

Desain Primer Dan Deteksi Gen Chs (*Chalcone Synthase*) pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) Tipe Udang

Epi Supri Wardi^{1,2}, Verawati¹, Atika Irma Juita¹, Bastian Nova^{3*)}

¹Prodi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Perintis Indonesia

²Mahasiswa Program Doktorat, Prodi Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas

³Prodi Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Andalas

*)E-mail: bastiannova@ae.unand.ac.id

Info Artikel

Sejarah Artikel :

Diterima : 19.11.2023

Disetujui : 29.11.2023

Dipublikasikan :

30.11.2023

Kata Kunci:

Gambir, Katekin,
Chalcone Synthase

Keywords:

Gambir, Catechins,
Chalcone Synthase

Abstrak

Latar belakang: Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) merupakan tumbuhan asli Asia Tenggara terutama pulau Sumatera dan dibudidayakan terutama di daerah Sumatera Barat. Gen CHS (*Chalcone synthase*) merupakan salah satu enzim kunci yang terlibat dalam biosintesa katekin pada tanaman gambir. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan primer yang dapat digunakan dalam deteksi gen CHS (*chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) tipe Udang, serta untuk melihat apakah primer yang telah didesain dapat mendeteksi gen CHS (*chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) tipe Udang. **Metode:** Tahapan penelitian ini meliputi pendesainan primer spesifik dan primer degeneratif, isolasi DNA tanaman gambir dengan metode CTAB, PCR (*Polymerase chain reaction*) dan elektroforesis. **Simpulan dan saran:** Dari hasil penelitian didapatkan satu pasang kombinasi primer degeneratif yaitu : *forward* CHS-A1-F (5'-TNG TCT TCT GCA CAN CCT CCG GNG-3') dan *reverse* CHS-C1-R (5'-CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT-3') yang memberikan hasil amplifikasi yang sesuai dengan estimasi produk sebesar 724 bp. Sehingga pasangan primer tersebut dapat dijadikan pilihan primer untuk mendeteksi gen CHS pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) tipe Udang.

Abstract

Background: Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) is an original or native plant of Southeast Asia, especially Sumatra, this plant being cultivated in west Sumatra massively. CHS (*Chalcone synthase*) gene is a key enzyme that involved in catechins biosynthesis of Gambir plant. **Objectives:** The aim of this research is to obtain the Primer that can be used on the detection of CHS (*Chalcone synthase*) gene of Udang type Gambir plant (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb), besides, the research also aims to see or revealed the Primer that has been designed can detect CHS (*Chalcone synthase*) gene of Udang type Gambir plant (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb). **Methods:** The stages of this research included, designing the Specific Primer and Degenerative Primer, isolating the DNA of Gambir plant by using CTAB method, PCR (*Polymerase chain reaction*) and electrophoresis. **Conclusions and suggestions:** Based on the result finding, it was found a pair of Primer Degenerative combination : *forward* CHS-A1-F (5'-TNG TCT TCT GCA CAN CCT CCG GNG-3') and *reverse* CHS-C1-R (5'-CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT-3') which gave an amplification result that matched with the estimate of the product, 724bp. So that, that Primer pair can be use as the primary choice to detect CHS gene of Udang type Gambir plant (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb).

PENDAHULUAN

Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) merupakan tumbuhan asli Asia Tenggara terutama pulau Sumatera dan dibudidayakan terutama di daerah Sumatera Barat (Badan POM RI, 2010). Fauza (2009) menyatakan, bahwa dari populasi tanaman gambir yang dibudidayakan petani di Siguntur Pesisir Selatan, terdapat empat tipe tanaman gambir, yaitu : Udang, Cubadak, Riau Gadang dan Riau Mancik. Dari tipe gambir tersebut menurut Hasan, *et al.*, (2000) di laporkan bahwa tipe Udang mempunyai tingkat produksi getah dan randemen hasil yang lebih tinggi dari tipe lainnya.

Namun sampai saat ini masih banyak permasalahan yang dihadapi dalam pengembangannya, baik dari segi teknologi bercocok tanam, pengolahan pasca panen, perencanaan bisnis dan pemasaran serta aspek sosial ekonomi budaya. Hal ini terlihat jelas dari 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 (Nazir, 2000). Sedangkan menurut (Gumbira, S.E *et al.*, 2009) dalam pemanfaatan gambir, karakteristik mutu gambir tidak hanya didasarkan pada mutu fisik tetapi juga mutu kimianya. Kandungan katekin sebagai komponen utama pada gambir menjadi syarat utama dalam menentukan mutu gambir.

