

**SKRIPSI**

**UJI KUANTITATIF DAN KUALITATIF DNA PULE PANDAK**

*(Rauvolfia serpentina L.)*

Oleh  
**Rizqi Hapsari**  
**H0708062**



**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI**  
**FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS SEBELAS MARET**  
**SURAKARTA**  
**2012**

*comn user*

**UJI KUANTITATIF DAN KUALITATIF DNA PULE PANDAK  
(*Rauwolfia serpentina* L.)**

**SKRIPSI**

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
guna memperoleh derajat Sarjana Pertanian  
di Fakultas Pertanian  
Universitas Sebelas Maret**



**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
SURAKARTA  
2012**

*commit to user*

SKRIPSI

UJI KUANTITATIF DAN KUALITATIF DNA PULE PANDAK

(*Rauwolfia serpentina* L.)

Rizqi Hapsari  
H0708062

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. Ir. Sulandjari, MS  
NIP. 195203231985032001

Dr. Ir. Endang Yuniastuti, M.Si  
NIP. 197006091994022001

Surakarta, Oktober 2012  
Mengetahui  
Universitas Sebelas Maret  
Fakultas Pertanian  
Dekan,

Prof. Dr. Ir. H. Bambang Pujiasmanto, MS  
NIP.195602251986011001

*commit to user*

SKRIPSI

UJI KUANTITATIF DAN KUALITATIF DNA PULE PANDAK

(*Rauvolfia serpentina* L.)

yang dipersiapkan dan disusun oleh  
**Rizqi Hapsari**  
**H0708062**

telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal:  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Pertanian  
Program Studi Agroteknologi

Susunan Tim Penguji:

**Ketua**

**Anggota I**

**Anggota II**

**Prof. Dr. Ir. Sulandjari, MS**  
**NIP. 195203231985032001**

**Dr. Ir. Endang Yuniastuti, M.Si**  
**NIP. 195210101976122001**

**Ir. Sukaya, MS**  
**NIP. 195905151986031004**

*commit to user*

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian sekaligus penyusunan skripsi ini. Dalam penulisan skripsi ini tentunya tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karenanya, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Pujiasmanto, MS selaku Dekan Fakultas Pertanian UNS.
2. Dr. Ir. Hadiwiyono, M.Si selaku Ketua Jurusan Program Studi Agroteknologi.
3. Prof. Dr. Ir. Nandariyah, MS selaku Pembimbing Akademik atas waktu, semangat, ilmu, dan bimbingan yang diberikan.
4. Prof. Dr. Ir. Sulandjari, MS selaku Pembimbing Utama yang membiayai pelaksanaan penelitian ini dan memberikan bimbingan dalam penelitian, serta ilmu.
5. Dr. Ir. Endang Yuniastuti, M.Si selaku Pembimbing Pendamping atas dorongan, semangat, waktu, ilmu, dan bimbingan yang diberikan.
6. Ir. Sukaya, MS selaku Dosen Pembahas, atas kritik, saran dan bimbingan.
7. Kedua orang tua saya yang telah memberi dukungan baik secara materi, spiritual, dan pengertiannya.
8. Teman-teman seperjuangan Agroteknologi Angkatan 2008 “SOLMATED” dan “FILANTROPI” atas kebersamaan yang telah kita lalui dengan penuh suka dan duka serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu,

Penulis menyadari bahwa dalam pembuatan skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, saran dan kritik yang bersifat membangun sangat diharapkan agar dapat lebih baik. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis sendiri khususnya dan bagi para pembaca pada umumnya. Amin.

Surakarta, Oktober 2012

Penulis

*commit to user*

## DAFTAR ISI

|   | Halaman |
|---|---------|
| <b>HALAMAN JUDUL</b> .....  | i       |
| <b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....   | iii     |
| <b>KATA PENGANTAR</b> .....   | v       |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....   | vi      |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....   | viii    |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....  | ix      |
| <b>RINGKASAN</b> .....  | x       |
| <b>SUMMARY</b> .....  | xi      |
| <b>I. PENDAHULUAN</b> .....   | 1       |
| A. Latar Belakang.....  | 1       |
| B. Rumusan Masalah.....   | 3       |
| C. Tujuan Penelitian.....   | 3       |
| <b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....   | 4       |
| A. Tumbuhan Pule Pandak ( <i>Rauvolfia serpentina</i> L.) .....           | 4       |
| B. Analisis Fenotip dan Genotip.....                                      | 5       |
| 1. Analisis Fenotip.....  | 6       |
| 2. Analisis Genotip .....   | 6       |
| C. Uji Kuantitatif DNA .....  | 8       |
| D. Uji Kualitatif DNA .....   | 10      |
| <b>III. METODE PENELITIAN</b> .....                                       | 12      |
| A. Waktu dan Tempat Penelitian.....                                       | 12      |
| B. Alat dan Bahan Penelitian .....  | 12      |
| C. Pelaksanaan Penelitian .....   | 12      |
| 1. Cara Kerja Penelitian.....   | 12      |
| 2. Analisis Data.....   | 15      |
| <b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....                                     | 16      |
| A. Uji Kuantitatif DNA Pule Pandak ( <i>Rauvolfia serpentina</i> L.)..... | 16      |
| B. Uji Kualitatif DNA Pule Pandak ( <i>Rauvolfia serpentina</i> L.).....  | 20      |
| <b>V. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....                                      | 27      |

*commit to user*

A. Kesimpulan..... 27

B. Saran..... 27

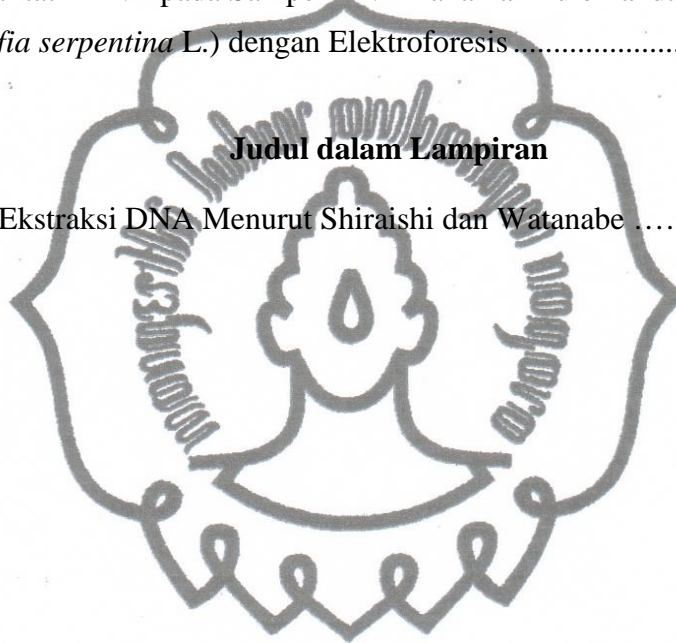
**DAFTAR PUSTAKA.....28**

**LAMPIRAN.....32**



## DAFTAR TABEL

| <b>Nomor</b> | <b>Judul dalam Teks</b>  | <b>Halaman</b> |
|--------------|--|----------------|
| 1.           | Uji Kuantitatif DNA pada Sampel DNA Tanaman Pule Pandak<br>( <i>Rauwolfia serpentina</i> L.) dengan Spektrofotometri UV-Vis..... | 16             |
| 2.           | Hasil Pengecekan Kualitas dan Kuantitas DNA Kemiri Sunan<br>Menggunakan Spektrofotometer.....                                    | 18             |
| 3.           | Uji Kualitatif DNA pada Sampel DNA Tanaman Pule Pandak<br>( <i>Rauwolfia serpentina</i> L.) dengan Elektroforesis .....          | 26             |
|              | <b>Judul dalam Lampiran</b>  | <b>Halaman</b> |
| 4.           | Protokol Ekstraksi DNA Menurut Shiraishi dan Watanabe .....  | 32             |





## DAFTAR GAMBAR

| Nomor | Judul dalam Teks  | Halaman        |
|-------|---|----------------|
| 1.    | Uji Kualitatif DNA pada Sampel DNA Tanaman Pule Pandak ( <i>Rauwolfia serpentina</i> L.) Asal Saradan dan Wonogiri dengan Ekstraksi Lumat.....                | 22             |
| 2.    | Uji Kualitatif DNA pada Sampel DNA Tanaman Pule Pandak ( <i>Rauwolfia serpentina</i> L.) Asal Saradan dan Wonogiri dengan Ekstraksi Agak Lumat.....           | 23             |
| 3.    | Uji Kualitatif DNA pada Sampel DNA Tanaman Pule Pandak ( <i>Rauwolfia serpentina</i> L.) Asal Saradan dengan <i>Buffer</i> TE 50 $\mu$ l dan 100 $\mu$ l..... | 24             |
| 4.    | Hasil Pengecekan Kualitas DNA Sampel Kemiri Sunan dengan Gel Elektroforesis 1%.....   | 25             |
|       | <b>Judul dalam Lampiran</b>   | <b>Halaman</b> |
| 5.    | Bahan Penelitian Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA .....   | 33             |
| 6.    | Khemikalia Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA .....   | 33             |
| 7.    | Alat-alat Ekstraksi DNA .....   | 34             |
| 8.    | Alat-alat Uji Kuantitatif DNA.....  | 35             |
| 9.    | Alat-alat Uji Kualitatif DNA .....  | 35             |
| 10.   | Hasil Isolasi DNA Pule Pandak ( <i>Rauwolfia serpentina</i> L.).....  | 36             |

## RINGKASAN

**UJI KUANTITATIF DAN KUALITATIF DNA PULE PANDAK (*Rauvolfia serpentina* L.).** Skripsi: Rizqi Hapsari (H0708062). Pembimbing: Sulandjari, Endang Yuniastuti, Sukaya. Program Studi: Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta.

