxb.*) Tipe Riau Gadang

Telah diuji dan disetujui skripsinya sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) melalui ujian sarjana yang diadakan pada tanggal 16 September 2020 berdasarkan ketentuan yang berlaku.

Ketua Sidang

apt.Yahdian Rasyadi , M.Farm

Pembimbing I

Anggota Penguji I

Epi Supri Wardi, M.Si

apt.Lola Azvenela, M.Farm

Pembimbing II

Anggota Penguji II

apt.Diza Sartika, M.Farm

apt.Irwandi, M.Farm

**Mengetahui :
Ketua Program Studi S1 Farmasi**

apt. Revi Yenti, M.Si

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan maka apabila telah selesai (dari suatu urusan) kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain dan hanya kepada Tuhanlah hendaknya kamu berharap

(Qs. Alam Nasyrah: 7,9)

Sujud syukurku kusembahkan kepadaMu ya Allah, Tuhan Yang Maha Agung dan Maha Tinggi. Atas takdirmu saya bisa menjadi pribadi yang berpikir, berilmu, beriman dan bersabar. Semoga keberhasilan ini menjadi satu langkah awal untuk masa depanku, dalam meraih cita-cita saya.

Dengan ini saya persembahkan karya ini untuk;

Ayah dan Ibu tercinta...

Terima kasih atas kasih sayang yang berlimpah dari mulai saya lahir, hingga saya sudah sebesar ini, terima kasih juga atas limpahan doa yang tak berkesudahan Serta segala dukungan, yang tiada terhingga yang tiada mungkin dapat kubalas hanya dengan selembar kertas yang bertuliskan kata cinta dan persembahan. Semoga ini menjadi langkah awal untuk membuat Ayah dan Ibu bahagia, karna kusadar selama ini belum bisa berbuat yang lebih. Untuk Ayah dan Ibu yang selalu membuatku termotivasi dan selalu menyirami kasih sayang, selalu mendoakanku, selalu menasehatiku menjadi lebih baik,

Terima kasih selanjutnya untuk adik-adikku tersayang (Reza, Rizky, Arlan) atas segala kasih sayang, doa, serta dalam memberi dukungan dan doa yang tanpa henti. Engkau menjadikan ku kuat disetiap langkah ku. Hanya karya kecil ini yang dapat aku persembahkan. Maaf belum bisa menjadi panutan seutuhnya, tapi aku akan selalu menjadi yang terbaik untuk kalian semua.

Terima kasih juga yang tak terhingga untuk ibu Epi Supri Wardi, M.Si dan ibu apt. Diza Sartika, M. Farmsebagai dosen pembimbingku, serta Bapak Drs. BA Martinus, M.Si sebagai pembimbing akademik yang sudah sangat membantu, membimbing serta menasehati selama ini. Terima kasih juga Teruntuk semua dosen dan staf Fakultas Farmasi Univeristas Perintis Padang, terimakasih untuk ilmu yang sangat berarti semoga berguna dimasa depan.

Kepada sahabatku (Ariska, Wahyu, Nada, Eka, Tika, Yulma), tim gambir (Atika dan Dila) serta keluarga DPM, terima kasih atas bantuan, doa, nasehat, hiburan, semangat, cinta dan kasih sayang yang kalian berikan selama aku kuliah, aku tak akan melupakan semua yang telah kalian berikan selama ini...

Ucapan terima kasih ini saya persembahkan juga untuk seluruh teman-teman saya di Fakultas Farmasi angkatan 2016. Terima kasih untuk memori yang kita rajut setiap harinya, atas tawa yang setiap hari kita miliki, dan atas solidaritas yang luar biasa. Sehingga masa kuliah selama 4 tahun ini menjadi lebih berarti. Semoga saat-saat indah itu akan selalu menjadi kenangan yang paling indah.

Untuk semua pihak yang saya sebutkan, terima kasih atas semuanya. Semoga Tuhan senantiasa membalas setiap kebaikan kalian. Serta kehidupan kalian semua juga dimudahkan dan diberkahi selalu oleh Allah SWT.

By Amelia Saputri, S.Farm

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah, Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya jualah, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi dengan judul **“Desain Primer dan Deteksi Gen CHS (Chalcone synthase) Pada Tanaman Gambir (Uncaria gambir (Hunter) Roxb.) Tipe Riau Gadang”**. Skripsi ini merupakan salah satu persyaratan untuk menyelesaikan program pendidikan Sarjana Strata Satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kata kesempurnaan dan tidak akan terwujud tanpa partisipasi dan kontribusi dari berbagai pihak. Maka pada kesempatan ini izinkan penulis dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat untuk mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tidak terhingga kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Apt. Elfi Sahlan Ben sebagai Rektor Universitas Perintis Indonesia.
2. Ibu Dr. apt. Eka Fitrianda, M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Perintis Indonesia,
3. Ibu Epi Supri Wardi, M.Si selaku dosen pembimbing 1 serta ibu apt.Diza Sartika, M.Farmselaku dosen pembimbing 2 yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing penulis dalam proses pelaksanaan, penyusunan, dan penyelesaian skripsi ini.

4. Bapak Drs. B.A.Martinus, M.Si selaku penasehat akademik yang telah memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis selama perkuliahan.
5. Bapak dan ibu dosen yang telah mendidik dan mencurahkan ilmu ini kepada penulis dan analis labor Fakultas Farmasi Universitas Peritnis Indonesia.
6. Semu pihak yang tidak bias penulis sebutkan namanya satu persatu, atas bantuan baik langsung maupun tidak langsung dalam menyelesaikan skripsi ini.

Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dengan pahala yang berlipat ganda serta senantiasa dilimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua. Kritik dan saran yang mendukung sangat penulis harapkan demi perbaikan dan penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata penulis mengharapkan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca lainnya.

Padang, September 2020

Hormat saya

Penulis

ABSTRAK

Gambir merupakan salah satu tanaman yang mengandung katekin. Kandungan katekin pada gambir merupakan komponen yang menjadi syarat utama dalam penentuan mutu gambir. CHS (*Chalcone synthase*) adalah salah satu gen yang terlibat dalam proses biosintesis pembentukan katekin. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan primer yang dapat digunakan dalam deteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir tipe riau gadang serta untuk melihat kemampuan primer yang telah didesain untuk mendeteksi gen CHS pada tanaman gambir. Pendesainan primer dilakukan dengan menggunakan *alignment* 21 data sekuens gen CHS dan dipilih daerah yang memiliki kesamaan basa antara sekuens gen yang *di-align* untuk mendapatkan primer. Isolasi DNA gen CHS tanaman gambir menggunakan metode CTAB dan untuk isolasi RNA menggunakan *Total RNA Mini Kit (Plant)* dari Geneaid. Sintesis cDNA menggunakan kit *Rever TraAce[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover* (Toyobo). Pada hasil desain primer didapatkan empat primer *forward* dan satu primer *reverse*. Hasil desain primer yang dapat digunakan untuk deteksi gen CHS dengan hasil cDNA tanaman gambir yaitu primer F3-R1 (TNG TCT TCT GCA CNA CCT CCG GNG - CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT). Proses deteksi gen CHS pada daun gambir menghasilkan produk dengan estimasi sebesar 724 bp.

Kata kunci : DNA, RNA, cDNA, Gambir, *Chalcone synthase*, PCR, Katekin

ABSTRACT

Gambir is one of the plants containing catechins. The content of catechins in gambir is a component that is the main condition in determining the quality of gambir. CHS (Chalcone synthase) is one of the genes involved in the process of biosynthesis of catechin formation. This research aims to obtain a primer that can be used in the detection of CHS (Chalcone synthase) genes in plants and to look at the primary capabilities that have been designed to detect CHS genes in gambir plants. Primary design was done by dialignment of 21 CHS gene sequence data and selected regions that had alkaline similarities between gene sequences that were dialignment to obtain primary. DNA isolation of plant CHS genes uses the CTAB method and for RNA isolation using Geneaid's Total RNA Mini Kit (Plant). CDNA synthesis uses rever *Rever TraAce*[®] kit qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo). In the primary design results get four primer forward and one reverse primer. The primary design results that can be used for detection of CHS genes with the result of cDNA gambir plant namely primary F3-R1(TNG TCT TCT GCA CNA CCT CCG GNG - CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT). Chs gene detection process on gambir leaves produces products with an estimated of 724 bp.

Keywords : DNA, RNA, cDNA, Gambir, Chalcone synthase, PCR, Catechin

DAFTAR ISI

Halaman

JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINALITAS dan PENYERAHAN HAK CIPTA	ii
PENGESAHAN	iii
PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Klasifikasi Tanaman Gambir	5
2.2 Morfologi Tanaman Gambir	6
2.3 Kandungan Gambir	9
2.4 Manfaat Tanaman Gambir	10
2.5 Desain Primer	11
2.6 DNA dan RNA	15
2.6.1 Isolasi DNA dan RNA	18
2.7 <i>Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	21
2.8 PCR	22
2.8.1 Komponen PCR	23
2.8.2 Tahapan PCR	25
2.9 Elektroforesis	26
BAB III. METODE PENELITIAN	28
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	28
3.2 Alat dan Bahan	28
3.2.1 Alat	28
3.2.2 Bahan	28
3.3 Metode Penelitian	29
3.4 Prosedur Penelitian	29
3.4.1 Pengambilan Sampel	29
3.4.2 Identifikasi Sampel	29
3.4.3 Desain Primer Degeneratif	29
3.4.4 Isolasi DNA Daun Gambir	31
3.4.5 Isolasi RNA Daun Gambir	32
3.4.6 Elektroforesis	33
3.4.7 Sintesis cDNA	33
3.4.8 PCR Dan Elektroforesis	34
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Hasil Penelitian	36
4.2 Pembahasan	37

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1 Kesimpulan	48
5.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	54

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik Morfologi dan Komponen Hasil Empat Tipe Gambir	7
2. Lambang Nukleotida Yang Digunakan Dalam Penyusunan Sekuen Primer Degeneratif Menurut IUPAC	30
3. Komposisi Bahan Sintesis cDNA	34
4. Coaktail PCR untuk amplifikasi DNA.....	34
5. Coaktail PCR untuk amplifikasi cDNA	35
6. Kondisi PCR untuk amplifikasi fragmen.....	35
7. Hasil desain primer degeneratif	38
8. Kualitas dan kuantitas hasil isolasi DNA atau RNA yang diukur dengan nanodrop.....	43
9. Kode sekuen untuk desain primer degeneratif	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Gambar tanaman gambir (sumber : Suharman, 2018)	5
2. Penampilan Helaiian Daun Gambir (sumber : Ferita et al., 2013).....	8
3. Gambar struktur kimia katekin (sumber : Suharman, 2018).....	9
4. Skemabiosintesis flavonoid (sumber:Zhou <i>et al.</i> , 2016).....	11
5. Sekuen gen CHS hasil penelusuran NCBI	29
6. Hasil <i>multialignment</i> 21 sekuen gen CHS	30
7. Laman awal situs Idt	31
8. Hasil elektroforesis DNA atau RNA daun gambir.....	42
9. Visualisasi Hasil amplifikasi DNA daun gambir	45
10. Visualisasi Hasil amplifikasi cDNA daun gambir	46
11. Hasil identifikasi tanaman gambir (Uncaria gambir (hunter) roxb.)	54
12. Tanaman gambir tipe riau gadang.....	55
13. Skema desain primer degeneratif.....	56
14. <i>Multialignment</i> posisi primer F1	58
15. <i>Multialignment</i> posisi primer F2.....	59
16. <i>Multialignment</i> posisi primer F3.....	60
17. <i>Multialignment</i> posisi primer F4.....	61
18. <i>Multialignment</i> posisi primer R1	62
19. Nilai Tm dan % GC F1	63
20. Nilai Tm dan % GC F2	63
21. Nilai Tm dan % GC F3	63
22. Nilai Tm dan % GC F4	64
23. Nilai Tm dan % GC R1	64
24. Skema isolasi DNA daun gambir tipe riau gadang	65
25. Skema isolasi RNA daun gambir tipe riau gadang	66
26. Skema elektroforesis	67
27. Skema sintesis cDNA	68
28. Skema amplifikasi PCR dan elektroforesis.....	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil identifikasi gambir (<i>Uncaria gambir (hunter) roxb.</i>)	54
2. Gambar pengambilan tanaman gambir tipe riau gadang	55
3. Skema proses desain primer degeneratif.....	56
4. Data sekuen yang dipakai pada desain primer	57
5. Hasil <i>Multialignment</i>	58
6. Nilai Tm dan % GC setiap primer	63
7. Skema proses isolasi DNA daun gambir	65
8. Skema proses isolasi RNA daun gambir	66
9. Skema proses elektroforesis	67
10. Skema proses sintesis cDNA	68
11. Skema proses PCR dan Elektroforesis.....	69

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gambir adalah sari getah yang diekstraksidari ranting dan daun tanaman *Uncaria gambir* (Hunter) *Roxb* yang termasuk ke dalam famili Rubiaceae. Gambir tumbuh banyak di Indonesia akan tetapi pemanfaatan yang lebih luas sampai saat ini belum begitu banyak dilakukan. Selain digunakan sebagai campuran makanan sirih, gambir juga dapat di gunakan sebagai campuran obat tradisional sampai dalam campuran obat modern (Amos *et al*, 2004). Menurut Hamda, (2009), Ada empat tipe gambir yang ada di Sumatera Barat, keempat jenis gambir tersebut adalah tipe udang, tipe riau gadang, tipe mancik dan tipe cubadak. Berdasarkan hasil analisis persentase kadar katekin dari keempat tipe gambir yang dilakukan oleh Ferita *et al*, (2013), tipe udang mempunyai rata-rata persentase kadar katekin lebih tinggi dibandingkan tiga tipe gambir lainnya yaitu 25,89%, sedangkan untuk riau gadang memiliki persentase kadang katekin 18,11%, tipe riau mancik 16,95% dan tipe cubadak 12,81%. Dari persentase kadar katekin diatas terlihat bahwa gambir tipe riau gadang memiliki persentase kadar katekin tertinggi kedua setelah tipe udang, Selain itu ketersediaan untuk gambir tipe riau gadang juga mudah didapatkan.

Dewick, (2009) menyatakan ekstrak gambir mengandung senyawa fungsional golongan senyawa polifenol dan senyawa ini merupakan hasil metabolit sekundertanaman yang menyusun golongan tanin. Salah satu yang termasuk dalam polifenol adalah flavonoid. Gambir mengandung 7-33 % katekin, 20-50 % asamcatechu tannin, quercetin, *catechin red*, *fixed oil*, dan *wax* (Amos *et al*, 2004). Hasil analisis kualitatif juga menunjukkan bahwa gambir mengandung

quinon, terpenoid, alkaloid, tannin, flavonoid dan saponin(Ferdinal *et al*, 2013).

Pemanfaatan gambir oleh konsumen tidak hanya berdasarkan mutu fisik dari gambir tersebut, tetapi juga dilihat dari mutu kimianya. Kandungan katekin merupakan komponen yang menjadi syarat utama dalam penentuan mutu gambir. Selain kadar katekin, adanya bahan pencampur atau kotoran dalam gambir akan mengurangi kadar katekin dan aroma yang merupakan persyaratan mutlak yang harus dipenuhi oleh gambir dengan mutu baik(Gumbira *et al*, 2009).Sejumlah penelitian telah dilakukan untuk mengetahui mutu gambir secara fisika dan kimianya. Sedangkan untuk penentuan mutu gambir secara molekuler dilakukan dengan mendeteksi gen yang terlibat dalam biosintesis katekin. Ada beberapa gen yang terlibat dalam biosintesis katekin, salah satunya yaitu gen CHS (*Chalcone synthase*).

Sejumlah penelitian telah dilakukan untuk mengidentifikasi gen kunci terlibat dalam akumulasi katekin.*Chalcone synthase* (CHS) mengkatalisasi langkah pertama yang dilakukan dalam biosintesis flavonoid (Sun *et al.*, 2015).Pembentukan *chalcone* adalah titik masuknya biosintesis katekin, *Chalcone synthase* memainkan peran penting dalam biosintesis flavonoid dengan mengkatalisasi kondensasi satu molekul p-coumaryl CoA dengan tiga molekul malonyl-CoA melalui aksi *chalcone synthase* (CHS) untuk menghasilkan *naringenin chalcone*, prekursor umum untuk sintesis flavonoid (Yu & Jez, 2008).*Chalcone synthase* juga dapat digunakan untuk memodifikasi komponen flavonoid pada tanaman lain. gen CHS dapat digunakan sebagai genetik determinan untuk kandungan katekin. Pada penelitian (Sun *et al.*, 2015) yang menganalisis *chalcone synthase* pada *freesia hybrid* menyatakan bahwa gen CHS

juga berperan dalam biosintesis flavonoid pada *freesia hybrid*, selain itu ekspresi gen CHS yang berlebih dapat meningkatkan jumlah total flavonoid dalam bunga.

Salah satu metode deteksi yang cukup menjanjikan dan mulai dikembangkan di era bioteknologi saat ini adalah deteksi molekuler dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Salah satu kunci keberhasilan deteksi dengan PCR adalah pemilihan primer yang akan digunakan. Desain primer yang tepat sangat diperlukan untuk menghasilkan primer yang sesuai dengan target amplifikasi (Widowati, 2013). Seiring dengan perkembangan teknologi informatika, telah dirancang *software* yang dapat digunakan dalam mendesain dan menganalisis primer (Maitriani *et al.*, 2014).

