

Desain Primer Dan Deteksi Gen CHS (*chalcone synthase*) Pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) Tipe Riau Gadang

Epi Supri Wardi*, Sumaryati Syukur, Zulkarnain Chaidir, Jamsari Jamsari, Diza Sartika

Dicantumkan: [15 Oktober 2020] Direvisi: [24 Maret 2021] Terbit: [29 April 2021]

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 di 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 mengalignment 21 data sekuengen CHS dan dipilih daerah yang memiliki kesamaan basa antara sekuen gen yang dialignment 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 Tra Ace® 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 (TNGTCTTCTGCACNACCTCCGGNG - CCANTC CAASCCYTCWCCDGTSGT). Proses deteksi gen CHS pada daun gambir menghasilkan produk dengan estimasi sebesar 724 bp.

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

PENDAHULUAN

Gambir adalah sari getah yang diekstraksi dari 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 digunakan sebagai campuran obat tradisional sampai dalam campuran obat modern [1]. Terdapat empat tipe gambir yang ada di Sumatera Barat, keempat jenis gambir tersebut adalah tipe udang, tipe riau gadang, tipe mancik dan tipe cubadak [2]. Berdasarkan hasil analisis persentase kadar katekin dari keempat tipe gambir yang dilakukan oleh Ferita dkk [3].

Dewick dkk, menyatakan ekstrak gambir mengandung senyawa fungsional golongan senyawa polifenol dan senyawa ini merupakan hasil metabolit sekunder tanaman yang menyusun golongan tanin [4]. Salah satu yang termasuk dalam polifenol adalah flavonoid. Gambir mengandung 7-33 % katekin, 20-50 % asam catechu tannin, quercetin, catechin red, fixed oil, dan wax [1]. Hasil analisis kualitatif juga menunjukkan bahwa gambir mengandung quinon, terpenoid, alkaloid, tannin, flavonoid dan saponin [5]. 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 [6]. 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 [7]. *Chalcone synthase* juga dapat digunakan untuk memodifikasi komponen flavonoid pada tanaman lain. gen CHS dapat digunakan sebagai genetik determinan untuk kandungan katekin. Pada penelitian [6] 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 [8]. 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 gen pengendali pembentukan katekin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Primer degeneratif merupakan primer yang sekuennya memiliki basa-basaselain dari basa penyusun nukleotida DNA [9]. 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 dilakukan *multialignment* dengan menggunakan Program ClustalW dari software Bioedit. Hasil dari *multialignment* selanjutnya dipilih daerah yang memiliki kesamaan basa antara sekuen gen yang di *alignment* yang ditandai dengan banyaknyatanda '*' sehingga didapatkan primer *forward* dan *reverse* yang akan digunakan pada deteksi DNA dan cDNA gen CHS menggunakan PCR.

Tabel 1. Hasil Desain Primer

Kriteria	F1	F2	F3	F4	R1
Jumlah basa	29	28	24	28	24
Tm (°C)	63.7	63.8	63.6	63.7	63.6
% GC	52,9	56,5	60,4	51,8	59,7

Keterangan :