Indonesia termasuk negara yang memiliki keanekaragaman hayati berupa tumbuhan obat yang sangat tinggi, yang diperkirakan terdapat di berbagai tipe hutan di Indonesia. Tumbuhan obat merupakan komponen penting dalam pengobatan berupa ramuan jamu tradisional dan telah digunakan sejak dahulu untuk memecahkan berbagai masalah kesehatan yang dihadapi dan merupakan kekayaan budaya bangsa Indonesia yang perlu dipelihara dan dilestarikan. Salah satu tumbuhan obat di Indonesia adalah Pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) yang terkenal karena khasiatnya dalam menyembuhkan berbagai macam penyakit, terutama penyakit tekanan darah tinggi. Di bidang bioteknologi tentang penelitian analisis molekuler tumbuhan Pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) masih terbatas. Tahap pertama untuk analisis molekuler diawali dengan isolasi DNA pada jaringan yang akan digunakan. Hasil isolasi DNA perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui konsentrasi DNA dan kemurnian DNA tumbuhan Pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) melalui uji kuantitatif dan kualitatif DNA sehingga dapat berguna untuk keberlanjutan analisis molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kuantitas dan kualitas DNA tumbuhan Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.).

Metode analisis yang digunakan adalah uji kuantitatif DNA dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan uji kualitatif DNA dengan menggunakan elektroforesis gel tipe horizontal, pada sampel DNA asal Saradan dan Wonogiri. Penelitian menghasilkan data berupa rasio absorbansi sampel DNA dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan spektrofotometri UV-Vis kemudian dihitung konsentrasi DNA pada uji kuantitatif DNA serta pita DNA hasil elektroforesis gel tipe horizontal pada uji kualitatif yang tervisualisasi dengan Gel-Doc.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rasio sampel DNA asal Saradan dan Wonogiri dengan perlakuan penggerusan daun secara lumat didapatkan rasio 1,1 dengan konsentrasi DNA untuk sampel DNA Saradan 810 ng/ $\mu$ l dan Wonogiri 770 ng/ $\mu$ l. Perlakuan penggerusan daun agak lumat didapatkan rasio 1,1 (Saradan) dan 1,2 (Wonogiri) dengan konsentrasi DNA 840 ng/ $\mu$ l untuk sampel DNA Saradan dan Wonogiri 970 ng/ $\mu$ l. Penambahan *buffer* TE pada *pellet* DNA asal Saradan sebanyak 50  $\mu$ l dan 100  $\mu$ l didapatkan hasil berturut-turut dengan rasio 1,1 dan 1,2; konsentrasi DNA 750 ng/ $\mu$ l dan 820 ng/ $\mu$ l. Pada uji kualitatif didapat hasil dari semua sampel DNA asal Saradan dan Wonogiri terdapat DNA dengan tervisualnya pita DNA dengan Gel-Doc.

## SUMMARY

**QUANTITATIVE AND QUALITATIVE DNA TEST ON PULE PANDAK (*Rauvolfia serpentina* L.).** Thesis-S1: Rizqi Hapsari (H0708062). Advisers : Sulandjari, Endang Yuniastuti, Sukaya.. Study Program : Agrotechnology, Faculty of Agriculture University of Sebelas Maret (UNS), Surakarta.

Indonesia is one of countries which has a very high biodiversity medical plants, estimated and contained of various types of forests in Indonesia. Medical plants is an important component in the treatment of traditional herbs and used for a long time ago to solve any medical problems which were faced and as Indonesia cultural wealth that needs to be nurtured and preserved. One of the medical plants in Indonesia is Pule Pandak which renowned for its efficacy in curing various diseases, especially high blood pressure. In biotechnology research on the molecular analysis of plant Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) is still limited. The first begins with molecular analysis of DNA isolation on the network to use. DNA isolation results should be tested to determine the DNA concentration and purity of the DNA of plants Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) through quantitative and qualitative DNA test that can be useful for molecular analysis of sustainability. This study aims to determine the quantity and quality of DNA Pandak Pule (*Rauvolfia serpentina* L.) plant.

The analytical method used is a quantitative test of DNA by using UV-Vis spectrophotometry and qualitative test DNA using electrophoresis horizontal type, the DNA samples from Saradan and Wonogiri. The study produce data in the form of the ratio of absorbance of the sample DNA with a wavelength of 260 nm and 280 nm with UV-Vis spectrophotometry and then calculated the concentration of DNA in a quantitative test results of DNA and DNA band type horizontal gel electrophoresis on a qualitative test visualized using Gel-Doc.

The results showed that the ratio of DNA samples from Saradan and Wonogiri by crushing the leaves are pulverized treatment obtained by the concentration ratio of 1.1 DNA to DNA samples Saradan 810 ng/ $\mu$ l and Wonogiri 770 ng/ $\mu$ l. The treatment leaves a little creamed crushing ratio of 1.1 obtained (Saradan) and 1.2 (Wonogiri) with a DNA concentration of 840 ng/ $\mu$ l for DNA samples Wonogiri Saradan and 970 ng/ $\mu$ l. The addition of the DNA pellet in TE buffer Saradan origin of 50  $\mu$ l and 100  $\mu$ l respectively the results obtained with a ratio of 1.1 and 1.2; DNA concentration of 750 ng/ $\mu$ l and 820 ng/ $\mu$ l. In the qualitative test results were obtained from all DNA samples from Saradan and Wonogiri visualized contained DNA with the DNA bands using Gel-Doc.

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Indonesia termasuk negara yang memiliki keanekaragaman hayati berupa tumbuhan obat yang sangat tinggi, yang diperkirakan terdapat di berbagai tipe hutan di Indonesia. Tumbuhan obat merupakan komponen penting dalam pengobatan berupa ramuan jamu tradisional dan telah digunakan sejak dahulu untuk memecahkan berbagai masalah kesehatan yang dihadapi dan merupakan kekayaan budaya bangsa Indonesia yang perlu dipelihara dan dilestarikan. Kebutuhan akan kesehatan yang semakin meningkat kemudian adanya isu global “*back to nature*” menjadikan perubahan gaya hidup yang memberikan peluang pasar yang semakin besar sehingga memberikan dampak yang positif bagi perkembangan industri obat tradisional dan fitofarmaka.

Pemanfaatan keanekaragaman hayati berupa ramuan jamu telah menarik perhatian jauh diluar batas negara Indonesia dan penggunaan jamu sebagai obat alternatif untuk berbagai penyakit khususnya untuk penyakit yang tidak berhasil disembuhkan dengan obat-obatan modern yang sekarang terus meningkat. Saat ini industri jamu tradisional maju pesat dan secara ekonomis menguntungkan. Mengingat permintaan yang terus meningkat, pengadaan bahan baku obat atau jamu dengan cara pemungutan langsung dari alam akan mengancam keberadaan populasi tumbuhan khasiat obat. Salah satu jenis tumbuhan khasiat obat tersebut adalah Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) tumbuhan obat Indonesia yang sangat terkenal karena khasiatnya dalam menyembuhkan berbagai macam penyakit, terutama penyakit tekanan darah tinggi (Khisbah 2003).

Keberadaan Pule Pandak di alam saat ini sudah sangat jarang, bahkan tergolong langka. Kelangkaan Pule Pandak tersebut terutama disebabkan oleh kegiatan eksploitasi hutan, alih fungsi hutan, dan pemanfaatan lahan oleh masyarakat serta pengambilan tumbuhan obat tidak mempertimbangkan aspek kelestarian sehingga mempengaruhi penurunan populasi tumbuhan khasiat obat. Untuk melestarikan plasma nutfah tumbuhan khasiat obat dapat ditempuh dengan pembudidayaan tumbuhan tersebut. Namun didalam upaya introduksi tumbuhan

liar menjadi tanaman budidaya diperlukan pengetahuan mengenai sifat-sifat biologis dan ekofisiologisnya tetapi sampai saat ini penelitian dan informasi mengenai potensi, penyebaran, bioekologi, dan bioteknologi serta teknik pelestarian tumbuhan obat masih sangat terbatas. Begitu pula yang terjadi pada tumbuhan Pule Pandak. Padahal informasi tersebut sangat diperlukan guna mendasari upaya pelestarian, pemanfaatan dan pengembangan tumbuhan obat melalui budidaya tanaman.

Di bidang bioteknologi tanaman obat Pule Pandak hingga saat ini masih terbatas pada analisis molekuler dalam upaya mengidentifikasi genetik tanaman. Karakterisasi berdasarkan morfologi hasilnya kurang akurat karena dipengaruhi oleh faktor lingkungan, perbedaan umur tanaman, dan jaringan tanaman sehingga perlu dilakukan analisis molekuler yang dapat memberi data yang lebih akurat melalui analisis tingkat DNA (*deoxyribo nucleid acid*) sebagai material genetik karena tidak dipengaruhi kondisi lingkungan. Oleh karena itu, diperlukan adanya upaya analisis molekuler pada tanaman Pule Pandak. Teknik analisis molekuler telah memberikan peluang untuk mengembangkan dan mengidentifikasi genetik dari suatu kultivar tanaman. Pendekatan genetika molekuler dengan menggunakan penanda DNA telah berhasil membentuk penanda molekuler yang mampu dalam mendeteksi gen dan sifat-sifat tertentu, evaluasi keragaman dan evolusi pada tingkat genetik (Hoon-Lim et al. 1999).