Sehubungan dengan itu, maka dilakukan pendisainan primer degeneratif untuk mengisolasi gen CHS (*Chalcone synthase*) yakni salah satu gen yang ikut terlibat dalam biosintesis katekin. Primer tersebut diharapkan dapat mendeteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) dari DNA tanaman gambir yang ikut sebagai pengendali pembentukan katekin. Berdasarkan latar belakang, maka peneliti tertarik untuk mengambil judul desain primer dan deteksi gen *Chalcone synthase* pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe riau gadang.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana desain primer degeneratif yang dapat digunakan dalam deteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe riau gadang?
2. Apakah primer yang telah didesain dapat mendeteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe riau gadang?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mendapatkan primer degeneratif yang dapat digunakan dalam deteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) *Roxb.*) tipe riau gadang.
2. Untuk melihat kemampuan primer yang telah didesain untuk mendeteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) *Roxb.*) tipe riau gadang.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Bagi peneliti

Mendapatkan informasi mengenai primer yang dapat digunakan untuk deteksi gen CHS (*chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) *Roxb.*) tipe riau gadang.

2. Bagi masyarakat

Sebagai sumber informasi dalam perkembangan ilmu pengetahuan dan dalam aplikasinya guna mempermudah kedepannya di 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 klasifikasi tanaman gambir



Gambar 1. Tanaman Gambir (Suharman, 2018)

Klasifikasi ilmiah tanaman gambir :

- Kerajaan : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : dycotyledomae
Ordo : Gentianales
Famili : Rubiaceae
Genus : Uncaria
Species : *Uncaria gambir* (Hunter) roxb (Amos, 2010).

Tanaman gambir merupakan tanaman alami yang dapat tumbuh di kawasan hutan dengan ketinggian 10-800 meter dari permukaan laut. Tanaman ini akan tumbuh baik di daerah yang mempunyai curah hujan rata sepanjang tahun, cukup cahaya matahari dan dapat tumbuh dengan baik didaerah tebing dengan pengaliran air yang baik (Amos, 2010).

2.2 Morfologi tanaman gambir

Tanaman gambir (*Uncaria gambir* (hunter) roxb.) termasuk kedalam suku kopi-kopian (rubiaceae) dengan bentuk seperti pohon bougenvil, merambat dan berkayu. Tanaman ini, merupakan tanaman perdu, dengan tinggi 1 sampai 3 meter. Batang tegak, bulat, percabangan sympodial dengan warna cokelat tua. Daun tunggal, berhadapan, bentuk daun oval atau lonjong, tepi daun bergerigi pangkal daun bulat, ujung meruncing. Bunga gambir adalah bunga majemuk, berbentuk lonceng, terletak di ketak daun, panjang sekitar 5 cm. buah berbentuk bulat telur, panjang 1,5 cm dengan warna hitam (Suharman, 2018).

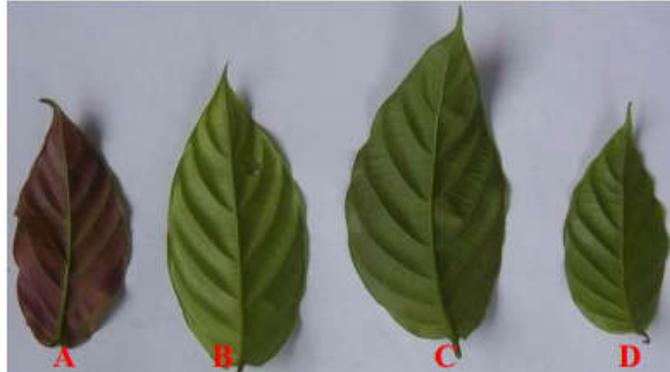
Gambir merupakan salah satu komoditas unggulan Indonesia. Saat ini Indonesia tercatat sebagai penghasil utama dan pemasok kebutuhan gambir dunia hingga mencapai 80% dengan total produksi sekitar 18.297.760 ton/tahun. Pasar produk gambir Indonesia adalah Australia, Bangladesh, Hongkong, India, Malaysia, Nepal, Pakistan, Taiwan, Jepang, Saudi Arabia, Filipina, Thailand dan Singapura (Gumbira *et al*, 2009). Salah satu sentra produksi gambir adalah di Sumatera Barat. Sentra produksi gambir di Sumatera Barat terbanyak dibandingkan dengan daerah lainnya, dan menghasilkan gambir untuk kebutuhan ekspor. Industri pengolahan gambir di daerah ini terdapat di Kabupaten Lima Puluh Kota, Kabupaten Pesisir Selatan, Kabupaten Pasaman, Kabupaten Sawah Lunto, Kabupaten Sijunjung, Kabupaten Tanah Datar, dan Kota Madya Bukit Tinggi. Sebagian besar pengolahan gambir di Sumatera Barat masih dilakukan secara tradisional, sebagian kecil telah melakukan pengolahan secara modern (Amos, 2010).

Ada empat tipe gambir yang ada di Sumatera Barat, keempat jenis gambir tersebut adalah tipe udang, tipe riau gadang, tipe riau mancik dan tipe cubadak(Hamda, 2009). Pengamatan morfologi terhadap beberapa karakter menunjukkan perbedaanyang mengindikasikan bahwa perbedaan tersebut disebabkan oleh faktor genetik.Karakter panjang dan lebar helaian daun pada keempat tipe gambir menunjukkanangka yang hampir sama, demikian juga dengan karakter panjang tangkai daun dandiameter tangkai daun (Tabel 1).

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

No	Karakter	Udang	Cubadak	R.mancik	R. Gadang
		Rata2±Sd	Rata2±Sd	Rata2±Sd	Rata2±Sd
a) Daun					
1	Panjang daun(cm)	11,99±1,61	11,7±1,84	10,58±1,39	10,98±0,84
2	Lebar daun (cm)	6,05±0,47	6,43±0,72	5,82±0,72	5,79±0,55
3	Panjang tangkai daun(cm)	0,8±0,12	1,15±0,16	0,84±0,22	0,8±0,05
4	Diameter tangkai daun(cm)	0,23±0,02	0,21±0,03	0,19±0,04	0,22±0,03
5	Tebal daun (mm)	0,36±0,06	0,18±0,03	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±9,57	46,02±6,87	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±1,19	6,9±1,29	7,5±1,37
13	Sudut cabang (o)	65,6±4,38	70,6±5,76	65,0±5,3	71,4±4,33
14	Diameter ranting (cm)	0,38±0,04	0,38±0,14	0,34±0,06	0,38±0,04
15	Jumlah kait (buah)	1,50±1,05	2,59±0,57	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 mrh	hj mrh tua	hj tua	hj tua
18	Diameter bunga (cm)	5,01±0,5	5,28±0,56	4,15±0,39	4,48±1,25
19	Panjang tangkai bunga (cm)	3,77±0,82	3,73±0,88	3,38±0,7	2,16±0,42
20	Diameter tangkai bunga (cm)	0,23±0,05	0,26±0,05	0,18±0,02	0,19±0,02
d) Buah					
21	Panjang tangkai buah (cm)	2,8±0,35	3,27±0,42	1,75±0,32	2,19±0,37
22	Diameter tangkai buah (cm)	0,25±0,02	0,26±0,03	0,25±0,02	0,24±0,02
23	Warna buah muda*)	hj mrh	hj tua	hj tua	hj tua
24	Warna buah masak *)	hj cok	cok tua	cok hit	cok hit
25	Jumlah polong/tangkai (bh)	72,2±12,2	73,3±5,51	62,9±7,98	62,06±13,6
26	Panjang polong (cm)	3,45±0,40	3,15±0,42	3,07±0,24	3,19±0,24
e) Komponen Hasil					
27	Jumlah cabang/batang(bh)	10,0±3,09	5,5±1,32	6,25±2,5	5,0±1,0
28	Jumlah ranting/cabang(bh)	10,8±2,99	13,5±2,84	11,0±2,43	13,2±4,4
29	Jumlah daun/ranting (bh)	13,2±2,24	15,5±2,14	11,06±2,04	13,9±3,4
30	Berat 1 helai daun (g)	1,56±0,54	2,51±0,72	1,65±0,58	2,13±0,41
31	Rendemen hasil (%)	6,7±0,39	5,87±0,58	6,12±0,50	5,8±0,8

Karakter warna daun merupakan salah satu karakter yang dapat dilihat secara morfologi untuk membedakan antara satu tanaman dengan tanaman lainnya dalam mengelompokkannya kepada empat tipe yang ada selama ini (Gambar 2). Namun demikian perbedaan warna tersebut tidaklah tegas, dan mempunyai variasi yang cukup sulit untuk diperhatikan.

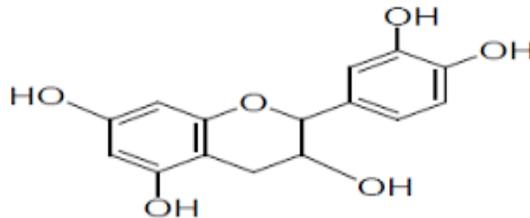


Gambar 2. Penampilan Helaian Daun Gambir, A= Udang, B= Cubadak, C= Riau Gadang, D= Riau Mancik (Ferita et al., 2013)

Gambir adalah sari getah yang di ekstraksi dari daun tanaman gambir (*Uncaria Gambir* (hunter) *Roxb.*) yang dilakukan dengan berbagai cara pengolahan mulai dari pengolahan tradisional yang masih digunakan sampai saat ini maupun dengan menggunakan peralatan semi mekanis ataupun modern yang dikembangkan saat ini (Amos, 2010). Pengaruh pengolahan dan cara pengolahan gambir mengakibatkan terjadinya perubahan komposisi kandungan utama gambir yaitu katekin dan asam kateku tanat. Setiap perlakuan dan proses yang berbeda pada daun dan ranting gambir sangat mempengaruhi kandungan katekin pada gambir (Amos, 2010).

2.3 Kandungan gambir

Tanaman gambir kaya akan flavonoid, kurang lebih 60% senyawa polifenoldari gambir adalah flavonoid turunan dihidroflavonol. Beberapa dari senyawafenolik tersebut adalah katekin, tanin, epikatekin, antosianidin, proantosianidin, asam fenolat, dan beberapa flavonoid lainnya (Nazir, 2000). Katekin berfungsi sebagai antioksidan, yaitu untuk mencegahkerusakan akibat reaksi oksidasi pada pangan, kosmetik dan farmasi(Pratt, 1990).



Gambar 3. Struktur kimia katekin (Suharman, 2018)

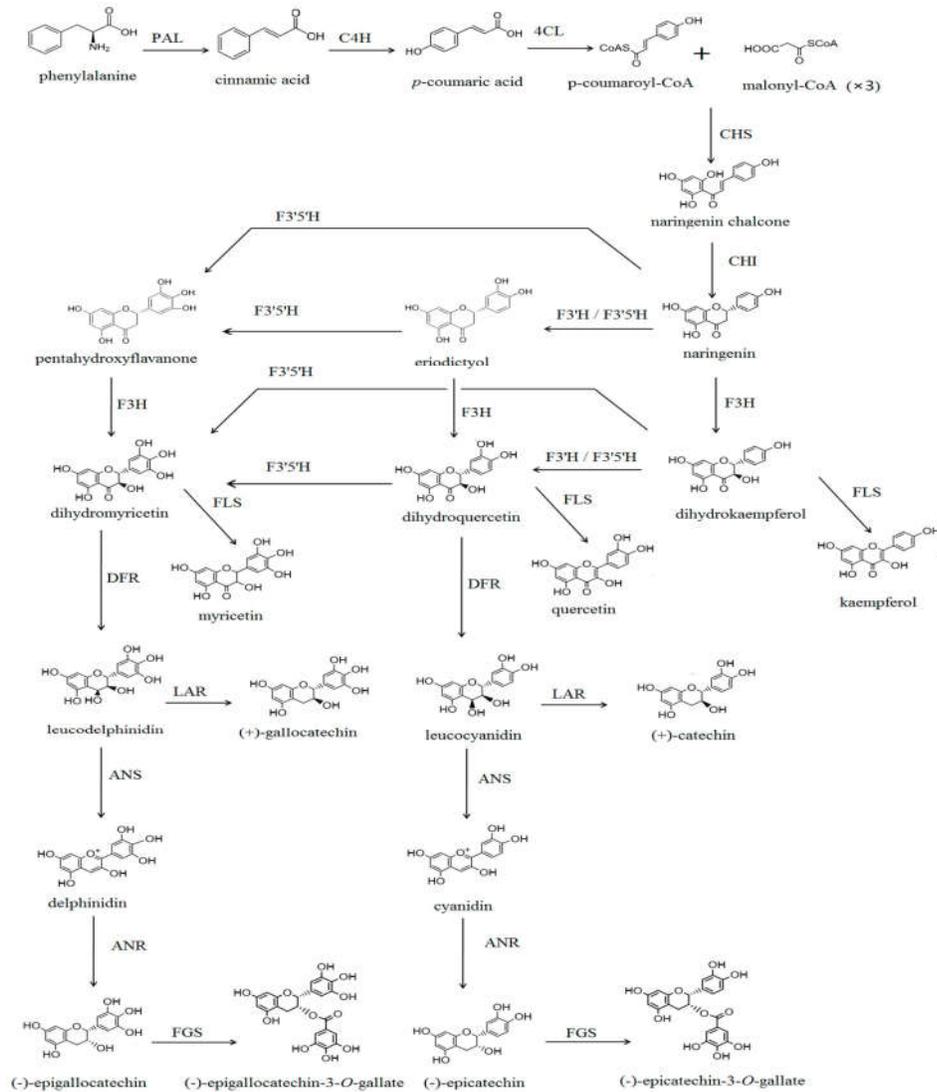
Kandungan katekin yang sangat tinggi diharapkan dari tanaman gambir merupakan karakter kuantitatif yang mana banyak dikendalikan oleh beberapa gen. Hilpiani, (2012) menyatakan bahwa adanya perbedaan kadar katekin pada gambir dipengaruhi oleh kondisi daun yang diekstrak. Daun gambir muda memiliki rendemen ekstrak lebih tinggi daripada daun tua. Katekin terdiri dari katekin (C), epikatekin (EC), epikatekingalat (ECG), epigalokatekin (EGC) dan epigalokatekingalat (EGCG). Menurut Lucida H, (2006), stabilitas katekin dipengaruhi oleh pH dan konsentrasi senyawa fenolik. Katekin memiliki sifat mudah teroksidasi pada pH mendekati netral dan lebih stabil pada pH lebih rendah.

2.4 Manfaat tanaman gambir

Bila ditinjau dari senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam gambir, maka tidak heran kalau gambir memiliki banyak sekali manfaat/ kegunaan terutama bagi kesehatan, kecantikan, maupun industri. Bukti empiris dan bukti ilmiah tersebut merupakan petunjuk bahwa daun gambir mengandung komponen bioaktif yang berperan sebagai antimikroba. Gambir juga bisa digunakan sebagai perawatan kecantikan. Diantaranya bisa membantu mengurangi noda-noda bekas jerawat di wajah dengan menggunakan maskergambir. Dalam bidang kesehatan khasiat gambir sebagai astringen dan hemostatik (Sabarni, 2015).

Berbagai khasiat dari gambir telah banyak diteliti diantaranya sebagai penyembuhan luka bakar pada kulit punggung mencit putih (Handayani *et al*, 2015), perangsang sistem syaraf otonom (Kusharyono, 2004), sebagai antiseptik mulut (Lucida *et al*, 2007), Selain itu juga telah diteliti kemampuan ekstrak gambir sebagai penghambat sintesa asam lemak (Shu-Yan *et al*, 2008), Penelitian tentang toksisitasnya terhadap ginjal, hati dan jantung telah dilakukan oleh (Armenia, 2004), sedangkan penelitian tentang teratogenitasnya secara in-ovo telah dilakukan oleh (Almahdy *et al*, 2004).

Katekin yang dihasilkan merupakan hasil dari metabolit sekunder yang memang banyak dipengaruhi oleh beberapa enzim yang disandikan oleh beberapa gen (Istino, 2011). Flavonoid disintesis melalui jalur fenil propanoid dan jalur biosintesis flavonoid. CHS (*Chalcone Synthase*) merupakan enzim kunci dari jalur flavonoid sentral. CHS memainkan peran penting dalam biosintesis flavonoid. Jalur biosintesis flavonoid dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Skema biosintesis flavonoid (Zhou *et al.*, 2016)

2.5 Desain Primer

PCR adalah teknik yang paling diterima secara luas, umumnya digunakan untuk melakukan diagnosis yang membutuhkan spesifisitas dan sensitivitas yang sangat tinggi. PCR umumnya digunakan untuk berbagai tugas, seperti deteksi penyakit keturunan, identifikasi sidik jari genetik, diagnosis penyakit menular, kloning gen, pengujian paternitas, dan komputasi DNA. Untuk membuat sebuah alat PCR yang spesifik, efektif dan efisien bagi peneliti maupun klinisi, aspek

yang paling penting adalah melakukan desain pada primer (desain primer). Primer adalah molekul oligonukleotida untai tunggal yang terdiri atas sekitar 30 basa. Desain primer yang tepat adalah salah satu faktor yang paling penting dalam keberhasilan sekuensing DNA (Maitriani et al., 2014).

