

# PENGEMBANGAN METODE ISOLASI DNA GENOM PADA TANAMAN JARAK PAGAR (*Jatropha Curcas L.*)

Maftuchah & Agus Zainudin<sup>2</sup>

## ABSTRACT

Molecular markers have been used extensively to study genetic relationships in number of crops. One of the techniques that can be used to obtain DNA finger print is RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique, a molecular technique based on PCR technology. The quality of amplification products depend on several factors such as MgCl<sub>2</sub> concentration, primers, PCR condition and DNA quality. In this study, an experiment was conducted to find out appropriate DNA isolation technique for three accessions *Jatropha curcas* (Karangtengah, Lamongan and NTB). Three DNA isolation technique has been tested and two of them were able to produce good quality of genomic DNA. The results therefore indicate that the technique can be used to genomic DNA isolation of *Jatropha curcas* on molecular analysis.

## 1. PENDAHULUAN

Pemanfaatan minyak jarak pagar (*Jatropha curcas* L) sebagai bahan biodiesel merupakan salah satu alternatif untuk mengantisipasi meningkatnya permintaan bahan bakar. Minyak jarak pagar selain merupakan sumber minyak terbarukan (*renewable fuels*) juga termasuk *non edible oil* sehingga tidak bersaing dengan kebutuhan konsumsi manusia seperti pada minyak kelapa sawit, minyak jagung dsb. Secara agronomis tanaman jarak pagar cukup sesuai untuk dibudidayakan dengan kondisi agroklimat di Indonesia; bahkan pada kondisi kering dan pada lahan marginal. Akan tetapi ada berbagai permasalahan yang dihadapi antara lain belum adanya varietas unggul dan masih terbatasnya pendekatan molekuler dalam pemuliaan tanaman pagar.

Tanaman jarak pagar termasuk dalam famili Euphorbiaceae, di mana genus *Jatropha* memiliki 175 spesies. Dari jumlah tersebut lima spesies ada di Indonesia, yaitu *Jatropha curcas* L dan *Jatropha gossypifolia* yang sudah digunakan sebagai tanaman obat. sedangkan *Jatropha integerrima* Jacq, *Jatropha multifida* dan *Jatropha podagrica* Hook digunakan sebagai tanaman hias. Dalam perkembangan dewasa ini, species *Jatropha curcas* L. menarik minat karena sifat minyaknya yang dapat

digunakan untuk substitusi minyak diesel dan dapat dimanfaatkan sebagai bahan biodiesel.

Pemuliaan tanaman jarak pagar hingga saat ini masih terbatas pada seleksi dan uji lapang dengan menggunakan karakter morfologi dalam upaya mendeskripsikan tanaman. Dalam hal ini, kebanyakan karakter yang nampak merupakan interaksi genetik dan kondisi lingkungan. Oleh karena itu, diperlukan adanya upaya analisis molekuler pada tanaman jarak pagar. Teknik biologi molekuler telah memberikan peluang untuk mengembangkan dan mengidentifikasi peta genetik dari suatu kultivar tanaman. Pendekatan genetika molekuler dengan menggunakan penanda DNA telah berhasil membentuk penanda molekuler yang mampu dalam mendeteksi gen dan sifat-sifat tertentu, evaluasi keragaman dan evolusi pada tingkat genetik (Hoon-Lim *et al.* 1999). Beberapa teknik penanda DNA tersebut adalah *Restriction Fragment Length Polymorphism*, *Amplified Fragment Length Polymorphism* dan *Random Amplified polymorphic DNA*.

Penggunaan penanda RAPD didasarkan pada pertimbangan antara lain : informasi susunan nukleotida dalam DNA tidak perlu diketahui terlebih dahulu, relatif sederhana dan mudah preparasinya, hanya perlu sejumlah kecil DNA dan memberikan hasil lebih cepat dibandingkan beberapa

<sup>1</sup> Maftuchah. Fakultas Pertanian. Jurusan Agronomi. Universitas Muhammadiyah Malang.  
Alamat Korespondensi : Simpang Ijen A-21 Oro-oro Dowo Klojen Malang  
Tlp. 0341-551300, Hp. 08161435516,  
Email. maftuchah@telkom.net

penanda molekuler lain. Analisis sidik jari DNA tanaman jarak didasarkan pada jumlah, frekuensi dan distribusi alel-alel DNA berdasarkan penanda RAPD yang telah diperoleh. beberapa hal diatas mendasari pemikiran diperlukan adanya upaya analisis molekuler pada tanaman jarak pagar dengan menggunakan penanda RAPD.

