

# OPTIMASI SUHU, LAMA INKUBASI DAN KONDISI DAUN PADA METODE EKSTRAKSI DNA SORGUM

**Fristy Damanik**

Balai Penelitian Tanaman Serealia

HP. 082188155683

E-mail : [fristydamanik09@gmail.com](mailto:fristydamanik09@gmail.com)

## ***Ringkasan***

*Sorgum merupakan tanaman serealia serbaguna yang potensial untuk dikembangkan. Oleh karenanya perlu kajian salah satunya yaitu dengan teknik molekuler berbasis DNA. Ekstraksi DNA merupakan proses penghancuran sel untuk memisahkan DNA dari protein dan polisakarida. Proses ekstraksi DNA yaitu pengaturan suhu dan lama inkubasi sangat menentukan kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan sehingga perlu dilakukan kajian dan optimasi. Kegiatan bertujuan untuk mengkaji suhu dan lama inkubasi yang optimal dalam mengekstraksi DNA dari daun sorgum dengan kondisi berbeda. Metode yang digunakan meliputi persiapan sampel daun sorgum, ekstraksi DNA dan uji kuantitatif DNA. Hasil kajian menunjukkan ekstraksi DNA sampel daun sorgum yang segar menghasilkan konsentrasi DNA yang tinggi dan kemurnian yang lebih baik dibanding dengan DNA sampel daun sorgum yang didinginkan terlebih dahulu selama semalaman pada suhu -20°C. Konsentrasi DNA tertinggi diperoleh dari perlakuan inkubasi 65°C selama 30 menit yaitu konsentrasi DNA 998 ng/μl dengan kemurnian 1,795 dan perlakuan inkubasi 60°C selama 45 menit yaitu dengan konsentrasi 958 ng/μl dan kemurnian 1,809.*

***Kata Kunci:*** Ekstraksi DNA, sorgum, inkubasi

## **1. PENDAHULUAN**

Sorgum (*Shorgum* spp) merupakan tanaman serealia serbaguna yang dapat digunakan sebagai sumber pangan, pakan ternak, dan bahan baku industri, sehingga potensial untuk dikembangkan. Pengembangan dari suatu kultivar sorgum tidak hanya dilihat dari karakter/sifat morfologinya saja, tetapi dapat dianalisa dengan teknik genetika molekuler melalui analisis DNA-nya. Penggunaan teknik molekuler dalam pemuliaan tanaman sangat membantu pemulia dalam proses introgresi suatu gen dari satu individu ke individu lain serta membantu memberikan informasi tentang genetik tanaman. Teknik molekuler juga mempunyai keunggulan karena jumlahnya tidak terbatas dan tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan maupun fase perkembangan tanaman (Tanksley & McCouch, 1997).

Teknik molekuler sangat erat kaitannya dengan DNA. Pemisahan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak dan polisakarida dilakukan melalui ekstraksi. Ekstraksi DNA dari tumbuhan dilakukan melalui proses penghancuran dinding sel (*lysis of cell walls*), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa serta

penghilangan protein dan RNA (*cell digestion*), dan pengendapan DNA (*precipitation of DNA*) (Meng & Feldman, 2010).

Metode beberapa ekstraksi DNA pada dasarnya sama, namun dapat dimodifikasi untuk menghancurkan inhibitor yang ada didalam masing-masing sumber spesimen (Retnaningati, 2021). Penghancuran inhibitor dan sel dapat dilakukan secara mekanik, kimiawi, maupun enzimatik. Proses penghancuran sel dalam ekstraksi DNA sangat mempengaruhi kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan. Optimasi metode dapat dilakukan terhadap suhu dan lama inkubasi yang digunakan dalam proses ekstraksi DNA (Langga *et al.*, 2012)

Kajian ini bertujuan untuk mengetahui suhu dan lama inkubasi yang optimal dalam mengekstraksi DNA dari daun sorgum dengan kondisi berbeda.

## **2. BAHAN DAN METODE**

### **2.1. Tempat dan Waktu Percobaan**

Kegiatan dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Penelitian Tanaman Serealia pada bulan Februari sampai Maret 2022.