Primer adalah oligonukleotida spesifik yang komplemen dengan daerah yang telah ditentukan pada DNA target sebagai tempat dimulainya sintesis DNA baru (Maitriani *et al.*, 2014). Primer yang dibuat secara degeneratif dapat digunakan untuk bahan kloning berbasis PCR. Hal ini didasari atas adanya kesamaan sekuen gen dari organisme baik yang masih satu spesies maupun sudah berbeda genus ataupun familinya. Selama gen-gen dari organisme yang berbeda tersebut memiliki kesamaan sekuen, maka sekuen 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 (*Tymine*), dan G (*Guanine*). Primer degeneratif biasanya menggunakan lambang nukleotida degeneratif selain dari lambang A (*Adenine*), C (*Cytosine*), T (*Tymine*) dan G (*Guanine*). Nukleotida degeneratif dimaksudkan untuk bisa dipakai pada beberapa sekuen 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). Primer yang baik ditentukan oleh beberapa sifat/karakter primer, diantaranya :

a. Panjang primer

Desain primer yang diperlukan untuk PCR adalah sepasang primer yang dikenal dengan *forward* primer dan *reverse* primer. Primer yang diperoleh merupakan rangkaian basa nukleotida yang unik dan diusahakan memiliki

ukuran pendek untuk meminimalkan biaya. Panjang primer berkisar 18-30 basa, didasarkan pada pertimbangan kombinasi acak yang mungkin ditemukan pada satu urutan genom. Primer dengan panjang lebih dari 30 basa tidak disarankan, karena tidak menunjukkan spesifisitas yang lebih tinggi. Selain itu, primer yang panjang dapat berakibat terhibridasi dengan primer lain sehingga tidak membentuk polimerisasi DNA.

b. *Primer Melting Temperature (T_m)*

Primer *Melting Temperature* (T_m) atau suhu leleh merupakan temperatur yang diperlukan oleh primer untuk mengalami disosiasi / lepas ikatan. Suhu leleh primer yang digunakan harus sama untuk memastikan kinerja yang konsisten pada pasangan primer.

c. *Primer Annealing Temperature (T_a)*

Primer *Annealing Temperature* (T_a) merupakan suhu yang diperkirakan agar primer dapat berkaitan dengan template (DNA) secara stabil. Suhu anealing yang tinggi akan menyulitkan terjadinya ikatan primer sehingga menghasilkan produk PCR yang kurang efisien. Sebaliknya, suhu anealing yang terlalu rendah menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA di tempat yang tidak spesifik.

d. *Selisih Primer Melting Temperature (ΔT_m)*

Pasangan primer sebaiknya tidak memiliki selisih suhu leleh yang tinggi. Pasangan primer dengan selisih suhu leleh yang lebih dari 5°C menyebabkan penurunan proses amplifikasi, atau bahkan memungkinkan tidak terjadi proses amplifikasi.

e. GC Content

Aturan umum yang diikuti oleh sebagian besar program desain primer adalah menggunakan persen basa G dan C antara 40% hingga 60%.

f. *Secondary Structures*

Reaksi PCR sebaiknya tidak mengandung *secondary structures* berupa hairpin atau dimer. Stabilitas *secondary structure* ditentukan oleh energi bebas (ΔG) dan suhu lelehnya. Hal ini menyebabkan primer tidak dapat menempel dengan template DNA.

1) Hairpin

Hairpin adalah struktur yang dibentuk oleh basis pasangan asam polynucleic antara urutan komplementer untai tunggal baik DNA maupun RNA. Terbentuknya struktur loop /hairpin pada primer sebaiknya dihindari, namun sangat sulit untuk memperoleh primer tanpa memiliki struktur hairpin. Hairpin pada ujung 3' dengan ΔG (energy yang diperlukan untuk memecah struktur hairpin) = -2 kcal/mol dan hairpin internal dengan $\Delta G = -3$ kcal/mol masih dapat ditoleransi. Kedua primer sebaiknya tidak memiliki basa nukleotida T pada ujung 3'-nya karena dapat menyebabkan *mismatch*/ketidakcocokan. Banyaknya *mismatch* pada ujung 3'-primer juga dapat menyebabkan hairpin.

2) *Self*Dimer dan *Cross* Dimer

Primer yang berikatan dengan primer lainnya yang sejenis disebut dengan *self* dimer. *Self* dimer pada ujung 3' dengan $\Delta G = -5$ kcal/mol dan *self* dimer pada bagian internal dengan $\Delta G = -6$ kcal/mol masih dapat ditoleransi. Primer yang berikatan dengan primer pasangannya (*reverse dan forward*)

disebut dengan *Cross Dimer*. *Crossdimer* pada ujung 3' dengan $\Delta G = -5 \text{ kcal/mol}$ dan *self dimer* pada bagian internal dengan $\Delta G = -6 \text{ kcal/mol}$ masih dapat ditoleransi.

g. *Self-Complementary (SC) dan Pair-Complementary (PC)*

Selain *secondary structures*, *complementary* pada primer dan pasangan primer juga harus dihindari. *Self complementary* dapat menyebabkan struktur hairpin yang stabil hanya dengan 4 pasangan basa GC pada ujung maupun bagian tengah primer. Primer harus berisi kurang dari 4 basa komplementer, terutama pada ujung 3'. *Pair complementary* terutama pada ujung 3' primer dapat menyebabkan struktur dimer.

h. *Repeats & Runs*

Perulangan yang cukup panjang dengan basa sama (lebih dari tiga basa berurutan sama, misal basa AGCGGGGGATG memiliki 5 basa berurutan G) harus dihindari karena dapat menyebabkan terjadinya *breathing* pada primer dan *mispirming*, sehingga proses penempelan primer menjadi sulit. Primer sebaiknya juga tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa dan maksimum pengulangan 2 basa sebanyak 4 kali masih dapat ditoleransi. Misalnya ATATATAT Hal ini juga menyebabkan terbentuknya struktur hairpin (Eling K *et al.*, 2014).

2.6 DNA dan RNA

DNA adalah polimer nukleotida yang tersusun secara sistematis dan merupakan pembawa informasi genetik yang diturunkan kepada jasad keturunannya. Informasi genetik disusun dalam bentuk kodon yang berupa tiga pasang basa nukleotida dan menentukan bentuk, struktur maupun fisiologi suatu jasad (Yuwono, 2016). 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).

Struktur molekul DNA pertama kali diungkapkan oleh James Watson dan Francis Crick pada tahun 1953. Model struktur molekul DNA disebut *double helix* (untai ganda). Untai ganda DNA tersusun oleh dua rantai polinukleotida yang berpilin. Kedua rantai tersebut mempunyai rotasi yang berlawanan. Kedua rantai tersebut berikatan dengan adanya ikatan hidrogen antara basa adenine (A) dengan thymine (T), dan guanine (G) dengan cytosine (C). Proporsi basa A dan T, serta G dan C selalu sama sehingga komposisi DNA dapat dinyatakan dengan kandungan G + C (G + C content) yang berkisar dari 26% sampai 74%. (Yuwono, 2016).

Gen pada semua organisme prokariot dan eukariot terbuat dari DNA. Pada virus gen terbuat dari DNA atau RNA (asam ribonukleat). RNA, seperti halnya DNA, merupakan polimer panjang tidak bercabang yang terdiri dari nukleotida-nukleotida yang bersambung dengan ikatan 3'→5' fosfodiester. Struktur kovalen RNA berbeda dengan DNA dalam dua hal. Sebagaimana terbaca dari namanya, unit-unit gula dalam RNA berupa ribosa bukan deoksiribosa. Ribosa mengandung sebuah gugus 2'-hidroksil yang tidak terdapat pada deoksiribosa. Perbedaan yang lain ialah bahwa satu dari keempat basa utama dalam RNA adalah urasil (U) yang menggantikan timin (T). Urasil, seperti timin, dapat membentuk pasangan basa dengan adenin, tetapi tidak mengandung gugus metil yang terdapat dalam timin (Rosana Dadan, 2012). RNA menyusun 5-10% dari berat kering sel. Pada dasarnya, terdapat dua kelompok utama RNA yang menyusun makhluk hidup, yaitu RNA genetik dan RNA non genetik.

1. RNA genetik

RNA genetik memiliki fungsi yang sama dengan DNA, yakni merupakan molekul genetik yang secara keseluruhan bertanggung jawab dalam membawa segala materi genetik, seperti yang dimiliki oleh DNA. Dengan kata lain, RNA ini berfungsi sebagai DNA. RNA genetik ini hanya dimiliki oleh makhluk hidup tertentu yang tidak memiliki DNA, seperti pada beberapa jenis virus.

2. RNA nongenetik

RNA nongenetik merupakan RNA yang tidak berperan sebagai DNA. RNA nongenetik dimiliki oleh makhluk hidup yang materi genetiknya diatur oleh DNA. Pada makhluk hidup kelompok ini, di dalam selnya terdapat DNA dan RNA. Berdasarkan letak serta fungsinya, RNA non-genetik dibedakan menjadi tiga macam, yakni RNA duta, RNA ribosom, dan RNA transfer.

a. RNA duta atau "*messenger RNA*" (mRNA) merupakan asam nukleat yang berbentuk pita tunggal dan merupakan RNA terbesar atau terpanjang yang bertindak sebagai pola cetakan pembentuk polipeptida. Fungsi utama mRNA adalah membawa kode-kode genetik dari DNA ke ribosom. mRNA juga berfungsi sebagai cetakan dalam sintesis protein.

b. RNA transfer (tRNA) merupakan RNA terpendek yang bertindak sebagai penerjemah kodon dari mRNA. Selain itu, tRNA berfungsi mengikat asam-asam amino yang akan disusun menjadi protein dan mengangkutnya ke ribosom. Pada tRNA terdapat bagian yang berhubungan dengan kodon yang disebut antikodon dan bagian yang berfungsi sebagai pengikat asam amino.

c. RNA ribosom (rRNA) merupakan RNA dengan jumlah terbanyak dan penyusun ribosom. RNA ini berupa pita tunggal, tidak bercabang, dan fleksibel.

Lebih dari 80% RNA merupakan rRNA. Fungsi rRNA sampai sekarang masih belum banyak diketahui, tetapi diduga memiliki peranan penting dalam proses sintesis protein (Rosana Dadan, 2012)

2.6.1 Isolasi DNA dan RNA

Kemajuan yang telah dicapai dalam bidang bioteknologi dan teknik DNA rekombinan telah membantu mempercepat dan meningkatkan berbagai penelitian menuju ke arah 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 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 sekuen pengontrol ekspresi gen (*regulatory sequence*) (Fatchiyah *et al*, 2011).

Isolasi adalah prosedur yang digunakan untuk memisahkan suatu bagian dari bagian lain dengan tujuan tertentu (Singleton & Sainsbury, 2006). 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 mRNA 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 seldan membran sel harus dipecah untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel. Penghancuran sel dapat dilakukan dengan cara mekanik, kimiawi dan enzimatik. Proses penghancuran sel dipengaruhi oleh jumlah bahan (kuantitas), kondisi bahan (kualitas), dan proses penghancuran itu sendiri (Sri Pujiyanto, 2014).

Materi genetik sering diperlukan sebagai sumber gen untuk diklon. Untuk keperluan ini, proses isolasi mutlak dilakukan sebab isolasi materi genetik merupakan proses untuk mengekstrak (memisahkan) materi genetik dari sel yang mengandung berbagai komponen seperti plasma sel, organel sel, dinding sel, dan

membran sel. Proses isolasi DNA dan RNA secara garis besar terdiri atas tiga tahap yaitu pemecahan sel dan solubilisasi membran, isolasi dan pemurnian, dan pemekatan (Eskundari, 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 membutuhkan larutan untuk menghilangkan kontaminan seperti protein, karbohidrat dan senyawa lainnya. Ekstraksi fenol dan kloroform dapat menghilangkan kontaminan protein sedangkan penghilangan kontaminan DNA dapat dilakukan dengan presipitasi litium klorida (LiCl). Pemekatan merupakan tahap akhir dalam proses pemurnian DNA dan RNA. Cara yang paling efektif untuk memekatkan DNA dan 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 atau RNA yang berkualitas serta dapat diukur konsentrasi dan tingkat kemurniannya. DNA atau RNA yang berkualitas memiliki kontaminan yang rendah dan dapat divisualisasi pada saat elektroforesis (Putri, 2010).

Ketersediaan RNA dengan kualitas tinggi merupakan syarat penting dalam beberapa analisis transkriptomika, seperti studi perbandingan ekspresi gen [DGE (*Differential Gene Expression*)] ataupun sekuensing RNA (*RNA-sequencing*) (Wanqian *et al.*, 2005). Namun demikian, sangat sulit untuk mendapatkan RNA

total dengan kualitas dan kuantitas tinggi terutama dari jaringan tanaman yang banyak mengandung komponen polisakarida dan polifenol. Sampel yang terkontaminasi oleh polisakarida dan polifenol akan menyebabkan RNA terdegradasi dan menurunkan kualitas serta kuantitas RNA. Isolasi RNA merupakan proses penting dengan tahapan yang cukup panjang dan rumit, serta menggunakan bahan kimia spesifik seperti fenol dan kloroform (Xiao *et al.*, 2012). Menurut Suehiro *et al.*, (2005), tahapan yang panjang dalam proses isolasi RNA juga sekaligus menyebabkan kemungkinan terjadinya tingkat kontaminasi yang tinggi, sehingga hasil RNA total yang diperoleh tidak sesuai. Hal tersebut mendorong banyak peneliti untuk mengembangkan protokol baru untuk isolasi RNA dari beberapa jaringan tanaman yang sulit, seperti memiliki kandungan polisakarida dan polifenol yang tinggi (Gasic *et al.*, 2004).

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 D, 2006).

2.7 Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Teknik *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) merupakan metode paling sensitif dalam menyintesis DNA tunggal dari mRNA. Prinsip dasar RT-PCR adalah mengubah untai mRNA menjadi DNA dengan bantuan enzim transcriptase dan primer oligo-dT. Primer oligo-dT akan menempel pada ujung 3' poli-A mRNA dan selanjutnya enzim reverse transcriptase akan membentuk untai DNA awal dengan menyintesis basa-basa nukleotida mRNA

dengan basa komplementernya. Setelah untai pertama DNDA terbentuk, cetakan mRNA di degradasi dengan bantuan enzim RNase (Kendall & Riley, 2000). Untai pertama DNA merupakan untai tunggal, sehingga dibutuhkan primer *forward* untuk membuat komplemen untai tunggal tersebut menjadi untai ganda. DNA untai ganda yang telah terbentuk selanjutnya diamplifikasi dengan teknik PCR standar (Weaver & Hedrick, 1997).

2.8 PCR

PCR adalah teknologi canggih yang dapat mendeteksi DNA dengan cara amplifikasi DNA. Hasil pemeriksaan PCR dapat membantu untuk menegakkan diagnose sepanjang pemeriksaan tersebut dikerjakan dengan cara yang benar dan sesuai dengan standar internasional. Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Masalah yang berkenaan dengan PCR yaitu biaya PCR yang masih tergolong tinggi. 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, Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), Enzim DNA Polimerase, dan Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer (K. Yusuf, 2007).

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan teknik yang sensitif untuk mengamplifikasi segmen spesifik pada DNA dengan cepat. Teknik ini dapat membentuk milyaran salinan fragmen DNA spesifik atau gen untuk mendeteksi dan mengidentifikasi sekuens gen melalui tahapan uji selanjutnya. Setiap uji PCR membutuhkan DNA *template*, primer nukleotida, dan DNA polimerase. Enzim DNA polimerase penting karena menghubungkan nukleotida yang terpisah

menjadi satu kesatuan untuk membentuk produk PCR (Garibyan & Avashia, 2013).

2.8.1 Komponen PCR

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama adalah :

1. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 10^5 – 10^6 molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.
2. Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (18 – 28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA. Dan mempunyai kandungan G + C sebesar 50 – 60%.
3. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion Mg^{2+} sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Iniyang diperlukan untuk reaksi polimerasi.
4. Enzim DNA Polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim polimerase taq tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.
5. Komponen pendukung lain adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 (suhu 20°C); 50 mM KCl; 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); Tween 20 sebanyak 0,01% atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1%; disamping itu perlu ditambahkan 1,5 mM $MgCl_2$ (K.Yusuf, 2007)

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 dilipatgandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik (K.Yusuf, 2007). Teknik PCR yang ditemukan Kary B.Mullis menggunakan fragmen Klenow DNA Polimerase I *E. coli* untuk mensintesis sekuen DNA yang baru. Namun, enzim ini mempunyai keterbatasan, yaitu terdenaturasi pada suhu tinggi (suhu denaturasi utas ganda DNA) pada tahap pertama proses PCR, sehingga keaktifan enzim tersebut hilang saat proses pemanjangan (*elongation*). Oleh karena itu, enzim harus ditambahkan setiap tahap, setelah suhu untuk proses ekstensi diturunkan sampai 37 °C (Saiki *et al.*, 1988).

Proses PCR memerlukan dua macam oligonukleotida (primer) yang masing-masing berhibridisasi dengan salah satu utas DNA yang akan diamplifikasi pada sisi yang berbeda dan keempat deoksinukleosida trifosfat (dNTP) dalam jumlah yang cukup, serta suatu DNA polimerase khusus yang tahan panas (Koolman & Roehm, 2005). Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan yang tinggi karena DNA polymerase mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk. Masalah yang berkenaan dengan PCR yaitu biaya PCR yang masih tergolong tinggi. Selain itu kelebihan lain metode PCR dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-9} mol) sebesar 200.00 kali setelah dilakukan 20 siklusreaksi selama 220 menit (K.Yusuf, 2007)

2.8.2. Tahapan PCR

Ada tiga tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat :

1. *Denaturasi*

Di dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polymerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5, 95 dan 97,5⁰C (K. Yusuf, 2007)

2. *Annealing (penempelan primer)*

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara

36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C.(K.Yusuf, 2007)

3. Pemanjangan Primer (*Extention*)

Selama tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada bufer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda.(K.Yusuf, 2007).