Berbagai jenis marka molekuler yang sudah ada, umumnya yang dipilih untuk dijadikan marka molekuler guna mendukung program seleksi. Sebelum melangkah pada kegiatan penelitian pencarian marka genetik dengan berbagai analisis molekuler, terlebih dahulu harus dilakukan isolasi DNA dari bagian tanaman yang akan digunakan dalam tahap ekstraksi DNA. Dalam tahapan isolasi DNA seringkali ditemukan hambatan untuk menghasilkan kualitas DNA yang murni sehingga dapat digunakan sebagai bahan untuk analisis molekuler lebih lanjut. Oleh karena itu didalam tahap isolasi DNA menentukan kegiatan penelitian analisis molekuler. Untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA dari hasil isolasi DNA perlu dilakukan pengujian kuantitatif DNA dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan kualitatif DNA dengan elektroforesis yang

selanjutnya dapat digunakan untuk analisis molekuler lebih lanjut. Beberapa hal di atas mendasari pemikiran diperlukan adanya upaya uji molekuler pada tumbuhan obat Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) dengan uji kuantitatif dan kualitatif DNA sebagai bahan analisis molekuler.

## B. Perumusan Masalah

Pule pandak merupakan tumbuhan khasiat obat yang dapat menyembuhkan berbagai penyakit terutama hipertensi. Penelitian di bidang molekuler tumbuhan Pule pandak masih terbatas. Tahap awal untuk melakukan analisis molekuler adalah isolasi DNA. Dalam tahap isolasi DNA meliputi pemecahan dinding sel dan membran inti dilanjutkan dengan pemisahan DNA dari berbagai komponen sel yang lain atau kontaminan yang tidak diinginkan seperti protein, polifenol, alkaloid, dan lain sebagainya serta tahap purifikasi atau pemurnian DNA. Teknik isolasi DNA merupakan faktor penentu keberhasilan untuk tahap selanjutnya dalam analisis molekuler. Keberhasilan dalam isolasi DNA akan dapat diketahui konsentrasi dan kemurnian DNA melalui uji kuantitatif dan kualitatif DNA. Oleh karena itu rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana uji kuantitatif dan kualitatif DNA pada tumbuhan Pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.).

## C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan yaitu:

1. Mengetahui kuantitas DNA tumbuhan Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.).
2. Mengetahui kualitas DNA tumbuhan Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.).

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Tumbuhan Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.)

Taksonomi tumbuhan obat pule pandak sebagai berikut:

|            |                                  |
|------------|----------------------------------|
| Divisi     | : Spermatophyta                  |
| Sub divisi | : Angiospermae                   |
| Kelas      | : Dicotyledonae                  |
| Ordo       | : Apocynales                     |
| Famili     | : Apocynaceae                    |
| Genus      | : Rauvolfia                      |
| Spesies    | : <i>Rauvolfia serpentina</i> L. |

(Sulandjari 2008).

Menurut Sastroamidjojo (2001), secara morfologi, pule pandak merupakan tumbuhan berbatang perdu, dan mengandung getah, tinggi sampai 40 cm. daun pule pandak berbentuk seperti telur terbalik, diujung menajam, bagian pangkal menjadi kurang lebar dan merupakan tangkai pendek, permukaan daun tidak berbulu, tepi daun rata, bertiga/ berempat mengelilingi batang. Bunga berwarna putih ada juga yang merah, dalam payung tambahan. Akar sangat pahit, putih, dan mengandung pati. Sulandjari (2008) menyatakan akar pule pandak bagian tumbuhan yang lebih besar bila dibandingkan dengan bagian tumbuhan yang terdapat di atas tanah. Bentuk akar tunggang dengan sedikit akar serabut yang kecil dan agak panjang. Sistem perakaran masuk ke tanah dengan berkelok-kelok atau bengkok dan membesar. Menurut Trivedi, Kumari (2011), buah pule pandak termasuk buah yang berbiji, buah yang masih muda berwarna hijau dan hitam keunguan pada saat buah sudah tua. Kulit buah berwarna coklat pucat, biji lunak tetapi permukaan kulit biji sangat keras.

Pule pandak mempunyai kadar kandungan alkaloid yang berbeda-beda menurut bagian tumbuhan, umur, fase pertumbuhan (vegetatif dan generatif), teknik perbanyakan serta kondisi tempat tumbuh. Kadar alkaloid dari pule pandak akan meningkat sesuai dengan bertambahnya umur tanaman (Sulandjari 2008).

*commit to user*

Tumbuhan pule pandak menyukai daerah relatif terbuka, bersemak atau di tepi hutan. Tumbuhan seringkali dijumpai pada vegetasi yang spesifik, seperti di bawah tegakan jati. Atau pada hutan bambu, dengan ketinggian 0 – 500 m di atas permukaan laut (Wibawa, 2006).

Kandungan kimia : Akar mengandung 3 grup alkaloid, yang jenis dan jumlahnya tergantung dari daerah asal tumbuhnya. Grup I termasuk alkaline kuat (*quarternary ammonium compound*): serpentine, serpentine, sarpagine, dan samatine. Grup II (*tertiary amine derivate*): yohimbine, ajmaline, ajmalicine, tetraphylline, dan tetraphyllicine. Grup III termasuk alkaline lemah (*secondary amities*): reserpine, rescinnamine, deserpidine, raunesine, dan canescine (Iskandar 2007).

Akar pule pandak berkhasiat sebagai penenang (*sedatif*), menyebabkan tidur (*hipnotik*), penurun tekanan darah tinggi, melancarkan aliran darah, penghilang nyeri (*analgesik*), peredam demam (antipiretik), peredam panas dalam, serta sebagai antiradang. Sedangkan batang dan daun pule pandak berkhasiat untuk mengobati influenza, sakit tenggorokan, malaria, tekanan darah tinggi, diare, hernia, bisul dan memar, penolak angin serta menghilangkan darah beku (Wibawa 2006).

Berdasarkan hasil penelitian Sulandjari et al. (2005) menunjukkan bahwa pada kerapatan naungan 50% sampai dengan kerapatan naungan 80%, kadar reserpina lebih tinggi daripada kerapatan naungan 20%; namun bobot akar pertanaman tertinggi didapat pada tingkat naungan 20%. pada tanaman pule pandak kandungan reserpinanya lebih tinggi apabila ditanam di dataran rendah daripada di dataran tinggi.

## B. Analisis Fenotip dan Genotip

Di bidang pertanian kegiatan identifikasi suatu tanaman khususnya bidang pemuliaan tanaman sangat diperlukan karena untuk membantu pengelompokkan, usaha memperbaiki sifat tertentu, meningkatkan produksi, dan kualitas tanaman. Untuk mencapai tujuan yang telah disebutkan di atas maka perlu adanya analisis secara fenotip dan genotip. Analisis fenotip telah banyak dilakukan karena mudah



tetapi kurang akurat karena dipengaruhi oleh umur tanaman, jaringan tanaman, dan lingkungan tempat tumbuh sehingga perlu dilanjutkan dengan analisis genotip yang mempelajari keragaman genetik tanaman yang sangat erat kaitannya dengan kajian tentang gen, DNA, dan kromosom.

### 1. Analisis Fenotip

Karakterisasi merupakan kegiatan awal untuk mengetahui variasi sifat pertumbuhan vegetatif dan generatif maupun sifat morfologi tanaman yang bertujuan untuk menghasilkan deskripsi tanaman. Koleksi yang ada dan yang telah dikarakterisasi dapat menghasilkan deskripsi yang bermanfaat sebagai materi dalam pembentukan varietas unggul baru, yang dapat dilakukan melalui introduksi, seleksi, dan persilangan dengan menggunakan tetua yang terpilih dari koleksi plasma nutfah (Suryadi et al. 2003).

Identifikasi berdasarkan karakter morfologi ini memiliki keterbatasan, diantaranya yaitu faktor lingkungan, jumlah karakter yang diamati terbatas dan adanya sifat dominan dan resesif pada tanaman. Meskipun demikian, identifikasi terhadap karakter morfologi tetap penting dan masih tetap digunakan dalam program pemuliaan tanaman karena pengamatannya sangat mudah dan cepat (Hayat 2008).

Penanda morfologi mudah dilihat oleh mata, contohnya adalah warna, ukuran atau bentuk organ tertentu. Walaupun mudah dan masih dipakai, penanda morfologi dapat termodifikasi oleh pengaruh lingkungan sehingga dianggap tidak stabil. Selain itu, penanda morfologi jumlahnya sangat terbatas dan untuk mengamatinya harus menunggu hingga sifat penanda itu muncul (Pandini 2009).

### 2. Analisis Genotip

Genotipe suatu individu menentukan fenotipe yang beragam, sebagian diantaranya akan memberi kontribusi pada kelestarian individu tersebut. Seleksi alam akan bekerja dengan cara memilih individu-individu dengan kelestarian tertinggi dalam populasi. Dengan demikian kombinasi gen yang sesuai cenderung diteruskan atau diturunkan, sedangkan yang kalah adaptif cenderung dihilangkan dari populasi (Stansfield 2007).

Marka molekuler menjadi penting karena karakter tanaman pada dasarnya hasil interaksi antara faktor genetik dengan lingkungan. Sehingga tanaman yang pada dasarnya masih satu jenis menjadi dapat berbeda secara fisik karena perbedaan perlakuan atau lingkungan. Oleh sebab itu salah satu cara mengidentifikasi persamaan atau perbedaan jenis dibalik keragaman karakteristik fisik adalah melihat variasi pada tingkat gen (Azrai 2005).

