

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Warna Isolat DNA dari Beberapa Spesimen *Rafflesia* Menggunakan Protokol yang Berbeda

Berdasarkan hasil penelitian, secara kumulatif warna isolat yang didapatkan dari masing-masing protokol adalah kekuning-kuningan (*yellowish*), coklat (*brown*), dan tidak berwarna (*colorless*). Data selengkapnya disajikan pada (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Warna Isolat DNA dari Beberapa Spesimen Herbarium *Rafflesia* Menggunakan Protokol yang Berbeda

Sampel	Warna Isolat DNA			
	I Kit Promega	II Kit Plant DNA Mini	III CTAB (Doyle and Doyle, 1990)	IV CTAB (Cota-Sanchez <i>et. al.</i> , 2006)
BrRp	Coklat	Kekuning-kuningan	Tidak berwarna	Tidak berwarna
BrRa	Coklat	Kekuning-kuningan	Tidak berwarna	Tidak berwarna
CaRa	Coklat	Kekuning-kuningan	Tidak berwarna	Tidak berwarna
PeRa	Coklat	Kekuning-kuningan	Tidak berwarna	Tidak berwarna

Isolasi DNA dari beberapa spesimen herbarium *Rafflesia* menggunakan Protokol I (Kit Promega) yang standar tanpa adanya modifikasi menghasilkan isolat yang semuanya berwarna coklat (*brown*). Warna coklat pada proses isolasi dapat berasal dari warna sampel herbarium yang terlarut atau karena pencoklatan (*browning*) akibat oksidasi fenolik. Kemungkinan terjadinya pencoklatan sangat kecil karena sampel berasal dari herbarium basah di dalam larutan alkohol 70%

yang telah disimpan selama 10 tahun. Pada umumnya fenol ditemukan dalam jaringan meristem seperti pada daun muda (Porebski *et al.* 1997).

Selain itu, isolat yang dihasilkan melalui Protokol I tidak bebas dari kotoran. Sebenarnya kotoran akibat lisis sel dapat dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Sentrifugasi akan memisahkan campuran menjadi dua fase yakni bagian yang mengendap (pelet) dan yang cair (supernatan). Namun karena supernatan yang dihasilkan cukup kental sehingga masih menyisahkan kotoran yang terjebak pada supernatan meskipun dalam jumlah yang kecil. Diduga kekentalan supernatan tersebut mengindikasikan keberadaan polisakarida yang cukup tinggi sebagaimana diterangkan oleh Wilkins dan Smart, (1996).

Pada proses Isolasi DNA menggunakan protokol II (Kit *Plant DNA Mini*) dihasilkan isolat yang semuanya berwarna kekuning-kuningan (*yellowish*) serta bebas dari kotoran. Meskipun Kit ini penggunaannya lebih khusus untuk jaringan tumbuhan, namun tetap memerlukan modifikasi untuk mengekstraksi DNA dari spesimen herbarium *Rafflesia*. Proses purifikasi pada Protokol II dilengkapi HiBind yang dapat memaksimalkan hasil isolat DNA dengan kualitas yang lebih baik daripada Protokol I.

Prinsip dasar Isolasi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen lainnya. Hasil Isolasi tersebut merupakan tahapan penting untuk langkah berikutnya dan harus dilakukan dengan baik dan bebas kontaminasi. Penggunaan Protokol I dan II pada Isolasi DNA dari spesimen herbarium *Rafflesia* ini belum dapat diterapkan karena menghasilkan isolat dengan tampilan warna yang tidak layak untuk analisis selanjutnya. Modifikasi

presipitasi dan purifikasi perlu diterapkan untuk mendapatkan DNA yang lebih murni.

Protokol III (Doyle and Doyle, 1990) dan Protokol IV (CTAB Cota-Sanchez *et. al.*, 2006) yang dimodifikasi oleh Riahi M. *et. al.* 2010 menghasilkan isolat yang bersih (*colorless*). Modifikasi yang digunakan peneliti sebelumnya adalah penggunaan EDTA berkonsentrasi 20 mM yang lebih rendah dari sebelumnya (50 mM); penggunaan 1% β -merchптоethanol yang lebih tinggi sebelumnya (0,4%); dan mengurangi waktu precipitasi. Karakteristik dari modifikasi kedua protokol ini adalah mengurangi metabolit penyebab kontaminan; biaya yang lebih rendah dan waktu yang cukup singkat.

