

SELEKSI PRIMER RAPD UNTUK AUTENTIKASI KUMIS KUCING (*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.)

¹Dyah Subositi, ¹Anshary Maruzy, ¹Nur Rahmawati Wijaya

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional,
Jl. Lawu Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah
Email: dyah.subositi@gmail.com

Abstrak

Kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) merupakan tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai bahan baku obat tradisional oleh masyarakat umum maupun industri. Tanaman ini berpotensi dipalsukan atau terjadi kekeliruan dengan tekelan (*Eupatorium riparium*) karena mempunyai morfologi daun yang mirip terutama dalam bentuk simplisia. Penggunaan karakter morfologi dan fitokimia dalam autentikasi tanaman obat mempunyai keterbatasan karena dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan umur fisiologis tanaman. Penanda molekular RAPD merupakan salah satu metode autentikasi tumbuhan obat yang tidak dipengaruhi oleh kedua faktor tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk seleksi primer RAPD sebagai tahap awal dalam autentikasi kumis kucing. Isolasi DNA genom dilakukan pada kumis kucing, tekelan dan campuran keduanya, selanjutnya dilakukan amplifikasi menggunakan 20 primer RAPD. Tiga primer RAPD tidak dapat menghasilkan produk amplifikasi dan total fragmen yang dihasilkan sebanyak 97 fragmen DNA, serta polimorfisme sebesar 43,3%. Sebanyak 3 primer RAPD yaitu OPK-2, OPL-1 dan OPM-1 menghasilkan masing-masing satu fragmen spesifik pada kumis kucing dan tekelan. Primer RAPD tersebut dapat digunakan untuk autentikasi kumis kucing dengan tekelan.

Kata Kunci: RAPD, Kumis kucing, Autentikasi

1. PENDAHULUAN

Kumis kucing merupakan tanaman obat yang telah banyak dimanfaatkan secara empiris atau turun menurun untuk peluruh batu ginjal dan peluruh air seni (Widiyastuti et al., 2012). Tanaman ini berperawakan terna tegak, tinggi dapat mencapai 2 m, batang persegi 4, beralur, daun tunggal, helaian daun berbentuk bulat telur, bulat memanjang-lanset, oval atau belah ketupat, pangkal meruncing, runcing sampai tumpul, bunga majemuk tandan, di ujung batang atau cabang, panjang 7-29 cm, mahkota bunga berbibir 2, warna ungu pucat-putih, Benang sari lebih panjang dari tabung mahkota bunga (Widiyastuti et al., 2012).

Tekelan (*Eupatorium riparium*) merupakan tanaman yang berpotensi menjadi adulteran kumis kucing karena mempunyai kemiripan pada bentuk daun (Hernadi et al., 2019). Tanaman ini mengandung senyawa Metilripariokromen-A dan mempunyai potensi sebagai sumber bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai fungisida, herbisida dan sebagai tanaman obat (Chrystomo, Sumardi, & Hartanto, 2011)

Menurut pedoman WHO untuk metodologi penelitian dan evaluasi pada obat tradisional, langkah pertama adalah verifikasi atau identifikasi bahan baku yang benar untuk pemastian kualitas, keamanan dan khasiatnya (World Health Organization, 2000). Autentikasi merupakan suatu tantangan dalam pemanfaatan tanaman obat, proses ini idealnya dilakukan sejak panen hingga menjadi produk akhir. Industri obat tradisional memperoleh bahan baku tanaman yang berasal dari pengepul yang tidak terlatih dan umumnya berasal dari daerah pedesaan. Hal tersebut berpotensi menyebabkan kualitas bahan baku menjadi kurang dan berpotensi adanya adulterasi atau substitusi (Khan, Mirza, & Abdin, 2010). Kekeliruan pada bahan baku obat tradisional dapat terjadi secara sengaja ataupun tidak disengaja.

Beberapa teknik telah dikembangkan untuk identifikasi herbal yang dipasarkan antara lain yaitu morfologi, anatomi, sidik kimia dan pendekatan berbasis DNA, beberapa teknik tersebut mempunyai kelebihan dan kekurangan (Lee et al., 2015). Identifikasi bahan baku obat tradisional biasanya melalui organoleptik, karakter mikroskopis (ukuran, bentuk, warna, bau, rasa, tekstur). Identifikasi tersebut mudah dilakukan, namun sangat subyektif tergantung dari keahlian dan pengalaman terutama pada bahan yang berbeda pada spesies yang berkerabat.

