

**BASELANG**

Jurnal Ilmu Pertanian, Peternakan, Perikanan dan Lingkungan
e-journal.faperta.universitasmuarabungo.ac.id

Desain Primer dan Deteksi Gen CHS (*Chalcone Synthase*) pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) Tipe Riau Mancik

Primer Design and Detection of Chalcone Synthase (CHS) Gene in Riau Mancik Type of Gambir Plant (Uncaria gambir (Hunter) Roxb.)

Bastian Nova^{1*}, Epi Supri Wardi², Miftahur Rahmi³, Fadillatul Zikri²

¹Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Andalas,

²Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Perintis Indonesia, ³Program Studi Tadris Biologi Fakultas Tarbiyah dan Keguruan Universitas Islam Negeri Sulthan Taha Saifuddin Jambi.

Article Info

Keywords : *Chalcone synthase*, DNA, Gambir, Katekin, PCR

Email Penulis Korespondensi:
bastiannova@ae.unand.ac.id

¹Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Kampus Limau Manis, Universitas Andalas, Sumatera Barat, Indonesia

²Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Perintis Indonesia, Sumatera Barat, Indonesia

³Program Studi Tadris Biologi, Fakultas Tarbiyah dan Keguruan, Universitas Islam Negeri Sulthan Taha Saifuddin, Jambi, Indonesia

ABSTRAK

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

Kata kunci: *Chalcone synthase*, DNA, Gambir, Katekin, PCR.

ABSTRACT

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

degenerative primers with 4 forward primers and 2 reverse primers. The primer that has a binding site with the results of DNA isolated is the primer pair of A1F and C1R produces a product with an estimated 724 bp.

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

PENDAHULUAN

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

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

Ekstrak tanaman gambir mengandung beberapa senyawa flavonoid yaitu katekin (7-33%), pirokatekol (20-30%), kuersetin (2-4%) (Parkash *et al.*, 2007). Menurut (Balentine *et al.*, 1997). Katekin merupakan komponen terbanyak dalam tanaman gambir dan sangat bermanfaat dalam dunia farmasi antara lain untuk pembuatan obat-obatan hipertensi B, obat antidiare dan obat kumur (Gerhard, 2004). Selain itu kandungan katekin juga dimanfaatkan sebagai antioksidan sehingga potensial dijadikan minuman fungsional yang

baik bagi kesehatan (Dharma, 1985). Kandungan katekin merupakan parameter dalam menentukan mutu gambir. Dimana karakteristik mutu gambir tidak hanya didasarkan pada mutu fisik tetapi juga mutu kimianya (Gumbira *et al.*, 2009).

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

Katekin disintesa melalui jalur fenilpropanoid dan flavonoid. Salah satu enzim yang berperan penting dalam mengkatalisis langkah pertama jalur fenilpropanoid menuju flavonoid adalah CHS (*Chalcone synthase*) (Wang *et al.*, 2017). Dimana pada awal jalur biosintesis flavonoid enzim CHS (*Chalcone synthase*) melakukan kondensasi satu molekul 4-coumaroyl-CoA dan tiga molekul malonyl-CoA untuk menghasilkan narigenin chalcone (Stafford, 1990). Ada korelasi yang kuat antara ekspresi gen CHS dan kandungan flavonoid di banyak tanaman (Kamiishi *et al.*, 2012; Morita *et al.*, 2012; Dare *et al.*, 2013). Selain itu CHS (*Chalcone synthase*) merupakan enzim yang berpengaruh dalam banyak proses fisiologis termasuk, pengembangan buah/benih,

Baselang, Vol. 4. No. 1

pigmentasi bunga, penyerbukan dan ketahanan terhadap tekanan biotik dan abiotik pada tanaman (Dao *et al.*, 2011).

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

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

METODOLOGI

Pengambilan Sampel

Kegiatan pengambilan sampel gambir tipe Riau Mancik diambil di Siguntur, Kabupaten Pesisir Selatan. Bagian tanaman yang diambil

yaitu bagian pucuk daun muda tanaman gambir.

