

Isolasi DNA Daun Jagung Menggunakan Metode Delaporta dan CIMMYT yang Dimodifikasi

Haeni Purwanti

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Isolasi DNA daun jagung menggunakan metode Delaporta dari Universitas Delaporta dan CIMMYT yang dimodifikasi dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor dan Laboratorium Genetika, IPB-UPLB, Filipina. Tujuan percobaan adalah mencari prosedur ekstraksi DNA daun jagung yang sesuai dan memberikan hasil yang optimal. DNA daun jagung berhasil diisolasi dengan metode Delaporta yang biasa digunakan untuk mengekstraksi DNA padi dan tanaman lainnya di Universitas Delaporta dan telah dimodifikasi. Kuantitas DNA yang berhasil diisolasi dari tiap sampel cukup banyak, namun kualitasnya kurang bagus. Sediaan DNA yang diperoleh umumnya terdegradasi, sehingga tidak dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya, misalnya untuk diamplifikasi dengan teknik PCR atau dipotong dengan enzim restriksi pada analisis menggunakan teknik RFLP. Ekstraksi DNA daun jagung menggunakan metode yang direkomendasikan oleh CIMMYT dapat menghasilkan isolat DNA yang baik, berupa pelet berwarna putih, sehingga diharapkan dapat digunakan untuk analisis selanjutnya.

Kata kunci: Isolasi DNA, daun jagung, metode Delaporta, metode CIMMYT

ABSTRACT

DNA extraction from maize leaves were done using two modified methods of Delaporta from Delaporta University and CIMMYT in the Biology Molecular Laboratory of Research Institute for Food Crop Biotechnology, Bogor and the Genetic Laboratory of the Institute of Plant Breeding, UPLB, Philippines. The study was aimed to obtained a proper method to prepare pure DNA isolates that will be used in another research activity. DNA from the maize leaves were successfully isolated using the modified method of Delaporta, which was usually used to extracted DNA from rice leaf in Delaporta University. Quality of the isolated DNA, however, was not good, since most of the DNAs were degraded. DNA isolation using the modified method of CIMMYT resulted in a better quality of DNAs. PCR amplification or enzyme restriction of the DNA samples will be done following an RFLP analysis.

Key words: DNA extraction, maize leaves, Delaporta method, CIMMYT method

PENDAHULUAN

Sampai saat ini produksi jagung nasional terus meningkat, tetapi belum mampu mengimbangi kebutuhan yang semakin membengkak. Volume impor jagung sudah mencapai rata-rata satu juta ton per tahun pada empat tahun terakhir ini. Selain untuk pangan, jagung juga digunakan untuk pakan dan bahan baku industri. Meningkatnya nilai kurs dolar akhir-akhir ini

berpengaruh langsung terhadap kenaikan harga pakan yang sebagian besar menggunakan jagung sebagai bahan bakunya (Puslitbangtan, 1998).

Penyakit bulai merupakan salah satu kendala utama produksi jagung. Selama 15 tahun terakhir, 38 varietas jagung telah dilepas dan disebarluaskan ke petani. Hampir seluruh varietas jagung tersebut dilaporkan mempunyai ketahanan terhadap penyakit bulai yang disebabkan oleh *Peronosclerospora maydis*. Penyakit tersebut mengakibatkan kerusakan yang serius pada berbagai sentra produksi jagung di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Sulawesi Selatan, Lampung, dan Sumatera Utara. Meskipun sudah ada varietas jagung yang tahan terhadap bulai, petani masih menggunakan fungisida Ridomil yang harganya mahal dan tidak ramah lingkungan.

Penggunaan varietas jagung yang telah diperbaiki secara genetika merupakan salah satu cara untuk meningkatkan produksi jagung. Prinsip dari teknik ini adalah mendapatkan susunan gen baru, yang dalam budidayanya menunjukkan keunggulan-keunggulan tertentu dibandingkan dengan induknya (Ismunadji *et al.*, 1988).