4.2 Kosentrasi Isolat DNA dari Beberapa Spesimen *Rafflesia* Menggunakan Protokol yang Berbeda

Pada penelitian ini, secara kumulatif diperoleh berat dan kosentrasi akhir isolat DNA yang cukup variatif sebagaimana disajikan pada (tabel 4.2).

Tabel 4.2 Hasil Kosentrasi Akhir Isolat DNA dari Beberapa Spesimen Herbarium *Rafflesia* Menggunakan Protokol III dan IV

Sampel	Konsentrasi DNA (dalam ng/ μ L)	
	CTAB (modifikasi; Doyle and Doyle, 1990)	CTAB (modifikasi; Cota-Sanchez <i>et. al.</i> , 2006)
BrRp	21,2	4,4
BrRa	127,3	64,3
CaRa	274,9	22,5
PeRa	65,0	29,1

Isolat DNA yang didapatkan menggunakan Protokol I dan II tidak dihitung konsentrasi ataupun berat hasilnya karena hasil yang diperoleh tidak menunjukkan adanya DNA yang layak untuk dianalisis. Pada Protokol III dihasilkan isolat DNA

dari sampel BrRp, BrRa, CaRa, PeRa dengan konsentrasi berturut-turut: 21,2 ng/ μ L, 127,3 ng/ μ L, 274,9 ng/ μ L dan 65,0 ng/ μ L. BrRp memiliki konsentrasi paling rendah sementara konsentrasi paling tinggi didapat dari sampel CaRa. Suatu perkiraan yang ditarik dari hasil tersebut adalah bahwa sampel BrRp yang berasal dari herbarium *Rafflesia patma* Blume. koleksi kebun Raya Bogor diambil dari bagian braktea bunga mekar yang telah melewati masa hidup kurang lebih 4 tahun sehingga braktea yang diambil adalah jaringan mati (Sofi, komunikasi pribadi). Pada braktea juga terdapat tulang-tulang daun menjadikan sampel bermassa tinggi namun lebih sedikit mengandung sel-sel yang tidak berinti.

Pada sampel BrRa, CaRa dan PeRa masing-masing menghasilkan isolat berkonsentrasi tinggi. Berdasarkan penelusuran lebih lanjut ditemukan informasi yang menyatakan bahwa spesimen *Rafflesia* yang dikoleksi tersebut dikoleksi pada saat masih berupa kuncup (knop). Knop *Rafflesia* lebih bersifat meristematik meski lambat lajunya. Sel-sel meristematik dicirikan dengan sel-sel yang lebih kecil dengan inti sel yang besar. Hal tersebut dapat digunakan untuk menduga konsentrasi isolat DNA yang lebih tinggi.

Pada Protokol IV didapatkan konsentrasi isolat DNA BrRp, BrRa, CaRa dan PeRa masing-masing: 4,4ng/ μ L, 64,3 ng/ μ L, 22,5 ng/ μ L dan 29,1 ng/ μ L. Sampel BrRp memiliki konsentrasi paling rendah sementara konsentrasi paling tinggi didapat dari sampel BrRa.

Penggunaan protokol III dan IV dapat menghasilkan isolat DNA dengan konsentrasi yang variatif. Dengan demikian, buffer CTAB cukup memenuhi syarat untuk digunakan dalam Isolasi DNA dari beberapa spesimen herbarium

Rafflesia. Jika diperhatikan hasil isolat pada kedua Protokol tersebut maka, diketahui bahwa isolasi DNA menggunakan metode Doyle and Doyle, (1990) menghasilkan isolat DNA dengan konsentrasi yang lebih tinggi daripada isolasi DNA menggunakan metode Cota-Sanchez *et. al.*, (2006). Pemberian 1 mL buffer ekstraksi dengan tambahan PVP 2% dan 2% β -mercaptoethanol melalui inkubasi 60°C selama 1 jam lebih efektif daripada pemberian 800 μ L buffer Isolasi CTAB suhu 65°C dengan tambahan 1% β -mercaptoethanol melalui inkubasi dalam *waterbath* bersuhu 65°C selama 15 menit.