Identifikasi Morfologi di Herbarium

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

Desain Primer Degeneratif

Pada tahapan pendisainan primer degeneratif diawali dengan membuka situs NCBI (National Center for Biotechnology Information), setelah itu mencari sekuen gen tanaman yang mengandung gen CHS (*Chalcone synthase*), data-data yang terdapat pada NCBI (National Center for Biotechnology Information) disimpan dalam bentuk FASTA. Setelah dilakukan *multialignment* kemudian primer disusun dengan menggunakan penyusun sekuen primer menurut IUPAC seperti yang terdapat pada **Tabel 1**. Setelah primer disusun dengan menggunakan penyusun primer menurut IUPAC kemudian dilihat apakah desain primer tersebut sesuai dengan syarat yang dapat dilihat pada *software* IDT, selanjutnya dimasukkan sekuen primer yang telah di desain. Primer yang disintesis kemudian diuji terhadap DNA hasil isolasi, dengan melakukan optimasi pada suhu annealingnya.

Tabel 1. Simbol yang digunakan dalam penyusunan sekuen primer degeneratif menurut IU

Lambang	Basa/nukleotida	Lambang	Basa/Nukleotida
A	<u>A</u> denosine	M	A C (a <u>M</u> ino group)
C	<u>C</u> ytosine	S	G C (<u>S</u> trong interaction)
G	<u>G</u> uanine	W	A T (<u>W</u> weak interaction)
T	<u>T</u> hymine	B	G T C (bukan A) (<u>B</u> setelah A)
U	<u>U</u> racil	D	G A T (bukan C) (<u>D</u> setelah C)
R	G A(<u>puR</u> ine)	H	A C T (bukan G) (<u>H</u> setelah G)
Y	T C(<u>pY</u> rimidine)	V	G C A (bukan T, bukan U) (<u>V</u> setelah U)
K	G T(<u>K</u> etone)	N	A G C T (<u>zN</u> y)

Sumber: (Jamsari, 2013)

Isolasi DNA

DNA diisolasi menggunakan metode CTAB yang dikembangkan oleh (Doyle dan Doyle, 1987) dengan sedikit modifikasi oleh

(Fadli, 2016) pada bagian jumlah dan waktu yang digunakan. DNA diisolasi dari daun muda (pucuk) tanaman gambir. Sebanyak 1 lembar daun digerus dengan mortal sampai

Baselang, Vol. 4. No. 1

halus, lebih cepat lebih baik. Sekitar 400 mg jaringan yang sudah digerus dimasukkan ke dalam *tube eppendorf* 2 ml yang steril. Ditambahkan 1 ml 2x buffer ekstraksi CTAB + β -Mercaptoethanol 1% dan dibolak-balik. Divortex sampai semuanya tercampur rata, kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dan dibolak-balik setiap 10 menit sekali. Ditambahkan 500 μ l Campuran Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1) kemudian diratakan dengan cara membolak-balik selama 1 menit. Disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Dilakukan pemisahan supernatan ke dalam *tube eppendorf* 2 ml yang baru dan steril. Ditambahkan 500 μ l chloroform: isoamilalkohol (24:1) tabung dibolak-balik selama 10 menit, dilakukan sentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke *tube eppendorf* 1,5 ml baru yang steril dan ditambahkan 1/10 kali volume larutan natrium asetat dan 1 ml ethanol 99% dingin, kemudian tabung dibolak balik selama 1 menit sampai terlihat benang-benang halus. Untuk mendapatkan DNA pada dasar *tube eppendorf* dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Larutan dibuang dan pelet DNA dicuci dengan 500 μ l ethanol 70% dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, larutan etanol dibuang. DNA dikeringkan pada suhu ruang di atas tissue. Dilarutkan kembali dengan 1x Buffer TE dan disimpan sebagai stok pada suhu -20°C.

Elektroforesis

Metode yang digunakan untuk identifikasi, pemisahan, dan purifikasi fragmen DNA adalah menggunakan gel agarosa 1%. 1 gr agarose ditimbang dan ditambahkan 100 ml 0,5x TBE dan dimasukkan ke dalam botol Shcott. Dimasak menggunakan microwave dengan suhu medium hight selama 1,5 menit.

Tutup botol Scott harus dalam keadaan longgar saat dimasak, proses pemasakan dilakukan sampai Agarose benar-benar mencair (larut). Gel tray, Comb 8 slot, dan penghambat gel dipasang, yang akan digunakan selama running DNA. Gel agarose yang masih mencair ditambahkan ethidium bromide sebanyak 5 μ l (10 mg/ml), diaduk sampai merata dengan menggunakan batang pengaduk. Agarosa dituangkan ke dalam gel tray dan dibiarkan sampai mengeras pada lemari asam sekitar 30 menit. Selagi menunggu gel membeku atau padat cocktail elektroforesis disiapkan. Pembuatan cocktail elektroforesis terdiri dari marker standar lamda 1 μ l dan 2 μ l bpb, sampel DNA masing-masing 2 μ l. Pada lamda DNA dan sampel DNA ditambah 10x BPB sebanyak 1 μ l.

