Jurnal Littri 17(1), Maret 2011. Hlm. 11 - 17
ISSN 0853-8212

OPTIMASI TEKNIK ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA YANG EFISIEN DAN EFEKTIF PADA KEMIRI SUNAN (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw)

SYAFARUDDIN[1)] dan TRI JOKO SANTOSO[2)]

[1)]Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri
Jl. Raya Pakuwon Km2 Parungkuda-Sukabumi 43357
Telp. +62-266-7070941 Fax: +62-266-6542087
E-mail: den_ovan@yahoo.com
[2)]Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor 16111
Telp.+62-251-8316897 Fax: +62-251-8338820
E-mail: trijsant@yahoo.com

ABSTRAK

Kemiri sunan merupakan salah satu tanaman penghasil biodiesel dengan potensi yang sangat besar disamping pemanfaatannya sebagai tanaman konservasi. Minyak kemiri sunan mengandung racun sehingga tidak dapat dikonsumsi. Dikatakan bahwa asam α-eleostearat dengan kandungan 50% dalam minyak merupakan senyawa yang mengakibatkan minyak kemiri sunan beracun. Sebagai tanaman yang potensial, maka sangat diperlukan informasi lengkap tentang tanaman tersebut, termasuk analisis DNA. Berbagai teknik dapat dilakukan untuk mengisolasi DNA tergantung dari jenis tanaman, organ tanaman, atau jaringan tanaman yang digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efektif dan efisien, sehingga bisa mengurangi biaya dan penghematan waktu dalam pengerjaan di laboratorium. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor pada bulan Juli-September 2010. Materi genetik yang digunakan adalah contoh daun muda tanaman kemiri sunan yang diambil dari kebun koleksi plasma nutfah dan kebun Agro Widya Wisata, Pakuwon, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri (BALITTRI), Sukabumi. Sedangkan bahan lain adalah paket bahan kimia yang digunakan dalam kegiatan isolasi DNA pada umumnya. Kegiatan meliputi beberapa tahapan: ekstraksi dan purifikasi DNA, pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA serta amplifikasi DNA. Hasil ekstraksi DNA kemiri sunan dengan menggunakan kombinasi penambahan antioksidan polivinilpolipirolidon (PVPP) dan mercapto-ethanol, namun tanpa penggunaan nitrogen cair, ataupun penyimpanan lebih lama (*over night*) dari ekstrak daun yang telah digerus sebelum dilakukan purifikasi seperti yang sering dilakukan untuk tanaman tahunan pada umumnya, memperlihatkan hasil yang sangat memuaskan, dimana DNA mempunyai kualitas dan kuantitas yang sangat baik serta pola pita amplikon DNA terlihat sangat jelas dan tebal, sehingga bisa dikatakan bahwa teknik isolasi DNA yang dipakai dalam kegiatan ini adalah sangat memberikan hasil yang nyata dan memenuhi syarat untuk digunakan dalam ekstraksi DNA kemiri sunan.

Kata kunci: *Reutalis trisperma*, optimasi, isolasi, purifikasi, DNA

ABSTRACT

Optimation of DNA isolation and purification techniques on* Reutalis trisperma *(Blanco) Airy Shaw

Reutalis trisperma is well known as a potential plant which produces biodiesel and to be used for the conservation as well. The *reutalis* oil is toxic, therefore it is inedible due to about 50% α-eleostearat acid content in the oil. As a potential plant, its information in more detail is needed including the DNA analysis. There are many techniques to conduct DNA isolation depending on kind of plants, plant organ, or plant tissue that will be analyzed. The aim of this experiment was to find the effectiveness and efficiency techniques of DNA isolation and purification, so they can reduce cost and time while working in the laboratory. The experiment was conducted at Molecular Biology Laboratory of Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (BB BIOGEN), Bogor from July to September 2010. Young leaves of reutelis used as genetic materials were taken from germplasms collection at Pakuwon Experimental Station of Indonesian Spice and Industrial Crops Research Institute (ISICRI), Sukabumi. While some chemicals were used as the other material. The activities were as follows : DNA extraction and purification, measurement of DNA concentration, and amplification of DNA. Deletion of resistor enzyme-polysacharide, especially for perennial plant. DNA isolation can be done by breaking down of cell wall, cell membrane, and nuclear membrane. The results showed that conscientiousness of DNA isolation and purification denoted an important step to obtain clean and contaminant free of DNA, so the banding patterns were clear. In this technique did not use polypinilpolypirolidone (PVPP) and mercapto-ethanol such as antioxidant, liquid nitrogen, neither over night storage of leaf extraction before used for purification which is often used for perennial plant. In addition the results showed that band pattern of DNA was very thick and clear, therefore this technique can be applied for DNA isolation on *Reutalis trisperma*.