Langkah awal pelaksanaan marka molekuler adalah mengambil bagian tanaman, biasanya berasal dari daun muda. Kemudian diisolasi DNA nya dan dicari bagian yang bertanggung jawab terhadap karakter unggul pada tanaman. Biasanya DNA yang diisolasi kemudian akan dihubungkan dengan bank data genetika, untuk mengidentifikasi gen dan menduga karakter yang diekspresikan. Melalui marka molekuler maka kepemilikan varietas akan diperkuat dengan identitas tanamannya secara spesifik dalam bentuk gambar atau karakter gen (Windiastika 2011).

Penanda genetik, biasa juga disebut dengan marka, merupakan ekspresi pada individu yang tidak terlihat oleh mata atau terdeteksi dengan alat tertentu, yang menunjukkan dengan pasti genotipe suatu individu. Beberapa penanda genetik sangat terpercaya karena bersifat lembam, tidak mudah berubah karena pengaruh lingkungan. Penanda genetik sangat penting dalam penyelidikan filogeni suatu organisme (Tao et al. 2009).

Kelebihan penanda DNA atau penanda molekuler adalah tidak dipengaruhi oleh lingkungan dan terekspresi pada semua jaringan tanaman. Pendekatan molekul pada tingkat DNA memiliki beberapa keuntungan diantaranya penelitian tingkat genotipe dapat langsung diuji dari pada fenotipe, bagian DNA yang berbeda berevolusi dengan kecepatan yang berbeda sehingga bagian yang tepat dapat dipilih untuk studi selanjutnya, berbagai teknik berdasarkan tingkat DNA telah banyak dikembangkan dan masing-masing berpotensi menjadi penanda gen yang tepat untuk pemecahan masalah tertentu, dapat digunakan untuk melihat filogeni, tes parental atau pembuktian silsilah (Cintamulya 2011).

DNA (*Deoxyribonucleic acid*) merupakan salah satu makromolekul yang mempunyai peranan sangat penting pada jasad hidup yang tersusun secara

sistematis dan merupakan pembawa informasi genetic yang diturunkan kepada jasad keturunannya. Informasi genetik disusun dalam bentuk kodon yang berupa tiga pasang basa nukleotida dan menentukan bentuk, struktur, maupun fisiologi suatu jasad (Yuwono 2005).

Struktur DNA *double helix* terbentuk dari empat tipe nukleotida yang berikatan secara kovalen membentuk rantai polinukleotida (rantai DNA atau benang DNA) dengan rangka (tulang punggung) gula fosfat tempat melekatnya basa-basa. Dua rantai polinukleotida saling berikatan melalui ikatan hidrogen antara basa-basa nitrogen dari rantai yang berbeda. Semua basa berada dalam bentuk *helix* ganda dan rangka (tulang punggung) gula fosfat berada di bagian luar (Fathiyah et al. 2011).

DNA (*Deoxyribonucleic acid*) sebagai materi genetik hanya ditemukan di dalam nukleus, yaitu dalam kromosom, mitokondria, plastida, dan sentriol. Berupa rantai panjang dan ganda (*double helix*), fungsinya berhubungan erat dengan penurunan sifat dan sintesis protein. Kadarnya tidak dipengaruhi oleh aktivitas sintesis protein, basa nitrogennya terdiri atas purin (adenin (A) dan guanin (G)) dan pirimidin (timin (T) dan sitosin (C)), komponen gulanya deoksiribosa yaitu ribose yang kehilangan satu atom oksigen (Pratiwi et al. 2006).

### C. Uji Kuantitatif DNA

Isolasi DNA dapat dilakukan melalui tahapan-tahapan antara lain: preparasi ekstrak sel, pemurnian DNA dari ekstraksi sel dan presipitasi DNA. Meskipun isolasi DNA dapat dilakukan dengan berbagai cara, akan tetapi pada setiap jenis atau bagian tanaman dapat memberikan hasil yang berbeda, hal ini dikarenakan adanya senyawa polifenol dan polisakarida dalam konsentrasi tinggi yang dapat menghambat pemurnian DNA (Zubaidah 2004).

Isolasi DNA merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi analisis DNA. DNA dapat ditemukan baik pada kromosom inti maupun pada organel, yaitu mitokondria dan kloroplas. Untuk mengekstrak DNA, diperlukan langkah-langkah laboratorium untuk memecahkan dinding sel dan membran inti, yang dilanjutkan dengan pemisahan DNA dari berbagai komponen sel lain. Pada saat

melakukannya, DNA harus dijaga agar tidak rusak dan didapatkan DNA dalam bentuk rantai yang panjang (Fatchiyah et al. 2011).

Pada umumnya, teknik isolasi DNA pada tanaman tahunan memerlukan berbagai modifikasi dari teknik standar umumnya, seperti penambahan antioksidan polivinilpolipirolidon (PVPP) dan mercaptoethanol, ataupun penggunaan nitrogen cair untuk membantu menghancurkan jaringan serta penyimpanan lebih lama (*over night*) dari ekstrak daun yang telah digerus sebelum dilakukan purifikasi (Syafaruddin dan Santoso 2011).

DNA berkualitas tinggi yang akan didapat dalam suatu ekstraksi merupakan satu kaidah dasar yang harus dipenuhi dalam studi molekuler, terutama dalam penandaan sidik jari DNA. *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol (Jose dan Usha 2000).

Ardiana (2009), menyatakan bahwa penggunaan bufer CTAB sebagai pengganti nitrogen cair untuk mengisolasi DNA pada tanaman jeruk dan pepaya dapat menghasilkan produk DNA yang berkualitas yang ditunjukkan oleh pita DNA genom.

Uji kuantitatif DNA adalah analisis untuk menentukan kandungan/jumlah DNA yang terdapat dalam suatu zat atau komponen zat yang sebelumnya telah diketahui keberadaan DNA plasmidnya dalam larutan contoh dengan cara uji kualitatif (Larasati 2011).

Spektrofotometri ini merupakan gabungan antara spektrofotometri UV dan Visible. Sinar UV memiliki panjang gelombang 190-380 nm karena sinar UV tidak dapat dideteksi oleh mata, maka senyawa yang dapat menyerap sinar ini terkadang merupakan senyawa yang tidak memiliki warna bening dan transparan. Alat ini menggunakan dua buah sumber cahaya berbeda, sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible. Meskipun untuk alat yang lebih canggih sudah menggunakan hanya satu sumber sinar sebagai sumber UV dan Vis, yaitu photodiode yang dilengkapi dengan monokromator (Riyadi 2009).

DNA yang mengandung basa-basa purin dan pirimidin dapat menyerap cahaya UV. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm, sedang kontaminan protein atau phenol dapat menyerap cahaya pada 280 nm. Dengan adanya perbedaan penyerapan cahaya UV ini, sehingga kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 ( $\text{Å}260/\text{Å}280$ ), dan nilai kemurnian DNA berkisar antara 1.8-2.0 (Fatchiyah et al. 2011).

Menurut Muhammad,S.A., Praseno (1991) rasio yang kurang dari 1,8 menunjukkan bahwa preparasi DNA telah terkontaminasi baik oleh fenol maupun protein. Sedangkan rasio yang lebih dari 2 berarti preparasi DNA telah terkontaminasi oleh RNA.

Menurut Pharmawati (2009) pada konsentrasi DNA rendah (10 ng sampai 25 ng), PCR menghasilkan pola yang konstan, tetapi saat konsentrasi DNA dinaikkan menjadi 45 ng, terdapat band DNA yang tidak teramplifikasi. Beberapa penelitian lain menunjukkan hasil yang berlawanan yaitu rentang konsentrasi DNA cetakan dalam PCR-RAPD sangat luas dan pola-pola DNA yang dihasilkan relatif konstan. Contohnya pada *Fagopyrum esculentum*, pola RAPD tetap sama pada rentang konsentrasi DNA 6 ng sampai 480 ng, demikian pula pada *Pinus mariana* dan *P. rubens*, PCR-RAPD dengan konsentrasi DNA yang bervariasi (10 ng sampai 1000 ng) menghasilkan intensitas dan pola DNA yang sama. Selain konsentrasi DNA juga perlu diperhatikan konsentrasi primer yang akan digunakan untuk proses amplifikasi. Konsentrasi primer berpengaruh terhadap intensitas produk PCR-RAPD pada *Grevillea*.

#### D. Uji Kualitatif DNA

Metode standar yang digunakan untuk identifikasi, pemisahan, dan purifikasi fragmen DNA adalah menggunakan elektroforesis gel agarosa. Migrasi elektroforesis DNA melalui gel agarosa, arus listrik, dan suhu. Molekul DNA yang bermuatan negatif saat elektroforesis pada gel agarosa berbanding terbalik dengan konsentrasi gelnya. Migrasi struktur molekul yang besar akan lebih lambat

dibandingkan struktur molekul yang kecil dalam proses melewati pori-pori gel (Fathiyah et al. 2011).

Elektroforesis merupakan suatu teknik pemisahan molekul seluler berdasarkan atas ukurannya dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Teknik ini dapat digunakan dengan memanfaatkan muatan listrik yang ada pada makromolekul (Yuwono 2005).

Larutan DNA yang bermuatan negatif dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada gel agarosa dan diletakkan pada kutub negatif. Apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan buffer yang sesuai maka DNA akan bergerak ke kutub positif (Mahmuddin 2010).

Gel agarosa yaitu suatu bahan semi-padat berupa polisakarida yang diekstraksi dari rumput laut. Gel agarosa dibuat dengan melarutkannya dalam suatu buffer. Agar dapat larut dengan baik, pelarutannya dibantu dengan pemanasan (Yuwono 2005).