Kandungan utama ekstrak gambir adalah katekin sekitar 7-33%, dan selain katekin ekstrak gambir mengandung bermacam-macam komponen, antara lain :Asam *kathechu* tannat 20-55% :*pyrokatechol* 20-30 %, gambir floresen 1-3 %, *katechu* merah 3- 5%, *quersetin* 2-4 %, *fixed oil* 1-2% dan wax 1-2 % (Azmi Dhalimi, 2006). Dalam bidang Farmasi katekin gambir banyak dimanfaatkan, penelitian yang dilakukan oleh (Rhayu, 2016) katekin gambir digunakan sebagai obat luka bakar, penelitian (Kusharyanto, 2004) hasil infusa Gambir mempunyai efek sebagai perangsang susunan urat syaraf otonom pada hewan coba, dan penelitian (Anggraini *et al.*, 2013) Ekstrak gambir di formulasi sebagai gel Antijerawat. Banyaknya manfaat katekin dari gambir maka perlu dilakukan usaha peningkatan kualitas dan mutu dari gambir sehingga didapatkan gambir dengan kadar katekin yang lebih tinggi.

Katekin disintesa melalui lintasan *phenyl-propanoid* dan flavanoid. *Chalcone synthase* (CHS) diduga merupakan enzim kunci yang terlibat dalam biosintesa katekin (Singh, R *et al.*, 2010). Pembentukan chalcone adalah titik masuk dari biosintesis katekin, dan ada tiga jenis enzim yaitu, fenilalanin amonia-lyase (PAL), sinamat 4-hidroksilase (C4H), chalcone synthase (CHS) terlibat dalam proses pembentukan katekin. Flavan-3-ols (juga dikenal sebagai katekin) terutama diproduksi melalui naringenin-chalcone R (CHS) (Liu *et al.*, 2015).

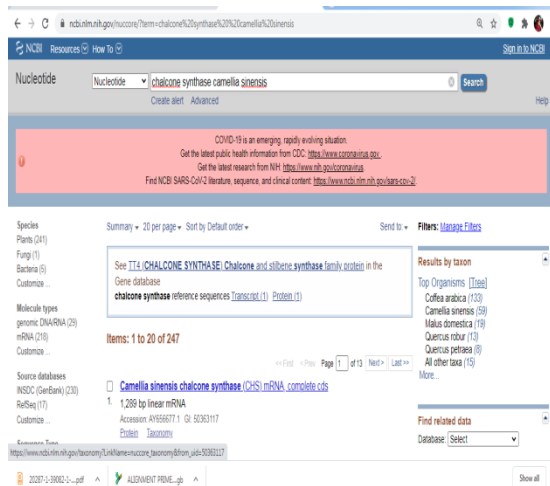
Pengujian primer spesifik Ferita, *et a.*, (2011 dan 2012) yaitu UtgF dan UtgR, belum dapat menunjukan produk sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai primer spesifik yang digunakan untuk isolasi gen F3H, DFR, dan LAR pada tanaman gambir. Pengujian primer yang dilakukan oleh (Istino Ferita, *et al.*, 2013) Udtg1 dan Udtg2 diuji pada DNA genom awal, belum

menunjukkan hasil/produk. Sedangkan pengujian kombinasi primer Udtg3 dan Udtg4 ternyata mampu menghasilkan produk sesuai harapan terhadap genom awal. Namun dari beberapa kali pengujian untuk kombinasi tersebut masih belum menunjukkan akurasi 100%. Sehubungan permasalahan diatas dan belum adanya penelitian desain primer untuk gen CHS pada tanam gambir tipe Udang maka perlu di lakukan penelitian pendesainan primer pada gen CHS tanaman gambir tipe Udang. Primrer tersebut diharapkan memiliki *binding side* pada DNA tanaman gambir tipe Udang.

METODE PENELITIAN

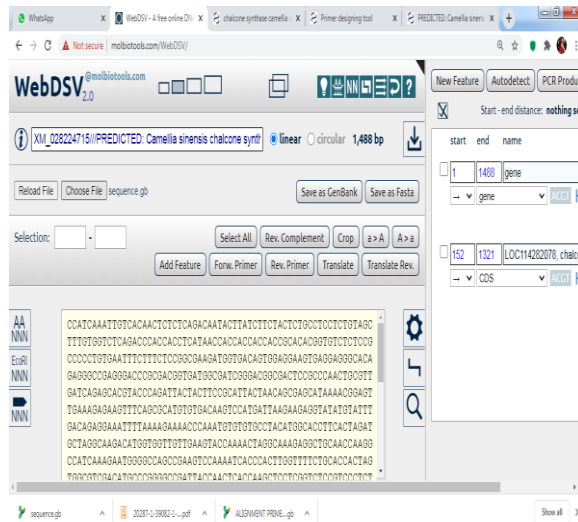
Desain Primer Spesifik

Pada tahapan pendesainan primer spesifik menggunakan data-data yang terdapat pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), dilakukan pencarian gen CHS pada colom *search*.