2.9 Elektroporesis

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 kimia 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 (Richardson *et al*, 1986).

Menurut Stenesh dalam (Titrawani, 1996) 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 makro-molekul

ditempatkan dalam suatu kamar tertutup dan dialiri arus listrik. Kecepatan migrasi dari makromolekul diukur dengan jalan melihat terjadinya pemisahan dari molekul (terlihat seperti pita) didalam pelarut. Sedangkan teknik elektroforesis daerah adalah menggunakan suatu bahan padat yang berfungsi sebagai media penunjang yang berisi (diberi) larutan penyangga. Media penunjang yang biasa dipakai adalah gel agarose, gel pati, gel poliakrilamida dan kertas selulose poliasetat.

Kegunaan Metode Elektroforesis Telah disebutkan di atas bahwa pola protein tertentu dari satu spesies hewan berbeda, secara elektroforesis akan memperlihatkan pola protein yang berbeda pula pada hewan lainnya. Faktor tersebutlah yang menyebabkan pola protein dapat digunakan untuk membedakan spesies hewan. Perbedaan pola protein inilah yang seringkali digunakan sebab untuk membedakan populasi secara tepat kadangkala tidak dapat dilakukan apabila hanya menggunakan pengamatan melalui morfologi saja. Fenomena ini pula yang menyebabkan metode elektroforesis banyak dilakukan untuk pengamatan taksonomi, sistematik dan genetic serta untuk mengidentifikasi spesies hewan maupun tumbuhan (bio-sistematik). Dapat pula digunakan untuk melihat phylogenetic reconstruction (rekonstruksi secara Filogenetik) dari suatu jenis hewan atau tumbuhan. (Rianta, 2001).

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. Pemesanan primer dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia, Tangerang. Penelitian ini dilakukan dari bulan maret sampai juli 2020.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Alat

Mortal, pistil, *tube eppendorf* 2ml, *tube eppendorf* 1,5ml, vortex, *waterbath*, *centrifuge*, lemari pendingin -20⁰C, botol Scott, *microwave*, *gel tray*, Comb 8 slot, penghambat gel, lemari asam, unit elektroforesis (Mupid-Ex-Jepang), *gel documentation system* (Cybertech-Jerman), UV-transluminator (Biometra-Jerman), dan mesin PCR (Biometra-Jerman).

3.2.2 Bahan

Daun muda (pucuk) gambir tipe riau gadang. Bahan kimia yang dipakai dalam kegiatan penelitian ini adalah RB buffer, β -mercaptoethanol, etanol absolute, W1 bufffer, wash buffer, RNase free water, agarose, 0,5 x TBE, ethidium bromide, 10 x BPB, kit PCR (KOD1 mix blue), marker 1 KB, ddH₂O PCR, Primer, cDNA template, 4x DN master mix, gDNA remover, nuclease free water, 5x RT master mix, 2X buffer CTAB, phenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1), chloroform:isoamylalkohol (24:1), natrium asetat, etanol 99% dingin, etanol 70%, 1x buffer TE.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu eksperimen dan deskriptif. Metode eksperimen dilakukan untuk menguji spesifitas dari primer degeneratif yang digunakan pada deteksi gen CHS (*Chalcone Synthase*) pada tanaman gambir. Metode deskriptif dilakukan untuk menjelaskan hasil pengujian primer pada isolasi gen penyandi CHS (*Chalcone Synthase*).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengambilan Sampel

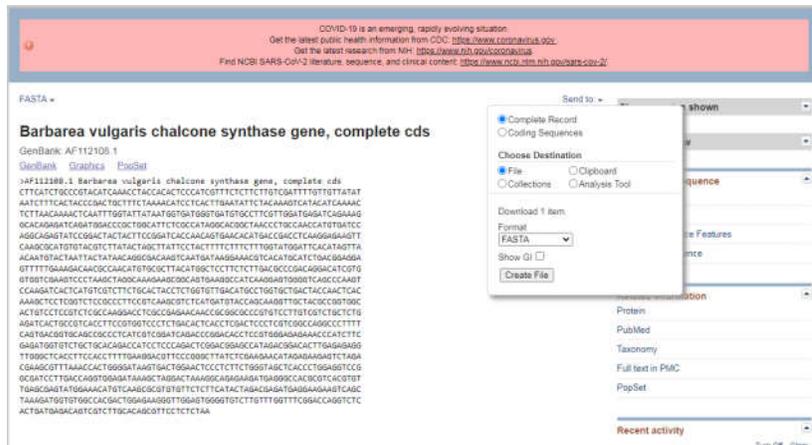
Pengambilan sampel diambil di daerah Siguntur Kabupaten Pesisir Selatan. Bagian tanaman yang diambil adalah bagian daun muda (pucuk).

3.4.2 Identifikasi sampel

Identifikasi sampel daun gambir dilakukan di Herbarium ANDALAS Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Andalas.

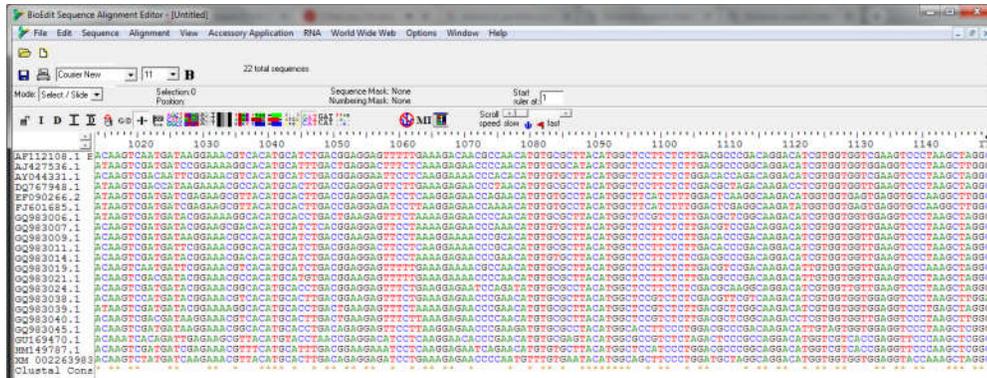
3.4.3 Desain Primer Degeneratif

Pada tahapan pendisainan primer degeneratif menggunakan data-data yang terdapat pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) yang disimpan dalam bentuk FASTA.



Gambar 5. Sequence gen CHS hasil penelusuran pada NCBI

21 Data sekuen DNA gen CHS (*Chalcone Synthase*) (lampiran 4) dilakukan *multialignment* dengan menggunakan *software* ClustalW dari program 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 2.

Tabel 2. Lambang nukleotida yang digunakan dalam penyusunan sekuen primer degeneratif menurut IUPAC

Lambang	Basa/nukleotida	Lambang	Basa/Nukleotida
A	<i>Adenosine</i>	M	A C (aMino group)
C	<i>Cytosine</i>	S	G C (Strong interaction)
G	<i>Guanine</i>	W	A T (Weak interaction)
T	<i>Thymine</i>	B	G T C (bukan A) (B setelah A)
U	<i>Uracil</i>	D	G A T (bukan C) (D setelah C)
R	G A (<i>puRine</i>)	H	A C T (bukan G) (H setelah G)
Y	T C (<i>pYrimidine</i>)	V	G C A (bukan T, bukan U) (V setelah U)
K	G T (<i>Ketone</i>)	N	A G C T (zNy)

Setelah primer disusun maka urutan primer dimasukkan kedalam situs Idt (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>) untuk melihat nilai Tm dan % GC.

OligoAnalyzer

Gambar 7. Laman awal situs Idt

3.4.4 Isolasi DNA Daun Gambir

Isolasi DNA daun gambir menggunakan metode CTAB dengan sedikit modifikasi. Dibuat campuran 2x buffer CTAB sebanyak 5 ml ditambahkan dengan 50 μL β -mercaptoethanol lalu di inkubasi pada suhu 65⁰C. gerus 1 lembar daun gambir tipe riau gadang, diambil \pm 300 mg dimasukkan ke dalam *tube eppendorf* 2 ml. kemudian ditambahkan 1 ml campuran 2x buffer CTAB dengan β -mercaptoethanol, dibolak-balik lalu divortex hingga tercampur merata. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 65⁰ C selama 30 menit dan dibalik setiap 10 menit sekali. Ditambahkan 500 μL campuran phenol:kloroform:isoamylalkohol (25:24:1) divortex selama 1 menit. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, supernatan diambil dan dipindahkan kedalam *tube eppendorf* 2 ml yang baru. Ditambahkan 500 μL campuran chloroform : isoamylalkohol (24:1) divortex selama 10 menit. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dan supernatan dipindahkan kedalam *tube eppendorf* 1,5 ml yang baru. Ditambahkan natrium asetat sebanyak 1/10 kali volume supernatan dan 1 ml etanol 99% dingin. Tabung dibolak-balik selama 1 menit sampai terlihat benang-benang halus. Disentrifugasi pada kecepatan 12.000

rpm selama 5 menit, lalu supernatant dibuang dan ditambahkan 500 μ L etanol 70 %. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, supernatant di buang dan DNA dikeringkan di dalam oven. Setelah kering DNA ditambahkan 100 μ L 1x buffer TE dan disimpan pada suhu -20°C

3.4.5 Isolasi RNA Daun Gambir

Isolasi RNA daun gambir menggunakan *Total RNA Mini Kit (Plant)* dari Geneaid. Gerus 1 lembar daun gambir tipe riau gadang. Diambil \pm 25 mg sampel dan dimasukkan ke dalam tube 1,5ml, ditambahkan 500 μ L RB buffer dan 5 μ L β -mercaptoethanol. Kemudian vortex dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit, disentrifus menggunakan sentrifus dingin (suhu 17°C) 1000 x g selama 3 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan kedalam filter kolom dalam tube 1,5 ml, lalu disentrifus (suhu 17°C) 1000 x g selama 1menit. Filter kolom dibuang, lalu supernatan dipindahkan ke dalam tube 1,5 yang baru, ditambahkan etanol absolut sebanyak $1/2$ x volume filtrat. RB kolom diletakkan di dalam tube 1,5 ml yang baru, kemudian dimasukkan filtrat ke dalam RB kolom dan disentrifus dingin (suhu 17°C) 14.000 x g selama 1 menit. Supernatan dibuang danRB kolom diletakkan kembali ke dalam tube 1,5 ml, ditambahkan 400 μ L W1 buffer, disentrifus dingin (suhu 17°C) 14.000 X g selama 1 menit. Supernatan dibuang, RB kolom diletakkan ke dalam tube 1,5 ml, ditambahkan 400 μ L *wash* buffer, disentrifus dingin (suhu 17°C) 14.000 x g selama 1 menit. Supernatan dibuang,RB column diletakkan ke dalam tube 1,5 ml, ditambahkan 400 μ L *wash* buffer, disentrifus dingin (suhu 17°C) 14.000 x g selama 1 menit. Supernatan dibuang, RB kolom diletakkan ke dalam tube 1,5 ml, ditambahkan 400 μ L *wash* buffer, disentrifus dingin (suhu 17°C) 14.000 x g selama 1 menit. Supernatan dibuang,

RB kolom diletakkan ke dalam tube 1,5 ml, disentrifus dingin (suhu 17⁰C) 14.000 x g selama 3 menit. Pindahkan RB kolom ke dalam tube 1,5 ml yang baru, ditambahkan 50 uL RNase *free water*, diinkubasi 4 menit di suhu ruang dan disentrifus dingin (suhu 17⁰C) 14.000 x g selama 1 menit. Pipet filtrat hasil sentrifus dan dimasukkan kembali ke RB kolom, diinkubasi 2 menit, disentrifus dingin (suhu 17⁰C) 14.000 x g selama 1 menit.

3.4.6. Elektroforesis

Timbang 1 gram agarose dan tambahkan 0,5 x TBE sebanyak 100 ml lalu dimasukkan ke dalam botol scott. Masak menggunakan microwave selama 1,5 menit dengan suhu medium. Gel agarose yang masih cair kemudian ditambahkan ethium bromide sebanyak 5 µl dan aduk sampai merata. Selanjutnya pasang gel tray, comb 8 slot, dan penghambat gel. Masukkan agarose ke dalam gel tray dan biarkan sampai mengeras. Kemudian dilakukan pembuatan cocktail elektroforesis yang terdiri dari sampel RNA 2 µl, 10x BPB 1 µl. Setelah agar membeku, buka penghambat gel dan ditambahkan buffer 0,5x TBE pada bak elektroforesis sampai permukaan gel terbenam. Selanjutnya dimasukkan standar lamda dan sampel DNA ke dalam lubang paling kiri dengan hati-hati. Lakukan proses running menggunakan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah selesai letakkan gel di atas UV transimunilator dan dokumentasikan dengan gel doc (biometra, jerman). Simpan data dalam bentuk digital (Fadli, 2016).

3.4.7 Sintesis cDNA

Sintesis cDNA daun gambir dilakukan menggunakan kit *Rever TraAce*[®] *qPCR RT Master Mix with gDNA Remover* (Toyobo). Komposisi bahan untuk sintesis cDNA terdapat pada Tabel 3. Terdapat dua tahapan dalam kit ini, yaitu

pendegradasian DNA pengotor pada *template* RNA dan reaksi transkripsi balik. Larutan pendegradasi DNA pengotor merupakan campuran 4X DN *MasterMix* (MM) dan gDNA *remover* dengan perbandingan 50 : 1. *Template* RNA, 4xDN MM, dan NFW dicampurkan dan diinkubasi pertama pada 37 °C selama 5menit menggunakan mesin PCR. Selanjutnya yaitu proses reaksi transkripsi balik dengan penambahan 5x RT Mmix II yang di dalamnya terdapat primer oligodT serta primer acak dan dilakukan kembali inkubasi kedua dengan tahapan inkubasi yaitu pada suhu 37 °C selama 15 menit, 50 °C selama 5 menit, dan 98 °C selama 5 menit dengan menggunakan mesin PCR.

Tabel 3. Komposisi bahan sintesis cDNA

Bahan	Volume
RNA	15 µl
4X DN <i>Master Mix</i>	6 µl
NFW (<i>Nuclease Free Water</i>)	3 µl
5x RT Mmix <i>Buffer</i>	6 µl
Total	30 µl

3.4.8 PCR Dan Elektroforesis

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

Tabel4. Cocktail PCR untuk amplifikasi DNA

KOD 1 mix blue	25 µl
water (ddH ₂ O)	15,1 µl
Primer forward	1,5 µl (konsentrasi 10 pmol/µl)
Primer reverse	1,5 µl (konsentrasi 10 pmol/µl)
DNA tamplate	6,9µl (konsentrasi 20 µg)
Volume akhir	50 µl

Tabel 5. Cocktail PCR untuk amplifikasi cDNA

KOD 1 mix blue	25 µl
water (ddH ₂ O)	21 µl
Primer forward	1,5 µl (konsentrasi 10 pmol/µl)
Primer reverse	1,5 µl (konsentrasi 10 pmol/µl)
DNA tamplate	1µl (konsentrasi 250 µg/ 10µl)
Volume akhir	50 µl

Tabel 6. Kondisi PCR untuk amplifikasi DNA

Reaksi	Suhu (°c)	Waktu	Jumlah siklus
Denaturasi awal	95	3 menit	
Denaturasi	95	30 detik	} 15
Anneling	75	30 detik	
Ekstensi	72	2 menit	
Denaturasi	95	30 detik	} 25
Anneling	60	30 detik	
Ektensi	70	2 menit	
Ekstensi akhir	72	5 menit	
pause	8	~	

Hasil amplifikasi Cdna belum bisa dilihat dengan mata telanjang. Untuk melihatnya, DNA dan cDNA hasil amplifikasi ini perlu dianalisa lebih lanjut dengan elektroforesis. Hasil amplifikasi diperiksa menggunakan gel agarosa 1%. cDNA hasil amplifikasi diload pada gel agarosa 1% dalam bufer TBE 0,5X. Masing- masing produk PCR sebanyak 3µl dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis dengan mengikut sertakan 3µl DNA 1 kb ladder (100 ng/µl) pada sumur pertama. Seterusnya gel agarose dijalankan dengan teknik elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 40 menit. Setelah itu hasil elektroforesis didokumentasikan dengan gel doc (Biometra Jerman).

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

1. Hasil identifikasi morfologi

Secara morfologi sampel diidentifikasi di Herbarium ANDA Fakultas Biologi Universitas Andalas menunjukkan spesies *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. dengan family Rubiceae (lampiran 1).

2. Hasil desain primer degeneratif

Hasil desain primer berupa empat buah primer *forward* dan satu primer *reverse* (F1, F2, F3, F4, dan R1) (tabel 6).

3. Hasil isolasi DNA atau RNA

Isolasi DNA atau RNA dari tumbuhan gambir berupa larutan jernih tidak berwarna (bening).

4. Hasil sintesis cDNA

Sintesis cDNA dari RNA gambir berupa larutan jernih tidak berwarna (bening). Proses sintesis cDNA menghasilkan cDNA sebanyak 30 μ l dengan konsentrasi 1656 μ g/ μ l dengan kemurnian sebesar 1.743 (A260/A280), 2.247 (A230/A260).

5. Hasil Amplifikasi DNA dan cDNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Profil pita hasil amplifikasi sampel gambir untuk gen CHS (*Chalcone synthase*) menggunakan primer F3-R1 diperoleh ukuran panjang fragmen cDNA pada rentang 500-750 bp (gambar 7, gambar 8).