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

PCR dan Elektroforesis

Setelah primer disusun dan disintesis, kemudian dilakukan kegiatan amplifikasi DNA yang telah diisolasi dengan reaksi pada **Tabel 2**. Amplifikasi menggunakan primer degeneratif hasil desain dilakukan dengan teknik PCR Gradient (Biometra- Jerman) dengan pengaturan sesuai pada **Tabel 3**.

Baselang, Vol. 4. No. 1

Tabel 2. Coctail PCR untuk amplifikasi DNA

<i>KOD I mix blue</i>	25 μ l
<i>Primer forward</i>	1,5 μ l (kosentrasi 10 pmol/ μ l)
<i>Primer reverse</i>	1,5 μ l (kosentrasi 10 pmol/ μ l)
<i>DNA template</i>	8,2 μ l
<i>Water (ddH₂O)</i>	13,8 μ l
<i>Volume akhir</i>	50 μ l

Tabel 3. Kondisi PCR untuk amplifikasi fragmen

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

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Primer degeneratif merupakan primer yang sekuenya memiliki basa-basa selain dari basa penyusun nukleotida DNA (Jamsari, 2013). Primer degeneratif yang digunakan didesain secara manual. Primer yang digunakan terdiri atas 2 primer yakni primer *forward* dan primer *reverse*. Primer *forward* merupakan oligonukleotida yang memiliki sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat. Sedangkan primer *reverse* merupakan oligonukleotida yang memiliki sekuen identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 3'-OH (Yuwono, 2006).

Perancangan primer perlu memperhatikan syarat dan kriteria primer yang

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

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

Baselang, Vol. 4. No. 1

Pendisainan primer degemerartif dimulai dari mencari sekuen gen CHS pada tanaman yang di akses di *gene bank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Kemudian 21 data tanaman yang mengandung sekuen gen CHS di BLAST dan disimpan dalam bentuk FASTA. Sekuen-sekuen gen

yang digunakan untuk mendesain primer ini dapat dilihat pada **Tabel 4**. Selanjutnya dilakukan *multialignment* dengan menggunakan program Clustal W dari software BioEdit. Semua data sekuen yang berkaitan dengan sekuen gen CHS di *alignment* menggunakan bantuan program ini.

Tabel 4. Hasil desain primer gen CHS (Chalcone synthase)

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

Hasil dari *multialignment* diperoleh 4 primer *forward* (A1F, B3F, B1F, B2F) dan 2 primer *reverse* (C1R dan A1R) yang akan digunakan pada kegiatan amplifikasi DNA gen CHS menggunakan mesin PCR. Pemilihan primer ini memperhatikan Tm dan persen GC antara primer *forward* dan primer *reverse* serta

daerah lestarinya. Pendisainan primer *forward* didisain dari sekuen yang berada pada posisi awal dari *multialignment*, sedangkan pendisainan primer *reverse* didisain pada posisi akhir dari *multialignment* sehingga deretan antara primer *forward* dan primer *reverse* merupakan estimasi produk yang nantinya dihasilkan dari kegiatan amplifikasi

Baselang, Vol. 4. No. 1

PCR penyandi gen CHS. Dari nilai estimasi produk yang diperkirakan tersebut juga dapat dijadikan sebagai tolak ukur keberhasilan dari kegiatan amplifikasi penyandi gen CHS selain dari ada tidaknya *binding site* dan perbandingan konsentrasi antara primer dengan DNA *template*. Primer yang telah didisain tersebut memiliki basa-basa degeneratif seperti, S, Y, R, C, D, hal ini dikarenakan pada daerah tersebut terdapat banyak perbedaan basa. Sehingga mengharuskan mengganti basa-basa yang tidak sama tersebut dengan basa degeneratif pada setiap primer degeneratif yang dikeluarkan IUPAC. Basa-basa degeneratif tersebut diharapkan agar basa pengganti yang terdapat pada primer dapat menempel pada *template* sehingga memperbesar kemungkinan primer menempel pada *binding site* nya. Melalui analisis menggunakan IDT (*Integrated DNA Technologies*) hasil pendisainan primer telah memenuhi kriteria primer yang baik.