F1: 5'RGAAACGNCACATGCABBTGACNGARGAG'3

F2: 5'GACATNGTGGTGGTNGARGTCCCHAAGC'3

F3: 5'TNGTCTTCTGCACNACCTCCGGNG '3

F4: 5'ATGATGTACCARCAAGGTTGCTTCGCCG'3

R1: 5'CCANTCCAASCCYTCWCCDGTSGT '3

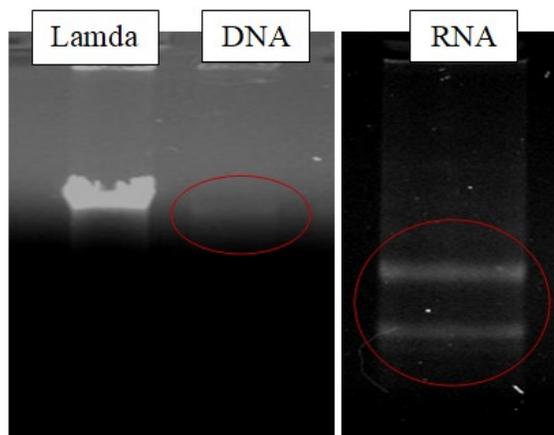
Panjang primer dapat dimulai dari 18 hingga 30 basa. Penggunaan panjang primer yang kurang dari 18 basamemiliki kemungkinan *mispriming*(penempelan primer pada tempat yangtidak diinginkan) tinggi [10]. Pada hasil desain primer panjang basa pada F1, F2, F3, F4, dan R1 berturut-turut adalah 29, 28, 24, 28, dan 24.Tm (*melting temperature*) merupakan temperatur saat setengah untai DNA gandaterpisah. Dari hasil desain primer perbedaan nilai Tm pada pasangan primer F1-R1 yaitu 01^oC, F2-R1 yaitu 0,2^oC, sedangkan untuk pasangan F3-R1 tidak terdapat perbedaan nilai Tm, dan untuk pasangan primer F4-R1 terdapat perbedaan nilai Tm sebesar 0,1^oC. Nilai Tm primer hasil desaintelah memenuhi acuan pada program. Padakempat pasangan primer tersebut terdapat perbedaannilai Tm yang tidak melebihi nilai sebesar 5^oC. Perbedaan nilai Tmantar dua primer yang melebihi 5^oC akan menyebabkan penurunan proses amplifikasi, atau bahkan memungkinkan tidak terjadi proses amplifikasi. Sedang- kan 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 telahmemenuhi acuan program yang disarankan.

Proses isolasi DNA secara garis besar terdiri atas tiga tahap yaitu pemecahan sel dan solubilisasi membran, isolasi dan pemurnian DNA, dan pemekatan DNA [11]. 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 -merchптоethanol.Setelah proses ekstraksi, DNA yang didapat dapat dipekatan 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. Pada proses isolasi RNA diawali dengan menggerus sampel daun tanpa tulang untuk memudahkan proses penggerusan daun. Menurut Jamsari [12], 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. Penambahan larutan RB Buffer dan β -merchптоethanol di gunakan untuk perusakan atau penghancuran membran dan dinding sel (*lysis*). untuk pengikatan RNA menggunakan 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 menggunakan 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 [13]. 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.

Uji kualitatif DNA dan RNA dilakukan dengan proses elektroforesis. TBE 1X bertindak sebagai larutan penyangga yang berguna untuk menjaga kesetimbangan PH dan

memberikan ion untuk konduktivitas. Visualisasi kualitas DNA dan RNA diamati dengan UV transilluminator.



Gambar 4. Hasil elektroforesis DNA dan RNA daun gambir tipe riau gadang

Visualisasi gel elektroforesis hasil ekstraksi DNA dan RNA (Gambar 4) 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.

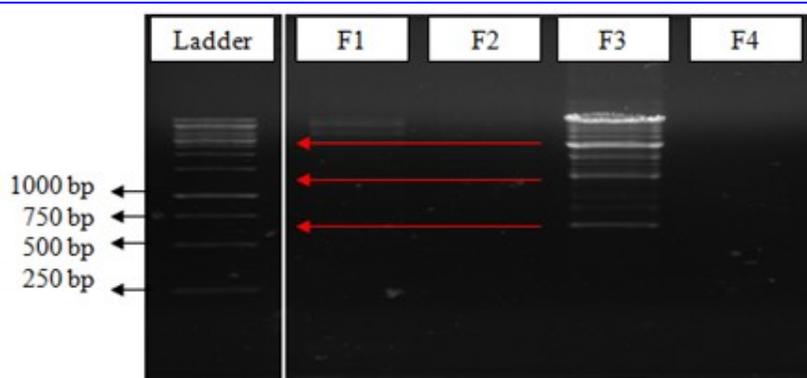
Uji kuantitatif dilakukan dengan mengukur absorbansi DNA dan RNA menggunakan *Nano Drop spectrophotometer*.

Tabel 2. Kualitas dan kuantitas hasil isolasi DNA dan 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. Rasiokemurnian A280/A260 di bawah rentang tersebut menunjukkan bahwa terdapat kontaminasi protein. Nilai rasio kemurnian A280/A260 dari sampel DNA dan RNA (tabel 2), 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 [14]. Nilai rasio kemurnian A260/230 sampel DNA dan RNA (tabel 2) 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.

