

Identifikasi Simplisia yang Dijual sebagai *Strychnos ligustrina* Bl. di Pasar Tradisional Surabaya dengan Metode *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)

Oeke Yunita, Angelica Kresnamurti

Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

* email: oeke@mail.wima.ac.id, angelica@mail.wima.ac.id

ABSTRACT

Authentication of Strychnos ligustrina Bl. had been performed at molecular level (DNA) with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method, based on the amplification of random DNA fragments by Polymerase Chain Reaction (PCR) with a single arbitrary primer. The aim of this research was obtaining similar banding patterns between DNA of plant Strychnos ligustrina Bl. and DNA of its lignum on local market. Strychnos ligustrina Bl. was determined by UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi and plants sold as Strychnos ligustrina Bl. were collected as lignum from traditional market at Wonokromo, Rungkut, Genteng, Benowo dan Pabean. DNA from these plants were extracted by modified Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method and amplified by RAPD method. Amplification had been performed by primer OPO-4 had shown banding patterns on the gel electrophoresis which banding patterns were shown by Strychnos ligustrina Bl. and plants sold as Strychnos ligustrina Bl. on Benowo. Based on this early result, we assume that plants sold as Strychnos ligustrina Bl. on Benowo has closely genetic relationship with Strychnos ligustrina Bl.

Key words: authentication, PCR, RAPD method, *Strychnos ligustrina Bl*

PENGANTAR

Strychnos ligustrina Bl. (*Strychnos lucida* R Brown) adalah tanaman dari suku Loganiaceae, dengan nama daerah bidara laut (umum), dara laut, dara putih (Jawa), kayu ular (Sumatra, Timor) (Tanaman Obat Indonesia jilid II, 1985; de Padua *et al.*, 1999).

Tanaman *Strychnos ligustrina*, dengan ketinggian hingga 12 meter, lebih banyak dijumpai di hutan-hutan primer (jauh dari pemukiman) (Roemantyo, 1994). Batang dan akar dari tanaman ini digunakan dalam pengobatan tradisional di Indonesia untuk mengobati demam, gigitan ular, luka, dan eksim. Batang tanaman ini juga digunakan dalam komponen jamu pengatur haid. Akar tanaman dapat digunakan untuk mengobati diabetes sedangkan daun dan buahnya digunakan sebagai racun ikan di Australia (Praswanto *et al.*, 1996; Rahayu dan Walujo, 1996; de Padua *et al.*, 1999). Adanya manfaat tanaman ini sebagai obat tradisional di masyarakat dengan ketersediaan tanaman yang terbatas di kalangan masyarakat, dapat menimbulkan adanya upaya penggantian (substitusi) tanaman ini dengan tanaman lain.

Upaya yang dilakukan untuk membuktikan keaslian tanaman (*authentication*) yang digunakan sebagai obat tradisional adalah dengan pengujian secara morfologi dan anatomi, pengujian kandungan kimia dengan teknik kromatografi, serta pengujian persamaan atau perbedaan genetik dengan menggunakan penanda molekuler DNA (Hon *et al.*, 2003).

Berdasarkan hasil pengujian karakteristik makroskopis dan mikroskopis tanaman yang dijual sebagai tanaman *Strychnos ligustrina* di beberapa pasar tradisional yang berada di wilayah kota Surabaya, simplisia tanaman yang dijual berupa simplisia kayu (*lignum*), yang sulit dibedakan secara morfologi dengan tanaman *Strychnos ligustrina* yang sesungguhnya (Yunita dan Kresnamurti, 2004).

Salah satu upaya untuk mengidentifikasi tanaman yang sulit dibedakan berdasarkan ciri morfologisnya adalah dengan melakukan deteksi pada tingkat molekuler yang menggunakan beberapa metode, misalnya *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Cheng *et al.*, 1998^a; 1998^b; 1998^c).

Metode RAPD, yang merupakan salah satu modifikasi dari teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dapat mendeteksi perbedaan genetik dari berbagai jenis varietas tanaman, misalnya pada anggur (Kim *et al.*, 2002) serta dapat mendeteksi keaslian suatu tanaman misalnya pada *Panax ginseng* dengan beberapa jenis tanaman penggantinya (Cheng *et al.*, 1998^c).