Deoxyribonucleic acid (DNA) adalah biomakromolekul penyusun utama kromosom dan mengandung semua informasi genetika. Informasi genetika yang terdapat pada DNA memiliki dua fungsi, yaitu (1) sebagai sumber informasi pada sintesis molekul-molekul protein sel atau organisme dan (2) sebagai sumber informasi yang akan diturunkan kepada sel anak (Martin, 1987).

DNA sebagai sumber informasi yang diturunkan kepada sel anak dapat dijadikan dasar dalam menentukan kekerabatan suatu organisme, misalnya teknik DNA *fingerprinting*. DNA *fingerprinting* (sidik jari DNA) adalah suatu pola fragmen DNA dari suatu individu dengan ukuran yang berbeda pada suatu gel *Southern* (*Southern gel*), yang ditimbulkan atau akibat oleh satu atau banyak loci *variable number of tandem repeat* (VNTR) (Li Jin dan Chakraborty, 1994). Pola dari fragmen tersebut didasarkan pada *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), yaitu variasi polimorfisme panjang fragmen tertentu DNA yang direstriksi akibat adanya mutasi yang terjadi dalam waktu yang lama (Khush dan Toenniessen, 1991).

Keberhasilan teknik sidik jari DNA dan *Southern gel* sangat ditentukan oleh teknik isolasi DNA. Hal ini penting karena teknik tersebut membutuhkan DNA murni dan utuh dalam jumlah yang memadai. Hasil penelitian ini diharapkan meningkatkan hasil jagung dengan memperbaiki varietas yang berpotensi hasil tinggi yang dikombinasikan dengan ketahanan terhadap bulai melalui seleksi markah molekuler.

BAHAN DAN METODE

Percobaan dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor dan Laboratorium Genetika, *Institute Plant Breeding (IPB) University of Philippines at Los Banos, Philippines*, Instalasi Penelitian Bioteknologi (Inlitbio) Cikeumeuh, dan Kebun Percobaan IPB, Los Banos, pada musim hujan (MH) dan musim kemarau (MK) 1999/2000.

Alat yang digunakan, yaitu gunting, vortex, peralatan sentrifuse, mortar, inkubator dan shaker, tabung propeline, tabung corning, tabung eppendorf, pipet pas-teur, *waterbath*, dan spectrophotometer-uv Hitachi 150-20. Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah silika gel, larutan NaOH 1 N, larutan Na₂CO₃ 0,5 N, bufer Tris-HCl 100 mM pH 7,5, larutan EDTA 40 mM, larutan SDS 10%, larutan Na-asetat 3 M, kloroform, isoamilalkohol, isopropanol, etanol 70%, bufer TE, nitrogen cair, CTAB, Na-bisulfite, dan air bebas ion. Benih jagung sebanyak 62 galur yang terdiri dari galur lokal dari Indonesia dan galur luar dari CIMMYT. Resep bufer ekstraksi (Delaporta dan CTAB) disajikan pada Tabel 1.

Metode Delaporta yang Dimodifikasi

Sebanyak 5 g daun jagung digiling dengan mortar dalam nitrogen cair kemudian dipindahkan ke dalam tabung falcon 50 ml tertutup dan disimpan dalam es atau *freezer* dengan suhu -70°C. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan 20 ml bufer ekstraksi dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit. Sebanyak 5 ml kalium asetat 5 M ditambahkan ke dalam tabung dan disimpan pada suhu -20°C selama 20 menit. Campuran disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan disaring dengan filter Miracloth steril ke dalam tabung corning 50 ml kemudian ditambahkan 20 ml kloroform dan

Tabel 1. Resep bufer ekstraksi

Bahan	Komposisi per liter
Bufer ekstraksi (Delaporta)	
NaCl	14,61 g
Basa Trisma	12,11 g
EDTA	18,07 g
SDS	25,00 g
Air suling sampai volume larutan pH diatur dengan HCl	1 l
Bufer ekstraksi (CTAB)	
D H ₂ O	650 ml
1 M Tris pH 7,5	100 ml
1M NaCl	140 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	100 ml
CTAB	10 g
Na-bisulfite	14,56 g

isoamilalkohol dengan perbandingan 24 : 1 dan di-sentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung corning yang steril dan ditambah 2/3 volume isopropanol. Campuran disimpan pada suhu -20°C. DNA diambil menggunakan alat pemancing, dicuci dengan etanol 70% dan diresuspensi ke dalam 200-250 µl TE dalam tabung eppendorf 1,5 ml.