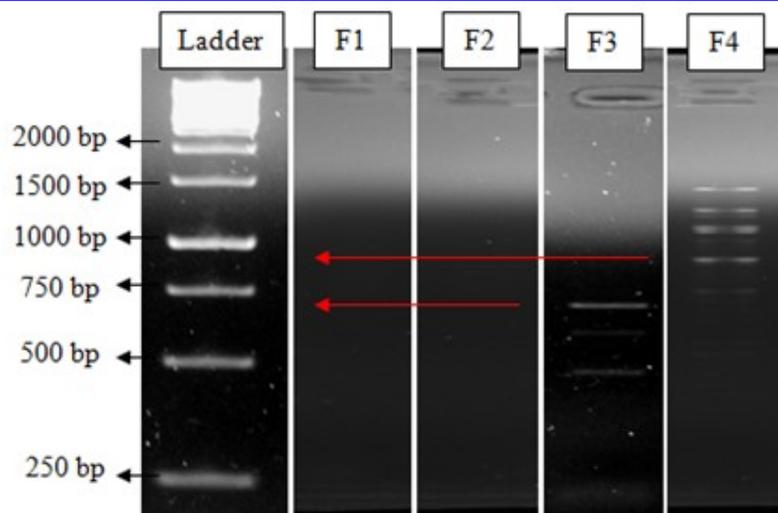
Pada sintesis cDNA dilakukan penambahan enzim *reverse transcriptase* yang bertujuan untuk menggandakan RNA yang telah di isolasi ke dalam bentuk cDNA. Hasil sintesis cDNA diverifikasi menggunakan nanodrop. Hasil dari pengukuran menggunakan nano biodrop didapatkan konsentrasi sebesar 1.656 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 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.



Gambar 5. Visualisasi Hasil Amplifikasi PCR DNA Gambir Tipe Riau Gadang

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 5), 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.

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 6), 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.



Gambar 6. Visualisasi hasil amplifikasi PCR cDNA Gambir tipe Riau Gadang

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.

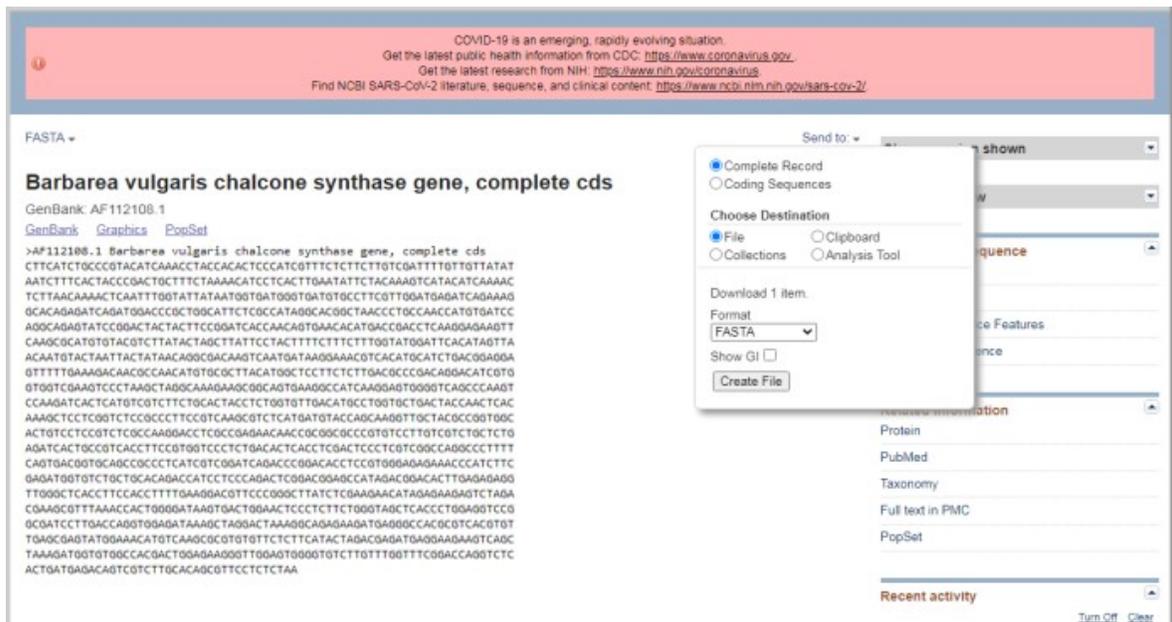
KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan di peroleh kesimpulan bahwa 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). Primer degeneratif yang di desain dapat mendeteksi gen CHS hasil cDNA tanaman gambir (*Uncaria gambir* (hunter) Roxb.) tipe riau gadang yang menghasilkan produk dengan estimasi sebesar 724 bp.