Dalam penelitian ini akan dilakukan identifikasi simplisia tanaman sampel yang dijual sebagai tanaman *Strychnos ligustrina* di pasar-pasar tradisional Surabaya dengan menggunakan metode RAPD.

Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi ada tidaknya pola larik DNA yang sama antara tanaman *Strychnos ligustrina* dan simplisia tanaman sampel dan dalam penelitian selanjutnya dapat digunakan

untuk mengambil kesimpulan ada tidaknya persamaan jenis antara tanaman *Strychnos ligustrina* dan simplisia tanaman sampel.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut: tanaman *Strychnos ligustrina* diperoleh dari UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, sedangkan simplisia tanaman sampel yang dijual sebagai tanaman *Strychnos ligustrina* diperoleh dari beberapa pasar tradisional di wilayah Kota Surabaya. Primer-primer RAPD (OPO-1, OPO-2, OPO-3, OPO-4, OPO-6, OPO-7, OPO-8, OPO-9, OPO-14, OPO-15), pereaksi/bahan kimia untuk identifikasi mikroskopis (air, kloralhidrat, fluoroglusin HCl), *dry ice*, CTAB (*Cetyltrimethylammonium Bromide*), EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*), PVP (*Polivinyl Pyrolidon*), IAA (Isoamilasetat), Isopropanol, Na asetat, etanol absolut, 2-merkaptotanol, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Master mix Promega (Taq DNA Polimerase 50 unit/ml; dATP, dGTP, dCTP, dTTP masing-masing 400 ml; MgCl₂ 3mM), NaCl, TE (Tris HCl-EDTA), TBE (Tris Basa, Asam Borat, EDTA) *buffer*, *ethidium bromide*, kloroform, fenol, NaOH, indikator universal.

Alat penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut: elektroforesis, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), *sentrifuge*, desikator, oven, inkubator, *freezer* -20 °C, *staining chamber*, *autoclave*, spektrofotometer, mikroskop foto, vorteks.

Pengambilan Sampel Tanaman

Pengambilan simplisia tanaman sampel yang dijual sebagai tanaman *Strychnos ligustrina* (untuk selanjutnya disebut sebagai simplisia tanaman sampel) dilakukan di pasar-pasar tradisional di lima wilayah kota Surabaya (wilayah Surabaya Timur: Pasar Rungkut, wilayah Surabaya Selatan: Pasar Wonokromo, wilayah Surabaya Pusat: Pasar Genteng, wilayah Surabaya Barat: Pasar Benowo dan wilayah Surabaya Utara: Pasar Pabean). Pengambilan sampel dalam satu pasar dibatasi maksimal dari 3 penjual simplisia tanaman yang mendapatkan bahan tanaman dari daerah yang berbeda.

Dari kelima pasar tersebut diperoleh 9 simplisia dengan kode sebagai berikut: P1 (toko ke-1 di Pasar Pabean), P2 (toko ke-2 di Pasar Pabean), P3 (toko ke-3 di Pasar Pabean), W1 (toko ke-1 di Pasar Wonokromo), W2 (toko ke-2 di Pasar Wonokromo), W3 (toko ke-3 di Pasar Wonokromo), R (Pasar Rungkut), G (Pasar Genteng), B (Pasar Benowo).

Determinasi dan Identifikasi Tanaman

Tanaman *Strychnos ligustrina* yang diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, berupa daun dan batang tanaman.

Pengujian karakteristik makroskopis tanaman dilakukan dengan mengamati warna dan tekstur permukaan batang.

Simplisia tanaman sampel yang dijual sebagai *Strychnos ligustrina* di beberapa pasar tradisional, berupa simplisia kayu (*lignum*). Pengujian karakteristik makroskopis dilakukan dengan mengamati warna simplisia, ukuran dan tekstur permukaan simplisia.

Pengujian karakteristik mikroskopis terhadap tanaman *Strychnos ligustrina* yang berasal dari Kebun Raya Purwodadi, dilakukan dengan mengamati melalui mikroskop irisan melintang batang tanaman dalam medium air dengan pereaksi fluoroglusin HCl.

Karakteristik mikroskopis simplisia tanaman sampel yang dijual sebagai tanaman *Strychnos ligustrina* diuji dengan melakukan pengamatan terhadap serbuk dari simplisia melalui mikroskop dalam medium kloralhidrat dan pereaksi fluoroglusin HCl.