Key words: *Reutalis trisperma*, optimization, isolation, purification, DNA

PENDAHULUAN

Kemiri sunan (*Reutealis trisperma* (Blanco) Airy Shaw) merupakan salah satu tanaman penghasil biodiesel dengan potensi yang sangat besar disamping pemanfaatannya sebagai tanaman konservasi. Habitus tanaman, berupa pohon berukuran sedang dengan mahkota daun yang rindang dan lebar serta sistem perakaran yang dalam, sangat cocok untuk rehabilitasi lahan kritis marginal menjadi lahan yang produktif berkesinambungan. Tanaman ini berasal dari Filipina. Beberapa puluh tahun yang silam kemiri sunan ditanam secara besar-besaran dalam area perkebunan di daerah Karawaci dan Cilongok (Tangerang) sebagai tanaman penghasil minyak.

Minyak kemiri sunan mengandung racun sehingga tidak dapat dikonsumsi. VOSSEN dan UMALI (2002), menyatakan bahwa asam α-eleostearat dengan kandungan 50% dalam minyak merupakan senyawa yang mengakibatkan minyak kemiri sunan beracun. Minyak kemiri sunan

dapat digolongkan jenis minyak nabati yang mudah mengering. Minyak nabati adalah minyak yang mudah mengering dan termasuk jenis minyak dengan banyak ikatan rangkap, seperti minyak kacang kedelai, minyak kemiri, minyak biji karet, dan lain-lain. Minyak kemiri sunan dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan seperti sebagai insektisida alami yang sangat efektif untuk membunuh hama dan bahan pelapis cat kapal.

Tanaman kemiri sunan sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai tanaman penghasil bahan bakar nabati (BBN) yang dapat menjawab masalah konsumsi energi masa depan, karena penggunaan BBN lebih ramah lingkungan dan diperkirakan akan semakin ekonomis dengan semakin langkanya bahan bakar minyak (BBM). Pada gilirannya BBN akan memiliki prospek yang semakin baik untuk dikembangkan apalagi BBN merupakan sumber energi terbarukan yang didukung pengembangannya oleh pemerintah melalui regulasi dan kebijakan, pembiayaan serta penelitian dan pengembangan (SAMBODO, 2008).

Tanaman ini dapat ditemukan pada ketinggian hingga 1.000 m di atas muka laut, berbentuk pohon dengan kanopi yang lebar dan perakarannya dalam sehingga sangat baik sebagai tanaman konservasi. Tanaman ini dapat menghasilkan minyak nabati yang berpotensi sebagai bahan bio-diesel. Eksplorasi potensi genetik dari kemiri sunan ini akan sangat mendukung program pemuliaan dan pemanfaatannya di masa mendatang. Terlebih dengan perkembangan ilmu bioteknologi melalui teknik-teknik molekuler, maka usaha eksplorasi genetik akan lebih mudah dilakukan dan akan memperoleh hasil yang lebih akurat.

Variasi teknik molekuler sangat beragam tergantung cara pelaksanaan untuk mendapatkan data maupun tingkatan target data yang diinginkan sesuai kemudahan pelaksanaan, kapabilitas sumber daya manusia, fasilitas dan peralatan, serta kecukupan finansial (KARP *et al.,* 1997). Faktor dana atau biaya ini menjadi faktor penentu, karena penggunaan bahan kimia dan atau nitrogen cair yang harganya relatif mahal dan pengadaan bahannya yang terkadang memerlukan waktu yang sangat lama, sehingga menjadi penghambat dalam kegiatan di laboratorium. Untuk itu perlu dilakukan terobosan-terobosan penelitian yang dapat mengatasi permasalahan tersebut, khususnya untuk tanaman tahunan atau tanaman yang mengandung phenol tinggi, dengan cara memodifikasi metode-metode yang sudah ada, baik dalam hal pemakaian bahan kimia maupun pengaturan annealing temperatur pada saat *running* Polymerase Chain Reaction (PCR) pada tingkat yang paling optimal.