Sebelum dilakukan elektroforesis, suspensi DNA terlebih dahulu harus ditambahkan *loading dye* yang berfungsi untuk menambah densitas, sehingga DNA akan selalu berada di dasar sumur, pewarna untuk memudahkan meletakkan sampel DNA ke dalam sumur, agar dapat bergerak ke arah anoda dengan laju yang dapat diperkirakan sehingga dapat digunakan sebagai tanda migrasi DNA. Pewarna yang biasa digunakan adalah *bromophenol blue* dan *xylene cyanol*. Selain itu, pembacaan pita DNA di dalam gel yang telah diwarnai dengan *ethidium bromida* di atas lampu UV yang dibandingkan dengan DNA standar juga sering dilakukan untuk menganalisis kuantitas jumlah DNA (Suharsono dan Widyastuti 2006).

Larutan EtBr ini digunakan sebagai alat untuk mengidentifikasi dan mengukur semi-kualitatif fragmen DNA yang terseparasi dalam gel. Selain itu larutan EtBr akan terikat diantara dua untai ganda DNA dan berinteraksi diantara basa molekul DNA, sehingga menyebabkan pita DNA dalam gel agarosa akan berpendar kuning jingga bila disinari ultraviolet pada panjang gelombang yang pendek karena pewarna ini mengandung zat fluorescence (Windiastika 2012).

### III. METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni sampai Agustus 2012 yang bertempat di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian dan Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.

#### B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun muda dari 2 sampel tanaman Pule Pandak yang berasal dari Saradan, dan Wonogiri (Lampiran 2a), Khemikalia (Lampiran 2b) buffer ekstraksi (1 M Tris pH 9, 5 M NaCl, 0,5 M etilendiamin tetraasetat (EDTA), 10 % cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), mercaptoethanol, H<sub>2</sub>O), kloroform, natrium asetat, isopropanol, etanol dingin 70%, buffer TE (Tris EDTA), aquadest, gel agarose 1%, buffer Tris acetate etilendiamin tetraasetat (TAE) 1x, kertas parafilm, *loading dye*, dan etidium bromide (EtBr).

Alat yang digunakan pada penelitian ini (Lampiran 3) adalah tabung eppendorf ukuran 0,5 mL dan 1,5 mL, timbangan analitik, *sentrifuge*, *waterbath*, mesin vortex, spektrofotometri UV-Vis, kuvet, Gel-Doc, erlenmeyer 200 mL, *hotplate* dan *stirer*, mikro pipet, tip (biru, kuning, dan putih), flakon, mortar porselin dan penumbuk, elektroforesis horizontal, *chamber*, dan cetakan sisir.

#### C. Pelaksanaan Penelitian

##### 1. Cara Kerja Penelitian

- a. Ekstraksi DNA metode Shiraishi dan Watanabe (1995) (Lampiran 1) yang dimodifikasi Nandariyah (2007) yaitu dengan memodifikasi pengurangan waktu dan kecepatan sentrifugasi (7 menit dengan kecepatan 13.000 rpm), metode Shiraishi dan Watanabe (1995) sentrifugasi 2-3 jam dengan kecepatan 58.000 rpm.
  - i. Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan untuk ekstraksi DNA

*commit to user*

- ii. Menimbang tiap sampel daun tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) 1 gram.
- iii. Memanaskan buffer ekstraksi pada waterbath dengan suhu 65 °C selama 30 menit.
- iv. Menghaluskan tiap sampel daun yang telah ditimbang dengan mortar porselin sampai setengah lumat kemudian memasukkan buffer ekstraksi 1000 µL ke dalam mortar dan dilumatkan sampai benar-benar halus.
- v. Memindahkan tiap sampel daun yang telah dilumatkan ke tabung eppendorf ukuran 1,5 mL kemudian menambahkan 1000 µL buffer ekstraksi, selanjutnya menginkubasi ke waterbath dengan suhu 65 °C selama 30 menit.
- vi. Mensentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 7 menit.
- vii. Mengambil cairan lapisan atas dengan menggunakan mikropipet dan memindahkan ke tabung eppendorf yang baru, setelah itu menambahkan kloroform sebanyak jumlah cairan yang diambil dengan perbandingan 1:1, Menggojog hingga homogen dan mensentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 7 menit. Mengulang sampai 3 kali.
- viii. Mengambil cairan lapisan atas dan memindahkan ke tabung eppendorf baru kemudian menambahkan 20 µL Natrium asetat (pH 7,5) dan 100 µL isopropanol, menggojog sampai homogen.
- ix. Mensentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 7 menit.
- x. Menginkubasi ke dalam freezer semalam.
- xi. Mengambil tabung eppendorf yang diinkubasi dalam freezer kemudian mensentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 7 menit.
- xii. Membuang cairan secara perlahan-lahan selanjutnya menambahkan etanol dingin 70 % 100 µL ke dalam tabung eppendorf.
- xiii. Mensentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 7 menit dan membuang sisa etanol yang ada di dalam eppendorf.
- xiv. Mengeringanginkan pelet DNA selama 2 jam.



- xv. Menambahkan Tris EDTA 50  $\mu\text{L}$  dan 100  $\mu\text{L}$  ke dalam tabung eppendorf yang berisi pelet DNA yang sudah dikeringanginkan dan menyimpan ke dalam freezer dengan suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

b. Uji Kuantitas DNA

- i. Mengencerkan setiap sampel DNA 20  $\mu\text{L}$  ke dalam flakon yang berisi 3980  $\mu\text{L}$  aquadest atau 20  $\mu\text{L}$  dari 4 mL aquadest.
- ii. Memvortek setiap flakon yang berisi sampel DNA yang telah diencerkan sampai homogen.
- iii. Menghidupkan spektrofotometri UV-Vis dan mengatur panjang gelombang yang diperlukan yaitu 260 nm dan 280 nm.
- iv. Memasukkan 4 mL aquadest ke dalam kuvet I sebagai blanko dan memasukkan setiap sampel DNA yang telah diencerkan sehingga volumenya menjadi 4 mL ke dalam kuvet II.
- v. Muncul nilai absorbansi tiap sampel DNA pada  $\lambda$  260 nm dan  $\lambda$  280 nm.
- vi. Menghitung nilai kemurnian DNA dengan rumus nilai absorbansi sampel DNA  $\lambda$  260 nm dibagi dengan nilai absorbansi sampel DNA  $\lambda$  280 nm.
- vii. Menghitung konsentrasi DNA dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{DNA} = A^{\circ} 260 \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan :

$A^{\circ} 260$  = Nilai absorbansi pada  $\lambda$  260 nm

50 = Larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50  $\mu\text{g}$  untai ganda per mL.

(Fatchiyah et al. 2011).

c. Uji Kualitas DNA

- i. Menimbang agaros 1 % 0,3 gram.
- ii. Menambahkan 30 mL buffer TAE 1x ke dalam elenlenmeyer ukuran 200 mL yang di dalamnya telah berisi agaros 1 % 0,3 gram dan memanaskan sampai larut dengan *hotplate* dengan suhu  $300^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit.

- iii. Gel yang sudah larut didinginkan sebentar dan dituangkan dalam chamber yang telah dipasangi sisir pada alat elektroforesis.
- iv. Membiarkan gel memadat dan siap untuk digunakan untuk running elektroforesis.
- v. Mengangkat sisiran pada chamber sehingga membentuk sumuran untuk memasukkan setiap sampel DNA.
- vi. Memasukkan setiap sampel DNA 2  $\mu\text{L}$  ke dalam sumuran yang telah ditambahkan dengan *loading dye* 1  $\mu\text{L}$  yang sebelumnya mencampur pada kertas parafilm.
- vii. Menghidupkan *power supply* dan mengatur pada tegangan 85 volt selama 30 menit.
- viii. Mengangkat gel hasil running elektroforesis dan memasukkan ke dalam wadah yang berisi 0,5  $\mu\text{g/mL}$  etidium bromide (EtBr) selama 15 menit, selanjutnya memasukkan ke dalam wadah yang berisi aquadest 0,5 L.
- ix. Memvisualisasi dengan menggunakan Gel-Doc.

Visualisasi hasil uji kualitas DNA dengan mengamati pita DNA hasil elektroforesis horizontal dengan visualisasi menggunakan Gel-Doc.

## 2. Analisis Data

Data hasil penelitian ini berupa data kuantitatif dengan spektrotometri UV- Vis dan foto dari visualisasi hasil uji kualitas DNA dengan elektroforesis yang dianalisis secara deskriptif. Analisis data ini menunjukkan nilai absorbansi sampel DNA dan konsentrasi DNA serta ada atau tidaknya DNA yang terlihat dengan visualisasi menggunakan Gel-Doc.

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### A. Uji Kuantitatif DNA Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.)

Hasil dari isolasi DNA tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) yang berasal dari Saradan dan Wonogiri dilakukan uji kuantitatif DNA dengan menggunakan alat spektrofotometri untuk mengetahui nilai perbandingan absorbansi DNA pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Spektrofotometri merupakan suatu metode analisis untuk mengukur konsentrasi suatu senyawa berdasarkan kemampuan senyawa tersebut mengabsorpsi berkas sinar atau cahaya dengan panjang gelombang tertentu (Riyadi 2009). Spektrofotometri yang digunakan pada uji kuantitatif DNA penelitian ini adalah spektrofotometri UV-Vis (*Ultraviolet Visible*). DNA yang mengandung basa-basa purin dan pirimidin dapat menyerap cahaya UV. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada  $\lambda$  260 nm, sedang kontaminan protein atau phenol dapat menyerap cahaya pada  $\lambda$  280 nm. Nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0 (Fatchiyah et al. 2011). Menurut Sambrook et al. (1989) DNA dengan rasio pada kisaran angka tersebut telah memenuhi persyaratan kemurnian yang dibutuhkan dalam analisis molekuler. Hasil uji kuantitatif DNA pada sampel DNA tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Tabel 1.).