Setelah primer didesain, dilakukan kegiatan isolasi DNA genom tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.). Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Corkill & Rapley, 2008; Dolphin, 2008). Kegiatan isolasi DNA diawali dengan mempersiapkan sampel yaitu bagian pucuk daun muda tanaman gambir yang diambil dari Kabupaten Pesisir Selatan tepatnya di Siguntur. Pucuk yang digunakan dalam keadaan segar yang disimpan di kantong plastik didalam box styrofoam yang diberi es batu guna menjaga kesegaran serta memudahkan dalam proses transportasi. Menggunakan bagian pucuk tanaman gambir bertujuan untuk mempermudah dalam kegiatan penggerusan. Hal ini dikarenakan pucuk tanaman gambir merupakan bagian terlunak dari jaringan tanaman gambir. Menurut Jamsari (2007), salah satu hal yang harus diperhatikan dalam kegiatan isolasi DNA adalah efektifitas isolasi, karena jaringan-jaringan tanaman tertentu memiliki spesifitas struktur fisikokimia yang berbeda-beda.

Terlalu lama didalam proses penggerusan akan mengaktifkan enzim DNase sehingga akan menguraikan molekul-molekul DNA. Apabila menggunakan bagian jaringan yang keras ataupun jaringan tua akan membutuhkan waktu yang lama dalam penggerusan.

DNA diisolasi menggunakan metode CTAB yang dikembangkan oleh (Doyle dan Doyle, 1987) dengan sedikit modifikasi oleh (Fadli, 2016). CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA genom tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol (Lumaret *et al.*, 1998). Ada tiga tahapan proses isolasi DNA yaitu proses pemecahan (lisis), ekstraksi dan presipitasi. Pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan dari awal isolasi DNA yang bertujuan untuk mengeluarkan isi sel (Holme dan Hazel, 1998). Proses lisis dengan menggunakan CTAB sering dipakai untuk melisis membran sel pada isolasi DNA tumbuhan (Bettelheim & Landesberg, 2007). Dalam Kegiatan ini pemecahan sel dilakukan secara mekanis yaitu dengan melakukan penggerusan dan proses lisis dengan 2x CTAB. Dalam penggunaan buffer CTAB sering kali ditambahkan 2-mercaptoethanol yang berfungsi untuk menghilangkan kandungan senyawa polifenol dalam sel tumbuhan. Larutan 2-mercaptoethanol dapat menghilangkan polifenol dalam sel tanaman dengan cara membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa polifenol yang kemudian akan terpisah dengan DNA (Lodhi *et al.*, 1994). Senyawa polifenol perlu dihilangkan agar diperoleh kualitas DNA yang baik. Polifenol juga dapat menghambat reaksi dari enzim Taq polimerase pada saat dilakukan amplifikasi. Disamping itu polifenol akan mengurangi hasil ekstraksi DNA serta mengurangi tingkat kemurnian DNA (Porebski *et al.*, 1997).

Pada tahapan ekstraksi DNA terjadi deproteinase dengan menambahkan Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:4:1). Fenol digunakan sebagai pendenaturasi protein, ekstraksi dengan menggunakan fenol menyebabkan protein kehilangan kelarutannya dan mengalami presipitasi yang selanjutnya dapat dipisahkan dari DNA melalui