Terlebih pada spesies tersebut dan adulterannya mempunyai karakter yang sama (Ganie, Srivastava, Narula, Ali, & Sharma, 2012). Penggunaan analisis kimia tidak selalu dapat diandalkan karena hasil yang diperoleh dipengaruhi oleh umur, fisiologi dan kondisi penyimpanan. Selain itu, spesies tanaman yang berkerabat mengandung komponen kimia yang serupa sehingga menyulitkan pada identifikasi (Ganie et al., 2012).

Penanda molekular mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan penanda fenotipik antara lain yaitu tidak dipengaruhi oleh kondisi fisiologis, faktor lingkungan (Mei et al., 2017). Penanda molekular RAPD telah dimanfaatkan dalam autentikasi tumbuhan obat salah satunya karena faktor jumlah sampel yang digunakan sedikit dalam analisis dan tidak membutuhkan jaringan/sampel spesifik (Sarwat, Srivastava, & Khan, 2016).

Penelitian ini bertujuan untuk skrining primer RAPD sebagai tahapan awal untuk autentikasi kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) dengan potensi adulterannya yaitu tekelan (*Eupatorium riparium*).

2. METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*), tekelan (*Eupatorium riparium*) dan campuran kumis kucing-tekelan dengan perbandingan (1:3; 1:1; 3:1) yang diperoleh dari kebun koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Daun muda TO tersebut masing-masing sebanyak 0,1 gr disimpan pada freezer -80°C, kemudian diisolasi menggunakan protokol dan kit isolasi Thermo. Kemurnian dan Konsentrasi DNA ditentukan melalui teknik spektrofotometri pada serapan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (λ 260/280).

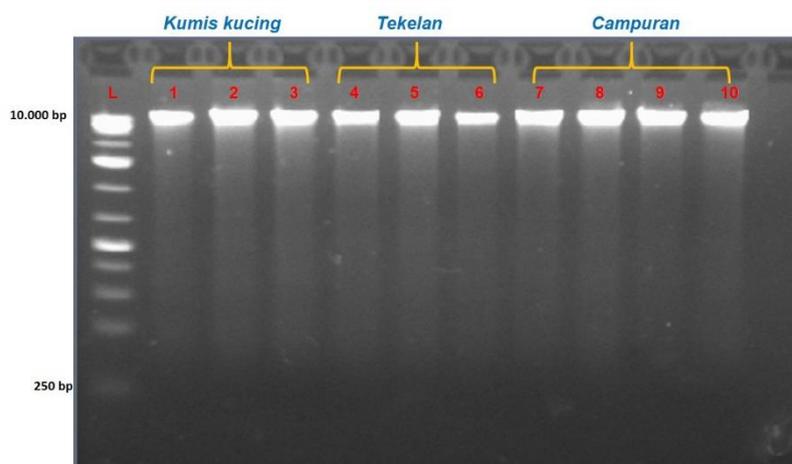
Amplifikasi DNA menggunakan 20 primer RAPD (Tabel 1). Sebanyak 2 μ l template (25 ng DNA genom), 1 μ l primer, 12,6 μ l PCR mix, kemudian ditambah *destilated water* hingga volume 25 μ l. Campuran tersebut dimasukkan dalam *Thermocycler* (BioRad) dengan program sebagai berikut: pre-denaturasi 95°C selama 3 menit, dilanjutkan sebanyak 39x siklus yang terdiri dari tahap denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* 36 °C selama 50 detik dan *elongation* 72°C selama 2 menit, kemudian dilanjutkan *extention* 72°C selama 8 menit dan pada 4°C sebagai *holding temperature*. Produk amplifikasi dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,8% yang telah diberi *Peq green* pada 60 volt selama 80 menit. Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan sinar UV pada alat *Gel Documentation System* (BioRad).

Fragmen-fragmen DNA produk PCR dipilih berdasarkan ketebalan pita dan polimorfisme yang dihasilkan. Polimorfisme dihitung berdasarkan fragmen DNA yang dihasilkan dari masing-masing primer. Apabila terdapat fragmen DNA yang tebal/jelas dan berbeda atau spesifik pada kumis kucing dan tekelan serta muncul di campuran keduanya maka fragmen tersebut sebagai kandidat marker genetik untuk autentifikasi.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Isolasi DNA genom

Kebenaran identitas bahan baku tanaman obat merupakan tahap pertama untuk memastikan kualitas, khasiat, dan keamanan produk herbal yang dihasilkan. Penanda molekular RAPD merupakan salah satu penanda molekular yang mempunyai kelebihan dibandingkan dengan karakterisasi morfologi maupun profiling senyawa kimia untuk autentikasi. Tahap pertama dalam autentikasi secara molekular adalah isolasi DNA (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil Isolasi DNA. Keterangan: 1-3: DNA kumis kucing individu 1-3, 4-6: DNA tekelan individu 4-6, 7-10: Campuran kumis kucing dan tekelan, 7: perbandingan 1:3, 8-9: perbandingan 1:1, 10: perbandingan 3:1.

