

KAJIAN KARAKTERISASI TERKAIT POTENSI KADAR KATEKIN PADA TANAMAN GAMBIR

(*Uncaria gambir* (Hunt) Roxb)



Aprizal Zainal
Istino Ferita
Gustian
Warnita

**KAJIAN KARAKTERISASI TERKAIT POTENSI KADAR
KATEKIN PADA TANAMAN GAMBIR
(*Uncaria gambir* (Hunt) Roxb)**

UU No 28 tahun 2014 tentang Hak Cipta

Fungsi dan sifat hak cipta Pasal 4

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

Pembatasan Pelindungan Pasal 26

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i Penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv Penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

Sanksi Pelanggaran Pasal 113

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

**KAJIAN KARAKTERISASI TERKAIT POTENSI
KADAR KATEKIN PADA TANAMAN GAMBIR
(*Uncaria gambir* (Hunt) Roxb)**

Aprizal Zainal, Istino Ferita, Gustian, Warnita

Penerbit



CV. MEDIA SAINS INDONESIA
Melong Asih Regency B40 - Cijerah
Kota Bandung - Jawa Barat
www.medsan.co.id

Anggota IKAPI
No. 370/JBA/2020

**KAJIAN KARAKTERISASI TERKAIT POTENSI KADAR KATEKIN
PADA TANAMAN GAMBIR (*Uncaria gambir* (Hunt) Roxb)**

Aprizal Zainal, Istino Ferita, Gustian, Warnita

Editor:

Rintho R.Rerung

Tata Letak:

Aprizal Zainal dkk

Desain Cover:

Syahrul Nugraha

Ukuran:

A5 Unesco: 15,5 x 23 cm

Halaman:

lii, 158

ISBN:

978-623-362-595-1

Terbit Pada:

Juli 2022

Hak Cipta 2022 @ Media Sains Indonesia dan Penulis

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari Penerbit atau Penulis.

PENERBIT MEDIA SAINS INDONESIA

(CV. MEDIA SAINS INDONESIA)

Melong Asih Regency B40 - Cijerah

Kota Bandung - Jawa Barat

www.medsan.co.id

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh

Segala puji dan syukur atas rahmat Allah SWT, karena berkat rahmat serta karunia-Nya buku dengan judul Kajian Karakterisasi Terkait Potensi Kadar Katekin pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunt) Roxb) telah terbit. Salawat dan salam senantiasa teruntuk kepada Nabi besar Muhammad SAW yang telah mengantarkan nilai-nilai ilahiah dan jalan keselamatan kepada umat manusia.

Bahan dasar buku ini adalah pengembangan dari; 1. Disertasi Ibu Dr Istino Ferita (almarhumah) yang memiliki judul asli Studi Hubungan Karakter Morfologi, Anatomi, dan Molekuler Terkait Potensi Kadar Katekin pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb); 2. Program penelitian penulis perihal Perbanyakan Massal Gambir (*Uncaria gambir* (Hunt) Roxb) Berkatekin Tinggi Secara *In Vitro* pada Skim Riset Publikasi Bereputasi (RPB) Batch I tahun 2022. Demi memperoleh manfaat yang lebih luas, maka penulis membukukannya. Buku ini ditulis sebagai media berbagi penulis sekaligus melaporkan; Identifikasi dan Seleksi Populasi Gambir Berpotensi Kadar Katekin Tinggi dan Rendah, Kajian Karakter Morfologi dan Anatomi, Karakterisasi Molekuler, Isolasi dan Purifikasi Fragmen Spesifik Terkait Potensi Kadar Katekin Tinggi, Kloning dan Sekuensing Fragmen Terkait Potensi Kadar Katekin Tinggi, Desain Primer Spesifik Terkait Potensi Kadar Katekin Tinggi.

Keberhasilan buku ini tentu tidak akan terwujud tanpa adanya dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada; 1). Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi melalui hibah penugasan penelitian skim: Riset Publikasi Bereputasi (RPB) Batch I Tahun Anggaran 2022 Nomor Kontrak : T/2/UN.16.17/PT.01.03/Pangan-RPB/2022, yang mendanai penelitian penulis. Keluarga tercinta yang senantiasa mendukung dan memberikan do'a terbaik dalam setiap perjalanan. Serta ucapan terima kasih kepada kedua orang tua dan mertua kami semoga diberi kelapangan, penerangan, kesejukan dalam alam kuburnya. Terima kasih juga kepada Penerbit Media Sains Indonesia yang bersedia mewujudkan bahan studi ini menjadi sebuah buku yang diharapkan bermanfaat bagi dunia akademik maupun non akademik. Penulis menyadari tak ada gading yang tak retak, karena itu penulis memohon maaf atas ketidak sempurnaan buku ini. Kritik dan saran dari pembaca sangat diharapkan untuk kesempurnaan buku ini.

Indonesia, Mei 2022

Tim Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI	iii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
Pengantar	1
Fokus Pembahasan Buku.....	6
BAB 2 LANDASAN TEORI	11
Morfologi dan Ekologi Tanaman Gambir	11
Kegunaan Gambir, dan Kandungan Kimia.....	14
Penanda Molekuler	17
Kloning DNA.....	18
Sekuensing DNA	19
BAB 3 IDENTIFIKASI MORFOLOGI, ANATOMI, MOLEKULER TERKAIT KATEKIN.....	23
Identifikasi dan Seleksi Populasi.....	30
Kajian Karakter Morfologi dan Anatomi	34
dst.....	105
dst.....	115
BAB 4 HUBUNGAN KARAKTER MORFOLOGI, ANATOMI, DAN MOLEKULER TERKAIT KATEKIN.....	97
Identifikasi dan Seleksi Populasi.....	97
Kajian Karakter Morfologi	101
dst.....	105
dst.....	115
BAB 5 PENUTUP.....	134
Kesimpulan	142
Saran.....	142
Index.....	167
Daftar Pustaka	168

BAB 1

PENDAHULUAN

Pengantar

Tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) merupakan salah satu komoditas ekspor hasil perkebunan rakyat yang bernilai ekonomi tinggi dan prospektif untuk diusahakan secara komersial mengingat kegunaannya yang beragam. Getah gambir terutama mengandung senyawa katekin yang sangat dibutuhkan dalam industri-industri farmasi, kosmetik, batik, cat, penyamak kulit, biopestisida, hormon pertumbuhan, pigmen dan sebagai campuran bahan pelengkap makanan. Selain senyawa katekin, gambir juga mengandung senyawa tannin, kuersetin, fluoresin, dan lilin.

Di Indonesia tanaman gambir sebagian besar tersebar dan diusahakan di Sumatera Barat, sehingga gambir disebut juga tanaman spesifik Sumatera Barat. Di Sumatera Barat, lebih dari 90% lahan gambir terdapat di Kabupaten Limapuluh Kota dan Pesisir Selatan, dan lebih dari 80% produksi gambir Indonesia berasal dari daerah ini. Pada tahun 2006 tercatat luas lahan tanaman gambir di Sumatera Barat 19.121 ha, meningkat menjadi 28.326 ha pada tahun 2009, Peningkatan produksi seiring dengan luas lahan, yaitu dari 12.973 ton pada tahun 2006 menjadi 13.897 ton pada tahun 2009. Pada tahun 2006 volume ekspor gambir Indonesia tercatat 15.630 ton, meningkat pada tahun 2009

menjadi 18.297 ton dengan nilai ekspor US \$ 13.760 tahun 2006, dan meningkat pada tahun 2009 menjadi US \$ 38,038 (Badan Pusat Statistik, 2010). Produksi gambir Indonesia diekspor ke negara ; India, Jerman, Pakistan, Taiwan, dan Singapura. Umumnya gambir yang diekspor memiliki kadar katekin di bawah 75%. Data perkembangan tanaman dan ekspor gambir (tahun 2006 s/d 2009) disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data perkembangan dan ekspor gambir Indonesia tahun 2006-2009.

Tahun	Luas Tanaman *) (Ha)	Produksi *) (ton)	Volume ekspor**) (ton)	Nilai Ekspor**) (\$)
2006	19.121	12.973	15.630	13.760
2007	19,350	13,115	13.583	22.871
2008	19,575	13,956	16.465	33.581
2009	28,326	13,897	18.297	38.038

Keterangan:

*) Data Sumatera Barat. **) Data Indonesia

Produktivitas dalam bentuk ekstrak dihitung untuk jangka waktu satu tahun

Sumber : Sumatera Barat Dalam Angka (2010) dan Badan Pusat Statistik (2011)

Tingginya permintaan dan harga gambir di dunia sangat menguntungkan untuk memproduksi gambir dengan mutu dan produksi tinggi. Indonesia adalah satu-satunya negara pengekspor gambir di dunia yang masih mengekspor gambir dalam bentuk mentah (Nazir, 2000). Harga gambir ekspor berkisar US \$ 3.200 per ton (MyRMnews, 2009), sedangkan ditingkat petani berkisar antara Rp 17.000 hingga Rp 27.000 per kg. Usaha meningkatkan ekspor gambir, pengembangan tanaman gambir yang memiliki produksi tinggi serta kandungan katekin

tinggi perlu diteliti.

Peluang mengembangkan tanaman gambir secara komersial didukung oleh ketersediaan sumberdaya seperti tersedianya lahan yang cukup, iklim yang sesuai, dan tenaga kerja yang banyak. Peluang tersebut akan dapat dimanfaatkan secara optimal bila didukung oleh produktivitas yang optimal. Namun produktivitas gambir petani saat ini masih sangat rendah. Produktivitas yang rendah merupakan masalah utama dalam pengembangan tanaman gambir. Roswita, (1990) dan Dinas Perkebunan Sumatera Barat, (1998) menyatakan bahwa produktivitas tanaman gambir rakyat berkisar antara 400 kg - 600 kg getah kering per ha, sementara secara teoritis potensi hasil tanaman gambir dapat mencapai 2100 kg getah kering per ha.

Salah satu penyebab rendahnya produktivitas gambir Sumatera Barat adalah karena dalam budidayanya belum menggunakan kultivar unggul dan bermutu. Penggunaan kultivar unggul merupakan faktor yang sangat menentukan dalam produktivitas suatu tanaman. Upaya peningkatan produksi getah kering gambir, khususnya kadar katekin, maka sudah semestinya dalam budidaya tanaman gambir digunakan populasi dengan genotipe yang seragam dan memiliki potensi produksi tinggi atau potensi kadar katekin tinggi. Upaya tersebut hanya dapat dilakukan, jika tersedia suatu metode identifikasi dini yang memungkinkan kita melakukan koleksi dan seleksi genotipe-genotipe berpotensi kadar katekin tinggi sejak tanaman masih berada pada fase perkecambahan atau fase bibit.

Memperoleh kultivar unggul tanaman gambir dengan kandungan katekin tinggi merupakan suatu upaya yang dapat dilakukan

dalam memperbaiki produktivitas dan mutu produk gambir. Sehubungan dengan hal tersebut, diperlukan pendekatan untuk mengetahui tanaman gambir yang mempunyai karakter-karakter morfologis, dan genetik (molekuler) yang berpotensi katekin tinggi. Selain hal itu secara anatomi diperlukan juga karakter-karakter spesifik yang dapat digunakan sebagai pembeda antara gambir berpotensi kadar katekin tinggi dengan katekin rendah. Struktur anatomi diharapkan dapat memperkaya karakter yang dipakai untuk membantu permasalahan sistematika pada *Uncaria gambir*.

Upaya peningkatan produktivitas melalui perbaikan gen pengendali produksi termasuk gen pencari potensi kadar katekin, telah mendorong penelitian molekuler mengenai identifikasi karakter-karakter tertentu. Informasi dan pengetahuan pada tingkat molekuler tentang sistem penanda yang dapat digunakan untuk mendeteksi suatu karakter pada tanaman, dapat digunakan untuk pemecahan efektif yang berhubungan dengan potensi produksi, termasuk kadar katekin pada gambir.

Ketidakteragaman pada populasi tanaman gambir merupakan suatu masalah yang dihadapi dalam memperoleh bahan perbanyakan. Hal ini disebabkan karena sampai saat ini belum ditemukan cara yang dapat digunakan untuk mendeteksi gambir dengan potensi katekin tinggi pada fase tanaman muda (bibit). Keberhasilan karakterisasi dan penentuan potensi genetik kadar katekin pada populasi tanaman gambir sangat ditentukan oleh kemampuan indentifikasi dini tentang keberadaan fragmen pencari katekin tinggi. Ketersediaan sistem diagnosa yang akurat dan cepat merupakan suatu prasyarat penting demi kelancaran

sistem deteksi dini pada tanaman gambir yang mencirikan potensi genetik kadar katekin tinggi.

Metode identifikasi tanaman gambir selama ini masih berdasarkan penampakan karakter morfologi. Kelemahan metode ini bukan saja terletak pada waktu yang lama untuk dapat melakukan identifikasi (sangat tergantung umur tanaman), akan tetapi juga kurang praktis, serta karakter morfologi sering dipengaruhi oleh lingkungan. Pada tanaman gambir perbedaan antara satu tipe dengan yang lainnya dapat dilihat setelah berumur satu tahun lebih. Oleh karena itu perlu dikembangkan suatu metode seleksi yang lebih cepat, akurat, dan tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Metode tersebut dapat diperoleh melalui penggunaan sistem penanda berbasis molekuler.

Keberhasilan suatu metode identifikasi dini dalam mendeteksi potensi genetik kadar katekin akan meningkatkan nilai tambah tanaman gambir yang akan memberikan dampak positif baik bagi petani gambir maupun bagi negara secara nasional. Arah penelitian selanjutnya dapat difokuskan pada perakitan kultivar unggul baru yang terkait dengan potensi genetik kadar katekin tinggi, dalam upaya pengembangan program pemuliaan tanaman gambir ke depan.

Berdasarkan hal yang telah dikemukakan di atas, maka diterbitkan naskah buku yang berjudul, "Kajian Karakterisasi Terkait Potensi Kadar Katekin Pada Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* (Hunt) Roxb).

Fokus Pembahasan Buku

Penulisan naskah yang disajikan dalam buku ini memiliki tujuan 1) Untuk memberikan informasi karakter-karakter morfologi, anatomi, maupun karakter molekuler yang dapat dijadikan sebagai penciri tanaman gambir yang berpotensi kadar katekin tinggi. 2) Untuk memberikan informasi sekuen DNA dari fragmen-fragmen spesifik yang terkait dengan potensi kadar katekin tinggi. 3) Untuk menginformasikan kombinasi primer spesifik terkait dengan potensi berkadar katekin tinggi. 4) Untuk mendapatkan tingkat akurasi primer spesifik dalam menghasilkan sistem metode deteksi dini pada kegiatan seleksi tanaman gambir yang terkait potensi berkadar katekin tinggi dalam upaya peningkatan produktivitas tanaman gambir.

Rangkaian penulisan dalam buku ini meliputi **tujuh** topik kegiatan yaitu ; (1) Identifikasi dan Seleksi Populasi Gambir Berpotensi Kadar Katekin Tinggi dan Rendah, (2) Kajian Karakter Morfologi dan Anatomi, (3) Karakterisasi Molekuler, (4) Isolasi dan Purifikasi Fragmen Spesifik Terkait Potensi Kadar Katekin Tinggi, (5) Kloning dan Sekuensing Fragmen Terkait Potensi Kadar Katekin Tinggi, (6) Desain Primer Spesifik Terkait Potensi Kadar Katekin Tinggi, (7) Uji Akurasi Sistem Penanda STS (*Sequence Tagget Sites*)

BAB 2

LANDASAN TEORI

Morfologi, dan Ekologi Tanaman Gambir

Tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) merupakan tanaman belukar dari famili *Rubiaceae*. Asal usul tanaman gambir tidak diketahui dengan pasti, tetapi diduga berasal dari Asia Tenggara. Di daerah tersebut gambir telah dibudidayakan (Djarwaningsih, 1993). Daerah penyebarannya di Indonesia antara lain adalah Aceh, Sumatera Utara, Riau, Sumatera Barat, Sumatera Selatan, Bangka, Belitung, dan Kalimantan Barat.

Dari bentuk morfologi, tanaman gambir termasuk jenis tanaman perdu, bila dibiarkan akan tumbuh memanjat menggunakan kait. Tinggi tanaman 1,5 m – 2 m, warna batang coklat muda sampai coklat tua, percabangan banyak, bersudut 30°-50° dari batang utama. Warna daun hijau muda, hijau coklat, dan hijau tua, dengan panjang petiole 0,2 cm-0,4 cm berwarna hijau (Balai Informasi Pertanian Sumatera Barat, 1995). Lingkar batang yang sudah tua ukurannya dapat mencapai 45 cm. Daunnya oval sampai bulat dengan panjang 8 cm – 14 cm, lebar 4 cm - 6,5 cm (Nazir, 2000).

Daun merupakan bagian tubuh tumbuhan yang paling banyak mengandung klorofil sehingga kegiatan fotosintesis paling banyak berlangsung di daun. Secara anatomi, daun dibagi atas tiga bagian yaitu epidermis, parenkim/mesofil, dan jaringan pembuluh. Epidermis merupakan lapisan terluar daun, yang terdiri dari

epidermis atas dan epidermis bawah. Untuk mencegah transpirasi yang terlalu besar, epidermis dilapisi oleh kutikula. Pada epidermis juga terdapat stomata, yang berfungsi untuk tempat berlangsungnya pertukaran gas antara atmosfer dengan sistem ruang antara sel yang berada pada jaringan mesofil di bawah epidermis yang disebut rongga substomata. Membuka dan menutupnya stomata diantaranya ada yang disebabkan mekanisme turgor, akumulasi ion kalium, akumulasi asam absisat, dan pengaruh lingkungan seperti suhu, kelembaban udara maupun cahaya (Dalimunthe, 2004).

Parenkim daun terdiri dari 2 lapisan sel, yakni palisade (jaringan pagar) dan spons (jaringan bunga karang), keduanya mengandung kloroplast. Jaringan pagar sel-selnya rapat sedangkan jaringan bunga karang sel-selnya agak renggang, sehingga masih terdapat ruang-ruang antar sel. Kegiatan fotosintesis lebih aktif pada jaringan pagar karena kloroplastnya lebih banyak daripada jaringan bunga karang ([http:// lingkungan. infogoue.com/organ_tumbuhan](http://lingkungan.infogoue.com/organ_tumbuhan), 2011).

Tanaman gambir mempunyai bunga yang muncul pada ketiak daun dan merupakan bunga majemuk berbentuk bongkol yang termasuk ke dalam jenis bunga hermaprodit, yakni dalam satu bunga terdapat benang sari dan kepala putik. Stamennya lima utas menempel pada daun mahkota, satu stamen mempunyai dua kepala sari. Ovari terdiri dari dua ruang dan ovulanya banyak (Lemmens dan Wulijarni, 1999 *cit* Silfia, 2004). Bunga yang masih kuncup berwarna hijau kekuningan, dan ketika mekar berwarna merah darah diselang-selingi bintik-bintik kuning (Denian dan Fiani, 1994). Bongkolnya berdiameter 6 cm – 8 cm, panjang

tangkai bunga mencapai 3 mm, tabung mahkota berbentuk benang, panjangnya 10 mm - 15 mm, daun kelopak panjangnya 5 mm - 7 mm (Djarwaningsih, 1993). Tanaman gambir dinyatakan bersifat *protandry* artinya kepala sari mengalami pemasakan lebih dulu dibandingkan kepala putik, sehingga tanaman gambir diduga melakukan penyerbukan silang untuk reproduksinya (Denian dan Fiani, 1994; Silfia, 2004, dan Jamsari, *et al.*, 2007).

Buah gambir berbentuk polong semu, dalam satu bongkol akan terbentuk banyak polong buah, dan setiap polong buah mempunyai biji yang sangat banyak dan sangat halus. Panjang polong berkisar antara 3 cm - 7 cm, saat muda berwarna hijau muda sampai hijau tua, dan saat masak berwarna kuning kecoklatan, dan jika terlalu masak berwarna coklat kehitaman. Buah yang terlalu masak akan pecah sendiri di pohonnya dan biji-bijinya akan berserakan diterbangkan angin (Denian, *et al.*, 1992). Biji gambir mempunyai ukuran yang sangat kecil dengan panjang 1 mm - 2 mm, bagian luar mempunyai sayap, sehingga mudah diterbangkan angin. Dikarenakan ukuran yang kecil tersebut, makanya sulit menentukan biji yang hidup (baik) dengan biji yang mati. Dibawah mikroskop terlihat biji yang masih hidup berwarna coklat terang, sedangkan biji yang sudah mati berwarna coklat kehitaman. Dalam biji terdapat *radicula* (calon akar), *caulikula* (calon batang) dan *cotyledon* (daun lembaga) (Denian dan Fiani, 1994). Menurut Risdale (1992) dalam 1 kg biji gambir terdiri dari 25 juta biji.

Tanaman gambir dapat tumbuh baik sampai ketinggian 900 m di atas permukaan laut (dpl) dengan curah hujan 2500 mm/tahun - 3000 mm/tahun. Bulan basah maksimum 400 mm/bulan - 450

mm/bulan, dan bulan basah minimum 100 mm/bulan - 200 mm/bulan, dengan intensitas cahaya matahari yang banyak. Tanaman gambir tidak tahan kondisi tanah tergenang air, justru itu petani gambir memilih bertanam pada lahan yang berlereng (Balai Informasi Pertanian Sumatera Barat, 1995).

Tanaman gambir tidak terlalu memilih tanah yang khusus, yang penting sistem pengairan harus baik, karena air tergenang akan mengganggu pertumbuhan gambir. Gambir dapat tumbuh pada semua jenis tanah termasuk tanah ultisol dengan pH tanah antara 4,8 - 5,5. Pertumbuhan akan baik pada kondisi suhu udara 16°C - 28°C, kelembaban nisbi udara 70% - 85%, dengan jumlah hari hujan 140 hari per tahun (Daswir dan Kusuma, 1993), penyinaran matahari langsung dengan intensitas cahaya yang cukup banyak (Nazir, 2000).

Tanaman gambir dapat dipanen umur 1 tahun - 1,5 tahun setelah tanam. Bagian yang dipanen adalah daun beserta ranting muda. Jaringan tanaman tersebut banyak mengandung katekin. Panen dilakukan dengan memotong cabang dan ranting-ranting tanaman. Setiap tahun, panen dapat dilakukan 2 - 4 kali, tergantung kepada pertumbuhan tanaman. Tanaman gambir dapat dipanen terus menerus selama 15 tahun semenjak penanaman (Teknologi dan Industri Sumatera Barat, 2001).

Denian, *et al.*, (1992) menyatakan bahwa tanaman gambir yang dikembangkan pada perkebunan rakyat terdiri dari tiga tipe, yaitu tipe Udang, Cubadak, dan Riau. Sementara itu, 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. Karakter spesifik yang dapat membedakan keempat gambir tersebut adalah warna daun dan ukuran daun. Tanaman gambir tipe Udang mempunyai ciri-ciri daun berwarna hijau kemerahan, tipe Cubadak mempunyai daun berwarna hijau muda dan tipe Riau Gadang dan Riau Mancik mempunyai daun berwarna hijau tua tetapi Riau Gadang helaian daunnya yang lebih luas dibanding Riau Mancik.

Sehubungan dengan warna daun, beberapa petani gambir menyatakan bahwa tanaman gambir yang berdaun merah (tipe Udang) mempunyai produksi getah yang lebih tinggi. Hasan, *et al.* (2000) juga menyatakan bahwa tipe Udang mempunyai tingkat produksi getah dan rendemen hasil yang lebih tinggi dari tipe lainnya. Sementara itu hasil karakterisasi Fauza (2009) juga menunjukkan tanaman gambir tipe Udang mempunyai rata-rata rendemen hasil yang tertinggi, masing-masing adalah Udang 6,90%, Cubadak 6,68%, Riau Gadang 6,53%, dan Riau Mancik 6,44%.

Kegunaan Gambir dan Kandungan Kimia

Heyne (1987) menyatakan bahwa kegunaan gambir sangat beragam, selain untuk kenikmatan pencampur makan sirih, juga sebagai penyamak kulit atau penyamak jala ikan, bahan dasar pencelupan/pewarna (terutama untuk mencelup sutera dan perlengkapan militer). Selain itu gambir juga digunakan di pabrik bir untuk menjernihkan bir dan sebagai bahan dalam industri farmasi.

Dalam bidang farmasi gambir dapat sebagai obat penahan darah, astrigen, antiseptik, dan obat sakit perut (Balai Informasi

Pertanian Sumatera Barat, 1988). Secara modern gambir telah dimanfaatkan oleh industri farmasi, seperti di perusahaan Zyma dari Swiss yang melakukan isolasi katekin dari daun gambir yang digunakan untuk obat penyakit hati dengan nama paten "Catergen" (Amos 1993 *cit.* Nazir, 2000). Di Jerman gambir dimanfaatkan sebagai bahan baku industri obat-obatan. Jerman termasuk importir katekin dalam jumlah yang cukup besar. Untuk bahan obat, importir Jerman Barat mensyaratkan kadar katekin gambir 40-60%, dan perusahaan farmasi Ciba Geigy mensyaratkan kadar katekin minimal 60,5%. Untuk menyamak kulit, perusahaan pengolah kulit Cuirplastek R. Bisset dan Cie mensyaratkan kandungan tanin 40%. Di Singapura gambir juga digunakan sebagai bahan pembuatan obat sakit perut. Sedangkan di Jepang gambir dikembangkan sebagai permen pelega tenggorokan khusus untuk para perokok, karena gambir mampu menetralkan nikotin (Teknologi dan Industri Sumatera Barat, 2001)

Gambir ternyata juga dapat dimanfaatkan sebagai pestisida nabati. Menurut Adria dan Idris (1996) ekstrak gambir dapat dipakai sebagai insektisida nabati dalam pengendalian larva kumbang colorado (*Epilachna sp.*). Idris dan Adria (1997) juga melaporkan bahwa tepung gambir juga bersifat fungisida nabati terhadap jamur *inperfect* (*Fusarium sp.*) penyebab penyakit bercak daun pada tanaman klausena (*Clausena anisata*). Menurut Nasrun, *et al* (1997) gambir dapat menghambat pertumbuhan jamur *Phytophthora cinnamomi* dan cukup berpotensi sebagai antibakteri dan antijamur. Nasrun (2001) melaporkan bahwa katekin ekstrak daun gambir konsentrasi 250 ppm telah dapat menekan

pertumbuhan koloni *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* sebesar 69,11%. Selain itu berbagai manfaat lain dari gambir yang masih dalam taraf penelitian seperti : perekat kayu lapis dan papan partikel (Kasim, 2004), tablet hisap gambir murni (Firmansyah, *et al.*, 2004), shampo gambir (Shanie, *et al.*, 2004), dan lain-lain.

Gambir adalah ekstrak daun dan ranting muda tanaman *Uncaria gambir* Roxb, yang dikeringkan. Ekstrak gambir mengandung beberapa komponen, yaitu katekin (1%-33%), asam kateku tanat (20%-55%), pirokatekol (20%-30%), gambir fluoresensi (1%-2%), kateku merah (3%-5%), kuersetin (2%-4%), fixed oil (1%-2%), lilin (1%-2%), dan alkohol dalam jumlah sedikit (Nazir, 2000). Kandungan kimia gambir yang dilaporkan Bakhtiar (2007) adalah: selain katekin, tannin, asam kateku tanat, kuersetin, lemak, lilin, dihidrogambirtanin, masih adalagi yakni ; Gambirin ($A_1, A_2, A_3, B_1, B_2, B_3$, dan C), gambirtanin, oksogambirtanin, gambirdin, isogambirdin, auroparin, rotundifolin, roksburgin (A, B, C, D, E), rinkofilin, isorinkofilin, dan musilago.

Menurut Bakhtiar (1991), bagian yang mempunyai nilai ekonomi pada gambir adalah kandungan kimia dalam getahnya berupa senyawa katekin, tanin, tanin kateku, fluoresin, kuersetin, lilin, lemak, dan lendir. Katekin dan tanin merupakan senyawa yang paling banyak dimanfaatkan. Bakhtiar (2007) mengemukakan, rumus molekul katekin yaitu $C_{15}H_{14}O_6$ dengan berat molekul 290,28.

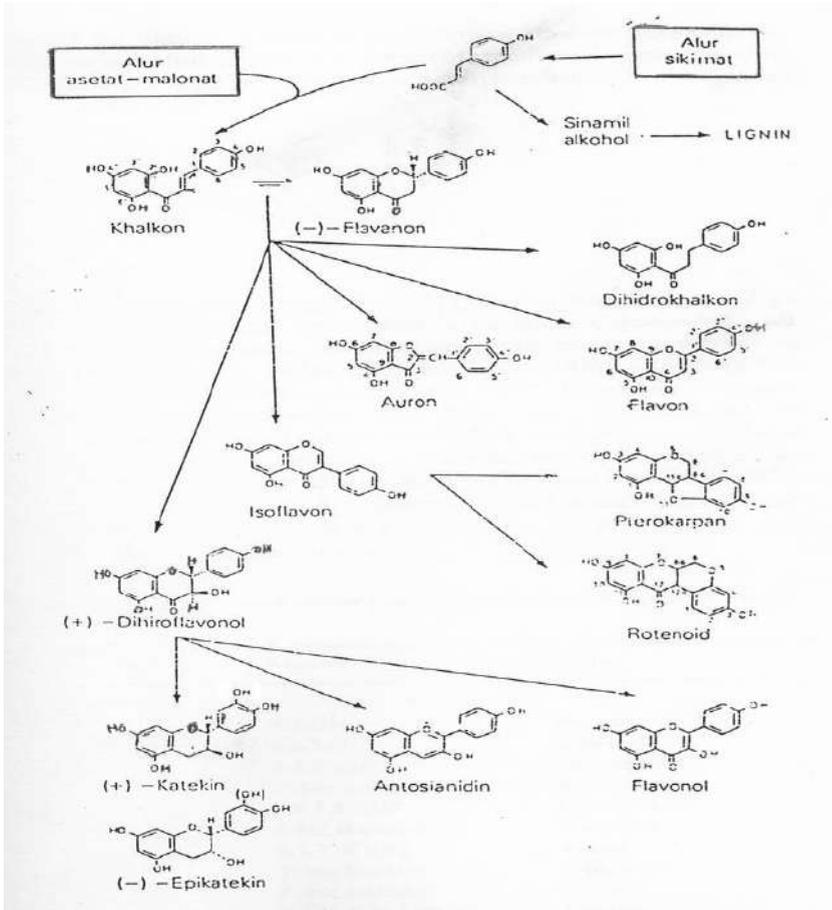
Katekin dapat larut di dalam air mendidih dan alkohol dingin (Teknologi dan Industri Sumatera Barat, 2001). Katekin tidak mudah larut dalam air dingin, dan bila airnya diuapkan maka asam kateku tannat akan berbentuk kristal yang berwarna merah

kecoklatan (Burkill, 1966). Katekin bersifat asam lemah, sukar larut dalam air, dan sangat tidak stabil diudara terbuka. Katekin bersifat mudah teroksidasi pada pH mendekati normal (pH = 6,9) dan lebih stabil pada pH rendah (2,8 dan 4,9). Katekin juga mudah terurai oleh cahaya dengan laju reaksi lebih besar pada pH rendah 3,45 dibandingkan pH 4,9 (Lucida, 2006). Katekin bila mengalami pemanasan cukup lama atau pemanasan dengan larutan bersifat basa maka dengan mudah akan menjadi katekin tannat, karena berkondensasi sendiri sehingga menjadi mudah larut dalam air dingin atau air panas Zeijlstra tahun 1943 *cit*, Hayani, 2003).

Parameter standar mutu gambir (SNI) berturut-turut adalah: kadar katekin, kadar abu, kadar air, kadar bahan tidak larut dalam air, dan kadar bahan tak larut dalam alkohol (Saleh, 2007). Standar SNI 01-3391-1994 menyatakan bahwa gambir mutu kelas satu, kadar katekin minimal 40%, kadar abu maksimal 7%, kadar air maksimal 17%, kadar bahan tidak larut dalam alkohol maksimal 12% (Hayani, 2003). Berbagai penelitian telah dilakukan dalam rangka mendapatkan mutu gambir sesuai dengan SNI (Abral, 2006; Saleh, 2007; Sait *et al*, 1989; Abral, *et al*, 2008).

Katekin merupakan senyawa yang termasuk kedalam golongan flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder, dan merupakan kelompok besar antioksidan yang dinamakan polifenol yang merata terdistribusi dalam jaringan tanaman. Struktur flavonoid saling berkaitan satu dengan yang lainnya, karena mempunyai jalur biosintesis yang sama yakni melalui dua jalur terpisah "sikimat dan asetat melonat". Setelah kedua jalur

tersebut bertemu, bentuk senyawa flavonoid yang pertama kali yaitu khalkon. Bentuk katekin dan senyawa flavonoid lainnya diturunkan dari senyawa ini (Markham,1988) seperti terlihat pada Gambar 1. Biosintesis flavonoid dimulai dari perpanjangan unit fenil propanoid (C6-C3) yang berasal dari turunan sinamat (jalur sikimat) dengan 3 unit asetat atau aseta-melonat.



Gambar 1. Skema jalur biosintesis senyawa katekin.

Gambir memiliki bau yang khas, rasanya agak pahit dan mempunyai sifat yang menarik (karena kandungan kateku

tannat), dengan pasca rasa manis enak (karena kandungan katekin). Selama ini tanaman gambir yang dibudidayakan ada tiga, yang dikenal dengan tipe Udang, Cubadak, dan Riau. Ketiga tipe gambir tersebut memiliki perbedaan morfologi yang jelas terutama jika dilihat dari karakteristik daunnya. Tipe Udang memiliki ukuran daun yang lebih luas, berwarna coklat kemerahan. Tipe Cubadak memiliki daun warna hijau muda sedangkan tipe Riau daunnya berwarna hijau tua. Dari ketiga tipe gambir yang ada tersebut, tipe udang diketahui memiliki produksi daun dan rendemen getah yang lebih tinggi dibandingkan kedua tipe lainnya. Hal ini disebabkan karena tipe Udang memiliki ukuran daun yang lebih luas dibanding tipe lainnya, sehingga produksi bobot daun basahanya lebih tinggi (Daswir dan Kusuma, 1993).

Denian dan Fiani (1994) menyatakan bahwa rendemen hasil gambir tipe Udang memperlihatkan nilai kisaran yang lebih tinggi dibanding tipe lainnya. Nilai kisaran masing-masing tipe adalah Udang 6,80%-7,10%, Cubadak 6,30%-6,70%, dan Riau 6,10%-6,40%. Denian, *et al.* (2004) menyatakan bahwa tipe Udang mempunyai bobot getah kering tertinggi dibanding tipe lainnya, yaitu berkisar 750-1.200 kg/ha, sedangkan Cubadak dan Riau masing-masing berkisar 630-1.050 kg/ha dan 550-950 kg/ha.

Rendemen hasil dan kadar katekin merupakan faktor penentu yang berhubungan langsung dengan nilai ekonomi dari tanaman gambir. Penelitian mengenai metoda penentuan kadar katekin tanaman gambir juga merupakan hal yang segera dilakukan optimalisasinya. Ferita, *et al.* (2009) (penelitian pendahuluan dari rangkaian penelitian ini) mengemukakan bahwa dari hasil analisis

katekin pada empat tipe tanaman gambir menunjukkan bahwa tipe Udang memiliki kandungan katekin yang paling tinggi dibanding tipe lainnya. Kadar katekin tipe Udang berkisar dari 14% - 45%, tipe Riau Mancik 3% - 33%, tipe Riau Gadang 9%-27%, dan tipe Cubadak dari 9%- 17%.

Penanda Molekuler

Program pemuliaan tanaman yang menggunakan metoda analisis morfologi berdasarkan observasi fenotipik kadangkala didukung oleh statistika yang rumit dalam populasi. Selain itu metode ini terkesan sulit karena kerumitan genetik dari sebagian besar sifat-sifat agronomi dan adanya interaksi yang kuat dengan faktor lingkungan. Karena itu karakterisasi morfologi perlu didukung oleh karakterisasi yang dilakukan melalui penanda molekuler. Penanda molekuler dapat memberi gambaran hubungan kekerabatan yang akurat antar spesies maupun kerabat jauhnya, karena analisis DNA sebagai material genetik tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Lefebvre *et al.*, 2001).

Perkembangan ilmu pengetahuan khususnya bioteknologi yang disebut *molecular marker* berdasarkan polimorfisme yang terdapat pada protein atau DNA, telah secara luas memfasilitasi penelitian dalam disiplin ilmu seperti taksonomi, ekologi, genetika, dan pemuliaan (Weising, *et al.*, 1995). Data dan informasi yang diperoleh dengan teknik-teknik konvensional tetap dan pasti sangat berguna namun harus disadari bahwa saat ini informasi dan data molekuler sangat dibutuhkan oleh pengguna khususnya para pemulia tanaman. Karakterisasi yang menghasilkan data keanekaragaman genetik berdasarkan marka-marka molekuler seperti dengan analisis RAPD, RFLP dan SSR

(mikrosatelit), pemetaan gen maupun sidik jari DNA dapat dimanfaatkan sebagai modal dasar dalam perakitan kultivar baru (Jamsari, 2008)

Paterson *et al*, (1991) menyatakan bahwa teknologi molekuler menjanjikan ketepatan dan akurasi, serta ketelitian metoda analisis yang baik, karena peran marka DNA yang paling mendasar adalah untuk mendeteksi variasi atau perbedaan antar beberapa individu. Selain itu analisis DNA juga berguna dalam penentuan gen yang berperan penting dalam sifat tertentu dan hubungan kekerabatan (Lefebvre *et al*, 2001) karena analisis DNA sebagai material genetik tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Marka DNA lebih banyak digunakan dalam menyusun sifat genetik suatu organisme yang berguna untuk menetapkan lokasi kromosom (lokus) dari gen yang mengatur sifat tertentu, baik sifat sederhana (kualitatif) ataupun kompleks (kuantitatif). Marka DNA lebih banyak tersedia dibandingkan dengan marka lainnya, sehingga memudahkan untuk menyusun peta genetik yang lebih sempurna dengan informasi yang lengkap dari seluruh kromosom yang diteliti (Nasir, 2000).

DNA merupakan bahan genetik berupa makromolekul yang mempunyai peranan sangat penting pada makhluk hidup. DNA adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan merupakan pembawa informasi genetik yang diwariskan pada turunannya. Informasi disusun dalam bentuk kodon berupa tiga pasang basa nukleotida dan menentukan bentuk, struktur, dan fisiologi suatu makhluk hidup (Yuwono, 2006).