4.2 Pembahasan

Pengambilan sampel diambil di daerah Siguntur Kabupaten Pesisir Selatan. Selanjutnya sampel diidentifikasi menggunakan metode morfologi konvensional yang diidentifikasi dari bentuk fisik seperti bunga, daun, biji, batang dan cabangnya (Kalangi *et al.*, 2014). Hasil dari identifikasi yang dilakukan menunjukkan sampel merupakan Tumbuhan *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. untuk sampel gambir yang diujikan (Gambir Riau Gadang) (lampiran 1).

Primer degeneratif merupakan primer yang sekuennya memiliki basa-basa selain dari basa penyusun nukleotida DNA (Jamsari, 2013). Pada pendesainan primer kegiatan yang pertama kali dilakukan adalah mencari sekuen gen CHS dari beberapa jenis tanaman yang diakses di *gene bank* (NCBI). Sekuen-sekuen gen yang akan digunakan (lampiran 4) dilakukan *multialignment* dengan menggunakan Program ClustalW dari software Bioedit. Hasil dari *multialignment* selanjutnya dipilih daerah yang memiliki kesamaan basa antara sekuen gen yang *dialignment* yang ditandai dengan banyaknya tanda ‘*’ sehingga didapatkan primer *forward* dan *reverse* yang akan digunakan pada deteksi DNA dan cDNA gen CHS menggunakan PCR (lampiran 5). Setelah primer didesain, selanjutnya dilakukan pemesanan primer di PT. Genetika Science Indonesia, Tangerang. Pemesan primer kurang lebih selama dua minggu.

Daerah antara primer *forward* dan *reverse* merupakan estimasi produk yang nantinya dihasilkan dari kegiatan amplifikasi PCR gen CHS. Dari nilai estimasi produk yang diperkirakan tersebut juga dapat dijadikan sebagai tolak ukur keberhasilan dari kegiatan amplifikasi gen CHS. Primer yang telah di desain memiliki basa-basa degeneratif seperti S, Y, N, C, D, W, hal ini dikarenakan pada

daerah tersebut banyak terdapat perbedaan basa sehingga mengharuskan mengganti basa-basa yang tidak sama tersebut dengan basa degeneratif yang dikeluarkan oleh IUPAC. Pada pendesaian primer panjang basa, nilai T_m dan % GC perlu diperhatikan. Panjang primer dapat dimulai dari 18 hingga 30 basa. Penggunaan panjang primer yang kurang dari 18 basa memiliki kemungkinan *mispriming* (penempelan primer pada tempat yang tidak diinginkan) tinggi (Maitriani *et al.*, 2014). Dari hasil pendesaian primer (tabel 7) didapatkan empat primer *forward* dan satu primer *reverse*. Didapatkannya satu primer *reverse* karena hasil *alignment* sekuen gen CHS pada bagian ujungnya terdapat sedikit yang memiliki kesamaan basa dan juga sedikitnya urutan basa yang memenuhi syarat desain primer yang baik. Pada hasil desain primer panjang basa pada F1, F2, F3, F4, dan R1 berturut-turut adalah 29, 28, 24,28, dan 24. Hal ini menandakan bahwa pada pendesaian primer degeneratif telah memenuhi acuan yang disarankan untuk panjang basa yang digunakan.

Tabel 7. Hasil desain primer degeneratif

Nama	Sekuen	Jumlah Basa	T_m	%GC	Estimasi
F1	5'RGAAACGNCACATGCABBTG ACNGARGAG'3	29	63.7 °C	52,9	906 bp
R1	5'CCANTCCAASCCYTCWCCDG TSGT '3	24	63.6 °C	59,7	
F2	5'GACATNGTGGTGGTNGARGT CCCHAAGC'3	28	63.8 °C	56,5	815 bp
R1	5'CCANTCCAASCCYTCWCCDT SGT '3	24	63.6 °C	59,7	
F3	5'TNGTCTTCTGCACNACCTCC GGNG '3	24	63.6 °C	60,4	724 bp

R1	5'CCANTCCAASCCYTCWCCDG TSGT '3	24	63.6 °C	59,7	
F4	5'ATGATGTACCARCAAGGTTG CTTCGCCG'3	28	63.7 °C	51,8	
R1	5'CCANTCCAASCCYTCWCCDG TSGT '3	24	63.6 °C	59,7	632 bp

T_m (*melting temperature*) merupakan temperatur saat setengah untai DNA ganda terpisah. Dari hasil desain primer perbedaan nilai T_m pada pasangan primer F1-R1 yaitu 01°C , F2-R1 yaitu $0,2^{\circ}\text{C}$, sedangkan untuk pasangan F3-R1 tidak terdapat perbedaan nilai T_m , dan untuk pasangan primer F4-R1 terdapat perbedaan nilai T_m sebesar $0,1^{\circ}\text{C}$. Nilai T_m primer hasil desain telah memenuhi acuan pada program. Pada keempat pasangan primer tersebut terdapat perbedaan nilai T_m yang tidak melebihi nilai sebesar 5°C . Perbedaan nilai T_m antar dua primer yang melebihi 5°C akan menyebabkan penurunan proses amplifikasi, atau bahkan memungkinkan tidak terjadi proses amplifikasi. Sedangkan untuk nilai GC yang baik berkisar 40-60 %. Dimana untuk nilai GC pada F1, F2, F3, F4, dan R1 berturut-turut adalah 52,9%, 56,5%, 60,4%, 51,8%, dan 59,7%. Dari nilai %GC dapat dilihat bahwa %GC pada primer hasil desain telah memenuhi acuan program yang disarankan.

Isolasi DNA dilakukan dengan metode CTAB dengan sedikit modifikasi. Adapun modifikasi yang dilakukan yaitu Perubahan suhu inkubasi dari 60°C menjadi 65°C , dan kecepatan setrifugasi. Proses isolasi DNA secara garis besar terdiri atas tiga tahap yaitu pemecahan sel dan solubilisasi membran, isolasi dan pemurnian RNA, dan pemekatan RNA (Eskundari, 2010). Tahap pertama dalam isolasi DNA adalah proses perusakan atau penghancuran membran dan dinding sel. Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA yang

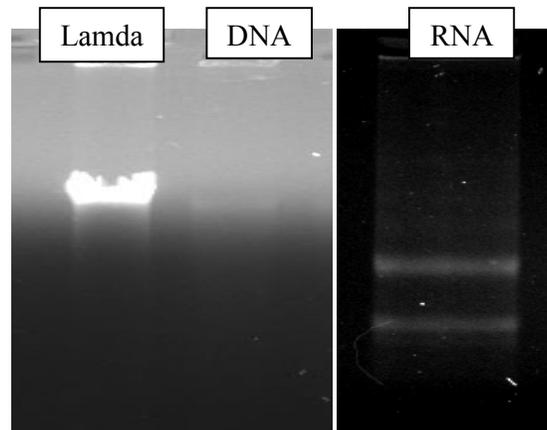
bertujuan untuk mengeluarkan isi sel. Proses pemecahan sel dilakukan dengan penggerusan sampel dan penambahan campuran 2x buffer CTAB dengan β -mercaptoethanol. Proses deproteinase menggunakan Campuran Phenol :Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1). Setelah proses ekstraksi, DNA yang didapat dapat dipekatkan melalui proses presipitasi. Pada proses ini digunakan natrium asetat dan etanol 99% dingin. Senyawa tersebut akan mempresipitasi DNA sehingga DNA akan menggumpal membentuk struktur fiber dan terbentuk pellet setelah dilakukan sentrifugasi. Proses presipitasi juga berfungsi untuk menghilangkan residu-residu kloroform yang berasal dari tahapan ekstraksi. Selanjutnya proses pencucian DNA dilakukan menggunakan etanol 70% dan pelarutan DNA yang didapat menggunakan 1x buffer TE.

Isolasi RNA dilakukan menggunakan *Total RNA Mini Kit (Plant)* dari *Geneaid*. Isolasi RNA merupakan tahap awal untuk mendapatkan informasi yang berkaitan dengan ekspresi gen. Secara umum isolasi RNA lebih sulit dibandingkan dengan isolasi DNA karena RNA sangat mudah terdegradasi oleh RNase (ribonuklease) (Eskundari, 2010). Pada proses isolasi RNA diawali dengan menggerus sampel daun tanpa tulang untuk memudahkan proses penggerusan daun. Menurut (Jamsari, 2007), salah satu hal yang harus diperhatikan dalam kegiatan isolasi RNA adalah efektifitas isolasi, karena jaringan- jaringan tanaman tertentu memiliki spesifitas struktur fisikokimia yang berbeda-beda. Terlalu lama di dalam proses penggerusan akan mengaktifkan enzim RNase sehingga akan menguraikan molekul-molekul RNA. Setelah proses penggerusan, selanjutnya ditambahkan larutan RB Buffer dan β -mercaptoethanol yang di gunakan untuk perusakan atau penghancuran membran dan dinding sel

(*lysis*). untuk pengikatan RNA ditambahkan ethanol absolute. Larutan W1 bufer dan *wash* bufer berfungsi untuk pencucian dan pemurnian RNA yang didapatkan. Selanjutnya untuk menarik dan melarutkan RNA yang terdapat dalam RB column ditambahkan RNase *free water*. Metabolit primer maupun sekunder (fenolik dan polisakarida) pada tumbuhan dapat mengganggu proses isolasi DNA dan RNA. Isolasi DNA dan RNA tanaman sulit dilakukan karena tingginya kandungan polisakarida, pigmen, dan senyawa-senyawa lain yang terdapat di dalam jaringan tanaman (Daohong *et al.*, 2004). Jaringan tanaman gambir memiliki kandungan polisakarida, polifenol dan senyawa kompleks lainnya yang mengendap bersama RNA dan jumlahnya bervariasi pada jaringan sehingga menjadi permasalahan dalam memperoleh ekstrak RNA yang berkualitas tinggi. Adapun dilakukan isolasi DNA dan RNA dikarenakan pada hasil isolasi DNA konsentrasi yang didapatkan kecil dan juga untuk melihat perbandingan hasil amplifikasi antara hasil isolasi DNA dan RNA, sehingga dicoba menggunakan isolasi RNA. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Sun *et al* (2015) tentang Analisis Molekuler dan Biokimia *Chalcone Synthase* dari *Freesia hybrid* pada Jalur Biosintetik Flavonoid juga menggunakan hasil isolasi RNA, untuk isolasi dan deteksi gen CHS pada tanaman lain juga lebih banyak menggunakan hasil dari isolasi RNA yang diubah ke cDNA untuk amplifikasi PCR dari pada menggunakan DNA.

Setelah DNA dan RNA berhasil diisolasi, selanjutnya dilakukan pengukuran RNA secara kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif DNA dan RNA dilakukan dengan proses elektroforesis. Prinsip kerja dari elektroforesis adalah sampel yang di tempatkan dalam bak elektroforesis yang berisi larutan penyangga

yang dialiri listrik molekul dan partikel bermuatan akan bergerak ke arah elektrode yang memiliki muatan berlawanan. Untuk sampel DNA dan RNA akan bergerak dari muatan negatif ke muatan positif karena DNA dan RNA bermuatan negatif. TBE 1X bertindak sebagai larutan penyangga yang berguna untuk menjaga kesetimbangan PH dan memberikan ion untuk konduktivitas. Visualisasi kualitas DNA dan RNA dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 1% selama 30 menit dengan voltase 100 volt (gambar 8), dan RNA diamati dengan UV transilluminator.



Gambar 8. Hasil elektroforesis DNA dan RNA daun gambir tipe riau gadang

Visualisasi gel elektroforesis hasil ekstraksi DNA dan RNA (Gambar 8) terlihat pada hasil isolasi DNA terdapat pita yang sangat tipis, sedangkan Pada hasil elektroforesis RNA, adanya dua pita dengan ketebalan (intensitas) fluoresensi kedua pita sama, seimbang dan kurang tajam. Pita RNA yang terbentuk yang menunjukkan bahwa adanya RNA. Ketajaman fluoresensi pita DNA dan RNA yang kurang jelas pada sampel bisa disebabkan karena konsentrasi DNA dan RNA total hasil ekstraksi kecil, hal ini juga bisa disebabkan oleh tidak halus nya sampel yang digunakan. Lamanya penggerusan dan waktu inkubasi juga dapat mempengaruhi hasil isolasi DNA.

Uji kuantitatif dilakukan dengan mengukur absorbansi DNA dan RNA menggunakan *NanoDrop spectrophotometer*. *NanoDrop spectrophotometer* bisa digunakan sebagai salah satu sarana untuk melihat kualitas DNA dan RNA, alat ini berkerja dengan cara menangkap gelombang cahayasampel DNA atau RNA yang diserap dan dikalkulasikan melalui hasil Absorbansi 260/280 dan 260/230. A260 merupakan gelombang cahaya yang berfungsi untuk menangkap RNA, sedangkan A280 merupakan gelombang cahaya yang berfungsi untuk menangkap DNA, protein, dan lain-lain (Sambrook & Rusell, 2001).

Tabel 8. Kualitas dan kuantitas hasil isolasi DNA atau RNA yang diukur dengan nanodrop

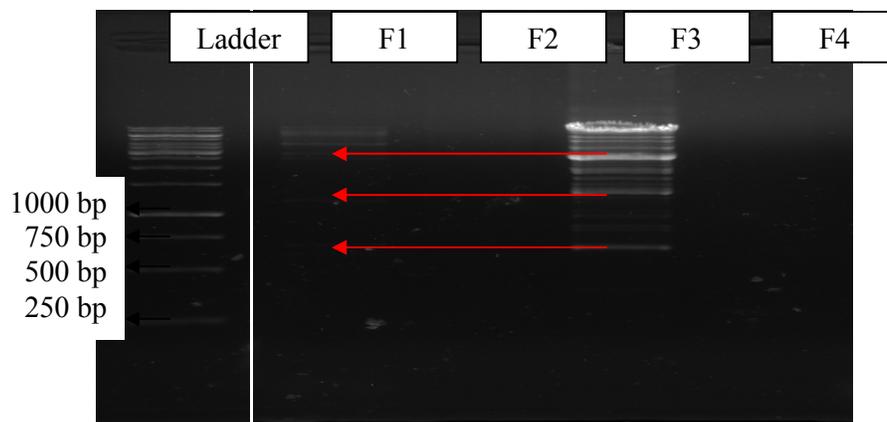
No	Sampel	280/260	260/230	Konsentrasi
1	DNA	1.208	0,383	145 µg/ml
2	RNA	2.157	2.009	186,4 µg/ml

Menurut Sambrook & Rusell (2001), nilai rasio kemurnian A280/A260 seharusnya berkisar 1.8–2.0. Rasio kemurnian A280/A260 di bawah rentang tersebut menunjukkan bahwa terdapat kontaminasi protein. Nilai rasio kemurnian A280/A260 dari sampel DNA dan RNA (tabel 8), menunjukkan bahwa kedua sampel masih terdapat kontaminan dari protein. Sedangkan berdasarkan nilai rasio kemurnian A260/230, suatu sampel memiliki kemurnian DNA yang baik apabila memiliki nilai rasio kemurnian A260/230 berkisar 1,8-2,0 untuk DNA dan 2.0–2.4 untuk RNA (Farrell, 2005). Nilai rasio kemurnian A260/230 sampel DNA dan RNA (tabel 8) menunjukkan bahwa DNA yang di dapat memiliki kemurnian yang kurang baik sedangkan untuk RNA yang di dapat memiliki tingkat kemurnian yang cukup baik dari kontaminan polisakarida.

Setelah proses elektroforesis RNA dan dihasilkan pita RNA yang berkualitas, RNA total hasil isolasi selanjutnya digunakan sebagai cetakan untuk mensintesis cDNA. Konsentrasi RNA yang digunakan sebesar 186,4 ng/ μ L. Proses sintesis cDNA dalam penelitian ini menggunakan kit *ReverTra Ace[®] qPCR Master Mix with gDNA Remover* dari Toyobo. Pada sintesis cDNA dilakukan penambahan enzim *reverse transcriptase* yang bertujuan untuk menggandakan RNA yang telah di isolasi ke dalam bentuk cDNA. Hasil sintesis cDNA diverifikasi menggunakan nanodrop. Hasil dari pengukuran menggunakan nanodrop didapatkan konsentrasi sebesar 1.656 μ g/ μ l, dengan nilai absorbansi A260/280 sebesar 1.743 dan A260/230 sebesar 2.247, dari hasil tersebut terlihat bahwa cDNA yang dihasilkan belum sepenuhnya murni, karena masih terdapat pengotor di dalamnya. Hal ini terjadi dikarenakan masih terdapat senyawa pengotor yang berasal dari larutan RNA sebelumnya dan masih terbawa saat proses sintesis cDNA. Adapun perubahan RNA ke cDNA adalah dikarenakan RNA sendiri berupa untai tunggal sehingga tidak dapat digunakan untuk proses amplifikasi menggunakan PCR.