3.2. Amplifikasi

Amplifikasi menggunakan 30 primer RAPD menghasilkan sebanyak 97 fragmen. Tiga primer RAPD yaitu OPK-5, OPM-2 dan OPM-3 tidak dapat mengamplifikasi dan tidak menghasilkan fragmen (Tabel 1).

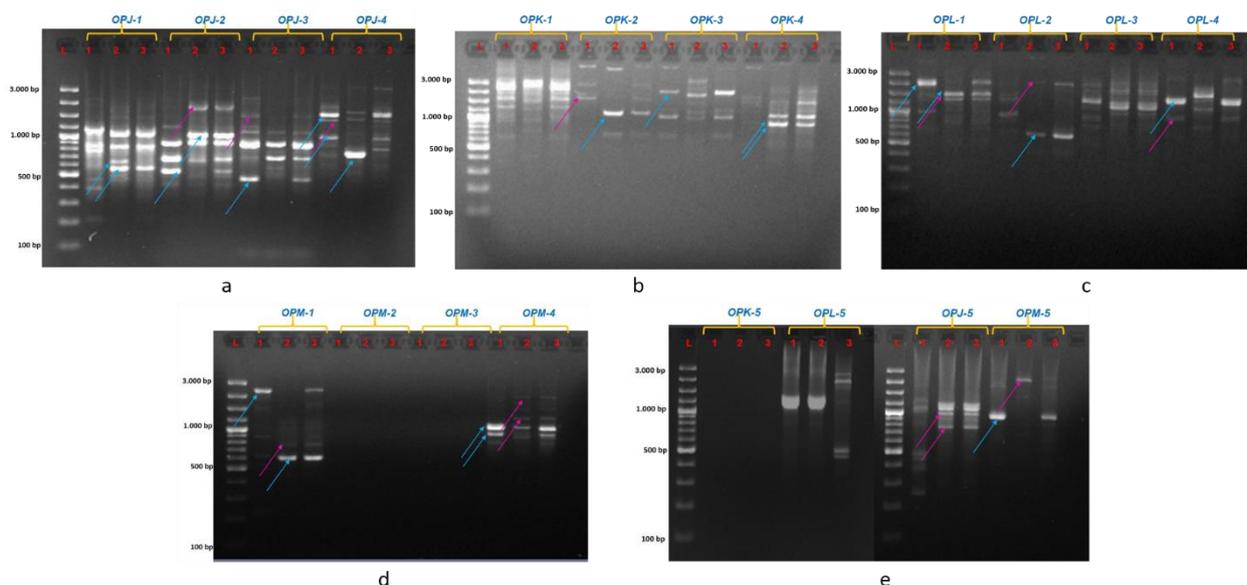
Tabel 1. Fragmen DNA kumis kucing dan tekelan hasil amplifikasi menggunakan 20 primer RAPD

No	Primer	Fragmen Monomorfik	Total Fragmen	Polimorfisme (%)	Fragmen Spesifik			
					Kumis Kucing		Tekelan	
					Kuat	Lemah	Kuat	Lemah
1.	OPJ-1	5	7	71,4	1	-	1	-
2.	OPJ-2	3	6	50	1	-	1	1
3.	OPJ-3	5	8	62,5	1	1	-	-
4.	OPJ-4	4	7	42,9	2	1	1	-
5.	OPJ-5	5	7	71,4	-	-	-	2
6.	OPK-1	2	5	40	2	1	-	-
7.	OPK-2	3	6	50	-	2	1	-
8.	OPK-3	5	7	71,4	1	-	-	1
9.	OPK-4	2	4	50	-	-	2	-
10.	OPK-5	-	-	-	-	-	-	-
11.	OPL-1	1	4	25	1	-	1	1
12.	OPL-2	2	4	50	-	-	1	1
13.	OPL-3	5	8	62,5	-	-	1	2
14.	OPL-4	4	6	66,7	1	1	-	-
15.	OPL-5	2	2	0	-	-	-	-
16.	OPM-1	3	6	50	1	-	1	1
17.	OPM-2	-	-	-	-	-	-	-
18.	OPM-3	-	-	-	-	-	-	-
19.	OPM-4	4	8	50	1	1	-	2
20.	OPM-5	-	2	100	1	-	-	1
TOTAL		55	97		13	7	10	12