Gambar 1. Sekuens yang dipilih

Salah satu sekuen gen CHS yang diinginkan (Gambar 1) dipilih untuk didesain, kemudian diklik pick primers, disimpan dalam bentuk FASTA dan FASTA sekuen gen CHS dimasukan kedalam WebDSV untuk melihat posisi atau rentang sekuen gen CHS.

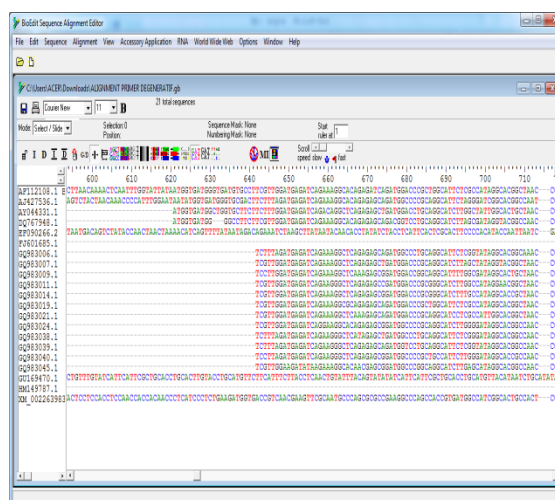


Gambar 2. Proses desain primer

Kemudian didesain primer (Gambar 2) di NCBI sesuai dengan rentang sekuen yang telah ditandai dengan memilih GC 50-60% dan Temperatur yang berdekatan anatar *forward* dan *reverse*, atur primer yang diinginkan. Dan dilihat hasil dengan WebDSV. Dan akan didapatkan primer spesifik pada gen CHS.

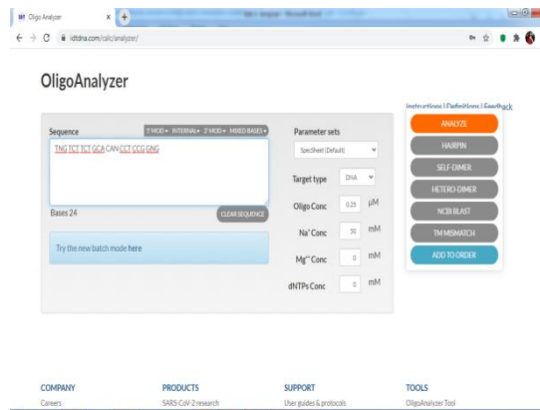
Desai Primer Degeneratif

Pada tahapan pendesainan primer degeneratif menggunakan data-data sekuen pada (lampiran 10) yang terdapat pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) yang disimpan dalam bentuk FASTA. Data 21 sekuen DNA tersebut dilakukan *multialignment* dengan menggunakan software ClustalW dari program *Bioedit*.



Gambar 3. Proses *multialignment* primer

Setelah dilakukan *multialignment* (Gambar 3) kemudian primer disusun dengan menggunakan penyusun sekuen primer menurut IUPAC. Kemudian dilakukan penglihatan apakah desain primer sesuai dengan syarat yang dilihat dengan software IDT, dimasukan sekuen primer yang telah di desain (Gambar 4).



Gambar 4. Proses pengecekan primer yang telah didesain

Kemudian diklik *Analyze*, maka akan muncul GC dan TM pada primer yang telah disusun, primer yang didesain kemudian diuji terhadap DNA hasil isolasi, dengan melakukan optimasi pada suhu anealingnya.

Isolasi DNA

Isolasi DNA tanaman gambir menggunakan metode CTAB yang dikembangkan oleh Doyle (1987) dengan sedikit modifikasi oleh (Muhammad Fadli, 2016). Dipipet CTAB 5 mL dimasukan kedalam *beaker glass*, dipipet β -Mercaptoethanol 1% 1/10 CTAB (50 μ l) dicampurkan, ditutup dengan Aluminium Foil inkubasi 65°C hingga panas. DNA diisolasi dari daun muda tanaman gambir tipe Udang. Daun tanpa tulang daun diambil sebanyak 1 lembar digerus dengan mortal sampai halus, lebih cepat lebih baik. Sekitar 300 mg jaringan yang sudah digerus dimasukkan ke dalam *tube eppendorf* 2 ml yang steril. Ditambahkan 1 mL 2x buffer ekstraksi CTAB + β -Mercaptoethanol 1% hangatkan dibolak balik. Divortex sampai semuanya tercampur rata, kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dan dibalik-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 supernatans ke dalam *tube eppendorf*