Ekstraksi DNA Tanaman

Deoxyribonucleid acid (DNA) dari daun tanaman *Strychnos ligustrina* serta DNA simplisia kayu (*lignum*) tanaman sampel, diekstraksi dengan metode CTAB yang dimodifikasi dengan cara sebagai berikut: serbuk halus daun atau serbuk *lignum*, yang telah ditambah dengan *buffer* isolasi CTAB dan 2-merkaptotanol, diinkubasi pada *water bath* 65 °C. Selanjutnya ditambahkan campuran kloroform dan IAA dan disentrifugasi pada 12.000 rpm sehingga menghasilkan tiga fasa. Fasa atas yang encer ditambahkan lagi dengan campuran kloroform dan IAA dan disentrifugasi pada 12.000 rpm. Setelah itu ditambahkan isopropanol untuk mengendapkan DNA. Setelah disimpan dalam pendingin (suhu -20 °C) campuran disentrifugasi 10.000 rpm sehingga menghasilkan *pellet* DNA. *Pellet* DNA direhidrasi dengan TE, ditambah dengan Natrium asetat dan etanol absolut dingin, serta dicuci dengan etanol 80% dan disentrifugasi pada 11.000 rpm. *Pellet* DNA dikeringkan dan dilarutkan dalam TE. Fragmen DNA hasil isolasi, dianalisis konsentrasinya dengan spektrofotometri serta kemurniannya dengan spektrofotometri dan elektroforesis (Angraeni, 1998; Taufik, 1999).

Amplifikasi fragmen DNA tanaman

Fragmen DNA tanaman *Strychnos ligustrina* dan DNA simplisia tanaman sampel diamplifikasi dengan metode PCR (komponen PCR: PCR mix, primer RAPD) dengan suhu *annealing* 35 °C selama 45 siklus amplifikasi (Angraeni, 1998; Taufik, 1999). Amplifikasi fragmen DNA tanaman dilakukan dengan menggunakan primer-primer RAPD.

Analisis hasil PCR

Analisis hasil PCR dengan metode elektroforesis '*submarine*' menggunakan gel agarosa 1,4% dan TBE 0,5×

sebagai *running buffer*. Hasil elektroforesis diwarnai dengan *ethidium bromide*, selanjutnya pita DNA diamati di bawah UV 1312 nm. Kemudian dilakukan identifikasi ada tidaknya pola larik DNA yang sama antara tanaman *Strychnos ligustrina* dan simplisia tanaman sampel.

HASIL

Hasil Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis Tanaman

Tanaman-tanaman yang dijual sebagai tanaman *Strychnos ligustrina* di beberapa pasar tradisional Surabaya, pada umumnya dijual dalam bentuk simplisia kayu (*lignum*), dengan harga relatif murah antara lima ratus hingga seribu rupiah per ons. Perbedaan karakteristik pada umumnya berdasarkan warna serta tekstur dari permukaan simplisia, seperti pada tabel 1.

Hasil Ekstraksi DNA Tanaman dan DNA Simplisia

DNA tanaman dan simplisia yang telah diekstraksi dengan metode CTAB yang telah dimodifikasi, selanjutnya diperhitungkan konsentrasi dan kemurniannya berdasarkan harga serapan pada spektrofotometer (Tabel 2).

Tabel 1. Hasil pengamatan makroskopis simplisia tanaman yang dijual sebagai Tanaman *Strychnos ligustrina* di Beberapa Pasar Tradisional Surabaya

| Kode | Daerah Asal | Warna Simplisia | Profil Simplisia |
|------|-------------------|-----------------|--------------------------------------|
| P1 | Jember | Coklat tua | tebal dan lebar, permukaan kasar |
| P2 | Banyuwangi | Coklat muda | tipis, permukaan halus |
| P3 | Jember-Banyuwangi | Coklat muda | tipis, permukaan agak kasar |
| B | Pasar Pabean | Coklat muda | tipis, permukaan halus |
| R | Solo | Coklat muda | tebal, permukaan halus |
| G | ---- * ---- | Coklat muda | tipis, permukaan agak kasar |
| W1 | Pasar Pabean | Coklat tua | tebal, rapuh, permukaan sangat kasar |
| W2 | Yogyakarta | Coklat | tipis, permukaan halus |
| W3 | Caruban | Coklat tua | tebal, rapuh, permukaan kasar |

Keterangan:

* : tidak diketahui asalnya

P1, P2, P3 = toko 1, toko 2 dan toko 3 di lokasi Pasar Pabean

B = toko di lokasi Pasar Benowo

R = toko di lokasi Pasar Rungkut

G = toko di lokasi Pasar Genteng

W1, W2, W3 = toko 1, toko 2 dan toko 3 di lokasi Pasar Wonokromo

Tabel 2. Hasil ekstraksi dna tanaman *Strychnos ligustrina* dan simplisia tanaman sampel yang digunakan untuk elektroforesis dan PCR

| Kode Sampel | λ nm | Serapan | Konsentrasi DNA (ng/ μ l) | Kemurnian |
|-------------|--------------|---------|-------------------------------|-----------|
| S.L | 260 | 0,130 | 262,5 | 1,0318 |
| | 280 | 0,126 | | |
| | 320 | 0,115 | | |
| P1 | 260 | 0,166 | 840 | 1,1067 |
| | 280 | 0,150 | | |
| | 320 | 0,118 | | |
| P2 | 260 | 0,100 | 140 | 1,0417 |
| | 280 | 0,096 | | |
| | 320 | 0,092 | | |
| P3 | 260 | 0,089 | 105 | 1,0349 |
| | 280 | 0,086 | | |
| | 320 | 0,083 | | |
| R | 260 | 0,126 | 350 | 1,0328 |
| | 280 | 0,122 | | |
| | 320 | 0,106 | | |
| G | 260 | 0,105 | 140 | 1,0294 |
| | 280 | 0,102 | | |
| | 320 | 0,097 | | |
| B | 260 | 0,118 | 227,5 | 1,0535 |
| | 280 | 0,112 | | |
| | 320 | 0,105 | | |
| W1 | 260 | 0,105 | 157,5 | 1,0294 |
| | 280 | 0,102 | | |
| | 320 | 0,096 | | |
| W2 | 260 | 0,133 | 227,5 | 1,0310 |
| | 280 | 0,129 | | |
| | 320 | 0,120 | | |
| W3 | 260 | 0,135 | 175 | 1,0227 |
| | 280 | 0,132 | | |
| | 320 | 0,125 | | |

Keterangan:

S.L. = Tanaman *Strychnos ligustrina*

P1, P2, P3 = Simplisia Tanaman sampel dari toko 1, toko 2, dan toko 3 di lokasi Pasar Pabean

B = Simplisia Tanaman sampel dari toko di lokasi Pasar Benowo

R = Simplisia Tanaman sampel dari toko di lokasi Pasar Rungkut

G = Simplisia Tanaman sampel dari toko di lokasi Pasar Genteng

W1, W2, W3 = Simplisia Tanaman sampel dari toko 1, toko 2, dan toko 3 di lokasi Pasar Wonokromo

Hasil Pengujian Kemurnian DNA dengan Elektroforesis

Harga kemurnian DNA hasil ekstraksi tersebut digunakan untuk memperhitungkan volume DNA yang akan dipakai untuk pengujian kemurnian DNA dengan metode elektroforesis serta volume DNA yang akan dipakai dalam proses amplifikasi dengan PCR.

Perhitungan volume DNA tersebut, berdasarkan rumus sebagai berikut:

* Volume DNA untuk elektroforesis (ml)

$\frac{\text{Kemurnian DNA untuk PCR } (=1,8)}{\text{Kemurnian DNA hasil ekstraksi}} \times \text{Volume DNA hasil ekstraksi } (\mu\text{l})$
 (Konsentrasi DNA yang diperlukan untuk PCR = 400 – 800 ng/ml)

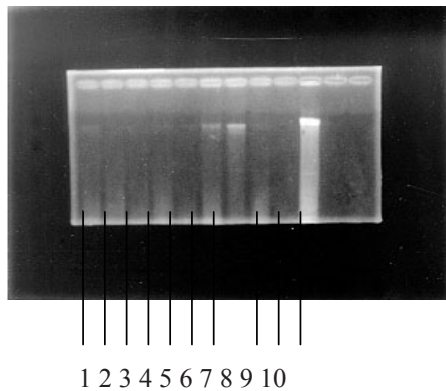
* Volume DNA untuk PCR (ml) = 0,5 × Volume DNA untuk elektroforesis (ml)