Selanjutnya hasil isolasi DNA dan hasil cDNA digunakan sebagai cetakan pada proses amplifikasi PCR. Proses PCR bertujuan untuk menggandakan molekul DNA. Prinsip kerja PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yaitu menggunakan *reaction mixture* serta memanfaatkan enzim dari DNA polimerase yang bersifat termostabil dan fragmen DNA yang pendek disebut primer. Primer berfungsi untuk mensintesis secara langsung sekuens DNA target spesifik dari DNA template. Reaksi sintesis tersebut terus berulang sehingga membentuk suatu siklus (Sunarno *et al.*, 2014). Ada tiga tahapan penting dalam

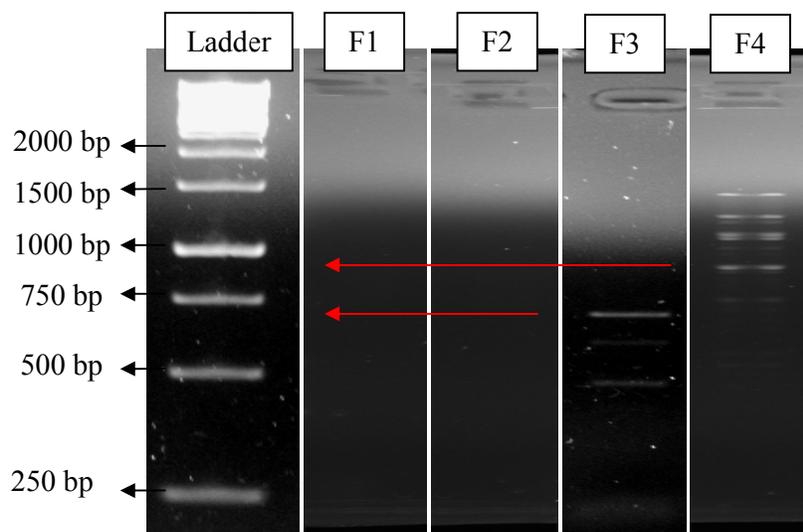
proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung dengan cepat yaitu denaturasi, annealing, dan pemanjangan untai DNA (K.Yusuf, 2007). Pada proses PCR menggunakan 40 siklus berulang (tabel 6). Proses PCR dimulai dari tahap pra-denaturasi menggunakan suhu 95⁰C untuk pembukaan DNA untai ganda menjadi untai tunggal. Proses ini berlangsung selama 3 menit, dan dilanjutkan proses denaturasi pada suhu 95⁰C selama 30 detik. Kemudian proses annealing berlangsung selama 30 detik pada suhu 65⁰C. Pada tahap ini primer akan menempel pada DNA template di tempat yang berkomplemen dengan sekuens primer. Proses *extention* berlangsung selama 2 menit pada suhu 72⁰C, *extention* bertujuan untuk proses pemanjangan primer menggunakan untai tunggal DNA sebagai cetaknya. DNA polimerase akan memasangkan dNTP yang sesuai dengan pasangannya. Proses ini akan berlangsung selama 14 siklus pertama kemudian dilanjutkan dengan tahap denaturasi, *annealing*, *extention* dengan suhu yang berbeda selama 25 siklus berikutnya dan diakhiri dengan tahap final *extention* selama 5 menit pada suhu 72⁰C.



Gambar 9. Visualisasi Hasil Amplifikasi PCR DNA Gambir Tipe Riau Gadang

Visualisasi hasil amplifikasi fragmen DNA gen target dilihat menggunakan proses elektroforesis dan diamati dengan UV transilluminator. Pada

elektroforesis ini digunakan marker 1 kb ladder sebagai acuan untuk mengetahui ukuran DNA hasil amplifikasi dan berfungsi sebagai penanda posisi pasangan basa dari molekul DNA yang bermigrasi. Dari hasil visualisasi dapat dilihat bahwa kombinasi F1-R1, F2-R1, dan F4-R1 tidak terdapat pita yang sesuai dengan estimasi produk. Sedangkan untuk kombinasi primer F3-R1 menghasilkan produk yang sesuai estimasi yaitu 724 bp (gambar 9), tetapi masih terdapat smear dan adanya beberapa pita. Hasil amplifikasi tersebut memperlihatkan bahwa produk yang dihasilkan tidak spesifik. Hal ini dikarenakan primer yang didesain mungkin dapat mendeteksi lebih dari satu gen yang mengakibatkan dapat mengamplifikasi daerah lain yang bukan gen target.



Gambar 10. Visualisasi hasil amplifikasi PCR cDNA Gambir tipe Riau Gadang

Dari hasil visualisasi amplifikasi fragmen cDNA gen target dapat dilihat bahwa kombinasi primer F3-R1 terdapat pita DNA berada pada rentang 500-750 bp (gambar 10), Hal ini sesuai dengan estimasi produk yaitu sebesar 724 bp. Pada hasil elektroforesis cDNA terlihat bahwa hasil amplifikasi tidak menunjukkan adanya smear dan pita yang didapat lebih tegas dari hasil amplifikasi DNA, hal

ini menunjukkan bahwa kualitas dan kemurnian DNA sangat berpengaruh dalam proses amplifikasi DNA. Menurut Nkongolo *et al.*, (1998) kualitas DNA dan kemurnian DNA yang kurang baik, kemungkinan masih mengandung polysakarida, senyawa fenolik ataupun senyawa kontaminan lainnya. Kontaminan dalam jumlah yang signifikan dapat mempengaruhi penempelan primer pada cetakan DNA. Kandungan fenol, tannin dan metabolit sekunder pada tumbuhan dapat mempengaruhi ekstraksi DNA dan akhirnya dapat mempengaruhi hasil dari kegiatan PCR.

Sedangkan untuk pasangan primer F1-R1 dan F2-R1 tidak terdapat pita sama sekali, hal ini menandakan bahwa primer yang di desain tidak dapat mendeteksi gen target. Untuk pasangan primer F4-R1 terdapat pita hasil amplifikasi akan tetapi pita yang didapat tidak sesuai dengan estimasi produk dari primer F4-R1, hal ini menandakan bahwa pasangan primer ini tidak dapat mendeteksi gen target tetapi memiliki kemungkinan untuk mendeteksi gen lain selain gen target.

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan di peroleh kesimpulan bahwa:

1. Pasangan primer degeneratif yang dapat digunakan untuk deteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (hunter) *Roxb.*) tipe riau gadang yaitu pasangan primer F3-R1(TNG TCT TCT GCA CNA CCT CCG GNG) – (CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT).
2. Primer degeneratif yang di desain dapat mendeteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) hasilcDNA tanaman gambir (*Uncaria gambier* (hunter) *Roxb.*) tipe riau gadang yang menghasilkan produk dengan estimasi sebesar 724 bp.

5.2 Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya agar melakukan proses sekuensing untuk memastikan bahwa pita DNA yang didapat merupakan gen CHS (*chalcone synthase*), serta disarankan untuk menggunakan gen-gen lain seperti F3H, LAR, ANS, ANR ataupun PA-ase dan lainnya yang ikut terlibat dalam proses biosintesis katekin pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (hunter) *Roxb.*).

DAFTAR PUSTAKA

- Almahdy et al. (2004). Uji Teratogenitas Gambir Murni Secara In-vivo. *Farmasi FMIPA Universitas Andalas. Padang*.
- Amos, A. (2010). Kandungan Katekin Gambir Sentra Produksi Di Indonesia. *Jurnal Standardisasi*, 12(3), 149.
- Amos, Zainudin, I., Triputranto, A., Rusmandana, B., & Ngudiwaluyo, S. (2004). *Teknologi Pasca Panen Gambir*. Badan pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Armenia, A. S. dan H. A. (2004). Toksisitas ekstrak gambir (*Uncaria gambir* Roxb) terhadap organ ginjal, hati dan jantung mencit. *Sem. Nas. Tumbuhan Tanaman Obat Indonesia XXVI*.
- Dale, J. W., & Schantz, M. von. (2002). *From Genes to Genomes*. John Wiley & Sons, LTD.
- Daohong, W., Bochu, W., Biao, L., Chuanren, D., & Jin, Z. (2004). *Extraction of total RNA from Chrysanthemum containing high levels of phenolic and carbohydrates*.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition* (2nd ed., Vol. 5). British Library Cataloguing in Publication Data A.
- Eling K, D., Kurniawan, R., & Muhimmah, I. (2014). Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction(PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review. *Seminar Informatika Medis 2014*. <http://snimed.fit.uui.ac.id/>
- Eskundari, R. D. (2010). *Isolasi Dan Karakterisasi Fragmen Gen Leafy*. institut Pertanian Bogor.
- Fadli, M. (2016). *Isolasi Gen DFR (Dihydroflavonol 4-Reductase) Pada Tanaman gambir (Uncaria gambir (Hunter) Roxb.) Berbasis PCR (Polymerase Chain Reaction)* (Issue June). Universitas Andalas Padang.
- Farrell, R. (2005). *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* (3rd ed). Elsevier Academic Press.
- Fatchiyah, E. L., Arumingtyas, S, W., & S, R. (2011). *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisa*. Penerbit Erlangga.
- Ferdinal, N., Sulistyono, J., & Nazir, N. (2013). Sintesis Enzimatis Flavonoid-glikosida dari Gambir (*Uncaria gambir*) menggunakan Enzim CGT-ase dari *Bacillus Licheniformis*. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*, 289–296.

- Perita, I., Jamsari, Suliansyah, I., & Gustian. (2013). Studi Hubungan Karakter Morfologi, Anatomi, Dan Molekuler Terkait Potensi Kadar Katekin Pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb). *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133.
- Gasic, K., Hernandez, A., & Korban, S. S. (2004). RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*.
- Gumbira, S. E., Syamsu, K., Mardliyati, E., Herryandie, A., Evalia, N. A., Rahayu, D. L., Puspitarini, R., Ahyarudin, A., & Hadiwijoyo, A. (2009). Agroindustri dan Bisnis Gambir Indonesia. *IPB Press. Bogor*, 118 hal.
- Hahlbrock, K., & Scheel, D. (1989). Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*.
- Hamda, F. (2009). Identifikasi Karakteristik Gambir (*Uncaria* spp) di Sumatera Barat dan analisis RAPD. *Disertasi. Universitas Padjajaran. Bandung*.
- Handayani, Fitri, Siswanto, E., & Pangesti, Lisna . a. I. (2015). Uji Aktifitas terhadap Penyembuhan Luka Bakar pada Kulit Punggung Mencit Putih Jantan (*Mus musculus*). *Jurnal Ilmiah Manuntung*.
- Hilpiani, D. (2012). *Uji Toksisitas Akut Isolat Katekin Gambir Dari Fase Etil Asetat Terhadap Mencit Putih Jantan Secara In Vivo*. UIN Syarif. Jakarta.
- Istino, F. (2011). Studi Hubungan Karakter Morfologi, Anatomi, dan Molekuler Terkait Potensi Kadar Katekin Pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb). *Disertasi Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Padang*.
- Jamsari. (2007). *Bioteknologi Pemula: Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Universitas Riau Press.
- Jamsari. (2013). *Rekayasa Genetika untuk Analisa Genom dan Produksi Organisme Transgenik*. UR Press.
- K.Yusuf, Z. (2007). Polymerase chain reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis*.
- Kendall, L. V, & Riley, L. K. (2000). Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Contemporary Topics*.
- Koolman, J., & Roehm, K. (2005). *Color Atlas of Biochemistry* (Edisi ke-2). Thieme.
- Kusharyono. (2004, September). Efek infuse Gambir (*Uncaria gambir* Roxb) yang diperoleh dari Pasar terhadap Sistem Syaraf Otonom Mencit Jantan. *Seminar*

Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXVI.

- Liu.(1998). A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. *Plant Molecular Biology Reporter*.
- Lucida, Bakhtiar, H. ., & Putri, A. . (2007). *Formulasi Sediaan Antiseptik Mulut dari Katekin Gambir*. Universitas Andalas.Padang.
- Lucida H. (2006). Determination of the ionization constant and the stability of catechin from gambir (*Uncaria Gambier* (Hunter) Roxb.). *The Twelfth Asian Symposium on Medicinal Plants. Spices and Other Natural Products (ASOMPS XII)*. Padang.
- Maitriani, L. K. B., Wirajana, N., & Yowani, S. C. (2014). *Desain Primer Untuk Amplifikasi Fragmen Gen Inha Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) Dengan Metode Polymerase Chain Reaction*.
- Nazir, N. (2000). *Gambir Budidaya, Pengolahan, dan Prospek Diversifikasinya*. yayasan Hutanku.
- Nkongolo, K. K., Klimaszewska, K., & Gratton, W. S. (1998). DNA Yields and Optimization of RAPD Patterns Using Spruce Embryogenic Lines, Seedlings, and Needles. *Plant Molecular Biology Reporter*.
- Pratt, D. . dan B. J. . H. (1990). Natural Antioxidant Not Exploited Commercially. *Elsevier Applied Science. London*.
- Putri. (2010). Karakterisasi spesies bahan baku ikan air tawar komersial berbasis PCR-sequencing dan perbandingan metode ekstraksi DNA. *Skripsi. Bogor . Institut Pertanian Bogor*.
- 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>
- Rianta, P. (2001). Mengenal Metode Elektroforesis. *Oseana*.
- Richardson, Baverstock, & Adams, M. (1986). *Allozyme Electrophoresis. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies*. Academic Press.
- Rosana Dadan. (2012). Struktur dan Fungsi DNA dan RNA. *Biofisika*.
- Sabarni. (2015). *Teknik Pembuatan Gambir (Uncaria gambir Roxb) Secara Tradisional*. UIN Ar-Raniry.
- Saiki, David, H. ., Susanne, S., Stephen, J., Russel, H., Glenn, T., Kary, & Henry AE, B. (1988). Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*.

- Sambrook, J. F., & Rusell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)*. Cold Springs Harbour Press.
- Sartika D. (2006). *Bioinformatika pada gen pembungaan: karakterisasi gen homolog pada Magnoliopsida dan Liliopsida*. Institut Teknologi Bandung.
- Shu-Yan, Z., Chao-Gu, Z., Xi-Yun, Y., & Wei-Xi, T. (2008). Low Concentration Of Condensed Tannins From Catechu Significantly Inhibits Fatty Acid Synthase And Growth Of MCF- 7 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Singleton, P., & Sainsbury, D. (2006). *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (Third Edit). John Wiley & Sons, LTD.
- Sri Pujiyanto, R. S. F. (2014). *Buku guru menjelajah dunia biologi* (Eka Sandra Aryani (ed.); jilid 3). Tiga Serangkai Pustaka Mandiri.
- Suehiro, N., Matsuda, K., Okuda, S., & Natsuaki, T. (2005). A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. *Journal of Virological Methods*.
- Suharman. (2018). *gambir, peluang pasar, budidaya dan pengolahannya* (edisi 1). CV BUDI UTAMA.
- Sun, W., Meng, X., Liang, L., Jiang, W., Huang, Y., He, J., Hu, H., Almqvist, J., Gao, X., & Wang, L. (2015). Molecular and biochemical analysis of chalcone Synthase from freesia hybrid in flavonoid biosynthetic pathway. *PLoS ONE*.
- Sunarno, Muna, F., Fitri, N., Malik, A., Karuniawati, A., & Soebandrio, A. (2014). Metode Cepat Ekstraksi DNA Corynebacterium diphtheriae Untuk Pemeriksaan PCR. *Bul. Penelit. Kesehat*.
- Titrawani. (1996). *Biodiversiti Kodok Genus Rana Di Tinjau Dari Morfologi, Kariotip Dan Pola Protein Di Kodya Sawah Lunto*. Institute Pertanian Bogor.
- Tohib, W. (2012). *Plant Breeding*. Dewa Ruci Press.
- Wanqian, L., Bochu, W., Chuanren, D., & Biao, L. (2005). A method for isolating functional RNA from callus of Dendrobium candidum contented rich polysaccharides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.
- Weaver, R. F., & Hedrick, P. W. (1997). *Genetics* (3rd Ed). Brown Publisher.
- Widowati, E. W. (2013). Desain Primer Sitokrom B (Cyt B) Sebagai Salah Satu Komponen PCR (Polymerase Chain Reaction) Untuk Deteksi DNA Babi. *Laporan Penelitian Individual*.
- Xiao, Y., Yang, Y., Cao, H., Fan, H., Ma, Z., Lei, X., Mason, A. S., Xia, Z., & Huang, X. (2012). Efficient isolation of high quality RNA from tropical

palms for RNA-seq analysis. *Plant OMICS*.

Yu, O., & Jez, J. M. (2008). Nature's assembly line: Biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *Plant Journal*.

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

Zhou, T. S., Zhou, R., Yu, Y. Ben, Xiao, Y., Li, D. H., Xiao, B., Yu, O., & Yang, Y. J. (2016). Cloning and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase gene from tea plant (*Camellia sinensis*). *International Journal of Molecular Sciences*.

