

OPTIMASI METODE ISOLASI DNA GENOM PADA TANAMAN KAPULASAN

Optimization Method DNA Isolation for Kapulasan Plant DNA Genome

Ediwirman¹ dan Ellina Mansya²

¹ Staf Pengajar Agroteknologi Fakultas Pertanian Univ. Tamansiswa Padang

² Peneliti Balai Penelitian Tanaman Buah (Balittbu) Solok

Email: deasyiva90@gmail.com

ABSTRACT

High quality and quantity of genomic DNA for plant kapulasan is required for analyses based on the polymorfisme chain reaction (PCR) technic. Method DNA isolation were proven to be genus or even species spesific. Objective of this study was to determine of methode with using protocol most reliably produced sufficient quantity and good quality of plant kapulasan genomic DNA. Method utilizing Doyle and Sanghai-Marroof with storge of leaf until dry, yielded higher quality and quantity of genomic DNA.

Key words : *DNA, Kapulasan*

PENDAHULUAN

Kapulasan merupakan salah satu buah tropik yang potensial dikembangkan dimasa mendatang. Indonesia merupakan daerah tropik yang kaya sumberdaya genetik yang belum sepenuhnya dieksplorasi secara optimal. Kapulasan menjadi salah satu kekayaan flora di Indonesia, dan tidak ditemukan pada semua wilayah dengan tingkat populasi yang semakin berkurang. Kapulasan ditemukan di Jawa Barat dan Sumatera Barat. Berkurangnya populasi kapulasan terjadi akibat kerusakan lingkungan dan secara habitusnya tidak banyak wilayah yang cocok untuk kapulasan. Konservasi merupakan salah satu upaya untuk menjaga kelestarian dan keragaman kapulasan di Indonesia.

Keanekaragaman kapulasan mampu menjelaskan hubungan kekerabatan secara umum, tetapi belum tentu memberikan informasi karakternya secara spesifik. Untuk mendapatkan informasi tersebut diperlukan suatu program karakterisasi dari plasma nutfah pada tingkat morfologi dan molekuler. Karakterisasi morfologi sering dipengaruhi oleh faktor lingkungan, sehingga penggunaan marka molekuler

diharapkan dapat memberikan gambaran karakterisasi dengan akurasi yang cukup tinggi dalam melihat keragaman genetik individu, baik pada tingkat spesies maupun kerabat jauhnya. Salah satu penanda molekuler adalah melalui hibridisasi fragmen DNA dengan marka DNA dengan mengamplifikasi fragmen DNA dengan mesin PCR.

Pengembangan teknik analisis molekuler dengan PCR menjadi salah satu kemajuan yang dicapai dalam mengidentifikasi suatu tanaman pada tingkat DNA. Salah satu keuntungan analisis keragaman menggunakan teknik molekuler yang memanfaatkan teknologi PCR adalah kuantitas DNA yang dibutuhkan hanya sedikit, bahkan dapat mengamplifikasi DNA tanaman *Spinacia oleracea* L. dengan jumlah 1,5 ng (Pandey *et al.*, 1996). Meskipun diperlukan dengan kuantitas yang rendah, keberhasilan isolasi menjadi salah satu dari faktor penentu kuantitas tersebut.

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan isolasi adalah senyawa metabolit sekunder. Menurut Milligan (1992), senyawa metabolit sekunder akan mempengaruhi kualitas dan kuantitas DNA. Isolasi tidak saja

berdasarkan metode yang sudah ada, tetapi membutuhkan beberapa modifikasi. Untuk mendapatkan DNA yang berkualitas baik, memerlukan metode isolasi yang tepat, tergantung dari jenis tanamannya.

Kualitas dan kuantitas DNA yang baik dapat dicapai melalui penanganan fisik dari daun, yang pada prinsipnya bertujuan untuk melindungi DNA genom terdegradasi akibat senyawa metabolit sekunder, terutama sampel daun yang diambil dari jarak yang jauh, sehingga membutuhkan teknik penyimpanan dan isolasi yang baik. Oleh karena itu untuk studi dengan ketersediaan sampel segar yang terbatas prosedur yang tepat sangat diperlukan.