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). Ada tiga langkah utama dalam ekstraksi DNA, yaitu perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (SURZYCKI, 2000).

Dewasa ini perkembangan ilmu pengetahuan sangat pesat, diantaranya adalah perkembangan ilmu biologi molekuler yang memungkinkan diperolehnya suatu marka gen yang mengendalikan karakter target perbaikan dalam program pemuliaan tanaman. Penemuan teknik dalam memperoleh gen yang mengendalikan suatu karakter sebagai penanda atau marker molekuler, sangat membantu efektifitas maupun efisiensi dari pelaksanaan proses seleksi yang akan dilakukan. Marka molekuler berdasarkan polimorfisme yang terdeteksi pada tingkat makro molekul di dalam sel (GUPTA *et al*., 2002).

Seiring dengan berkembangnya ilmu pengetahuan yang mampu mendukung akselerasi kemajuan dari seleksi untuk mendapatkan karakter yang diinginkan, berbagai metode seleksi juga berkembang, antara lain adalah seleksi dilakukan pada tingkat gametofit dan sporofit (OTTAVIANO dan SARI-GORLA, 1993), seleksi secara *in vitro* (WENZEL dan FOROUGHI-WEBR, 1993), dan seleksi tingkat molekuler (ARUS dan MORINO-GONZALES, 1993). Metode PCR dengan menggunakan sepasang primer, yang meliputi : STSs (Sequence-Tagged Sites) dan (SCARs) Sequence Characterized Amplified Regions, DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism), SSRs (Simple Sequence Repeats), IFLP (Intron Fragment Length Polymorphism), ESTs (Expressed Sequence Tags), RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphism) dan REMAP (Retroposon-Microsatellite Amplified Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) dan modifikasinya, SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) dan melacak beberapa sifat QTL (Quantitative Trait Locus) (HERRAN *et al.*, 2000; LEBRUN *et al*., 2001).

Pemilihan jenis marka molekuler yang akan digunakan dalam seleksi harus benar-benar dipertimbangkan kesesuaiannya dengan fasilitas dan materi yang dimiliki untuk melakukan seleksi. Penyiapan atau purifikasi gen target juga sangat menentukan keberhasilan dari seleksi yang dilakukan. Dari berbagai jenis marka molekuler yang sudah ada, umumnya yang dipilih untuk dijadikan marka molekuler guna mendukung program seleksi antara lain adalah PCR berdasarkan marka, RFLP, RAPD, AFLP, SSR, dan QTL (HERRAN *et al.*, 2000; TEULAT *et al.*, 2000; LEBRUN *et al*., 2001).

Dalam bidang pemuliaan misalnya, penanda molekuler yang sering digunakan dalam kegiatan analisis keragaman genetik adalah RAPD (MAWIKERE, 2006; HANNUM *et al.*, 2003; MAFTUCHAH, 2001). RAPD adalah penanda berbasis PCR dengan menggunakan 10 basa primer acak. Teknik RAPD tidak memerlukan pelacak DNA atau informasi mengenai sekuens DNA yang dilacak. Prosedurnya sederhana dan mudah dalam hal preparasi, dapat dilakukan secara maksimal untuk sampel dalam

jumlah banyak, jumlah DNA yang diperlukan relatif sedikit, dan pengerjaannya tidak menggunakan senyawa radioaktif (KARP *et al.*, 1996). Pada tanaman tahunan RAPD dapat digunakan untuk meningkatkan efisiensi seleksi awal. Teknik RAPD memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya.

Sebelum melangkah pada kegiatan penelitian pencarian marka genetik dengan berbagai teknik seperti yang disebutkan pada alinea di atas, terlebih dahulu harus ditentukan teknik isolasi dan purifikasi DNA dari setiap tanaman yang akan diuji. Seringkali ditemukan hambatan dalam ekstraksi DNA, khususnya untuk tanaman tahunan, seperti kebanyakan pada tanaman koleksi yang dimandatkan pada Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri (BALITTRI). 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, sehingga berdampak pada biaya dan waktu.