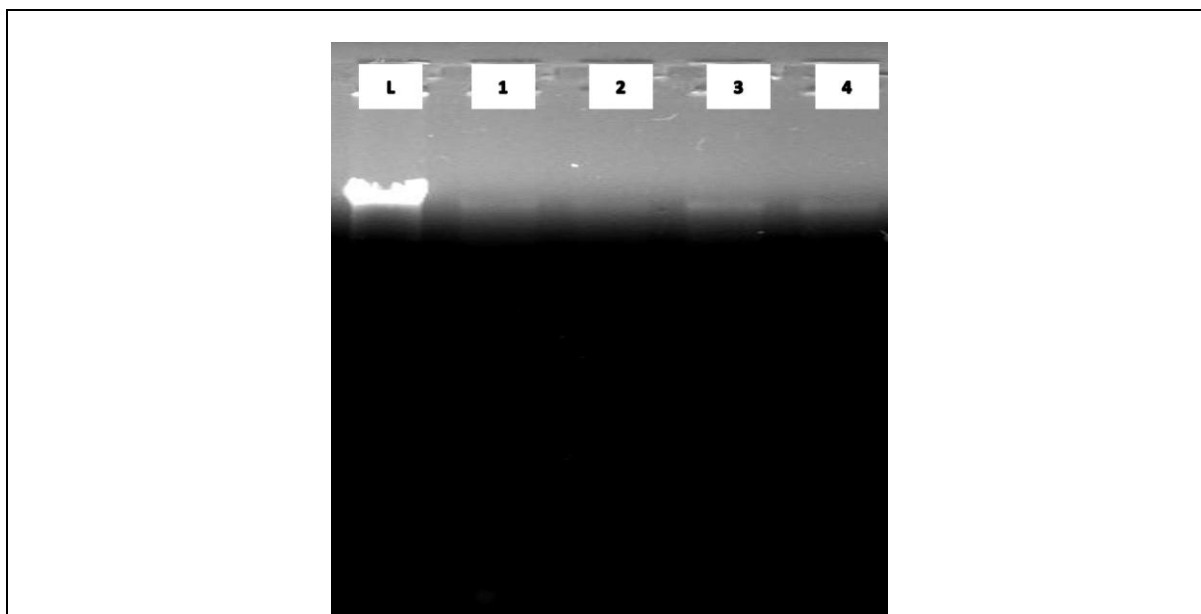
Baselang, Vol. 4. No. 1

sentrifugasi (Karp, 2008). Sedangkan Kloroform tidak dapat bercampur dengan air dan kemampuannya untuk mendeproteinisasi berdasarkan kemampuan rantai polipeptida yang terdenaturasi untuk masuk atau ke dalam fase antara kloroform – air.

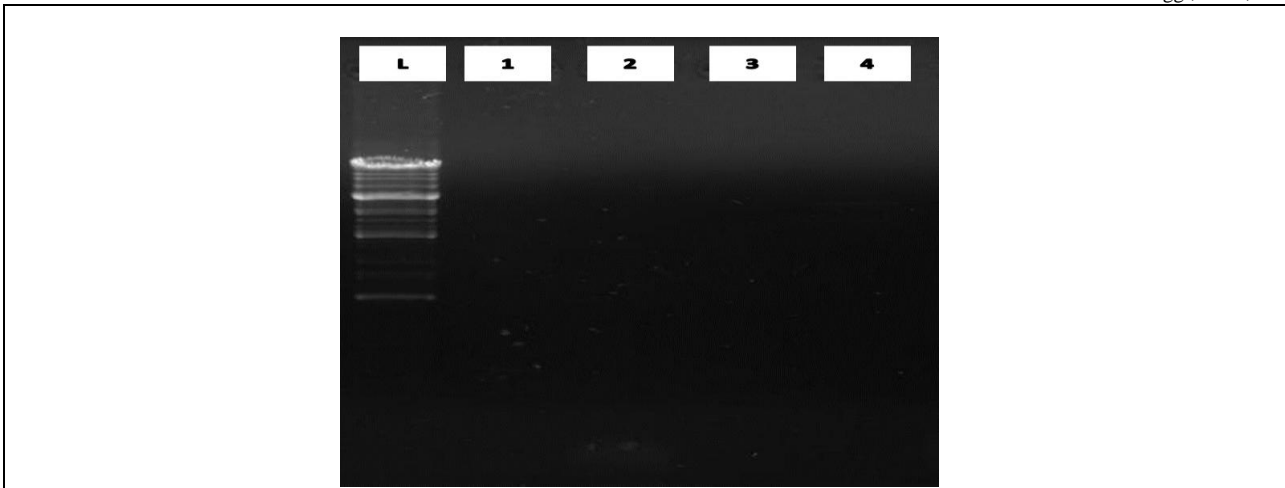
Proses ini dapat dilakukan dengan membentuk emulsi dari air dan kloroform dengan sentrifugasi. Isoamil alkohol berfungsi sebagai emulsifier dapat ditambahkan ke kloroform untuk membantu pembentukan emulsi dan meningkatkan luas permukaan kloroform-air yang mana protein akan mengalami presipitasi (Surzycki, 2000). Untuk memekatkan DNA dilakukan proses presipitasi dengan menggunakan etanol absolut yang bertujuan untuk mempresipitasi DNA dan menggumpalkan sehingga terbentuk pelet setelah dilakukan sentrifugasi (Surzycki, 2000). Pada tahapan ini, DNA yang terpresipitasi akan terpisah dari residu-residu RNA dan protein yang masih tersisa.