Buffer CTAB dengan kandungan garam yang tinggi dapat memisahkan polisakarida dari dinding sel, sedangkan PVP dapat mengurangi browning akibat kandungan fenol pada daun muda (Porebski *et al.*, 1997; Surzycki 2000). Penambahan senyawa pereduksi seperti β -mercaptoethanol dalam proses isolasi DNA dapat mencegah proses oksidasi senyawa fenolik sehingga menghambat aktivitas radikal bebas yang dihasilkan oleh oksidasi fenol terhadap asam nukleat (Wilkins & Smart 1996). Selanjutnya Fang *et al.*, (1992) dan Tel-zur *et al.*, (1999), menyatakan bahwa penambahan NaCl dengan konsentrasi di atas 1 M dapat meningkatkan kelarutan polisakarida sehingga lebih mudah untuk dihilangkan

4.3 Kemurnian Isolat DNA dari Beberapa Spesimen *Rafflesia* Menggunakan Protokol yang Berbeda

Parameter lain yang perlu diketahui dalam uji kualitatif hasil Isolasi DNA adalah kemurnian. Tingkat kemurnian menunjukkan kualitas DNA dari kontaminan yang ikut terisolasi. Kemurnian larutan DNA tersebut dapat dilihat dengan membagi nilai $A_{260/280}$. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio kedua

nilai tersebut berkisar antara 1,8 - 2,0. Jika nilai rasio lebih kecil dari 1,8 maka masih ada kontaminasi protein atau fenol di dalam larutan. Secara kumulatif, nilai $A_{260/280}$ pada protokol III dan IV disajikan pada tabel 4.3..

Tabel 4.3 Kemurnian Isolat DNA dari Beberapa Spesimen Herbarium *Rafflesia* Menggunakan Protokol yang Berbeda

Sampel	Nilai $A_{260/280}$	
	CTAB (modifikasi; Doyle and Doyle, 1990)	CTAB (modifikasi; Cota-Sanchez <i>et. al.</i> , 2006)
BrRp	0,92	1,42
BrRa	1,45	1,50
CaRa	1,26	1,56
PeRa	1,46	1,43

Pada Protokol III didapatkan nilai rasio $A_{260/280}$ sampel BrRp, BrRp, CaRa dan PeRa berturut-turut: 0,92; 1,45; 1,26 dan 1,46. Nilai $A_{260/280}$ sampel PeRa memiliki tingkat kontaminasi paling rendah yaitu 1,46.. Nilai $A_{260/280}$ sampel BrRp memiliki tingkat kontaminasi lebih tinggi dari pada CaRa dan BrRa.

Pada Protokol IV didapatkan nilai rasio $A_{260/280}$ sampel BrRp, BrRp, CaRa dan PeRa berturut-turut: 1,42; 1,50; 1,56 dan 1,46. Nilai $A_{260/280}$ sampel CaRa memiliki tingkat kontaminasi paling rendah. Sampel BrRp memiliki tingkat kontaminasi lebih tinggi dari pada CaRa dan BrRa.

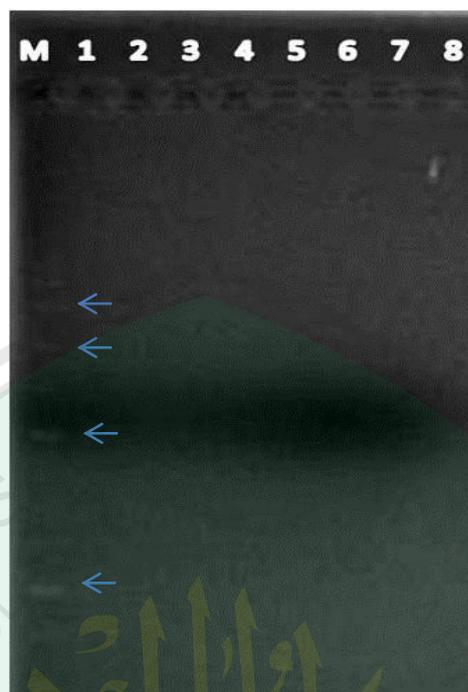
Penggunaan metode Doyle and Doyle, (1990) dan Cota-Sanchez *et. al.*, (2006) pada proses isolasi DNA dari spesimen herbarium *Rafflesia* menghasilkan isolat DNA yang semuanya mengandung kontaminasi protein. Hal tersebut terlihat dari nilai $A_{260/280}$ di bawah 1,8. Jika diamati nilai rata-rata $A_{260/280}$ antara kedua Protokol maka, dapat disimpulkan bahwa penggunaan Cota-Sanchez *et. al.*, (2006)