Pada tulisan ini akan diuraikan teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efektif dan efisien (dari berbagai teknik yang pernah dicoba), tetapi dapat menghasilkan kualitas DNA yang bagus dan tidak terkontaminasi, sehingga hasil dari PCR akan menunjukkan pola pita yang jelas. Hal ini merupakan tahap awal yang sangat menentukan dalam kegiatan penelitian biologi molekuler, baik yang menggunakan metode sederhana maupun yang paling canggih sekalipun. Teknik isolasi DNA adalah faktor penentu keberhasilan tahap selanjutnya. Biasanya, teknik isolasi DNA untuk tanaman tahunan memerlukan perlakuan khusus seperti penggunaan nitrogen cair untuk membantu menghancurkan jaringan, penyimpanan sampel daun di ruang gelap atau ditutup kertas aluminium foil selama beberapa jam sampai satu malam (*over night*).

Percobaan ini mempunyai tujuan untuk mendapatkan teknik isolasi DNA berkualitas tinggi dari daun kemiri sunan dengan menggunakan kombinasi antioksidan polivinilpolipirolidon (PVPP) dan mercaptoethanol, namun tanpa penggunaan nitrogen cair sewaktu penggerusan ataupun penyimpanan lebih lama (*over night*) terhadap ekstrak daun yang telah digerus sebelum dilakukan purifikasi seperti yang sering dilakukan untuk tanaman tahunan, sehingga dapat menghemat biaya dan waktu.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor pada bulan Juli-September 2010. Materi genetik yang digunakan adalah contoh daun muda tanaman kemiri sunan yang diambil dari kebun koleksi plasma nutfah dan kebun Agro Widya Wisata, Pakuwon, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri (BALITTRI), Sukabumi. Sedangkan bahan lain adalah paket bahan kimia yang digunakan dalam kegiatan isolasi DNA pada umumnya. Alat yang digunakan adalah timbangan analitik, mesin PCR, perangkat elektroforesis, gel documentation, *waterbath,* sentrifus, *microwave oven,* lemari es dan *freezer, vortex mixer*, alat gelas, mortar dan pestel, spatula, gunting, pipet ukur, pipet mikro, tip mikro, pH meter, tabung mikrosentrifus, dan sarung tangan karet. Kegiatan meliputi beberapa tahapan:

Ekstraksi dan Purifikasi DNA

Protokol yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah prosedur ekstraksi yang dikembangkan oleh DOYLE dan DOYLE (1987) berbasis CTAB dengan modifikasi penambahan 2% Polivinilpolipirolidon (PVPP). Sampel daun muda segar (Gambar 1) dari Kemiri Sunan ditimbang sebanyak 0,5 - 0,7 g, lalu diletakkan dalam cawan porselein steril dan ditambahkan 400 ul buffer ekstraksi CTAB kemudian digerus dengan mortar steril sampai daun lumat. Daun sampel yang telah lumat dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 2 ml, kemudian ditambahkan kembali buffer ekstraksi CTAB sebanyak 400 µl dan divortex selama 2-3 menit.

Tahapan selanjutnya dilakukan inkubasi sampel dalam *water bath* bersuhu 65°C selama 15 menit sambil tabung dibolak-balik setiap 5 menit. Tahapan ini dilakukan untuk mengoptimalkan kerja buffer ekstrak yang ditambahkan ke dalam sampel. Sampel kemudian divortex selama 2-3 menit, selanjutnya dilakukan sentrifugasi sampel dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Tujuannya untuk memisahkan debris dan komponen sel lain yang menjadi penyebab kontaminasi dengan DNA.

Gambar 1. Daun muda yang digunakan untuk sampel
Figure 1. Young leaf used for DNA extraction sample

Supernatan yang telah diperoleh kemudian diambil dan ditambahkan dengan larutan Chloroform: Isolamyl-alkohol atau Chisam dengan perbandingan 24:1. Penambahan chisam ini dilakukan untuk mengekstraksi DNA dari kontaminan. Chloroform merupakan pelarut organik yang dapat melarutkan protein, lipid, dan molekul lain seperti polisakarida, sehingga diharapkan akan diperoleh supernatan berisi DNA yang bebas kontaminan. Suspensi kemudian divortex sampai rata untuk optimalisasi homogenasi.