DNA *template* hasil isolasi tersebut selanjutnya dielektroforesis untuk melihat keberhasilan dari proses isolasi. Elektroforesis merupakan pergerakan zat akibat adanya pengaruh medan listrik. Salah satu gel yang

dapat digunakan adalah gel agarose. gel tersebut berfungsi memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Pada pembuatan gel agarose ditambahkan *ethidium bromide* yang bertujuan agar hasil isolasi DNA dapat teramati secara visual. Etidium bromida akan menyisip ke dalam DNA sehingga apabila dilihat di bawah sinar UV pita-pita DNA menjadi terlihat karena etidium bromida akan memendarkan sinar UV. Sampel DNA memerlukan loading buffer sebelum dimasukkan ke dalam sumur, loading buffer ini berfungsi sebagai pewarna dan meningkatkan densitas sampel sehingga fragmen tersebut berada di dasar sumur dan tidak menyebar. Marker atau penanda yang digunakan pada elektroforesis merupakan campuran molekul dengan ukuran berbedabeda yang digunakan untuk menentukan ukuran molekul dalam pita sampel (Clark & Cristopher, 2008). Kemudian di *running* dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Hasil isolasi dapat dilihat pada **Gambar 1**.



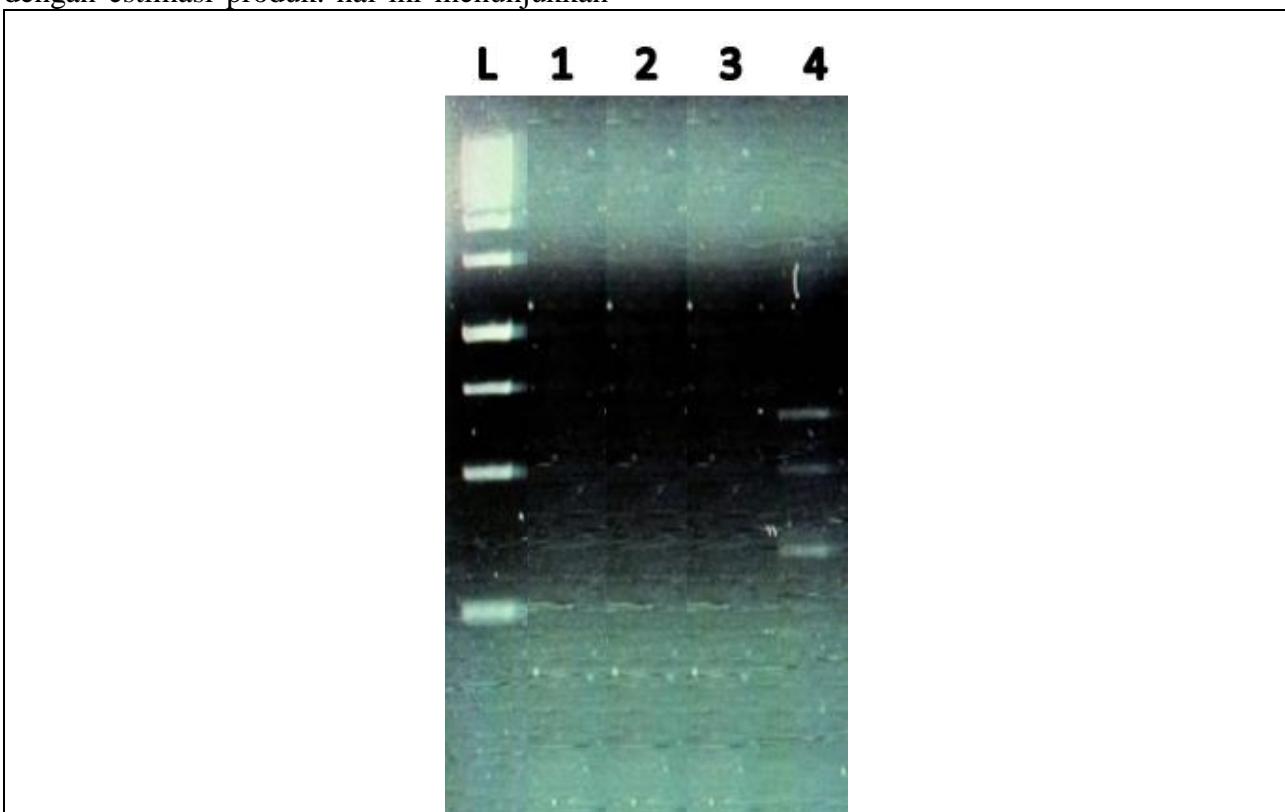
Gambar 1. Hasil isolasi DNA tanaman gambir tipe Riau Mancik; L: Standar (lambda), 1-4:Ulangan Sampel DNA gambir tipe riau mancik.