Tabel 1. Uji Kuantitatif DNA pada Sampel DNA Tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) dengan Spektrofotometri UV-Vis

| Sampel DNA                   | Panjang Gelombang |                  | Rasio | Konsentrasi     |
|------------------------------|-------------------|------------------|-------|-----------------|
|                              | $\lambda$ 260 nm  | $\lambda$ 280 nm |       |                 |
| Saradan (S1)                 | 0,081             | 0,072            | 1,1   | 810 ng/ $\mu$ l |
| Wonogiri (W1)                | 0,077             | 0,069            | 1,1   | 770 ng/ $\mu$ l |
| Saradan (S2)                 | 0,084             | 0,076            | 1,1   | 840 ng/ $\mu$ l |
| Wonogiri (W2)                | 0,097             | 0,080            | 1,2   | 970 ng/ $\mu$ l |
| Saradan (S3 <sub>50</sub> )  | 0,075             | 0,067            | 1,1   | 750 ng/ $\mu$ l |
| Saradan (S3 <sub>100</sub> ) | 0,082             | 0,071            | 1,2   | 820 ng/ $\mu$ l |

Keterangan: S1 dan W1= Sampel DNA dengan Ekstraksi Lumat, S2 dan W2= Sampel DNA dengan Ekstraksi Agak Lumat, S3<sub>50</sub>= Pellet DNA+50  $\mu$ l TE, S3<sub>100</sub>= Pellet DNA+100  $\mu$ l TE

Uji kuantitatif dari sampel DNA tumbuhan Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) yang berasal dari Saradan dengan kode S dan Wonogiri dengan kode W. Sampel DNA asal Saradan (S) terdapat perlakuan yaitu pada saat ekstraksi dengan penggerusan yang lumat diberi kode S1 dan agak lumat S2. Adapun kode sampel DNA S3<sub>50</sub> dan S3<sub>100</sub> artinya sampel DNA asal Saradan pada saat tahap isolasi DNA, *pellet* DNA yang telah dikeringanginkan ditambahkan *buffer* TE sebanyak 50  $\mu$ l dan 100  $\mu$ l. Begitu juga dengan sampel DNA asal Wonogiri dengan kode W1 dan W2 terdapat perlakuan yang sama seperti sampel DNA asal Saradan (S1 dan S2). Hasil dari uji kuantitatif pada Tabel 1. berupa rasio dan konsentrasi DNA. Rasio merupakan nilai perbandingan absorbansi  $\lambda$  260 nm dengan  $\lambda$  280 nm dari sampel DNA tumbuhan Pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.), sedangkan konsentrasi DNA merupakan jumlah DNA terkandung dari jaringan daun yang digunakan sebagai sampel dari proses isolasi DNA.

Rasio pada S1, W1, S2, dan S3<sub>50</sub> adalah 1,1. Pada sampel DNA W2 dan S3<sub>100</sub> memiliki rasio 1,2. Hal ini berarti rasio DNA dari semua sampel DNA kurang dari 1,8. Menurut Muhammad,S.A. dan Praseno (1991) rasio yang kurang dari 1,8 menunjukkan bahwa preparasi DNA telah terkontaminasi baik oleh fenol maupun protein. Selain rasio DNA, pertimbangan lain yang harus diperhatikan adalah konsentrasi DNA yang dihasilkan dari proses isolasi DNA. Pembacaan  $\lambda$  260 = 1 berarti konsentrasi DNA yang didapat sebesar 50  $\mu$ g/mL (Herison 2003). Konsentrasi DNA yang dihasilkan dari proses ekstraksi merepresentasikan jumlah DNA yang dikandung dari jaringan daun yang digunakan sebagai sampel karena metode dan perlakuan yang digunakan pada setiap sampel adalah sama. Konsentrasi DNA dari S1 810 ng/ $\mu$ l, W1 770 ng/ $\mu$ l, S2 840 ng/ $\mu$ l, W2 970 ng/ $\mu$ l, S3<sub>50</sub> 750 ng/ $\mu$ l, dan S3<sub>100</sub> 820 ng/ $\mu$ l. Konsentrasi DNA dari sampel DNA S1 dan W1 lebih rendah dari sampel DNA S2 dan W2 diduga karena pengaruh perbedaan penggerusan pada proses ekstraksi jaringan daun. Penggerusan jaringan daun muda secara agak lumat memberikan hasil dengan konsentrasi yang lebih tinggi bila dibanding dengan penggerusan daun muda secara lumat. Hal ini karena daun Pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) tergolong lunak sehingga proses pengeluaran DNA dari dinding sel dapat dengan mudah tanpa harus memerlukan

penggerusan yang lumat. Konsentrasi DNA dari sampel DNA S3<sub>50</sub> 750 ng/μl lebih rendah dari sampel DNA S3<sub>100</sub> 820 ng/μl karena perbedaan jumlah *buffer* TE yang ditambahkan sewaktu *pellet* DNA sudah keringangin. Hasil uji kuantitas DNA dengan kemurnian yang baik sesuai standar untuk analisis molekuler yaitu dengan rasio ± 1,8-2,0 (Fan dan Xueqin 2009, Mazo et al. 2012, Sheeja et al. 2008, Tenriulo 2001, Niu et al. 2008, Minarsih et al. 2011, Widyasari et al. 2008, Amani et al. 2011, Shahzadi et al. 2010, Padmalatha dan Prasad 2006, Majumder et al. 2011, Dhakshanamoorthy dan Selvaraj 2009). Seperti hasil uji kuantitatif DNA yang didapatkan oleh Syafarruddin dan Santoso (2011) (Tabel 2.).

Tabel 2. Hasil Pengecekan Kuantitas DNA Kemiri Sunan Menggunakan Spektrofotometer

| Sampel   | Rasio Kemurnian DNA | Konsentrasi DNA |
|----------|---------------------|-----------------|
| Sampel 1 | 1,80                | 3.863,31 ng/μl  |
| Sampel 2 | 1,81                | 4.546,55 ng/μl  |
| Sampel 3 | 1,86                | 2.823,42 ng/μl  |
| Sampel 4 | 1,79                | 2.562,01 ng/μl  |
| Sampel 5 | 1,80                | 5.031,39 ng/μl  |
| Sampel 6 | 1,92                | 668,80 ng/μl    |

Hasil pengecekan kualitas dan kuantitas dengan spektrofotometer menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh dari sampel-sampel kemiri sunan memiliki kualitas dan kuantitas DNA yang baik. Konsentrasi DNA yang diperoleh mempunyai kisaran antara 668,80-5.031,39 ng/ul. Jumlah DNA ini relatif cukup banyak dan dapat digunakan untuk analisis molekuler lebih lanjut. Sementara itu, rasio kemurnian DNA yang diperoleh juga berada pada kisaran angka dimana DNA dikatakan murni yaitu antara 1,8-1,9. Seperti dijelaskan dalam Sambrook et al. (1989) bahwa DNA dikatakan murni apabila mempunyai angka A260/A280 dalam kisaran 1,8-2,0. Pada teknik ekstraksi kemiri sunan digunakan fenol-kloroform yang berfungsi sebagai pendenaturasi protein. Sedangkan DNA dan RNA tidak terdenaturasi karena molekul ini tidak larut di dalam pelarut organik seperti fenol-kloroform. Selanjutnya dilakukan presipitasi DNA dengan menggunakan etanol yang berfungsi sebagai penghilang fenol-kloroform. Apabila fenol-kloroform masih berada di dalam sampel maka ada kemungkinan akan menghambat kerja enzim-enzim restriksi atau enzim lain yang digunakan untuk

analisis molekuler. Proses penggerusan atau homogenasi daun muda sampel tidak menggunakan nitrogen cair, tetapi cukup ditambahkan 0,5 ml buffer ekstraksi CTAB yang mempunyai fungsi untuk melisiskan membran sel dan membran fosfolipid bilayer (Syafaruddin dan Santoso 2011).

Selain itu, Perbedaan antara hasil uji kuantitas yang meliputi rasio kemurnian DNA dan konsentrasi DNA pada tumbuhan Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) dengan Kemiri Sunan (*Reutealis trisperma* (Blanco) Airy Shaw) dikarenakan pada proses ekstraksi daun Kemiri Sunan dilakukan penambahan 2% polivinilpolipirolidon (PVPP) dan setelah mendapatkan *pellet* DNA yang dilarutkan dengan buffer TE kemudian menambahkan 1  $\mu$ L RNase A (10 mg/mL) kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit sampai 1 jam. Sehingga rasio kemurnian DNA dan konsentrasi DNA Kemiri Sunan lebih bagus hasilnya bila dibandingkan dengan rasio kemurnian DNA dan konsentrasi DNA pada Pule Pandak. Karena Proses pengekstrasian daun Pule Pandak menggunakan buffer ekstraksi yang salah satu campurannya hanya menggunakan mercapthoetanol saja tidak menggunakan polivinilpolipirolidon (PVPP) dan setelah mendapatkan *pellet* DNA dan melarutkan dengan buffer TE tetapi tidak menggunakan 1  $\mu$ L RNase A (10 mg/mL). Hal ini yang menjadikan sampel DNA Pule Pandak yang didapatkan dengan nilai rasio seperti pada Tabel 1. kurang dari rasio standar yaitu 1,8-2,0. Konsentrasi DNA pada Kemiri Sunan lebih tinggi daripada pule pandak karena rasio kemurnian DNA Kemiri Sunan yang diperoleh menunjukkan DNA dengan kemurniaan yang sesuai standar.