Kuat : fragmen DNA tebal, jelas dan tereksresi pada campuran kedua bahan

Lemah : fragmen DNA tipis, *smear*, dan tidak tereksresi pada campuran kedua bahan

Polimorfisme yang dihasilkan dari kumis kucing dan tekelan berkisar antara 0-100% dengan rata-rata 56,7%. Hanya primer OPM-5 yang menghasilkan polimorfisme 100%. Selain berdasarkan polimorfisme, fragmen DNA yang dihasilkan pada masing-masing primer dipilih berdasarkan ketebalan dan kejelasan fragmen serta tereksresi atau tidaknya pada campuran kedua bahan (Gambar 2).



Gambar 2. Fragmen DNA kumis kucing (1), tekelan (2) dan campuran kumis kucing-tekelan (3) menggunakan primer RAPD {a. primer OPJ 1-4; b. primer OPK 1-4; c. Primer OPL 1-4, d. Primer OPM 1-4, e. Primer OPJ, OPK, OPL, OPM 5}

Sumber : dokumentasi pribadi

3.3. Pembahasan

Kekeliruan yang tidak sengaja terjadi karena kurangnya pengetahuan untuk identifikasi spesies, nama lokal sama, kemiripan morfologi, aroma, dan kekuranghati-hatian pada saat mengoleksi (Biswas & Biswas, 2014). Adulterasi secara sengaja bertujuan untuk mengganti tanaman utama dengan tanaman sejenis yang lebih mudah diperoleh dan lebih murah (Kiran, Khan, Mirza, Ram, & Abdin, 2010).

Fragmen-fragmen yang terekspresi yang spesifik untuk masing-masing spesies pada masing-masing primer berpotensi untuk digunakan sebagai marker autentikasi secara molekular (Gambar 2). Primer RAPD yang digunakan untuk autentikasi dipilih berdasarkan polimorfisme yang tinggi tetapi mempunyai fragmen yang sedikit, jelas, spesifik untuk kumis kucing dan tekelan serta terekspresi pada campuran kedua bahan tersebut. Teknik penanda molekular berdasarkan jumlah polimorfisme yang terdeteksi pada setiap aksesori atau spesies dan fragmen DNA yang unik/spesifik mampu membedakan dengan adulterannya (Tharachand, Selvaraj, & Mythili, 2012).

Terdapat tiga primer RAPD yang terpilih atau berpotensi untuk dikembangkan sebagai marker autentikasi dari 20 primer yang digunakan yaitu OPK-2, OPL-1, dan OPM-1. Skrining primer RAPD untuk autentikasi herbal juga telah digunakan pada beberapa jenis tanaman. Skrining primer RAPD menunjukkan hasil yang reproduksibel dan dapat membedakan dengan jelas antar 2 spesies *Cuscuta* yaitu *C. reflexa* dan *C. chinensis*. Hampir seluruh primer menghasilkan fragmen DNA yang unik pada kedua spesies tersebut. Primer RAPD yang dapat membedakan antar kedua spesies tersebut antara lain yaitu OPC-1, OPC-2, OPC-3, OPC-4, OPC-5, OPC-7 dan OPC-8 melalui ada tidaknya fragmen DNA yang terbentuk sebagai penanda untuk autentikasi spesies.

Hasil skrining primer RAPD dapat dikembangkan untuk penanda molekular SCAR untuk memperoleh fragmen tunggal yang dapat digunakan untuk autentikasi. Penanda SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) dapat dikembangkan dari penanda RAPD yang terpilih sebagai alternatif untuk memantau kualitas pada obat tradisional. Sebanyak 48 primer RAPD diseleksi untuk autentikasi umbi Pinelliae (*P. ternata*) dengan adulterannya *P. pedatisecta*, *P. tripartita*, dan *T. flagelliforme* menghasilkan 40 fragmen DNA spesifik yang potensial dan

dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat penanda molekular SCAR. Skrining primer RAPD untuk autentikasi juga digunakan untuk membedakan antara *P. nigrum* dengan aduterannya yaitu *C. papaya* yang beredar di pasaran.