Selanjutnya suspensi disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 25°C selama 10 menit, sehingga diperoleh suspensi dengan tiga lapisan; lapisan atas berwarna hijau jernih, lapisan tengah berwarna hijau keruh, dan lapisan bawah berupa pelet yang berwarna hijau tua. Supernatan pada lapisan paling atas diambil dan ditambahkan dengan 2/3 x volume larutan isopropanol dingin untuk presipitasi DNA. Supernatan yang telah ditambahkan isopropanol kemudian digoyang perlahan-lahan dengan cara membolak-balikkan tabung. Untuk mengendapkan DNA (pelet DNA), larutan disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit.

Endapan DNA dicuci dua kali dengan 70% etanol sebanyak 500 ul, disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm dengan suhu 4°C, kemudian cairan etanol dibuang dan pelet DNA dikeringanginkan, lalu dilarutkan dalam 50 µL bufer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) dan ditambahkan 1 µL RNAse A (10 mg/mL) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit sampai 1 jam. DNA disimpan dalam refrigerator sampai siap digunakan.

Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

DNA hasil isolasi selanjutnya dilakukan cek kuantitas dan kualitas untuk melihat konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan spektrofotometer dan elektroforesis gel. Pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan protein diukur pada panjang gelombang 280. Kemurnian larutan DNA dapat dihitung melalui perbandingan A_{260} nm dengan A_{280} nm. Batas kemurnian yang biasa dipakai dalam analisis molekuler pada rasio A_{260}/A_{280} adalah 1,8-2,0 (SAMBROOK *et al.,* 1989).

DNA yang sudah diukur konsentrasinya diencerkan sehingga mendapatkan konsentrasi yang seragam untuk digunakan dalam analisis PCR. Selanjutnya dilakukan pengecekan kualitas DNA dengan elektroforesis gel untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA dari kontaminan RNA dan keutuhan DNA hasil isolasi.

Amplifikasi DNA

Reaksi amplifikasi DNA dilakukan menggunakan Mesin PCR (MJ Research tipe PCT-100), dengan kondisi PCR sebagai berikut: satu siklus 3 menit pada suhu 94°C, dan diikuti dengan 45 siklus selama 1 menit pada suhu 94°C (denaturasi), 1 menit pada suhu 37°C (annealing), 2 menit pada suhu 72°C (ekstensi). Seluruh produk amplifikasi DNA dilengkapi dengan ekstensi selama 1 menit pada suhu 72°C. Analisis PCR dilakukan dengan total reaksi 20 µl mengandung 10 ng DNA genomik cetakan, masing-masing dNTP 0,1 µM (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), masing-masing primer RAPD 0,25 pmol, enzim *Taq DNA polymerase* 0,04 unit dalam larutan buffer 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glycerol, 0,5%, Tween 20, 0,5% nonidet P40 dan $MgCl_2$ 1,5mM). Hasil amplifikasi divisualisasikan menggunakan elektroforesis horizontal dengan gel agarose 1,5% (w/v) dalam buffer 1x TAE. Gel agarose kemudian direndam di larutan EtBr, sehingga pola pita dapat dilihat di bawah sinar ultraviolet. Hasil elektroforesis difoto menggunakan BIO-RAD Gel Doc™ EQ.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berbagai teknik atau metode dapat dilakukan untuk mengisolasi DNA tergantung dari jenis tanaman, organ tanaman atau jaringan tanaman yang digunakan. Tetapi pada dasarnya ada tiga faktor penentu dalam ekstraksi dan purifikasi DNA secara optimal : 1) Penghomogenan jaringan tanaman, 2) Komposisi penambahan larutan buffer pada saat penggerusan daun/jaringan tanaman sampel, dan 3) Penghilangan enzim penghambat polisakarida khususnya untuk tanaman tahunan.

Tanaman kemiri sunan merupakan tanaman tahunan yang mengandung senyawa metabolit sekunder yang cukup tinggi, seperti getah dan polifenol, sehingga perlu dilakukan optimasi dalam mengisolasi DNAnya untuk memperoleh DNA dengan kualitas yang tinggi. DNA tanaman dengan kualitas rendah akan menyebabkan hasil amplifikasi fragmen DNA tidak optimum. Oleh sebab itu modifikasi pada metode ekstraksi yang sudah baku pada tanaman tertentu perlu dilakukan.