Salah satu faktor yang mempengaruhi konsentrasi DNA yaitu pemilihan jaringan daun yang digunakan untuk isolasi DNA juga berpengaruh terhadap jumlah DNA yang didapatkan. Pada umumnya daun muda cenderung digunakan dalam ekstraksi DNA karena kemudahannya dalam mendapatkan DNA dengan kuantitas yang tinggi. Daun muda memiliki aktifitas pembelahan yang tinggi. Pada proses pembelahan, DNA akan mengalami replikasi, sehingga jumlah DNA akan mengganda, dengan demikian konsentrasi DNA yang ada pada daun muda relatif tinggi.

Tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) merupakan tanaman khasiat obat yang memiliki kandungan metabolit sekunder salah satunya alkaloid. Pada proses isolasi DNA tanaman seringkali terkontaminasi oleh polisakarida dan metabolit sekunder lainnya seperti tanin, pigmen, alkaloid dan flavonoid yang dapat mengganggu proses analisis molekuler. Keberadaan polisakarida dan senyawa metabolit sekunder dalam sel tanaman sering menyulitkan dalam isolasi asam nukleat. Struktur polisakarida yang mirip dengan asam nukleat menyebabkan polisakarida dapat mengendap bersama asam nukleat. Adanya kandungan polifenol dan metabolit sekunder lain seperti tannin, terpen dapat menurunkan kemurniaan DNA dan menghambat menempelnya primer (Padmalatha dan Prasad 2006).

#### **B. Uji Kualitatif DNA Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.)**

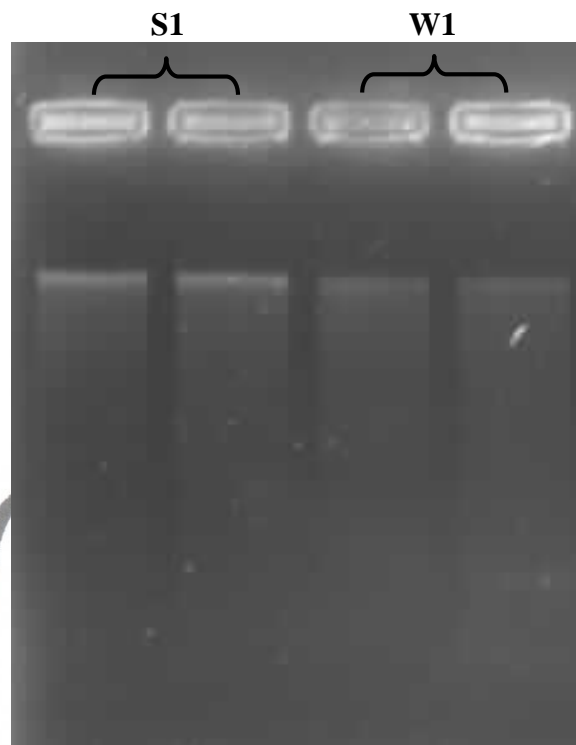
Uji kualitatif DNA dilakukan dengan teknik elektroforesis dari hasil isolasi DNA. Metode elektroforesis merupakan teknik yang dapat digunakan untuk menggambarkan pergerakan molekul-molekul bermuatan dalam medan listrik ke arah elektroda dengan muatan berlawanan atau teknik yang didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyangga di bawah pengaruh medan listrik. Media yang umum digunakan dalam elektroforesis adalah gel agarosa, suatu polisakarida yang diekstraksi dari berbagai jenis ganggang merah. Elektroforesis gel agaros digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 bp dan dijalankan secara horizontal.

Proses elektroforesis pada sampel molekul DNA ditempatkan ke dalam sumur (*well*) pada gel yang ditempatkan di dalam larutan penyangga, kemudian dialirkan listrik dengan kutub yang terpisah satu sisi dengan sisi lainnya. Molekul-molekul sampel tersebut akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai dengan muatannya. Dalam hal DNA, arah pergerakan adalah menuju elektroda positif, disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya. Setelah proses elektroforesis selesai, dilakukan proses pewarnaan agar molekul sampel yang telah terpisah dapat dideteksi. Dalam penelitian ini menggunakan *Etidium bromida* (EtBr) sebagai zat pewarnanya.

EtBr akan berinteraksi dengan basa dari molekul DNA dan akan memberikan warna orange fluoresance yang dapat dilihat di bawah sinar ultraviolet. Ketika dilihat di bawah sinar ultraviolet akan terlihat pita-pita (*band*) pada lajur-lajur yang berbeda pada gel, satu lajur merupakan arah pergerakan sampel dari sumur gel. Pita-pita yang berjarak sama dari sumur gel pada akhir elektroforesis mengandung molekul-molekul yang bergerak di dalam gel selama elektroforesis dengan kecepatan yang sama, yang berarti bahwa molekul-molekul tersebut berukuran sama.

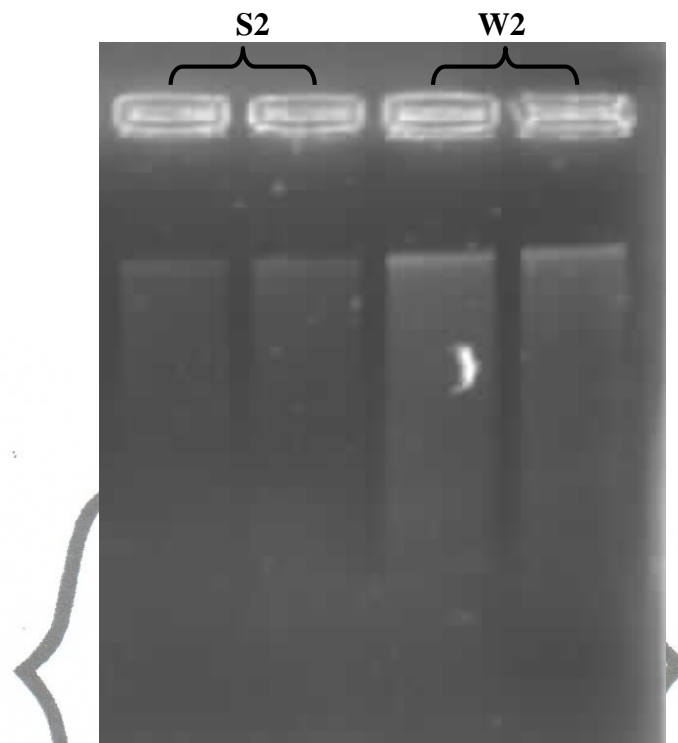
Penelitian uji kualitatif DNA dari hasil isolasi DNA tumbuhan Pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) dilakukan dengan elektroforesis gel. Sampel DNA yang digunakan mendapat perlakuan yang berbeda pada saat ekstraksi jaringan yang digunakan yaitu penggerusan dengan level yang berbeda. Penggerusan jaringan daun sampai lumat dan agak lumat. Hasil isolasi DNA dengan penggerusan lumat dilakukan pada jaringan daun tumbuhan Pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) yang berasal dari Saradan dan Wonogiri dengan kode S1 dan W1 yang digerus (ditumbuk) sampai lumat, sedangkan kode S2 dan W2 mendapat perlakuan saat ekstraksi dengan penggerusan agak lumat. Kode S3<sub>50</sub> dan S3<sub>100</sub> merupakan sampel DNA asal Saradan dengan jumlah pelarut yang berbeda yaitu penambahan buffer 50  $\mu$ l dan 100  $\mu$ l. Dari ketiga perlakuan ini ternyata menunjukkan visual pita DNA dengan ketebalan yang berbeda. Hasil uji kualitatif DNA pada sampel DNA Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) berasal dari Saradan dan Wonogiri (Gambar1, 2, dan 3).





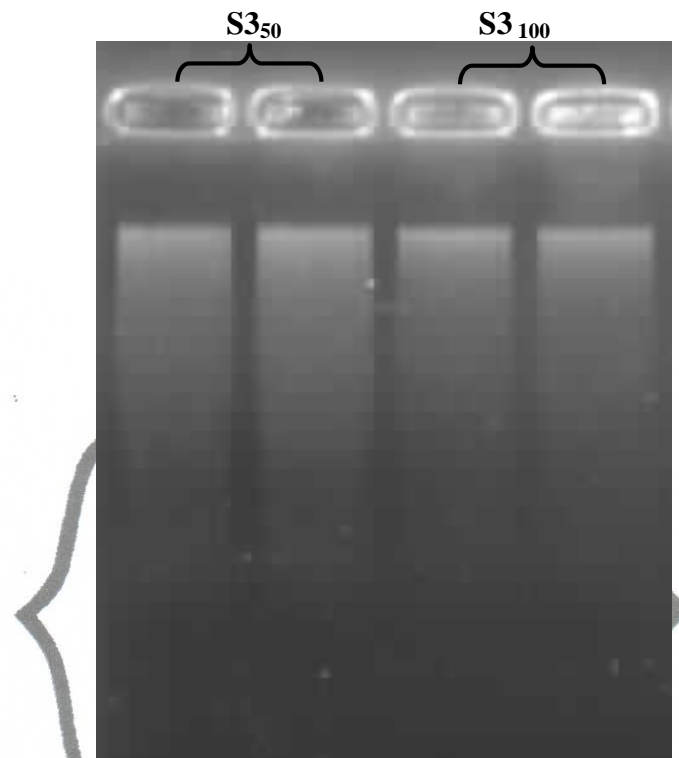
Gambar 1. Uji Kualitatif DNA pada Sampel DNA Tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) Asal Saradan dan Wonogiri dengan Ekstraksi Lumat

Visualisasi pita DNA asal Saradan (S1) dan Wonogiri (W1) terdapat DNA yang utuh tetapi yang terlihat jelas adalah S1. Hal ini dikarenakan konsentrasi pada sampel S1 lebih tinggi terbukti pada uji kuantitatif yaitu 810 ng/ $\mu$ l, sedangkan sampel W1 770 ng/ $\mu$ l. Konsentrasi yang tinggi akan terlihat pada visualisasi pita DNA yang lebih jelas. Berarti jumlah DNA yang terkandung dalam sampel DNA S1 lebih banyak daripada sampel DNA W1 saat dilakukan uji kualitatif dengan elektroforesis gel tipe horizontal. Diduga jumlah kandungan air lebih tinggi pada daun S1 seberat 1 gram yang diekstraksi dan metabolit sekunder lebih rendah sehingga jumlah DNA yang didapatkan lebih banyak bila dibandingkan dengan sampel DNA W1. Kenampakan visual pita DNA menggambarkan kemurnian DNA yang dihasilkan dari proses isolasi DNA.