Tabel 3. Volume DNA yang Digunakan dalam Metode Elektroforesis dan PCR

| Kode Sampel | Konsentrasi DNA (ng/μl) | Kemurnian | Volume DNA untuk ELP (μl) | Volume DNA untuk PCR (μl) |
|-------------|-------------------------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| S.L | 262,5 | 1,0318 | 6 | 3 |
| P1 | 840 | 1,1067 | 2 | 1 |
| P2 | 140 | 1,0417 | 12 | 6 |
| P3 | 122,5 | 1,0337 | 13 | 6,5 |
| R | 350 | 1,0328 | 5 | 2,5 |
| G | 140 | 1,0294 | 12 | 5,7 |
| B | 227,5 | 1,0535 | 7 | 3,5 |
| W1 | 157,5 | 1,0294 | 10 | 5,1 |
| W2 | 122,5 | 1,0440 | 13 | 6,5 |
| W3 | 175 | 1,0227 | 10 | 4,6 |

Keterangan:

- ELP = Elektroforesis
- PCR = Polymerase Chain Reaction
- S.L. = Tanaman *Strychnos ligustrina*
- P1, P2, P3 = Simplisia tanaman sampel dari toko 1, toko 2, dan toko 3 di lokasi Pasar Pabean
- B = Simplisia tanaman sampel dari toko di lokasi Pasar Benowo
- R = Simplisia tanaman sampel dari toko di lokasi Pasar Rungkut
- G = Simplisia tanaman sampel dari toko di lokasi Pasar Genteng
- W1, W2, W3 = Simplisia tanaman sampel dari toko 1, toko 2, dan toko 3 di lokasi Pasar Wonokromo



Keterangan :

- 1 = P1
- 2 = P2
- 3 = P3
- 4 = R
- 5 = G
- 6 = B
- 7 = W1
- 8 = W2
- 9 = W3
- 10 = SL

Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA tanaman *Strychnos ligustrina* dan DNA simplisia tanaman sampel

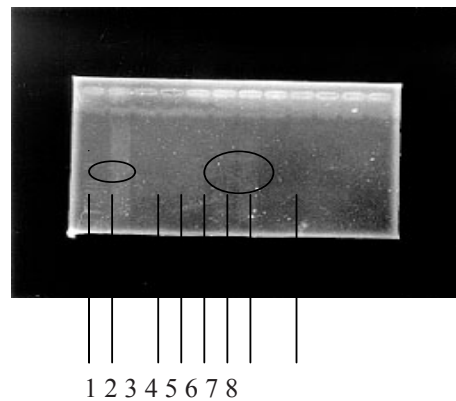
Hasil Amplifikasi DNA Tanaman *Strychnos ligustrina* dan DNA Simplisia Tanaman Sampel dengan Metode RAPD

Primer OPO-4 (5'-AAGTCCGCTC-3') dapat mengamplifikasi DNA tanaman *Strychnos ligustrina* dan DNA simplisia tanaman sampel sehingga menghasilkan

adanya perbedaan antara tanaman *Strychnos ligustrina* (kode SL) dan tanaman sampel (kode P1, R, G, B, W1, W2) (Gambar 2 dan 3).

PEMBAHASAN

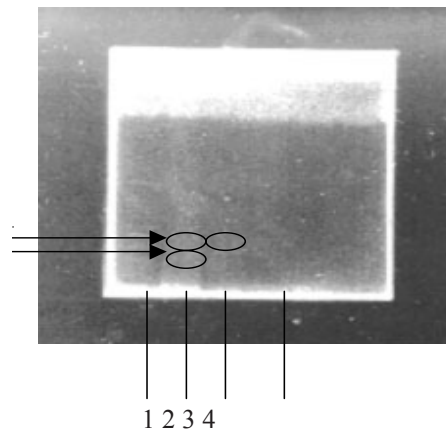
Berdasarkan hasil pengujian karakteristik secara makroskopis, batang tanaman *Strychnos ligustrina* tidak menunjukkan ciri spesifik, di mana bagian batang tanaman berduri dan daun-daunnya tebal serta berwarna hijau kecoklatan.