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. Hal ini sesuai dengan hasil beberapa peneliti terdahulu, diantaranya SURZYCKI (2000); SANTOSO (2005), mengatakan bahwa bufer CTAB dengan kandungan garam yang tinggi dapat memisahkan polisakarida dari dinding sel. 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.

Hasil pengecekan kualitas dan kuantitas dengan spektrofotometer menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh dari sampel-sampel kemiri sunan memiliki kualitas dan kuantitas DNA yang cukup baik (Tabel 1). Kuantitas DNA yang diperoleh mempunyai kisaran antara 668,80 - 5.031,39 ng/ul. Jumlah DNA ini relatif cukup banyak dan dapat digunakan untuk analisis PCR sampai ratusan kali. Sementara itu, kualitas 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 A_{260}/A_{280} dalam kisaran 1,8-2,0.

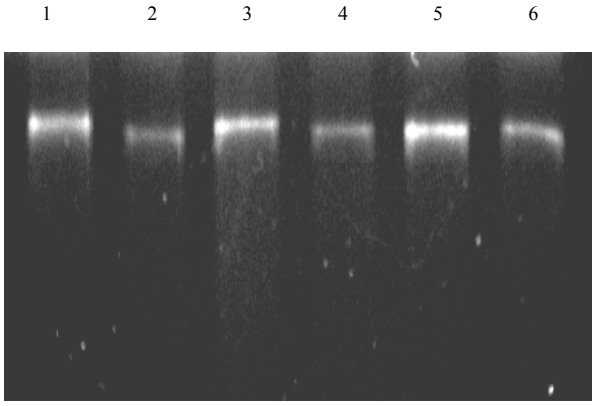
Hasil pengecekan kualitas DNA dengan menggunakan gel elektroforesis 1% juga menunjukkan hasil yang cukup memuaskan dimana DNA yang diperoleh terlihat utuh (Gambar 2). DNA yang utuh ditandai dengan tidak adanya *smear* DNA yang dielektroforesis. Hal ini menjadi penting karena pada proses PCR, DNA yang 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 kali ini adalah kombinasi penambahan antioksidan polivinilpolipirolidon (PVPP) dan mercaptoethanol pada buffer ekstraksinya. Dengan kombinasi ini dihasilkan kualitas DNA yang baik. PVP dan

Tabel 1. Hasil pengecekan kualitas dan kuantitas DNA kemiri sunan menggunakan spektrofotometer

Table 1. Checking result of DNA quantity and quality of Reutalis trisperma *by using spectrophotometer*

Sampel *Sample*	Konsentrasi (ng/µl) *Concentration (ng/µl)*	Kemurnian (A260/A280) *Purity (A260/A280)*
Sampel 1	3.863,31	1,80
Sampel 2	4.546,55	1,81
Sampel 3	2.823,42	1,86
Sampel 4	2.562,01	1,79
Sampel 5	5.031,39	1,80
Sampel 6	668,80	1,92



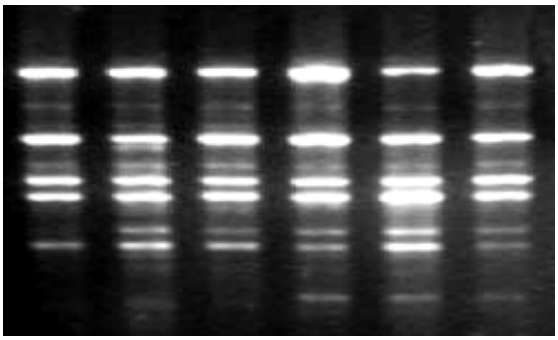
Gambar 2. Hasil pengecekan kualitas DNA sampel kemiri sunan dengan gel elektroforesis 1%

Figure 2. Checking result of DNA quality of Reutalis trisperma with electrophorsis gel 1%

mercatoethanol 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 A_{260}/A_{280} (Tabel 1 dan Gambar 2).