Prosedur isolasi banyak sekali, tetapi tidak dapat semuanya dapat diterapkan untuk berbagai jenis tanaman. Salah satu faktor penting yang bisa mempengaruhi isolasi DNA adalah kondisi daun. Daun yang terlalu lama, akan menyebabkan meningkatnya aktifitas senyawa tertentu, sehingga daun menjadi layu dan rusak.

Penelitian bertujuan mendapatkan metode isolasi DNA yang mampu menghasilkan DNA kapulasan dengan kualitas dan kuantitas yang baik dalam menunjang keberhasilan amplifikasi berbasis PCR.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang. Daun yang digunakan adalah daun yang diambil dari berbagai lokasi, yaitu dari Bonjol Kabupaten Pasaman dan Ketinggian Kabupaten 50 Kota.

Optimasi Isolasi DNA. Isolasi dilakukan dengan menggunakan metoda Sanghai-Marooof (1983) dan Doyley and Doyley (1987) dengan menggunakan nitrogen cair dan melalui penyimpanan kering.

Analisis kualitas DNA. Kualitas DNA diuji berdasarkan kemampuannya

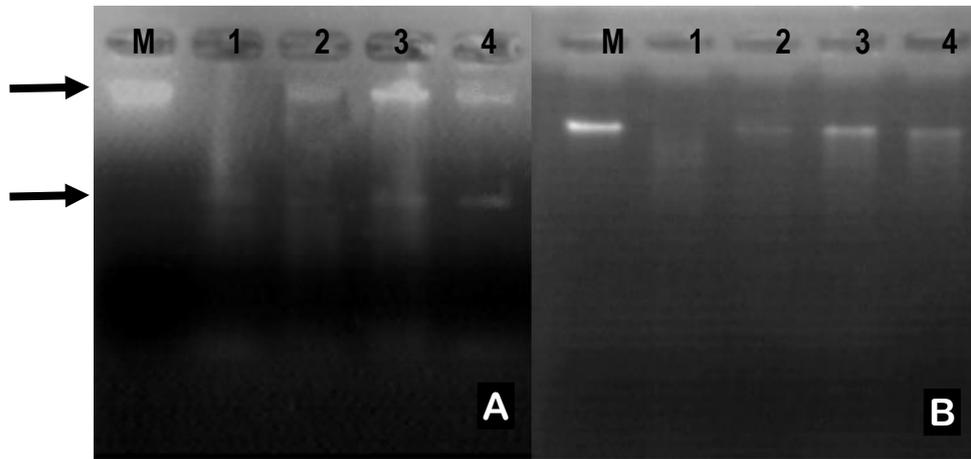
untuk dipotong menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Pemoongan DNA menggunakan 20 µl volume reaksi yang terdiri dari : 1 µl enzim restriksi *EcoRI* (Promega); 2 µl bufer H, dan 5 µg DNA dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 3 jam. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 µl EDTA 0.5 M, kemudian ditambah 4 µl *loading bufer*.

Elektroforesis. Hasil restriksi dari DNA dielektroforesis pada gel agarose (1.5 b/v) menggunakan bufer 0,5 x TBE yang telah ditambahkan larutan etidium bromida (0.5 mg/l). Elektrooforesis dilakukan pada voltase konstan sebesar 135 volt selama 2 jam, selanjutnya divisualisasikan di atas UV transiluminator, dan dipotret menggunakan *unit gel dokumentasi*. Dari tahapan ini akan diperoleh preparasi DNA yang smear akibat terdegradasi, dan DNA utuh pada DNA yang tidak direstriksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA genom kapulasan yang dilakukan dengan menggunakan metoda Sanghai-Marooof (1984), Doyle and Doyle (1991) berbeda terutama dilihat dari pola pita yang dihasilkan. Metoda yang baik dalam menyiapkan DNA genom adalah dapat menghasilkan DNA dalam ukuran yang besar (high molecular weight DNA), tidak terdegradasi selama proses ekstraksi dan pemurnian dan dapat dipotong dengan enzim restriksi. Hasil uji kualitas DNA genom kapulasan disajikan pada Gambar 1.