Dalam konteks *Marker Assisted Selection* (MAS), marka berbasis DNA dapat lebih efektif jika digunakan untuk tiga tujuan dasar,

yaitu: 1) identifikasi galur-galur tetua untuk perbaikan suatu karakter untuk tujuan khusus, 2) penelusuran alel-alel dominan atau resesif pada tiap generasi persilangan, dan 3) identifikasi individu-individu target sesuai dengan karakter yang diinginkan di antara turunan yang bersegregasi, berdasarkan komposisi alel persilangan sebagian atau seluruh genom (Azra'i, 2006).

Selain untuk mempelajari adanya variasi genetik, keperluan khusus sistem penanda sebagai alat deteksi kehadiran alel-alel spesifik yang mencirikan karakter-karakter penting tertentu dari suatu organisme merupakan kontribusi lainnya yang dapat ditunjukkan oleh penanda molekuler (Jamsari dan Ferita, 2010). Jamsari *et al* (2003) dan Jamsari *et al* (2004) telah mengembangkan sistem penanda molekuler untuk keperluan diagnosis dini untuk jenis kelamin tanaman asparagus pada fase kecambah. Jamsari dan Reflin (2008) juga telah mendesain kombinasi primer spesifik yang dapat digunakan untuk keperluan deteksi dini pathogen penyebab anthrakhnosa pada tanaman cabai. Selanjutnya Jamsari dan Ferita (2009); Jamsari dan Ferita (2010) juga telah mendesain kombinasi primer spesifik dalam pengujian sistem deteksi cepat berbasis PCR untuk mengidentifikasi spesies *Colletotrichum capsici* dan *Colletotrichum gleosporoides*, serta telah terbukti mempunyai akurasi yang tinggi.

Sesuai dengan fungsinya sebagai penanda, maka kehadiran penanda molekuler harus dapat memberikan informasi yang berguna tentang posisi gen-gen yang diiringinya. Oleh karena itu, maka selanjutnya yang harus dimiliki oleh suatu penanda adalah menunjukkan secara akurat posisi dari gen-gen relatif terhadap posisi penanda itu sendiri. Secara umum ada dua pendekatan yang

digunakan untuk menunjukkan posisi suatu penanda baik penanda berbasis morfologis, enzymatis maupun molekuler dengan gen-gen yang diiringinya, yakni posisi secara genetis dan posisi secara fisik. Posisi genetis adalah posisi yang didasarkan atas hasil analisis genetik dengan menggunakan perhitungan-perhitungan secara matematis, sedangkan posisi secara fisik ditentukan berdasarkan pengamatan fisik penanda tersebut dengan menggunakan teknik-teknik molekuler atau pengamatan *in situ* (Jamsari, 2007).

Berbagai macam sistem penanda berbasis DNA telah banyak dikembangkan. Diantaranya adalah RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) oleh Botstein *et al.* (1980), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990), mini dan mikrosatellite (Jeffreys *et al.*, 1985; Akkaya *et al.*, 1992; Sanchez de la Hoz, *et al.*, 1996). Olson *et al.* (1989) memperkenalkan sistem penanda STS (*Sequence Tagged Sites*) yakni suatu sistem penanda molekuler berbasis informasi sekuens yang memiliki spesifitas yang tinggi dibanding dengan sistem penanda RAPD. Sistem penanda STS memiliki berbagai derivat seperti CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphism Sequences*) (Konieczny dan Ausubel, 1993), SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*). Sistem penanda molekuler lain yang berbasis PCR yang cukup terkenal adalah AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) yang dikembangkan oleh Vos *et al.*, (1995). Wang *et al.*, (1998) mengembangkan suatu sistem penanda berbasis sekuens yang dikenal dengan SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Salah satu pendekatan yang dapat dilakukan untuk estimasi

variabilitas genetik adalah melalui marka genetik menggunakan analisis RAPD. Penanda RAPD yang dikembangkan oleh Williams, *et al.* (1990) merupakan teknik yang lebih cepat, lebih mudah dan lebih murah dibandingkan dengan RFLP dan AFLP (Ruiz *et al.*, 2000). Disamping itu sistem penanda RAPD juga telah diterapkan oleh berbagai pakar untuk melakukan karakterisasi varietas-varietas barley, brassica (Babaoglu *et al.*, 2004; Shiran *et al.*, 2006), seledri, bawang, kentang, dan tomat (Hu and Quiros, 1991; Kresovich, *et al.*, 1997; Yang and Quiros, 1993; Tinker, *et al.*, 1993; Dweikat, *et al.*, 1993, dan Yasmin *et al.*, 2006), *Shorea leavis* (Siregar, *et al.*, 1998), dan pada tanaman talas (Prana dan Hartati, 2003)

Beberapa sistem penanda seperti RFLP, AFLP, SNP, mikrosatelit, maupun minisatelit memerlukan keahlian yang lebih kompleks dalam operasionalnya dibandingkan dengan sistem penanda seperti RAPD dan STS, serta beberapa turunannya yakni CAPS dan SCARs. Penanda RAPD dan STS dianggap merupakan sistem penanda yang sangat simple dan paling ekonomis. Namun sistem penanda RAPD memiliki tingkat spesifisitas yang rendah. Untuk meningkatkan spesifisitas dan terus mempertahankan kemudahannya, maka suatu sistem penanda yang satu dikonversi menjadi sistem penanda lain (Jamsari, 2007).

Sistem penanda RAPD mempunyai kelemahan sehubungan dengan hasil yang kurang konsisten. Sebagaimana yang dikemukakan oleh Yu dan Pauls, (1992); Yang, *et al.*, (1996), menyatakan bahwa banyak faktor yang mempengaruhi ketidakstabilan dan sensitifitas penanda RAPD seperti rasio templet DNA dan primer, konsentrasi ion Mg dan *Taq-Polymerase*

yang digunakan dan jenis mesin PCR yang dipakai, serta rendahnya suhu annealing dan pendeknya primer RAPD yang digunakan.

Resolusi dan reliabilitas pola pita RAPD bukan saja ditentukan oleh primer dalam PCR, tetapi juga dipengaruhi oleh kualitas gel, kondisi *running* gel, lamanya separasi fragmen dalam gel, serta prosedur laboratorium (Qi dan Lindhout, 1979). Berkaitan dengan fungsinya sebagai *Marker Assisted Selection* (MAS), penanda RAPD yang sudah terbukti terkait dengan sifat tertentu dapat dikonversi kedalam sistem sequens *characterize amplified region* (SCARs) (Paran, *et al*, 1998), serta sistem STS dan CAPs.

Dasar analisis RAPD adalah menggunakan mesin PCR yang mampu mengamplifikasi sekuen DNA secara *in vitro*. Teknik ini melibatkan penempelan primer tertentu yang dirancang sesuai dengan kebutuhan. Tiap primer boleh jadi berbeda untuk menelaah keanekaragaman genetik kelompok yang berbeda. Penggunaan teknik RAPD memang memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang diseleksi dengan menggunakan satu primer arbitrari, terutama karena amplifikasi DNA secara *in vitro* dapat dilakukan dengan baik dan cepat dengan adanya PCR (Suryanto, 2003), dan membutuhkan sampel DNA lebih rendah (0,5-50 ng), tidak memerlukan radioisotop, tidak terlalu membutuhkan keahlian dalam melaksanakannya dibandingkan dengan RFLP (Demake and Adams tahun 1994 *cit. Karsinah et al*, 2002).

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction* = PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk menggandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida tertentu dengan cara *in*

vitro. Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary Mullis, dan sekarang metode ini telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik (Yuwono, 2006). Pada proses PCR ada 4 komponen utama yaitu; 1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, 2) Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen nukleotida pendek (15 – 25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, 3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan 4) enzim DNA polymerase, yaitu enzim yang melakukan katalis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang penting adalah senyawa buffer (Stansfield, *et al*, 2006).

Proses PCR terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi, annealing dan ekstensi. Pada tahap denaturasi terjadi pemisahan untai ganda DNA menjadi pita tunggal dengan pemanasan antara 94°C sampai 96°C. Setelah pita ganda DNA terpisah menjadi untai tunggal maka tahapan berikutnya adalah annealing. Annealing merupakan tahapan dimana terjadi penempelan primer kesisi tempelan (*binding site*) untai tunggal DNA templet yang terjadi pada suhu tertentu. Tahapan yang terakhir disebut ekstensi dimana pada tahap ini terjadi pembentukan molekul DNA sintesis. Pembentukan untai ini dikatalisis oleh enzim Taq Polymerase dengan dNTPs bebas sebagai penyusunnya (Jamsari, 2007).

Teknik PCR merupakan suatu teknik amplifikasi DNA secara *in vitro* yang dapat digunakan dalam mengidentifikasi klon-klon target dari suatu pustaka DNA. Prinsip identifikasi dengan menggunakan metode PCR adalah menggabungkan kemampuan hibridisasi yang dalam hal ini antara primer spesifik dengan sisi

ikatan (*binding site*) yang terdapat pada DNA didalam pustaka DNA dengan kemampuan sintesis pita DNA baru dengan bantuan enzim DNA *polymerase* (Jamsari, 2004).

Penggunaan metode PCR memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan metode hibridisasi. Salah satu keunggulannya adalah tidak perlu menggunakan bahan radioaktif dalam proses hibridisasi. Namun pendeteksian dengan metode PCR membutuhkan ketersediaan DNA murni yang mutlak harus disediakan dan waktu yang dibutuhkan dalam penggunaan metode PCR hanya satu hari (Jamsari, 2007).

Pendeteksian organisme menggunakan PCR telah banyak digunakan baik pada mikroorganisme, hewan maupun tumbuhan karena pendeteksian cara ini sangat sensitif. PCR adalah metode pengujian yang didasarkan pada perbedaan di dalam asam nukleat. Metode deteksi dengan PCR mempunyai keunggulan karena sistem analisisnya cepat, mempunyai sensitifitas yang tinggi, dan dapat mengidentifikasi organisme dengan jumlah yang sedikit (Babaloka, 2003; Lee, *et al.*, 1997; Lopez, *et al.*, 2003; Pastrik and Rainey,1999). Penemuan beberapa peneliti menunjukkan bahwa kepekaan dan kekhasan serta keberhasilan amplifikasi DNA dengan PCR bergantung pada jenis primer, panjang ampikon, dan bagian gen yang diampifikasi (Singh, *et al.*, 2005; Zou, *et al.*, 2005).

Metode PCR dapat mendeteksi klon-klon yang mengandung DNA target menggunakan berbagai metode *fingerprinting*, salah satu diantaranya adalah RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) yang diperkenalkan oleh Williams, *et al.*, pada tahun 1990 (Williams, *et al.*, 1990). Pada teknik RAPD, amplifikasi DNA

dilakukan secara *in vitro* dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*), yaitu dengan mengatur variasi temperatur pada mesin PCR, selama pengulangan siklus denaturasi, primer aneling, dan perpanjangan pita DNA dengan bantuan enzim Taq-polimerase. Teknik ini memerlukan primer yang panjangnya 10-nukleotida untuk segmen pemula dalam pembentukan fragmen tertentu dari DNA (Nair, 1993).

Penggunaan penanda RAPD relatif sederhana dan mudah dalam hal preparasi. Teknik RAPD memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya. Teknik ini juga mampu menghasilkan jumlah karakter yang relatif tidak terbatas, sehingga sangat membantu untuk keperluan analisis keanekaragaman organisme yang tidak diketahui latar belakang genomnya. Pada tanaman tahunan RAPD dapat digunakan untuk meningkatkan efisiensi seleksi awal (Suryanto, 2003)

Metode standar yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi dan memurnikan fragmen DNA adalah elektroforesis gel agarose. Agarose merupakan suatu fraksi dari agar-agar yang merupakan polimer netral dan sedikit mengandung sulfat. Agarose dikenal sebagai fraksi pembentuk gel dari agar-agar, dimana sifat-sifat gel yang dihasilkannya mendekati sifat-sifat gel ideal untuk keperluan bidang bioteknologi. Elektroforesis gel agarose adalah metode pemisahan molekul DNA dan RNA menurut muatan, ukuran, dan bentuk. Teknik ini sederhana, cepat terbentuk, dan mampu memisahkan campuran potongan DNA sesuai dengan ukurannya secara akurat, dibanding dengan densitas gradient sentrifugasi. Untuk mendeteksi lokasi potongan-potongan DNA berupa bands-DNA

pada gel agarose digunakan pewarna yang mengandung fluoresen dengan konsentrasi rendah, seperti *intercalating agent* ethidium bromide (EtBr). (<http://belindch.wordpress.com/pengenalan-elektroforesis/2010>)

Faktor yang menentukan dalam penggunaan elektroforesis adalah berat molekul, konsentrasi gel, bentuk konfirmasi dari molekul DNA dan kekuatan arus listrik. Senyawa-senyawa yang memiliki berat molekul yang lebih besar akan bermigrasi lebih lambat dibandingkan dengan senyawa yang mempunyai berat molekul lebih kecil. Semakin tinggi konsentrasi gel yang digunakan, berarti semakin kecil pori-pori gel, sehingga semakin lambat laju migrasi. Faktor sifat fisik molekul DNA juga mempengaruhi laju migrasi elektroforesis. Molekul DNA yang mengalami relaksasi cenderung bermigrasi lebih lambat daripada molekul DNA yang berbentuk superkoil (Jamsari, 2007).

Dalam melakukan amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan menggunakan PCR, salah satu bahan yang penting peranannya adalah primer. Primer merupakan titik awal pembentukan rantai polinukleotid sintetis. Pada saat proses annealing yang terjadi pada suhu tertentu (tergantung basa penyusunnya), primer akan melekat pada DNA templet pada *binding site* yang sesuai (David, 2005). Komposisi, ukuran, dan homologi primer terhadap DNA target harus ditentukan dengan baik, supaya diperoleh produk amplifikasi sesuai harapan pada saat melakukan PCR (<http://biomol.wordpress.com/bahan-ajar/pcr/2010>).

Primer adalah oligonucleotida spesifik yang komplemen dengan daerah yang telah ditentukan pada DNA target sebagai tempat dimulainya sintesis DNA baru. Syarat sebuah primer yang ideal

dalam PCR adalah: (1) Ukuran primer berkisar antara 17-28 basa; (2) Komposisi basa adalah 50-60% (C+G); (3) Primer PCR tidak boleh memiliki ujung 3' berupa G atau C, atau CG atau GC. Hal ini untuk menghindari terjadinya "*breathing*" pada ujung dan meningkatkan efisiensi priming; (4) Suhu anealing (T_m) berkisar antara 55°C-80°C; (5) Ujung 3' primer bukan merupakan komplementer (pasangan basa) karena akan menyebabkan terjadinya dimer primer; (6) Primer Reverse dan primer Forward harus dihindari saling berkomplemen; (Innis dan Gelfand, 1990; Vieux, *et al*, 2002). Primer yang berukuran pendek tidak sempurna melakukan proses annealing, hal ini disebabkan nilai Temperatur Melting (T_m)-nya rendah, dimana rumus $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$.

Aplikasi desain primer spesifik saat ini telah dimudahkan dengan adanya berbagai macam program / *software* yang dapat diakses melalui internet atau paket program komputer seperti Oligos V.30. Desain primer dilakukan menggunakan program Primer3 (<http://www.biotools.umassmed.edu/2010>) dapat digunakan untuk menentukan posisi primer forward dan reverse dalam satu sekuen DNA yang panjang, sesuai dengan kriteria yang dipakai misalnya berapa jumlah basa penyusunnya, kandungan G+C, panjang fragmen produk, dan T_m . Program Primer3 dapat secara langsung menentukan sekuen calon primernya.

Pada prinsipnya program untuk mendesain primer dari internet ataupun program Oligos mempunyai kemiripan dalam proses serta hasilnya. Pemilihan salah satu program yang akan digunakan dalam mendesain primer bergantung pada pemudahan mengaksesnya, kemudahan prosedurnya serta kelengkapan

informasi yang dapat diberikan oleh program tersebut. Namun demikian analisis yang dilakukan tidak menjamin bahwa primer yang dipilih secara langsung berhasil dengan baik, sebab perlu dilakukan optimasi, terutama dalam memilih suhu annealing serta jumlah siklus yang dibutuhkan.

Kloning DNA

Dalam kloning DNA memiliki empat hal penting yaitu :1) metode untuk menghasilkan fragmen-fragmen DNA, 2) reaksi-reaksi yang menggabungkan DNA asing ke suatu vektor, 3) cara pengenalan rekombinan buatan ke dalam sel inang sehingga dapat bereplikasi didalamnya, dan 4) metode untuk menyeleksi klon-klon dari sel-sel penerima yang telah memperoleh rekombinan (Old dan Primrose, 1989).

Teknologi DNA rekombinan merupakan teknik yang dapat digunakan untuk menguraikan mekanisme-mekanisme kompleks yang berkaitan dengan ekspresi gen. Rekayasa genetika merupakan salah satu teknik DNA rekombinan. Teknik ini mengubah urutan DNA untuk memodifikasi gen, yang selanjutnya dimasukkan kembali ke dalam sel atau organism sehingga dapat meningkatkan (*over ekspresi*) atau menurunkan (*silencing*) sejumlah protein yang dihasilkan tanaman transgenik. Gen rekayasa dapat berasal dari spesies yang sama atau berbeda dengan spesies tanaman yang akan disisipkan gen tambahan (Alberts, *et al*, 1994).

Dalam biologi molekuler, teknologi DNA rekombinan merupakan perpaduan dari sejumlah teknik, yaitu ; 1) restriksi DNA dengan enzim nuklease, sehingga memudahkan isolasi dan memanipulasi setiap gen yang diinginkan, 2) kloning DNA, yaitu jika sebuah

fragmen DNA tertentu telah diintegrasikan ke dalam suatu unsur genetik yang mampu menggandakan diri sendiri (plasmid atau virus) dan hidup dalam bakteri, sehingga mampu memproduksi sebuah molekul DNA menjadi jutaan kali salinan identik, dan 3) rekayasa genetika, yaitu suatu cara mengubah urutan DNA untuk memodifikasi gen, kemudian gen tersebut dimasukkan kembali kedalam sel suatu organisme (Alberts, *et al*, 1994).

Teknik kloning dilakukan biasanya menggunakan plasmid sebagai vektor yang sesuai dipilih untuk menjadi penerima sisipan gen target sebagai DNA donor. Plasmid merupakan DNA ekstrakromosomal berbentuk sirkular tertutup, berpita ganda, dan berukuran 1kb – 200 kb, Plasmid adalah molekul DNA tambahan yang terdapat pada kebanyakan sel prokariot dan juga beberapa sel eukariot, dan umumnya bukan merupakan komponen esensial dari inangnya (Jamsari, 2007). Plasmid merupakan suatu elemen genetik (*DNA-Plasmid*), yang mempunyai berat antara 1 – 3 % dari berat kromosom bakteri. Plasmid memiliki faktor resistensi (faktor R) yang terdiri dari segmen RTF (*Resistance Transfer Factor*) dan determinan *-r* (unit-*r*). Segmen RTF memungkinkan terjadinya perpindahan faktor R dan menularkan sifat resistensinya pada sel lain. Plasmid terdiri dari beberapa faktor R, sehingga plasmid mampu membawa sifat resistensi terhadap berbagai antibiotika atau bersifat multiresisten (Wegrzyn, 2005). DNA donor dan vektor dipotong dengan enzim restriksi yang sama, kemudian diinkubasi bersama dengan ligase untuk menyambungkan fragmen-fragmen DNA donor dengan plasmid. Hasilnya adalah plasmid rekombinan yang mengandung fragmen DNA target. Plasmid rekombinan kemudian digunakan untuk

mentransformasi sebuah sel inang bakteri, sehingga dihasilkan sebuah fragmen genetik baru dari bakteri itu yang dapat menjaga plasmid rekombinan dengan stabil (Stansfield, *et al*, 2006).

Plasmid umumnya berada pada struktur tersier yang sangat kuat atau disebut mempunyai bentuk *covalently closed circular* (CCC). Jika salah satu untai polinukleotida terputus, maka untai ganda akan kembali ke keadaan normal, yakni bereklasasi, dan plasmid akan berubah menjadi bentuk alternative yang disebut sirkular terbuka (*open circular* = oc). Bila dibandingkan dengan DNA kromosom, ikatan kedua untai gandanya jauh lebih longgar dan mempunyai insbuh aksial yang sangat tinggi. Perbedaan tersebut menyebabkan DNA plasmid jauh lebih resisten terhadap denaturasi daripada DNA kromosom. Justru itu, aplikasi kondisi denaturasi dapat memisahkan DNA plasmid dengan DNA kromosom (Brown, 1991).

DNA asing yang diambil oleh sel kompeten dapat berupa DNA bebas atau DNA sisipan dalam suatu vektor. Vektor-vektor yang membawa DNA tersebut terdiri dari plasmid, bakteriofage, dan kosmid (Snyder and Champness, 1977). Sebagai komponen ekstragenomik, plasmid memiliki gen yang mengendalikan kemampuan plasmid untuk memperbanyak diri atau replikasi secara autonom, sehingga perbanyak molekul plasmid tersebut tergantung pada kendali perbanyak sel inangnya. Replikasi DNA plasmid dikendalikan oleh seperangkat enzim yang sama dengan yang digunakan untuk replikasi kromosom bakteri. Jika replikasi DNA plasmid bergabung/bertepatan dengan DNA kromosom inangnya, dikatakan replikasi plasmid berada dalam kontrol ketat, sehingga pada kondisi ini di dalam setiap sel bakteri hanya ada

satu atau beberapa kopi saja. Sebaliknya jika replikasi berlangsung tidak bertepatan dengan replikasi sel inangnya, maka disebut dalam kondisi kontrol longgar, maka jumlah kopi plasmid dapat mencapai 10 -200 kopi pada setiap sel bakteri, bahkan jumlah tersebut dapat mencapai beberapa ribu kopi (Jamsari, 2007).

Plasmid yang banyak dipakai sekarang adalah plasmid yang telah dimodifikasi (dikonstruksi, ditambah, dan dikurangi) pada sifat-sifat tertentu sehingga memudahkan dalam melakukan kloning DNA. Plasmid yang sering digunakan adalah yang replikasinya dalam kontrol longgar, dan berukuran relatif kecil (2000 – 4000 bp). Menurut Brock, *et al*, (1994), karakteristik penting dari plasmid adalah : 1) mempunyai ori (*origin of replication*) sehingga dapat bereplikasi di dalam sel inang secara otonomi, 2) mempunyai marker seleksi (*selectable marker*), dan 3) mempunyai situs kloning (*cloning sites*). Kelebihan yang dimiliki oleh plasmid dibandingkan vektor lainnya sehingga lebih banyak digunakan adalah : a) mudah dimanipulasi, b) mempunyai jumlah kopi yang banyak (kuantitasnya banyak), dan c) mempunyai marker untuk seleksi yakni gen ketahanan terhadap antibiotik tertentu sehingga lebih memudahkan dalam mendeteksi plasmid yang membawa gen tertentu.

Saat ini transformasi DNA dilakukan dengan menggunakan perantara yaitu vektor, yang selanjutnya juga dikembangkan pada bakteri *E.coli*. Pada tahapan transformasi melibatkan molekul CaCl_2 yang dapat menyebabkan sel-sel bakteri membengkak dan membentuk sferoplas yang kehilangan protein periplasmiknya sehingga dinding sel menjadi bocor. DNA yang ditambahkan ke

dalam campuran ini akan membentuk kompleks resisten DNase dengan ion-ion Ca^{2+} yang terikat pada permukaan sel. Kompleks tersebut diambil oleh sel selama perlakuan kejutan panas (*heat shock*) yang diberikan (Susanto, 2009).

Transformasi (pengambilan DNA oleh sel bakteri) dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu : (1) dengan cara *heat shock* (kejutan panas) dimana campuran sel dan DNA plasmid rekombinan didinginkan dalam waktu yang lama, kemudian dipanaskan dengan segera pada suhu 42°C , (2) dengan cara elektroporasi (kejutan listrik) menggunakan suatu alat yang dialiri arus listrik. Untuk memasukkan DNA ke dalam sel bakteri, sel tersebut harus diberi perlakuan agar menjadi sel kompeten, yaitu sel yang mampu menerima DNA dari luar. Kemampuan paling tinggi untuk memasukkan DNA dari luar terjadi pada sel yang berada dalam fase logaritmik, yaitu pada waktu pertumbuhan sel sedang cepat. Perlakuan dengan CaCl_2 menyebabkan dinding sel menjadi lebih permeabel dan bermuatan positif, sehingga dapat menarik DNA yang bermuatan negatif.

Sekuensing DNA

Sekuensing DNA merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengetahui urutan nukleotida atau basa dalam suatu fragmen DNA. DNA menyimpan informasi genetik dalam bentuk urutan nukleotida. Dengan mengetahui urutan nukleotida suatu gen, maka dapat ditentukan urutan asam amino protein yang dikodonya. Sebaliknya, urutan asam amino protein tidak dapat memberikan informasi lengkap tentang urutan nukleotida gen

yang mengkodonya. Karena alasan tersebut, selain karena mahalnyanya sekuensing protein, maka sekuensing DNA jauh lebih banyak digunakan (Gaffar, 2007).

Sekuensing asam nukleat adalah proses penentuan urutan nukleotida pada suatu fragmen DNA atau RNA. Sekuen RNA biasanya ditentukan dengan melakukan sekuensing terhadap DNA cetaknya (Suryanto, 2003). Informasi sekuen nukleotida sangat penting dalam bidang kloning molekuler, karena dengan mengetahui sekuen DNA maka dapat ditentukan situs enzim restriksi spesifik atau dapat memprediksi *open reading frame* (ORF) sekuen DNA yang bersangkutan.

Teknik sekuensing pertama kali diperkenalkan oleh Maxam Gilbert dengan metoda kimia murni. Namun teknik ini sebagian besar telah digantikan oleh teknik sekuensing yang dikembangkan oleh Frederick Sanger yang menggunakan metoda terminasi rantai (*chain terminator*). Teknik tersebut melibatkan terminasi atau penghentian reaksi sintesis DNA *in vitro* yang spesifik untuk sekuens tertentu menggunakan substrat nukleotida yang telah dimodifikasi (Suryanto, 2003).

Metode sekuensing DNA yang paling banyak digunakan adalah metode dideoksi Sanger. Ada tiga tahapan penting yang harus dilakukan pada sekuensing, yaitu: 1) pembentukan fragmen-fragmen DNA untai tunggal dengan berbagai ukuran melalui proses PCR, 2) pemisahan fragmen-fragmen DNA dengan gel elektroforesis poliakrilamida, dan 3) pembacaan hasil elektroforesis (Gaffar, 2007).

Teknik terminasi rantai ini menggunakan enzim polymerase dengan beberapa tahap modifikasi yaitu menggunakan pelabelan

senyawa berpendar (*fluoresens*). Hasil pembacaan berupa elektrophoregram hasil scanner terhadap fragmen-fragmen yang ada dalam gel poliakrilamid (Jamsari, 2007). Pada metoda ini, DNA yang akan disekuensi diinkubasi dengan DNA *polymerase I*, primer yang sesuai, dan empat jenis dNTP (*deoksi nukleotida trifospat*) untuk reaksi polimerase. Campuran reaksi melibatkan senyawa penanda yang bersifat berpendar yang memungkinkan hasil reaksi polimerasinya mudah untuk dideteksi. Senyawa penting dalam campuran tersebut adalah ddNTP yang dihilangkan gugus 3-OH pada deoksi nukleotidanya (Muladno, 2002; Voet, *et al*, 1999). Tiap-tiap nukleotida menghasilkan puncak (*peak*) dengan warna yang dapat dibedakan pada elektrophoregram yaitu A berwarna hijau, G berwarna hitam, C berwarna biru, dan nukleotida T berwarna merah (Ratnayani, *et al*, 2007).

Ekstensi rantai DNA pada sekuensing terminasi rantai dimulai pada situs spesifik pada DNA cetakan menggunakan oligonukleotida pendek (primer) yang komplementer terhadap DNA pada daerah situs tersebut. Primer tersebut diperpanjang menggunakan DNA polimerase, dan enzim yang mereplikasi DNA. Bersama dengan primer, DNA polimerase, juga diikutkan empat jenis basa deoksinukleotida (satuan pembentuk DNA) dan nukleotida pemutus atau penghenti rantai (*terminator* rantai) pada konsentrasi rendah (biasanya di-deoksinukleotida) (Yuwono, 2006).

Cara lain pelabelan primer adalah dengan melabel pemutus rantainya, lazim disebut metode sekuensing *dye terminator*. Keunggulan cara ini adalah bahwa seluruh proses sekuensing dapat dilakukan dalam satu reaksi, dibandingkan dengan empat

reaksi terpisah yang diperlukan pada penggunaan *primer* berlabel. Pada cara tersebut, masing-masing dideoksinukleotida pemutus rantai ditandai dengan pewarna *fluoresens*, yang berpendar pada panjang gelombang yang berbeda-beda ([http:// biomol.Wordpress.com/ bahan-ajar/sekuensing-DNA2011](http://biomol.Wordpress.com/bahan-ajar/sekuensing-DNA2011)).

Metode tersebut lebih mudah dan lebih cepat dibandingkan penggunaan *primer* berwarna, namun dapat menimbulkan ketidaksamaan tinggi kurva atau puncak (*peak*) yang disebabkan oleh ketidaksamaan penggabungan pemutus rantai berwarna berukuran besar pada pertumbuhan DNA (ketidaksamaan tersebut bergantung pada DNA cetakan). Masalah tersebut telah dapat dikurangi secara nyata dengan penggunaan macam-macam enzim dan pewarna baru yang meminimalkan perbedaan dalam penggabungan. Metode ini kini digunakan pada sebagian besar usaha reaksi sekuensing karena lebih sederhana dan lebih murah. *Primer-primer* yang digunakan tidak perlu dilabel secara terpisah (yang bisa jadi cukup mahal untuk *primer* yang dibuat untuk sekali pakai), walaupun hal tersebut tidak terlalu bermasalah dalam penggunaan *universal primer* ([http:// biomol.Wordpress.com/ bahan-ajar/sekuensing-dna2011](http://biomol.Wordpress.com/bahan-ajar/sekuensing-dna2011)).

Sekarang untuk melakukan sekuensing DNA dipermudah dengan bantuan komputer dalam menganalisis sekuens DNA secara otomatis. Pengoperasian sekuensing pada skala besar dipercepat dengan cara otomatis, sehingga mampu melakukan sekuensing DNA yang berukuran besar dalam waktu singkat, sejak diciptakan mesin DNA *sequenser*. Pada prinsipnya polimorfisme dilihat dari urutan basa atau sekuens DNA dari fragmen tertentu dari suatu genom organisme (Voet, *et al*, 2000; Suryanto , 2003).

BAB 3

IDENTIFIKASI MORFOLOGI, ANATOMI, MOLEKULER TERKAIT KATEKIN

Pengamatan data karakter morfologi tanaman gambir dilaksanakan di Kebun Koleksi Gambir Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang, lokasi kebun tersebut berada pada ketinggian 337 meter di atas permukaan laut. Percobaan analisis kadar katekin dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tanaman Fakultas Pertanian, dan Laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Andalas. Pengamatan struktur anatomi daun dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan IPB Bogor. Percobaan isolasi DNA, amplifikasi PCR, dan kloning DNA dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang.. Sedangkan kegiatan sekuensing dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkmann Jakarta. Secara keseluruhan penelitian dilaksanakan selama 25 bulan yakni mulai April 2009 sampai dengan Mei 2011.

Bahan dan Alat

Bahan tanaman yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini adalah empat tipe tanaman gambir (Udang, Cubadak, Riau Gadang, dan Riau Mancik) dengan umur 2 tahun enam bulan, yang terdapat di kebun koleksi tanaman gambir Fakultas

Pertanian. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis kadar katekin adalah katekin standar yaitu katekin murni sebagai pembanding (yang diperoleh dari laboratorium Kimia Organik Bahan Alam/KOBA Farmasi Unand atas kebaikan Prof. Dr. Amri Bakhtiar), etil asetat (p.a), dua pasang daun ketiga dan daun ke empat dari pucuk cabang tanaman gambir. Untuk pengamatan struktur anatomi daun digunakan 5 individu dalam pool katekin tinggi, dan 5 individu dalam pool katekin rendah, masing-masing individu diulang 3 kali, atau 3 helai daun, sehingga total sampel adalah 30 helai daun. Bahan kimia yang dipergunakan yaitu ; FAA (formaldehid, asam asetat glacial, alkohol 70%, safranin, fastgreen, paraffin, Tertier Butil Alkohol (TBA), dan etanol 100%. Material untuk isolasi DNA adalah dua helai pucuk yang masih muda. Beberapa bahan kimia yang dipakai untuk isolasi DNA dan reaksi PCR adalah : CTAB, NaCl, Tris, HCl, Ethanol (p.a), Ethidiumbromida, Phenol, Chloroform (p.a), Isoamyl alkohol, NaOH β -Mercaptoethanol, RNase, RTG-PCR Kit (GE,USA), ddH₂O standard PCR, dan primer RAPD dari operon, asam asetat glacial (p.a), dan β -hydroxyquinoline (p.a), agarose, ethanol 99% (p.a), alkohol 70% dan TBE. Bahan-bahan untuk purifikasi dan kloning adalah; kit purifikasi (Promega, USA), bakteri *E.coli* strain DH5 α , yeast ekstrak, trypton, pepton, CaCl₂, NaOH, *pGem T-Easy vektor*, primer T7 dan SP6, ampicillin, X-gal, IPTG, aquabides, spiritus, ethanol 99% (p.a) dan alkohol 70%.

Alat-alat yang dipakai untuk analisis katekin adalah : UV-VIS *spektrofotometer ultra violet* (Genesis-UV), timbangan analitik, kurvet kuarsa, *hot plate magnetic stirrer*, cawan petri, mortar, alu, corong penyaring biasa, kertas saring kualitatif, erlenmeyer 100

ml, gelas ukur, batang pengaduk. Untuk pengamatan karakter morfologi digunakan alat-alat, kaca pembesar, kamera digital (Nikon Coolpix S51), timbangan digital, mistar, kertas label, jangka sorong, busur, spidol, pena, pensil, *colour chart* (*Munsell Color Charts for Plant Tissue*), yaitu hijau tua = 5GY4/6, hijau muda = 2,5GY6/10, hijau kemerahan = 2,5Y7/6, hijau kecoklatan = 5Y5/4, coklat muda = 7,5YR5/4, coklat tua = 5YR5/2, merah muda = 5YR6/6, merah tua = 10R4/6, hitam = 10R3/2. Alat untuk pengamatan struktur anatomi daun digunakan; mikrotom putar (RV-140), blok dan oven paraffin, *Strectcher* (pemanas), mikroskop (Olympus tipe CH20) yang dilengkapi dengan kamera (Olympus Tipe Dp12).

Alat untuk pengamatan isolasi DNA dan amplifikasi PCR digunakan; mortar, *vortex*, *microcentrifuge*, *autoclave*, *water bath*, pH meter, pipet mikro, *microtube*, *microwave*, spatula, ependorf 2 ml dan 1,5 ml, mesin PCR (Biometra-Jerman), unit *elektrophoresis* (Mupid-Ex-Jepang), *gel documentation system* (Cybertech-Jerman), *UV-Transluminator* (Biometra-Jerman). Kegiatan purifikasi dan kloning digunakan alat-alat; *water bath*, *incubator shaker*, *centrifuge* dingin, cawan petri, tabung reaksi, lampu spiritus, *spreader*, erlenmeyer, tusuk gigi, aluminium foil, plastik warp, tissue, dan oven suhu 37°C, program Statistix8, program PAST, program Bioedit, *vecscreen ncbi*, BLAST, dan Clustal W, Oligos 3.0, dan Primer3 yang dapat diunduh melalui internet.

Metodologi Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 3 tahap. Tahap pertama (I) dilakukan seleksi tanaman gambir berkadar katekin tinggi dan rendah yang terdiri dari 3 kegiatan, sebagai berikut.

- a. Identifikasi dan seleksi populasi genotipe gambir berkadar katekin tinggi dan rendah. Kegiatan koleksi dan seleksi ini bertujuan untuk mendapatkan populasi tanaman gambir yang mempunyai potensi genetik berkadar katekin tinggi dan berkadar katekin rendah. Untuk penentuan genotipe-genotipe tanaman gambir tersebut, telah dianalisis kadar katekinnya berdasarkan tipe-tipe yang dibudidayakan selama ini oleh petani gambir di Sumatera Barat, yaitu tipe Udang, Cubadak, Riau Gadang, dan Riau Mancik.
- b. Kajian karakter morfologi dan struktur anatomi. Pengamatan karakter morfologi dilakukan terhadap 48 tanaman, yakni 24 individu tipe Udang, dan delapan individu masing-masing pada tipe Cubadak, Riau Gadang, serta Riau Mancik. Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui karakter-karakter morfologi yang dapat digunakan sebagai penciri dari tanaman gambir yang mempunyai potensi genetik kadar katekin tinggi dan penciri kadar katekin rendah. Untuk struktur karakter anatomi dilakukan pada kelompok tanaman berpotensi katekin tinggi (lima tanaman), dan kelompok tanaman gambir berpotensi katekin rendah (lima tanaman).
- c. Analisis molekuler secara fingerprinting berbasis RAPD. Analisis molekuler dilakukan hanya pada gambir tipe Udang. Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui secara molekuler fragmen-fragmen yang dapat memberikan differensiasi antara tanaman gambir berpotensi genetik kadar katekin tinggi dan katekin rendah dan dilanjutkan dengan seleksi primer RAPD pada tingkat seleksi individu. Dalam hal ini dilakukan uji konsistensi dari primer RAPD terpilih, yakni primer yang memperlihatkan

polimorfisme dari fragmen potensi kadar katekin tinggi yang ada dalam pool tanaman gambir.

Tahap kedua (II) adalah purifikasi, kloning, dan sekuensing fragmen spesifik terkait potensi kadar katekin tinggi; terdiri dari 2 kegiatan yaitu :

a. Isolasi dan purifikasi fragmen spesifik terkait potensi kadar katekin tinggi pada tanaman gambir. Kegiatan ini bertujuan untuk memisahkan fragmen target terpilih yang benar-benar hanya merupakan produk terkait potensi genetik kadar katekin tinggi. Produk ini merupakan langkah mutlak untuk melakukan kegiatan kloning dan sekuensing.

b. Kloning dan sekuensing fragmen-fragmen terkait potensi kadar katekin tinggi. Kloning menggunakan plasmid *pGemT-Easy vector* dengan inang bakteri *E-coli* strain DH5 α . Kegiatan kloning bertujuan untuk menggandakan fragmen target hasil purifikasi, sedangkan kegiatan sekuensing bertujuan untuk mengidentifikasi urutan basa nukleotida dari fragmen spesifik yang terkait potensi kadar katekin tinggi. Sekuens yang dipeoleh digunakan untuk pendesainan primer spesifik, yang dapat diaplikasikan untuk mendekteksi tanaman gambir yang memiliki potensi kadar katekin tinggi.