Untuk membuktikan bahwa DNA yang telah diperoleh mempunyai kualitas yang sangat baik maka DNA tersebut digunakan sebagai cetakan (template) untuk analisis PCR dengan menggunakan program RAPD. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer RAPD OPB-17 menunjukkan bahwa DNA yang diamplifikasi menghasilkan pita DNA (amplikon) yang sangat bagus dimana pola pita DNA terlihat sangat jelas dan tebal (Gambar 3). Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa teknik isolasi DNA yang dipakai dalam kegiatan ini adalah sangat memberikan hasil yang nyata dan memenuhi syarat untuk digunakan dalam ekstraksi DNA kemiri sunan. Beberapa penelitian tentang optimasi isolasi DNA dan protokol untuk PCR-RAPD juga telah dilakukan untuk tanaman aromatik dan obat-obatan serta tanaman endemik (PADMALATHA dan PRASAD, 2006; TRIDJATMIKO, 2006; SAHASRABUDHE dan DEODHAR, 2010).

Keberhasilan di atas, telah memberikan hasil bahwa dengan cara menghilangkan penggunaan nitrogen cair yang relatif sulit didapatkan, di samping juga harganya yang cukup mahal, tanpa penyimpanan sampel jaringan yang akan diisolasi serta dengan memodifikasi teknik yang digunakan dapat memberikan hasil DNA yang sangat murni dan pola pita yang sangat jelas ketika dilakukan proses PCR. Hal ini memberikan efek yang sangat signifikan pada pembiayaan dan efektivitas waktu, sehingga proses analisis molekuler bisa lebih hemat dan cepat.



Gambar 3. Contoh pola pita hasil amplifikasi PCR menggunakan cetakan DNA kemiri sunan hasil ekstraksi dengan teknik miniprep CTAB

Figure 3. Band pattern of PCR amplification obtained by using DNA template of Reutalis trisperma *with miniprep CTAB technique*

Dalam percobaan ini, pengerjaan ekstraksi dan isolasi DNA lebih difokuskan pada bagaimana memodifikasi bahan kimia dan teknik yang digunakan, misalnya pada saat penggerusan, pemvortekan sampel, dan pengaturan temperatur annealing yang digunakan pada saat denaturasi. Menurut SUBANDIYAH (2006), kegagalan dalam PCR sering disebabkan karena proses denaturasi yang tidak sempurna. Suhu yang diprogramkan biasanya 95°C selama 30 detik atau 97°C selama 15 detik. Sedangkan ARDIANA (2009) menyatakan bahwa untuk DNA yang mengandung G+C tinggi, suhu perlu dinaikkan atau waktu denaturasi diperpanjang tetapi tidak terlalu lama dan suhunya tidak terlalu tinggi karena akan merusak enzim Taq D-pol yang umumnya mempunyai waktu paruh 40 menit pada 95°C.

KESIMPULAN DAN SARAN

Teknik ekstraksi DNA berbasis CTAB dengan memodifikasi serta penambahan antioksidan polivinil-polipirolidon (PVPP) dan mercaptoethanol, tanpa penggunaan nitrogen cair ataupun penyimpanan lebih lama (*over night*) ekstrak daun yang telah digerus sebelum dilakukan purifikasi seperti yang sering dilakukan untuk tanaman tahunan, dapat dilakukan pada sampel daun kemiri sunan dengan memberikan hasil yang sangat memuaskan. Kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan dapat digunakan dengan baik untuk proses PCR terlihat dari pola pita DNA yang dihasilkan sangat jelas dan tebal. Dengan demikian, teknik ekstraksi ini cukup menghemat waktu dan biaya yang dapat ditekan seefektif dan seefisien mungkin. Selanjutnya untuk isolasi DNA tanaman tahunan lain yang mempunyai kemiripan dengan kemiri sunan atau yang mempunyai kandungan phenol tinggi, disarankan untuk mengikuti protokol seperti yang dilakukan pada kemiri sunan.

DAFTAR PUSTAKA

ARDIANA, D.W. 2009. Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi bufer CTAB. Bul. Teknik Pertanian. 14(1): 12-16.

ARUS, P. and J. MORENO-GONZALES. 1993. Marker-assisted selection. *In*: Hayward, M.D., N.O. Bosemark, and I. Romagosa (Eds.) Plant Breeding: Principles and Prospects. Chapman & Hall. London. p.314 - 331.

DOYLE, J.J. and J.L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.

GUPTA, P.K., R.K. VARSHNEY, and M. PRASAD. 2002. Molecular Markers: Principles and Methodology. *In:* Jain, S.M., D.S. Brar, and B.S. Ahloowalia (Eds.). Molecular Techniques in Crop Improvement. p.9-54.