Metode CIMMYT yang Dimodifikasi

Sebanyak 1 g daun jagung (dalam 50 ml tabung sentrifugasi) yang sudah di-giling dengan mortar dalam nitrogen cair dikeluarkan dari *biofreezer* dengan suhu -80°C, ditambahkan 27 ml larutan ekstrak bufer CTAB dicampur sampai rata. Selanjutnya diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 65°C selama 60 menit, setiap 15 menit dicampur sampai merata. Setelah itu, disaring dengan kain kasa, larutan ditampung dalam 50 ml tabung, disentrifugasi dan ditambah kloroform dan iso-amilalkohol dengan perbandingan 24 : 1 sampai mencapai volume 40 ml, dikocok merata selama 5 menit. Larutan tersebut disentrifugasi pada 2500 rpm selama 20 menit. Larutan di atas endapan dipipet, dipindahkan pada 50 ml tabung sentrifugasi baru (tanpa menyentuh endapan kloroformnya) ditambah isopropanol suhu pada suhu -20°C sampai volumenya mencapai 35 ml, dikocok sampai merata, dan di-sentrifugasi 2500 rpm selama 3 menit pada suhu 23°C. Isopropanol dibuang dan ditambah Wash 1 (76% ethanol + 0,2 M NaO asetat) selama 20 menit, DNA dipindahkan dengan pemancing ke dalam eppendorf 1,5 ml dan ditambah 1 ml Wash 2 (76% ethanol + 10 mM NH₄ asetat). DNA dikeringkan kurang lebih selama 30 menit, ditambah 400 µl TE + RNase, dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam dengan dikocok setiap 15 menit. Suspensi disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit, supernatan dipindahkan ke tabung eppendorf 0,5 ml dan diberi label.

Pengukuran Konsentrasi DNA

Sebanyak 50 ml, 1% Agarose dalam 1 x TBE dituangkan pada cawan mikrofilter (*microplate*) yang mempunyai 96 lubang sumur yang kering dan bersih. Pada setiap lubang sumur dituangkan 17 µl *blue juice*, 3 ekstrak DNA dicampurkan pada setiap lubang sumur yang sudah diberi *blue juice*, dimulai pada lubang sumur kelima dituangkan standar lambda DNA 10 µl (5, 10, 20, dan 40 ng/µl) pada lubang sumur kesatu sampai keempat. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama 30 menit atau bila pewarna biru sudah berpindah sepanjang 6 cm dari titik awal pewarna pada agar. Setelah elektroforesis, agar diberi warna ethidium bromida selama 15 menit, diamati dengan sinar ultra violet kemudian difoto dengan kamera polaroid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA 62 galur jagung dengan metode Delaporta yang dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balitbio disajikan pada Tabel 2. Keadaan

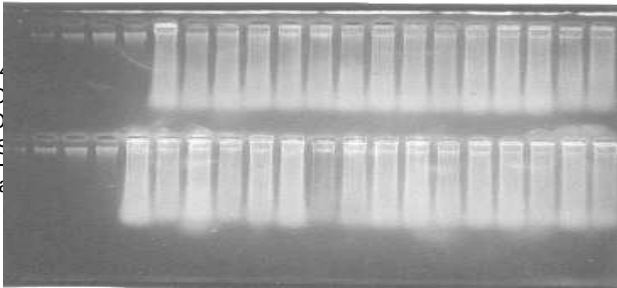
DNA jagung sudah rusak sehingga tidak dapat dianalisis selanjutnya (Gambar 1). Hasil isolasi DNA 12 galur jagung menggunakan metode CIMMYT yang dimodifikasi di laboratorium IPB, Los Banos, Filipina disajikan pada Tabel 3. DNA jagung cukup baik sehingga dapat dianalisis selanjutnya (Gambar 2).