Tahap ketiga (III) adalah pendesainan primer dan uji akurasi sistem penanda molekuler yang terdiri dari dua kegiatan yaitu;

a. Pendesainan primer menggunakan program Oligos V.30 dan Primer3 yang diakses secara *on line* dari internet, dan disintesis di perusahaan pensintesis oligonukleotida pada perusahaan 1st base.

b. Melakukan uji akurasi sistem penanda molekuler. Primer spesifik yang telah didesain, diuji dengan DNA genom awal, dan DNA-DNA sampel tanaman gambir tipe Udang dari 24 individu tanaman.

Tahap I : Identifikasi tanaman gambir berkadar katekin tinggi dan rendah

3.3.1. Identifikasi dan Seleksi Populasi Gambir Berpotensi Kadar Katekin Tinggi dan Rendah

Kegiatan identifikasi dan seleksi menggunakan 32 tanaman yang diambil secara sengaja (mewakili tipe Udang, Cubadak, Riau Gadang, dan Riau Mancik). Kegiatan seleksi dimulai dengan melakukan analisis kadar katekin dari tanaman sampel. Untuk menentukan kadar katekin digunakan metoda Ciba-Geigy (SP-SMP-377-1985). Kegiatan analisis dilakukan dengan mengambil 1 pasang daun ke 3 dan 1 pasang daun ke 4 dari pucuk tanaman gambir, dengan 4 ulangan. Bahan kimia yang digunakan adalah etil asetat p.a, dan katekin murni (Prof.Dr. Amri Bakhtiar komunikasi pribadi), serta aquades steril. Alat yang digunakan adalah ; *spektrofotometer ultra violet* (Genesis-UV), kurvet kuarsa, timbangan analitik, *hotplate magnetic stirrer*, mortar, alu, labu ukur 50 ml, gelas ukur, cawan petri diameter 9 cm, oven, corong kaca, mikro pipet, aluminium foil, erlenmeyer bertutup asah 100 ml, kertas saring kualitatif, dan tissue gulung.

Untuk membuat larutan standar (sebagai pembanding), katekin murni juga dikeringkan diatas cawan petri, di dalam oven pada suhu 80°C selama 3 jam. Setelah 3 jam katekin ditimbang sebanyak 25 mg, dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan kemudian

dilarutkan dengan etil asetat (p.a) sebanyak 25 ml. Selanjutnya diaduk sampai homogen menggunakan *hot-plate magnetic stirrer* dengan kecepatan 300 rpm selama 5 menit pada suhu 40°C. Larutan tersebut dipipet sebanyak 1 ml, dan dimasukkan ke erlenmeyer baru kemudian ditambah lagi dengan etil asetat 25 ml dan diaduk kembali sampai homogen. Larutan ini dinamakan larutan standar yang siap untuk diukur nilai absorbannya dengan *Spektrofotometer UV* (Genesis-UV)

Untuk pembuatan larutan contoh (sampel daun gambir) dilakukan sebagai berikut. Sepasang daun gambir ke 3 dan 4 dari ujung ranting, diambil dan dihaluskan dengan mortar, selanjutnya dibuat lapisan setipis mungkin di atas cawan petri dan dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 3 jam. Selanjutnya contoh gambir kering dihaluskan lagi, kemudian ditimbang sebanyak 25 mg dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, dilarutkan dengan etil asetat sebanyak 25 ml. Larutan diaduk dengan *hot-plate magnetic stirrer* dengan kecepatan 300 rpm selama 5 menit pada suhu 40°C. Selanjutnya larutan disaring dengan kertas saring kualitatif. Hasil saringan di pipet sebanyak 1 ml, dan dimasukkan ke erlenmeyer baru, kemudian dilarutkan lagi dengan etil asetat sebanyak 25 ml dan diaduk sampai homogen. Larutan tersebut dinamakan larutan contoh yang siap untuk diukur nilai absorbannya dengan *Spektrofotometer UV* (Genesis-UV).

Pengukuran nilai absorban dilakukan menggunakan *Spektrofotometer UV* (Genesis) pada panjang gelombang 279 nm. Untuk kalibrasi alat digunakan etil asetat sebagai blanko = 0, nilai absorban larutan standar = E_c , dan nilai absorban larutan contoh

= Et. Untuk menentukan kadar katekin (%) digunakan rumus sbb:

$$\% \text{ katekin} = \frac{Et_{279} \times W_s}{Ec_{279} \times W} \times 100\% \dots (\text{SP-SMP-377-1985:})$$

Metode Ciba-Geygi)

Keterangan:

Et 279 = absorban / penyerapan larutan contoh pada panjang gelombang 279 nm

Ec 279 = absorban / penyerapan larutan standar pada panjang gelombang 279 nm

Ws = Berat katekin standar (murni)

W = Berat contoh gambir.

3.3.2. Kajian Karakter Morfologi dan Anatomi

3.3.2.1. Karakterisasi Morfologi

Pengamatan pada karakter morfologi dilakukan terhadap daun, cabang, bunga, buah, dan komponen hasil. Pengamatan karakter morfologi mengacu kepada prosedur Denian *et al.* (1991). Tiap tanaman sampel yang diamati dibagi atas 4 bagian yaitu Barat, Timur, Utara dan Selatan. Tiap bagian diamati satu ranting yang diambil secara acak. Pada masing-masing ranting diamati dua helai daun ke-6 yang dihitung dari ujung ranting.. Karakter-karakter yang diamati untuk penelitian ini adalah :

1. Daun

- a. Bentuk helaian daun, ditentukan berdasarkan perbandingan (rasio) panjang: lebar daun. Misalnya jika panjang:lebar = 1:1 bentuknya adalah *orbicularis*, dan jika panjang:lebar = 1,5-2 : 1 bentuknya adalah ovalis (Tjitrosoepomo, 2005)
- b. Panjang daun (cm), ditentukan dengan mengukur mulai dari pangkal tangkai daun sampai ujung daun melalau ibu tulang daun

dengan menggunakan mistar.

c. Lebar daun (cm), ditentukan dengan mengukur mulai dari bagian terlebar sisi kiri daun tegak lurus pada ibu tulang daun, sampai ke bagian terlebar sisi kanan daun, menggunakan mistar.

d. Panjang tangkai daun (cm), ditentukan dengan mengukur mulai dari pangkal tangkai daun yang menempel pada cabang sampai pada batas helaian daun, menggunakan mistar.

e. Diameter tangkai daun (mm), ditentukan dengan mengukur garis tengah lingkaran pada bagian tengah tangkai daun, menggunakan jangka sorong

f. Warna daun, ditentukan dengan mengamati warna permukaan atas daun dan mencocokkan dengan *colour chart* (*Munsell Color Charts for Plant Tissue*)

g. Tebal daun (mm), ditentukan dengan mengukur jarak antara permukaan atas daun dengan permukaan bawah daun menggunakan jangka sorong.

h. Bentuk pangkal daun (*basis*), ditentukan dengan berpedoman pada kategori: runcing (*acutus*), jika pertemuan kedua tepi daun sedikit demi sedikit membentuk sudut lancip kecil dari 90°, meruncing (*acuminatus*), tumpul (*obtusus*), membulat (*rotundatus*), dan lain-lain

i. Bentuk ujung daun (*apex*), ditentukan dengan kriteria seperti yang dilakukan pada pangkal daun.

2. Cabang

a. Panjang ranting (cm), ditentukan dengan mengukur panjang, mulai dari pangkal cabang pada batang utama sampai pada ujung (titik tumbuh) cabang dengan menggunakan mistar.

b. Panjang ruas (cm), ditentukan dengan mengukur jarak antar

dua buku pada ruas ke enam dari ujung cabang dengan menggunakan mistar.

c. Jumlah ruas (buah), ditentukan dengan menghitung seluruh ruas yang ada pada satu cabang.

d. Sudut cabang ($^{\circ}$), ditentukan dengan mengukur sudut yang dibentuk antara batang utama dengan cabang dengan menggunakan busur.

e. Diameter ranting (mm) ditentukan dengan mengukur garis tengah lingkaran cabang pada ruas ke-6 dari ujung dengan menggunakan jangka sorong

f. Jumlah kait (buah), ditentukan dengan menghitung seluruh kait yang ada pada suatu cabang

g. Warna cabang, ditentukan dengan mengamati warna permukaan cabang dan dicocokkan dengan *colour chart*

3. Bunga

a. Warna bunga, ditentukan dengan mengamati warna permukaan bunga dan mencocokkan dengan *colour chart*

b. Diameter bunga (mm), ditentukan dengan mengukur garis tengah lingkaran bunga bagian tengah bunga dengan menggunakan jangka sorong

c. Panjang tangkai bunga (cm), ditentukan dengan mengukur mulai dari pangkal tangkai bunga yang menempel pada cabang sampai batas bagian bawah kelopak bunga dengan menggunakan mistar

d. Diameter tangkai bunga (mm), ditentukan dengan mengukur garis tengah lingkaran tangkai bunga dengan menggunakan jangka sorong

4. Buah

- a. Panjang tangkai buah (cm), ditentukan dengan mengukur mulai dari pangkal tangkai buah yang menempel pada cabang sampai batas bagian bawah buah dengan menggunakan mistar.
- b. Diameter tangkai buah (mm), ditentukan dengan mengukur garis tengah lingkaran tangkai buah dengan menggunakan jangka sorong
- c. Warna buah muda, ditentukan dengan mengamati warna permukaan buah yang masih muda dan mencocokkan dengan *colour chart*
- d. Warna buah masak, ditentukan dengan mengamati warna permukaan buah yang telah masak dan mencocokkan dengan *colour chart*
- e. Jumlah polong per tangkai (buah), ditentukan dengan menghitung seluruh polong (bongkol) dalam satu tangkai
- f. Panjang polong (cm), ditentukan dengan mengukur mulai dari pangkal polong yang menempel pada tangkai buah sampai ujung polong dengan menggunakan mistar.

5. Komponen hasil

- a. Jumlah cabang per batang (buah), ditentukan dengan menghitung seluruh cabang pada satu batang
- b. Jumlah ranting per cabang (buah), ditentukan dengan menghitung seluruh ranting pada satu cabang
- c. Jumlah daun per ranting (helai), ditentukan dengan menghitung seluruh daun pada satu ranting
- d. Berat satu helai daun (g) ditentukan dengan menimbang satu helai daun menggunakan timbangan digital
- e. Rendemen hasil (%), diperoleh dengan cara merebus daun

sebanyak 100 g bahan segar, kemudian dihancurkan dengan blender untuk selanjutnya lakukan pengempaan, dipisahkan ekstraknya dengan cara pengendapan, kemudian dikeringkan (Susilobroto, 2000). Perhitungan adalah : bobot ekstrak /bobot segar daun x 100 %.

3.3.2.2. Struktur Anatomi Daun

Sampel daun sebanyak 3 helai diambil dari 3 ulangan daun tanaman. Pengamatan struktur anatomi daun dilakukan terhadap sediaan mikroskopis sayatan melintang yang dibuat dengan metode parafin (Johansen, 1940). Daun difiksasi di dalam larutan FAA (formaldehid, asam asetat glasial, alkohol 70% dengan perbandingan 5:5:90). Selanjutnya dilakukan dehidrasi, penjernihan dan infiltrasi parafin mengikuti metode Johansen (1940). Sampel yang telah difiksasi selama 48 jam di dalam larutan FAA dicuci dengan alkohol 50% sebanyak 4 kali masing-masing selama 1 jam.

Infiltrasi parafin ke dalam jaringan dilakukan secara bertahap dengan menambahkan parafin beku ke dalam wadah yang berisi sampel, tertier butil alkohol dan minyak parafin, kemudian dibiarkan terbuka pada suhu ruang selama 1 - 4 jam dan dilanjutkan di dalam oven suhu 60°C. Setelah infiltrasi parafin, sampel ditanam di dalam blok parafin. Selanjutnya sampel yang berada di dalam blok parafin dilunakkan dengan merendam ke dalam larutan Gifford (75 bagian alkohol 60%, 20 bagian asam asetat glasial dan 5 bagian gliserin) selama 1- 4 minggu. Kemudian sampel daun disayat setebal 10 μm dengan menggunakan mikrotom putar. Pita parafin yang diperoleh direkatkan pada gelas objek yang telah diolesi dengan perekat

albumin-gliserin dan dikeringkan di atas *hotplate* pada suhu 40°C selama 6 - 12 jam. Selanjutnya preparat diwarnai dengan pewarnaan rangkap ganda yaitu safranin 2% dan fastgreen 0.5%. Preparat yang telah diwarnai ditetesi entellan kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop. Metode sayatan melintang sediaan mikroskopis dan sediaan irisan daun gambir metode parafin .

Karakter anatomi yang diamati pada sediaan sayatan transversal daun adalah tebal daun, jaringan palisade, jaringan bunga karang, epidermis, stomata dan kutikula. Pengamatan di bawah mikroskop (Olympus tipe CH20) yang dilengkapi dengan kamera (Olympus tipe DP12).

3.3.3. Analisis Data

Data hasil pengamatan terhadap karakter-karakter morfologi dan stuktur anatomi ditampilkan dalam bentuk tabel, gambar dan data dianalisis secara deskriptif. Untuk melihat hubungan antara kadar katekin dengan beberapa karakter morfologi dan antomi dilakukan analisis regresi menggunakan program perangkat lunak *statistix8*. Untuk melihat differensiasi dari semua individu digunakan *program PAST*.

3.3.4. Karakterisasi Molekuler

3.3.4.1. Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan metode CTAB yang dikembangkan oleh Doyle dan Doyle (1990). DNA diisolasi dari daun muda (pucuk) tanaman gambir. Isolasi DNA dimulai dengan menggerus 0,3 g daun sampai halus di dalam mortar, kemudian serbuk daun dimasukkan ke tabung eppendorf 2 ml sebanyak 400 mg dan ditambahkan 1 ml buffer CTAB 2X dengan menggunakan

mikropipet 1000 μ l dan dicampurkan secara merata dengan membolak-balik tabung secara hati-hati dan divortek.

Selanjutnya eppendorf diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dengan membolak-balik tabung setiap 10 menit. Setelah itu ditambahkan 500 μ l Phenol-chloroform-isoamilalkohol (25:24:1 v/v/v). Tabung dibolak-balik selama 1 menit dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit. Fase cair bagian atas (supernatan) dipindahkan secara hati-hati ke dalam tabung eppendorf steril 2 ml yang baru dan ditambahkan 500 μ l chloroform-isoamilalkohol. Tabung dibolak-balik selama 1 menit dan disentrifugasi kembali pada 12.000 rpm selama 10 menit.

Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung 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 dengan hati-hati sampai muncul DNA yang ditandai dengan warna benang benang putih. Selanjutnya disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit untuk mengendapkan DNA pada dasar tabung eppendorf.

Tahap berikutnya larutan dibuang dan pellet DNA dicuci dengan 500 μ l ethanol 70% dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit, kemudian ethanol dibuang secara hati-hati. DNA dikeringkan dengan membalik tabung di atas kertas tisu. DNA tidak boleh dibiarkan kering terlalu lama karena akan sulit dilarutkan. Untuk melarutkan pellet DNA ditambahkan 100 μ l TE 1X dengan menggunakan pipet mikro 200 μ l, dan selanjutnya disimpan sebagai stok pada suhu -20°C. Jumlah pelarut yang ditambahkan tergantung pada besar kecilnya pellet DNA yang diperoleh, pada penelitian ini dilarutkan dengan TE 1X sebanyak

100 μ l.

DNA yang telah dilarutkan yang masih berwarna coklat, dimurnikan menurut metode Sambrook, *et al.* (1989). DNA diendapkan dengan menambahkan 1/10 kali volume (10 μ l) natrium asetat 3,0 M dan sebanyak 2 kali volume (200 μ l) ethanol absolut, diaduk dengan membolak-balik tabung secara perlahan dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit untuk mendapatkan pellet DNA. Cairan pada tabung dibuang dengan hati-hati menggunakan mikropipet dan diusahakan supaya tidak menyentuh pellet DNA.

Selanjutnya DNA dicuci dengan dengan 300 μ l ethanol 70%, disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 12.000 rpm dan cairan dibuang ke dalam sebuah gelas beaker. DNA dikeringkan dengan cara meletakkan tabung dalam posisi terbalik di atas kertas tissue sampai sisa-sisa ethanol menguap dari pellet DNA dan dari dinding tabung, tetapi tidak boleh biarkan terlalu kering. Selanjutnya DNA dilarutkan dalam 100 μ l TE 1X, ditambah RNase, dan disimpan sebagai stok dalam suhu -20 °C. Apabila larutan DNA akan digunakan dalam jangka waktu yang panjang dapat disimpan di suhu -80 °C.

Kuantitas DNA diestimasi dengan gel elektroforesis dan dibandingkan dengan standar DNA λ -50. Sebanyak 2 μ l masing-masing larutan DNA yang diperoleh dicampur dengan 7 μ l TE 1X, serta 1 μ l 10X loading buffer (BPB) dielektroforesis bersama-sama dengan DNA λ -50 (2 μ l) pada gel agarose 1 % yang telah ditambah etidium bromida 5 μ l pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah itu hasil elektroforesis divisualisasikan di atas UV transiluminator. Konsentrasi DNA ditentukan dengan

membandingkan intensitas fragmen DNA sampel dengan DNA λ . DNA sampel kemudian diencerkan dengan TE 1X sampai mencapai konsentrasi 10 ng/ μ l dan siap digunakan untuk reaksi amplifikasi dengan teknik RAPD-PCR.

3.3.4.2. Differensiasi Fingerprinting RAPD

Kegiatan seleksi primer menggunakan 98 primer RAPD yang dicobakan pada pool DNA gambir (pool DNA gambir berpotensi kadar katekin tinggi dan pool DNA yang katekin rendah). Pool dibentuk berdasarkan persentase kadar katekin yang dihasilkan, yakni pool katekin tinggi adalah sampel yang kadar katekinnya > 15%, dan pool katekin rendah adalah sampel yang kadar katekinnya \leq 15%. Berdasarkan hal itu, maka untuk pool DNA katekin tinggi diambil 5 sampel yaitu U7, U8, U12, U13, dan U14., sedangkan pool DNA katekin rendah juga 5 sampel yaitu U5, U15, U16, U21, dan U22.

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan RTG PCR Kit (GE USA) yang didalamnya sudah terkandung komponen amplifikasi PCR, yaitu : enzim Taq polymerase, dNTPs, dan MgCl₂ serta buffer PCR. RTG PCR Kit ditambah air (ddH₂O) 9 μ l, dan primer RAPD 3 μ l (konsentrasi 20 pmol/ μ l), DNA tamplate 3 μ l (konsentrasi 10 ng/ μ l), sehingga volume akhir menjadi 15 μ l. Selanjutnya mesin PCR diprogram dengan tahapan pada Tabel 1 Setelah reaksi PCR selesai, DNA hasil amplifikasi ditambah 1,5 μ l 10 x loading buffer (BPB) ke dalam masing-masing tabung RTG-PCR, dicampurkan dan siap untuk diload pada gel agarosa 1,5 % dalam buffer TBE 0,5X. Masing-masing produk PCR sebanyak 15 μ l dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis dengan mengikut sertakan 10 μ l DNA 1 kb ladder (Fermentas- USA) pada

sumur pertama. Gel agarose dijalankan dengan teknik elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 50 menit. Setelah itu hasil elektroforesis divisualisasikan di atas UV transiluminator.

Tabel 1. Program amplifikasi RAPD PCR tanaman gambir

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Inisiasi	96	2 menit	
denaturasi			
Denaturasi	94	30 detik	} 45
Anneling	36	1 menit	
Ekstensi	72	2 menit	
Final ekstensi	72	5 menit	
Pause	4		

Hasil amplifikasi dilihat dengan menggunakan teknik elektroforesis. Pool DNA katekin tinggi dan katekin rendah dibandingkan untuk melihat polimorfisme fragmen DNA spesifik yakni fragmen yang hanya terdapat pada pool DNA katekin tinggi tetapi tidak terdapat pada pool DNA katekin rendah dengan menggunakan 98 primer RAPD. Fragmen-fragmen spesifik yang diperoleh, dipotong dari gel agarose menggunakan skalpel steril dibawah sinar UV yang selanjutnya digunakan untuk kepentingan furifikasi.

3.3.4.3. Seleksi Primer Tingkat Individu

Hasil amplifikasi PCR menggunakan 98 primer RAPD pada pool DNA gambir berpotensi katekin tinggi dan pool DNA gambir katekin rendah yang telah memperlihatkan polimorfisme

selanjutnya diuji pada tingkat seleksi individu. Ada 6 primer RAPD (Tabel 2) yang dominan menunjukkan polimorfisme antara kedua pool DNA tersebut. Keenam primer tersebut diuji konsistensinya dengan melakukan pengujian primer RAPD terpilih pada tingkat seleksi individu artinya pengujian dilakukan pada masing-masing sampel penyusun pool DNA katekin tinggi dan pool DNA katekin rendah.

Tabel 2. Sekuen primer RAPD yang menunjukkan polimorfisme pada fragmen DNA gambir potensi kadar katekin tinggi pada DNA pool

No	Nama Primer	Sekuen Primer RAPD
1	OPB-11	GTA GAC CCG T
2	OPN-16	AAG CGA CCT G
3	OPN-19	GTC CGT ACT G
4	OPX-09	GGT CTG GTT G
5	OPK-15	CTC CTG CCA A
6	OPI-01	ACC TGG ACA C

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan RTG PCR Kit (GE-USA) dilakukan seperti halnya pada langkah kegiatan seleksi dalam pool, yakni menguji kembali 6 primer RAPD terpilih untuk menentukan konsistensi hasil. Selanjutnya mesin PCR diprogram dengan tahapan Tabel 1.

DNA hasil amplifikasi ditambahkan 1,5 μ l 10 x loading buffer (BPB) ke dalam masing-masing tabung RTG-PCR, dicampurkan dan siap untuk diload pada gel agarosa 1,5 % dalam buffer TBE

0,5X. Masing-masing produk PCR sebanyak 15 µl dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis dengan mengikutsertakan 10 µl DNA 1 kb ladder (Fermentas-USA) pada sumur pertama. Gel agarose dijalankan dengan teknik elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 50 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan di atas UV transiluminator. Fragmen hasil amplifikasi merupakan fragmen target yang terkait dengan penciri potensi kadar katekin tinggi, yang diperlukan untuk kegiatan kloning DNA.

Tahap II : Purifikasi, Kloning, dan Sekuensing Fragmen Spesifik Terkait Potensi Kadar Katekin Tinggi

3.3.5. Isolasi dan Purifikasi Fragmen Spesifik Terkait Potensi Kadar Katekin

Isolasi dan purifikasi dilakukan terhadap fragmen-fragmen RAPD yang memperlihatkan karakter spesifik, artinya fragmen tersebut dapat digunakan sebagai penciri khusus dan penciri umum dari genotipe gambir terkait potensi kadar katekin tinggi. Fragmen-fragmen DNA spesifik tersebut dimurnikan dari kontaminan sisa-sisa agarose dan senyawa lain seperti ethidium bromide. Fragmen tersebut diisolasi dari gel agarose dengan teknik pemotongan, yang dilakukan secara hati-hati karena harus dilakukan dibawah sinar UV. Pemotongan menggunakan skalpel steril dengan cara mengambil bagian yang mengandung fragmen yang dikehendaki. Fragmen tersebut dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml steril, dielusi untuk selanjutnya dipurifikasi menggunakan kit-gel purifikasi (Promega, USA). Potongan fragmen tersebut diencerkan dengan *membrane binding solution* (larutan pengikat membrane) dengan

perbandingan 10 µl setiap 10 mg berat agar yang dipotong. Campuran tersebut di *tipping* kemudian divortex hingga melarut dengan sempurna.

Campuran tersebut diinkubasi didalam *waterbath* dengan suhu 65°C selama 10 menit. Larutan dipipet dan dimasukkan ke dalam kolom mini, dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Kolom mini dicuci dengan menambahkan 700 µl *membrane wash solution*, selanjutnya di sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, dan fasa cair di buang. Langkah mencuci kolom mini diulangi dengan penambahan 500 µl *membrane wash solution*, dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, selanjutnya fasa cair juga dibuang.

Kolom mini dipindahkan ke dalam ependorf 1.5 ml yang baru dan dipotong tutupnya, selanjutnya ditambahkan 50 µl *Nuclease free water* kedalam kolom mini, dan inkubasi selama 1 menit pada suhu ruang, Selanjutnya disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Produk purifikasi dapat disimpan pada suhu 4°C atau -20°C dan siap untuk diligasi. Jika produknya kurang bagus, maka sebaiknya diamplifikasi lagi sehingga fragmen targetnya semakin lebih bagus. Produk amplifikasi selanjutnya diligasikan ke dalam plasmid *pGem-T Easy Vector* (Promega, USA).

3.3.6. Kloning dan Sekuensing Fragmen Penciri Gambir Potensi Katekin Tinggi.

3.3.6.1. Persiapan Sel Kompeten

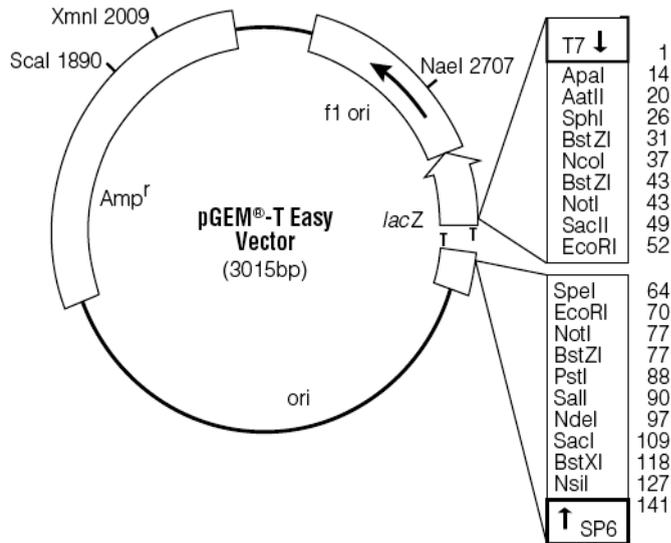
Sel kompeten dibuat dengan mempersiapkan kultur starter.

Bakteri *E.coli* strain DH5 α (koloni tunggal) dikulturkan dalam tabung reaksi yang mengandung 5 ml medium Luria-Bertani (LB) cair, dan *dishaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C selama satu malam. Selanjutnya diambil 2 ml suspensi bakteri yang telah dikulturkan satu malam tersebut dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 30 ml LB cair, kemudian *dishaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C selama 4 jam. Suspensi dipanen ke tabung ependorf 2 ml, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit, kemudian fasa cair dibuang dengan hati-hati. Pemanenan suspensi tersebut diulangi sampai 3 kali ke dalam ependorf yang sama sampai terlihat adanya endapan bakteri.

Endapan bakteri ditambah 500 μ l 0,1 M CaCl₂, *ditipping* sampai larut, dan diinkubasi selama 20 menit dalam es (4°C). Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Fasa cair dibuang, dan endapan bakteri ditambah dengan CaCl₂ 0,1 M sebanyak 500 μ l, dan diinkubasi dalam es batu selama 20 menit.

3.3.6.2. Ligasi Fragmen Spesifik ke dalam Plasmid

Kegiatan ligasi dilakukan dengan menggunakan prosedur dari promega (Promega-USA). Reaksi ligasi dari fragmen spesifik RAPD hasil purifikasi dilaksanakan dengan prosedur sebagai berikut.



Gambar 3. Peta vektor plasmid *pGemT- Easy* yang digunakan untuk cloning

Kedalam tabung ependorf 1,5 ml dimasukkan bahan-bahan dengan komposisi campuran sampel terdiri dari : 2x *Rapid Ligation Buffer* sebanyak 7,5 μ l, T₄ DNA *Ligase* sebanyak 1 μ l, DNA hasil purifikasi sebanyak 5,5 μ l, *pGem-T Easy Vektor* sebanyak 1 μ l, sehingga totalnya menjadi 15 μ l. Komposisi campuran reaksi ditipping dan diinkubasi selama 1 malam pada suhu 4°C. Peta vektor plasmid *pGem-T Easy* dan titik insersi dapat dilihat pada Gambar 3.

3.3.6.3. Tranformasi Plasmid Rekombinan ke dalam *E.coli* Strain DH-5 α

Transformasi dilakukan dengan menggunakan prosedur dari promega (Promega-USA) dengan melakukan sedikit modifikasi. Ke dalam tabung ependorf 1,5 ml, dimasukkan secara hati-hati 5

µl setiap hasil ligasi, dan sel kompeten sebanyak 50 µl, yang selanjutnya disimpan dalam es batu selama 20 menit. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam *waterbath* suhu 42°C selama 2 menit, untuk memberikan *heat shock* (kejutan panas), kemudian segera didinginkan dalam es batu selama 2 menit. Campuran itu ditambah medium SOC sebanyak 250 µl, dan *dishaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C selama 1 jam. Hasil transformasi ditanam pada medium LB padat yang telah ditambah IPTG, X-Gal, dan antibiotik ampisillin, dan ditumbuhkan satu malam. Untuk membuktikannya, produk rekombinan diseleksi menggunakan sistem *blue-white selection*, dan bagi koloni bakteri yang berwarna putih adalah yang mempunyai plasmid.

3.3.6.4. Isolasi DNA Plasmid Rekombinan

Isolasi DNA plasmid dilakukan secara mini preparasi menggunakan metode *quick and dirty* (Birnboim and Doly, 1979). Koloni tunggal bakteri (putih atau sedikit kebiruan) yang merupakan hasil transformasi dibiakkan dalam 10 ml medium LB cair yang mengandung 10 µl ampisilin, kemudian *dishaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C selama satu malam.

Kegiatan isolasi plasmid terlebih dahulu disiapkan lysozim sebanyak 200 µl dimasukkan ke dalam Larutan I (50 mM glukosa, dan 10 mM EDTA, dan 25 mM Tris). Sampel yang telah dikulturkan satu malam dimasukkan ke dalam ependorf 2 ml, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan pellet DNA rekombinan. Fasa cair dibuang dan didasar tabung akan terdapat pellet DNA, kemudian tambah lagi dengan sampel yang masih tersisa, disentrifugasi lagi dan dilakukan secara berulang-ulang

atau sampai volume sampel 6 ml.

Pellet DNA dipanen dan diresuspensi dengan penambahan campuran Larutan I sebanyak 200 μ l sampai homogen dengan *ditipping* atau divortex. Campuran ini ditambah Larutan II (SDS 0,1 % dengan NaOH 0,2 M) sebanyak 200 μ l dan dibolak balik selama 5 menit dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Campuran tersebut ditambah kalium asetat 3 M sebanyak 150 μ l dan dibolak balik selama 5 menit dan dimasukkan ke dalam es batu selama 15 menit. Larutan tersebut disentrifugasi pada suhu 4°C selama 10 menit, dengan kecepatan 14.000 rpm. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung ependorf 1,5 ml baru, dan selanjutnya ditambah 500 μ l CI(*Chloroform Isoamylalkohol*) dengan perbandingan 24:1, dan dicampurkan dengan membolak-balik tabung secara hati-hati. Campuran ini disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung ependorf 1,5 ml yang baru, dan dipresipitasi dengan 700 μ l ethanol absolut dingin. Supernatan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm suhu 4°C selama 20 menit. Cairan dibuang hati-hati, pellet DNA dicuci dengan ethanol 70%, sebanyak 150 μ l dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit.

Pellet DNA dikeringkan dengan *heater block* pada suhu 55°C selama 5-10 menit. Pellet dilarutkan dengan ddH₂O steril 50 μ l, dan siap untuk diuji dengan elektroforesis. Analisis elektroforesis digunakan 5 μ l larutan DNA plasmid dengan menggunakan konsentrasi agarose 0,65%, mengikutsertakan marker 1 kb ladder (Fermentas-USA), pada tegangan 100 volt selama 40 menit. Hasilnya di dokumentasikan menggunakan *UV*

transluminator.

3.3.6.5. Analisis Fragmen Sisipan dengan Primer T7 dan SP6

DNA hasil transformasi yang mengandung fragmen yang telah disisipi oleh plasmid, selanjutnya diuji menggunakan amplifikasi PCR dengan primer universal T7 (3'- ATT ATG CTG AGT GAT ATC CC-5') dan SP6 (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3'). Amplifikasi menggunakan RTG-PCR kit (Promega USA), dengan campuran rekasi ddH₂O PCR 21 µl, template DNA plasmid 2 µl, dan primer T7 dan SP6 FR 2 µl, sehingga total volume 25 µl , dan dijalankan sebanyak 30 siklus. Program PCR yang digunakan disajikan pada Tabel 3.

Fragmen *insert* (fragmen sisipan) dapat diketahui ukurannya dengan melakukan pengujian elektroporesis dalam medium agarose 1% selama 40 menit dengan mengikutsertakan 1 kb ladder (Fermentas-USA) sebagai marker. DNA plasmid yang diduga mengandung sisipan DNA gambir berpotensi katekin tinggi kemudian dipurifikasi dari gel dan diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer T7 dan SP6. Produk tersebut dapat disimpan pada -20°C untuk keperluan sekuensing nantinya.

Tabel. 3. Program amplifikasi PCR menggunakan primer T7 dan SP6

Proses	Suhu (° C)	Waktu	Jumlah Siklus
Denaturasi awal	95	3 menit	} Loop I 1 siklus
Denaturasi	94	30 detik	
Anneling	55	30 detik	
Ekstensi	72	1,5 menit	} Loop II 29 siklus
Denaturasi	94	30 detik	
Anneling	57	30 detik	
Ekstensi	72	1,5 menit	
Ekstensi akhir	72	10 menit	
Pause	4		

3.3.6.6. Sekuensing DNA Fragmen Spesifik

Untuk keperluan sekuensing DNA plasmid rekombinan yang merupakan hasil isolasi pada tahap sebelumnya dilakukan amplifikasi dengan menggunakan primer T7 dan SP6. Amplifikasi disiapkan campuran reaksi sebagai berikut: ddH₂O PCR sebanyak 21 µl, primer T7SP6 (konsentrasi 5 pmol/µl) sebanyak 2 µl, dan DNA template 2 µl, sehingga volume total 25 µl. selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin PCR (Biometra-Jerman) yang dijalankan dengan program (Tabel 3).

Kegiatan amplifikasi PCR ini dilakukan selama 1 jam 54 menit. Untuk lebih meyakinkan kita sebelum dilakukan sekuensing

terlebih dahulu dilakukan pengujian elektroforesis dengan mengikutsertakan 1 kb ladder (Fermentas-USA) sebagai marker, dan λ DNA50 ng/ μ l sebagai pembanding konsentrasi templet DNA sampel. Campuran reaksi untuk kegiatan ini terdiri dari 5 μ l DNA templet, TE 1X 5 μ l, dan BPB 1 μ l, selanjutnya dimasukkan ke dalam sumur gel agarose dengan konsentrasi 1%. Mesin elektroforesis dijalankan selama 40 menit, pada tegangan 100 volt, hasilnya didokumentasikan di atas UV transluminator.

Kegiatan sekuensing DNA dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkmann Jakarta, mengikuti metode Sanger, *et al*, (1970), yaitu dimulai dari melakukan *termal cycling*, *clean up*, dan *running/sample plate*. Untuk kegiatan *termal cycling* digunakan program PCR khusus yakni menggunakan hanya satu primer saja, dapat berupa primer T7Forward atau SP6Revers, dan mengikutsertakan DTC Mix yang berisi ddNTP. Campuran reaksi yang digunakan untuk *termal Cycling* adalah : ddH₂O 15 μ l, DNA template 0,5 μ l, primer 0,5 μ l, dan DTC mix 4,0 μ l, sehingga total volume adalah 20 μ l. Programnya terdiri dari denaturasi pada suhu 96°C selama 20 detik, annealing pada suhu 55 °C selama 20 detik, dan ekstensi pada suhu 60 °C, dan program dijalankan sebanyak 30 siklus dengan lama waktu yang dibutuhkan 3 jam 35 menit.

Selanjutnya dilakukan kegiatan *Clean Up*, yaitu Na-Asetat 3 M sebanyak 2 μ l/sampel, EDTA 100 mM sebanyak 2 μ l/sampel (sebaiknya digunakan dalam keadaan segar). Kedua bahan tersebut dicampurkan dengan menambahkan produk PCR *termal cycling* dan ditambah dengan ethanol absolut sebanyak 60 μ l. Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm

selama 22 menit. Supernatan dibuang kemudian pellet dicuci dengan ethanol 70%, disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Pekerjaan tersebut diulang sampai dua kali, kemudian pellet dikeringkan menggunakan *heaterblok* pada suhu 50°C selama 5 menit.

Kegiatan berikutnya adalah *running/sample plate* untuk sekuensing. Pellet yang telah kering tersebut ditambah dengan *Sample Loading Solution* (SLS) sebanyak 40 µl, kemudian dimasukkan ke *sample plate* selanjutnya sekuensing dijalankan. Untuk 8 sampel membutuhkan waktu selama 150 menit.

Data hasil sekuens selanjutnya diedit menggunakan program Bioedit yang dapat diakses di internet (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/>,2010). Untuk basa nukleotide yang tidak terbaca oleh software dapat ditentukan basa nukleotidanya secara manual dengan memperhatikan puncak (*peak*) tertinggi. Selanjutnya basa-basa nukleotide tersebut dimasukkan ke program *vecscreen* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/>,2010) untuk menentukan daerah insert dari rekombinan yang di sekuensing. Hasil *vecscreen* dimasukkan kedalam program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang disediakan oleh server-server Public Sequences Database seperti NCBI (USA), EMBL (Eropah), guna untuk perbandingan homologi data kita dengan beberapa database lainnya di dalam genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>,2010)

Tahap III: Desain Primer dan Uji Akurasi Sistem Penanda

3.3.7. Desain Primer Spesifik Terkait Potensi Kadar Katekin Tinggi

3.3.7.1. Desain Primer Spesifik

Data sekuens disimpan dalam bentuk format FASTA dan digunakan dalam kegiatan pendisainan primer. Disain primer dilakukan dengan menggunakan software Oligos V.30 (Kalendar, 2002) yang dikembangkan oleh universitas Helsinki yang memiliki lisensi bebas. Selain dengan program Oligos V.30, pendesainan kombinasi primer juga dilakukan menggunakan program Primer3 yang diakses secara *on line* di internet (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3.2010>).

Parameter-parameter untuk pendisainan primer diset sedemikian rupa sehingga menghasilkan pasangan primer yang bersifat spesifik, yaitu diupayakan memiliki jumlah nukleotida 18-25 buah, memiliki titik didih yang cukup tinggi (60°C), memiliki perbandingan senyawa CG dan AT yang hampir berimbang, diupayakan 3 basa nukleotide terakhir adalah C atau G, serta menghindari adanya pengulangan satu macam nukleotid yang lebih dari 4 buah secara berurutan. Primer disintesis oleh perusahaan pensintesis oligonukleotid pada perusahaan 1st base. Primer yang disintesis selanjutnya diuji coba dengan menggunakan fragmen DNA yang mengandung sekuens darimana asal primer disintesis (genomik DNA dari fragmen dimana produk PCR awal dihasilkan).