Program pemuliaan tanaman, diperlukan identifikasi baik karakter morfologi maupun molekuler untuk menguji keragaman genotip klon-klon yang akan dipilih untuk tetua persilangan (Schnell *et al.* 1995). Pemakaian teknik RAPD memiliki resolusi yang sebanding dengan RFLP dalam hal analisis kekerabatan antar genotip (dos Santos *et al.* 1994) dan mampu menghasilkan jumlah karakter yang tidak terbatas sehingga sangat membantu dalam analisis keragaman genetik tanaman yang tidak diketahui latar belakang genomnya (Liu dan Furnier, 1993). Analisis RAPD hanya memerlukan sejumlah kecil DNA sehingga sangat sesuai untuk species tanaman berkayu (Rowland dan Levi 1994). RAPD memerlukan biaya lebih rendah dibandingkan biaya untuk uji kekerabatan berdasarkan analisis DNA yang lain. Metode RAPD menggunakan primer dengan ukuran sepuluh basa sering digunakan untuk studi kekerabatan, identifikasi varietas (CIMMYT, 1998), pemetaan genetik, analisis struktur DNA organisme dan *fingerprinting* suatu individu organisme. Teknik RAPD menggunakan primer acak maupun spesifik telah terbukti dapat digunakan sebagai penanda molekuler untuk berbagai karakter agronomis penting. Pemakaian marka molekuler RAPD banyak digunakan untuk menyusun kekerabatan beberapa individu dalam spesies maupun kekerabatan antar spesies. Penggunaan kekerabatan ini dapat dijadikan rujukan dalam pemuliaan persilangan untuk mendapatkan keragaman yang tinggi dari hasil suatu persilangan (Maftuchah, 2001).

Proses isolasi DNA genom tanaman, keberadaan polisakarida dan senyawa metabolit sekunder dalam sel tanaman sering menyulitkan dalam proses isolasi asam nukleat. Struktur polisakarida yang mirip dengan asam nukleat akan menyebabkan polisakarida tersebut akan mengendap bersama dengan asam nukleat. Penambahan senyawa pereduksi seperti marchaptoetanol dan dithiothreitol dapat mencegar proses oksidasi senyawa fenolik sehingga menghambat aktivitas radikal bebas yang dihasilkan oleh oksidasi fenol terhadap asam nukleat (Wilkins dan

Smart, 1996). Metabolit sekunder dan polisakarida juga dapat menghambat kerja enzim Adanya polisakarida dalam tanaman ditandai dengan kekentalan pada hasil isolasi DNA yang menyebabkan kesulitan dalam reaksi PCR akibat penghambatan aktivitas Taq polymerase (Fang *et al.*, 1992 dalam Porebski *et al.*, 1997) Oleh karena itu diperlukan suatu teknik isolasi DNA genom tanaman yang tepat sehingga diperoleh kualitas DNA yang baik bagi proses amplifikasi PCR.

Hasil penelitian ini diharapkan akan diperoleh DNA genomik tanaman jarak pagar dan metode isolasi DNA yang sesuai pada tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) sebagai materi dalam proses amplifikasi PCR.

## 2. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Molekuler Tanaman Pusat Pengembangan Bioteknologi, Universitas Muhammadiyah Malang. Tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) yang dipergunakan berasal dari Kebun Koleksi Plasma Nutfah Jarak dari Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat (BALITTAS) – Karangploso, Malang. Aksesori jarak pagar yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah Lamongan. Nusa Tenggara Barat dan Karang Tengah. Isolasi DNA Genomik Tanaman Jarak (*Jatropha curcas* L.)

DNA genom tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) diisolasi dari daun muda tanaman jarak pagar. Prosedur ekstraksi DNA dari daun tanaman jarak pagar dilaksanakan berdasarkan metode standar (Sambrook *et al.*, 1989) dengan menggunakan bufer CTAB, metode Doyle and Doyle (1990), serta metode Zheng *et al.* (1995) dengan menggunakan bufer pengestrak SDS. Setelah DNA hasil isolasi dimurnikan, kemudian dilakukan analisis melalui running agarose gell 0,8 %.