PROSEDUR PENELITIAN

Desain Primer Degeneratif

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



Gambar 4. Sequence gen CHS hasil penelusuran pada NCBI



Gambar 5. Hasil multialignment 21 sekuen gen CHS

Setelah dilakukan *multialignment* kemudian primer disusun dengan menggunakan penyusunan sekuen primer menurut IUPAC. Setelah primer disusun maka urutan primer dimasukkan kedalam situs Idt (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>) untuk melihat nilai Tm dan % GC.

OligoAnalyzer

The screenshot shows the OligoAnalyzer web interface. It features a 'Sequence' input field with a 'CLEAR SEQUENCE' button. Below the input field is a 'Bases 0' indicator and a 'Try the new batch mode here' button. To the right, there are 'Parameter sets' and 'Target type' dropdown menus. Below these are input fields for 'Oligo Conc' (0.25 μ M), 'Na⁺ Conc' (50 mM), 'Mg⁺⁺ Conc' (0 mM), and 'dNTPs Conc' (0 mM). On the far right, there are buttons for 'ANALYZE', 'HAIRPIN', 'SELF-DIMER', 'HETERO-DIMER', 'NCBI BLAST', 'TM MISMATCH', and 'ADD TO ORDER'. At the top right of the interface, there are links for 'Instructions | Definitions | Feedback'.

Gambar 6. Laman awal situs Idt

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 μ L β -mercaptoethanol lalu di inkubasi pada suhu 65^o C. gerus 1 lembar daun gambir tipe riau gadang, diambil \pm 300 mg dimasukkan kedalam 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 65^o C selama 30 menit dan dibalik setiap 10 menit sekali. Ditambahkan 500 μ L campuran phenol:kloroform:isoamylalkohol (25:24:1) divortex selama 1 menit. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, supernatant diambil dan dipindahkan kedalam tube eppendorf 2 ml yang baru. Ditambahkan 500 μ L 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, supernatan di buang dan DNA dikeringkan di dalam oven. Setelah kering DNA ditambahkan 100 μ L 1x buffer TE dan disimpan pada suhu -20^o C.

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 1,5 ml, ditambahkan 500 μ L RB buffer dan 5 μ L β -mercaptoethanol. Kemudian vortex dan diinkubasi pada suhu 60^oC selama 5 menit, disentrifus menggunakan sentrifus dingin (suhu 17^oC) 1000 x g selama 3 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam filter kolom dalam tube 1,5 ml, lalu disentrifus (suhu 17^oC) 1000 x g selama 1 menit. 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^oC) 14.000 x g selama 1 menit. Supernatan dibuang dan RB 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, ditambahkan 400 μ L wash buffer, disentrifus dingin (suhu 17°C) 14.000 x g selama 3 menit. Pindahkan RB kolom ke dalam tube 1,5 ml yang baru, ditambahkan 50 μ L RNase free water, diinkubasi 4 menit di suhu ruang dan disentrifus dingin (suhu 17°C) 14.000 x g selama 1 menit. Pipet filtrat hasil sentrifus dan dimasukkan kembali ke RB kolom, diinkubasi 2 menit, disentrifus dingin (suhu 17°C) 14.000 x g selama 1 menit.

Elektroforesis

Timbang 1 gram agarose dan tambahkan 0,5 x TBE sebanyak 100 ml lalu dimasukkan kedalam botol scott. Masak menggunakan microwave selama 1,5 menit dengan suhu medium. Gel agarose yang masih cair kemudian ditambahkan EtBr sebanyak 5 μ l dan aduk sampai merata. Selanjutnya pasang gel tray, comb 8 slot, dan penghambat gel. Masukkan agarose kedalam gel tray dan biarkan sampai mengeras. Kemudian dilakukan pembuatan coaktail eletroforesis yang terdiri dari sampel RNA 2 μ l, 10x BPB 1 μ l. 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 kedalam lubang paling kiri dengan hati-hati. Lakukan proses running menggunakan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah selesai letakkan gel diatas UV transimunilator dan dokumentasikan dengan gel doc (biometra, jerman). Simpan data dalam bentuk digital [15].