Uji coba dilakukan dengan menggunakan berbagai suhu annealing yang optimum dari kedua kombinasi primer tersebut. Apabila kedua kombinasi primer yang diuji pada beberapa sampel DNA menghasilkan produk PCR seperti yang diharapkan (ukuran seperti diprediksi dari panjang sekuens yang diapit oleh primer), maka primer tersebut dapat digunakan, jika tidak maka akan

didesain primer pada posisi lainnya. Kombinasi primer yang mampu menghasilkan produk PCR spesifik dengan ukuran seperti diprediksi dari informasi sekuensnya merupakan produk luaran tahap kegiatan ini. Indikator keberhasilan dapat dicapai dan diukur dengan menggunakan nilai persentase tingkat akurasi

3.3.7.2. Uji Akurasi Sistem Penanda STS (*Sequence Tagget Sites*)

Hasil pengujian primer spesifik pada kegiatan selanjutnya diuji coba pada DNA genomik awal dan genomik seluruh koleksi gambir tipe Udag yang dimiliki. Pada setiap pengujian primer spesifik yang dilakukan menghasilkan fragmen spesifik yang sesuai harapan (ukuran panjang fragmen prediksi), maka fragmen tersebut merupakan indikator pada tanaman gambir yang memiliki potensi kadar katekin tinggi. Hal ini berarti sistem penanda yang digunakan adalah penanda STS.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (Biometra-Jerman). Total volume dalam amplifikasi yaitu 25 μ l dengan menggunakan RTG PCR kit (Promega-USA) yang terdiri dari campuran; ddH₂O 20 μ l, DNA templet 3 μ l (konsentrasi 5 ng/ μ l), dan primer Udtg3 dan Udtg4 (konsentrasi 10 pmol/ μ l) sebanyak 2 μ l. Kondisi mesin PCR dijalankan dengan program sebagai berikut : denaturasi awal pada suhu 96°C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 96°C selama 1 menit, annealing pada suhu 60°C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72°C, ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit, dan pause pada suhu 4°C. Program dijalankan sebanyak 45 siklus yang membutuhkan waktu selama 2 jam 51 menit 26 detik.

Hasil amplifikasi diuji dengan gel electrophoresis yang

mengikutsertakan 1 kb ladder (Fermentas-USA) sebagai marker. Produk PCR selanjutnya dimasukkan ke dalam sumur gel agarose dengan konsentrasi 1,5 %. Mesin elektroforesis dijalankan selama 40 menit, pada tegangan 100 volt, hasilnya didokumentasikan di atas UV transluminator.

Proses amplifikasi dinyatakan berhasil apabila dalam satu slot blok gel (sumur) terlihat satu pita DNA atau satu fragmen yang ukurannya sesuai dengan prediksi saat primer didesain untuk DNA gambir katekin tinggi (sesuai harapan). Primer yang diuji dapat dinyatakan tidak spesifik, apabila menghasilkan produk amplifikasi lebih dari satu fragmen, panjang fragmen tidak sesuai prediksi saat primer didesain, dan apabila menghasilkan produk pada DNA gambir katekin rendah (tidak diharapkan)

Tingkat akurasi primer dapat ditentukan dalam mendeteksi keberadaan fragmen pencari katekin tinggi berdasarkan produk amplifikasi yang dihasilkan dan ukuran produk amplifikasi sesuai dengan kriteria primer yang didesain. Untuk primer Udtg3 dan Udtg4 diprediksi panjang produk hasil amplifikasi yaitu 178 bp.

Pengujian kombinasi primer ini dilakukan terhadap semua sampel tanaman gambir tipe Udang hasil koleksi (24 tanaman). Penentuan tingkat akurasi primer dalam mendeteksi keberadaan fragmen spesifik pencari gambir berpotensi kadar katekin tinggi dapat dilihat dari produk amplifikasi yang dihasilkan dan ukuran produk amplifikasi sesuai dengan kriteria kombinasi primer. Tingkat akurasi primer (dalam persentase) dapat dihitung dengan menggunakan rumus umum berikut. Tingkat keberhasilan primer yang diuji dinyatakan sbb:

$$\text{Tingkat Akurasi} = \frac{\text{Jumlah sampel produk sesuai harapan}}{\text{Jumlah sampel yang diuji}} \times 100\%$$

Keterangan : Produk sesuai harapan = untuk primer Udtg3 dan Udtg4 ukuran produk 178 bp, Jumlah sampel = total semua tanaman gambir tipe Udang yang diuji

Pada sampel DNA katekin tinggi, jika dihasilkan produk sesuai harapan (178 bp) dinyatakan sebagai Non Rekombinan (hasil PCR +), demikian juga kalau pada sampel DNA katekin rendah tidak menghasilkan produk, hal ini dinilai sebagai Non Rekombinan (hasil PCR -)(karena memang tidak diinginkan). Sedangkan jika pada sampel DNA katekin tinggi tidak menghasilkan produk sesuai harapan (178 bp), maka dinilai sebagai Rekombinan (hasil PCR -), demikian pula jika pada sampel DNA katekin rendah justru menghasilkan produk (178 bp) (karena memang tidak diinginkan), maka dinilai sebagai Rekombinan (hasil PCR +).

BAB 4

HUBUNGAN KARAKTER MORFOLOGI, ANATOMI, DAN MOLEKULER TERKAIT KATEKIN

Identifikasi dan Seleksi Populasi Gambir Berpotensi Kadar Katekin Tinggi dan Rendah

Sampel tanaman yang digunakan untuk bahan percobaan berasal dari tanaman gambir yang berumur 2 tahun 6 bulan yang terdapat di Kebun Percobaan Fakultas Pertanian, Limau Manis Padang. Lokasi areal kebun percobaan yang ditanami gambir terletak pada daerah dengan ketinggian 337 m dpl. Identifikasi dan sekaligus seleksi tanaman gambir dilakukan pada empat tipe tanaman gambir yaitu tipe Udang, Riau Mancik, Riau Gadang, dan Cubadak. Untuk menyeleksi tanaman gambir yang mempunyai potensi kadar katekin tinggi dan potensi katekin rendah dilakukan analisis kadar katekin berdasarkan metode Ciba-Geygi (SP-SMP-377-1985). Setelah dilakukan analisis terhadap 32 individu tanaman gambir didapatkan hasil seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Persentase kadar katekin empat tipe tanaman gambir

Ulangan	Persentase Kadar Katekin (%)			
	T. Udang	T. Riau Mancik	T.Riau Gadang	Cubadak
1	22,95	17,60	18,79	9,02
2	27,74	15,75	27,39	12,69
3	24,07	3,18	17,05	12,00
4	20,00	27,50	9,72	17,22
5	14,15	33,88	19,50	13,04
6	17,22	12,01	25,10	10,40
7	35,17	16,35	12,69	17,03
8	45,87	9,37	14,70	11,09
Kisaran	14-45 %	3 – 33 %	9 – 27 %	9 – 17%
Rata-rata	25,89%	16,95%	18,11%	12,81%

Berdasarkan hasil analisis tersebut, ternyata tipe Udang (U) mempunyai potensi kadar katekin rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan tiga tipe gambir yang lainnya, dengan rata-rata 25,89% (kisaran 14% - 45%). Sebaliknya tipe Cubadak mempunyai potensi kadar katekin paling rendah dengan rata-rata 12,81%. (kisaran 9% - 17%,). Nilai kadar katekin yang diperoleh tersebut berkaitan dengan nilai rendemen hasil (Tabel 5), dimana pada tipe Udang rendemen hasil rata-rata 6,7% dengan berkisar antara 6,1 – 7,5%, yang tergolong sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan rendemen hasil dari ketiga tipe lainnya yaitu; Cubadak rata-ratanya 5,87% dengan kisaran 5,8 – 7,3% ; Riau Mancik rata-rata 6,12% dengan kisaran 5,7 – 7,1%; dan Riau

Gadang rata-ratanya 5,8% dengan kisaran 5,7 – 8,2% (Tabel 5). Jika dibandingkan dengan hasil penelitian Fauza, *et al* (2010), menyatakan bahwa kadar katekin tipe Udang dari beberapa daerah di Sumatera Barat (7 lokasi daerah) cukup bervariasi. Lokasi Halaban mempunyai nilai kadar katekin lebih rendah yaitu 20,15%. Lokasi Siguntur rata-rata kadar katekinnya adalah 46,87%. Terlihat kecenderungan bahwa faktor ketinggian tempat mempengaruhi terhadap nilai kadar katekin yang diperoleh. Semakin tinggi lokasi penanaman gambir, maka kadar katekinnya semakin rendah, bila dibandingkan dengan lokasi dataran rendah. Kadar katekin diduga berhubungan dengan rendemen hasil. Denian dan Fiani (1994) menyatakan, bahwa rendemen hasil gambir tipe Udang memperlihatkan nilai kisaran yang lebih tinggi dibandingkan dengan tipe lainnya. Nilai kisaran masing-masing tipe adalah Udang 6,80%-7,10%, Cubadak 6,30%-6,70%, dan Riau 6,10%-6,40%. Hasan, *et al* (2000) juga menyatakan bahwa tipe Udang mempunyai tingkat produksi getah dan rendemen hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan tipe lainnya. Sedangkan hasil karakterisasi Fauza (2009) juga menunjukkan rata-rata rendemen hasil yang tinggi pada tipe Udang yaitu 6,90%, Cubadak 6,68%, Riau gadang 6,53%, dan Riau Mancik 6,44%.

Berdasarkan hasil tersebut maka pernyataan yang selama ini dikemukakan oleh petani gambir sudah dapat dipertegas dengan fakta hasil penelitian. Jika diperhatikan pada tipe Riau, maka tipe Riau Gadang mempunyai rata-rata kadar katekin sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan Riau Mancik. Tipe Riau Gadang mempunyai kadar katekin dengan rata-rata 18,11% (kisaran 3%-33%). Sedangkan tipe Riau Mancik mempunyai kadar katekin

dengan dengan rata-rata 16,95% (kisaran 9%-27%). Nilai kadar katekin pada tipe Riau Gadang dan Riau Mancik lebih rendah bila dibandingkan dengan tipe Undang. Nilai tersebut juga seiring dengan nilai rendemen hasil yang juga rendah pada tipe Riau Gadang dan Riau Mancik (Tabel 5).

Terjadinya perbedaan nilai kadar katekin dipengaruhi oleh banyak faktor, baik yang menyakut pemeliharaan seperti tindakan pemupukan, dan pengendalian gulma, maupun yang berhubungan dengan tempat tanaman gambir dibudidayakan, yakni yang berhubungan dengan dataran rendah dan dataran tinggi.

4.2. Kajian Karakter Morfologi dan Anatomi

4.2.1. Karakterisasi Morfologi

Kajian karakter morfologi dilakukan terhadap 4 tipe gambir yang diidentifikasi yaitu Udang, Cubadak, Riau Mancik, dan Riau Gadang. Tiap sampel tanaman yang diamati dibagi atas 4 bagian yaitu Barat, Timur, Utara dan Selatan. Tiap bagian diamati 1 ranting yang diambil secara acak. Pada masing-masing ranting diamati 2 helai daun, yang dihitung adalah daun ke-6 dari pucuk. Hasil pengamatan terhadap karakter morfologi dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5 menyajikan nilai rata-rata beberapa karakter morfologi dan komponen hasil pada empat tipe tanaman gambir yang ada di Kebun Koleksi Gambir Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Jika diperhatikan Tabel 5, dapat dilihat bahwa hampir semua karakter morfologi yang diamati secara umum bervariasi. Akan tetapi antara nilai tertinggi dengan nilai terendah setiap tipe agak sempit (jarak nilai terendah dengan nilai tertinggi cukup kecil)

Gambir tipe Udang mempunyai rata-rata panjang daun 11,99 cm, tipe Cubadak 11,70 cm, tipe Riau Gadang 10,98 cm, dan tipe Riau Mancik 10,58 cm. Nilai rata-rata empat tipe gambir tersebut mempunyai kisaran yang sempit antara satu dengan lainnya. Karakter lebar daun, tipe Udang mempunyai rata-rata 6,05 cm, Cubadak 6,43 cm, Riau Mancik 5,82 cm, dan Riau Gadang 5,79 cm. Karakter panjang tangkai daun, dan diameter tangkai daun, juga mempunyai nilai yang hampir sama pada keempat tipe gambir. Karakter panjang ranting, panjang ruas, dan jumlah ruas pada empat tipe gambir menunjukkan nilai kisaran yang cukup luas

(nilai terendah hingga nilai tertinggi). Namun karakter tersebut belum dapat digunakan sebagai pembeda anantara ke empat tipe gambir bila dihubungkan dengan nilai kadar katekin. Hasil analisis regresi menunjukkan bahwa tiga karakter tersebut mempunyai hubungan yang sangat lemah, dengan nilai $R^2 = 0,01$.

Tiga karakter kualitatif (Tabel 5), yaitu bentuk helaian daun, basis daun, dan apek daun menunjukkan skor yang hampir sama pada empat tipe tanaman gambir. Karakter bentuk helaian daun adalah oval, dan *ovalis - oblongus* (jorong memanjang), demikian juga pada basis dan apek daun, sama-sama mempunyai bentuk *acuminatus* (meruncing). Menurut Tjitrosoepomo (2005), pada tanaman *Uncaria gambir*, daun berhadapan, tunggal, bertangkai, jorong memanjang, dan ujungnya meruncing

Pengamatan morfologi terhadap beberapa karakter menunjukkan perbedaan yang mengindikasikan bahwa perbedaan tersebut disebabkan oleh faktor genetik. Karakter panjang dan lebar helaian daun pada keempat tipe gambir menunjukkan angka yang hampir sama, demikian juga dengan karakter panjang tangkai daun dan diameter tangkai daun. 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. Namun demikian perbedaan warna tersebut tidaklah tegas, dan mempunyai variasi yang cukup sulit untuk diperhatikan.

Tabel 5. Karakteristik morfologi dan komponen hasil empat tipe gambir yang diamati nilai rata-rata pada 48 tanaman

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 tangk bunga (cm)	0,23±0,05	0,26±0,05	0,18±0,02	0,19±0,02
d) Buah					
21	Panjang tangk buah (cm)	2,8±0,35	3,27±0,42	1,75±0,32	2,19±0,37
22	Diameter tangk 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

Keterangan : Ov=oval, Obl=oblongus, Ac =Acutus,
Acu=acuminatus, hj=hijau, mr=merah, md =muda,
cok = coklat, hit = hitam
*) = Penentuan warna menggunakan standar
referensi *colour chart*
(*Munsell Color Charts for Plant Tissue*)
(Tipe Udang 24 tanaman, T.Cubadak, T.Riau Gadang,
T.Riau Mancik masing-masing 8 tanaman)

Secara umum warna daun dari seluruh sampel yang diamati adalah hijau. Namun demikian terdapat variasi diantara keempat tipe gambir tersebut. Hasil pengamatan morfologi berpedoman pada klasifikasi warna menurut *Munsell Color Charts for Plant Tissue*. Tipe Udang memiliki warna daun yang berkisar antara hijau sampai merah tua atau hijau kemerahan (2,5Y7/6).

Bila diperhatikan terutama arah ke pucuk atau bahagian atas tanaman, maka warna merah sendiri memperlihatkan variasi yang beragam pada populasi tipe Udang. Pupus atau daun pucuk memperlihatkan warna hijau, sedangkan warna merah dimulai dari daun ke tiga hingga daun ke tujuh, dan mulai daun ke 8 hijau kemerahan. Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa warna daun tipe Udang ada yang hijau kemerahan (2,5Y7/6), merah muda (5YR6/6), dan merah tua (10R4/6). Sedangkan tipe Cubadak tidak demikian halnya, warna daun yang dominan adalah hijau muda (2,5GY6/10). Tipe Riau Mancik dan Riau Gadang warna daunnya sama-sama memiliki warna hijau agak tua (5GY4/6). Kedua tipe Riau tersebut hanya berbeda dalam hal luas daun (Gambar 4).

Bila diperhatikan dan dihubungkan dengan karakter warna daun dengan nilai kadar katekin, terlihat bahwa tanaman yang mempunyai warna daun agak merah tua mempunyai

kecendrungan kadar katekin lebih tinggi. Diduga ada keterkaitan warna daun dengan potensi genetik kadar katekin. Namun, diperlukan kajian lebih lanjut tentang variasi warna daun merah yang terjadi pada tipe Udang.



Gambar 4. Penampilan helaian daun gambir, A= tipe Udang, B= tipe Cubadak, C= tipe Riau Gadang, dan D = tipe Riau Mancik

Karakter jumlah kait, ternyata tidak semua tanaman sampel memperlihatkan karakter kaitnya. Hal ini karena ada sebagian tanaman yang tidak mempunyai organ kait, disebabkan karena tunas yang menjadi bakal bunga yang keluar dari ketiak daun, posisinya sama dengan tunas yang tumbuh menjadi kait, artinya tunas yang muncul dari ketiak daun dapat tumbuh menjadi bunga atau kait. Tjitrosoepomo (2005) mengemukakan bahwa kuncup yang menjadi bunga disebut dengan kuncup bunga, dan kuncup yang tidak menjadi bunga disebut kait.

Sehubungan dengan penampilan secara morfologi tanaman

gambir, hasil penelitian ini seiring dengan pernyataan yang disampaikan oleh Tjitroseopomo (2005) yang menyatakan bahwa *Uncaria gambir* termasuk tumbuhan semak yang memanjat dengan kait, batang lebih kurang bersegi empat, dan agak menebal pada buku-bukunya.

Karakter bunga tanaman gambir, diameter bunga pada tipe Udang sedikit lebih besar dibandingkan dengan tipe Riau Mancik dan Riau gadang, namun hampir sama dengan tipe Cubadak. Menurut Nazir (2000), bunga gambir kecil terletak dalam bongkol yang berbentuk bola terdapat dalam ketiak daun. Secara umum warna bunga berkisar dari hijau hingga merah muda. Buahnya berbentuk kapsul, didalamnya terdapat biji yang sangat halus, pirang dan bersayap.

Pada karakter warna buah, terdapat variasi warna buah pada keempat tipe gambir yang diamati. Pada tipe Udang variasi warna buah terlihat sejak buah muda dengan variasi mulai dari hijau tua, hijau muda, hijau kemerahan, merah muda, dan merah tua. Sedangkan pada buah masak variasi warna yang ditemui mulai dari coklat muda (7,5YR5/4), coklat tua (5YR5/2), dan hitam (10R3/2). Pada tiga tipe lainnya Cubadak, Riau gadang, dan Riau Mancik warna buah muda berkisar dari hijau tua hingga merah muda, dan warna buah masak mulai dari coklat tua hingga hitam.

Variasi juga ditemui pada karakter jumlah polong pada ke empat tipe gambir yang diamati. Tipe Udang memiliki jumlah polong rata-rata 72 polong (kisaran 64 – 91 polong). Sedangkan pada tipe Cubadak rata-rata 73 polong dengan nilai kisaran yang lebih sempit yaitu antara 67-80 polong per tangkai. Nilai ini sedikit lebih tinggi dari pada tipe Riau Mancik dengan rata-rata 63 polong

(kisaran 51 – 72 polong) per tangkai, namun pada tipe Riau Gadang didapat rata-rata 62 polong per tangkai dengan kisaran lebih luas yaitu 48 – 89 polong. Hasil ini menunjukkan bahwa pada tipe Riau terdapat jumlah polong dengan kisaran yang luas. Variasi yang sempit dijumpai pada karakter panjang polong, dengan kisaran mulai dari 2,5 – 4,0 cm, dengan rata-rata 3,1 cm.

Pada ke empat tipe gambir ternyata karakter jumlah cabang paling sedikit jumlahnya adalah 4 cabang, tipe Udang rata-rata 10 ; Cubadak rata-rata 5,5; Riau Mancik rata-rata 6,25; dan Riau Gadang rata-rata 5,0 cabang per batang. Namun demikian, karakter jumlah cabang dapat dikaitkan dengan nilai kadar katekin. Tipe Udang mempunyai rata-rata jumlah cabang yang lebih banyak dibandingkan dengan tipe Cubadak, Riau gadang, dan Riau Mancik, dan hal tersebut juga ditunjukkan oleh besarnya nilai kadar katekin tipe Udang yang juga lebih tinggi dari ketiga tipe tersebut.

Pada empat tipe gambir yang diamati, karakter jumlah ranting per cabang ternyata mempunyai kisaran nilai yang hampir sama, yaitu tipe Udang rata-rata 10,8 (kisaran 9 – 19) ; Cubadak 13,5 (kisaran 10 -18); Riau mancik 11,0 (kisaran 8 – 13); dan Riau Gadang 13,2 (kisaran 6 – 17) ranting per cabang. Hal yang sama juga terlihat pada karakter jumlah daun per ranting, dan berat satu helai daun, yang menunjukkan nilai hampir sama pada keempat tipe gambir.

Karakter rendemen hasil pada empat tipe gambir ternyata juga mempunyai variasi yang sempit yaitu pada tipe Udang dengan rata-rata 6,7%, Cubadak rata-rata 5,9%, Riau mancik rata-rata 6,1%, dan Riau Gadang dengan rata-rata 5,8%. Denian dan Fiani

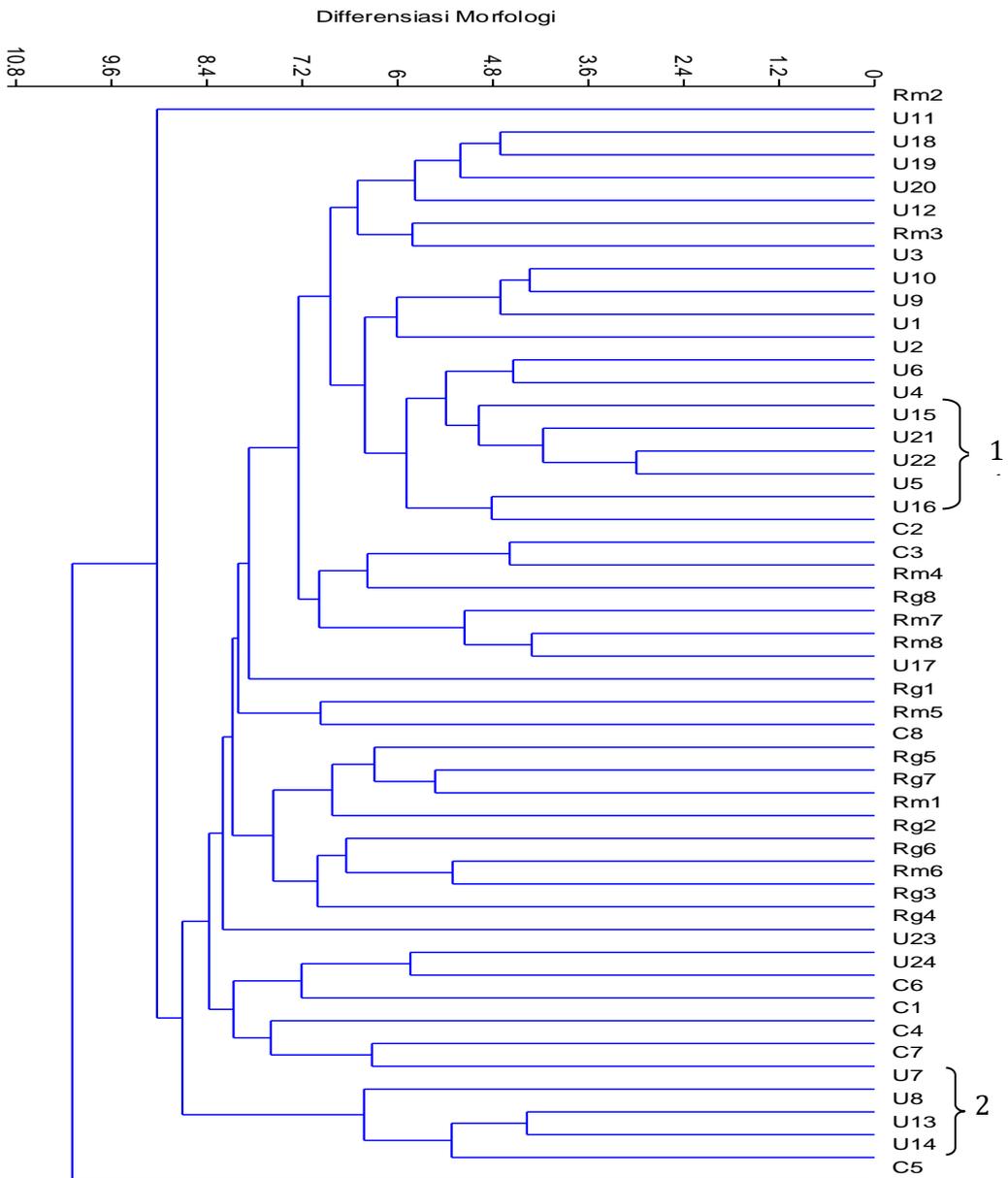
(1994) menyatakan bahwa rendemen hasil gambir tipe Udang memperlihatkan nilai kisaran yang lebih tinggi dibandingkan dengan tipe lainnya. Nilai kisaran masing-masing tipe adalah Udang 6,80%-7,10%, Cubadak 6,30%-6,70%, dan Riau 6,10%-6,40%. Hasan, *et al* (2000) juga menyatakan bahwa tipe Udang mempunyai tingkat produksi getah dan rendemen hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan tipe lainnya. Sedangkan hasil karakterisasi Fauza (2009) juga menunjukkan rata-rata rendemen hasil tipe Udang 6,90%, Cubadak 6,68%, Riau gadang 6,53%, dan Riau Mancik 6,44%.

Selanjutnya untuk melihat peran semua karakter morfologi dan komponen hasil pada 48 tanaman gambir (Udang, Cubadak, Riau Gadang, dan Riau Mancik) dilakukan analisis menggunakan program *PAST Analysis*. Hasil analisis menunjukkan bahwa 31 karakter yang diamati ternyata menyumbang nilai untuk membentuk pengelompokan dari semua individu seperti yang ditampilkan pada Gambar 5.

Gambar 5 memperlihatkan bahwa pengelompokan semua individu terbentuk pada tingkat kemiripan 0,0 - 0,96 (sangat bervariasi), hal ini diduga karena pada tanaman gambir terjadi penyerbukan silang. Walaupun demikian ada kecenderungan tipe Udang membentuk kelompok sesama tipe Udang, hal yang sama juga pada tipe Cubadak, Riau Gadang, maupun Riau Mancik, walaupun ada satu atau dua individu yang agak terpisah dari kelompoknya seperti Rm2 dan C5. Berdasarkan hal ini pengelompokan tanaman gambir ke dalam tipe-tipe yang ada selama ini, secara ilmiah perlu ditinjau kembali.

Jika diperhatikan tanaman U7, U8, U13, dan U14, terdapat dalam

satu kelompok yang sama, hal ini mengindikasikan bahwa individu Udang tersebut sesungguhnya termasuk pada individu kelompok gambir berpotensi kadar katekin tinggi. Demikian juga pada individu U5, U15, U16, U21, dan U22 mempunyai kemiripan berdekatan, dimana kelima individu ini termasuk kelompok gambir berpotensi kadar katekin rendah (berdasarkan analisis kadar katekin)



Gambar 5. Dendrogram diferensiasi morfologi dari 48 individu tanaman gambir

1 = tanaman gambir berpotensi kadar katekin rendah;

2 = tanaman gambir berpotensi kadar katekin tinggi.

Analisis terhadap semua karakter morfologi, terlihat ada beberapa karakter yang menentukan perbedaan (differensiasi) antara pengelompokan individu-individu yang diamati; yaitu panjang daun, lebar daun, panjang tangkai daun, diameter tangkai daun, dan tebal daun. Karakter panjang daun dengan nilai *Eigenvalue loading* (5.07469), lebar daun (3.65678), panjang tangkai daun (3.04801), diameter tangkai daun (2.78521), dan tebal daun (2.18953) merupakan karakter yang lebih menentukan differensiasi antara individu-individu, karena *Eigenvalue loading*nya lebih tinggi dari karakter yang lainnya.

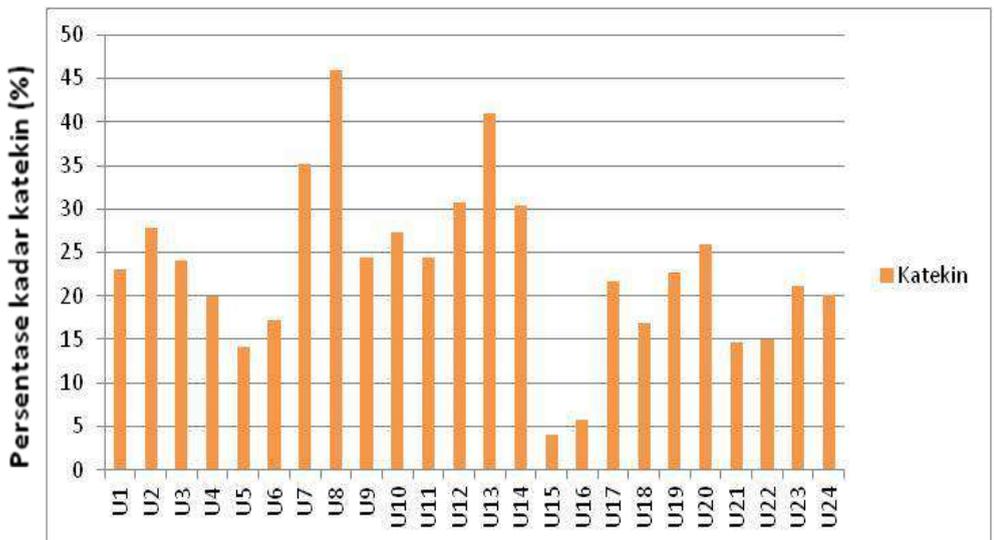
Analisis kadar katekin terhadap empat tipe tanaman gambir yang telah diamati memperlihatkan bahwa tipe Udang mempunyai kadar katekin yang lebih tinggi dibandingkan dengan tiga tipe lainnya. Oleh karena itu studi lanjut karakterisasi secara molekuler hanya dilakukan pada tanaman gambir tipe Udang.

4.2.2. Variasi Kadar Katekin pada Tipe Udang

Hasil pengamatan nilai kadar katekin pada empat tipe gambir, ternyata tipe Udang memiliki rata-rata kadar katekin lebih tinggi dibandingkan dengan tiga tipe lainnya. Namun pada tipe Udang sendiri juga mempunyai nilai yang cukup bervariasi, diantaranya ada yang memiliki kadar katekin lebih rendah yaitu 4,10% (Gambar 6).

Gambar 6 memperlihatkan bahwa untuk tipe Udang ditemui potensi kadar katekin yang sangat rendah pada dua sampel tanaman (U15) dengan persentase 4,10% dan (U16) yaitu 5,79%. Pada 24 tanaman gambir tipe Udang yang dianalisis kadar katekinnya, ternyata secara umum nilai persentase kadar katekinnya di atas

20%, dan hanya 6 tanaman yang persentase katekinnya dibawah dari 20%. Kadar katekin yang telah diuji memiliki rata-rata 23,04% dengan kisaran antara 4,1 % hingga 45,87%. Diperoleh 5 sampel tanaman nilai kadar katekinnya $\geq 30\%$ yaitu Udang (U7 = 35,17%; U8= 45,87%; U12 = 30,70; U13=41,04%, dan U14=30,32%).



Gambar 6. Variasi kadar katekin pada 24 tanaman gambir tipe Udang.

Terjadinya variasi kadar katekin dari 24 tanaman gambir tipe Udang yang diamati, diduga dikarenakan faktor genetik, dimana semua tanaman tumbuh pada areal lokasi yang sama yang berarti memiliki lingkungan yang sama. Variasi kadar katekin memiliki kaitan dengan variasi yang ditemui pada warna daun. Warna daun merupakan salah satu karakter yang memperlihatkan variasi yang cukup besar pada individu-individu yang diamati. Warna daun yang dijumpai adalah; merah agak tua, merah muda dan hijau kemerahan (Gambar 7). Terlihat ada kecendrungan bahwa

daun yang bewarna hijau kemerahan memiliki kadar katekin yang lebih rendah bila dibandingkan dengan daun tanaman gambir tipe Udang yang merah agak tua.



Gambar.7 Variasi warna daun tanaman gambir pada tipe Udang.
1= hijau kemerahan, 2= merah, 3= hijau kemerahan, dan
4= merah agak tua

Gambar 7 memperlihatkan bahwa terjadi variasi warna daun pada Udang itu sendiri. Hasil penelitian ini menunjukkan variasi warna daun seiring dengan variasi nilai kadar katekin. Kadar katekin merupakan senyawa utama yang terdapat dalam ekstrak gambir yang mempunyai banyak kegunaan diantaranya sebagai penyamak kulit atau penyamak jala ikan, bahan dasar pencelupan/pewarna (terutama untuk mencelup sutera dan perlengkapan militer). Selain itu gambir juga digunakan di pabrik bir untuk menjernihkan bir dan sebagai bahan dalam industri farmasi.

Sebagai komoditas ekspor, gambir mempunyai persyaratan tertentu. Standar SNI 01-3391-1994 menyatakan bahwa gambir mutu kelas satu, kadar katekin minimal 40%, kadar abu maksimal 7%, kadar air maksimal 17%, kadar bahan tidak larut dalam alkohol maksimal 12% (Hayani, 2003).

Gambir ternyata juga dapat dimanfaatkan sebagai pestisida nabati. Menurut Adria dan Idris (1996) ekstrak gambir dapat dipakai sebagai insektisida nabati dalam pengendalian larva kumbang colorado (*Epilachna sp*) Idris dan Adria (1997) juga melaporkan bahwa tepung gambir juga bersifat fungisida nabati terhadap jamur *imperfect* (*Fusarium sp*) penyebab penyakit bercak daun pada tanaman klausena (*Clausena anisata*). Menurut Nasrun, *et al* (1997) gambir dapat menghambat pertumbuhan jamur *Phytophthora cinnamomi* dan cukup berpotensi sebagai antibakteri dan antijamur. Dalam bidang farmasi gambir dapat sebagai obat penahan darah, astrigen, antiseptik, dan obat sakit perut (Balai Informasi Pertanian Sumatera Barat, 1988).

4.2.3. Hubungan Karakter Morfologi dengan Kadar Katekin

Sebanyak 26 karakter morfologi dan 5 karakter komponen hasil. dilakukan analisis menggunakan regresi (*Statistix8*). Masing-masing karakter dikorelasikan terhadap nilai kadar katekin. Secara umum beberapa karakter tidak menunjukkan korelasi dengan kadar katekin, namun demikian ada lima karakter yang berkorelasi dengan kadar katekin yaitu, warna daun (X_1), warna cabang (X_2), warna buah muda (X_3), berat satu helai daun (X_4), dan rendemen hasil (X_5) dengan nilai $R^2 = 0,7799$ dan ditunjukkan dengan persamaan regresi sebagai berikut:

$$\underline{Y = 12,469 + 2,095X_1 + 0,789X_2 + 1,991X_3 - 0,272X_4 - 0,756 X_5}$$

Nilai R^2 yang ditunjukkan oleh hasil regresi tersebut memperlihatkan bahwa keeratan hubungan antara 5 karakter morfologi dengan kadar katekin cukup memadai, artinya dengan nilai $R^2 = 0,7799$ dapat dianggap bahwa persamaan yang kita peroleh dinyatakan baik untuk digunakan. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa karakter warna, baik warna daun, warna cabang, maupun warna buah muda mempunyai keterkaitan dengan kadar katekin. Warna daun dalam hal ini mempengaruhi nilai kadar katekin, dimana katekin merupakan senyawa yang tergolong ke dalam flavonoid, seperti halnya antosianidin. Senyawa antosianidin adalah senyawa yang dapat memberikan warna merah atau kuning pada organ tanaman, terutama bunga. Senyawa antosianidin maupun katekin sama-sama berasal dari dihidroflavonol yang terlibat dalam jalur biosintesis flavonoid. Menurut Markham, (1988), struktur flavonoid saling berkaitan satu dengan yang lainnya, karena mempunyai jalur biosintesis yang sama yakni melalui dua jalur terpisah sikimat dan asetat melonat (Gambar 1). Setelah kedua jalur tersebut bertemu, bentuk senyawa flavonoid yang pertama kali yaitu khalkon. Bentuk katekin dan senyawa flavonoid lainnya diturunkan dari senyawa khalkon tersebut. Menurut Burhan, *et al* (1997) senyawa flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan seperti, daun, tepung sari, nektar bunga, buah, dan biji

Variabel yang paling besar pengaruhnya terhadap kadar katekin pada gambir adalah warna daun. Hal ini dibuktikan oleh nilai koefisien regresi warna daun yang lebih besar dibandingkan dengan empat variabel lainnya. Dengan demikian warna daun dianggap merupakan faktor penyumbang tingginya nilai kadar

katekin. Dari tabel anova Tabel 6 terlihat bahwa model regresi sudah sesuai dengan peluang sangat nyata yaitu $p = 0,0075$ untuk warna daun, sedangkan karakter lain yang juga berpengaruh sangat nyata adalah warna buah muda dengan $p = 0,0249$. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa jika terjadi perubahan angka pada warna daun (X_1) satu satuan, dan yang lainnya tetap (X_2, X_3, X_4, X_5), akan mengakibatkan nilai kadar katekin berubah sebesar 2,095 satuan.