### 2.1. Metode CTAB (Sambrook *et al.*, 1989).

Pada proses isolasi dengan metode CTAB (Sambrook *et al.*, 1989) dilakukan pembuatan bufer lisis (yang terdiri atas 0,2 M Tris-Cl pH 7,5 ; 0,05M EDTA pH 8,0 ; 2 M NaCl ; 2 % CTAB) dan bufer

ekstraksi (terdiri dari 0,35 M sorbitol ; 0,1 M Tris-Cl pH 7,5 ; 5 mM EDTA ; dH<sub>2</sub>O). Potongan daun dimasukkan tabung 1,5 ml yang telah didinginkan dalam es, kemudian daun digerus dengan bantuan nitrogen cair. Setelah itu ditambahkan bufer isolasi DNA (campuran bufer lisis, bufer ekstraksi dan sarcocyl). Suspensi divortex sampai tercampur merata, kemudian diinkubasi selama 1 jam, pada suhu 65°C. Setelah 1 jam ditambah 750 µl kloroform - isoamil alkohol (24 : 1). Setelah homogen larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, 4°C, lapisan atas diambil dan dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml, kemudian ditambahkan larutan isopropanol dan divortex perlahan. Sentrifugasi dilakukan selama 5 menit, 12.000 rpm, pada suhu 4°C, kemudian supernatan dibuang. Pelet dicuci menggunakan 500 µl EtOH 70 %, kemudian disentrifugasi 12.000 rpm, 3 menit dan supernatan dibuang. Sentrifugasi dilakukan kembali dengan kecepatan 12.000 rpm, 1 menit, kemudian supernatan dibuang dengan mikropipet. Pelet dikeringkan dan dilarutkan dengan 50 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 1 mM EDTA pH 8,0). DNA disimpan pada suhu -20°C.

#### **Metode CTAB (Doyle and Doyle, 1990).**

DNA genomik jarak pagar diisolasi dengan menggunakan 200 mg daun, yang dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan digerus dengan bantuan nitrogen cair. Ke dalam tabung ditambahkan 750 µl bufer ekstraksi CTAB. Campuran tersebut divortex lalu diinkubasi dalam pemanas air selama 60 menit pada suhu 65°C. Setelah dibiarkan dingin hingga suhu kamar, campuran tersebut ditambahkan dengan 750 µl kloroform - isoamil alkohol ( 24 : 1 ). Campuran disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4°C. Lapisan atas dimasukkan ke dalam tabung eppendorf lain yang mengandung isopropanol dan dicampur merata. Setelah disentrifugasi selama 10 menit 11.000 rpm, endapan DNA dicuci dengan menambahkan etanol 76 % dan dikeringkan. Endapan DNA yang telah kering dilarutkan dalam 25 µl bufer TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 1 mM EDTA pH 8,0). DNA disimpan pada suhu -20°C.

#### **Metode SDS (Zheng *et al* , 1995).**

Pada pemakaian metode ekstraksi Zheng *et al* (1995), sebelum berlangsungnya proses isolasi DNA dilakukan pembuatan bufer pengekrak yang terdiri atas 25 mM EDTA (pH 7,5), 50 mM TrisHCl (pH 8), 300 mM NaCl, SDS 1% dan H<sub>2</sub>O. Potongan daun tanaman jarak pagar dimasukkan tabung 1,5 ml yang telah didinginkan dalam es, kemudian digerus dengan menambahkan 400 ul buffer pengekrak. Setelah cukup halus ditambahkan 100 ul buffer pengekrak. Setelah itu diambil 400 ul larutan dan ditambah dengan 400 ul chloroform. Suspensi divortex sampai tercampur merata, kemudian dan setelah homogen larutan disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4°C. Lapisan atas diambil dan dimasukkan ke dalam tube 1,5 ml, kemudian ditambahkan 800 µl Etanol absolut. Larutan disentrifugasi selama 3 menit, 13.000 rpm, pada suhu 4°C, kemudian supernatan dibuang. Pelet dicuci kembali dengan menggunakan 500 µl EtOH 70 %. Supernatan dibuang, kemudian endapan dicuci kembali dengan etanol 70%, dan disentrifugasi 13.000 rpm, pada suhu 4°C. Supernatan dibuang kembali, dan pelet dikeringkan dengan menggunakan vakum. Setelah kering, pelet ditambah dengan 50 ul TE dan DNA disimpan pada suhu -20°C.

Hasil isolasi DNA dengan berbagai teknik tersebut kemudian dielektroforesis pada 0,8% gel agarosa pada kondisi 50V selama 30 menit. Deteksi dilakukan dengan menggunakan UV transluminator dan dilakukan pemotretan gell.