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA tanaman gambir tipe Riau Mancik; L: Standar (Lambda), 1: A1F-A1R, 2: B3F-A1R, 3: B1F-A1R, 4: B2F-A1R.

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

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



Gambar 3. Hasil amplifikasi CHS;L: Standar (Lambda), 1: B3F-C1R, 2: B1F-C1R, 3: B2F-C1R, 4: A1F-C1R.

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

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa, didapatkan 8 pasangan primer degeneratif untuk mengisolasi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik. Pasangan primer A1F dengan C1R merupakan kombinasi primer yang paling bagus hasilnya. Pasangan primer degeneratif A1F dan C1R dapat mendeteksi gen CHS (*Chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) tipe Riau Mancik menghasilkan produk dengan estimasi sebesar 724 bp.

DAFTAR PUSTAKA

Balentine DA, Wiseman SA, B. L. 1997. The Chemistry of Tea Flavonoids. *CRIR Rev Food Sci Nutr*, 37(8), 693–704.

BPOM RI. 2007. *Acuan Sediaan Herbal Volume Ketiga Edisi Pertama*. Jakarta: Direktorat Jenderal Penhawasan Obat dan Makanan.

Chuanhong Wang, Shuang Zhi, Changying Liu, Fengxiang Xu, Aichun Zhao, Xiling Wang, Xing Tang, Zhengang Li, P. H., & Maode, Y. 2017. *Isolation and characterization of a novel chalcone synthase gene family from mulberry*.

Dao, T.T.H.; Linthorst, H.J.M.; Verpoorte, R. 2011. *Chalcone synthase and its functions in plant resistance*. 10, 397.

Dare AP, Tomes S, Jones M, McGhie TK, Stevenson DE, Johnson RA, G., & DR, H. R. 2013. Phenotypic changes

associated with RNA interference silencing of chalcone synthase in apple (*Malus × domestica*). *Plant J*, 74, 398–410.

- Denian, Irfan, A.J.P. Tamsin, & B. 2000. *Teknologi Budidaya dan Pengolahan Gambir*. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sukarami.
- Dharma AP. 1985. *Tanaman Obat Tradisional Indonesia*. Jakarta: PN Balai Pustaka.
- Dolphin, W. D. 2008. *Biological Investigations*.
- Doyle, J. J. and J. L. D. 1987. *Isolation of Plant DNA from Fress Tissue*. 13–15.
- Fadli, M. 2016. *Isolasi Gen Dfr (Dihydroflavonol 4-Reductase) Pada Tanaman Gambir (Uncaria Gambir (Hunter) Roxb.) Berbasis Pcr (Polymerase Chain Reaction)*. Universitas Andalas Padang.
- Ferita, I. 2011. *Studi Hubungan Karakter Morfologi, Anatomi, dan Molekuler Terkait Potensi Kadar Katekin Pada Tanaman Gambir (Uncaria gambir(Hunter) Roxb)*. Padang: Disertasi Fakultas Pertanian Universitas Andalas.
- Gaffar, S. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Bandung: Universitas Padjajaran.
- Gerhard L. 2004. *Advances in Chemistry and Bioactivity of the Genus Uncaria Phytotherapy Research*.
- Gumbira et al. 2009. *Agroindustri dan Bisnis Gambir Indonesia*. IPB Press. Bogor, 118 hal.
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. 2000. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Unitas.
- Hapsari, A., & Misrianti, R. 2007. *Gen Cytochrome b sebagai Penanda Molekuler untuk Mendeteksi Cemaran Daging Tikus pada Bakso* (L. P. B. Molekuler, Ed.). Bogor: Lembaga Penelitian Institut Pertanian Bogor.
- Haryanto, S. 2009. *Ensiklopedia Tanaman Obat Indonesia*. Yogyakarta: Palmall.
- Jamsari. 2007. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Amplifikasi Analisis Molekuler*. Pekanbaru: Unri Press.
- Jamsari. 2013. *Rekayasa Genetika untuk Analisa Genom dan Produksi*