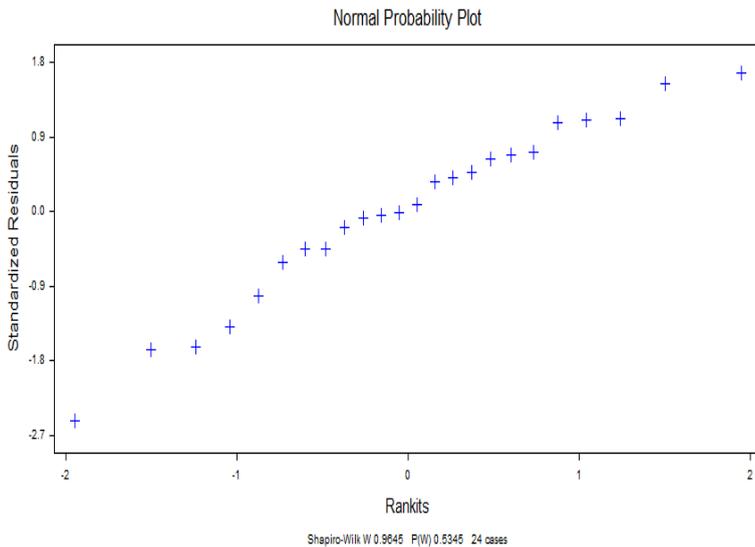
Tabel 6. Hasil analisis regresi dan table anova beberapa karakter morfologi yang menunjukkan korelasi dengan kadar katekin
Unweighted Least Squares Linear Regression of katekin

Predictor Variables	Coefficient	Std Error	T	P	VIF
Constanta	12.4686	18.5784	0,67	0,5107	
Warna daun	2.09531	0.69541	3,01	0,0075	2,4
Warna cabang	0.78950	0.87906	0,90	0,3810	2,7
Warna buah muda	1.99123	0.81401	2,45	0,0249	1,7
Berat 1 helai daun	-0.27117	2.01403	- 0,13	0,8944	1,1
Rendemen	-0.75624	2.91464	- 0,26	0,7982	1,2
R-Squared	0.7799	Resid. Mean Square (MSE)			25.9716
Adjusted R-Squared	0.7187	Standard Deviation			5.09624
Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	5	1656.37	331.275	12,67	0,00
Residual	18	467.49	25.972		
Total	23	2123.86			

Cases Included 24 Missing Cases 1

Suatu persamaan regresi dapat diterima, maka salah satu syarat yang harus terpenuhi adalah kenormalan faktor acak, dimana plot kenormalan membentuk garis lurus disepanjang diagonal (Mattjik dan Sumertajaya, 2000). Untuk memeriksa asumsi kenormalan faktor acak, maka digunakan plot kenormalan (*normality probability plot*) seperti tercantum pada Gambar 8. Gambar 8

memperlihatkan bahwa plot kenormal acak sudah sesuai persyaratan, yaitu sebaran nilai membentuk garis lurus disepanjang diagonal, sehingga persamaan regresi dapat diterima.



Gambar 8. Plot kenormalan dengan penduga katekin (Y), beserta variable warna daun (X_1), warna cabang (X_2), warna buah muda (X_3), berat 1 helai daun (X_4), dan rendemen (X_5).

Tabel 7. Karakter morfologi dan komponen hasil tanaman gambir tipe Udang berpotensi katekin tinggi dan gambir berpotensi katekin rendah (masing-masing diwakili oleh 5 sampel tanaman)

No	Karakter	Katekin Tinggi	Katekin Rendah
		Rata \pm Sd	Rata \pm Sd
a) Daun			
1	Panjang daun (cm)	11,79 \pm 0,55	12,14 \pm 1,7
2	Lebar daun (cm)	6,2 \pm 0,24	6,1 \pm 0,4
3	Panjang tangkai daun (cm)	0,7 \pm 0,1	0,73 \pm 0,02
4	Diameter tangkai daun (cm)	0,25 \pm 0,01	0,25 \pm 0,02
5	Tebal daun (mm)	0,4 \pm 0,03	0,4 \pm 0,06
6	Bentuk helai daun	Oval	Oval
7	Basis	Acuminatus	Acuminatus
8	Apex	Acuminatus	Acuminatus
9	Warna daun*)	Merah tua	hj kemerahan
b) Cabang			
10	Panjang ranting (cm)	56,81 \pm 11,6	52,3 \pm 7,7
11	Panjang ruas (cm)	7,03 \pm 0,8	6,8 \pm 1,3
12	Jumlah ruas (buah)	8,58 \pm 1,7	6,5 \pm 0,54
13	Sudut cabang ($^{\circ}$)	67,08 \pm 6,8	65,32 \pm 3,8
14	Diameter ranting (cm)	0,4 \pm 0,04	0,4 \pm 0,04
15	Jumlah kait (buah)	2,95 \pm 1,6	1,96 \pm 1,4
16	Warna cabang*)	hj cok	hj cok
c) Bunga			
17	Warna bunga*)	mera tua	merah muda
18	Diameter bunga (cm)	4,6 \pm 0,2	5,3 \pm 0,3
19	Panjang tangkai bunga (cm)	3,4 \pm 0,2	4,4 \pm 0,8
20	Diameter tangkai bunga (cm)	0,2 \pm 0,01	0,18 \pm 0,008
d) Buah			
21	Panjang tangkai buah (cm)	2,8 \pm 0,3	2,5 \pm 0,08
22	Diameter tangkai buah (cm)	0,25 \pm 0,01	0,5 \pm 0,01
23	Warna buah muda*)	merah tua	merah tua
24	Warna buah masak*)	cok tua	cok hit
25	Jumlah polong/tangkai (bh)	78,4 \pm 7,6	78,3 \pm 3,7
26	Panjang polong (cm)	3,58 \pm 0,27	3,5 \pm 0,39
e) Komponen Hasil			
27	Jumlah cabang/btg (bh)	10,4 \pm 3,4	10,4 \pm 2,3
28	Jumlah ranting/cabng (bh)	11,8 \pm 3,9	9,5 \pm 1,7
29	Jumlah daun/ranting (helai)	14,7 \pm 2,1	12,95 \pm 0,5
30	Berat 1 helai daun (g)	1,3 \pm 0,26	1,29 \pm 0,26
31	Rendemen hasil (%)	7,19 \pm 0,2	6,8 \pm 0,2

Keterangan: Ov= *oval*; Obl= *oblongus*; Ac= *acuminatus*; Hij=hijau;
mr= merah; md=muda; cok= coklat, hit= hitam
*) = Penentuan warna menggunakan standar referensi
colour chart (Munsell Color Charts for Plant Tissue)

Hasil pengamatan secara morfologi yang dilakukan dengan membandingkan beberapa karakter dari tipe Udang yang berpotensi katekin tinggi (U7,U8,U12, U13, dan U14) dengan gambir yang berpotensi katekin rendah (U5, U15, U16, U21, dan U22) disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7 menyajikan beberapa karakter morfologi antara gambir tipe Udang katekin tinggi dengan katekin rendah. Setiap karakter menunjukkan kisaran yang hampir sama angkanya namun terlihat kecendrungan bahwa pada gambir yang berpotensi katekin tinggi mempunyai nilai rata-rata sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan gambir berpotensi katekin rendah, kecuali pada karakter panjang daun, diameter tangkai daun, diameter ranting dan diameter bunga. Hasil pengamatan tersebut mengindikasikan bahwa adanya perbedaan yang memang disebabkan oleh faktor genetik. Untuk beberapa karakter lain, menunjukkan perbedaan yang tidak begitu dominan.

Karakter warna daun merupakan salah satu karakter yang dapat dilihat secara morfologi untuk membedakan antara satu tanaman dengan tanaman lainnya, namun demikian hal tersebut cukup sulit dilakukan. Tipe Udang dicirikan oleh warna daun merah. Warna daun merah juga memiliki perbedaan diantaranya. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh (Fauza, *et al*, 2010) bahwa pada tanaman gambir tipe Udang di Kenagarian Simpang Kapuk (Kabupaten 50 Kota) karakter warna daun merah memperlihatkan perbedaan, baik pada permukaan atas maupun

permukaan bawah. Ada daun yang permukaan atasnya berwarna hijau tua dan permukaan bawahnya hijau kemerahan. Ada pula permukaan atas berwarna hijau muda dan permukaan bawahnya berwarna merah. Terjadinya perbedaan setiap karakter yang diamati diduga disebabkan oleh perbedaan faktor genetik yang diekspresikan oleh potensi sifat yang dimiliki oleh tanaman yang bersangkutan.

Warna buah masak pada tanaman gambir potensi kadar katekin tinggi memperlihatkan warna mulai dari warna coklat muda, coklat tua, dan hitam, sedangkan pada gambir potensi kadar katekin rendah memperlihatkan warna coklat tua dan hitam. Terlihat kecendrungan bahwa pada kelompok gambir berpotensi kadar katekin tinggi ditemui buah masak berwarna coklat, sedangkan pada gambir katekin rendah hanya coklat tua dan hitam.

Bila diperhatikan karakter berat satu helai daun, pada gambir berpotensi kadar katekin tinggi juga lebih tinggi daripada gambir berpotensi kadar katekin rendah yaitu 1,20 gram lebih berat dari 1,15 gram. Hal tersebut seiring dengan rendemen hasil, dimana gambir berpotensi kadar katekin tinggi juga menunjukkan rendemen 7,18% , yakni lebih tinggi daripada gambir potensi kadar katekin rendah yang hanya memiliki rendemen 6,89%.

Berdasarkan nilai rata-rata hasil pengamatan karakter morfologi empat tipe tanaman gambir umur 24 bulan dapat dilihat bahwa hampir semua karakter masih memperlihatkan nilai kisaran yang memberikan perbedaan. Secara umum variasi yang terjadi antara nilai tertinggi dan nilai terendah satu karakter pada kelompok gambir berpotensi kadar katekin tinggi dan berpotensi kadar

katekin rendah lebih sempit bila dibandingkan dengan nilai kisaran seluruhnya. Secara umum nilai kisaran karakter-karakter yang diamati berdasarkan kelompok menunjukkan variasi yang lebih kecil dibanding variasi yang terjadi pada seluruh tanaman.

Oleh karena secara morfologi terdapat sedikit perbedaan antara gambir berpotensi kadar katekin tinggi dengan gambir berpotensi katekin rendah, dan perbedaan tersebut terlihat jelas pada daun, maka studi selanjutnya diarahkan pada struktur anatomi daun.

4.2.4. Struktur Anatomi Daun, dan Kadar Katekin pada Tipe Udang

Struktur anatomi daun gambir diamati menggunakan sediaan sayatan melintang mikroskopis dengan metode paraffin. Hasil pengamatan struktur anatomi daun pada tanaman gambir yang berpotensi kadar katekin tinggi dengan daun gambir potensi katekin rendah, memperlihatkan perbedaan yang jelas, seperti yang ditampilkan pada Tabel 8, sedangkan hasil pengamatan selengkapnya disajikan pada.

Struktur karakter anatomi daun pada tanaman gambir berpotensi katekin tinggi memperlihatkan nilai pengamatan beberapa karakter anatomi daun yang lebih tinggi daripada gambir berpotensi katekin rendah. Tabel 8 menunjukkan bahwa tebal kutikula atas, kutikula bawah, epidermis atas, epidermis bawah, tebal bunga karang dan tebal daun, untuk sampel tanaman dari kelompok gambir berpotensi kadar katekin tinggi menunjukkan angka yang lebih tinggi dibandingkan dengan gambir yang berpotensi kadar katekin rendah, kecuali pada tebal palisade menunjukkan angka yang sama.

Hasil analisis pada kelompok tanaman gambir tipe Udang

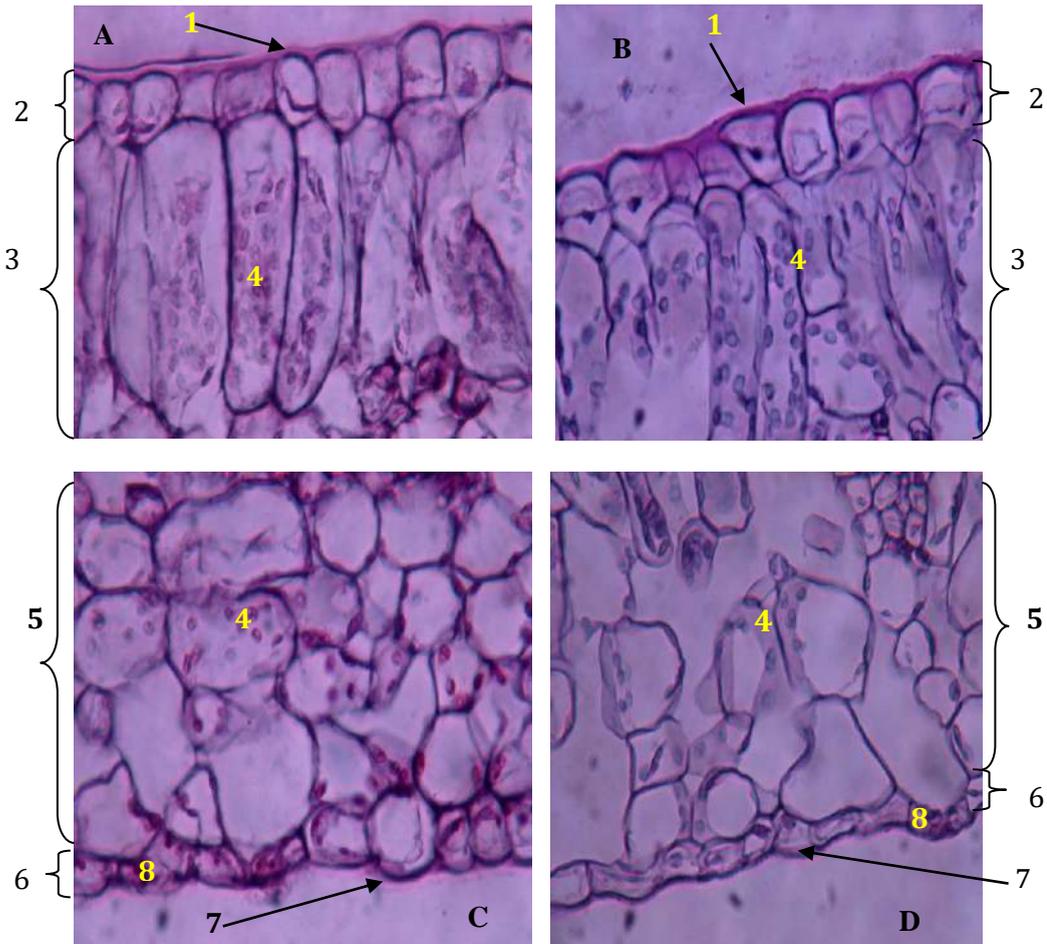
berpotensi kadar katekin tinggi mempunyai tebal daun yang lebih tebal yaitu 202,24 μm (0,20224 mm), sedangkan kelompok gambir tipe Udang berpotensi kadar katekin rendah hasilnya 199,08 μm (0,19909 mm). Variasi yang terjadi tersebut diduga disebabkan oleh pengaruh dari perbedaan faktor genetik dari dua kelompok tanaman gambir tipe Udang yang diamati.

Tabel 8. Rata-rata pengamatan anatomi daun gambir berpotensi katekin tinggi dan katekin rendah (masing-masing diwakili oleh 5 sampel tanaman)

No	Sampel	Tebal kutikula atas (μm)	Tebal kutikula bawah (μm)	Tebal epidermis atas (μm)	Tebal epidermis bawah (μm)	Tebal bunga karang (μm)	Tebal palisade (μm)	Tebal daun (μm)
1	U7	3,0	1,2	12,1	8,8	56,3	105,8	196,3
2	U8	3,2	1,0	11,7	10,0	72,5	137,5	210,8
3	U12	2,3	3,3	13,3	9,2	62,9	105,4	183,3
4	U13	3,5	1,2	12,1	9,6	64,6	105,8	187,9
5	U14	3,2	2,0	13,3	8,3	75,0	121,7	232,9
Ut	Total	15,2	8,7	62,5	45,9	331,3	576,2	1011,2
	Rataan	3,04	1,74	12,5	9,18	66,26	115,24	202,24
6	U5	3,0	1,0	13,3	8,8	53,3	105,4	190,4
7	U15	2,5	1,0	13,3	10,0	66,7	119,2	194,6
8	U16	2,0	1,0	12,9	7,9	60,0	108,3	193,3
9	U21	2,3	1,0	10,8	7,1	61,3	120,0	205,0
10	U22	2,7	1,0	11,3	8,3	60,4	125,0	212,1
Ur	Total	12,5	5,0	61,6	42,1	301,7	577,9	995,4
	Rataan	2,5	1,0	12,32	8,42	60,34	115,58	199,08

Ketebalan jaringan spons atau jaringan bunga karang pada kelompok gambir berpotensi kadar katekin tinggi rata-rata 66,26 μm . Angka tersebut lebih tebal daripada nilai rata-rata kelompok gambir berpotensi katekin rendah yaitu 60,34 μm . Jaringan spons bentuknya tidak beraturan dan berfungsi untuk menyimpan cadangan makanan. Fenomena ini diduga bahwa spons yang lebih tebal akan lebih mampu menyimpan senyawa metabolit sekunder berupa getah gambir dalam jumlah yang lebih besar pada vakuolanya. Hasil tersebut memperlihatkan pola yang sama

dengan rendemen hasil, dimana gambir berpotensi katekin tinggi mempunyai rendemen hasil rata-rata 7,18%, atau lebih tinggi dari pada gambir berpotensi katekin rendah yaitu 6,89%.



Gambar 9. Sayatan melintang daun permukaan atas, dan permukaan bawah; A= U₁₄(atas), B = U₁₆(atas), C =U₁₄(bawah), D = U₁₆(bawah). 1= kutikula atas, 2 = epidermis atas, 3 = jaringan palisade, 4 = kloroplas, 5 = jaringan spons, 6 = epidermis bawah, 7 = kutikula bawah, 8 = stomata. Gambir U₁₄ (Udang katekin tinggi) dan U₁₆ (Udang katekin rendah) dengan perbesaran (10 x 40)

Struktur anatomi daun gambir ditampilkan pada Gambar 9. Salah satu contoh gambar yang diwakili oleh sampel Udang14 (U₁₄) untuk gambir katekin tinggi, dan katekin rendah diwakili oleh Udang 16 (U₁₆). Pada sayatan melintang daun tanaman gambir, dapat dikemukakan bahwa pada permukaan atas terdiri dari; satu lapis sel epidermis atas (adaksial), kutikula, serta kloroplas dan jaringan palisade. Pada permukaan bawah terdapat satu lapis sel epidermis bawah (abaksial), jaringan spons atau jaringan bunga karang, kloroplas, stomata dan kutikula bawah.

Jaringan epidermis terdiri dari satu lapis sel yang kompak, dan berfungsi untuk melindungi jaringan yang dibawahnya. Kebanyakan daun tanaman memiliki epidermis yang dilapisi oleh kutikula, sehingga memiliki resistansi (ketahanan) tinggi untuk terjadinya difusi air. Selain kutikula, stomata memiliki resistansi rendah ketika membuka dan uap air berdifusi ke luar melalui stomata. Jumlah difusi air melalui stomata juga dipengaruhi faktor luar seperti hembusan angin, cahaya, suhu, dan kelembaban nisbi udara (Dalimunthe, 2004)

Mesopil yaitu jaringan yang terdapat antara epidermis atas (*adaxial*) dan epidermis bawah (*abaxial*) yang terdiri dari jaringan palisade dan spons Jaringan tersebut terdiri dari butir-butir khloroplas yang mengandung pigmen khlorofil. Pada jaringan palisade terlihat adanya butir-butir khloroplas yang berguna untuk berlangsungnya proses fotosintesis (Gambar 9). Butir khloroplas pada gambir berpotensi katekin tinggi hampir sama dengan gambir berpotensi kadar katekin rendah. Hasil tersebut seiring dengan angka tebal palisade yang ditampilkan pada Tabel

8 pada kedua kelompok gambir yaitu 115,24 μm dan 115,58 μm . Susunan sel-sel palisade yang tegak lurus terhadap helaian daun terlihat lebih beraturan daripada sel-sel palisade pada gambir katekin rendah. Hal ini memungkinkan penerimaan cahaya matahari untuk kegiatan fotosintesis akan lebih baik.

Pada permukaan bawah daun (baik pada gambir berpotensi katekin tinggi maupun gambir berpotensi katekin rendah) terdapat stomata dengan tipe anomositik, dimana stomata tidak dapat dibedakan antara sel pengiring dan sel epidermis. Sedangkan berdasarkan keberadaan stomata yang terletak pada bagian bawah (abaksial) maka disebut dengan daun hipostomatik (Meidaliza, *et al*, 2007 : Nurmawati, *et al*, 2007). Stomata berfungsi untuk organ pertukaran gas yaitu untuk mengambil CO_2 dari udara sebagai bahan fotosintesis, kemudian mengeluarkan O_2 sebagai hasil fotosintesis.

Gambar 9 memperlihatkan bahwa vakuola mendominasi sebagian besar ruang sel sehingga terlihat seperti ruang kosong karena sitosol terdesak ke bagian tepi sel. Bentuk dan susunan vakuola pada gambir berpotensi kadar katekin tinggi terlihat lebih kompak daripada gambir katekin rendah. Vakuola berperan sangat penting dalam kehidupan suatu tanaman, karena mekanisme pertahanan hidupnya bergantung pada kemampuan vakuola menjaga konsentrasi zat-zat terlarut di dalamnya. Senyawa katekin pada daun tanaman gambir sesungguhnya tersimpan dalam vakuola.

Vakuola pada tanaman cenderung lebih besar, yang didalamnya terkandung garam-garam organik, glikosida, zat penyamak (katekin dan tannin), minyak eteris (seperti jasmine, roseine,

zingiberine), alkaloid (seperti kafein, nikotin), enzim, dan butir-butir pati, serta berfungsi menyimpan senyawa organik yang dihasilkan oleh tanaman (<http://www.scribd.com/doc/17604347/Vakuola>, 2010)

Masing-masing karakter anatomi, baik pada gambir katekin tinggi maupun pada katekin rendah, dimana semua karakter anatomi yang diamati tidak menunjukkan korelasi dengan kadar katekin. Namun dari struktur anatomi seperti yang ditampilkan pada Gambar 9 dapat dikemukakan bahwa pada daun yang tebal (mesofil daun), butir-butir kloroplas lebih banyak terdapat dalam jaringan palisade dan jaringan spon daripada daun yang tipis.

Menurut Hidayat (1995), susunan kloroplas pada jaringan palisade memungkinkan penggunaan cahaya secara maksimum, sehingga efisiensi fotosintesis akan meningkat. Faktor lain yang juga menentukan adalah sistem ruang antar sel yang lebih luas pada jaringan palisade dan sejumlah sel memanjang tegak lurus terhadap permukaan helaian daun, sehingga efisiensi fotosintesis akan meningkat. Sedangkan jaringan spons sel-selnya bercabang dengan bentuk tidak beraturan. Hubungan antara sel yang satu dengan sel lainnya terbatas pada ujung cabang tersebut, dan sel-sel yang berdampingan membentuk hubungan horizontal dengan permukaan helaian daun.

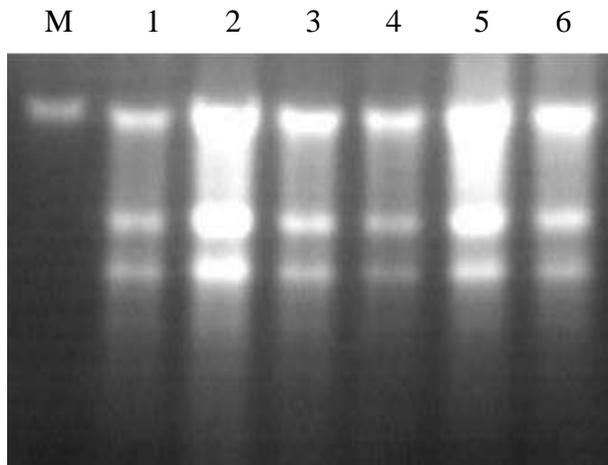
4.3. Karakterisasi Molekuler

4.3.1. Isolasi DNA

Sebelum dilakukan analisis untuk mendapatkan polimorfisme antara DNA tanaman gambir berpotensi kadar katekin tinggi dengan katekin rendah terlebih dahulu dilakukan isolasi DNA genom. Isolasi DNA genom menggunakan bahan pucuk muda yang

segar dari tanaman gambir tipe Udang (U) dengan metode CTAB (*Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*) (Doyle dan Doyle, 1990) dengan sedikit modifikasi. Protokol isolasi yang menggunakan phenol dan kloroform, biasanya bertujuan untuk melarutkan protein (Smalla, *et al.*, tahun 1993 *cit* Jamsari dan Ferita, 2010). Hasil isolasi dari 24 tanaman sampel semuanya menunjukkan kuantitas dan kualitas DNA yang baik, sebahagiannya ditampilkan pada Gambar 10, Kualitas DNA semakin baik terutama setelah penambahan RNase. Penambahan enzim RNase pada sampel DNA dilakukan bertujuan untuk pencernaan secara enzimatik terhadap molekul-molekul RNA yang masih tersisa karena molekul-molekul ini merupakan kontaminan yang dapat mempengaruhi efisiensi terhadap tindakan amplifikasi selanjutnya.

Kuantitas DNA diestimasi menggunakan gel elektrophoresis yang dibandingkan dengan DNA standar (λ DNA 50 ng/ μ l), kemudian di visualisasikan dengan UV transluminator. Salah satu hasil isolasi DNA genom dari tanaman gambir tipe Udang dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Hasil isolasi DNA tanaman gambir . M= λ DNA (50ng/ μ l), 1 - 6 adalah nomor sampel U1, U2, U3, U4, U5, dan U6. U= Tipe Udang

Hasil dokumentasi tersebut menunjukkan intensitas bervariasi dari fragmen yang terbentuk. Pada sampel kode 2 dan 5 mempunyai intensitas 5 kali λ DNA, sampel kode 3 dan 6 memiliki intensitas 3 kali λ DNA, sedangkan sampel kode 1 dan 4 mempunyai intensitas 2 kali λ DNA.

Gambar 10 memperlihatkan bahwa konsentrasi DNA gambir yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan dengan λ DNA, yaitu 2 - 5 kali λ DNA, artinya konsentrasi DNA sampel tanaman gambir yang diperoleh diperkirakan sekitar 100 ng/ μ l - 250 ng/ μ lnya. Hasil tersebut menggambarkan bahwa isolasi DNA gambir dengan menggunakan pucuk daun muda segar memakai metode CTAB (Doyle dan Doyle, 1990) pada tanaman gambir memberikan hasil yang sangat baik, karena jaringan masih lunak sehingga mudah membebaskan molekul-molekul asam nukleat dari inti sel. Bruce, *et al.*, tahun 1992., *cit.* Jamsari dan Ferita, 2010) menyatakan bahwa prosedur lisis kimiawi yang mengandung deterjen seperti

CTAB yang digabungkan dengan inkubasi pada suhu tinggi (65°C) merupakan tujuan dalam meningkatkan efisiensi isolasi. Menurut Miller *et al.*, tahun 1999 *cit* Jamsari dan Ferita (2010), kriteria efektifitas dan keberhasilan suatu metode isolasi DNA dapat diukur berdasarkan : a) efisiensi lisis sel, b) jumlah DNA yang dihasilkan, dan c) ukuran molekul DNA yang diperoleh.

Selain bahan tanaman dan bahan kimia yang perlu juga menjadi perhatian dalam mengisolasi daun gambir adalah dalam proses penggerusan. Jika proses penggerusan terlalu lama serbuk hasil gerusan akan cepat menguning /coklat karena kandungan senyawa fenolik yang tinggi pada tanaman gambir. Senyawa fenolik dapat menghambat kerja enzim sehingga mengganggu ekstraksi DNA. Penambahan senyawa pereduksi seperti β -*mercaptoethanol* dapat mencegah oksidasi senyawa fenolik sehingga menghambat aktifitas radikal bebas yang dihasilkan oleh oksidasi fenol terhadap asam nukleat (Wilkins dan Smart 1996).

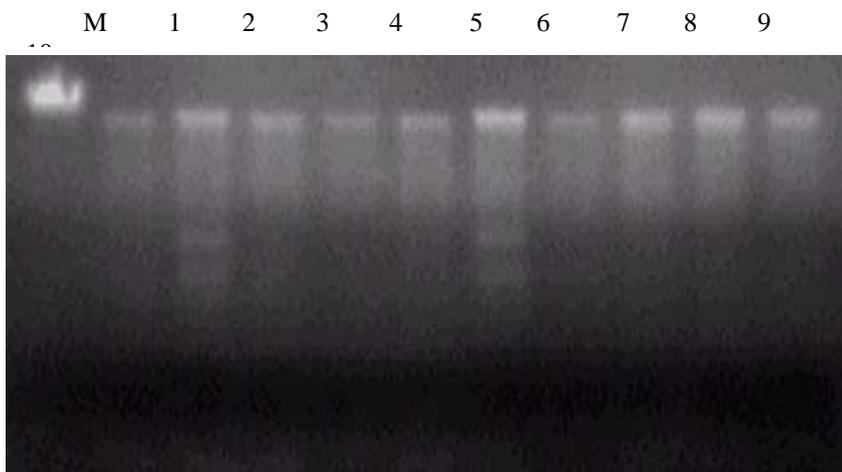
Pada Gambar 10 terlihat adanya fragmen *smear* dibawah fragmen utama. Diduga fragmen tersebut muncul disebabkan oleh penggerusan yang terlalu lama, akibatnya terjadi kerusakan secara mekanis serta aktifnya enzim DNase, sehingga produk DNA menjadi terpotong-potong.

Jamsari (2007) mengemukakan bahwa waktu yang cukup lama dalam kegiatan pemecahan dinding sel secara mekanis akan menyebabkan aktifitas enzim DNase bekerja secara efektif untuk menguraikan molekul-molekul DNA, sehingga DNA yang dihasilkan sudah tidak utuh lagi. Oleh karena itu, selama pemecahan sel secara mekanis perlu diupayakan agar suhu selalu dingin seperti melalui penambahan nitrogen cair, sehingga

aktivitas enzim DNase dapat dihambat.

Pada prinsipnya dapat dinyatakan bahwa hasil isolasi DNA genom yang telah diperoleh dapat digunakan untuk kegiatan amplifikasi selanjutnya. Tindakan yang dilakukan sebelum amplifikasi adalah melakukan pengenceran agar konsentrasi DNA menjadi sama yaitu menjadi 10ng/μl. Hal tersebut dilakukan dengan melarutkan DNA template menggunakan TE 1X sesuai perhitungan yang telah dilakukan. Secara lengkap konsentrasi yang diinginkan untuk dijadikan templet saat amplifikasi dari masing-masing sampel ditampilkan pada Tabel 8.

Untuk memastikan bahwa konsentrasi DNA yang telah diencerkan mempunyai konsentrasi yang sama, maka kembali dilakukan proses elektroforesis dengan agarose 1 % pada buffer 0,5X TBE menggunakan tegangan 100 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis didokumentasikan menggunakan UV transluminator. Setelah konsentrasi DNA terlihat sama yaitu 10 ng/μl (Gambar 11), langkah selanjutnya adalah tahap amplifikasi menggunakan mesin PCR dengan primer RAPD.



Gambar 11. Hasil pengenceran dengan konsentrasi DNA 10 ng/ μ l.
M = λ DNA 50 ng/ μ l. 1 sampai 10 adalah sampel U1 - 10

DNA genom hasil pengenceran masing-masing sampel memiliki volume 100 μ l. Volume tersebut cukup untuk dapat memenuhi kebutuhan dalam kegiatan amplifikasi PCR menggunakan primer RAPD. Untuk mempercepat proses seleksi primer dalam menentukan polimorfisme antara DNA gambir berpotensi katekin tinggi dan katekin rendah, maka dilakukan pembentukan pool DNA. Selanjutnya pool DNA yang dibentuk digunakan sebagai templet dalam analisis differensiasi fingerprinting berbasis RAPD. Sebagai DNA templet dalam seleksi primer digunakan pool DNA gambir dengan konsentrasi masing-masing 5 ng/ μ l (pool DNA gambir berpotensi kadar katekin tinggi dan pool DNA gambir yang berpotensi katekin rendah). Pool dibentuk berdasarkan persentase kadar katekin yang dihasilkan, yakni pool katekin tinggi adalah sampel yang kadar katekinnya > 15%, dan pool katekin rendah adalah sampel yang kadar katekinnya \leq 15%. Berdasarkan hal tersebut, maka untuk gambir pool DNA katekin tinggi digunakan 5 sampel yaitu U7, U8, U12, U13, dan U14, demikian juga pool DNA katekin rendah terdiri dari 5 sampel yaitu U5, U15, U16, U21, dan U22, sehingga terbentuk dua pool.

Tabel 9. Konsentrasi DNA yang dihasilkan masing-masing sampel beserta konsentrasi yang diharapkan untuk melaksanakan amplifikasi PCR

Sampel	Kode Sampel	Konsentrasi hasil isolasi (ng/μl)	Konsentrasi untuk amplifikasi (ng/μl)
Udang 1	U1	100	10
Udang 2	U2	250	10
Udang 3	U3	150	10
Udang 4	U4	100	10
Udang 5	U5	250	10
Udang 6	U6	150	10
Udang 7	U7	250	10
Udang 8	U8	250	10
Udang 9	U9	50	10
Udang 10	U10	100	10
Udang 11	U11	75	10
Udang 12	U12	75	10
Udang 13	U13	150	10
Udang 14	U14	150	10
Udang 15	U15	100	10
Udang 16	U16	75	10
Udang 17	U17	150	10
Udang 18	U18	50	10
Udang 19	U19	75	10
Udang 20	U20	125	10
Udang 21	U21	75	10
Udang 22	U22	100	10
Udang 23	U23	100	10
Udang 24	U24	150	10

4.3.2. Differensiasi Fingerprinting RAPD

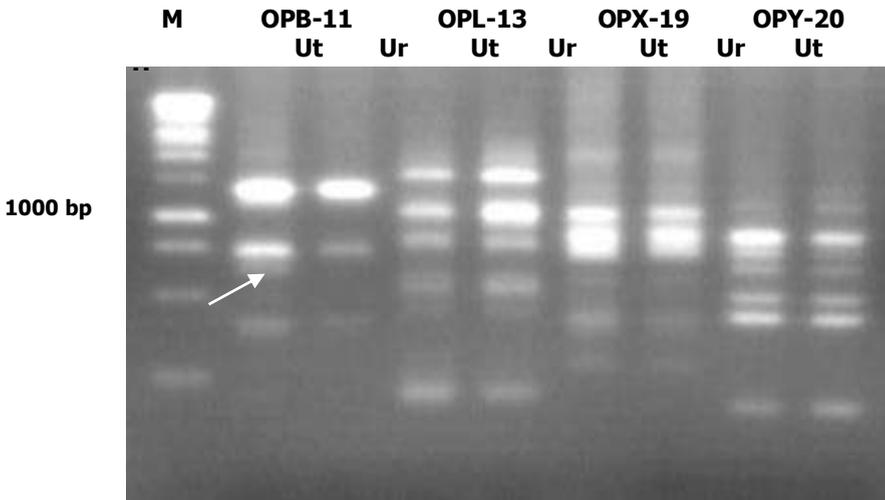
Seleksi primer menggunakan pendekatan analisis segregasi bulk (BSA = *Bulked Segregant Analysis*) pada pool DNA genom. Sebanyak 98 primer RAPD dari *operon technology* (Almaeda, USA) telah digunakan. Analisis menggunakan primer RAPD tersebut, menghasilkan 6 primer yang dapat memperlihatkan polimorfisme antara DNA gambir berpotensi katekin tinggi dengan gambir berpotensi katekin rendah (Tabel 10). Secara umum primer-primer RAPD yang telah diuji menghasilkan fragmen berkisar anantara 1 hingga 5 pita. Beberapa primer diantaranya tidak mampu menghasilkan fragmen (produk), tetapi ada juga yang menghasilkan 8 fragmen DNA.

Azrai'i (2006) mengemukakan, metode deteksi suatu karakter dapat berupa *gen tagging* dengan pendekatan MAS (*Marker Aisisted Selection*) dapat dikembangkan melalui suatu cara yang cepat dan tepat untuk menyeleksi individu tanaman dengan menggunakan marka yang terpaut kuat untuk suatu karakter melalui pendekatan analisis segregasi bulk atau BSA (*Bulked Segregant Analysis*).

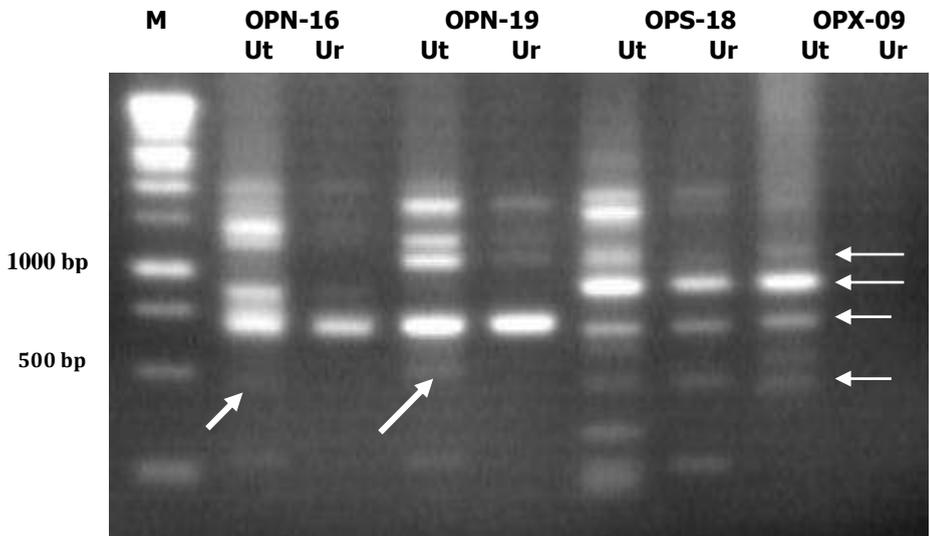
Penggunaan primer RAPD dalam mendeteksi suatu karakter tidak spesifik, karena primer RAPD merupakan primer arbitrary yang akan menghasilkan produk sesuai dengan *binding site* yang kompatibel dengan DNA *template*. Penggunaan primer RAPD sangat cocok untuk seleksi awal pada suatu tanaman yang belum diketahui latar belakang genomnya. Prana dan Hartati (2003) menyatakan, keberhasilan amplifikasi DNA genom menggunakan teknik RAPD selain ditentukan oleh urutan basa primer yang digunakan serta kuantitasnya (kandungan primer dalam setiap

reaksi), ditentukan pula oleh kesesuaian kondisi PCR yang meliputi suhu annealing primer dan ekstensi.

Dasar analisis RAPD adalah menggunakan mesin PCR yang mampu mengamplifikasi sekuen DNA secara *in vitro*. Teknik ini melibatkan penempelan primer tertentu yang dirancang sesuai dengan kebutuhan. Penggunaan teknik RAPD memang memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang diseleksi dengan menggunakan satu primer arbitrari, terutama karena amplifikasi DNA secara *in vitro* dapat dilakukan dengan baik dan cepat dengan adanya PCR (Suryanto, 2003). Berikut ditampilkan hasil amplifikasi PCR yang mampu memberikan polimorfisme antara kedua pool.