HANNUM, S., A. HARTANA, dan SUHARSONO. 2003. Kemiripan genetik empat populasi kelapa genjah berdasarkan random amplified polymorphic DNA. Hayati 10(4): 125-129.

HERRAN, A., L. ESTIOKO, D. BECKER, and M.J.B. RODRIQUEZ. 2000. Linkage mapping and QTL analysis in coconut. Theor. Appl. Genet. 101:292 - 300.

JOSE, J. and R. USHA. 2000. Extraction of geminiviral DNA from a highly mucilaginous plant (*Abelmoschus esculentus*). Plant Mol. Biol. Rep. 18: 349 - 355.

KARP, A., O. SEBERG, and M. BUIATTI. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. Ann. Bot. 78: 143 - 149.

KARP, A., S. KRESOVICH, K.V. BHAT, W.G. AYAD, and T. HODGKIN. 1997. Molecular tool in plant genetic resources conservation: A guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin. No. 2.

LEBRUN, P., L. BAUDOUIN, R. BOURDEIX, J.L. KONAN, J.H.A. BARKER, C. ALDAM, A. HERRÀN, and E. RITTER. 2001. Construction of a linkage map of the rennel island tall coconut type (*Cocos nucifera* L.) and QTL analysis for yield characters. Genome. 44:962-970.

MAFTUCHAH. 2001. Strategi pemanfaatan penanda molekuler dalam perkembangan bidang hortikultura. Makalah Sarasehan Pemanfaatan Penanda Molekuler di Bidang Hortikultura. Perhorti Jatim - Deptan.

MAWIKERE, N.L. 2006. Plasma nutfah kelapa Papua dan hubungan kekerabatannya dengan populasi kelapa Indonesia lainnya dan Papua New Guinea berdasarkan penanda RAPD. Disertasi Doktor Sekolah Pascasarjana, IPB. Bogor.

OTTAVIANO, E. and M. SARI-GORLA. 1993. Gametophytic and Sporophytic Selection. *In:* Hayward, M.D., N.O. Bosemark, and I. Romagosa (Eds.) Plant Breeding: Principles and Prospects. Chapman & Hall. London. p.332-352.

PADMALATHA, K. and M.N.V. PRASAD. 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. Afr. J. Biotechnol. 5:230-234.

SAHASRABUDHE, A. and M. DEODHAR. 2010. Standardization of DNA extraction and optimization of RAPD-PCR condition in *Garcinia indica*. International Journal of Botany. 6(3): 293-298.

SAMBODO, M.T. 2008. Energy sector in Indonesia and environmental impact: from fossil fuel to biofuel. Jurnal Ekonomi dan Pembangunan, XVI(1): 1-9.

SAMBROOK, J. and D.W. RUSSEL. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold-Spring Harbor Laboratory Press. 2nd edition 165p.

SANTOSO, P.J. 2005. Modified CTAB-based DNA isolation procedure for fruit crops. Jurnal Stigma XIV(1):1-4.

SUBANDIYAH, S. 2006. Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi atau Identifikasi Patogen Tumbuhan. Beberapa Metode Ekstraksi DNA. Pelatihan dan Workshop Identifikasi DNA dengan Aplikasi PCR. Malang. p.43-50.

SURZYCKI, S. 2000. Basic Techniques in Molecular Biology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

TEULAT, B., C. ALDAM, R. TREHIN, P. LEBRUN, J.H.A. BARKER, G.M. ARNOLD, A. KARP, L. BOUDOUIN, and F. ROGNON. 2000. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) population from across the geographic range using sequence-tagged micro-satellite (SSRs) and RFLPs. Theor. Appl. Genet. 100:764-771

TRIDJATMIKO, K.R. 2006. Penggunaan Metode PCR untuk Deteksi Cepat Keragaman DNA. Pelatihan dan Workshop Identifikasi DNA dengan Aplikasi PCR. Malang. p.22-25.

VOSSEN, H.A.M. dan B.E. UMALI. 2002. Plant Resources of South-East Asia No 14. Prosea Foundation. Bogor. Indonesia.

WENZEL, G. and B. FOROUGHI-WEBR. 1993. *In vitro* Selection. *In:* Hayward, M.D., N.O. Bosemark, and I. Romagosa (Eds.) Plant Breeding: Principles and Prospects. Chapman & Hall. London. p.353 - 370.