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

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

Elektroforesis

Hasil Isolasi DNA diperiksa menggunakan gel agarosa 1%. Gel dibuat dengan melarutkan 1 gram bubuk agarosa dalam 100 mL 0,5x TBE buffer kemudian dihomogenkan dan dipanaskan dengan *microwave* hingga mendidih. Setelah agarose larut, ke dalam botol Scott ditambahkan 1 tetes ethidium bromida, kemudian kocok sebentar. Selanjutnya dituangkan pada cetakan gel yang sebelumnya telah ditempatkan *comb* (sisir) untuk membuat lubang/sumur dan didiamkan hingga gel mengeras. Gel agarose yang sudah beku direndam secara submarine atau direndam dalam *running buffer*. DNA hasil isolasi di pipet 2 μ l dan 1 μ l loading buffer (BPB) ke dalam masing-masing *tube eppendorf*, dicampurkan dan dimasukkan ke dalam sumur gel, penanda berat molekul di satu sumur lainnya diisidengan standar lamda (λ) 3 μ l, lalu siap untuk diloading pada gel agarosa 1% dalam buffer TBE 0,5X.. Seterusnya gel agarose dijalankan dengan teknik elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah itu hasil elektroforesis didokumentasikan dengan *gel doc* (Biometra Jerman).

PCR dan Elektroforesis

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

Tabel 1. *Coctail* PCR untuk sampel tumbuhan gambir

KOD Master Mix Blue	25 µL
Primer Reverse	1,5 µL
Primer Forward	1,5 µL
DNA Template	10 µL
Nuclease-Free Water	12 µL
Kondisi Akhir Reaksi	50 µL

Tabel 2. Program Running PCR

Reaksi	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Denaturasi awal	95	3 Menit	14
Denaturasi	95	30 detik	
Anneling	75	30 detik	
Ekstensi	72	2 menit	24
Denaturasi	95	30 detik	
Anneling	60	30 detik	
Ektensi	70	2 menit	
Ekstensi akhir	72	5 menit	-
Pause	8	-	

Setelah reaksi PCR selesai, dilakukan elektroforesis kembali, DNA hasil amplifikasi dipipet dimasukan kedalam sumur sebanyak 3 µl dan penanda berat molekul di satu sumur lainnya diisi dengan 3µL DNA Ladder 1 kb. Setelah lubang-lubang pada gel selesai diisi, tangki elektroforesis diberi aliran listrik. Sisi yang berisi hasil amplifikasi diberi arus negatif. Proses elektroforesis dijalankan selama 30 menit pada voltase 100 volt. Setelah proses *running* selesai, gel diamati di atas UV trans-illuminator dan didokumentasikan dengan kamera digital.

HASIL PENELITIAN

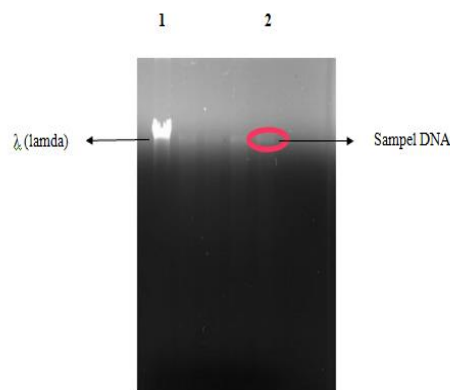
Dari penelitian yang dilakukan didapatkan hasil, satu pasang primer spesifik, delapan pasangan primer degeneratif.

Tabel 3. Hasil Desain primer spesifik

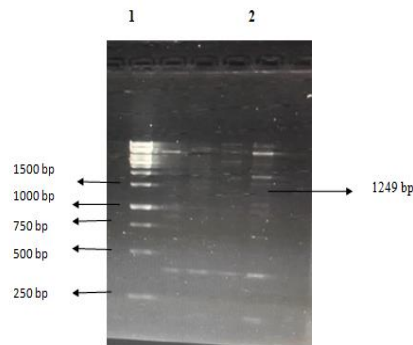
No	Nama Primer	Sekuen Nukleotida (5-> 3)	Jumlah Basa	GC (%)	Tm (°C)	Estimasi Produk
1	CHS- F	TCAGCTACCACTCT CTCCTTT	21	47,6	55	1249 bp
	CHS-R	AACACACCGAGCCT AGCATAAT	22	45,5	56,4	