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 transkripsibalik. 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 balikdengan penambahan 5x RT Mmix II yang di dalamnya terdapat primer oligodTserta primer acak dan dilakukan kembali inkubasi kedua dengan tahapan inkubasiyaitu pada suhu 37 °C selama 15 menit, 50 °C selama 5 menit, dan 98 °C selama5 menit dengan menggunakan mesin PCR.

PCR Dan Elektroforesis

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

Tabel 3. 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	15
Ekstensi	72	2 menit	15
Denaturasi	95	30 detik	25
Anneling	60	30 detik	25
Ekstensi	70	2 menit	25
Ekstensi akhir	72	5 menit	
pause	8	-	

Hasil amplifikasi diperiksa menggunakan gel agarosa 1%. cDNA hasil amplifikasi diload pada gel agarosa 1% dalam buffer TBE 0,5X. Masing-masing produk PCR sebanyak 3 μ l dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis dengan mengikut sertakan 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 40 menit. Setelah itu hasil elektroforesis didokumentasikan dengan gel doc (Biometra Jerman).

DEKLARASI

Para Penulis tidak memiliki konflik dalam hal penulisan dan pendanaan.

INFORMASI TENTANG PENULIS

Penulis Rujukan:

Epi Supri Wardi, Sumaryati Syukur, Zulkarnain Chaidir
Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas
email: epi.supriwardi@gmail.com

Jamsari Jamsari
Program Studi Agroteknologi, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas

Epi Supri Wardi, Diza Sartika
Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Perintis Indonesia

PUSTAKA

1. Amos, Zainudin, I., Triputranto, A., Rusmandana, B., & Ngudiwaluyo, S. *Teknologi Pasca Panen Gambir*. Badan pengkajian dan Penerapan Teknologi. **2004**.
2. Hamda, F. Identifikasi Karakteristik Gambir (*Uncaria spp*) di Sumatera Barat dan analisis RAPD. *Disertasi. Universitas Padjajaran. Bandung. 2009*.
3. Ferita, I., Jamsari, Suliansyah, I., & Gustian. Studi Hubungan Karakter Morfologi, Anatomi, Dan Molekuler Terkait Potensi Kadar Katekin Pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb). *Journal of Chemical Information and Modeling. 2013*.
4. Dewick, P. M.. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition* (2nd ed., Vol. 5). **2009**. British Library Cataloguing in Publication Data A.
5. Ferdinal, N., Sulisty, J., & Nazir, N. Sintesis Enzimatis Flavonoid-glikosida dari Gambir (*Uncaria gambir*) menggunakan Enzim CGT-ase dari *Bacillus Licheniformis*. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung, 2013*. 289–296.

6. Sun, W., Meng, X., Liang, L., Jiang, W., Huang, Y., He, J., Hu, H., Almqvist, J., Gao, X., & Wang, L. Molecular and biochemical analysis of chalcone Synthase from freesia hybrid in flavonoid biosynthetic pathway. *PLoS ONE*. **2015**.
7. Yu, O., & Jez, J. M. Nature's assembly line: Biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *Plant Journal*. **2008**.
8. Widowati, E. W. Desain Primer Sitokrom B (Cyt B) Sebagai Salah Satu Komponen PCR (Polymerase Chain Reaction) Untuk Deteksi DNA Babi. *Laporan Penelitian Individual*. **2013**.
9. Jamsari. *Rekayasa Genetika untuk Analisa Genom dan Produksi Organisme Transgenik*. UR Press. **2013**.
10. Maitriani, L. K. B., Wirajana, N., & Yowani, S. C. *Desain Primer Untuk Amplifikasi Fragmen Gen Inha Isolat 134 Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) Dengan Metode Polymerase Chain Reaction*. **2014**
11. Eskundari, R. D. *Isolasi Dan Karakterisasi Fragmen Gen Leafy*. institut Pertanian Bogor.
12. Jamsari. (2007). *Bioteknologi Pemula: Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Universitas Riau Press. **2010**
13. Sambrook, J. F., & Rusell, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)*. Cold Springs Harbour Press. **2001**.
14. Farrell, R. *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* (3rd ed). Elsevier Academic Press. **2005**
15. Fadli, M. *Isolasi Gen DFR (Dihydroflavonol 4-Reductase) Pada Tanaman gambir (Uncaria gambir (Hunter) Roxb.) Berbasis PCR (Polymerase Chain Reaction)* (Issue June). Universitas Andalas Padang. **2016**