memiliki tingkat kontaminasi protein lebih rendah dari pada penggunaan metode Doyle and Doyle, (1990).

Enzim proteinase K dapat digunakan untuk menghancurkan protein sehingga DNA dapat diisolasi secara utuh (Muhammad, dan Praseno. 1991). Dalam proses ini sebagian kecil RNA juga dapat dibersihkan. Sedangkan kloroform digunakan untuk membersihkan sisa-sisa protein dan polisakarida dari larutan.

4.4 Hasil *Running* Elektroforesis Isolat DNA dari Beberapa Spesimen *Rafflesia* Menggunakan Protokol yang Berbeda

Uji kualitas DNA memperlihatkan bahwa genom dengan konsentrasi yang lebih tinggi memperlihatkan ketebalan pita yang lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih rendah (Gambar 4.3). Pada sumur 1 (konsentrasi genom 21,2 ng/ μ L), (2) 127,3 ng/ μ L, (3) 274,9 ng/ μ L, (4) 65,0 ng/ μ L, (5) 4,4ng/ μ L, (6) 64,3 ng/ μ L, (7) 22,5 ng/ μ L dan (8) 29,1 ng/ μ L tidak menampilkan pita walau setipispun. Hal ini menunjukkan bahwa volume 4 μ L (konsentrasi DNA 274,9 ng/ μ L) belum cukup untuk memperlihatkan pita yang jelas. Sementara penelitian Tenriulo A. *et. al.*, (2001) menunjukkan volume 6 uL (konsentrasi DNA 1.020 ng) cukup untuk memperlihatkan band yang jelas. Semakin besar volume genom yang *di-loading* pada sumur gel, maka semakin tinggi konsentrasi DNA yang terkandung di dalam larutan sampel tersebut (Fatchiyah, 2011).



Gambar 4.3 Hasil Elektroforesis DNA dari Beberapa Spesimen Herbarium *Rafflesia*

Keterangan

2% agarose, 85 V, 90 menit

M (Marker)

Protokol III: 1 (BrRp), 2 (BrRa), 3 (CaRa), 4 (PeRa)

Protokol IV: 5 (BrRp), 6 (BrRa), 7 (CaRa), 8 (PeRa)

4.5 Kajian Keislaman

4.5.1 *Rafflesia* dan Keindahannya

Rafflesia telah diakui keindahan dan keunikannya oleh banyak pihak sejak pertama kali ditemukan pada 1791 di pulau Jawa (van Steenis et al., Dalam Nais, 2001). Setelah kabar penemuan tersebut meluas, banyak yang menolak mempercayainya sebagai jenis tumbuhan (Zuhud *et al.*, 1998). Sejarah mencatat bahwa *Rafflesia* merupakan tumbuhan hutan tropis yang menjadi primadona dalam dunia ilmu pengetahuan. Pada awalnya para botanis berebut untuk menjadi yang pertama dalam membuat deskripsi, memberikan nama sekaligus

mempublikasikannya. Susatya (2011), bahkan menggambarkan perebutan tersebut ibarat sebuah drama di masa kini, proses yang melibatkan intrik, politik dan ketamakan.