Tabel 4. Hasil Desain Primer degeneratif

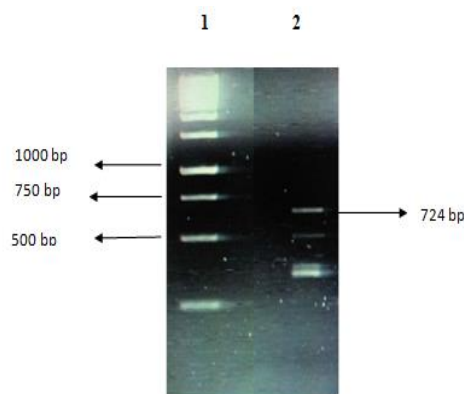
No	Nama Primer	Sekuen Nukleotida (5-> 3)	Jumlah Basa	GC (%)	Tm (°C)	Estimasi Produk
1	CHS-A1-F	TNG TCT TCT GCA CAN CCT CCG GNG	24	60,4	67,3	724 bp
	CHS-C1-R	CCANTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT	24	59,7	67,1	
2	CHS-B3-F	RGA AAC GNC ACA TGC ABB TGA CNG ARG AG	29	52,9	67,5	906 bp
	CHS-C1-R	CCANTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT	24	59,7	67,1	
3	CHS-B1-F	GAC ATN GTG GTG GTN GAR GTC CCH AAG C	28	56,5	67,7	815 bp
	CHS-C1-R	CCANTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT	24	59,7	67,1	
4	CHS-B2-F	ATG ATG TAC CAR CAA GGT TGC TTC GCC G	28	51,8	64,5	632 bp
	CHS-C1-R	CCANTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT	24	59,7	67,1	
5	CHS-A1-F	TNG TCT TCT GCA CAN CCT CCG GNG	24	60,4	67,3	645 bp
	CHS-A3-R	CAC GCR CTN GAC ATR TTW CCG TAC TCR CTC A	31	51,6	67,6	
6	CHS-B3-F	RGA AAC GNC ACA TGC ABB TGA CNG ARG AG	29	52,9	67,5	827 bp
	CHS-A3-R	RGA AAC GNC ACA TGC ABB TGA CNG ARG AG	31	51,6	67,6	
7	CHS-B1-F	GAC ATN GTG GTG GTN GAR GTC CCH AAG C	28	56,5	67,7	736 bp
	CHS-A3-R	GAC ATN GTG GTG GTN GAR GTC CCH AAG C	31	51,6	67,6	
8	CHS-B2-F	ATG ATG TAC CAR CAA GGT TGC TTC GCC G	28	51,8	69,5	



Gambar 5. Hasil Elektroforesis Isolasi DNA. Ket : 1. Marker, 2. Hasil Amplifikasi Gen



Gambar 6. Hasil PCR Primer Spesifik. Ket : 1. Leader (1 kb), 2. Hasil Amplifikasi Gen



Gambar 7. Hasil Desain primer degeneratif. Ket : 1. Leader (1 kb), 2. Hasil Amplifikasi Gen

PEMBAHASAN

Pembuatan Primer spesifik dan degeneratif. Pada penyusunan desain primer hal yang harus diperhatikan pada komposisi primer yaitu, kandungan GC 50-60% (Singh, 2001). Temperatur melting (T_m) 50-80°C dan interaksi diantara primer dimana adanya pembentukan dimer dan *hairpin*. Ketentuan penyusunan primer adalah primer disusun dari urutan oligonukleotida sepanjang 15-32 bp pada ujung - 5' pita DNA cetakan maupun komplementernya (Fatchiyah, E.L., *et al.*, 2011).

Dari hasil desain primer yang didapatkan pada tabel 3 dan 4 sesuai dengan syarat penyusunan primer. Penyusunan primer spesifik didapatkan sekuen pada tabel 5, yang terdiri dari satu pasang primer. Penyusunan primer spesifik di lakukan dengan menggunakan pick primer NCBI pada tanama

teh (*Camellia sinensis*) gen CHS dengan kode LOC114282078, yang dilihat posisinya dengan WebDSV.

Menurut Jamsari (2013) Primer Degeneratif adalah primer yang sekuenya memiliki basa-basa selain dari basa penyusun nukleotida DNA. Pada penyusunan primer degeneratif dilakukan pencarian sekuen- sekeun gen CHS pada jurnal dengan kode akses dan akses di *genebank* yaitu NCBI. Sekuen- sekuen gen didapatkan dari bermacam-macam tanaman yang terdapat gen CHS didalamnya, kemudian sekuen gen CHS *multiple alignment* dengan ClustalW dari program *Bioedit*. Semua data sekuen CHS di *alignment* menggunakan program *Bioedit*. Dipilih daerah lestari dari hasil *multiple alignment*, sehingga didapatkan delapan pasang primer degeneratif, yang terdiri dari empat *forward* dan dua *reverse*.