### **2.2. Bahan dan Alat**

Materi genetik yang digunakan yaitu sampel daun muda populasi tanaman sorgum. Bahan kimia yang digunakan dalam ekstraksi DNA yaitu bufer CTAB,  $\beta$ -merkuptoetanol, *chloroform isoamylalcohol* (chisam), isopropanol, etanol, bufer tris (TE), akuades, es batu. Alat yang digunakan yaitu *autoclave*, timbangan analitik, gunting, mortar, pestel, spatula, tabung mikrosentrifus 1,5 ml, pipet mikro, tip mikro, *waterbath*, *vortex mixer*, sentrifus, freezer dan nanospektrofotometer.

### **2.3. Persiapan Sampel**

Sampel daun muda sorgum berusia sekitar 14 hari setelah tanam dipetik dan ditimbang masing-masing 0,4 g. Daun segar langsung dilakukan isolasi DNA, sementara sampel daun lainnya disimpan semalam dalam suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dahulu sebelum dilakukan ekstraksi DNA. Perlakuan ini digunakan sebagai pengganti nitrogen cair dalam teknik penggerusan yaitu daun didinginkan terlebih dahulu (Ferniah & Pujiyanto, 2013).

### **2.4. Ekstraksi DNA**

Ekstraksi DNA tanaman sorgum dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi modifikasi bufer CTAB (Khan *et al.*, 2004). Sampel daun muda yang sudah ditimbang masing-masing 0,4 g dimasukkan ke dalam mortar. Setelah itu digerus hingga halus menggunakan pestel dengan menambahkan bufer CTAB dan diusahakan tidak berbusa.

Sampel yang telah halus dimasukkan ke dalam dua tabung mikro dengan volume yang sama. Kemudian ditambahkan  $\beta$ -merkuptoetanol 10  $\mu\text{l}$  setiap tabung mikro. Tabung mikro lalu diinkubasi dalam *waterbath* pada perlakuan suhu dan lama

inkubasi berbeda-beda (yaitu suhu 60°C, 65°C, 70°C masing-masing selama 10, 20, 30 dan 45 menit dengan teknik setiap 10 menit tabung dibolak-balik.

Setelah diinkubasi tabung mikro didinginkan lalu ditambahkan *chloroform isoamylalcohol* (chisam), kemudian dihomogenkan menggunakan vortex mixer selama 5 menit. Tabung mikro disentrifugasi dengan kecepatan 11600 rpm selama 10 menit.

Hasil sentrifugasi adalah terbentuknya 3 lapisan yaitu supernatan, pellet dan chisam. Supernatan (cairan bening yang paling atas) dipindahkan dengan hati-hati ke tabung mikro 1,5 ml lalu ditambahkan isopropanol dingin, kemudian tabung dibolak-balik hingga terbentuk untaian DNA berupa benang-benang halus. Tabung kemudian disentrifugasi selama 10 menit untuk mengendapkan DNA di dasar tabung. Selanjutnya supernatan dibuang sehingga yang tersisa hanya endapan pellet DNA. Pellet DNA dicuci dengan menambahkan etanol 70% dingin dan didiamkan selama 10 menit.

Selanjutnya etanol 70% dingin dibuang dengan hati-hati agar pellet DNA tidak ikut terbang. Pellet DNA dicuci lagi untuk kedua kali dengan etanol 70% dingin dan didiamkan 10 menit lalu etanol 70% dingin dibuang kembali. Pellet DNA lalu dikering anginkan dengan cara membalik tabung diatas nampan yang telah dilapisi kertas tisu. Setelah kering ke dalam tabung yang berisi pellet DNA ditambahkan bufer tris-EDTA untuk melarutkan pellet DNA. Setelah DNA larut, DNA dihomogenkan dan disentrifugasi. Perlakuan ekstraksi yang sama diulangi untuk sampel yang sudah di dinginkan selama semalaman pada suhu -20°C.

### **2.5. Uji Kuantitatif DNA**

Uji kuantitas DNA sorgum dilakukan dengan cara memipet 3 µl larutan DNA sorgum yang sudah homogen lalu mengujinya dengan alat nanospektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Pada nanospektrofotometer digunakan metode panjang gelombang tunggal (*Single Wave Length*) dan OD diukur pada Panjang gelombang 260 nm. Spektrofotometer akan membaca dan mengeluarkan hasilnya di layar monitor berupa nilai konsentrasi dan kemurnian DNA setiap nomor DNA yang diuji. Kemurnian larutan DNA dapat diukur dari nilai perbandingan antara absorbansi pada Panjang gelombang 260 nm (A260) dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm (A280) (Sambrook et al.,1989). Kualitas kemurnian DNA yang baik dan memenuhi syarat untuk analisis molekuler berada diantara 1,8-2,0 (Muladno, 2002).