Keterangan:

- 1 = Marker
- 2 = SL
- 3 = P1
- 4 = R
- 5 = G
- 6 = B
- 7 = W1
- 8 = W2

Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA tanaman *Strychnos ligustrina* dan DNA simplisia tanaman sampel, hasil amplifikasi dengan primer OPO-4 (5'-AAGTCCGCTC-3') dengan suhu *annealing* 35 °C



Keterangan:

- 1 = Marker
- 2 = SL
- 3 = B
- 4 = W

Gambar 3. Hasil elektroforesis DNA tanaman *Strychnos ligustrina* dan DNA simplisia tanaman sampel, hasil amplifikasi dengan primer OPO-4 (5'-AAGTCCGCTC-3') dengan suhu *annealing* 33 °C

Karakteristik makroskopis simplisia kayu tanaman *Strychnos ligustrina* (*Strychnii Lignum*) berupa potongan kecil, serutan atau serpihan kayu dengan bentuk dan ukuran yang berbeda-beda yaitu lurus, melengkung atau terpilin, tipis atau agak tebal. Warna simplisia kuning kecoklatan, tidak berbau dan berasa pahit. Simplisia tersebut mudah dipatahkan dengan bekas patahan yang tidak rata (Materia

Medika Indonesia Jilid VI, 1995). Karakteristik simplisia tersebut serupa dengan karakteristik simplisia tanaman sampel yang diperoleh di pasar-pasar tradisional Surabaya (Tabel 1.) Secara umum, warna serta profil simplisia yang dijual di beberapa pasar tradisional di Surabaya, bervariasi serta tidak menunjukkan adanya ciri spesifik yang dapat membedakan tanaman sampel dengan tanaman *Strychnos ligustrina* atau dengan spesies *Strychnos* yang lain maupun dengan tanaman yang berbeda spesies dan genusnya.

Hasil pengamatan mikroskopis pada serbuk simplisia tiap tanaman sampel juga tidak dapat menunjukkan adanya perbedaan spesifik antarsimplisia tanaman yang dijual di beberapa pasar tradisional. Oleh karena itu, upaya substitusi tanaman *Strychnos ligustrina* dengan tanaman lain, tidak dapat dideteksi dengan melakukan pengamatan secara mikroskopis. Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis simplisia tanaman sampel secara terperinci terdapat dalam penelitian Yunita dan Kresnamurti, 2004.

Pada tahap ekstraksi DNA tanaman, seringkali sulit dilakukan pemisahan DNA dari senyawa kontaminan lain yang berada dalam sel tanaman, misalnya polisakarida dan senyawa fenolik, di mana senyawa-senyawa tersebut mampu membentuk kompleks yang tidak reversibel dengan DNA selama proses ekstraksi. Oleh karena itu DNA hasil ekstraksi perlu diuji kualitasnya untuk mengetahui apakah kualitas DNA masih cukup memadai untuk diamplifikasi dengan PCR. Kualitas DNA hasil ekstraksi sangat menentukan hasil dan reproduksibilitas proses amplifikasi dengan PCR. Analisis dengan metode RAPD membutuhkan kemurnian DNA yang memadai untuk reaksi amplifikasi dengan PCR (Weir *et al.*, 1996).

Pengukuran kualitas DNA (kemurnian DNA) hasil ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan dua cara yaitu, dengan metode spektrofotometri dan dengan metode elektroforesis (Brown, 1995; Weir *et al.*, 1996).

Penentuan kemurnian DNA hasil ekstraksi dengan spektrofotometri dilakukan dengan membandingkan harga serapan larutan DNA pada panjang gelombang 260 nm dengan harga serapan pada panjang gelombang 280 nm (Tabel 3). DNA yang murni akan ditunjukkan dengan harga perbandingan 1,8, sedangkan jika harga perbandingan di bawah 1,8 maka DNA tersebut masih terkontaminasi dengan senyawa protein atau fenol (Brown 1995, Weir *et al.*, 1996).

Berdasarkan hasil pengukuran dengan spektrofotometer pada Tabel 2, kemurnian DNA tanaman *Strychnos ligustrina* maupun pada DNA simplisia tanaman sampel, hasil ekstraksi, masih menunjukkan harga di bawah 1,8 sehingga dapat disimpulkan masih adanya kontaminasi senyawa protein maupun fenol.

Penentuan kemurnian DNA hasil ekstraksi dengan metode elektroforesis dilakukan dengan cara melakukan elektroforesis terhadap masing-masing DNA hasil PCR dari *Strychnos ligustrina* maupun simplisia tanaman sampel, dengan konsentrasi yang telah diperhitungkan berdasarkan kemurnian DNA hasil pengukuran spektrofotometer (Tabel 3). DNA yang dapat teramplifikasi dengan baik adalah DNA yang mampu menunjukkan pita dengan jelas pada hasil elektroforesis.