Identifikasi atau autentikasi suatu spesies berdasarkan penanda molekular/DNA tidak cukup untuk menentukan kualitas dan produk yang dihasilkan karena ekspresi tumbuhan merupakan produk dari genom dan lingkungan (Da-cheng, Shi-lin, Pei-gen, & Yong, 2010). Autentikasi dan evaluasi menggunakan parameter yang lengkap dapat menyediakan informasi tumbuhan obat secara utuh. Nama ilmiah yang tepat dan jaminan mutu merupakan syarat penting untuk memastikan keberlangsungan kualitas produk yang berasal dari tumbuhan obat karena akan menentukan khasiat dan keamanannya (Vijayan, Cheethaparambil, Pillai, & Balachandran, 2014). Autentikasi bahan baku herbal sebaiknya menggunakan lebih dari satu parameter atau metode untuk memberikan hasil yang maksimal.

4. KESIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

Penanda molekular RAPD dapat digunakan sebagai salah satu metode untuk autentikasi kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*). Skrining primer RAPD menghasilkan 3 primer RAPD terpilih yaitu OPK-2, OPL-1 dan OPM-1 Primer RAPD tersebut dapat digunakan untuk autentikasi kumis kucing dengan tekelan yang berpotensi sebagai adulterannya.

Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk pengembangan metode SCAR berdasarkan fragmen DNA yang dihasilkan dari primer yang terpilih.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Biswas, K., & Biswas, R. (2014). DNA Molecular Markers Based Authentication of Herbal Drugs - A Review. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS)*, (March 2014), 671–677.
- Chrystomo, L. Y., Sumardi, I., & Hartanto, L. N. (2011). Penetapan Kadar Metilripariokromen-A pada Organ Eupatorium riparium Reg. dari Daerah Yang Berbeda. *Biota*, 16(1), 107–113.
- Da-cheng, H. a O., Shi-lin, C., Pei-gen, X., & Yong, P. (2010). Authentication of Medicinal Plants by DNA-based Markers and Genomics. *Science And Technology*, 2(4), 250–261. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-6384.2010.04.003>
- Ganie, S. H., Srivastava, P. S., Narula, A., Ali, Z., & Sharma, M. P. (2012). Authentication of shankpushpi by RAPD markers. *EurAsian Journal of BioSciences*, (January 2016), 39–46. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2012.6.0.5>
- Hernadi, E., Rohaeti, E., Rafi, M., Wahyuni, W. T., Putri, S. P., & Fukusaki, E. (2019). HPLC fingerprinting coupled with linear discriminant analysis for the detection of adulteration in *Orthosiphon aristatus*. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 42(15–16), 513–520. <https://doi.org/10.1080/10826076.2019.1629956>
- Khan, S., Mirza, K. J., & Abdin, M. Z. (2010). Development of RAPD markers for authentication of medicinal plant *Cuscuta reflexa*. *EurAsian Journal of BioSciences*, (4), 1–7. <https://doi.org/10.5053/ejobios.2010.4.0.1>
- Kiran, U., Khan, S., Mirza, K. J., Ram, M., & Abdin, M. Z. (2010). SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia*, 81(8), 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.08.002>
- Lee, Y. M., Ji, Y., Kang, Y. M., Kim, W. J., Choi, G., & Moon, B. C. (2015). Molecular authentication of pinelliae tuber and its common adulterants using RAPD-derived multiplex sequence characterized amplified region (Multiplex-SCAR) markers. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 9(1), 40–50.
- Mei, Z., Zhang, X., Khan, M. A., Imani, S., Liu, X., Zou, H., ... Fu, J. (2017). Genetic analysis

- of *Penthorum chinense* Pursh by improved RAPD and ISSR in China. *Electronic Journal of Biotechnology*, 30, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.08.008>
- Sarwat, M., Srivastava, S., & Khan, T. H. (2016). International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 8(8), 1417–1424.
- Tharachand, C., Selvaraj, C., & Mythili, M. (2012). Molecular markers in characterization of medicinal plants : An overview. *Research in Plant Biology*, 2(2), 01–12.
- Vijayan, D., Cheethaparambil, A., Pillai, G. S., & Balachandran, I. (2014). Molecular authentication of *Cissampelos pareira* L. var. *hirsuta* (Buch.-Ham. ex DC.) Forman, the genuine source plant of ayurvedic raw drug ‘Patha’, and its other source plants by ISSR markers. *3 Biotech*, 4(5), 559–562. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0183-8>
- Widiyastuti, Y., Widodo, H., Wahyono, S., Haryanti, S., Supriyati, N., Katno, ... Listyana, N. H. (2012). *Vademekum Tanaman Obat Untuk Sainifikasi* (Jilid 1 (E)). Jakarta: Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- World Health Organization. (2000). *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*. Geneva: World Health Organization.