Hasil isolasi DNA menggunakan metode CIMMYT yang dimodifikasi lebih bagus dibandingkan dengan hasil isolasi menggunakan metode Delaporta karena perbedaan bufer yang digunakan. Metode Delaporta memakai bufer SDS dan me-

Tabel 2. Hasil DNA daun jagung dari 62 galur inbred yang digunakan untuk heterosis. Bogor 1999

No.	Sampel gel atas	Kepekatan	No.	Sampel gel bawah	Kepekatan
1.	-		1.	-	
2.	Lambda DNA	5 ng/μl	2.	Lambda DNA	5 ng/μl
3.	Lambda DNA	10 ng/μl	3.	Lambda DNA	10 ng/μl
4.	Lambda DNA	20 ng/μl	4.	Lambda DNA	20 ng/μl
5.	Lambda DNA	40 ng/μl	5.	Lambda DNA	40 ng/μl
6.	Semar 3	3 μl	6.	IMrs-26	3 μl
7.	SIN.AMTSR-76-1-1-B-1-BBBB-5##BBBBBBBBB	3 μl	7.	P345C5S1B-15-4-2-1-2-1-2-B	3 μl
8.	Pool2(FS)C7	3 μl	8.	IMrs-15	3 μl
9.	Wis-D13		9.	AMATLCOHS-115-1-2-3-3-1-2-B-B	3 μl
10.	IMrs-18	3 μl	10.	CML281	3 μl
11.	P24(STE)C2-29-BBBB#-3-BBBBBBB	3 μl	11.	IMrs-2	3 μl
12.	IMrs-7	3 μl	12.	IMrs-8	3 μl
13.	IMrs-19	3 μl	13.	IMrs-24	3 μl
14.	IMrs-20	3 μl	14.	P345C4S2B46-2-2-1-2-B-B	3 μl
15.	IMrs-28		15.		3 μl
16.	IMrs-25		16.		3 μl
17.	P300C5S2B-4		17.		3 μl
18.	AMATL(HS)C		18.		3 μl
19.	Bisma(S2)CO		19.		3 μl
20.	AMATLCOGS		20.		3 μl

Setiap galur inbred ja



digabungkan

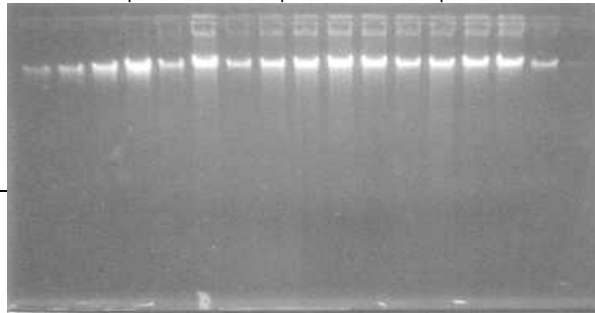
Gel atas: 1 = kosong, 2 = Lambda DNA 5, 3 = Lambda DNA 10, 4 = Lambda DNA 20, 5 = Lambda DNA 40, 6 = Semar 3, 7 = SIN.AMTSR-76-1-1-B-1-BBBB-5##BBBBBBBBB, 8 = Pool2(FS)C7, 9 = Wis-D13, 10 = IMrs-18, 11 = P24(STE)C2-29-BBBB#-3-BBBBBBB, 12 = IMrs-7, 13 = IMrs-19,

14 = IMrs-20, 15 = IMrs-28, 16 = IMrs-25, 17 = P300C5S2B-46-2-2-1-2-B-B-B, 18 = AMATL(HS)C1, 19 = Bisma(S2)CO-182-1-4, 20 = AMATLCOGS-9-1-1-1-1-2-B; Gel bawah: 1 = kosong, 2 = Lambda DNA 5, 3 = Lambda DNA 10, 4 = Lambda DNA 20, 5 = lambda DNA 40, 6 = IMrs-26, 7 = P345C5S1B-15-4-2-1-2-1-2-B, 8 = IMrs-15, 9 = AMATLCOHS-115-1-2-3-3-1-2-B-B, 10 = CML281, 11 = IMrs-2, 12 = IMrs-8, 13 = IMrs-24, 14 = P345C4S2B46-2-2-1-2-B-B-B, 15 = G26-C25-HS45-3-4-1-6-BBBB, 16 = Nei9203, 17 = Nei9204, 18 = Nei9202, 19 = Nei9008, 20 = AMATLCOHS-245-1-1-1-2-1-1-B-B