Hasil perhitungan kemurnian DNA *Strychnos ligustrina* maupun simplisia tanaman sampel dengan pengukuran spektrofotometer, juga dapat memperkirakan volume DNA yang digunakan untuk proses amplifikasi dengan PCR, seperti yang tercantum dalam Tabel 3.

Hasil elektroforesis pada Gambar 1 menunjukkan adanya pita-pita DNA *Strychnos ligustrina* maupun DNA simplisia tanaman sampel. Pita DNA *Strychnos ligustrina* terlihat mempunyai intensitas yang paling jelas dibandingkan pita DNA simplisia tanaman sampel. Hal tersebut diduga karena DNA *Strychnos ligustrina* diekstraksi dari bagian daun tanaman yang segar (belum dikeringkan) sehingga tidak terjadi kerusakan DNA akibat proses pengeringan selama pembuatan simplisia.

Pita DNA simplisia tanaman sampel yang menunjukkan intensitas jelas ditunjukkan oleh pita DNA simplisia tanaman sampel dengan kode B (lokasi Pasar Benowo) dan kode W1 (toko ke-1 di Pasar Wonokromo). Selanjutnya intensitas pita yang cukup jelas ditunjukkan oleh simplisia tanaman sampel kode P1 (toko ke-1 di Pasar Pabean), kode R (Pasar Rungkut), kode G (Pasar Genteng) dan kode W2 (toko ke-2 di Pasar Wonokromo). Oleh karena itu, DNA simplisia tanaman sampel yang akan diamplifikasi dengan PCR adalah DNA tanaman sampel dengan kode P1, R, G, B, W1, W2.

Setelah dilakukan amplifikasi dengan primer-primer kit RAPD, beberapa hasil amplifikasi menunjukkan tidak adanya pita yang nampak pada hasil elektroforesis. Hal ini diduga karena ketidaksesuaian primer dengan DNA *template* sehingga proses amplifikasi tidak berlangsung dengan baik (gambar tidak disertakan).

Hasil amplifikasi DNA dengan primer OPO-4 (5'-AAGTCCGCTC-3') pada Gambar 2 menunjukkan adanya pola jejak (*smear*) pada SL dan simplisia tanaman sampel kode B dan W1, di mana dengan adanya *smear* tersebut dapat diduga bahwa proses amplifikasi telah berjalan dengan baik.

Sementara itu pada beberapa simplisia tanaman sampel yaitu kode P1, R, G, W2 tidak timbul *smear*, yang menimbulkan dugaan bahwa simplisia tanaman sampel

dengan kode tersebut bukan merupakan simplisia tanaman *Strychnos ligustrina* karena tidak adanya hasil amplifikasi yang disebabkan karena ketidaksesuaian primer dengan DNA template.

Timbulnya smear pada *Strychnos ligustrina* serta simplisia tanaman sampel kode B dan W1 menimbulkan dugaan sementara bahwa ada kemiripan DNA tanaman *Strychnos ligustrina* dan DNA simplisia tanaman sampel kode B dan W1.

Selanjutnya dilakukan optimasi program siklus PCR dengan penurunan suhu *annealing* menjadi 33 °C, sehingga menghasilkan pola larik DNA seperti pada Gambar 3. Pola larik DNA simplisia tanaman sampel dengan kode B (Pasar Benowo) menyerupai pola larik DNA tanaman *Strychnos ligustrina*. Hal tersebut menimbulkan dugaan sementara bahwa simplisia tanaman sampel yang dijual di Pasar Benowo mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat dengan tanaman *Strychnos ligustrina*.

Dalam penelitian selanjutnya perlu dilakukan pencarian pola larik DNA yang spesifik dari tanaman *Strychnos ligustrina*, yang dapat berfungsi sebagai penanda molekul spesifik (*species-specific marker*) sehingga dapat digunakan sebagai pembanding untuk melakukan kontrol kualitas terhadap tanaman *Strychnos ligustrina* yang dijual di pasaran sebagai simplisia maupun sebagai komponen dalam ramuan obat tradisional.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada dr. Adrianta Surjadhana, Fakultas Farmasi, Unika Widya Mandala Surabaya, atas masukan dan perhatian yang diberikan selama penelitian ini berlangsung. Selain itu ucapan terima kasih diberikan kepada Dr. Adi Pancoro, FMIPA jurusan Biologi, Institut Teknologi Bandung (ITB) atas primer RAPD, masukan dan bimbingan yang diberikan, serta kepada Intan Taufik, S.Si., ITB dan Diah Kusumawaty, S.Si., Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung, atas saran, bantuan dan perhatian yang diberikan.