Lampiran 1. Hasil identifikasi tanaman gambir (*Uncaria gambir* (hunter) roxb.) tipe Riau Gadang

 **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 : 492/K-ID/ANDA/XII/2019
Lampiran : -
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada yth,
Amelia Saputri
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 : Amelia Saputri
No. BP : 1604047
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



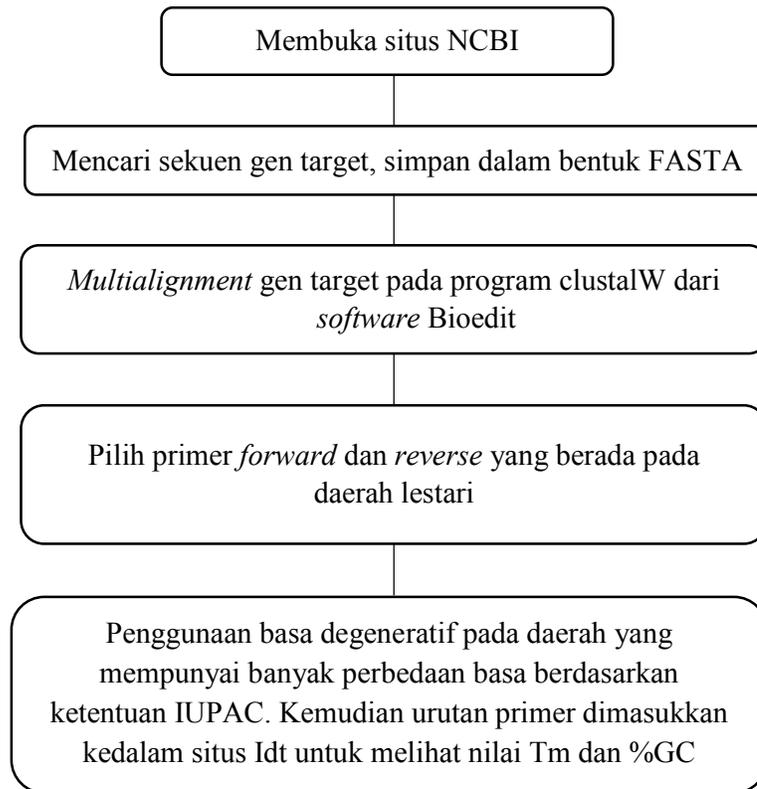
Gambar 11. Hasil identifikasi Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (hunter) roxb.) tipe Riau Gadang

Lampiran 2. Gambar pengambilan sampel tanaman gambir tipe riau gadang



Gambar 12.Tanaman gambir tipe riau gadang

Lampiran 3. Skema Desain primer degeneratif



Gambar 13. Skema desain primer degeneratif

Lampiran 4.Data sekuen yang dipakai pada desain primer

Tabel 9.Kode sekuen untuk desain primer degeneratif

No	Kode Sekuen	No	Kode Sekuen
1	AF112108.1	12	GC983019.1
2	AJ427536.1	13	GC983021.1
3	AY044331	14	GC983024.1
4	DQ767948.1	15	GC983038.1
5	EF090266.2	16	GC983039.1
6	GC983006.1	17	GC983040.1
7	GC983007.1	18	GC983045.1
8	GC983009.1	19	GU169470.1
9	GC983011.1	20	HM149787.1
10	GC983014.1	21	XM_002263983.3
11	FJ601685.1		

Lampiran 5. Hasil *Multialignment*

```

AF112108.1   AAGTCAATGA TAAGGAAACG TCACATGCAT CTGACGGAGG AGTTTTTTGAA AGACAACGCC
AJ427536.1   AAGTCGATGA TCCGAAAAG  GCACATGCAT TTGACTGAGG ACTTTCTCAA AGAGAACCCC
AY044331.1   AAGTCGACAA TTCGAAAACG TCACATGCAT CTGACGGAGG AATTCCTCAA GGAAAACCCA
DQ767948.1   AAGTCGACCA TAAGAAAACG CCACATGCAC TTGACCGAGG AGTTCCTGAA AGAGAACCCT
EF090266.2   AAGTCGATGA TCGAGAAGCG TTACATGCAC TTGACCGAGG AGATCCTCAA GGAGAACCAG
FJ601685.1   AAGTCGATGA TCGAGAAGCG TTACATGCAC TTGACCGAGG AGATCCTTAA GGAGAACCAA
GQ983006.1   AAGTCGATGA TACGAAAAG  GCACATGCAC CTGACTGAAG AGTTTCTAAA AGAGAACCCC
GQ983007.1   AAGTCGATGA TACGGAAGCG ACACATGCAT CTCACGGAGG AGTTCCTAAA AGAGAACCCA
GQ983009.1   AAGTCGATGA TAAGGAAACG CCACATGCAT CTGACCGAAG AGTTCCTAAA GGAAAACCCG
GQ983011.1   AAGTCGATGA TTCGAAAACG GCACATGCAT CTGACGGAGG ACTTCCTCAA GGAAAACCCG
GQ983014.1   AAGTCGATGA TACGAAAACG ACACATGCAT CTGACGGAGG AGTTCCTAAA AGAGAACCCG
GQ983019.1   AAGTCAATGA TTCGAAAACG TCACATGCAT CTGACGGAGG AGTTTTTTGAA AGAAAACGCC
GQ983021.1   AAGTCGACGA TACGAAAACG CCACATGCAT GTGACGGAAG AGTTTTTTGAA AGAAAACCCC
GQ983024.1   AAGTCGATGA TACGAAAACG GCACATGCAC CTGACGGAGG AGTTTCTGAA GGAGAATCCA
GQ983038.1   AAGTCCATGA TACGAAAACG TCACATGCAC TTGACGGAAG AGTTTCTGAA AGAGAACCCG
GQ983039.1   AAGTCGATGA TACGAAAAG  GCACATGCAC CTGACTGAAG AGTTTCTAAA AGAGAACCCG
GQ983040.1   AAGTCGACGA TAAGGAAACG TCACATGCAC TTGACTGAAG AGTTTCTTAA AGAGAACCCC
GQ983045.1   AAGTCGATGA TAAGGAAACG GCACATGCAC CTGACAGAGG AGTTCCTTAA GGAGAACCCG
GU169470.1   AAATCACAGA TTGAGAAGCG TTACATGTAC CTAACCGAGG ACATCCTCAA GGAACACCCG
HM149787.1   AAGTCGATGA TCGAGAAACG TTTCATGCAT TTGACGGAAG AAATCCTCAA GGAGAATCAG
XM_0022639   AAGTCTATGA TCAAGAAACG TTACATGCAC TTGACAGAGG AGATCCTGAA AGAGAACCCC
F1           ----- ---RGAAACG NCACATGCAB BTGACNGARG AG----- -----

```

Gambar 14. *Multialignment* Posisi primer F1

AF112108.1	AGGACATCGT	GGTGGTCGAA	GTCCCTAAGC	TAGGCAAAGA	AGCGGCAGTG	AAGGCCATCA
AJ427536.1	AGGACATCGT	GGTGGTGGAG	GTCCCTAAGC	TTGGGAAAGA	GGCGGCTGTG	AGGGCCATCA
AY044331.1	AGGACATCGT	GGTGGTCGAA	GTCCCTAAGC	TAGGCAAAGA	AGCGGCAGTG	AAGGCCATCA
DQ767948.1	AAGACCTCGT	GGTGGTTGAA	GTCCCTAAGC	TAGGCAAAGA	TGCAGCAGTG	AAGGCCATCA
EF090266.2	AAGACATGGT	GGTGAGTGAG	GTGCCAAGGC	TTGGCAAAGA	GGCGGCTCAA	AAGGCCATCA
FJ601685.1	AAGATATGGT	GGTGAGTGAG	GTGCCAAGGC	TTGGCAAAGA	GGCGGCTCAA	AAGGCCATCA
GQ983006.1	AAGACATCGT	GGTGGTGGAG	GTCCCTAAGC	TAGGGAAAGA	GGCGGCGGTG	AGGGCCATCA
GQ983007.1	AGGACATCGT	GGTGGTTGAA	GTCCCTAAGC	TAGGCAAAGA	AGCGGCAGTG	AAGGCCATCA
GQ983009.1	AAGACATCGT	GGTGGTTGAA	GTCCCTAAGC	TAGGCAAAGA	GGCTGCGGTG	AAGGCCATCA
GQ983011.1	AGGACATCGT	GGTGGTTGAA	GTCCCTAAGC	TAGGCAAAGA	GGCGGCAGTG	AAGGCCATCA
GQ983014.1	AGGACATCGT	GGTGGTTGAA	GTCCCTAAGC	TAGGCAAAGA	AGCGGCAGTG	AAGGCCATCA
GQ983019.1	AAGACATTGT	GGTGGTTGAA	GTCCCAAAGC	TAGGCAAAGA	AGCGGCAGTG	AAGGCCATCA
GQ983021.1	AAGACATTGT	GGTGGTTGAA	GTCCCTAAGC	TAGGCAAAGA	AGCTGCAGTG	AAGGCCATCA
GQ983024.1	AGGACATCGT	GGTTGTTGAA	GTCCCTAAGC	TAGGGAAAGA	GGCGGCAGTG	AAGGCCATCA
GQ983038.1	AAGACATCGT	GGTGGTGGAG	GTCCCTAAGC	TTGGAAAAGA	GGCGGCGGTG	AGGGCCATCA
GQ983039.1	AAGACATCGT	GGTGGTGGAG	GTCCCTGAGC	TAGGGAAAGA	GGCGGCGGTG	AGGGCCATCA
GQ983040.1	AAGACCTCGT	GGTGGTTGAG	GTCCCTAAGC	TTGGGAAAGA	GGCGGCCGTG	AGGGCCATCA
GQ983045.1	AAGACATTGT	AGTGGTGGAG	GTCCCTAAGC	TCGGGAAAGA	GGCGGCAATG	AGGGCCATCA
GU169470.1	AGGACATGGT	CGTCACCGAG	GTTCCCAAGC	TCGGCAAAGA	GGCTGCCCAG	AAGGCCATCA
HM149787.1	AGGACATGGT	CGTCACCGAG	GTTCCCAAGC	TCGGCAAAGA	GGCTGCCCAG	AAGGCCATCA
XM_0022639	AGGACATGGT	GGTGGTGGAG	GTACCAAAGC	TAGGCAAAGA	GGCAGCCGCA	AAGGCCATCA
F2	--GACATNGT	GGTGGTNGAR	GTCCCHAAGC	-----	-----	-----

Gambar 15. *Multialignment* Posisi primer F2

AF112108.1	TCCAAGATCA	CTCATGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCTGGTG	TTGACATGCC	TGGTGCTGAC
AJ427536.1	TCCAAGATCA	CCCATCTTGT	CTTCTGCACC	ACCTCCGGTG	TCGACATGCC	TGGCGCCGAC
AY044331.1	TCAAAGATCA	CTCATGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCCGGCG	TCGACATGCC	TGGTGCTGAC
DQ767948.1	TCCAAGATTA	CACACGTTGT	CTTCTGCACT	ACCTCAGGAG	TCGACATGCC	TGGTGCTGAC
EF090266.2	TCCAAGATCA	CCCACGTCAT	CATGTGCACC	ACCTCTGGTG	TTGACATGCC	CGGTGCAGAC
FJ601685.1	TCCAAGATCA	CCCACGTCAT	CATGTGCACC	ACCTCCGGTG	TCGATATGCC	CGGTGCAGAC
GQ983006.1	TCCAAGATCA	CCCATCTTGT	CTTTTGCACC	ACCTCCGGTG	TCGACATGCC	TGGAGCTGAC
GQ983007.1	TCCAAGATCA	CTCATGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCCGGTG	TCGACATGCC	TGGTGCCGAC
GQ983009.1	TCCAAGATCG	CTCACGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCCGGTG	TCGACATGCC	TGGTGCTGAC
GQ983011.1	TCCAAGATCA	CTCACGTCGT	TTTCTGCACT	ACTTCCGGCG	TCGACATGCC	TGGTGCTGAC
GQ983014.1	TCCAAGATCA	CTCATGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCCGGTG	TCGACATGCC	TGGTGCCGAC
GQ983019.1	TCCAAGATCA	CTCATGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCTGGTG	TTGACATGCC	TGGTGCCGAC
GQ983021.1	TCTAAGATCA	CTCATCTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCTGGTG	TTGACATGCC	TGGTGCTGAC
GQ983024.1	TCCAAGATCA	CACACGTCGT	CTTCTGCACT	ACATCCGGAG	TTGACATGCC	TGGTGCTGAC
GQ983038.1	TCCAAGATCA	CCCATCTTGT	CTTTTGCACC	ACCTCCGGTG	TCGACATGCC	TGGAGCTGAC
GQ983039.1	TCTAAGATCA	CTCATGTTGT	CTTCTGCACC	ACCTCCGGTG	TCGACATGCC	TGGAGCTGAC
GQ983040.1	TCCAAGATCA	CCCATCTTGT	CTTCTGCACC	ACCTCCGGTG	TCGACATGCC	CGGAGCCGAC
GQ983045.1	TCCATAATTA	CCCACGTTGT	CTTCTGCACA	ACCTCCGGAG	TCGACATGCC	TGGCGCCGAC
GU169470.1	TCCAAGATCA	CCCACGTCAT	CGTCTGCACC	ACCTCCGGCG	TCGACATGCC	CGGAGCCGAC
HM149787.1	TCCAAGATCA	CCCACGTCAT	CGTCTGCACC	ACCTCCGGCG	TCGACATGCC	CGGAGCCGAC
XM_0022639	TCCAAGATCA	CTCACCTAGT	CTTCTGCACC	ACCAGCGGTG	TTGACATGCC	CGGTGCTGAC
F3	-----	-----TNGT	CTTCTGCACN	ACCTCCGGNG	-----	-----

Gambar 16. *Multialignment* Posisi primer F3

```

AF112108.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTACGCCGG TGGCACTGTC
AJ427536.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG CGGCACTGTC
AY044331.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG CGGTACTGTC
DQ767948.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGC-----T GCTTCGCCGG CGGTACTGTC
EF090266.2   AGCGATTTAT GATGTACCAA CAAGGTACAA TATATAGGTT GCTTTGCGGG AGGAACTGCC
FJ601685.1   AGCGCTTTAT GATGTACCAA CAAGGT-----T GCTTTGCGGG TGGTACCGTC
GQ983006.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG CGGCACTGTC
GQ983007.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG CGGCACTGTC
GQ983009.1   AGCGTCTTAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG CGGTACTGTC
GQ983011.1   AGCGTCTTAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG TGGCACTGTC
GQ983014.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAA CAAGGT-----T GCTTCGCCGG CGGCACTGTC
GQ983019.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG TGGCACTGTC
GQ983021.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG TGGCACTGTT
GQ983024.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTACGCCGG CGGCACTGTC
GQ983038.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG CGGCACTGTC
GQ983039.1   AGCGTCCCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG CGGCACTGTC
GQ983040.1   AGCGTCTCAT GATGTACCAG CAAGGT-----T GCTTCGCCGG CGGCACTGTC
GQ983045.1   AGCGTCTCAT GATGTATCAG CAGGGC-----T GCTTCGCCGG CGGCACTGCC
GU169470.1   AGCGTTTCAT GATGTACCAG CAGGGT-----T GCTTCGCCGG AGGCACCGTC
HM149787.1   AGCGTTTCAT GATGTACCAG CAGGGT-----T GCTTCGCCGG AGGCACCGTC
XM_0022639   AGCGCTTCAT GATGTACCAA CAGGGC-----T GCTTTGCTGG TGGCACCGTT
F4           -----AT GATGTACCAR CAAGGT-----T GCTTCGCCG- -----

```

Gambar 17. *Multialignment* Posisi primer F4

AF112108.1	AGGAGTGGGG	TCAGCCCAAG	TCCAAGATCA	CTCATGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCTGGTG
AJ427536.1	AGGAGTGGGG	TCAGCCCAAG	TCCAAGATCA	CCCATCTTGT	CTTCTGCACC	ACCTCCGGTG
AY044331.1	AGGAGTGGGG	CCAGCCCAAG	TCAAAGATCA	CTCATGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCCGGCG
DQ767948.1	AGGAGTGGGG	TCAGCCCAAG	TCCAAGATTA	CACACGTTGT	CTTCTGCACT	ACCTCAGGAG
EF090266.2	AGGAGTGGGG	CCAGCCTAAG	TCCAAGATCA	CCCACGTCAT	CATGTGCACC	ACCTCTGGTG
FJ601685.1	AGGAGTGGGG	CCAGCCTAAG	TCCAAGATCA	CCCACGTCAT	CATGTGCACC	ACCTCCGGTG
GQ983006.1	AGGAGTGGGG	TCAGCCCAAG	TCCAAGATCA	CCCATCTTGT	CTTTTGCACC	ACCTCCGGTG
GQ983007.1	AGGAGTGGGG	TCAACCCAAG	TCCAAGATCA	CTCATGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCCGGTG
GQ983009.1	AGGAGTGGGG	TCAGCCTAAG	TCCAAGATCG	CTCACGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCCGGTG
GQ983011.1	AGGAGTGGGG	CCAGCCCAAG	TCCAAGATCA	CTCACGTCGT	TTTCTGCACT	ACTTCCGGCG
GQ983014.1	AGGAGTGGGG	TCAACCCAAG	TCCAAGATCA	CTCATGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCCGGTG
GQ983019.1	AGGAGTGGGG	TCAGCCCAAG	TCCAAGATCA	CTCATGTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCTGGTG
GQ983021.1	AGGAGTGGGG	TCAGCCCAAG	TCTAAGATCA	CTCATCTCGT	CTTCTGCACT	ACCTCTGGTG
GQ983024.1	AGGAGTGGGG	CCAGCCCAAG	TCCAAGATCA	CACACGTCGT	CTTCTGCACT	ACATCCGGAG
GQ983038.1	AGGAGTGGGG	TCAACCCAAG	TCCAAGATCA	CCCATCTTGT	CTTTTGCACC	ACCTCCGGTG
GQ983039.1	AGGAGTGGGG	TCAACCCAAG	TCTAAGATCA	CTCATGTTGT	CTTCTGCACC	ACCTCCGGTG
GQ983040.1	AGGAGTGGGG	CCAGCCCAAG	TCCAAGATCA	CCCATCTTGT	CTTCTGCACC	ACCTCCGGTG
GQ983045.1	AGGAGTGGGG	TCAGCCCAAG	TCCATAATTA	CCCACGTTGT	CTTCTGCACA	ACCTCCGGAG
GU169470.1	AGGAGTGGGG	CCAGCCCAAG	TCCAAGATCA	CCCACGTCAT	CGTCTGCACC	ACCTCCGGCG
HM149787.1	AGGAGTGGGG	CCAGCCCAAG	TCCAAGATCA	CCCACGTCAT	CGTCTGCACC	ACCTCCGGCG
XM_0022639	AGGAGTGGGG	TCAGCCCAAA	TCCAAGATCA	CTCACCTAGT	CTTCTGCACC	ACCAGCGGTG
R1	-----	-----CCAN	TCCAASCCYT	CWCCDGTSGT	-----	-----