Rafflesia dijadikan sebagai puspa nasional karena memiliki bentuk morfologi yang unik, indah dan mengagumkan. Allah Swt. menciptakan berbagai jenis tumbuhan yang menarik sebagai tanda akan kebesarannya. Sebagaimana disebutkan di dalam Al-Qur'an:

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوْسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ بَهِيجٍ ﴿٧﴾

Artinya: "dan Kami hamparkan bumi itu dan Kami letakkan padanya gunung-gunung yang kokoh dan Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuhan yang indah dipandang mata." (Q.S. Qaaf :7)

Menurut Shihab, (2002), *katabahij* berasal dari kata *bahaja* yakni sesuatu yang warnanya menyenangkan. Bahwa aneka jenis tumbuhan dengan keistimewaannya masing-masing tumbuh dari air dan tercurah dari langit, itu sudah menunjukkan betapa kuasa Allah Swt. Dengan demikian penyebutan kata *bahij* lebih membuktikan kuasanya. Semua ini seharusnya menjadikan manusia untuk semakin bersyukur sekaligus kagum kepada Sang Pencipta.

4.5.2 Konservasi *Rafflesia*

Hampir semua spesies dalam marga *Rafflesia* dikategorikan sebagai tumbuhan langka dengan status genting (*endangered*) (EN 3cd) sesuai dengan kriteria IUCN 1994 yang dilaporkan oleh Mogeia *et al.*, (2001). Selain itu *Rafflesia* merupakan tumbuhan langka yang takson dan populasinya cenderung berkurang, baik dalam jumlah individu, populasi maupun keanekaragaman

genetiknya. Analisa ini menyatakan bahwa *Rafflesia* mengalami resiko kepunahan yang sangat tinggi di alam jika tidak ditangani dalam waktu dekat. Biji *Rafflesia* dapat berkecambah dan berhasil menuju perkembangan selanjutnya jumlahnya sangat sedikit di alam (Nais, 2001; Susatya, 2011). Konservasi *Rafflesia* menjadi sangat penting untuk dilakukan guna menjaga kelestariannya.

Ancaman kepunahan *Rafflesia* terbesar disebabkan oleh perbuatan manusia salah satunya yaitu perusakan dan pemotongan inang yang terjadi karena iseng oleh orang yang tidak bertanggungjawab. Pemotongan inang di bagian akar atau cabang akan mematikan sebagian kuncup *Rafflesia*. Peladangan liar hampir menghilangkan semua populasi *Rafflesia* di suatu lokasi. Bunga *Rafflesia* juga banyak yang diambil secara liar oleh penduduk untuk dijadikan bahan obat. Semua tindakan tersebut dapat mengancam kelestarian *Rafflesia*.

Firman Allah SWT. dalam surat Ar-Rum ayat 41 yang berbunyi:

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا
لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ ﴿٤١﴾

Artinya: “Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusi, supaya Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar).”

Isi kandungan dari surat di atas yaitu, selain untuk beribadah kepada Allah, manusia juga diciptakan sebagai khalifah di muka bumi. Sebagai khalifah, manusia memiliki tugas untuk memanfaatkan, mengelola dan memelihara alam semesta. Allah telah menciptakan alam semesta untuk kepentingan dan kesejahteraan semua makhluk-Nya, khususnya manusia. Keserakahan dan

perlakuan buruk sebagian manusia terhadap alam dapat menyengsarakan manusia itu sendiri. Tanah longsor, banjir, kekeringan, tata ruang daerah yang tidak teratur dan udara serta air yang tercemar adalah buah kelakuan manusia yang justru merugikan manusia dan makhluk hidup lainnya. Islam mengajarkan agar umat manusia senantiasa menjaga lingkungan. Lebih dari itu Allah SWT melarang manusia berbuat kerusakan di muka bumi.

Konservasi merupakan bagian yang sangat penting untuk kelangsungan suatu organisme dan sistem pendukung kehidupan manusia. Konservasi memiliki tiga arti pokok; 1. Pengawetan alam dan biotanya (*preservation*), 2. Pelestarian sistem-sistem pendukung kehidupan dan 3. Campur tangan manusia yang proposional dalam bentuk manajemen. Perintah konservasi terdapat pada beberapa ayat di dalam Al-Qur'an salah satunya pada Q.S. A'raaf ayat 56:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ ﴿٥٦﴾

Artinya: “*dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan Berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah Amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik.*”

Abdullah, (1994) menerangkan bahwa Allah Swt. melarang manusia melakukan perusakan dan hal-hal yang dapat membahayakan diri mereka. Allah Swt. telah mengatur segala urusan di dunia ini dengan baik dan rapi sedangkan perusakan dapat membahayakan umat manusia. Secara tersirat ayat ini mengandung perintah “menjaga” kelangsungan hidup yang telah diatur secara rapi olehNya.