Baselang, Vol. 3. No. 2

- Organisme Transgenik*. Riau: UR Press.
- Kamiishi Y, Otani M, Takagi H, Han DS, Mori S, Tatsuzawa F, O. H., & Kobayashi H, N. M. 2012. Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene. *Mol Breed*, 30, 671–680.
- Kwon, C., Daham, J., & Jung, S. 2011. *Chiral Separation of Catechin by Capillary Electrophoresis with α -cyclophorooctadecaose Isolated from Rhodobacter Sphaeroides as Chiral Selectors*. Vol 32 No. (Korean Chem Soc).
- Langga, I, F., M, Restu., T, K. 2012. *Optimasi Suhu dan Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitti (Vitex cofassus Reinw.) Serta Analisa Keragaman Genetik dengan Teknik RAPD-PCR*. 3, 265 – 276.
- Luh Ketut Budi Maitriani, I Nengah Wirajana, S. C. Y. 2015. DesainPrimer untuk amplifikasi Fragmen Gen inhA Isolat 134 Multidrug resistance Tuberculosis(MDR-TB) denfan Metode PCR. *Cakra Kimia*, 3.
- Lumaret, R., H. Michaud, J.P. Ripoll, and L. T. 1998. *Chloroplast DNA extraction procedure for species high in phenolics and polysaccharides*. In A. Karp, P.G.
- Mardiswojo, S. dan H. R. 1968. *Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang Cetakan ke 2*. Jakarta: Depkes RI.
- Morita Y, Saito R, Ban Y, Tanikawa N, Kuchitsu K, Ando T, Yoshikawa M, N., & M. 2012. Tandemly arranged chalcone synthase A genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia hybrida*. *Plant J*, 70, 739–749.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika Edisi kedua*. Bogor: IPB press.
- Nazir, N. 2000a. *Budidaya, Pengolahan dan Prospek Diversifikasinya* (Gambir). Penerbit Hutanku.
- Nazir, N. 2000b) *Gambir Budidaya Pengolahan dan Prospek Diversifikasinya*. In *Yayasan Hutanku*. Padang: Yayasan Hutanku.
- Nazir, N. 2000c. *Gambir Budidaya Pengolahan dan Proyek Difraksi*. Padang: Yayasan Hutanku.
- Parkash A, Rigelhof F, M. E. 2007. Antioxidant Activity. Retrieved April 16, 2016, from Medallion Labs website: <http://medallionlabs.com/>
- Pharmawati, M. 2009. Optimization of DNA Extraction and PCR-RAPD Condition of *Grevillea* spp. (Proteaceae). *ISSN*, 1410 5292.
- Sahilah, A.M., Mohd. Fadly, L., Norrakiah, A.S. Aminah, A., Wan Aida, W. M. Ma'ruf, A.G & Mohd. Khan, A. (2012). Halal Market Surveillance of Soft and Hard Gel Capsules in Pharmaceutical Products using PCR and Southern-Hybridization on The Biochip Analysis. *International Food Research Journal*, 19(1), 371–375.
- Sambrook J, Fritsch EF, M. T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. USA: CSH Laboratory Pr.
- Singh, V. K. A. A. K. 2001. PCR Primer Design. *Molecular Biology Today*, 2, 27–32.
- Stafford HA. 1990. *Pathway to proanthocyanidins (condensed tannins), flavan-3-ols and unsubstituted flavans* (Flavonoid). Boca raton, Florida: CRC Press.
- Stanfield, DW., Jaimes SC., Raul, J. 2003. *Biologi Molekuler dan Sel*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Suherdi, A., D. & H. S. 1991. budidaya dan pasca panen gambir serta permasalahannya. *Biro Bina Pengembangan Sarana Perekonomian, Dati I Sumbar. Padang*.
- Viljoen GJ, Nel LH, C. J. 2005. *Molecular Diagnostic PCR Handbook* (Dordrecht (NL), Ed.). Springer.
- Wang Y, Gao L, Wang Z, Liu Y, Sun M, Yang D, Wei C, Shan Y, X. T. 2012. Lightinduced expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthetic pathways in callus of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Scientia Hort*, 133, 72–83.

Baselang, Vol. 3. No. 2

- Windiastika, G. 2012. *Metode Uji Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa*. Surabaya: Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan.
- Yuwono T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta: Penerbit Andi.
doi.org/10.3390/ijms17020261