Pada pendesainan primer degeneratif hanya memiliki dua *reverse* di karenakan pada hasil *alignment* sekuen gen CHS bagian ujung primer hanya memiliki sedikit kesamaan basa nukleotida dan sedikit urutan basa nukleotida yang memenuhi persyaratan pendesainan primer yang baik yang akan digunakan untuk kegiatan PCR. Pendesainan primer *forward* didesain untuk posisi awal dan *reverse* didesain untuk posisi akhir, sehingga daerah antara *forward* dan *reverse* merupakan estimasi produk yang nantinya di hasilkan dari amplifikasi PCR gen CHS. Primer memiliki basa-basa degeneratif seperti, B, R, S, Y, D, N, W, di karenakan pada daerah tersebut banyak terdapat perbedaan basa, sehingga mengharuskan mengganti basa-basa yang tidak sama tersebut dengan basa degeneratif sesuai dengan ketentuan IUPAC.

Hasil estimasi produk yang diperkirakan dapat menjadi tolak ukur keberhasilan dari kegiatan amplifikasi gen CHS selain ada tidaknya dan perbandingan konsentrasi antara primer dengan DNA dan penggunaan basa-basa degeneratif tersebut diharapkan agar dapat sebagai pengganti pada *primer* yang akan menempel pada *template*. Dilakukan percobaan pada setiap pasangan primer untuk melihat primer manakah yang menghasilkan *binding side* terhadap DNA tanaman gambir tipe Udang yang hasil estimasi produknya sesuai dengan primer yang telah disusun.

Dilakukan tahanan isolasi dengan menggunakan metode CTAB pada saat isolasi bagian yang diambil berupa daun muda tanpa tulang daun untuk memudahkan proses penggerusan, sebelum proses penggerusan sampel telah disimpan dalam lemari - 80°C sehingga saat penggerusan teksturnya menjadi renyah dan memudahkan dalam proses penggerusan. 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 di dalam proses penggerusan akan mengaktifkan enzim *DNAse* sehingga akan menguraikan molekul-molekul DNA (Jamsari, 2007). Apabila menggunakan bagian jaringan yang keras ataupun jaringan tua akan membutuhkan waktu yang lama dalam penggerusan.

Yusdiana (2008) menyatakan ada tiga konsep dalam isolasi DNA, yaitu, Pembukaan sel pada sampel untuk mengeluarkan asam nukleat, pemisahan asam nukleat dari komponen sel lain dan pemurnian asam

nukleat. Penambahan *Lysis Buffer* untuk proses penghancuran membran dan dinding sel dari daun tersebut, pemecahan sel (lisis) merupakan tahapan awal dari isolasi DNA (Giacomazzie, 2005). Pada proses lisis dengan menggunakan detergen yaitu *Cetyl Trimethylammonium Bromide* (CTAB) sering dipakai untuk melisiskan membran sel pada isolasi DNA tumbuhan (Bettelheim, *et al.*, 2007).

Tahap kedua yaitu ekstraksi pemisahan DNA, dilakukan menggunakan sentrifugasi, sampel di sentrifugasi. Bettelheim, *et al.*, (2007), menyebutkan bahwa setelah sentrifugasi akan terbentuk 2 fase yang terpisah yakni fase organik pada lapisan bawah dan fase aquoeus (air) pada lapisan atas sedangkan DNA dan RNA akan berada pada fase aqueous. Tahap ketiga yaitu pemurnian setelah proses ekstraksi DNA yang didapat dapat dipisahkan melalui presipitasi (pemisahan) digunakan isopropanol dalam tahapan pemisahannya. senyawa tersebut akan memisahkan DNA pada fase aquoeus sehingga DNA menggumpal membentuk struktur fiber dan terbentuk pellet setelah dilakukan sentrifugasi (Switzer, 1999).

Tahap selanjutnya adalah penambahan buffer TE ke dalam tabung yang berisi pellet DNA. Verkuil, *et al.*, (2008) menyatakan bahwa buffer TE disimpan pada suhu -20°C bertujuan agar sampel DNA yang telah diekstraksi dapat disimpan hingga waktu berminggu-minggu.

Untuk melihat hasil isolasi DNA ada atau tidaknya DNA yg diisolasi dilakukan dengan elektroforesis. Prinsip kerja dari proses elektroforesis yaitu sampel ditempatkan didalam sumur kemudian ditambah larutan penyangga dan dialiri oleh aliran listrik, molekul sampel akan bergerak ke matrik salah satu kutub listrik yang sesuai dengan muatannya. Untuk DNA akan bergerak dari muatan negatif ke muatan positif karena DNA bermuatan negatif.