Allah Swt. telah menunjuk manusia sebagai kholifah di muka bumi dan mengamanahkan bumi kepada manusia agar dikelola dan dimanfaatkan sebijak mungkin, sehingga tidak terjadi kerusakan. Allah Swt. berfirman dalam surat Al-Baqarah: 30.

وَإِذْ قَالَ رَبُّكَ لِلْمَلَائِكَةِ إِنِّي جَاعِلٌ فِي الْأَرْضِ خَلِيفَةً ۗ قَالُوا أَتَجْعَلُ فِيهَا مَنْ يُفْسِدُ فِيهَا وَيَسْفِكُ الدِّمَاءَ وَنَحْنُ نُسَبِّحُ بِحَمْدِكَ وَنُقَدِّسُ لَكَ ۗ قَالَ إِنِّي أَعْلَمُ مَا لَا تَعْلَمُونَ ﴿٣٠﴾

Artinya: “Ingatlah ketika Tuhanmu berfirman kepada Para Malaikat: “Sesungguhnya aku hendak menjadikan seorang khalifah di muka bumi.” mereka berkata: “Mengapa Engkau hendak menjadikan (khalifah) di bumi itu orang yang akan membuat kerusakan padanya dan menumpahkan darah, Padahal Kami Senantiasa bertasbih dengan memuji Engkau dan mensucikan Engkau?” Tuhan berfirman: “Sesungguhnya aku mengetahui apa yang tidak kamu ketahui.”

Manusia sebagai kholifah di bumi mengemban tugas untuk senantiasa menjaga bumi. Mereka bertanggungjawab atas kelestarian bumi. Manusia dianjurkan memanfaatkan sumber daya yang ada di dalamnya dan menjaga kelestariannya dengan tidak merusaknya. Sebagaimana dijelaskan dalam surat Al-Qashah: 77 .

وَابْتَغِ فِيمَا آتَاكَ اللَّهُ الدَّارَ الْآخِرَةَ ۗ وَلَا تَنْسَ نَصِيبَكَ مِنَ الدُّنْيَا ۗ وَأَحْسِنَ كَمَا أَحْسَنَ اللَّهُ إِلَيْكَ ۗ وَلَا تَبْغِ الْفَسَادَ فِي الْأَرْضِ ۗ إِنَّ اللَّهَ لَا يُحِبُّ الْمُفْسِدِينَ ﴿٧٧﴾

Artinya: “dan carilah pada apa yang telah dianugerahkan Allah kepadamu (kebahagiaan) negeri akhirat, dan janganlah kamu melupakan bahagianmu dari (kenikmatan) duniawi dan berbuat baiklah (kepada orang lain) sebagaimana Allah telah berbuat baik, kepadamu, dan

janganlah kamu berbuat kerusakan di (muka) bumi. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang berbuat kerusakan.”

Pada ayat tersebut bahwa manusia diperintahkan untuk memenuhi kebutuhan hidupnya di dunia dan berbuat baik dan dilarang berbuat kerusakan di muka bumi. Allah tidak menyukai “*mufsidin*” orang-orang yang berbuat kerusakan. Allah telah menyeru kepada manusia agar tidak membuat kerusakan, sehingga perlu ada analisis dampak dari perbuatan manusia agar manusia bisa mawas diri terhadap perbuatannya.

Beberapa usaha yang telah dilakukan dalam upaya konservasi *Rafflesia* meliputi: menetapkan statusnya sebagai tumbuhan langka dilindungi; melindungi habitat (*in-situ*) dengan menetapkannya sebagai kawasan konservasi; melakukan konservasi *ex-situ* seperti yang dikembangkan Kebun Raya Bogor sejak tahun 1801-sekarang; dan menyimpan koleksi herbariumnya (dilakukan di Herbarium Bogoriense, Puslit Biologi – LIPI). Metode perbanyak *Rafflesia* secara *in-vitro* maupun *in-vivo* juga telah dilakukan namun belum menunjukkan tanda keberhasilan.