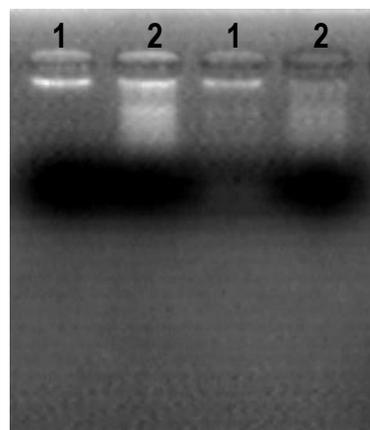
Gambar 1 menunjukkan bahwa metoda isolasi yang digunakan menghasilkan ukuran DNA yang berbeda dari kedua metoda yang digunakan. Ukuran DNA dapat dilihat dari jarak pita yang dihasilkan dengan sumur loading, setelah dilakukan elektroforesis. Terbentuknya smear saat elektroforesis akibat DNA telah mengalami degradasi dan adanya senyawa lain yang merupakan sisa dari hasil ekstraksi DNA.



Gambar 1. Hasil isolasi DNA genom dari tanaman kapulasan dengan menggunakan metode Shanghai-Marroof, dengan daun segar (1), daun kering (2), metode Doyle and Doyle, dengan daun kering (3), dan daun segar (4). Hasil isolasi yang belum diberikan RNase (A) dan yang diberi RNase (B), M λ DNA konsentrasi 50 ng/ μ L. (gel agarose 1%) pada 100 volt dengan 45 menit.

Penggunaan metode isolasi yang tepat mampu menghasilkan pita DNA yang lebih baik. Isolasi yang menggunakan metode Doyle and Doyle mampu memberikan pita yang lebih baik dibandingkan dengan metoda Shanghai-Marroof terhadap daun yang telah dikeringkan menggunakan silika gel selama 1 minggu, maupun daun segar. Pola pita

yang dihasilkan diikuti dengan adanya bagian smear di bawah pita DNA seperti pada Gambar 1 di atas. Terdapatnya bagian smear tersebut menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA masih memiliki kandungan RNA yang belum sepenuhnya hilang, sehingga penambahan RNase mampu menghilangkan aktifitas RNA seperti disajikan pada Gambar 1B.



Gambar 2. Pola pita DNA smear setelah dilakukan pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI*. (1) DNA yang belum dipotong ; (2) DNA yang telah dipotong

Penggunaan metode Doyle and Doyle mampu memberikan hasil lebih baik dibandingkan dengan Shanghai-Marroof, hal ini disebabkan kedua metode tersebut memiliki perbedaan senyawa purifikasi dalam pola ekstraksi dan isolasi DNA. Pola purifikasi dengan 2 kali (Phenol:

Chloroform:Isoamilalkohol) yang dilakukan pada metode Doyle and Doyle sangat efektif dalam menghilangkan berbagai senyawa yang mempengaruhi proses isolasi seperti protein dan polisakarida, dan fenol. Hal ini menunjukkan bahwa suatu metode yang digunakan meskipun berhasil untuk

suatu spesies tanaman, tetapi belum tentu akan berhasil pada spesies yang lain. Suatu prosedur yang sesuai untuk suatu spesies belum tentu dapat digunakan untuk spesies yang lain. Untuk mencapai hasil yang optimal penggunaan metode purifikasi menjadi salah satu bagian penting, selain mempertahankan kondisi jaringan tanaman tidak rusak.