Gambar 12. Hasil amplifikasi PCR dengan primer OPB-11, OPL-13, OPX-19, dan OPY-20 dengan sampel Ut = Udang katekin tinggi dan Ur = Udang katekin rendah. M= 1 kb ladder. Tanda panah adalah yang memperlihatkan polimorfisme



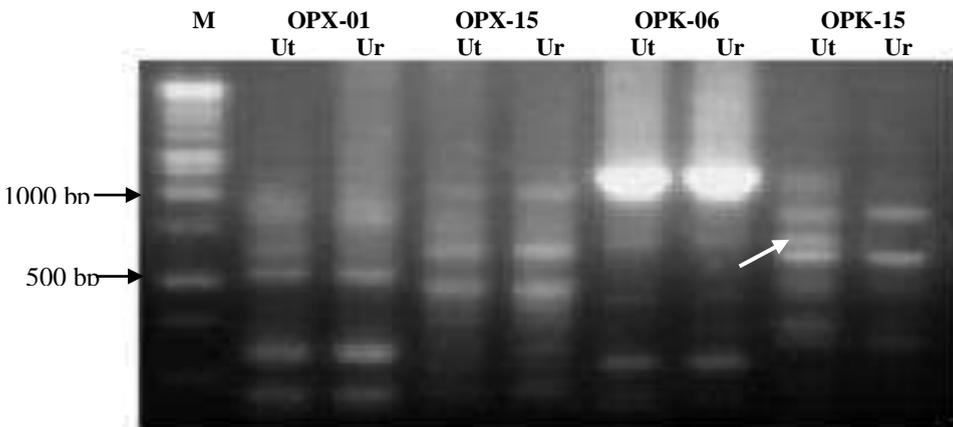
Gambar 13. Hasil amplifikasi PCR dengan primer OPN-16, OPN-19, OPS-18, dan OPX-09 dengan sampel Ut = Udang katekin tinggi dan Ur = Udang katekin rendah. M= 1 kb ladder. Tanda panah adalah yang menunjukkan polimorfisme

Primer OPB-11 (Gambar.12), dan primer OPN-16, OPN-19, OPX-09 (Gambar 13), memperlihatkan polimorfisme antara DNA gambir berpotensi katekin tinggi dengan katekin rendah. Primer OPB-11 dapat menghasilkan 4 fragmen pada gambir berpotensi katekin tinggi dan 3 fragmen untuk gambir potensi kadar katekin rendah, artinya terdapat satu fragmen yang berbeda dengan ukuran 700 bp. Primer OPN-16 (Gambar 13) menghasilkan 8 fragmen untuk gambir potensi katekin tinggi, dan 4 fragmen diantaranya memiliki intensitas yang sangat kuat, sedangkan 4 fragmen lainnya cukup tipis. Fragmen yang menunjukkan polimorfisme berada pada ukuran kira-kira 400 bp untuk katekin tinggi dan tidak dijumpai untuk katekin rendah. Untuk gambir katekin rendah terdapat 4 fragmen, satu diantaranya mempunyai intensitas cahaya yang sangat bagus, dan 3 fragmen lainnya

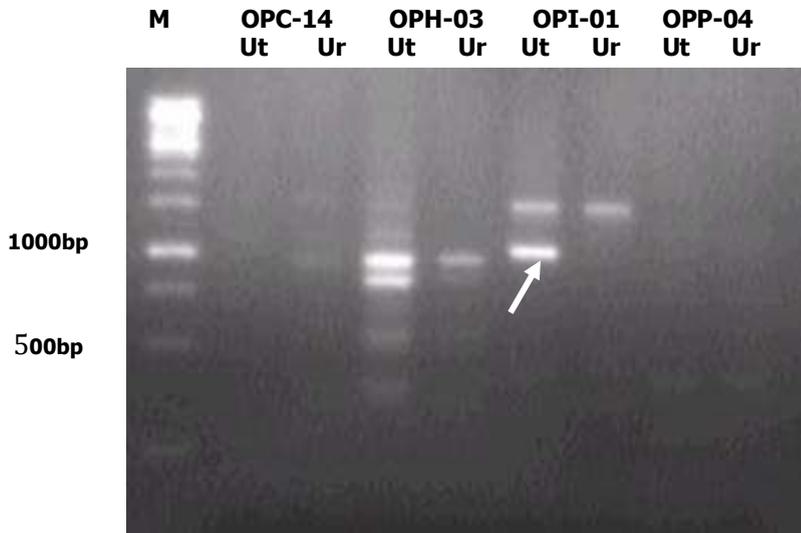
sangat tipis.

Primer OPN-19 memperlihatkan fragmen dengan ukuran sekitar 500 bp (Gambar 13) untuk sampel gambir potensi kadar katekin tinggi, namun tidak dijumpai ukuran yang sama pada gambir berpotensi katekin rendah. Primer OPX-09 (Gambar 13) untuk gambir potensi katekin tinggi dijumpai 4 fragmen dengan ukuran 1000 bp, 700 bp, 500 bp, dan 450 bp, tetapi pada gambir potensi katekin rendah tidak satupun dihasilkan fragmen.

Terbentuknya produk amplifikasi dengan beberapa primer RAPD, diduga disebabkan oleh kemampuan sekuen primer acak tersebut menghasilkan produk sesuai dengan *binding site* yang kompatibel dengan DNA templet. Sedangkan terbentuknya polimorfisme pada gambir katekin tinggi diduga adanya sekuen tertentu yang keberadaannya dapat digunakan sebagai pencirikan kadar katekin pada gambir. Diperlukan analisis lebih lanjut, mengenai gen yang betul-betul terlibat dalam mengendalikan sifat potensi kadar katekin tinggi.



Gambar 14. Hasil amplifikasi PCR dengan primer OPX-01, OPX-15, OPK-06, dan OPK-15 pada sampel Ut dan Ur. M= 1kb ladder. Tanda panah dalam yang menunjukkan polimorfisme.



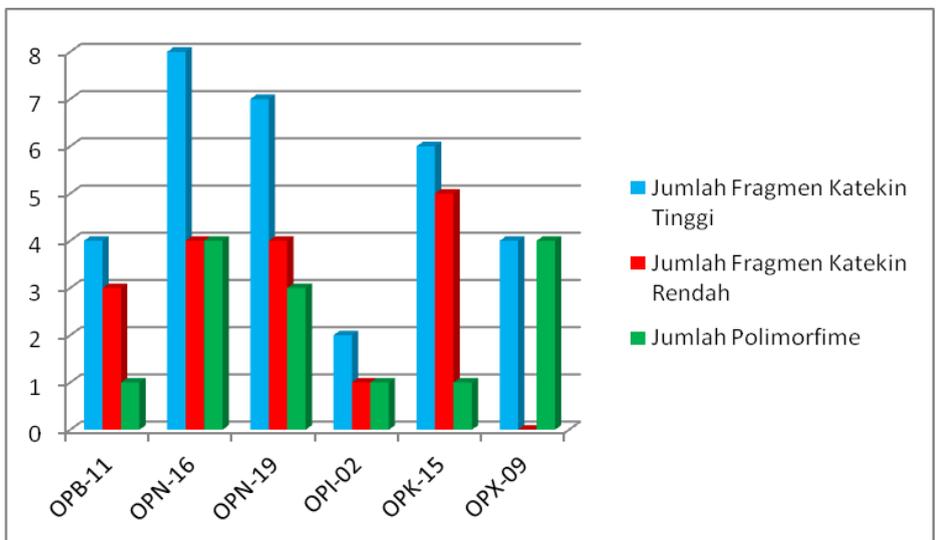
Gambar 15. Hasil amplifikasi PCR dengan primer OPC-14, OPH-03, OPI-01, dan OPP-04 pada sampel Ut dan Ur. M= 1 kb ladder. Tanda panah adalah yang menunjukkan polimorfisme

Primer OPK-15 (Gambar 14), dan primer OPI-01 (Gambar 15) memperlihatkan polimorfisme antara DNA gambir berpotensi katekin tinggi dengan gambir katekin rendah. Primer OPK-15 menghasilkan fragmen pada ukuran sekitar 700 bp, namun tidak dijumpai pada gambir potensi katekin rendah pada ukuran yang sama. Primer OPI-02 menghasilkan fragmen berukuran 1000 bp untuk gambir katekin tinggi, sedangkan pada gambir katekin rendah tidak dihasilkan fragmen pada ukuran yang sama.

Produk amplifikasi yang diperoleh dengan beberapa primer RAPD dan telah menunjukkan polimorfisme antara katekin tinggi dengan katekin rendah, diduga karena adanya sisi pengenalan dari sekuens primer acak yang sesuai dengan DNA templat. Suryanto (2003) menyatakan penggunaan teknik RAPD memang memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang diseleksi dengan menggunakan satu primer arbitrari,

terutama karena amplifikasi DNA secara *in vitro* dapat dilakukan dengan baik dan cepat dengan adanya PCR. Menurut Demake and Adams tahun 1994 *cit. Karsinah et al, (2002)*, penggunaan penanda RAPD membutuhkan sampel DNA lebih rendah (0,5-50 ng), tidak memerlukan radioisotop, dan tidak terlalu membutuhkan keahlian dalam melaksanakannya dibandingkan dengan penanda RFLP.

Hasil seluruh kegiatan amplifikasi menggunakan primer RAPD (98 primer) diperoleh 6 primer yang menunjukkan polimorfisme, yaitu primer OPB-11, OPI-02, OPK-15, OPN-16, OPN-19, dan OPX-09 (Tabel 10). Pada diagram Gambar 16 disajikan hasil tersebut.



Gambar 16. Diagram penampilan fragmen hasil amplifikasi dengan primer RAPD yang menunjukkan polimorfisme antara pool DNA gambar katekin tinggi dengan pool DNA gambar katekin rendah

Tabel 10. Primer RAPD beserta sekuens yang menunjukkan polimorfisme antara pool DNA gambir katekin tinggi dan katekin rendah.

No	Nama Primer	Sekuens	Fragmen Katekin Tinggi	Fragmen Katekin Rendah	Jumlah Polimorfisme
1	OPB-11	GTA GAC CCG T	4	3	1
2	OPN-16	AAG CGA CCT G	8	4	4
3	OPN-19	GTC CGT ACT G	7	4	3
4	OPI-02	ACC TGG ACA C	2	1	1
5	OPK-15	CTC CTG CCA A	6	5	1
6	OPX-09	GGT CTG GTT G	4	0	4

Tabel 9 dan Gambar 16, memperlihatkan 6 primer RAPD yang menunjukkan polimorfisme antara gambir berpotensi kadar katekin tinggi dengan katekin rendah yaitu OPB-11, OPI-01, OPN-16, OPN-19, OPK-15, dan OPX-09 dengan jumlah pita berkisar 2 hingga 8. Terjadinya polimorfisme antara gambir katekin tinggi dengan katekin rendah menggunakan penanda RAPD disebabkan oleh kemampuan sekuen primer acak tersebut menghasilkan produk sesuai dengan *binding site* yang kompatibel dengan DNA templet pada katekin tinggi, serta adanya sekuen tertentu yang keberadaannya dapat digunakan sebagai penciri kadar katekin pada gambir.

Williams, *et al*, (1990) telah berhasil menggunakan penanda RAPD untuk menguji polimorfisme intraspesifik dalam spesies tanaman. Dalam penelitian ini, dari pita-pita polimorfik yang dihasilkan oleh primer-primer tersebut dicari pita yang kemunculannya selalu terkait dengan potensi genetik kadar katekin tinggi. Selain 6 primer tersebut dijumpai juga beberapa primer yang

menghasilkan fragmen lebih banyak pada gambir berpotensi katekin rendah bila dibandingkan dengan gambir berpotensi katekin tinggi, seperti yang ditunjukkan oleh primer OPW-14, OPW-19, dan OPY-09, serta ada juga primer RAPD tersebut yang tidak mampu menghasilkan fragmen antara lain seperti yang ditunjukkan oleh primer OPM-04, OPQ-11, dan OPZ-13.

Primer merupakan syarat mutlak untuk terjadinya reaksi amplifikasi menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Dalam reaksi PCR terjadi penggandaan molekul DNA template dengan bantuan enzim *taq polymerase* dan dNTPs (nukleotida bebas) sebagai penyusunnya. Dalam hal ini primer berfungsi sebagai titik awal (*starting point*) dalam pembentukan rantai polynukleotida sintetis (Jamsari, 2007).

Pada proses PCR ada tiga tahapan yang berlangsung dalam beberapa siklus sesuai dengan program yang dipakai. Tiga tahapan itu yaitu denaturasi, annealing dan ekstensi. Pada tahap denaturasi terjadi pemisahan untai ganda DNA menjadi pita tunggal dengan pemanasan antara 94°C sampai 96°C. Setelah pita ganda DNA terpisah menjadi untai tunggal maka tahapan berikutnya adalah annealing. Annealing merupakan tahapan dimana terjadi penempelan primer kesisi tempelan (*binding site*) untai tunggal DNA templet yang terjadi pada suhu tertentu sesuai dengan karakteristik primer itu sendiri. Tahapan yang terakhir disebut ekstensi dimana pada tahap ini terjadi pembentukan molekul DNA sintetis. Pembentukan untai ini dikatalisis oleh enzim *Taq Polymerase* dengan dNTPs bebas sebagai penyusunnya. Jamsari (2007) menyatakan bahwa proses pembentukan molekul DNA memiliki kecepatan pembentukan sekitar 150 nukleotida per

detik.

Perbedaan kualitas hasil amplifikasi selain dilihat berdasarkan jumlah pita yang dapat diidentifikasi, juga dapat dilihat berdasarkan resolusi fragmen DNA yang diamplifikasi. Beberapa fragmen yang dihasilkan memperlihatkan pita dengan intensitas yang tajam.

Sebanyak 98 primer RAPD telah diuji, enam puluh delapan diantaranya mampu menghasilkan fragmen berkisar antara 2 hingga 7 dari setiap pool DNA genom), namun belum menghasilkan polimorfisme, sedangkan sebagian kecil yaitu delapan primer menghasilkan satu fragmen. Dua puluh dua primer tidak mampu menghasilkan fragmen seperti pada primer OPC-14 dan OPP-04. Secara keseluruhan total fragmen yang dihasilkan 317 fragmen pada pool DNA gambir katekin tinggi dan 306 fragmen pada pool DNA gambir katekin rendah.

Terdeteksi pada 6 primer menghasilkan fragmen lebih banyak pada katekin tinggi daripada katekin rendah dengan total fragmen polimorfisme 14 pita. Dalam penelitian ini pita-pita yang telah berhasil teramplifikasi oleh 6 primer (Tabel 10) diduga berhubungan dengan penciri gambir berpotensi kadar katekin tinggi. Hasil tersebut seiring dengan hasil penelitian (Sanjaya, *et al* (2002) yang telah berhasil membedakan aksesori cabai tahan dan peka antraknose menggunakan penanda RAPD dengan primer OPG-11.

Terdapat hal yang menarik pada primer OPF-13, OPW-14, OPW19, dan OPY-09, dimana untuk gambir potensi kadar katekin rendah lebih banyak fragmen yang dihasilkan daripada gambir potensi katekin tinggi dalam pool, artinya pada ukuran tertentu tidak

dijumpai fragmen pada gambir potensi katekin tinggi, sedangkan pada gambir potensi katekin rendah dijumpai fragmen. Total fragmen yang dihasilkan sebanyak 11 pita. Fragmen-fragmen tersebut perlu dikonfirmasi lebih lanjut, oleh karena kemungkinannya dapat digunakan sebagai penanda negatif untuk mendeteksi kontaminan pada program pemuliaan tanaman gambir.

Hasil penelitian tahap awal tersebut memperlihatkan enam primer RAPD yang mampu menghasilkan produk polimorfisme antara kedua pool DNA digunakan untuk analisis lebih lanjut. Untuk memastikan konsistensi hasil tersebut dilakukan pengujian kembali terhadap keam primer pada tingkat individu dari DNA penyusun pool.

4.3.3. Seleksi Primer Tingkat Individu

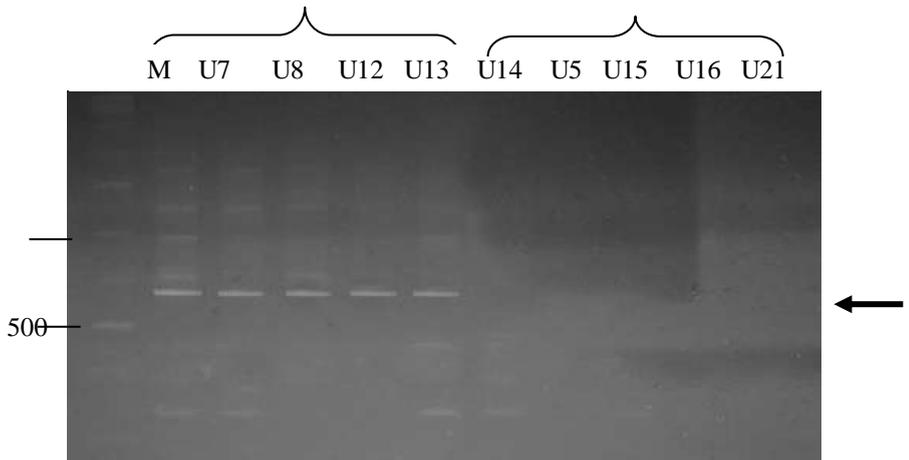
Kegiatan penelitian selanjutnya adalah pengujian primer RAPD pada tingkat seleksi individu artinya pengujian dilakukan pada masing-masing individu sampel penyusun pool DNA katekin tinggi dan pool DNA katekin rendah. Kegiatan seleksi tingkat individu dalam pool dilakukan dengan menguji kembali primer- primer yang telah menunjukkan polimorfisme antara Udang berpotensi katekin tinggi dan Udang berpotensi katekin rendah, yakni primer OPB-11, OPN-16, OPN-19, OPX-09, OPK-15, dan OPI-01. Masing-masing primer tersebut diuji kembali dengan individu-individu tanaman penyusun pool. Hasil analisis keenam primer RAPD ini semuanya membentuk produk dengan beberapa ukuran, namun fragmen hasil belum menunjukkan polimorfisme antara individu-individu dalam kedua pool DNA (bulk). Terbentuknya fragmen hasil amplifikasi PCR merupakan hasil berpasangannya

nukleotida primer dengan nukleotida genom tanaman sehingga semua DNA sampel yang diuji menghasilkan produk termasuk pada gambir katekin rendah.

Menurut Azra'ii (2006), karakter kuantitatif berhubungan dengan kompleksitas genetik disebabkan oleh banyaknya gen yang terlibat dalam ekspresinya, namun efek dari setiap gen terhadap penampilan fenotip hanya kecil.

Adanya interaksi antargen (epistasis) juga menjadi faktor penghambat dalam memanipulasi karakter kuantitatif.

Primer OPK-15 memperlihatkan hasil yang stabil. Pengujian amplifikasi dengan PCR ternyata menghasilkan produk berukuran lebih kurang 700 bp. Gambar 17 memperlihatkan hasil pengujian yang menghasilkan produk menggunakan primer OPK-15.



Gambar 17. Hasil amplifikasi PCR dengan primer OPK-15, dengan sampel U7, U8, U12, U13, U14, (Udang katekin tinggi), dan U5, U15, U16, U21, U22 (Udang katekin rendah); M= 1 kb Ladder (Fermentas-USA). Tanda panah memperlihatkan Posisi fragmen polimorfisme.

Sebanyak 10 DNA sampel gambir yang diuji, terlihat profil pita spesifik yang ditunjukkan oleh primer OPK-15, yakni memberikan produk pada Udang katekin tinggi dengan ukuran sekitar 700 bp, namun tidak dijumpai pada Udang katekin rendah. Untuk mendapatkan fragmen target hasil seleksi yang berasal dari primer RAPD memang memerlukan pengujian berulang sampai ditemukan fragmen yang dianggap spesifik dibandingkan dengan fragmen lainnya. Pita-pita spesifik ini dapat memberi harapan sebagai penanda gambir berpotensi katekin tinggi yang digunakan untuk identifikasi bibit gambir secara dini, karena identifikasi secara konvensional didasarkan pada karakter-karakter morfologi yang memerlukan observasi intensif pada tanaman dewasa.

Teknologi molekuler menjanjikan ketepatan dan akurasi, serta ketelitian metoda analisis yang baik, karena peran marka DNA yang paling mendasar adalah untuk mendeteksi variasi atau perbedaan antar beberapa individu (Paterson, *et al.*, 1991). Selain itu analisis DNA juga berguna dalam penentuan gen yang berperan penting dalam sifat tertentu dan hubungan kekerabatan (Lefebvre *et al.*, 2001). Selain untuk mempelajari adanya variasi genetik, keperluan khusus sistem penanda sebagai alat deteksi kehadiran alel-alel spesifik yang mencirikan karakter-karakter penting tertentu dari suatu organisme merupakan kontribusi lainnya yang dapat ditunjukkan oleh penanda molekuler (Jamsari dan Ferita, 2010).

Fragmen spesifik yang telah diperoleh dengan primer OPK-15 digunakan untuk kegiatan selanjutnya yaitu kloning, namun untuk memastikan fragmen target tersebut murni, maka terlebih dahulu

dilakukan purifikasi

4.4. Isolasi dan Purifikasi Fragmen Spesifik Terkait Potensi

Kadar Katekin Tinggi

Fragmen target yang terkait potensi kadar katekin tinggi diisolasi dan dipurifikasi dari agarose gel menggunakan skalpel steril di bawah sinar UV. Panjang fragmen yang diisolasi dengan memotong gel agarose yaitu berukuran kira-kira 700 bp. Fragmen hasil potongan dipurifikasi menggunakan kit purifikasi (Promega-USA). Tujuan kegiatan purifikasi adalah agar fragmen target terbebas dari molekul lain seperti buffer ataupun sisa primer. Fragmen target hasil purifikasi selanjutnya digunakan sebagai templet pada kegiatan reamplifikasi dengan primer yang sama (dalam hal ini OPK-15). Proses reamplifikasi dilakukan dengan RTG-PCR kit (Promega-USA) yang komposisi campuran reaksi terdiri dari ; ddH₂O PCR 9 µl, primer OPK-15; 3 µl, dan fragmen RAPD hasil purifikasi 3 µl, sehingga volume total 15 µl. Selanjutnya PCR dijalankan dengan kondisi seperti Tabel 1.

Produk PCR diestimasi menggunakan elektroforesis dalam agarose 1,5% dengan menyertakan 1 kb ladder (Fermentas-USA) sebagai marker pada buffer 0,5X TBE dengan tegangan 100 volt selama 50 menit. Hasil elektroporesis didokumentasikan menggunakan gel Dokumentasi UV transluminator (Biometra-Jerman) untuk memastikan konsistensi produk hasil reamplikasi. Produk PCR sesuai target diperoleh hasilnya dengan ukuran fragmen lebih kurang 700 bp yang merupakan ukuran fragmen sesuai harapan bila diamplifikasi menggunakan primer OPK-15 sekuen (5' - CTC CTG CCA A -3'). Selanjutnya produk PCR yang berasal dari purifikasi digunakan sebagai DNA templet pada

kegiatan ligasi dalam transformasi kloning DNA. Tahap kloning perlu dilakukan agar informasi sekuens yang diperoleh dari kegiatan sekuensing, betul-betul berasal dari klon tunggal.

4.5. Kloning Fragmen RAPD Spesifik Penciri Kadar Katekin Tinggi

DNA hasil purifikasi selanjutnya digunakan untuk kegiatan ligasi dan transformasi menggunakan vektor plasmid *pGem T-Easy* dengan bantuan bakteri *E.coli* strain DH5 α . Transformasi adalah proses masuknya DNA asing ke dalam suatu organisme. Transformasi genetik menggunakan metode *heat shock* (Sambrook and Russell, 2001). Kloning dilakukan dengan tujuan memperbanyak DNA yang tersisip pada sel kompeten (*E.coli*). Untuk dapat mengamati keberhasilan transformasi dihitung efisiensi transformasi.

4.5.1. Efisiensi Transformasi

Pembuktian keberhasilan transformasi dilakukan pada klon-klon yang ditumbuhkan dalam cawan petri yang mengandung media selektif (ditambah IPTG, X-gal, dan ampisillin) berdasarkan warna (*blue-white selection*). Jumlah koloni rekombinan yang dihitung secara acak masing-masing sampel pada enam buah cawan petri, didapatkan persentase rata-rata koloni putih 88,1%, dan koloni biru 0,7%, ada juga sekitar \pm 11,2 % koloni bakteri yang berwarna putih kusam yang juga resisten terhadap ampisilin. Pengamatan pertumbuhan koloni bakteri yang berwarna putih menunjukkan persentase yang tinggi yaitu sekitar 88,1%. Hal ini berarti bahwa efisiensi transformasi cukup berhasil dilakukan. Terbentuknya koloni putih, disebabkan karena gen *Lac-Z* yang semestinya

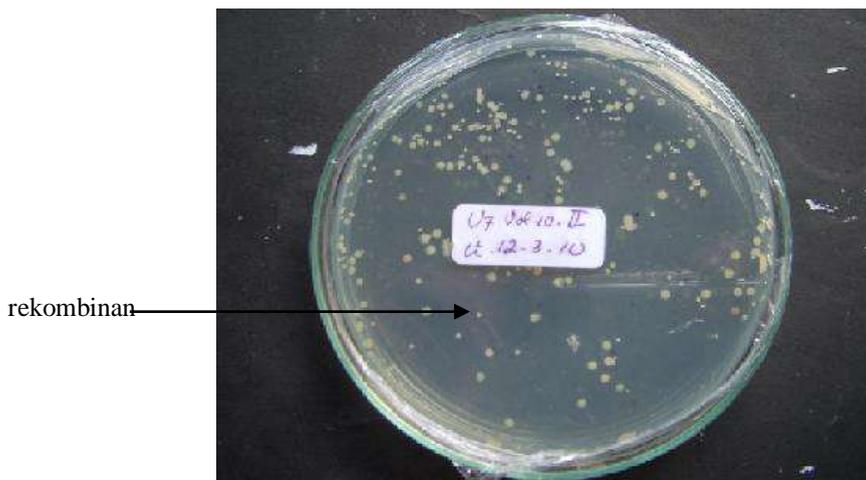
berfungsi merubah senyawa *X-Gal* menjadi berwarna biru, tidak lagi mampu melaksanakan tugas oleh karena sudah diinterupsi oleh fragmen RAPD yang disisipkan. Gen *Lac-Z* mengkode enzim *β-galaktosidase* yang mengkatalisis pemecahan laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Penyisipan DNA dilakukan di dalam gen *Lac-Z* ini, sehingga bila mengandung DNA sisipan maka gen *Lac-Z* akan inaktif (Gaffar, 2007).

Seleksi biru putih (*blue-white screening*) yaitu metode untuk memisahkan sel yang mengandung plasmid rekombinan dengan sel yang mengandung plasmid tanpa insert. Seleksi biru putih dilakukan untuk mengetahui keberhasilan proses ligasi atau keberadaan DNA sisipan. Metode ini menggunakan media yang mengandung *X-gal* dan IPTG (*Isopropil Thiogalaktosida*) (Brown ,1991). *X-gal* adalah molekul yang mirip galaktosa, sedangkan IPTG merupakan *inducer* enzim *β-galaktosidase*. Hasil ini sesuai dengan literatur yang menyatakan, terbentuknya koloni berwarna putih ini berarti sel bakteri mengandung DNA plasmid rekombinan dan proses ligasi dinyatakan berhasil (Brown, 1991). Pada tahapan transformasi melibatkan molekul CaCl_2 yang dapat menyebabkan sel-sel bakteri membengkak dan membentuk sferoplas yang kehilangan protein periplasmiknya sehingga dinding sel menjadi bocor. DNA yang ditambahkan ke dalam campuran ini akan membentuk kompleks resisten DNase dengan ion-ion Ca^{2+} yang terikat pada permukaan sel. Kompleks tersebut diambil oleh sel selama perlakuan kejutan panas (*heat shock*) yang diberikan (Susanto, 2009). Perlakuan dengan CaCl_2 menyebabkan dinding sel menjadi lebih permeabel dan bermuatan positif, sehingga dapat menarik DNA yang bermuatan

negatif.

Transformasi DNA merupakan salah satu metode untuk memasukkan DNA ke dalam sel bakteri. Prinsip dari transformasi adalah dengan ekstraksi DNA dari sel donor, kemudian dicampur dengan sel resipien yang telah dibuat rentan terhadap masuknya molekul DNA melalui pori atau saluran dalam dinding dan membran sel (Cowell dan Austin 1997).

Perhitungan koloni bakteri dilakukan dengan cara melihat dan menghitung koloni bakteri dalam setiap cawan petri yang ditumbuhkan selama > 18 jam hingga 20 jam. Setiap sampel ditumbuhkan pada 6 cawan petri. Hasil transformasi DNA dalam bakteri *E.coli* disajikan pada Gambar 18, yang merupakan salah satu bentuk pertumbuhan koloni bakteri berupa DNA rekombinan.



Gambar 18. Pertumbuhan koloni bakteri *E.coli* strain DH5 α yang dikloning dengan vektor *pGem T-easy*, pada suhu 37°C selama satu malam. Sampel U7

Gambar 18 memperlihatkan pertumbuhan bakteri *E.coli* hasil kloning. Morfologi bakteri pada media yang berhasil tumbuh tersebut terlihat bulat, mengkilat, dan saling bergerombol. Seleksi bakteri pembawa DNA rekombinan menggunakan antibiotik ampisilin, yang menunjukkan bahwa tidak ada koloni bakteri yang tumbuh, artinya bahwa bakteri yang digunakan tidak resisten terhadap antibiotik, jika tersisipi DNA insert bakteri tersebut akan resisten terhadap antibiotik

Molekul DNA rekombinan harus memiliki sekuens replikasi permulaan (*ori = origin of replication*), dan molekul DNA rekombinan harus berada dalam molekul sirkular tertutup dan berpita ganda. Perkembangbiakan plasmid (dalam hal ini *pGem T-Easy*) di dalam tubuh inangnya dipengaruhi terutama oleh sifat plasmid itu sendiri, apakah berada dalam kontrol ketat atau kontrol longgar, namun perkembangbiakan bakteri sebagai inang akan mempengaruhi juga laju amplifikasi fragmen DNA yang diklonkan (Jamsari, 2007).

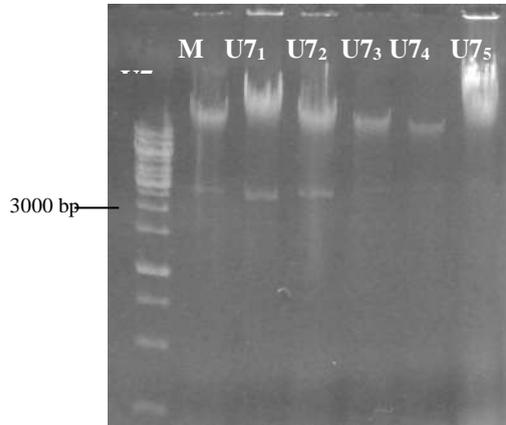
Replikasi molekul DNA rekombinan didalam sel bakteri mengikuti mekanisme replikasi DNA kromosomal yang terdapat dalam sel bakteri. Molekul DNA rekombinan yang ada dalam sel bakteri *E-coli* dipanen dengan membebaskannya dari sel-sel inang yaitu dengan melakukan isolasi plasmid DNA rekombinan. Isolasi plasmid DNA rekombinan dilakukan dengan mengambil koloni tunggal yang berwarna putih bening dan koloni yang berwarna biru muda terang. Kegiatan isolasi dilakukan dengan mengambil secara acak 6 koloni bakteri pada setiap cawan petri. Molekul DNA rekombinan dibebaskan dari sel bakteri yang dikemas dalam plasmid dapat dilakukan dengan secara mekanis dan kimiawi.

Lisis alkali (Birnboim-Dolly, 1979) merupakan metode yang umum dan banyak digunakan.

Seiring dengan pernyataan Muladno (2002), bahwa secara kimia lisis dinding sel dapat dilakukan dengan menambahkan senyawa kimia seperti lysozim. Senyawa ini dibersihkan dengan cara sentrifugasi, sehingga yang tertinggal hanya molekul nukleotida (DNA). Sedangkan untuk membersihkan protein dan polisakarida dari larutan digunakan fenol dan chloroform. Etanol berfungsi untuk memisahkan, memekatkan, dan mengendapkan DNA.

4.5.2. Isolasi Plasmid DNA Rekombinan

Isolasi plasmid DNA rekombinan dilakukan dengan mengambil koloni tunggal yang berwarna putih bening dan koloni yang berwarna biru muda terang. Salah satu contoh hasil isolasi DNA plasmid seperti terlihat pada Gambar 19, Gambar 19 memperlihatkan bahwa isolasi plasmid berhasil dilakukan. Hal ini ditunjukkan oleh panjang fragmen DNA yang dihasilkan lebih dari ukuran awal plasmid *pGem T-easy* (3.015 bp). Gambar 19 memperlihatkan sampel Udang7 = U7₁ s.d. U7₅ menghasilkan fragmen yang bagus, tetapi pada U7₆ fragmen kurang bagus. Sementara itu, untuk sampel lain, yaitu Udang 8 (U8), U12, U13, dan U14 hasil isolasi DNA plasmid rekombinan cukup bagus (gambar tidak ditampilkan).



Gambar 19. Hasil isolasi DNA plasmid. (M = marker 1 kb ladder Fermentas-USA); U7₁s/d. U7₆ adalah sampel Udang 7

Berdasarkan hasil isolasi DNA plasmid rekombinan yang diperoleh, maka dapat dipastikan bahwa semua koloni tersebut mengandung fragmen RAPD yang disisipkan. Meskipun melalui analisis ini belum bisa diprediksi secara akurat berapa basa ukuran insersi fragmen RAPD yang berhasil diselipkan sebenarnya. Hasil yang lebih akurat dapat dibuktikan dengan melakukan amplifikasi PCR menggunakan primer T7 dan SP6, yaitu primer universal *pGemT easy*.

Untuk sampel yang lain juga memperlihatkan bahwa sebagian fragmen DNA hasil isolasi kurang bagus (*smear*) dan pada bagian bawah terlihat adanya sisa RNA baik pada U12 maupun pada U13, namun fragmen tersebut mengandung fragmen RAPD yang disisipkan, karena ukurannya lebih dari 3.015 bp. Sementara dari enam koloni sampel U14 yang diisolasi juga menunjukkan fragmen yang berukuran lebih dari 3.015bp walaupun fragmen tersebut cukup tipis (gambar tidak ditampilkan). Hal ini dapat dipahami bahwa kloning fragmen RAPD berhasil dilakukan.

Namun dari keseluruhan hasil isolasi tersebut baru dapat dibuktikan seberapa ukuran fragmen yang berhasil disisipkan dengan melakukan amplifikasi PCR menggunakan primer T7 dan SP6.

Secara ringkas pada Tabel 11 dikemukakan hasil analisis jumlah koloni bakteri yang mengandung plasmid dan yang tidak mengandung plasmid. Pada Tabel 11 terlihat bahwa dari seluruh kegiatan isolasi plasmid DNA rekombinan, diperoleh persentase rata-rata koloni yang menghasilkan plasmid sekitar 59,6%, dan yang tidak mengandung plasmid 40,4%. Angka 59,6% ini memperlihatkan nilai yang lebih tinggi dari penelitian Jamsari (2008) dengan rata-rata menghasilkan plasmid 47,6% untuk *C. gloesporides* dan 45% untuk *C. capsici*. Hal tersebut mengindikasikan bahwa fragmen yang diklon dengan sistem *pGem T easy* dengan bantuan bakteri *E.coli* berhasil dilakukan. Kloning bertujuan untuk memperbanyak DNA yang tersisip pada sel kompeten. Tahapan kloning terdiri dari tiga yaitu ligasi, transformasi, dan seleksi transformans.

DNA asing yang diambil oleh sel kompeten dapat berupa DNA bebas atau DNA sisipan dalam suatu vektor. Vektor-vektor yang membawa DNA tersebut terdiri dari plasmid, bakteriofage, dan kosmid (Snyder and Champness, 1977). Plasmid lebih banyak digunakan daripada bakteriofage dan kosmid, karena dimiliki beberapa kelebihan dibandingkan vektor lainnya yaitu : a) mudah dimanipulasi, b) mempunyai jumlah kopi yang banyak (kuantitasnya banyak), dan c) mempunyai marker untuk seleksi yakni gen ketahanan terhadap antibiotik tertentu sehingga lebih memudahkan dalam mendeteksi plasmid yang membawa gen

tertentu Brock, *et al*, (1994). Sebagai komponen ekstragenomik, plasmid memiliki gen yang mengendalikan kemampuan plasmid untuk memperbanyak diri atau replikasi secara autonom, sehingga perbanyakan molekul plasmid tidak tergantung pada kendali perbanyakan sel inangnya. Replikasi DNA plasmid dikendalikan oleh seperangkat enzim yang sama dengan enzim digunakan untuk replikasi kromosom bakteri (Jamsari, 2007)

Plasmid umumnya berada pada struktur tersier yang sangat kuat atau disebut mempunyai bentuk *covalently closed circular* (CCC). Jika salah satu untai polinukleotida terputus, maka untai ganda akan kembali ke keadaan normal, yakni bereklasasi, dan plasmid akan berubah menjadi bentuk alternatif yang disebut sirkular terbuka (*open circular* = oc). Bila dibandingkan dengan DNA kromosom, ikatan kedua untai gandanya jauh lebih longgar dan mempunyai nisbah aksial yang sangat tinggi. Perbedaan tersebut menyebabkan DNA plasmid jauh lebih resisten terhadap denaturasi daripada DNA kromosom. Justru itu, aplikasi kondisi denaturasi dapat memisahkan DNA plasmid dengan DNA kromosom (Brown, 1991).

Tabel 11. Analisis hasil isolasi plasmid DNA rekombinan dengan koloni secara acak .

Sampel Udang Katekin Tinggi	Isolasi Ke	Jumlah Sampel	Ada Plasmid	Tidak ada Plasmid
U7	1	6	5	1
	2	6	3	3
U8	1	6	4	2
	2	4	1	3
U12	1	4	4	0
	2	5	0	5
U13	1	4	4	0
	2	5	3	2
U14	1	6	6	0
	2	6	1	5
Jumlah		52	31	21
Persentase			59,6%	40,4%

Untuk membuktikan seberapa besar fragmen yang berhasil disisipkan, maka dilakukan analisis amplifikasi PCR menggunakan primer T7 (3'- ATT ATG CTG AGT GAT ATC CC-5') dan SP6 (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3'). Untuk keperluan tahap kegiatan ini, maka templet yang digunakan adalah DNA plasmid yang telah diisolasi sebelumnya. Hasil amplifikasi ditunjukkan pada Gambar 20.