Ucapan terima kasih kepada Pimpinan dan staf Tropical Disease Center, Universitas Airlangga Surabaya, yang telah memberikan bantuan fasilitas laboratorium dan instrumen selama penelitian ini berlangsung.

Penelitian ini terselenggara dengan dukungan dana dari Widya Mandala Research Grant 2003.

KEPUSTAKAAN

Angraeni D, 1998. *Hubungan Kekerabatan Genetik Genus Mangifera dengan Analisis Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*, Skripsi Sarjana Jurusan Biologi, Institut Teknologi Bandung, Bandung.

- Brown TA, 1995. *Gene Cloning*, 3rd Ed. Chapman and Hall, London, 34–36, 228–249.
- Cheng KT, Fu LC, Wang CS, Hsu FL, Tsay HS, 1998^a. Identification of *Anoectochilus formosanus* and *Anoectochilus koshunensis* Spesies with RAPD Markers, *Planta Medica* 64(1):46–49.
- Cheng KT, Tsay HS, Chen CF, Chou TW, 1998^b. Determination of The Components in a Chinese Prescription Yu-Ping-Feng San, by RAPD Analysis. *Planta Medica* 64(6):563–565.
- Cheng KT, Su CH, Chang HC, Huang JY, 1998^c. Differentiation of Genuines and Counterfeits of *Cordyceps* Spesies Using Random Amplified Polymorphic DNA. *Planta Medica* 64(5): 451–453.
- Hon CC, Chow YC, Zeng FY, Leung FCC, 2003. Genetic Authentication of Ginseng and Other Traditional Chinese Medicine. *Acta Pharmacologica Sinica* 24(9):841–846 [Online] www.chinaphar.com/1671-4083/24/841.pdf [2004, February 26].
- Kim SH, Jeong JH, Kim SK, Paek KY, 2002. Parentage Identification of 'Daebong' Grape (*Vitis* spp) Using RAPD Analysis. *Journal of Plant Biotechnology* 4(2):67–70 [online]http://www.iplantbiotech.com/journal_dir/contents/vol4_2pdf/ksg-1.pdf [2003 January 25].
- Materia Medika Indonesia Jilid VI, 1995. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 273–277.
- de Padua LS., Bunyaphatsara N., Lemmens RHMJ (eds.), 1999. *Prosea. Medicinal and Poisonous Plants* 12 (1):467–472.
- Praswanto NPS, Dzulkarnain B, Sundari D, 1996. *Informasi Penelitian Komponen Jamu Pengatur Haid.*: Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alami VIII, Perhipba dan Balitro, Bogor, 174–188.
- Rahayu M, Walujo EB, 1996. *Pengetahuan dan Manfaat Keanekaragaman Jenis Tumbuhan Obat: Studi Kasus Orang-orang Atoni di Camplong Nusa Tenggara Timur*: Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alami VIII, Perhipba dan Balitro, Bogor, 295–301.
- Roemantyo S, 1994. *Kajian Botani Ekonomi Bahan Obat Nabati di Jawa*, in: Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alami VIII, Perhipba dan Balitro, Bogor, 168.
- Tanaman Obat Indonesia Jilid II, 1985. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Dirjen POM, 64.
- Taufik I, 1999. *Studi Keanekaragaman Genetik Kultivar Mangga (Mangifera indica L.) dengan menggunakan Metode Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*, Skripsi Sarjana Jurusan Biologi, Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Weir BJ, Pierre RGSt, Chibbar RN, 1996. Isolation of DNA for RAPD Analysis from Leaves of the Saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) and Other Horticultural Crops. *Canadian Journal of Plant Science* 76, 819 – 824.
- Yunita O, Kresnamurti A, 2004. Pengujian Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Tanaman yang Dijual Sebagai *Strychnos Ligustrina* Bl. Di Pasar Tradisional Surabaya. *Jurnal Obat Bahan Alam* 3(1):6–11.