Dari gambar 5 terlihat pita DNA yang sama dengan pita DNA Marker, ini menunjukkan adanya DNA pada hasil isolasi. Hasil Isolasi DNA di amplifikasi guna mengkonfirmasi DNA yang terbentuk, amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR. Dalam kegiatan amplifikasi hal yang harus diperhatikan konsentrasi pemanding antara DNA sampel sebagai *template* dan konsentrasi primer. Konsentrasi DNA dilihat menggunakan *Nano Biodrop*, konsentrasi isolasi DNA tanaman gambir tipe Udang yaitu sebesar $100\text{ ng}/\mu\text{l}$.

Konsentrasi primer yang terlalu tinggi menyebabkan tidak terjadinya proses amplifikasi, tidak murninya DNA sampel yang digunakan juga bisa menjadi penghalang amplifikasi (Muhammad Fadli, 2016). Hal-hal yang berpengaruh pada kegiatan PCR adalah kondisi dNTP, oligonukleotida, primer, DNA template, komposisi buffer, jumlah siklus reaksi, enzim yang digunakan, serta faktor teknis dan non teknis lainnya, misalnya kontaminasi. (Yuono, 2006).

Dengan memperhatikan hal tersebut dilakukan amplifikasi PCR gen CHS tanaman gambir tipe Udang menggunakan *KOD master mix blue* dengan 40 siklus, proses amplifikasi dimulai pada tahap peleburan yang dilakukan pada suhu tinggi untuk memutus ikatan hidrogen DNA dari untai ganda menjadi untai tunggal yang dilakukan dalam waktu 3 menit untuk siklus awal dan 30 detik untuk siklus

berikutnya. Ini untuk memastikan semua berkas DNA terpisah dan menyebabkan DNA tidak stabil dan siap menjadi *template* bagi primer (Muladno, 2010). Pada tahap peleburan menggunakan suhu 95° selama 3 menit.

Untuk tahap penempelan suhu diturunkan sehingga primer akan berikatan dengan DNA target. Semua primer menggunakan suhu 75° C, yang merupakan suhu yang optimum untuk penempelan primer ini. Untuk tahap elongasi suhu dinaikkan kembali karena pada tahap ini DNA polimerase dapat memanjangkan primer dengan cara menambah nukleotida pada untai DNA. Ini dilakukan pada suhu 72°C selama 2 menit untuk mensintesis fragmen PCR. Hasil PCR di lihat menggunakan elektroforesis, visualisasi fragmen PCR dalam gel agarose, kombinasi pasangan primer spesifik CHS-F dengan CHS-R menghasilkan pita DNA yang tidak sesuai dengan estimasi produk.

Dari gambar 6 pita DNA menunjukkan hasil pada rentang 250- 500 bp dan diatas 1500 bp, dan tidak terdapat pada rentang estimasi produk yaitu 1249 bp, ini dikarenakan kemungkinan suhu *annealing* yang tidak sesuai sehingga primer dimer, dan terdapat miss piring / penempelan primer yang tidak spesifik pada primer yang didesain hal ini menunjukkan bahwa hasil tidak sesuai dengan primer CHS yang telah di desain. Sehingga hasil tersebut bukanlah pita DNA gen CHS.

CHS-B3-R dan CHS-C1-R (A) , CHS-B1-F dan CHS-C1-R (B), CHS-B2-F dan CHS-C1-R (C), tidak menghasilkan pita DNA (lampiran 3). Serta kombinasi pasangan primer CHS-A1-F dan CHS-A3-R (D), CHS-B3-F dan CHS-A3-R(E), CHS-B1-F dan CHS-A3-R(F), CHS-B2-F dan CHS-A3-R(G), tidak menghasilkan pita DNA. (lampiran 4).). Ini dikarenakan kemungkinan primer tidak *binding side* dengan DNA template sehingga menyebabkan tidak adanya pita DNA pada hasil PCR. Kombinasi pasangan primer CHS-A1-F dan CHS-C1-R menunjukkan hasil yang sesuai estimasi produk gen CHS dengan pembanding yang digunakan yaitu leader 1 kb (gambar 7) dan hasil elektroforesis PCR menunjukkan bahwa pada primer CHS-A1-F dan CHS-C1-R tanaman gambir tipe Udang menghasilkan estimasi produk yaitu berada pada rentang 724.