Gambar 1. Elektroforesis gel DNA daun jagung dari 62 galur inbred yang digunakan untuk heterosis gel atas

Tabel 3. Hasil kuantifikasi DNA daun jagung dari 12 galur inbred untuk heterosis. Filipina, 1999

No.	Sampel	Kepekatan	Kepekatan	Kepekatan
1.	Lambda 5	50 ng/μl		
2.	Lambda 10	100 ng/μl		
3.	Lambda 20	200 ng/μl		
4.	Lambda 40	400 ng/μl		
5.	Imrs-1-μl.5	3 μl	50 μl	16,6
6.	Imrs-1-μl.10	3 μl	200 μl	66,6
7.	Imrs-2-μl.2	3 μl	50 μl	16,6
8.	Imrs-3-μl.7	3 μl	200 μl	66,6
9.	Imrs-7-μl.3	3 μl	200 μl	66,6
10.	Imrs-7-μl.4	3 μl	200 μl	66,6
11.	Imrs-7-μl.5	3 μl	200 μl	66,6
12.	Imrs-7-μl.6	3 μl	200 μl	66,6
13.	Imrs-15-μl.9	3 μl	200 μl	66,6
14.	Imrs-17-μl.1	3 μl	200 μl	66,6
15.	Imrs-17-μl.2	3 μl	200 μl	66,6
16.	Imrs-18-μl.8	3 μl	200 μl	66,6



1 = Lambda 5, 2 = Lambda 10, 3 = Lambda 20, 4 = Lambda 40, 5 = Imrs-1-μl.5, 6 = Imrs-1-μl.10, 7 = Imrs-2-μl.2, 8 = Imrs-3-μl.7, 9 = Imrs-7-μl.3, 10 = Imrs-7-μl.4, 11 = Imrs-7-μl.5, 12 = Imrs-7-μl.6, 13 = Imrs-15-μl.9, 14 = Imrs-17-μl.1, 15 = Imrs-17-μl.2, 16 = Imrs-18-μl.8

Gambar 2. DNA daun jagung dari 12 galur inbred untuk hetero-sis yang berhasil diisolasi

tode CIMMYT menggunakan bufer CTAB. Perbedaan lainnya adalah waktu inkubasi. Pada metode Delaporta, waktu inkubasinya 15 menit sedangkan pada metode CIMMYT selama 60-90 menit. Ekstrak bufer CTAB tampaknya lebih dapat mencuci kotoran atau protein yang menempel pada DNA jagung dibandingkan dengan ekstrak bufer SDS. Waktu inkubasi yang lebih lama di dalam bufer tampaknya juga berpengaruh terhadap kebersihan DNA jagung.

KESIMPULAN

DNA daun jagung berhasil diisolasi dengan modifikasi metode Delaporta yang biasa digunakan untuk ekstraksi DNA padi dan tanaman lain di Universitas Delaporta dengan kuantitas DNA yang cukup tinggi, namun kualitasnya tidak bagus dan rusak. Ekstraksi DNA daun jagung menggunakan modifikasi metode CIMMYT menghasilkan kualitas DNA yang cukup baik.

PUSTAKA

- Ismunadji, M., Mahyuddin Syam, dan Yuswadi. 1988.** Padi. Buku I. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor. 321 hlm.
- Khush, G.S. and G.H. Toenniessen. 1991.** Rice Biotechnology. IRRI, Los Banos and CAB International, Kew, Surrey. 4 p.
- Li Jin and R. Chakraborty. 1994.** Population dynamics of DNA fingerprint patterns within and between populations. *Genetical Research* 63(1):1-9.
- Martin, B. 1987.** Harpers review of biochemistry. Edisi 20, EGC. Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. 1998.** Laporan Kemajuan Penelitian Puslitbangtan 1998. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor. 311 hlm.