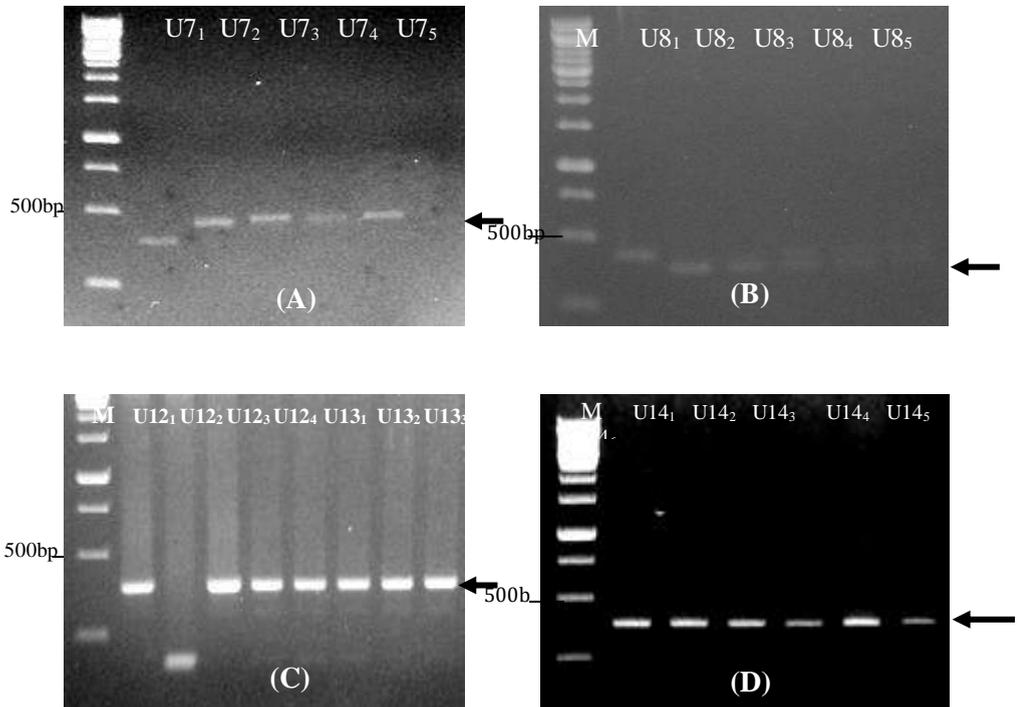
4.5.3. Analisis Fragmen Sisipan dengan Primer T7 dan SP6

Untuk menentukan ukuran fragmen insert yang berhasil diselipkan di dalam plasmid *pGEM-T Easy* maka dilakukan

amplifikasi PCR dengan menggunakan pasangan primer T7 dan SP6. Kedua primer tersebut didesain dari daerah internal pengait MCS (*Multi Cloning Site*) (lihat Gambar 3.). Untuk keperluan tahap kegiatan ini, maka templet yang digunakan adalah DNA plasmid yang telah diisolasi sebelumnya. Hasil amplifikasi DNA plasmid dengan menggunakan pasangan primer T7 dan SP6 dapat dilihat pada Gambar 20.

Gambar 20 (A) memperlihatkan bahwa fragmen produk amplifikasi sampel U7 dengan primer T7 dan SP6 menunjukkan fragmen yang berhasil diselipkan ke dalam plasmid ternyata ukurannya kurang dari 500 bp, yakni U7₁ kira-kira 350 bp, dan U7₂ s/d U7₅ berkisar 450 bp, sedangkan untuk sampel U7₆ tidak menghasilkan fragmen.. Sampel U7₁ lebih pendek, karena koloni yang diisolasi adalah koloni biru. Terbentuknya koloni biru disebabkan karena gen *lac-Z* masih berekspresi dan menghasilkan enzim *β-galaktosidase*, dimana enzim ini akan memecah X-gal dan menghasilkan senyawa berwarna biru, Hal ini bisa saja terjadi karena kemungkinan fragmen yang diselipkan tidak terlalu panjang (kurang dari satu kb).

Jika fragmen yang disisipkan kurang dari 1 kb, maka efek fungsi gen *Lac-Z* masih akan berpengaruh. Dengan demikian, koloni tersebut sebenarnya mengandung plasmid dan sekaligus insersi, akan tetapi ukurannya pendek. Keadaan tersebut dapat terjadi antara lain disebabkan oleh karakteristik dari fragmen DNA produk PCR yang diklon menggunakan *pGem T-easy*.



Gambar 20. Hasil amplifikasi PCR dengan primer T7 dan SP6; sampel U7 = A, U8= B, U12 dan U13 =C, dan U14 =D ; M= Marker 1 kb ladder (Fermentas-USA). Tanda panah adalah fragmen hasil kloning.

Gambar 20 (B), memperlihatkan sampel U8₁ dan U8₂ menghasilkan fragmen yang baik, dan tidak begitu halnya pada sampel U8₃ dan U8₄ dimana fragmennya tipis. Bila diperhatikan lagi sampel U8₅ dan U8₆ fragmen yang dihasilkan hampir tidak kelihatan atau bisa saja tidak ada fragmennya. Sampel-sampel seperti ini akan lebih pasti hasilnya apabila telah disequencing nantinya. Bila dikaitkan dengan hasil isolasi memang fragmen yang dihasilkan masih tercampur dengan pengotor, dan terbukti setelah diamplifikasi fragmen hasilnya sangat tipis. Gambar 20(C)

sampel U12 dan U13 semuanya menghasilkan fragmen, dengan panjang yang bervariasi, U12₂, terlihat panjang fragmennya paling pendek dibandingkan yang lainnya, yaitu dibawah 250 bp, namun yang lain hasilnya cukup bagus.

Sampel U14 pada Gambar 20 (D) fragmen yang dihasilkan sangat bagus dengan kisaran panjangnya 450 bp. Hasil yang kualitasnya bagus ini diperoleh karena telah dilakukan purifikasi sebelumnya. Untuk meningkatkan kualitas dan spesififikasi suatu fragmen target, maka tahap purifikasi merupakan hal yang perlu dilakukan.

Transformasi fragmen DNA yang terkait potensi kadar katekin tinggi pada tanaman gambir telah berhasil dilakukan (Gambar 20 dan Tabel 10). Hal ini memberikan peluang memperoleh sekuens fragmen RAPD target, sehingga besar juga variasi peluang untuk mendesain primer spesifik.

Bila dibandingkan fragmen hasil RAPD dengan fragmen hasil amplifikasi dengan primer T7 dan SP6 tidak selalu konsisten. Fragmen hasil amplifikasi dengan primer RAPD sebelum diklon berukuran kira-kira 700 bp, dan setelah diklon fragmennya berukuran kira-kira 400 bp.

Sistem penanda RAPD mempunyai kelemahan sehubungan dengan hasil yang kurang konsisten. Sebagaimana yang dikemukakan oleh Yu dan Pauls, (1992) menyatakan bahwa banyak faktor yang mempengaruhi ketidakstabilan dan sensitifitas penanda RAPD seperti rasio templet DNA dan primer, konsentrasi ion Mg dan *Taq-Polymerase* yang digunakan dan jenis mesin PCR yang dipakai, serta rendahnya suhu annealing dan pendeknya primer RAPD yang digunakan (Yang, *et al*, 1996). Hal

yang sama telah dikemukakan oleh beberapa peneliti sebelumnya (Meunier and Grimont, 1993; Rajput, *et al.*, 2006; Jamsari, 2008) bahwa produk RAPD memang tidak stabil.

Resolusi dan reliabilitas pola pita RAPD bukan saja ditentukan oleh primer dalam PCR, tetapi juga dipengaruhi oleh kualitas gel, kondisi *running* gel, lamanya separasi fragmen dalam gel, serta prosedur laboratorium (Qi dan Lindhout, 1979). Berkaitan dengan fungsinya sebagai *Marker Assisted Selection* (MAS), penanda RAPD yang sudah terbukti terkait dengan sifat tertentu dapat dikonversi kedalam sistem sequens *characterize amplified region* (SCARs) (Paran, *et al.*, 1998), serta sistem STS dan CAPs.

Konversi satu sistem marker kepada sistem marker yang lain pada prinsipnya adalah reposisi dan restrukturisasi posisi primer yang digunakan. Pada sistem marker RAPD, primer melekat secara acak pada genom templetnya, tetapi pada sistem marker yang lebih spesifik posisi titik lekat primer (*primer binding site*) didefinisikan secara pasti, sehingga ukuran fragmen yang akan dihasilkan dari proses amplifikasi juga akan dapat diprediksi lebih pasti (Jamsari, 2008).

Pada penelitian ini penanda RAPD dikonversi ke sistem penanda STS (*Sequence Tagged Sites*) yaitu sistem penanda yang sudah berbasis pada informasi sekuen DNA. Oleh karena itu, tahap kloning merupakan tahapan yang harus dilakukan dalam rangka pengembangan primer dari sistem RAPD kedalam sistem marker lain yang lebih spesifik yakni STS.

4.5.4. Sekuensing DNA Fragmen Spesifik

Produk PCR disekuensing secara *one read direction* menggunakan primer T7 dan SP6, beberapa sampel menggunakan primer T7 dan yang lainnya dengan primer SP6. Sekuensing dilaksanakan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkmann Jakarta. Hasil yang diperoleh berupa elektrophoregram dengan *peak-peak* (puncak) yang mempunyai warna-warni untuk membedakan jenis basa nukleotidanya. Nukleotida A (*Adenin*) berwarna hijau, nukleotida G (*Guanin*) berwarna hitam, nukleotida T (*Timin*) berwarna merah, dan nukleotida C (*Citosin*) berwarna biru. Pola warna *peak-peak* tersebut juga sama dengan pola warna yang dikemukakan oleh Ratnayani, *et al* (2007).

Penentuan urutan (sekuensing) basa DNA pada prinsipnya melibatkan produksi seperangkat fragmen DNA yang berbeda-beda ukurannya tetapi salah satu ujungnya selalu sama. Selanjutnya, fragmen-fragmen ini dimigrasikan/ dipisahkan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid atau *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) agar pembacaan sekuens dapat dilakukan (<http://biomol.wordpress.com/bahan-ajar/sekuensing-dna>, 2011)

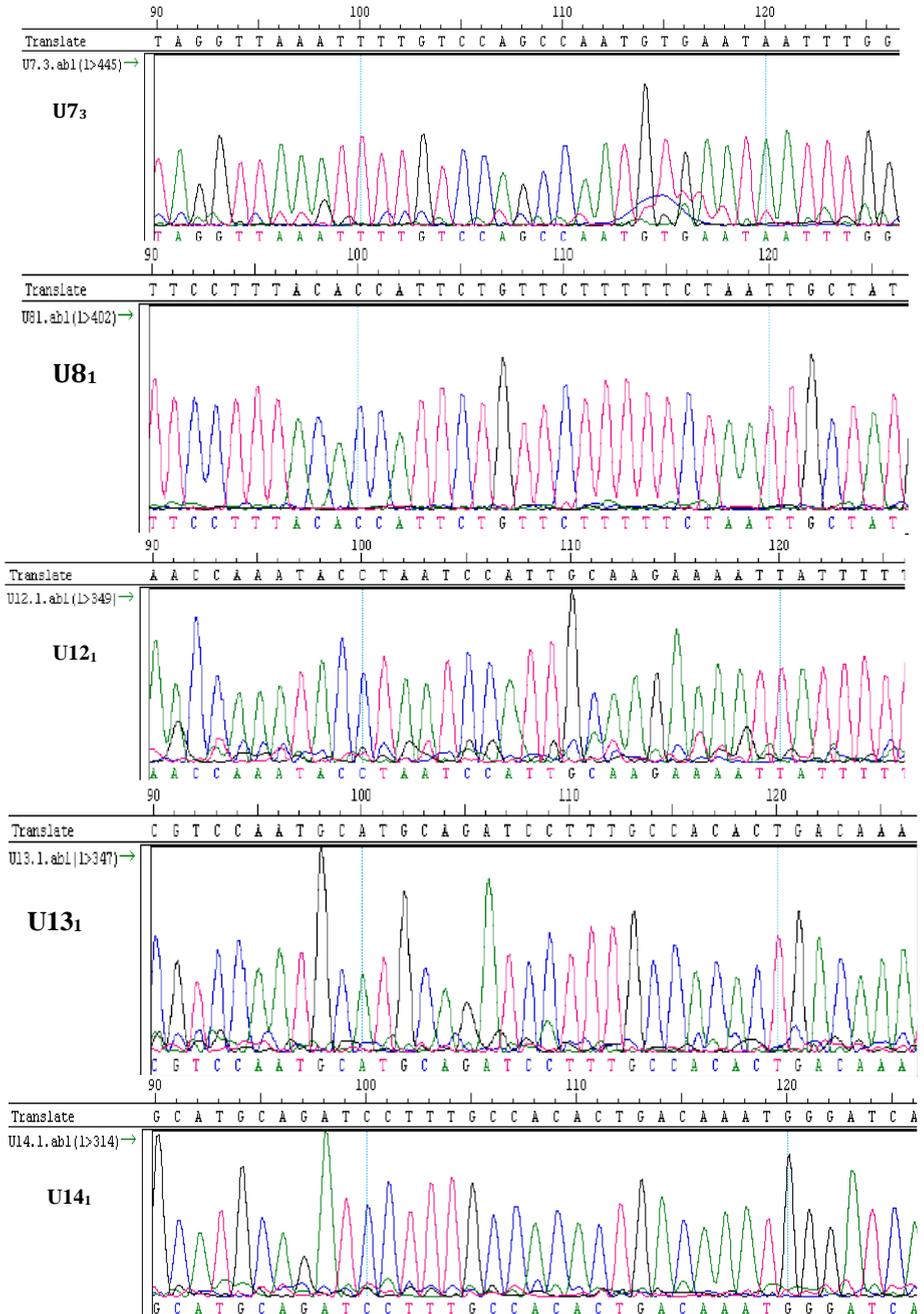
Lima fragmen spesifik yang disekuensing selanjutnya dianalisis, hasilnya memperlihatkan bahwa ada beberapa data yang memiliki kualitas sekuens yang kurang baik, yakni dengan munculnya sekuens N. Lambang N yang muncul hanya sekitar 3% yang merupakan lambang untuk simbol nukleotida A, G, T, dan C. Lambang N muncul karena terjadinya *overlapping peak* nukleotida satu sama lain, sehingga tidak terbaca oleh *software analysis*.

Hasil sekuensing DNA tersebut dianalisis dengan program Bioinformatika, dan dikontrol secara manual dengan memperhatikan puncak *peak-peak* yang tertinggi dengan *peak* yang lainnya. Data hasil sekuensing berupa elektroporegram ditampilkan pada Gambar 21

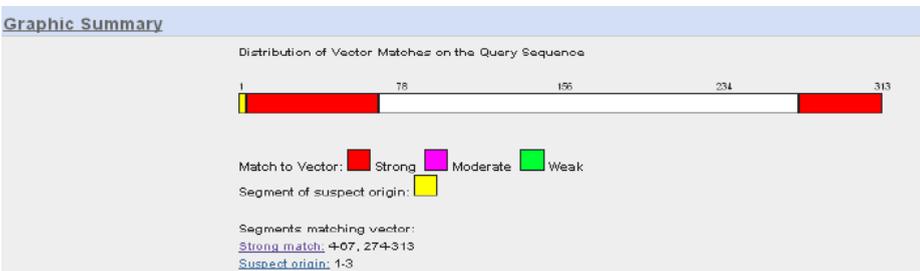
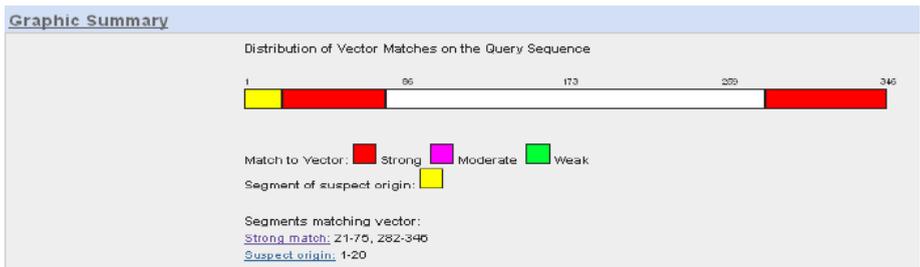
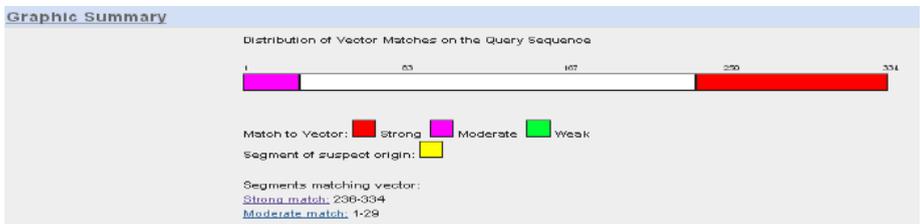
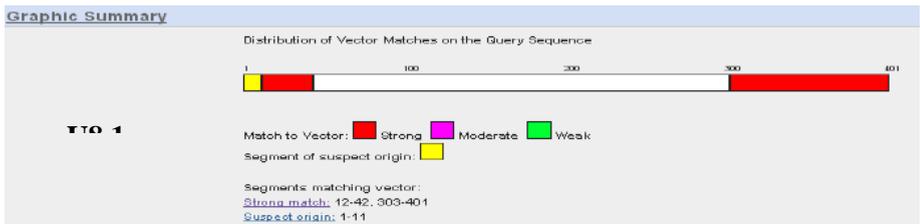
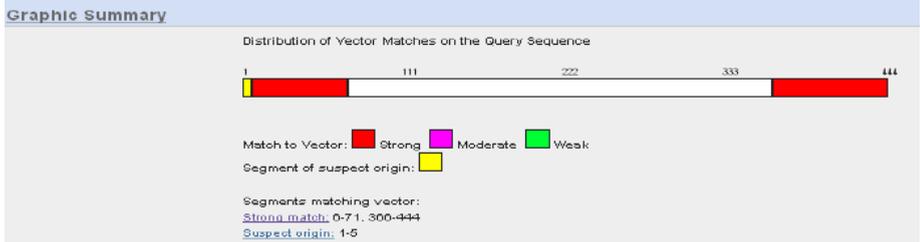
Gambar 21 memperlihatkan bahwa sampel U7 mempunyai panjang sekuens nukleotida 445bp, U8= 402 bp, U12=349bp, U13=347bp, dan U14 = 314 bp. Dengan demikian total panjang sekuens yang dianalisis pada 5 fragmen sampel tanaman gambir berpotensi kadar katekin tinggi adalah 1857 bp dengan rata-rata panjang sekuens 371 bp. Sekuen sampel U7 memperlihatkan sekuens terpanjang yakni 445 bp. Jika diperhatikan puncak *peak* dari elektroporegram di atas, dapat dinyatakan bahwa hasil sekuensing berupa urutan nukleotidanya cukup bagus.

Sekuensing asam nukleat adalah proses penentuan urutan nukleotida pada suatu fragmen DNA atau RNA. Sekuen RNA biasanya ditentukan dengan melakukan sekuensing terhadap DNA cetaknya (Suryanto, 2003). Dengan mengetahui urutan nukleotida suatu gen, maka dapat ditentukan urutan asam amino protein yang dikodinya (Gaffar, 2007).

Sekeuns DNA yang diperoleh masih tergabung dengan sekuens plasmid (vektor). Untuk memisahkan sekuens plasmid (vektor) yang telah digunakan dalam transformasi, dan untuk menentukan seberapa panjang sekuens insert (panjang fragmen sisipan), telah dilakukan analisis dengan *vectorscreen* (Gambar 22) yang diakses secara *online* di internet pada web site NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*): (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen>,2010)



Gambar 21. Visualisasi sebahagian elektrophoregram sekuen DNA fragmen U7, U8, U12, U13, dan U14 (gambir Udang berpotensi kadar katekin tinggi). Adenin= hijau, Guanin= hitam, Timin= merah, dan Cytosin= biru.



Gambar 22. Hasil vektor *screening* sekuen DNA gambar berpotensi kadar katekin tinggi, masing-masing sampel U7, U8, U12, U13, dan U14.

Gambar 22 memperlihatkan hasil analisis *vecsreen* 5 sampel tanaman gambir berpotensi kadar katekin tinggi. Warna merah adalah plasmid, dan warna putih adalah sekuen insert (fragmen spesifik), sedangkan warna kuning merupakan pengotor, yang ikut saat melakukan kegiatan kloning. Hasil analisis *vecsreen* menunjukkan bahwa fragmen yang berhasil ditransformasikan lebih kecil jika dibandingkan dengan fragmen awal yang disisipkan.

Hasil *vector screening* (Gambar 22) menunjukkan bahwa fragmen target yang berhasil ditransformasikan menggunakan vektor plasmid *pGem T-Easy* dengan bantuan bakteri *E.coli* strain DH5 α , untuk gambir berpotensi kadar katekin tinggi berukuran > 200 bp (Tabel 12)

Tabel 12 memperlihatkan bahwa ukuran fragmen target yang berhasil disisipkan berkisar antara 206 – 294 nukleotida. Variasi jumlah nukleotida yang diperoleh terdapat pada sampel U7₃ (294 basa) dan U8₁ (260 basa), sedangkan untuk sampel U12₁, U13₁, dan U14₁ memiliki jumlah nukleotida yang sama (206 basa). Variasi tersebut disebabkan terjadinya peristiwa substitusi, insersi, dan delesi terhadap nukleotida-nukleotida antara sampel Undang katekin tinggi. Sekuen DNA lima sampel tanaman gambir tipe Undang berpotensi katekin tinggi dianalisis lebih lanjut untuk mengidentifikasi adanya perbedaan urutan basa DNA melalui penjajaran kelima sekuen tersebut menggunakan program ClustalW2 yang tersedia secara *online*. Hasil penjajaran ditampilkan pada Gambar 23.

Tabel 12. Hasil sekuen DNA gambar berpotensi kadar katekin tinggi yang telah dipisahkan dari DNA vektor

No	Sampel	Jumlah Basa	Urutan sekuens DNA
1	U7.3	294	CTCCTGCCAACTAGAAAATAGGTTAAATTTTGTCCAGCCA ATGTGAATAATTTGGTAGATGCGACTTCAAAGTAGG AAAACATATTTCTGTGCTTTAGATATGAAAACTGC TGAAATTTGTATTTAGTTATGACTGTAATTTCTTCACT TATTCATGCCACGAATCATCTTTCTTTACGGTACCATT GAGCAGAGAATCTGATCAGACTGCCACTGTCCAAATGCA AGCAATTTAGGTCACGTTTCTTAGCTTATGCTTTGCAGT ATCAATGCAGGGTTTGGCAGGAG
2	U8.1	260	CTCCTGCCAACCAAATGAGGCCCTAATGTTTTTTCTTT TTTTTCATTTCTTTTACACCATTCTGTTCTTTTTCTAATT GCTATGGTTATGTAGTTGTCTACTGCTGATTTTTTTCC ATGTTACAACCAATCTAGAGAATTCTACAAGTGATTA TTTGGTTAGTTTCTAATATTTCTTTAAACCTCAGAAAGT TGAGATTCACATAATTCCTCATCAATGTTAGTTTGTGCGT TTGATTTTGCCTGCTCATTGGCAGGAG
3	U12.1	206	CTCCTGCCAACATAACAGCGTACATAAAGATTCAATGAT TGGATAAACCAAATACCTAATCCATTGCAAGAAAATTA TTTTTCAAAC TAGTTTTAAAACTCTGAAGCTTGGGGTGC AGATCTATTGATACTTTTCTTTAGACATGTCTGATCCC ATTTGTCAGTGTGGCAAAGGATCTGCATGCATTGGACG AGCTTGGCAGGAG
4	U13.1	206	CTCCTGCCAAGCTCGTCCAATGCATGCAGATCCTTTGCC ACACTGACAAATGGGATCAGACATGTCTAAAGGAAAAG TATCAATAGATCTGCACCCCAAGCTTCAGAGTTTTTAAA CTAGTTTGAAAAATAATTTTCTTGCAATGGATTAGGTA TTTGGTTTATCCAATCATTGAATCTTTATGTACGCTGTT ATGTTGGCAGGAG
5	U14.1	206	CTCCTGCCAAGCTCGTCCAATGCATGCAGATCCTTTGCC ACACTGACAAATGGGATCAGACATGTCTAAAGGAAAAG TATCAATAGATCTGCACCCCAAGCTTCAGAGTTTTTAAA CTAGTTTGAAAAATAATTTTCTTGCAATGGATTAGGTA TTTGGTTTATCCAATCATTGAATCTTTATGTACGCTGTT ATGTTGGCAGGAG

```

U13.1 CTCCTGCCAAG-----CTCGTCCAATGCAT---GCAGATCCTTTG--- 37
U14.1 CTCCTGCCAAG-----CTCGTCCAATGCAT---GCAGATCCTTTG--- 37
U7.3   CTCCTGCCAACTAGAAATAGGTTAAATTTTGTCCAGCCAAT---GTGAATAATTTGGTAG
57
U8.1   CTCCTGCCAACCC-----AAATGAGGCCCTAATGTTTTTTTCTTTTTTCATTT 48
U12.1 CTCCTGCCAACAT-----AACAGCGTACATAAAG---ATTCAATGATTGG--- 42
*****          * * .   :::*

U13.1 ---CCACACTGACAAATGGGATCAGACATGTCTA--AAGGAAAAGTATCAATA---GAT 88
U14.1 ---CCACACTGACAAATGGGATCAGACATGTCTA--AAGGAAAAGTATCAATA---GAT 88
U7.3   ATGCGACACTTCAAAGTAGGAAAACATATTTCT--GTGCTTTAGATATGAAA---AAC
111
U8.1   CCTTTACACCATTCTGTTCTTTTTCTAATTGCTATGGTTATGTAGTTGTCTACTGCTGAT
108
U12.1 ---ATAAACCAA--ATACCTAATC-CATTGCAA--GAAAATTATTTTTCAAA--CTAGT 91
** *  :: ** * . : : * : : : : : : : : : .

U13.1 CTGCACCCCAAG-----CTTCAG-----AGTTTTTAAACTAGTTTGAA--- 126
U14.1 CTGCACCCCAAG-----CTTCAG-----AGTTTTTAAACTAGTTTGAA--- 126
U7.3   CTGCTGAAATTTGTA----TTTCAGTTATGACTGTAATTTCTTCACATTATCCATGCCA
166
U8.1   TTTTTTTCATGTTA----CAACCAATCTA--GAGAATTCTACAAGTGTATTATTTGG 160
U12.1 TTAAAAACTCTG-----AAGCTT-----GGGG---TGCAGATCTATTG----- 126
* : :   : * :   .. * * : * : .

U13.1 --AAATAATTTTCTT---G---CAATGGATTAGGTATTTGGTTT----- 162
U14.1 --AAATAATTTTCTT---G---CAATGGATTAGGTATTTGGTTT----- 162
U7.3   CGAATCATCTTTCTTTACGGTACCATTGAGCAGAGAATCTGATCAGACTGCCACTGTCCA
226
U8.1   TTAGTTTCTAATATT-----CTTTTAAACCTCAGAAAGTTGAG----- 198
U12.1 -----ATACTTTT-----CCTTTAGACATG-----TCTG----- 150
: ** *   * : * ..   * :

U13.1 -ATCCAATCATT-----GAATCTTTATGTACGCTGT-----TATG-----TT 198
U14.1 -ATCCAATCATT-----GAATCTTTATGTACGCTGT-----TATG-----TT 198
U7.3   AATGCAAGCAATTTAGTTCACGTTTCTTAGCTTATGCTTTGCAGTATCAATGCAGGTTT
286
U8.1   -ATCACTAATTCCTCAT--CAATGTAGTTTGTGCGTTTGTATTTGCGTGCTC--ATT 252
U12.1 -ATCCATTTGTGAGTGTGG-CAAAGGATCTGCATGCATTGGA-----CGAGCT----TT 198
** * . : *   : : : : * * *   . : *   **

U13.1 GGCAGGAG 206
U14.1 GGCAGGAG 206
U7.3   GGCAGGAG 294
U8.1   GGCAGGAG 260
U12.1 GGCAGGAG 206
*****

```

Gambar 23. Sekuens nukleotida dari sampel Udang katekin tinggi (U7 s/d U14). Primer OPK-15 terdapat pada 10 basa pertama, dan 10 basa akhir. tanda * adalah sekuen yang sama

Hasil penjarangan sekuens 5 sampel Udang katekin tinggi (U7, U8, U12, U13, dan U14) dengan program ClustalW2 (Gambar 23)

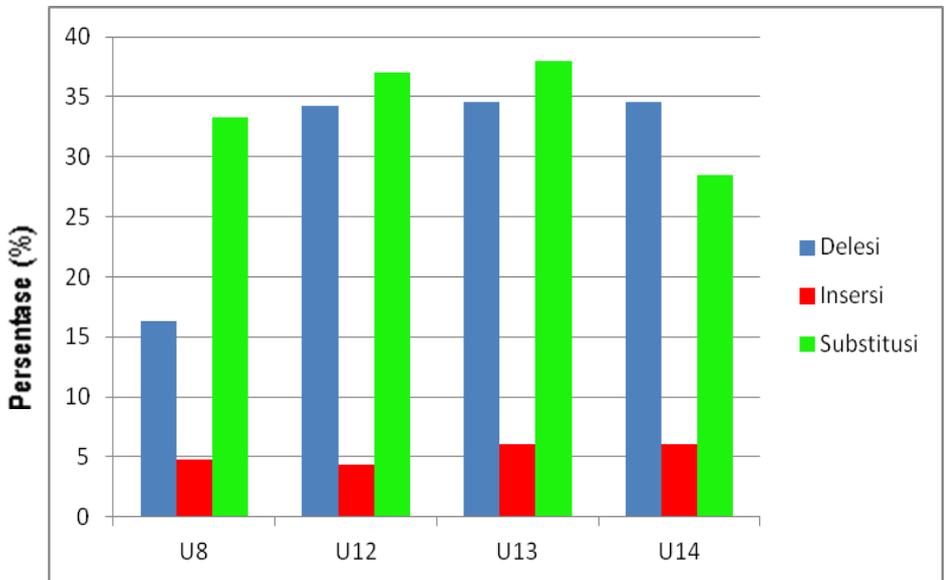
memperlihatkan jumlah basa nukleotida yang sama diperoleh sebanyak 51 basa, yang lain terjadi perbedaan-perbedaan. Kelima sampel tersebut mempunyai kesamaan basa DNA pada sepuluh basa pertama dan sepuluh basa terakhir yakni merupakan sekuen primer OPK-15 (primer RAPD terpilih). Hal membuktikan bahwa daerah yang teramplifikasi memang diapit oleh primer yang digunakan. Hasil penjajaran sekuens menjelaskan bahwa walaupun ukuran fragmennya sama tetapi mempunyai urutan sekuen nukleotida yang berbeda. Selanjutnya antara lima sampel tersebut terdapat juga beberapa perbedaan, dan kesamaan pada basa-basa tertentu. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel.13

Tabel 13. Variasi basa nukleotida lima fragmen spesifik dari gambir tipe Udang berpotensi kadar katekin tinggi.

No	Basa ke	Jenis basa					Tipe Perbedaan
		U7	U8	U12	U13	U14	
1	11, 12	T, A	C, -	A, T	--	--	Indel & Substitusi
2	36,47,48	G,G,A	T,T,C	T,T,C	A,A,G	A,A,G	Substitusi
3	61,62	A,T	C,C	--	--	--	Indel & Substitusi
4	95,96	--	T, G	--	--	--	Indel
5	99	G	-	-	G	G	Indel
6	126,174	A,C	T,T	A,T	C, G	C, G	Substitusi
7	187,	G,	T	-	-	-	Indel & Substitusi
8	216	A	A	-	T	T	Indel & Substitusi
9	254,255	T,A	C,T	AG	--	--	Indel & Substitusi
10	259,260,261	C,A,C	---	G,G,-	---	---	Indel & Substitusi

Kelima sekuens sampel tersebut sama-sama berasal dari satu kelompok gambir berpotensi kadar katekin tinggi, namun diantara sesama sampel memperlihatkan perbedaan pada sekuensnya. Peristiwa insersi, delesi dan substitusi terjadi pada

basa-basa DNA untuk kelima sampel tersebut. Peristiwa indel yang terjadi sangat bervariasi, ada yang hanya 1 (satu) basa saja bahkan pada tempat tertentu ada yang mengalami indel sebanyak 16 basa. Peristiwa substitusi terjadi 1-3 basa DNA saja. Untuk kelima sampel gambar berpotensi katekin tinggi ini terdapat perbedaan sekuen DNA yang disebabkan oleh insersi, delesi dan substitusi. Dari kelima sampel, U7 mempunyai urutan sekuen yang lebih panjang yaitu 294 basa. Gambar 24 memperlihatkan persentase terjadinya delesi, insersi, dan substitusi masing-masing sampel yang dibandingkan dengan 294 basa tersebut.



Gambar 24. Persentase terjadinya delesi, insersi, dan substitusi pada penjaran sekuen DNA U8, U12, U13, dan U14 yang dibandingkan dengan sekuen U7.

Gambar 24 memperlihatkan bahwa dari lima sekuen DNA gambar katekin tinggi peristiwa kejadian substitusi, dan delesi antara basa-basa tersebut menunjukkan angka yang lebih tinggi daripada

kejadian insersi. Delesi yang paling tinggi terdapat pada U12, U13, dan U14, sedangkan yang paling sedikit pada U7. Kejadian substitusi paling banyak dijumpai pada U13 yaitu 38 %

Sekuens DNA hasil pemisahan dengan DNA vektor dilanjutkan dengan program Bioinformatika menggunakan analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Analisis BLAST bertujuan untuk membandingkan sekuen yang dimiliki (sampel) dengan sekuen DNA yang didepositkan pada database (Gen Bank). Analisis dilakukan secara *online* yang diakses diinternet pada web site NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Untuk membandingkan sekuen DNA gambir potensi katekin tinggi yang diperoleh dilakukan analisis menggunakan program BLAST pada situs tersebut.

Hasil analisis BLAST dari masing-masing sekuen DNA yang telah diklon pada *E.coli* DH5 α yang dibandingkan dengan sekuen data GenBank, tidak ditemukan data sekuen yang telah didepositkan di Genbank terutama yang sefamili dengan *Unacaria*. Hasil Blast memperlihatkan bahwa sekuen DNA gambir mempunyai homologi dengan *Oryza sativa* Japonica Group Chromosome 10 clone dengan total skor 338, Query coverage 95%, E-value 7e-90, dan Max-ident 97%. Hal ini diduga karena sekuen DNA gambir yang dibandingkan cukup pendek, sehingga sebahagian dari sekuen pendek tersebut keberadaan sekuennya mirip dengan *Oryza sativa* Japonica. Hasil tersebut dapat dipahami bahwa sekuen hasil penelitian merupakan DNA struktural (klon DNA genomik) yang mungkin terdapat disekitar gen yang terlibat dalam penentu kadar katekin. Meskipun sekuen tersebut

bukanlah gen, namun basa-basa dari semua sekuen DNA tersebut dapat digunakan sebagai penanda (marker) pada tanaman gambir yang berpotensi katekin tinggi. Sehubungan dengan spesifikasi ekspresi gen pengendali biosintesis katekin belum diketahui pada penelitian ini, maka untuk memastikan hal tersebut diperlukan penelitian lebih lanjut

4.6. Desain Primer Spesifik Terkait Potensi Kadar Katekin Tinggi

Untuk mendapatkan primer yang mampu mendeteksi potensi kadar katekin tinggi pada genom tanaman gambir diperlukan primer spesifik. Primer didesain berdasarkan sekuen DNA yang diperoleh pada tahap sebelumnya. Ada beberapa alternatif primer yang mungkin digunakan, oleh karena itu perlu dilakukan pemilihan berdasarkan panjang produk PCR, nilai T_m (*melting temperature*) dan nilai T_a (*annealing temperature*). Berikut adalah beberapa primer yang telah didesain menggunakan program Oligos V.30

Tabel 14. Sekuen primer hasil desain dengan program Oligos V.30

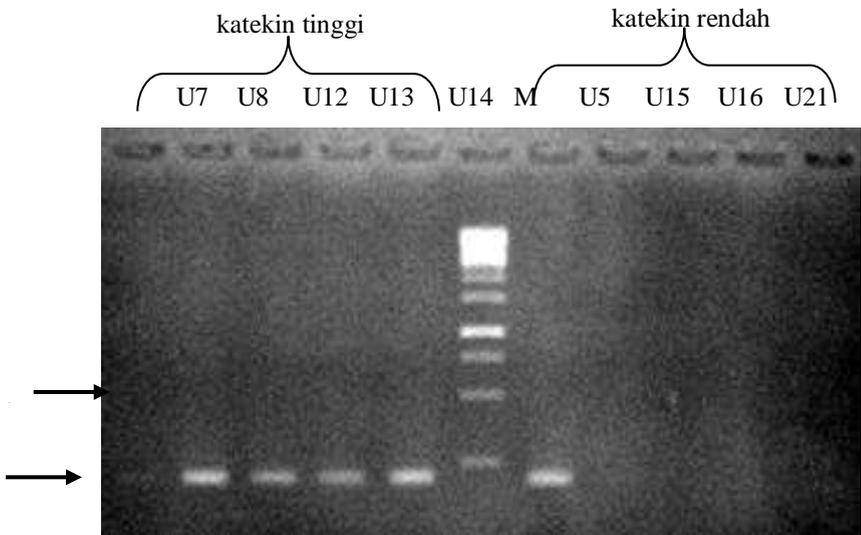
No	Nama Primer	Urutan Sekuens	Prediksi Panjang Produk
1	Utg1	5'-ATGTGGCATCTCCTGCCAAAG	209 bp
	Utg2	5'-AGAACAATTACCTCCTTCCAACC	
2	Utg3	5'- TTTTGTCCAGCCAATGTGAA	202 bp
	Utg4	5'- TTGGACAGTGGCAGTCTGAT	
3	Utg5	5'-CTGCCAAGCTCGTCCAATGC	163 bp
	Utg6	5'-AAACTCTGAAGCTTGGGGTGC	

Primer yang telah disintesis selanjutnya dilakukan pengenceran sampai konsentrasinya 100 pmol/ μ l. Sedangkan untuk kepentingan pengujian primer pada DNA genom dilakukan lagi pengenceran sampai konsentrasinya 20pmol/ μ l. Kombinasi primer Udg1 dan Udg2 dicobakan melalui beberapa kali pengujian pada sampel awal (U7, U8, U12, U13, U14, U5, U15, U16, U21, dan U22), hasilnya belum menunjukkan produk target. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa pada *DNA template* tidak terdapat situs penempelan primer atau tidak ada sekuens nukleotida yang komplementer dengan sekuens primer. Pengujian kombinasi primer Udg3 dan Udg4, serta kombinasi primer Udg5 dan Udg6 juga telah dilakukan, ternyata juga tidak menghasilkan produk PCR. Menurut Weeden, *et al* (1992), produk amplifikasi yang akan dihasilkan tergantung dari ada atau tidaknya situs penempelan primer pada *DNA template*. Selanjutnya dilakukan desain primer dengan kombinasi primer yang lain menggunakan softwear Primer3 secara *online* diinternet (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, 2011). Sekuen primer tersebut seperti yang ditampilkan pada Tabel 15.