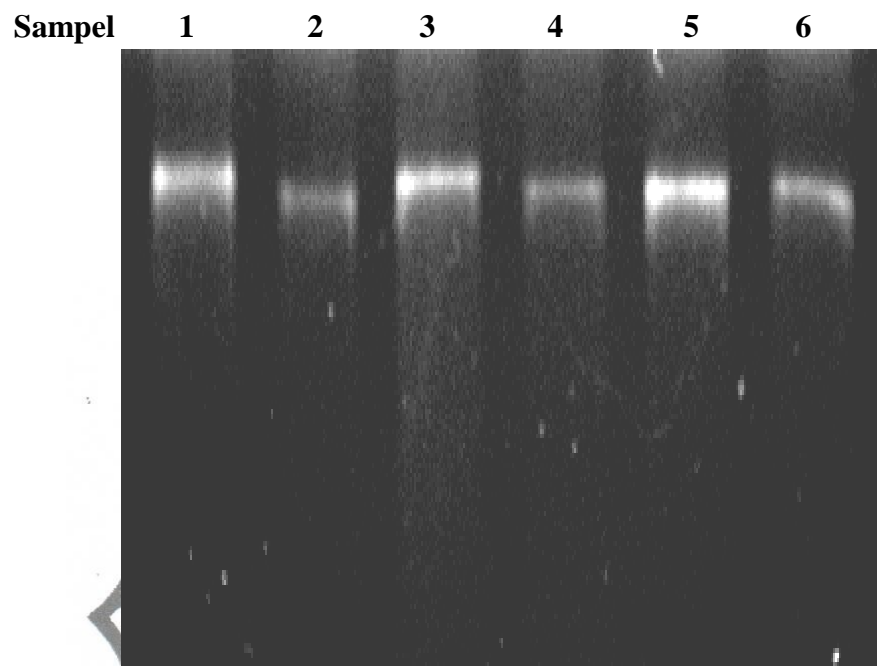
Gambar 2. Uji Kualitatif DNA pada Sampel DNA Tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) Asal Saradan dan Wonogiri dengan Ekstraksi Agak Lumat

Gambar 2. didapat hasil visual pita DNA dari sampel DNA asal Saradan (S2) dan Wonogiri (W2) terdapat DNA yang utuh sama pada Gambar 1. tetapi yang membedakan adalah pita DNA dari sampel Wonogiri (W2) lebih jelas bila dibanding dengan pita DNA dari sampel Saradan (S2), karena konsentrasi DNA pada sampel DNA W2 lebih tinggi terbukti dengan uji kuantitatif DNA yaitu 970 ng/ $\mu$ l. Perlakuan penggerusan sampel daun S2 yang ditumbuk agak lumat memberikan hasil DNA yang sedikit bila dibanding dengan W2 karena proses pemecahan dinding sel daun belum sempurna sehingga larutan *buffer* ekstraksi yang ditambahkan pada saat proses ekstraksi tidak dapat menarik DNA secara maksimal dan kerja enzim dalam daun belum aktif. Kemungkinan dinding sel daun asal Saradan (S2) lebih keras bila dibandingkan dengan dinding sel daun asal Wonogiri (W2).



Gambar 3. Uji Kualitatif DNA pada Sampel DNA Tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) Asal Saradan dengan Buffer TE 50  $\mu$ l dan 100  $\mu$ l

Gambar 3. menunjukkan hasil visual pita DNA dari proses elektroforesis dengan sampel DNA asal Saradan (S3), yang membedakan ialah penambahan *buffer* TE sebanyak 50  $\mu$ l dan 100  $\mu$ l. Namun, DNA yang terlihat dari kedua sampel sama utuhnya tetapi berbeda konsentrasinya. Berdasarkan Tabel 1. S3<sub>50</sub> dengan penambahan *buffer* TE 50  $\mu$ l menghasilkan konsentrasi 750 ng/ $\mu$ l dan S3<sub>100</sub> dengan penambahan *buffer* TE 100  $\mu$ l menghasilkan konsentrasi 820 ng/ $\mu$ l. Untuk membandingkan uji kualitatif DNA tanaman Pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) (Gambar 1, 2, dan 3) dengan uji kualitatif DNA pada tanaman Kemiri Sunan (*Reutealis trisperma* (Blanco) Airy Shaw) (Gambar 4).



Gambar 4. Hasil Pengecekan Kualitas DNA Sampel Kemiri Sunan dengan Gel Elektroforesis 1%.

Hasil pengecekan kualitas DNA dengan menggunakan gel elektroforesis 1% juga menunjukkan hasil yang cukup memuaskan dimana DNA yang diperoleh terlihat utuh (Gambar 4). DNA yang utuh ditandai dengan tidak adanya smear DNA yang dielektroforesis. Hal ini menjadi penting karena pada proses analisis molekuler lebih lanjut, DNA yang masih utuh akan lebih memberikan hasil yang relatif lebih akurat. DNA yang diisolasi dari tanaman seringkali terkontaminasi oleh polisakarida dan metabolit sekunder seperti tanin, pigmen, alkaloid dan flavonoid, sehingga diperlukan cara untuk menghindari hal di atas. Teknik yang digunakan dalam percobaan ekstraksi kemiri sunan adalah kombinasi penambahan antioksidan polivinilpolipirolidon (PVPP) dan mercaptoethanol pada buffer ekstraksinya. Dengan kombinasi ini dihasilkan kualitas DNA yang baik. PVP dan mercaptoethanol akan mereduksi senyawa-senyawa fenolik yang keberadaannya dapat merusak kualitas DNA. Penggerusan secara langsung sampel segar tanpa penyimpanan selama semalam dan tanpa penggunaan nitrogen cair (yang diketahui sangat membantu untuk menghancurkan jaringan dan melindungi DNA dari degradasi oleh enzim DNase) tetapi hasil yang diperoleh sangat memuaskan

yang ditandai dengan kualitas DNA yang utuh dan murni dilihat dari nilai rasio A260/A280 (Tabel 2. dan Gambar 4.). Hasil visualisasi sampel DNA kemiri sunan hasil elektroforesis terlihat sangat jelas bila dibandingkan hasil visualisasi sampel DNA Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) pada Gambar 1, 2, dan 3. Hal ini berhubungan dengan konsentrasi DNA Kemiri Sunan (*Reutealis trisperma* (Blanco) Airy Shaw ) lebih tinggi (Tabel 2.) daripada konsentrasi DNA pule pandak (Tabel 1.). Dalam visualisasi sampel DNA Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) dari hasil elektroforesis dapat di lihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji Kualitatif DNA pada Sampel DNA Tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) dengan Elektroforesis

| Sampel DNA  | Visualisasi DNA |
|---|-----------------|
| Saradan (S1, S2, S3 <sub>50</sub> , S3 <sub>100</sub> ) | Ada             |
| Wonogiri (W1, W2)                                       | Ada             |

Keterangan : S1 dan W1= sampel DNA dengan pengekstraksian lumut, S2 dan W2= sampel DNA dengan pengekstraksian agak lumut, S3<sub>50</sub>= pellet DNA+50 µl TE, S3<sub>100</sub>= pellet DNA+ 100 µl TE

Semua sampel DNA tumbuhan Pule pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) yang diuji kualitatif dengan elektroforesis menunjukkan terdapat DNA. Dengan adanya DNA hasil elektroforesis yang tervisual dengan alat Gel-doc maka DNA dapat digunakan sebagai materi untuk analisis molekuler lebih lanjut. Selain itu, untuk mengetahui kemurnian DNA dapat dilakukan dengan pematangan DNA menggunakan enzim restriksi. Enzim restriksi yang biasa digunakan ialah EcoR1 (Herison 2003).

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. Kesimpulan

1. Uji kuantitatif DNA dengan spektrofotometri  $\lambda$  260 nm dan  $\lambda$  280 nm pada sampel DNA tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) asal Saradan dan Wonogiri mempunyai rasio kurang dari 1,8. Standar rasio DNA 1,8-2,0.
2. Konsentrasi DNA dari sampel S1 810 ng/ $\mu$ l, W1 770 ng/ $\mu$ l, S2 840 ng/ $\mu$ l, W2 970 ng/ $\mu$ l, S3<sub>50</sub> 750 ng/ $\mu$ l, dan S3<sub>100</sub> 820 ng/ $\mu$ l.
3. Uji kualitatif DNA dengan elektroforesis horizontal pada semua sampel DNA dari tanaman Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* L.) asal Saradan dan Wonogiri menunjukkan bahwa terdapat DNA.

### B. Saran

Sebaiknya dilakukan pemurniaan DNA lebih lanjut (dengan RNAase, pemekatan dengan etanol) agar mendapatkan DNA utuh yang digunakan untuk analisis molekuler selanjutnya.