## **3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

Ekstraksi DNA dapat dilakukan berbagai macam teknik. Dalam proses ekstraksi DNA sel harus dilisis terlebih dahulu menggunakan beberapa agensia baik secara fisik maupun kimiawi. Proses ekstraksi DNA, dinding sel dapat dilisis dengan cara penggerusan menggunakan buffer ekstraksi sebelum diinkubasi. Buffer ekstraksi CTAB dapat digunakan untuk proses lisis. Inkubasi setelah penambahan buffer CTAB berfungsi untuk memaksimalkan proses pelisisan sel.

Pada kegiatan ini proses lisis sel dilakukan secara mekanik melalui penggerusan dan secara kimia dengan penambahan buffer CTAB dan  $\beta$ -merkaptotanol. Penambahan reagen tersebut akan membentuk kompleks dengan protein dan polisakarida

Penambahan reagen dalam proses lisis akan menghasilkan kotoran (debris) yang dapat dibersihkan dengan cara sentrifugasi agar kotoran menggumpal didasar tabung mikro. Protein dan polisakarida yang terbentuk dapat dibersihkan dengan menggunakan *chloroform isoamylalcohol* (chisam) yang berfungsi sebagai pendenaturasi protein. Sementara DNA dan RNA tidak terdenaturasi karena molekuler ini larut dalam pelarut organik seperti *chloroform* (Syafaruddin & Santoso, 2020).

Hasil sentrifugasi setelah penambahan *chloroform isoamylalcohol* (chisam) membentuk 3 lapisan, lapisan atas yaitu supernatant yang mengandung DNA, lapisan tengah adalah resin dan kotoran sel, dan lapisan paling bawah adalah *chloroform*.

Penambahan isopropanol dingin pada supernatan berfungsi untuk mengendapkan dan memisahkan DNA dari larutan. Untuk memisahkan DNA dari larutan dilakukan sentrifugasi yang bertujuan untuk mendapatkan pellet DNA di dasar tabung mikro. Pelet DNA dicuci menggunakan etanol dingin berfungsi untuk menghilangkan *chloroform* yang tersisa.

Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada Panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan berupa protein atau fenol dapat menyerap cahaya pada Panjang gelombang 280 nm. Kemurnian larutan DNA dapat diukur dari nilai perbandingan antara absorbansi pada Panjang gelombang 260 nm (A260) dengan nilai absorbansi pada Panjang gelombang 280 nm (A280). Nilai kemurnian yang baik berkisar antara 1,8-2,0 (Muladno, 2002). Kisaran nilai tersebut telah memenuhi syarat yang dibutuhkan dalam analisis molekuler (Sambrook et al.,1989). Hasil uji kuantitatif DNA menggunakan nanospektrofotometer disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Kuantitatif DNA Sorgum pada Berbagai Perlakuan

Lama Inkubasi	10 Menit		20 Menit		30 Menit		45 Menit	
Suhu Inkubasi	DNA (ng/ $\mu$ l)	A260/A280	DNA (ng/ $\mu$ l)	A260/A280	DNA (ng/ $\mu$ l)	A260/A280	DNA (ng/ $\mu$ l)	A260/A280
<b>Tipe sampel Daun Segar</b>								
60°C	816	1,365	250	1,253	969	1,441	958*	1,809*
65°C	574	1,341	370	1,263	998*	1,895*	381	1,216
70°C	300	1,227	558	1,369	518	1,216	210	1,157
<b>Tipe Sampel Daun Dingin</b>								
60°C	200	1,231	403	1,201	782	1,304	707	1,582

Lama Inkubasi	10 Menit		20 Menit		30 Menit		45 Menit	
Suhu Inkubasi	DNA (ng/μl)	A260/A280	DNA (ng/μl)	A260/A280	DNA (ng/μl)	A260/A280	DNA (ng/μl)	A260/A280
65°C	242	1,258	604	1,129	355	1,199	498	1,233
70°C	325	1,191	362	1,321	421	1,305	354	1,333

Keterangan : Tanda (\*) menunjukkan nilai konsentrasi yang tinggi dan kemurnian yang baik