Selain kandungan polisakarida dan senyawa metabolit sekunder, kondisi daun juga menentukan kualitas DNA. Untuk mempermudah proses isolasi, penggunaan daun yang berasal dari lapangan dengan jarak yang jauh, pada tanaman kapulasan dapat dioptimalkan dengan menggunakan daun yang telah dikeringkan dengan silika gel selama 1 minggu. Penggunaan daun kering mampu menghasilkan DNA yang lebih baik dibandingkan dengan daun segar. Hal ini disebabkan kapulasan merupakan salah satu jenis tanaman yang memiliki kandungan fenol dan polisakarida yang tinggi, seperti halnya dengan rambutan yang merupakan kerabat dekat dari kapulasan. Sulitnya mengekstraksi DNA disebabkan oleh tingginya kandungan polisakarida dan protein. Senyawa fenol dan polisakarida merupakan salah satu faktor yang dapat mengurangi efisiensi amplifikasi. Menurut Couch and Fritz (1990), tanaman berkayu memiliki senyawa polifenol dan polisakarida. Menurut Prana dan Hartati (2003), keberadaan polisakarida dan senyawa metabolit sekunder sering menghambat dalam isolasi. Senyawa tersebut memiliki struktur yang mirip dengan asam nukleat, sehingga mengendap bersama asam nukleat. Permasalahan dalam isolasi dan pemurnian DNA, penurunan polisakarida, endonuklease, dan senyawa penghambat seperti polifenol dan metabolit sekunder lainnya secara langsung akan mempengaruhi reaksi enzim. Menurut Fang, Hammer dan Grumet (1992) menghambat aktivitas taq polimerase pada amplifikasi DNA. Menurut Fang *et al.*, tahun 1992 dalam Porebski *et al.*, (1997), metabolit sekunder dan polisakarida dapat menghambat kerja enzim. Adanya polisakarida dalam tanaman ditandai dengan kekentalan pada hasil isolasi DNA yang menyebabkan kesulitan dalam pekerjaan

Jur. Agroekotek. 1 (1): 7-11, Juli 2009

pemipetan DNA, dan DNA tidak dapat diamplifikasi dalam reaksi PCR akibat penghambatan aktivitas *Taq polymerase*.

Penggunaan daun yang akan digunakan dalam analisis genom pada kapulasan, melalui penyimpanan kering dengan menggunakan silika gel mampu menekan aktifitas metabolisme pada daun. Pengeringan dengan kelembaban udara yang rendah pada media simpan akan sangat berpengaruh terhadap penurunan aktifitas metabolisme sel, sehingga kondisi sel akan tetap baik dan aktifitas senyawa-senyawa metabolit sekunder yang dikandungnya juga akan terhambat. Hal ini tentu akan mampu menjaga dan melindungi DNA yang ada dalam sel tanaman dengan baik.

Informasi yang diperoleh dari hasil penelitian ini memberikan bagian penting dalam mengisolasi DNA pada tanaman kapulasan, terutama dalam melihat keragaman tanaman kapulasan menggunakan analisis molekuler berbasis RAPD di Indonesia maupun untuk tujuan pemuliaan melalui pendekatan molekuler.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa, isolasi DNA genom pada tanaman kapulasan dengan menggunakan metode Doyle and Doyle mampu menghasilkan isolasi DNA yang lebih baik dibandingkan dengan Metode Shanghai dan Marof pada daun yang kering.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (DP2M) dengan nomor kontrak 0306/SP2H/DP2M/III/2008 yang telah memberikan dukungan dana dalam kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, Z., and W.R. Sharp. 1990. Potential of Biotechnology in Perennial Crop Improvement. Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 6. Perennial Crops (Z. Chen, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and M.R. Sondahl, Eds). McGraw-Hill Publishing Co. New York. pp. 3-21.
- Couch, J.A, dan P.J. Fritz. 1990. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. Plant Molecular Biology Reporter 8 (1): 8 – 12.
- Fang G, S. Hammer, dan R. Grumet. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biofeedback 13: 52-54.
- Idris. S, and M. L. Raziah. 2002. Status Report on Genetic Resources of Pulasan [*Nephelium ramboutan*-ake (Labill.) Leech] in Southeast Asia. Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI). Kuala Lumpur. 34 p.
- Milligan, B.G. 1992. Plant DNA isolation. pp 59-88. In A.R. Hoebel (Ed). Molecular genetic analysis of population. A practical approach. Oxford Univ. Press. New York.
- Pandey, R.N., Adams, R.P. and L.E. Flourney. 1996. Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. Plant Molec Biol reporter 14: 15-22.
- Porebski, S., Bailey, L.G. and B. R. Baum. 1997. Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molec Biol reporter 15: p. 8-15.
- Prana. T.K, dan N. S. Hartati. 2003. Identifikasi sidik jari DNA talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan Teknik RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): Skringing Primer dan Optimalisasi Kondisi PCR. Jurnal Natur Indonesia 5(2): hal. 107-112.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19: 11-15