Tabel. 15. Sekuen primer yang didesain dengan program Primer3

No	Nama Primer	Urutan Sekuens	Prediksi Panjang Produk
1	Udtg1 Udtg2	5'- CCAACCAAATGAGGCCCTA 5'- AATGAGCAGCAAATCAAA	246 bp
2	Udtg3 Udtg4	5'- CAGATCCTTTGCCACACTGA 5'- CCTGCCAACATAACAGCGTA	178 bp

Pengujian primer 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. Sayangnya dari beberapakali pengujian untuk kombinasi tersebut masih belum menunjukkan akurasi 100%, karena masih dijumpai fragmen produk amplifikasi pada satu sampel DNA Udang katekin rendah (tidak sesuai harapan). Pada sampel Udang U15, U16, U21, dan U22 (gambir berpotensi katekin rendah) yang diuji dengan kombinasi primer Udtg3 dan Udtg4, ternyata tidak mampu menghasilkan produk. Hal tersebut menunjukkan bahwa hasil PCR sesuai dengan harapan. Hasil analisis baru mengindikasikan posisi penanda molekuler lokus Udtg 3+4 untuk karakter kadar katekin tinggi memiliki posisi yang jauh dari gen pengendali kadar katekin tinggi. Disamping itu diduga bahwa karakter kadar katekin merupakan karakter kuantitatif yang dikendalikan oleh banyak gen, dimana kontribusi masing-masingnya relatif kecil.



Gambar 25. Amplifikasi PCR dengan kombinasi primer Udtg3 dan Udtg4 [10 pmol/ul] pada DNA genom awal tipe Udang katekin tinggi (U7,U8,U12,U13,U14) dan Udang katekin rendah (U5, U15, U16, U21, U22)

Sebanyak 10 sampel genom awal yang diuji dengan kombinasi primer Udtg3 dan Udtg4 memberikan tingkat keberhasilan sebanyak 90 %. Salah satu contoh hasil amplifikasi dengan primer Udtg3 dan Udtg4 ditampilkan pada Gambar 25.

Pengujian kombinasi primer Udtg3 dan Udtg4 pada DNA genom gambir tipe Udang katekin tinggi menghasilkan produk amplifikasi, walaupun pada sampel U7 fragmen yang dihasilkan sangat tipis. Panjang produk yang dihasilkan sekitar 200 bp pada Udang katekin tinggi, namun pada kelompok Udang katekin rendah juga menghasilkan produk pada satu sampel (U5). Hasil tersebut sesungguhnya tidak diharapkan, karena seharusnya untuk Udang katekin rendah tidak memiliki fragmen. Fenomena ini menunjukkan bahwa primer yang diuji tingkat akurasiya belum mencapai 100%, karena 1 sampel pada U5 (katekin

rendah) memperlihatkan produk fragmen.

Pada sampel U8, U12, U13, dan U14 kualitas pita fragmen yang dihasilkan cukup bagus, demikian juga pada U5 (katekin redah). Tingey, *et al*, (1994) menyatakan jumlah dan intensitas pita DNA yang dihasilkan setelah amplifikasi DNA dengan PCR sangat tergantung bagaimana primer mengenal urutan DNA komplementernya pada DNA templet yang digunakan. Kemungkinan pada sampel U5 tersebut terdapat sekuens DNA templet yang komplementer dengan sekuens kombinasi primer Udtg3+Udtg4, sehingga primer berhasil mengenali situs penempelan pada DNA templet, sehingga proses amplifikasi dapat berjalan baik.

Sampel U7 memperlihatkan intensitas fragmen sangat tipis. Hal tersebut diduga disebabkan oleh tingkat kemurnian DNA yang rendah atau jumlah salinan fragmen tersebut sangat sedikit. Mollah, *et al*, (2004) menyatakan bahwa, bervariasinya intensitas fragmen DNA hasil amplifikasi ini disebabkan oleh tingkat kemurnian DNA yang tidak sama, jumlah *copy* gen atau afinitas primer dengan templet yang berbeda-beda. Untuk dapat membuktikan tingkat akurasi kombinasi primer Udtg3+Udtg4 dilakukan pengujian pada sampel-sampel yang lain.

4.7. Uji Akurasi Sistem Penanda STS (*Sequence Tagget Sites*)

Sistem penanda STS (*Sequence Tagget Sites*) merupakan sistem penanda yang sudah berbasis kepada informasi sekuens DNA dari fragmen RAPD, yaitu berupa primer spesifik hasil desain dengan program Primer3 pada kegiatan sebelumnya. Selanjutnya kombinasi primer Udtg3+Udtg4 diuji pada sampel DNA genom yang dimiliki (24 sampel). Hasil pengujian dengan DNA genom

tanaman gambir hasil koleksi ternyata masih ditemui produk tidak sesuai harapan (Tabel 15).

Pada sampel DNA katekin tinggi, jika dihasilkan produk sesuai harapan (prediksi 178 bp) dinyatakan sebagai Non Rekombinan (hasil PCR +), demikian juga kalau pada sampel DNA katekin rendah tidak menghasilkan produk, hal ini dinilai sebagai Non Rekombinan (hasil PCR -)(karena memang tidak diinginkan). Sedangkan jika pada sampel DNA katekin tinggi tidak menghasilkan produk sesuai harapan (prediksi 178 bp), maka dinilai sebagai Rekombinan (hasil PCR -), demikian pula jika pada sampel DNA katekin rendah justru mengasilkan produk (prediksi 178 bp), maka dinilai sebagai Rekombinan (hasil PCR +). Hasil amplifikasi PCR (Tabel 15) menggunakan kombinasi primer Udtg3 +Udtg4 terhadap 24 DNA gambir dapat dikemukakan bahwa, beberapa sampel DNA katekin tinggi belum mampu menghasilkan produk sesuai harapan, demikian juga untuk sampel DNA katekin rendah ditemui pada dua individu yang masih menghasilkan fragmen (fragmen tidak sesuai harapan). Pengujian kombinasi primer spesifik hasil didesain untuk mendeteksi DNA gambir berpotensi katekin tinggi tingkat keberhasilannya rendah atau tingkat akurasi primer ini masih rendah.

Tabel 16. Amplifikasi DNA dengan primer Udtg3+Udtg4 terhadap 24 genom tanaman gambir tipe Udag.

No	Kode Sampel	Hasil PCR	R atau NR	No	Kode Sampel	Hasil PCR	R atau NR
1	U1(tinggi)	-	R	13	U13(tinggi)	+	NR
2	U2(tinggi)	+	NR	14	U14 (tinggi)	+	NR
3	U3 (tinggi)	-	R	15	U15 (rendah)	-	NR
4	U4 (tinggi)	-	R	16	U16 (rendah)	+	R
5	U5 (rendah)	+	R	17	U17 (tinggi)	-	R
6	U6 (tinggi)	-	R	18	U18 (tinggi)	-	R
7	U7 (tinggi)	+	NR	19	U19 (tinggi)	-	R
8	U8 (tinggi)	+	NR	20	U20 (tinggi)	-	R
9	U9 (tinggi)	-	R	21	U21 (rendah)	-	NR
10	U10 (tinggi)	-	R	22	U22 (rendah)	-	NR
11	U11 (tinggi)	+	NR	23	U23 (tinggi)	-	R
12	U12 (tinggi)	+	NR	24	U24 (tinggi)	-	R

Keterangan : (+) = fragmen sesuai harapan (NR= Non Rekombinan) (-) = fragmen tidak sesuai harapan (R= Rekombinan)

Tingkat keberhasilan yang rendah disebabkan karena karakter kadar katekin bersifat kuantitatif, dan diduga sekuens hasil penelitian ini merupakan DNA struktural (klon DNA genomik) yang mungkin terdapat disekitar gen yang terlibat dalam penentu kadar katekin, tetapi sekuen ini bukanlah gen melainkan sekuen DNA yang dapat digunakan sebagai penanda (marker) pada tanaman gambir yang berpotensi katekin tinggi.

Berdasarkan hasil pengujian primer tersebut, untuk menentukan tingkat akurasi kombinasi primer Udtg3 +Udtg4 dalam bentuk persentase dapat dihitung dengan menggunakan rumus umum berikut ini:

$$\text{Tingkat Akurasi} = \frac{\text{Jumlah sampel produk sesuai harapan}}{\text{Jumlah sampel yang diuji}} \times 100\%$$

$$\text{Tingkat Akurasi} = \frac{[7 (\text{katekin tinggi} = \text{NR}) + 3 (\text{katekin rendah} = \text{NR})]}{24} \times 100 \%$$

$$\text{Tingkat Akurasi} = \frac{10}{24} \times 100\%$$

$$\text{Tingkat Akurasi} = 41,7\%$$

Angka persentase tersebut memperlihatkan bahwa primer Udtg3+Udtg4 memiliki tingkat akurasi masih rendah yaitu 41,7% dalam mendeteksi tanaman gambir yang memiliki potensi kadar katekin tinggi. Hal ini disebabkan karena kadar katekin merupakan karakter kuantitatif yang dikendalikan oleh banyak gen. Dalam kromosom, banyak lokus yang menentukan karakter tersebut, tetapi belum diketahui lokus mana yang berperan. Kemungkinan posisi fragmen penanda (marker) terletak sangat jauh misalnya lebih dari 1000 bp, sehingga saat dilakukan amplifikasi dengan kombinasi primer spesifik tersebut tidak mampu menghasilkan produk PCR. Bila diperhatikan dari asal usul bahan genetik yang digunakan untuk penelitian, berasal dari genotipe populasi yang berbeda-beda sehingga diduga ada kemungkinan mempunyai variasi genotipe yang luas.

Menurut Crowder (1990) variabilitas genetik terjadi karena pengaruh gen dan interaksi gen yang berbeda-beda dalam suatu populasi. Variabilitas genetik yang luas akan menghasilkan variabilitas fenotipik yang luas pula jika interaksi genetik dengan lingkungan cukup tinggi. Fauza, *et al.* (2007) menyatakan bahwa

tanaman gambir mempunyai variabilitas genetik yang luas berdasarkan karakter fenotipik dan genetik (penanda RAPD).

BAB 5

PENUTUP

Berdasarkan data dan hasil analisis dapat diambil beberapa point pemikiran:

1. Warna daun merah dan tebal daun (struktur anatomi) merupakan karakter yang mencirikan tanaman gambir berpotensi kadar katekin tinggi.
2. Sekuen fragmen target yang terkait potensi kadar katekin tinggi telah berhasil disisipkan berjumlah 206 nukleotida.
3. Kombinasi primer spesifik dengan kode Udtg3 (5'-CAGATCCTTTGCCCACTGA -3') dan Udtg4 (5'-CCTGCCAACATAACAGCGTA -3') telah berhasil didesain dari sekuen DNA yang diperoleh.
4. Dihasilkan sistem metode deteksi dini dalam kegiatan seleksi tanaman gambir yang terkait potensi genetik kadar katekin tinggi secara molekuler menggunakan kombinasi primer spesifik Udtg3 dan Udtg4.

Agar primer Udtg3 dan Udtg4 dapat diketahui keberhasilannya, diperlukan pengujian tingkat akurasi pada beberapa sampel daerah sentra produksi gambir di Sumatera Barat.

Perlu dilakukan pembelajaran lebih lanjut, antara lain ;

- a) menentukan gen spesifik yang mengendalikan / terpaut kuat dengan potensi genetik kadar katekin tinggi dan katekin rendah,
- b) identifikasi lebih lanjut sehubungan dengan gen-

gen penting yang menentukan produksi tinggi, dalam upaya perakitan kultivar unggul tanaman gambir.

INDEX

anatomi,	A	katekin, ,	K
		.	
		kultivar, ,	
		.	
		karakter,	
benih, ,	B	molekuler,,	M
bibit,			
deteksi,	D	primer. ,	P
		.	
		produktivitas, ,	
		.	
		perbanyak, ,	
fase, ,	F	seleksi,	S
		sintetik,	
gambir,	G	unggul,	U
genotipe,			
identifikasi, ,	I	.	
.			

DAFTAR PUSTAKA

- Abral H., 2006, Pengembangan Alat Pengolahan Gambir Berkapasitas Tinggi, Penelitian PHK A2, Mesin Unand. Padang
- Abral,H., A.Bakhtiar.,D.P.Putra., H.Dahlan., dan Mastaryanto. 2008. Pengembangan mesin penekan daun bertenaga hidrolik: Studi Kasus Penekanan Daun Tanaman Gambir. Prosiding. Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II.Universitas Lampung 17-18 November 2008
- Adria dan H. Idris. 1996. Studi pendahuluan penggunaan ekstrak gambir sebagai insektisida nabati terhadap larva kumbang colorado (*Epilachna sp*). Laporan Penelitian Kelti Hama IPPTP Laing. Solok. 14 hal. (*tidak dipublikasikan*)
- Akkaya, M.S., A.A. Bhagwat., P.B. Cregan., 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. Genetics 132: 1131-1139
- Alberts.B., D. Bray ., J.Lewis., M. Raff., K.Roberts, and J.D. Watson. 1994. Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing, Third Edition. Inc:New York. 1291p
- Azra'i, M. 2006. Sinergi teknologi marka molekuler dalam pemuliaan tanaman jagung. Jurnal Litbang 25(3):81-89.
- Babaloka O. O. 2003. *Minireview: Molecular Techniques: an Overview of Methods for the Detection of Bacteria*. African Journal of Biotechnology vo.2 (12): 710-713.
- Babaoglu,S., L. Acik.,, A. Çelbi., and N.Adiguzel. 2004. Molecular analysis of Turkish *Alyssum* L. (*Brassicaceae*) Species by RAPD-PCR and SDS-PAGE methods. Journal of Science . U.G.Fen Bilimleri Dergisi. 17(3): 25-33.
- Badan Pusat Statistik. 2010. Sumatera Barat dalam angka. Badan Pusat Statistik. Jakarta.
- Badan Pusat Statistik. 2011. Statistik perdagangan luar negeri. Ekspor. Badan Pusat Statistik. Jakarta.

- Balai Informasi Pertanian Sumatera Barat. 1995. Pemupukan dan pengolahan gambir. Departemen Pertaian. 40 hal.
- Balai Informasi Pertanian Sumatera Barat. 1988. Bertanam gambir (*Uncaria gambir* Roxb). Departemen Pertanian. 4 hal.
- Bakhtiar, A. 1991. Manfaat gambir. Biro Bina Pengembangan Sarana Perekonomian Daerah Tk. I Sumatera Barat. Padang. 98 hal.
- Bakhtiar, A. 2007. Prospek diversifikasi produk berbasis gambir. Makalah Utama Seminar Nasional” Peningkatan nilai tambah gambir melalui pembangunan kawasan Agro-Technopark. Padang. 29 Nofember 2007. 4 hal
- Birnboim ,H. Cand& J. Doly . 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 7:1513-23. Laboratoire de Génétique Moléculaire, Institut de Recherche en Biologie Moléculaire, Paris, France
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davies, R. W. 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet* 32: 314-331.
- Brock, T. D., M.T.Madigan,. J.M. Martinko, and J. Parker. 1994. Biology of microorganisms. New York : Prentice Hall.
- Brown, T.A. 1991. Pengantar Kloning Gen. Penterjemah: Sumiati, A.M dan Praseno. Yogyakarta. Yayasan Essentia Medica.
- Bruce, K. D., W. D. Horns, J. L. Hobman, A. M Osbon, P. Strike, and D. A. Ritche. 1992. Amplification of DNA from native population of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3413 – 3416.
- Burhan, W., Z.Dawair., Suwirmen., D.Rangkuti., N. Suharti., dan Sidirmna. Lipid dan Metabolit Sekunder. 1997. Buku Ajar Fisiologi Tumbuhan. Kerjasama Heds Project-Jica dan FMIPA Universitas Andalas Padang. P{ 224-235.
- Burkill, I.H. 1966. A Dictionary of the Economic Product of the

Malay Peninsula. Vol. 1 (A-H). Governments of Malaysia and Singapore by the Ministry of Agriculture and Co-operatives. Kuala Lumpur Malaysia

- Cowell, I.A and Austin CA. 1997. cDNA Library Protocols : Preparation of Competent Cells for High-Efficiency Plasmid Transformation of *Escherichia coli*. Vol 69 : 129-137. Humana Pr.
- Crowder. L.V. 1990. Genetika Tumbuhan. Gajah Mada Universitas Press. Diterjemahkan oleh Kusdiarti,L. 499 hal
- Dalimunthe, A. 2004. Stomata, Biosintesis, Mekanisme Kerja, dan Peranannya dalam Metabolisme. Digitized by USU digital library. Program Studi Kehutanan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara.hal: 1 – 6.
- Daswir dan I.Kusuma. 1993. Sistem usaha tani gambir di Sumatera Barat. Media Komunikasi Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri (11):68-74.
- David, Ng. 2005. *Moleculer Technique Lecture Note 2005*. [http://www. Biotech .ubc.ca](http://www.Biotech.ubc.ca). [9 November 2009].
- Denian. A., H. Idris, dan E. Suryani. 1992. Studi sifat-sifat morfologis beberapa tipe gambir di Sumatera Barat. Bul. Litro VII(2) : 21-25.
- Denian. A. dan A. Fiani. 1994. Karakteristik morfologis beberapa nomor tanaman gambir. Prosiding Seminar Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Sub-Balitro Solok (4) : 29-30.
- Denian, A., S. Taher, A. Ruhnayati, dan Yudarfis. 2004. Status teknologi produksi tanaman gambir. Ekspose Gambir Kayu Manis, dan Atsiri. Solok 2 Desember 2004. hal 15-29.
- Dinas Perkebunan Sumatera Barat. 1998. Statistik Perkebunan. Dinas Perkebunan Sumatera Barat. Padang
- Djarwaningsih, T. 1993. Gambir. *Dalam* : Sutarno, H., H. Pudjaatmaka, dan S. Danimihardja (Eds.) *Pendayagunaan Tanaman Penghasil Bahan Pewarna dan Penyamak pada Lahan Kritis*. Yayasan Prosea Bogor. Hal 16-18

- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dweikat, I., S.Mackerzie, M.Levy., and H.Ohm. 1993. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theo Appl.Gene.* 85: 497-505
- Fauza, H., I. Ferita., Murdaningsih, H.K., N.Rostini, dan R.Setiamihardja. 2007. Variabilitas genetik tanaman gambir berdasarkan marka RAPD. *Zuriat* 18(1): 93-99
- Fauza, H. 2009. Identifikasi Karakteristik Gambir (*Uncaria* spp.) di Sumatera Barat dan Analisis RAPD. Disertasi. Universitas Padjadjaran Bandung. (Tidak dipublikasikan).
- Fauza, H., Murdaningsih, H.K., E.Suryani, dan I. Ferita. 2010. Sinergi teknik molekuler dan pemuliaan tanaman dalam perakitan kultivar unggul tanaman gambir tipe Udang berdaya hasil tinggi dan kandungan katekin tinggi. Laporan Penelitian Skim KKP3T Fakultas Pertanian Universitas Andalas bekerjasama dengan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Padang 81 hal.
- Ferita, I., H.Fauza., dan Yusniwati. 2009. Pengembangan metode deteksi Kadar Katekin Berbasis Molekuler pada Spesies *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. Laporan Hibah Strategis Nasional Tahun Anggaran 2009. Padang.
- Firmansyah, A. Bakhtiar, dan E. Rahmawati. 2004. Pengaruh konsentrasi metil selulosa dalam formulasi tablet murni. Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXVI. Padang 7-8 September 2004.
- Gaffar, S., 2007. Buku Ajar Bioteknologi Molekul. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Padjadjaran. Bandung. 82 halaman.
- Hasan, Z., A. Denian, Iran, A.J.P. Tamsin, dan B.Burhaman. 2000. Budidaya dan pengolahan Gambir. BPTP. Sukarami. 29 hal
- Hayani, E. 2003. Analisis kadar *catechin* dari gambir dengan berbagai metode. *Buletin Teknik Pertanian.* Vol.8(1): 31-33.
- Heyne, K. 1987. Tumbuh-tumbuhan berguna Indonesia Jilid III (terjemahan Nur Udin). Badan Litbang Kehutanan. Jakarta. Hal. 1767-1775

- Hidayat, B.E. 1995. Anatomi Tumbuhan berbiji. Penerbit. ITB Bandung Press. 275 hal.
- Hu,J.,and C.E.Quiros. 1991. Molecular and cytological evidence of deletions in alien chromosomes of two monosomic addition lines of *Brassica campestris-oleracea*. *Theor.Appl.Genet.*81:221-226.
- <http://belindch.wordpress.com/pengenalanelektroforesis/2010> [10 Oktober 2010].
- <http://biomol.wordpress.com/bahan-ajar/pcr/2010> [10 Oktober 2010].
- <http://www.scribd.com/doc/17604347/Vakuola> ,2010 [9 Desembr 2010].
- <http://www.biotoools.umassmed.edu/2010>) [19 Mei 2010].
- <http://lingkungan.infogoe.com/organtumbuhan2011>) [12 Maret 2011].
- [http:// biomol.Word press.com/ bahan-ajar/sekuensing-dna2011](http://biomol.Wordpress.com/bahan-ajar/sekuensing-dna2011) [20 Januari 2011].
- <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/2011> [20 Januari 2011].
- Idris, H dan Adria. 1997. Kajian awal penggunaan tepung gambir sebagai fungisida nabati terhadap jamur *imperfect (Fusarium sp)* penyebab penyakit bercak daun pada tanaman klausena (*Clausena anisata*). Laporan Penelitian Kelti Hama IPPTP Laing. Solok. (*tidak dipublikasikan*).
- Innis, M. A. Dan D. H. Gelfand. 1990. *PCR Protocols*. Academic Press, New York. Hal 3-12.
- Jamsari, I.Nitzz,S.M. Reamon-Buttner, C.Jung. 2003. Molecular Marker Development from BAC-end Sequences for Discriminating Sex-Types in *Asparagus officinalis* L. Proc.of Int Seminar and Conference of SKET-2002-IASI: ISBN:3-89342-019-3

- Jamsari, I.Nitzz,S.M. Reamon-Buttner, C.Jung. 2004. The use of BAC-based large insert library for development of gender diagnostic marker in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Theor and Appl. Genet. Vol.108:1140-1146.
- Jamsari. 2007. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Unri Press, Pekanbaru. 193 hal.
- Jamsari., Yaswendri, dan M. Kasim. 2007. Fenologi perkembangan bunga dan buah spesies *Uncaria gambir*. Jurnal Biodiversitas. Vol.8. No. 2: 141-146.
- Jamsari, 2008. Preparasi DNA Spesies *Colletotrichum sp.* dan Spesifitas Sistem Fingerprinting RAPD. Jurnal Natur Indonesia 11: 31-39.
- Jamsari dan Reflin. 2008. Pengembangan penanda molekuler berbasis PCR sebagai system deteksi dini keberadaan jamur penyebab antraknosa pada tanaman cabai. Laporan Penelitian Hibah Bersaing.
- Jamsari dan I.Ferita, 2009. Pengembangan Metode Preparasi DNA Cepat, Hibridisasi DNA Genomik-Produk PCR dan Visualisasinya untuk Mendukung Sistem Deteksi Dini Pathogen Antraknosa pada Pertanaman Cabai. Laporan Hibah Bersaing tahun Anggaran 2009. Padang. 33 hal.
- Jamsari dan I.Ferita, 2010. Pengembangan Metode Preparasi DNA Cepat, Hibridisasi DNA Genomik-Produk PCR dan Visualisasinya untuk Mendukung Sistem Deteksi Dini Pathogen Antraknosa pada Pertanaman Cabai. Laporan Hibah Bersaing tahun Anggaran 2010. Padang 51 hal.
- Jeffreys, A. J., V.Wilson., S.L. Thein., 1985. Hypervariable "minisatellite" Regions in Human DNA. Nature 314: 67-73.
- Johansen D.A. 1940. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc.
- Karsinah., Sudarsono., L.Setyobudi, dan H. Aswidinnoor. 2002. Keragaman genetic plasma nutfah jeruk berdasarkan analisis penanda RAPD. Jurnal Bioteknologi Pertanian. Vol.7.No.1.p:8-16.

- Kasim, A. 2004. Peluang dan tantangan pemanfaatan gambir sebagai bahan baku perekat pada industri kayu lapis dan papan partikel. Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXVI. Padang 7-8 September 2004.
- Konieczny A. and F.M. Ausubel., 1993. A Procedure for Mapping *Arabidopsis* Mutations Using Co-dominant Ecotype-Specific PCR-Based Markers. *Plant J.* 4: 403-410.
- Kresovich S, McFerson JR, Westman AL. 1997. Using molecular markers in genebanks: identity, duplication, contamination and regeneration. In: Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI workshop, 9–11 October 1995 (Ayad WG, Hodgkin T, Jaradat A, Rao VR (eds) International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp. 23–38.
- Lee, I. M., I. M. Bartoszyk, D. E. Gundersen, B. Mogen, and R. E. Davis. 1997. *Nested PCR for Ultrasensitive Detection of the Potato Ring Rot Bacterium, Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus.* Applied and environmental microbiology vol. 63 No. 7: 2625-2630.
- Lefebvre, V., B. Goffinet, J. Chauvet, B. Caromel, P. Signoret, R. Brand, and A. Palloix. 2001. Evaluation of genetic distance between pepper inbred lines for cultivar protection purpose : comparison of AFLP, RAPD, and phenotypic data. *Theor. Appl. Genet.* 102 : 741-750
- Lopez, M.M., E. Bertolini, A. Olmos, P. Caruso, M.T. Gorris, P. Llop, R. Penyalver, and M. Cambra. 2003. *Innovative Tools for Detection of Plant Pathogenic Viruses and Bacteria.* *Int Microbiol* 6: 233–243.
- Lucida, H. 2006. Determination of the innovation constants and the stability of catechin from gambir (*Uncaria gambir* Roxb) ASOPMS, 12 International Conference, November.2006. Padang.
- Maidaliza, T., S. Dahlan., L. Meriko., Roziyah, dan E. Sari. M. 2007. Kajian Struktur dan Kariotipe Gadung (*Dioscorea bulbifera* L.) di Sumatera Barat. *Jurnal Makara, Sain.* 11(1): 37-43.

- Markham, K.R. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Penerbit ITB. Bandung.
- Mattjik, A, A., dan I.M. Sumertajaya. 2002. Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab. IPB Press. Bogor. 281 hal.
- Meunier, J.R, Grimont, P.A. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144: 373-379.
- Mollah, S. Jaya, Abdul., Aswidinnoor, Hajrial & Santoso, Djoko. 2004. Deteksi dan Analisis Sekuens Gen Inhibitor Proteinase pada Beberapa Klon Kakao Harapan Tahan Penggerek Buah Kakao dari Sulawesi Selatan. *Menara Perkebunan.* 72(1):1-10.
- Muladno, 2002. Teknologi Rekayasa Genetika. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.
- MyRMnews, 2009. Wapres Kalla lepas ekspor gambir ke Nepal. Melalui [<http://www.myrmnews.com/14/04/09>].
- Nair, S. 1993. Detection of Polymorphism in DNA. In *Genome Analysis of Plant, Pest, and Pathogens. Workshop Handbook*, Central Research Institute for Food Crop Bogor, Indonesia 14-16 Juni 1993. IRRI Manila.
- Nasir. 2000. Bioteknologi potensi dan keberhasilannya dalam bidang pertanian. Raja Grafindo Persada. 286 hal.
- Nasrun, N., H. Idris, dan H. Syamsu. 1997. Pemanfaatan daun gambir sebagai pestisida nabati untuk pengendalian penyakit kanker batang pada tanaman kayu manis. *Prosiding Kongres nasional XIV Perhimpunan Fitopatologi Indonesia.* Palembang, 27-29 Oktober 1997; hal : 480-482.
- Nasrun, N. 2001. Pemanfaatan katechin ekstrak daun gambir sebagai fungisida nabati dalam pengendalian penyakit layu tanaman tomat. *Journal Stigma Edisi Januari - Maret ; 9(1):* 54-57.
- Nazir, N. 2000. Gambir, Budidaya, Pengolahan, dan Prospek Diversifikasinya. Hutanku. Padang. 136 hal.

- Nurmawati, S., dan S.Sulistiana. 2007. Studi Struktur epidermis daun *Dasymaschalon blumei* Finet & Ganep (Annonaceae) di Jawa dan Sumatra. *Jurnal Matematika, Sains, dan Teknologi* 8(1): 62-70.
- Old, R.W. and S.B. Primrose. 1989. Principle of gene manipulation an introduction to genetic engineering. Blackwell Scientific Publication. Oxford London.
- Olson, M., Hood, L., Canton, C., Doststein, D. 1989. A Common Language for Physical Mapping of the Human Genome. *Science* 254: 1434-1435.
- Paran, I., E.Aftergoot, and C.Shifriss. 1998. Variation in *Capsicum annum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*. 99: 167 – 173.
- Pastrik, K. H. and F. A. Rainey. 1999. *Identification and Differentiation of Clavibacter michiganensis subspecies by Polymerase Chain Reaction-Based Techniques*. *J. Phytopathology* 147: 687-693.
- Paterson, A.H.S.D. Tanksley and M.E. Soller. 1991. DNA marker in plant improvement. *Advancer in agronomy*. (44) : p39-44.
- Prana, T, K., dan N Sri Hartati. 2003. Identifikasi Sidik Jari DNA Talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan Teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*): Skrining Primer dan Optimalisasi Kondisi PCR. *Jurnal Natur Indonesia* 5(2): 107-112.
- Promega (1999). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Technical Manual).
- Qi, X and P.Lindhout. 1997. Development of AFLP markers in barley . *Mol. Gen. Genet.* 254: 330 – 336.
- Qyvind Hammer. 1999. Paleontological Statistic Version 2.10 (*PAST analysis*). Natural History Museum University of Orlo.
- Rajput, S.G., Wable, K.J., Sharma, K.M., Kubde, P.D. and Mulay, S.A. 2006. Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in Tomato. *African Journal of Biotechnology* 5: 108-112.

- Ratnayani, K., I.Nengah Wirajana, dan A.A.I.A.M. Laksmiwati. 2007. Analisis Variasi Nukleotida Daerah D-loop DNA Mitokondria pada Suatu Individu Suku Bali Normal. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana Bukit Jimbaran Bali.
- Risdale, C.E. 1992. *Uncaria gambir* (Hunter)Roxb. In Lemmens, R.H.M.J. & Wulijarni-Soecipto, N.(eds). Plant Resources of South-East Asia. Dye and tannin-producing plants. Prosea Foundation, Bogor. Indonesia. Pp: 125-127.
- Roswita, D. 1990. Prospek tanaman gambir di Sumatera Barat. Bul. BIP Padang (01): 8-10.
- Ruiz, R.A., D. C. Vacek, P. E. Parker, L. E. Wendel., U. Schaffner.,R. Sobhian., and R. D. Richard. 2000. Using Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) to Match Natural Enemies to Their Host Plant. Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds 4-14 July 1999, Montana State University, Bozeman, Montana, USA Neal R. Spencer [ed.]. pp. 289-293.
- Sait S., Sumarsi. dan Sunaryo J, 1989, Penelitian dan Pengembangan Komponen Utama Gambir (Catechin) sebagai Bahan Industri, Komunikasi No. 265, Balai Besar Industri Hasil Pertanian. Bogor.
- Saleh,R. 2007. Prospek Ekspor gambir dan produk turunannya. Makalah Utama Seminar Nasional” Peningkatan nilai tambah gambir melalui pembangunan kawasan Agro-Technopark. Padang. 29 Nofember 2007. 5 hal.
- Sanchez de la Hoz, M. P., J.A. Davila., Y.Loarce., E.Ferrer., 1996. Simple Sequence Repeat Primer Used in Polymerase Chain Reaction Amplifications to Study Genetic Diversity in Barley. Genome 39: 112-117.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sambrook, J. and D.W. Russell, 2001. Molecular cloning; A laboratory Manual, 3rd edition, Cold spring Harbor laboratory Press, New York, pp: 1.31-1.38, 1.116-1.118

- Sanjaya, L., G.A. Wattimena., E.Guharja.,M.Yusuf., H.Aswindinnoor., dan P. Stam. 2002. Keragaman ketahanan aksesi Capsicum terhadap antraknose (*Colletotrichum capsici*) berdasarkan penanda RAPD. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 7(2):37-42.
- Shanie, M., V. Hosiana, A. Bakhtiar. 2004. Formulasi. Shampo gambir murni. Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXVI. Padang 7-8 September 2004.
- Shiran,B., R.Azimkhani., S.Mohammadi., and M.R.Ahmadi. 2006. Potential use of Random Amplified Polymorphic DNA marker in Assessment of genetic diversity and identification of raseseed (*Brassica napus* L.) cultivar. *Biotechnology* 5(2):153-159.
- Siregar, U.J., E. Sudarmonowati, dan N.S. Hartati. 1998. Development of RAPD protocol for *Shorea laevis*. *Annales Bogorienses* 5: 85-92.
- Singh, K, Jildal N, Gupta S. L, Gupta A. K, Mittal D. 2005. *Detection of Newcastle Disease Virus Genome from Field Outbreaks in Poultry by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*. *Int J Poultry Sci* 4: 472-475.
- Silfia, R. 2004. Variasi morfologi dan sistem polinasi gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) yang terdapat di Kurai , Kecamatan Suliki Kabupaten Lima Puluh Kota. Fakultas MIPA. Universitas Andalas Padang.
- Snyder, L and W. Champness. 1977. *Molecular genetics of Bacteria*. 2nd Edition. ASM Press. Washington: 49-158.
- SP-SMP-377-1985. Penentuan kadar katechin dari gambir. Hal: 122-126.
- Stansfield, W.D., S.Jaime., R.Colome., and J.Cano. 2006. *Biologi Molekuler dan Sel*. Alih Bahasa oleh Amalia Safitri. Penerbit Erlangga Jakarta.
- Suryanto, D. 2003. *Melihat keanekaragaman organisme melalui beberapa teknik genetika molekuler*. Digitized by USU Digital Library. FMIPA. USU.
- Susanto, A.H., 2009. *Bahan Ajar Biologi Molekuler*. Dasar-dasar

teknologi DNA rekombinan.
<http://biomol.wordpress.com>[25 Maret 2009].

Susilobroto, B. 2000. Keragaan Industri Pengolahan Gambir dan Penyulingan nilam dan Peluang Pasar. Kantor Wilayah Departemen Perindustrian dan Perdagangan Propinsi Sumatera Barat. Padang : hal 1-8.

Teknologi dan Industri Sumatera Barat. 2001. Pengolahan gambir secara tradisional. Padang 3 hal.

Tjitrosoepomo, G. 2005. Taksonomi Umum, Dasar-Dasar Taksonomi Tumbuhan. Gajah Mada University Press. 216 hal.

Tingey, S. V., J. A. Rafalski, and M. K. Hanafey. 1994. Genetik Analysis with RAPD Markers. In: Coruzzi, C. And P. Puidormenech (eds.). *Plant Molecular Biology*. Berlin: Springer-Verlag.

Tinker, N.A., M.G. Fortin., and D.E. Mather. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley. *Theor. Appl.*

Vieux, E.F., P.Y. Kwok., and R.D. Miller. 2002. Primer Design for PCR and Sequencing in High-Throughput Analysis of SNPs. *Research Report BioTechniques* 32: 28-32.

Voet, D., J.G. Voet, and C.W. Pratt. 1999. *Fundamentals of Biochemistry*. Upgrade edition. New York. p 893.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Fritjters, A., Pot., J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23: 4407-4414.

Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., *et al.* 1998 Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphism in the Human Genome. *Science* 280: 1077-1082.

Weeden, N. F., G. M. Timmerman, M. Hemmat, B. E. Kneen., and M.

- A. Lodhi. 1992. Inheritance and Reliability of RAPD Markers. *In: Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Joint Breeding Symposia Series, November 1, 1992, Minneapolis, MN. Crop Science Society of America, Madison, WI.
- Wegrzyn, G. 2005. What does plasmid biology currently mean? Departement of Molecular Biology , University of Gdansk, Klaski, Poland : 24:80-82.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolf., and W. Meyer. 1995. DNA Fingerprinting in Plant and Fungi. CRC Press, Boca Raton. Florida. 322 p.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelick., K.J. Livak., J.A. Rafalski., S.V. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic acids Res.* 18:6531-6535.
- Wilkins, T.A and Smart, I.B. 1996. Isolation of RNA from Plant Tissue . in: Krieg. P.A. (ed). *A. Laboratory Guide to RNA Isolation , Analysis and Synthesis*. New York: Wiley – Liss.
- Yang,X., and C.Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor.Appl. Genet.* 86:205-212.
- Yang, W., A.C. de Olivera., I.Godwin., K. Schertz, and J.L. Bennetzen. 1996. Comparison of DNA markers technologies in characterizing plant genome diversity. Variability in Chinese Shorgums. *Crop. Sci.* 36 : 1669-1676.
- Yasmin,S.,S.Islam.,Khondoker., Nasirudin, and S.Alam. 2006 Molecular characterization of potatogermplasm by Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Biotechnology.* 5(1):27-31.
- Yu, K., K.P. Pauls. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl. Acids Res.* 20: 2606.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polimerase Chain Reaction* Penerbit Andi. Yogyakarta. 239 hal.
- Zou J, Shun S. H, Yen N. T, Gong Z. X. 2005. *Complete Genome*

Sequence and Biological Characterization of a Novel Goose paramyxovirus SF02 Isolated in China. Virus Gene 30: 13-21.

Gambir adalah komoditas ekspor yang berperan dalam pendapatan masyarakat dan meningkatkan devisa negara. Ekstrak tanaman gambir banyak kegunaannya dan sangat beragam. Potensi tersebut menjadikan permintaannya semakin meningkat. Peningkatan produktivitas gambir perlu didukung dengan upaya peningkatan teknologi budidaya serta pemuliaan tanamannya. Rendahnya produktivitas perlu dicarikan solusi dengan berbagai pendekatan. Buku ini ditulis sebagai media berbagi sekaligus melaporkan studi gambir terkait potensi kadar katekin. Buku ini berfokus kepada sebahagian dari kajian sumber daya genetik gambir itu sendiri. Kajian selanjutnya setelah buku ini adalah metode perbanyakkan massal gambir berkatekin tinggi, poliploid pada tipe-tipe gambir dan implikasinya terhadap kandungan getah katekin pada gambir tersebut.

Tim Penulis

- Aprizal Zainal
- Istino Ferita
- Gustian
- Warnita

Untuk akses **Buku Digital**,
Scan **QR CODE**



Media Sains Indonesia
Melong Asih, Regency B-40, Cijerah
Kota Bandung - Jawa Barat
Email : penerbit@medsan.co.id
Website : www.medsan.co.id