SIMPULAN

Pasangan primer yang di dapat digunakan untuk mendeteksi gen CHS (*chalcone synthase*) pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) tipe Udang yaitu pasangan primer degeneraif CHS-A1-F (TNG TCT TCT GCA CAN CCT CCG GNG) dengan CHS-C1-R (CCA NTC CAA SCC YTC WCC DGT SGT) dengan cara *alignment* 21 kode sequen yang terdapat di NCBI. Primer yang didesain CHS-A1-F dengan CHS-C1-R dapat mendeteksi gen CHS (*chalcone synthase*) tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) tipe Udang yang menghasilkan produk dengan estimasi sebesar 724 bp.

REFERENSI

- Anggraini, D., Rahmawati, N., & Hafisah, D. S. (2013). Formulasi Gel Antijerawat dari Ekstrak Etil Asetat Gambir. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, 1(12), 62–66.
- Azmi Dhalimi. (2006). *Permasalahan Gambir (Uncaria gambir, L) di Sumatera Barat dan Alternatif Pemecahannya, Perspektif*, vol 5 No.4.
- Badan POM RI. (2010). *Acuan Sediaan Herbal Vol.5*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Bettelheim dan Landesberg. (2007). *Laboratory Experiments for General Organic and Biochemistry*.
- Doyle, J. J. and J. L. D. (1987). *Isolation of plant DNA from fress tissue*.
- Fatchiyah, E.L., Arumingtyas, S, Widyarti., dan S, R. (2011). *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisa (Peneribit)*. Malang.
- Fauza, H. (2009). *Identifikasi Karakteristik Gambir (Uncaria spp) di Sumatra Barat dan Analisis RAPD*.
- Ferita, I. (2011). *Studi Hubungan Karakter Morfologi, Anatomi, dan Molekuler Terkait Potensi Kadar Katekin Pada Tanaman Gambir (Uncaria gambir (Hunter) Roxb)*. padang: Universitas Andalas.
- Ferita, Istino, 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*, 1–25.
- Giacomazzie. (2005). *Medium-Range Structural Properies of Vitreus Germania Obtained Through First Principles Analyss of Vibrational Spectra*.
- Gumbira, S.E., K., Syamsu, E., Mardliyati, A., Herryandie, NA., Evalia, D., & Rahayu, R., Puspitarini, A., Ahyarudin, dan A., H. (2009). *Agroindustri dan Bisnis Gambir Indonesia*. IPB Press. 118 hal.
- Hasan, Z., A.Denian, Iran, A.J.P. Tamsin, dan B. B. (2000). *Budidaya dan Pengolahan Gambir*. sukarami.
- Jamsari. (2007). *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Amplikasi Analisis Molekuler*. Unri Press. pekanbaru.
- Jamsari. (2013). *Rekayasa Genetika untuk Analisa Genom dan Produksi Organisme Transgenik*. UR Pres. Riau.
- Kusharyanto. (2004). Efek infuse Gambir (Uncaria gambir Roxb) yang diperoleh dari Pasar terhadap Sistem Syaraf Gtonom Mencit Jantan. *Seminar Nasional Tumbuhan Gbat Indonesia XXVI*.
- Liu, M., Tian, H., Wu, J., Cang, R., Wang, R., Qi, X., ... Chen, X. (2015). *Hubungan antara ekspresi gen dan akumulasi catechin selama musim semi dan musim gugur pada tanaman teh (Camellia sinensis L .)*. (November 2014).
- Muhammad Fadli. (2016). *Isolasi Gen DFR (Dyhidroflavonol 4- Reduktase) Tanaman Gambir (Uncaria Gambir (Hunter) Roxb) Berbasis PCR (Polymerase Chain Reaction)*.
- Muladno. (2010). *Teknologi Rekaya Genetika Edisi Kedua*. Bogor: IPB Press.

- Nazir, N. (2000). *Gambir Budidaya, Pengolahan, dan Prospek Diversifikasinya*. padang: Yayasan Hutanku.
- Rhayu, N. (2016). *Luka Bakar Pada Tikus (Rattus Norwegicus)*.
- Singh, R., Rastogi, S., & Dwivedi, U. . (2010). *Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. Compr. Rev. Food Sci., F 9,*.
- Singh, V. K. A. A. K. (2001). *PCR Primer Design. Molecular Biology*.
- Switzer. (1999). *Experimental biochemistry*. Oxford: Blackwell Scientific Pub.
- Verkuil, Alex, J. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*.
- Yuono, T. (2006). *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.
- Yusdiana. (2008). *Karakterisasi Lima Provenansi Bitti (Vitex cofassus Reinw. Sulawesi Selatan. Universitas Hasanuddin. Makasar*.