Dari hasil uji kuantitatif DNA sorgum menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh cukup besar dari setiap perlakuan. Hal ini ditunjukkan pada setiap nilai konsentrasi DNA yang dihasilkan. Tetapi nilai konsentrasi yang tinggi tidak menjamin bahwa DNA tersebut memenuhi syarat dalam analisis molekuler. Hasil pengujian yang memenuhi syarat menurut Sambrook *et al* (1989) terlihat pada perlakuan tipe sampel daun segar dengan inkubasi suhu 65°C selama 30 menit menghasilkan konsentasi DNA 998 ng/μl, nilai kemurnian 1,895 dan suhu 60°C selama 45 menit menghasilkan konsentrasi DNA 958 ng/μl, nilai kemurnian 1,809 (Tabel 1). Perlakuan tipe daun segar inkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dan inkubasi pada suhu 60°C selama 45 menit dapat mendegradasi protein dari dinding sel secara optimal dan memaksimalkan keluarnya DNA dari sel dibandingkan dengan perlakuan inkubasi lain, sehingga menghasilkan DNA yang cukup besar dan kemurnian yang memenuhi syarat untuk analisis molekuler.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Langga *et al.* (2012) pada tanaman bitti (*Vitex cofassus* Reinw) dan Retnaningati (2021) pada tanaman melon, adanya perbedaan keberhasilan ekstraksi DNA dipengaruhi oleh jenis tanaman serta kandungan yang terdapat pada tanaman tersebut. Berdasarkan hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa setiap jenis tanaman membutuhkan proses ekstraksi dengan suhu dan lama inkubasi yang berbeda. Lama inkubasi dan suhu inkubasi dalam ekstraksi DNA juga dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder seperti tannin yang dapat mempengaruhi kuantitatif DNA yang dihasilkan.

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

Ekstraksi DNA sampel daun sorgum yang segar menghasilkan konsentrasi DNA yang tinggi dan kemurnian yang lebih baik dibanding dengan DNA sampel daun sorgum yang didinginkan terlebih dahulu selama semalaman pada suhu -20°C. Konsentrasi DNA tertinggi diperoleh dari perlakuan inkubasi 65°C selama 30 menit yaitu konsentasi DNA 998 ng/μl dengan kemurnian 1,795 dan perlakuan inkubasi 60°C selama 45 menit yaitu dengan konsentrasi 958 ng/μl dan kemurnian 1,809.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Karlina Syahrudin, SP, MSi yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam penulisan naskah hingga layak dipublikasikan.

## DAFTAR BACAAN

- [1] Ferniah, R. S., & Pujiyanto, S. (2013). Optimasi Isolasi DNA Cabai (*Capsicum annum* L.) Berdasar Perbedaan Kualitas dan Kuantitas Daun serta Teknik Penggerusan. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 15(1), 14. <https://doi.org/10.14710/bioma.15.1.14-19>
- [2] Khan, I. A., Awan, F. S., Ahmad, A., & Khan, A. A. (2004). A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(1), 624892. <https://doi.org/10.1007/BF02773355>
- [3] Langga, I. F., Restu, M., & Kuswinanti, T. (2012). Optimalisasi suhu dan lama inkubasi dalam ekstraksi dna tanaman bitti (. *J Sains & Teknologi*, 12(3), 265–276.
- [4] Meng, L., & Feldman, L. (2010). A rapid TRIzol-based two-step method for DNA-free RNA extraction from *Arabidopsis* siliques and dry seeds. *Biotechnology Journal*, 5(2), 183–186. <https://doi.org/10.1002/biot.200900211>
- [5] Muladno. (2002). *Seputar Teknologi Rekayasa Genetik*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.
- [6] Retnaningati, D. (2021). Optimasi Metode Ekstraksi DNA pada Melon (*Cucumis melo* L.) Berdasarkan Suhu, Lama Inkubasi, dan Kondisi Daun. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 5(2), 109–114. <https://doi.org/10.24002/biota.v5i2.4096>
- [7] Sambrook, J., E. F., Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> Edition. Cold Spring Harbor, N.Y. 87 p.
- [8] Syafaruddin, S., & Santoso, T. J. (2020). Optimasi Teknik Isolasi Dan Purifikasi Dna Yang Efisien Dan Efektif Pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*, 17(1), 11. <https://doi.org/10.21082/jlitri.v17n1.2011.11-17>
- [9] Tanksley, S. D., & McCouch, S. R. (1997). Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277(5329), 1063–1066. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1063>