Gambar 18. *Multialignment* Posisi primer R1

Lampiran 6. Nilai Tm dan %GC setiap primer

Results RESUSPENSION DILUTION

SEQUENCE	5'- RGA AAC GNC ACA TGC ABB TGA CNG ARG AG -3'		
COMPLEMENT	5'- CTC YTC NGT CAV VTG CAT GTG NCG TTT CY -3'		
LENGTH	29		
GC CONTENT	52.9%		
MELT TEMP RANGE	MIN	MEAN	MAX
	59.2 °C	63.7 °C	67.5 °C

Gambar 19. Nilai TM dan %GC dari F1 hasil analisis Idt

Results RESUSPENSION DILUTION

SEQUENCE	5'- GAC ATN GTG GTG GTN GAR GTC CCH AAG C -3'		
COMPLEMENT	5'- GCT TDG GGA CYT CNA CCA CCA CNA TGT C -3'		
LENGTH	28		
GC CONTENT	56.5%		
MELT TEMP RANGE	MIN	MEAN	MAX
	59.7 °C	63.8 °C	67.7 °C

Gambar 20. Nilai TM dan %GC dari F2 hasil analisis Idt

Results RESUSPENSION DILUTION

SEQUENCE	5'- TNG TCT TCT GCA CNA CCT CCG GNG -3'		
COMPLEMENT	5'- CNC CGG AGG TNG TGC AGA AGA CNA -3'		
LENGTH	24		
GC CONTENT	60.4%		
MELT TEMP RANGE	MIN	MEAN	MAX
	59.3 °C	63.6 °C	67.2 °C

Gambar 21. Nilai TM dan %GC dari F3 hasil analisis Idt

Results

RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- ATG ATG TAC CAR CAA GGT TGC TTC GCC G -3'		
COMPLEMENT	5'- CGG CGA AGC AAC CTT GYT GGT ACA TCA T -3'		
LENGTH	28		
GC CONTENT	51.8%		
MELT TEMP RANGE	MIN	MEAN	MAX
	62.9 °C	63.7 °C	64.5 °C

Gambar 22. Nilai TM dan %GC dari F4 hasil analisis Idt

Results

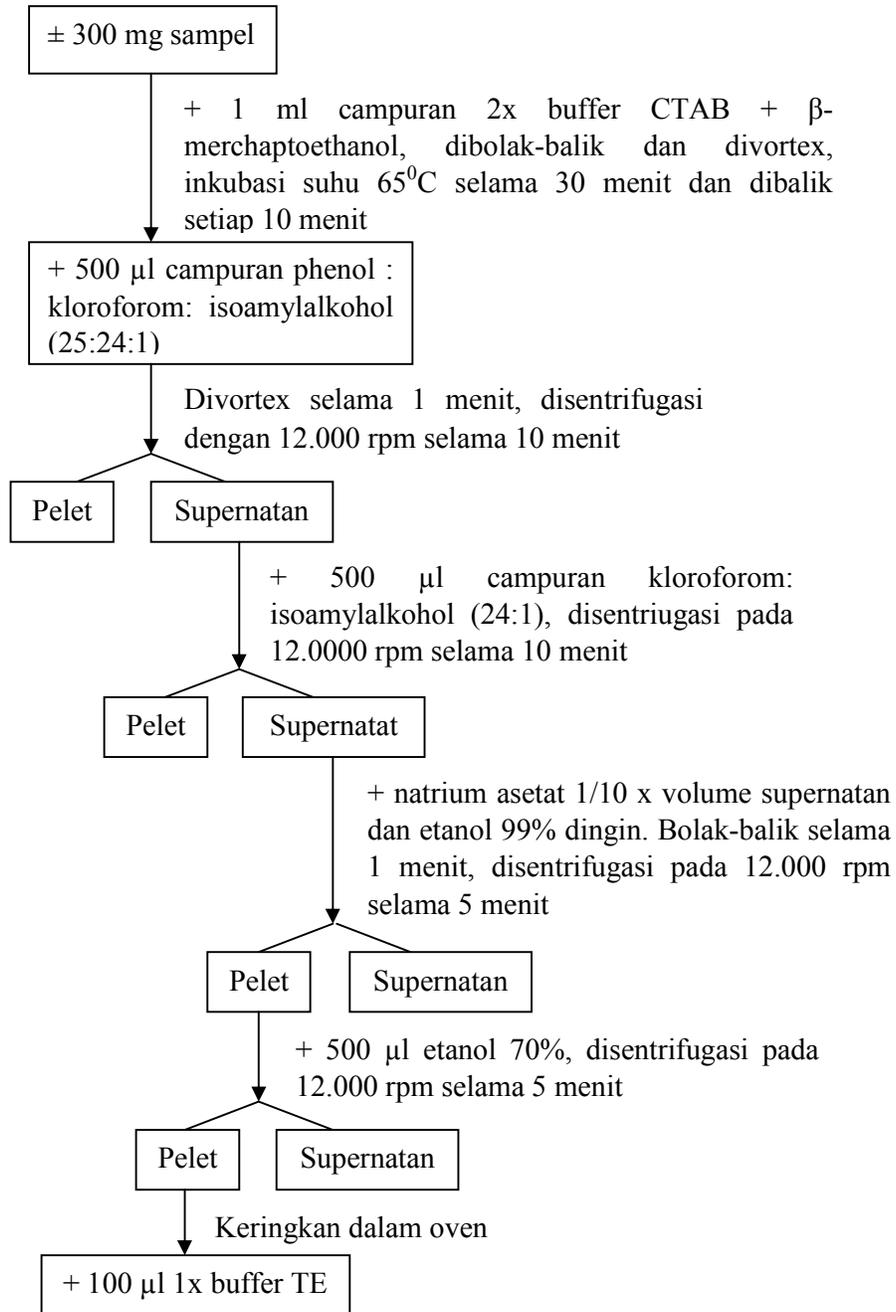
RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT -3'		
COMPLEMENT	5'- ACS ACH GGW GAR GGS TTG GAN TGG -3'		
LENGTH	24		
GC CONTENT	59.7%		
MELT TEMP RANGE	MIN	MEAN	MAX
	60.8 °C	63.6 °C	67.1 °C

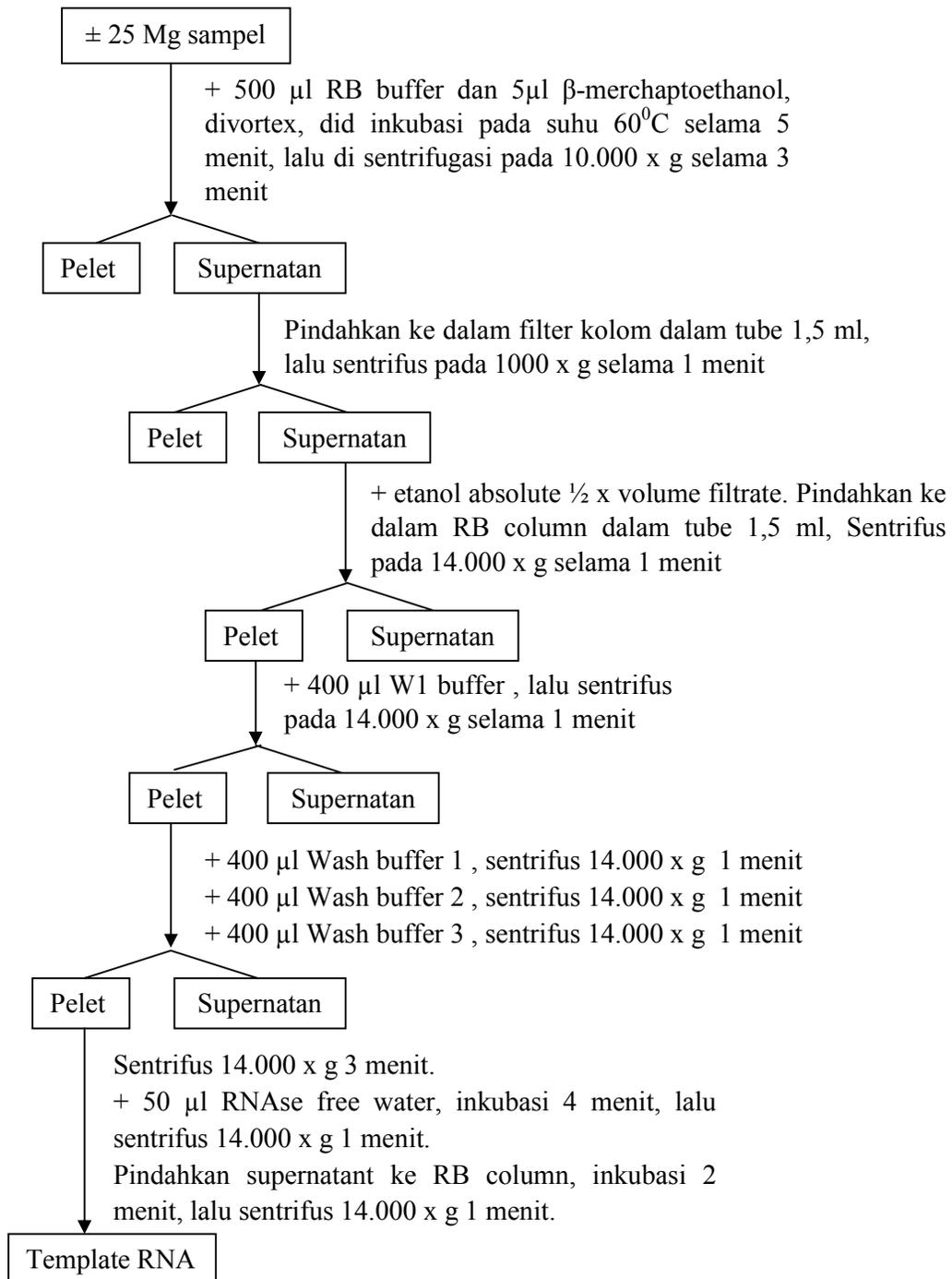
Gambar 23. Nilai TM dan %GC dari R1 hasil analisis Idt

Lampiran 7. Skema isolasi DNA daun gambir



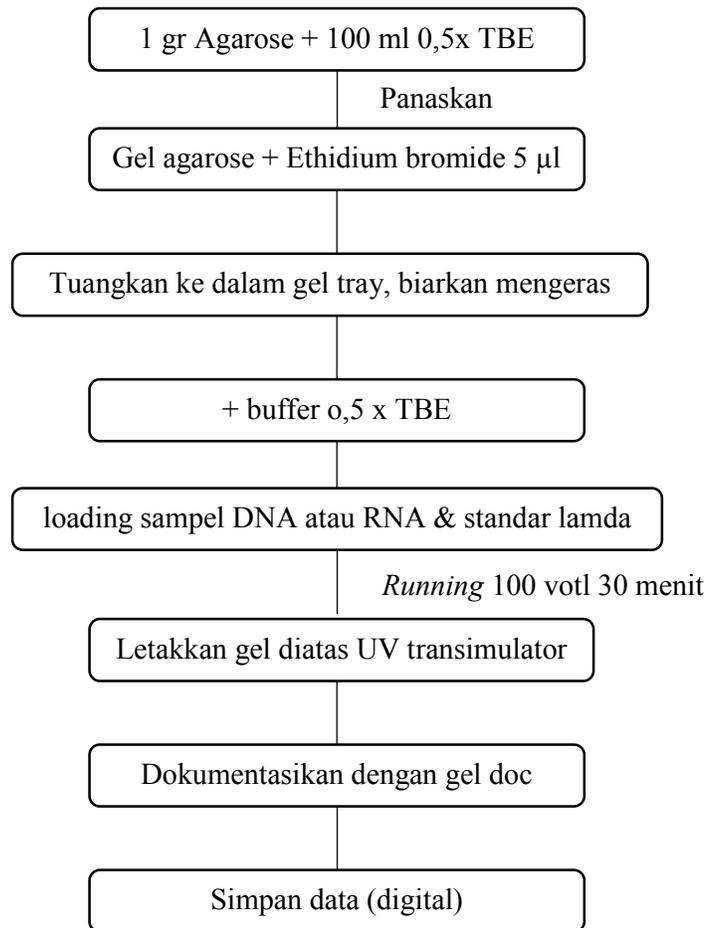
Gambar 24. Skema isolasi DNA daun gambir

Lampiran 8. Skema isolasi RNA daun gambir



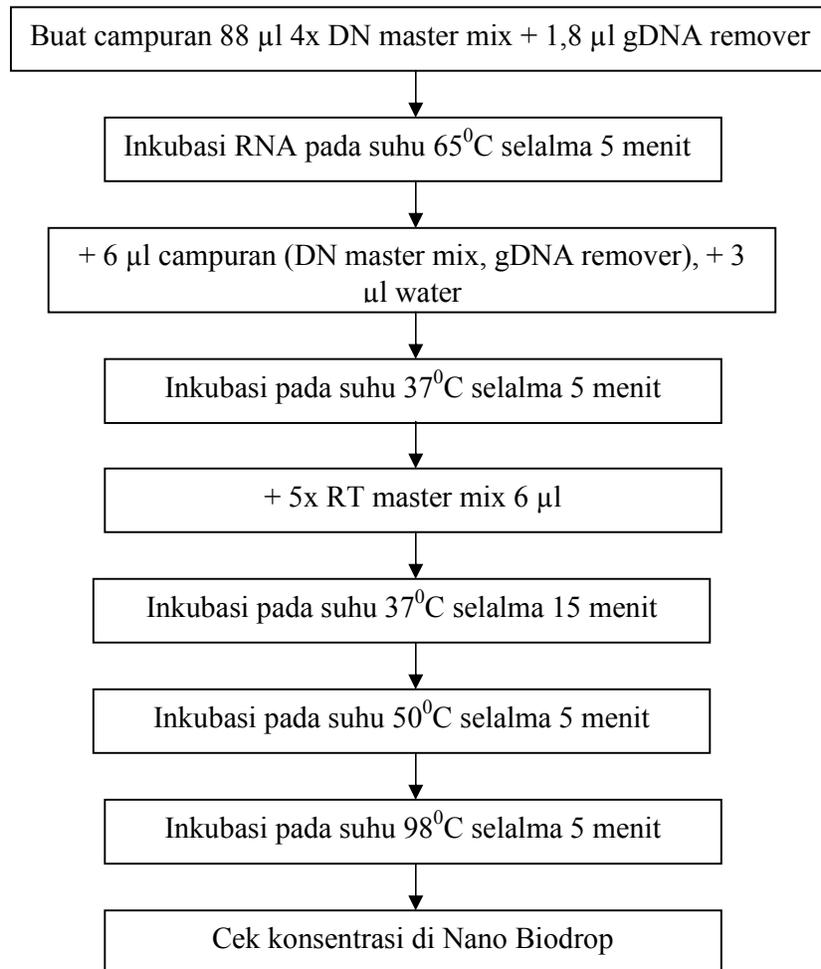
Gambar 25. Skema isolasi RNA daun gambir

Lampiran 9. Skema elektroforesis



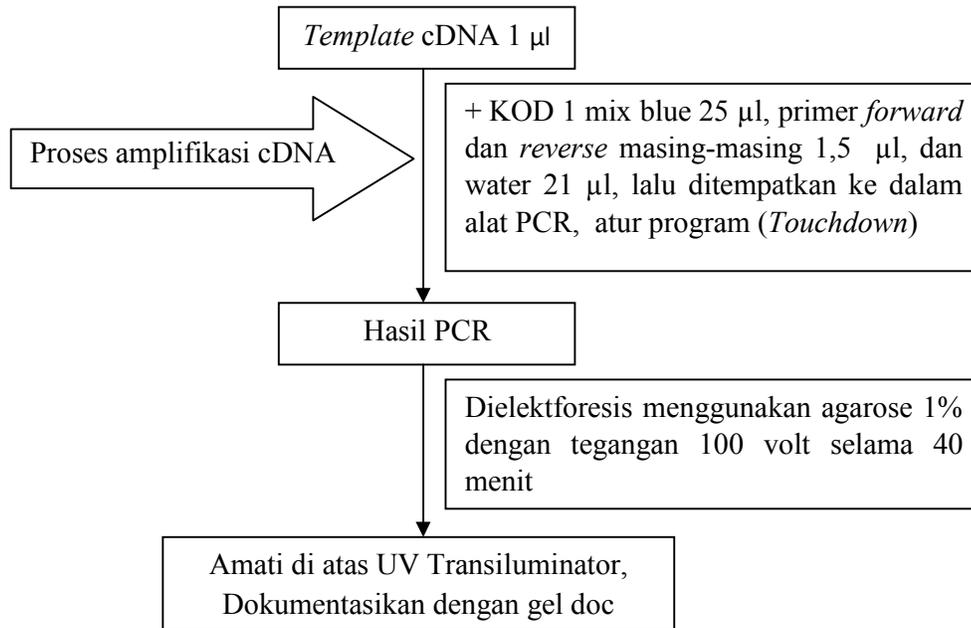
Gambar 26. Skema elektroforesis

Lampiran 10. Skema Sintesis cDNA



Gambar 27. Skema sintesis cDNA

Lampiran 11. Skema Amplifikasi PCR dan Elektroforesis



Gambar 28. Skema amplifikasi PCR dan elektroforesis