### **3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

Salah satu keuntungan pemakaian analisis keragaman genetik tanaman dengan menggunakan teknik molekuler yang memanfaatkan teknologi amplifikasi PCR adalah kuantitas DNA yang diperlukan hanya sedikit. Disamping itu, dalam pelaksanaan teknik RAPD tingkat kemurnian DNA yang dibutuhkan tidak perlu terlalu tinggi, atau dengan kata lain teknik amplifikasi PCR relatif toleran terhadap tingkat kemurnian DNA. Walaupun demikian, dalam suatu teknik isolasi DNA masih diperlukan suatu tahapan untuk meminimalkan senyawa-senyawa kontaminan yang dapat mengganggu reaksi PCR seperti polisakarida dan metabolit sekunder. Hal ini

disebabkan keberadaan polisakarida dan metabolit sekunder dalam sel tanaman sering menyulitkan dalam isolasi asam nukleat (Wilkins and Smarts, 1996). Dalam penelitian ini, DNA genom tanaman jarak pagar diisolasi dari daun muda tanaman jarak. Sampel daun dipilih dari individu tanaman jarak pagar yang sehat dengan pemakaian sampel dari masing-masing aksesori yang diuji (Karang tengah, Lamongan dan Lombok Barat).

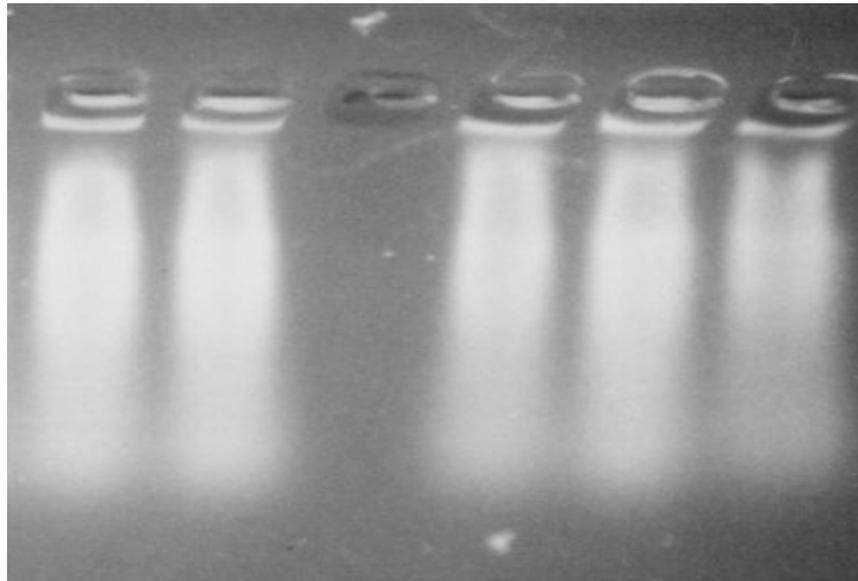
Tahap awal dilakukan isolasi DNA genomik tanaman jarak pagar dengan menggunakan prosedur ekstraksi DNA yang menggunakan bufer pengekstrak CTAB berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989). Bufer yang dipergunakan terdiri dari 0,2 M Tris-Cl pH 7,5 ; 0,05M EDTA pH 8,0 ; 2M NaCl ; 2% CTAB ; 0,35 M sorbitol ; 0,1 M Tris-Cl pH 7,5 ; 5 mM EDTA dan dH<sub>2</sub>O. Namun dengan penggunaan prosedur ekstraksi CTAB tersebut ternyata belum dapat menghasilkan DNA genom yang optimal (Gambar 1). Dari hasil elektroforesis terlihat bahwa kualitas DNA yang dihasilkan belum optimal, oleh karena itu proses isolasi selanjutnya dicoba dengan menggunakan metode isolasi DNA genomik yang lain.

Proses ekstraksi DNA jarak pagar, setelah penambahan bufer pengekstrak CTAB pada daun yang

telah dihaluskan , terbentuk larytan yang sangat kental, yang meunjukkan tingginya kandungan polisakarida. Selain polisakarida, kandungan senyawa fenolik jarak pagar juga cukup tinggi, hal ini dapat dilihat dari cepatnya pencoklatan pada ujung daun yang dipotong. Adanya polisakarida dan senyawa metabolit sekunder dalam sel tanaman sering menyulitkan dalam proses isolasi asam nukleat. Struktur polisakarida yang mirip dengan asam nukleat akan menyebabkan polisakarida tersebut akan mengendap bersama dengan asam nukleat.

Proses isolasi DNA tanaman, penambahan senyawa pereduksi seperti marchaptoetanol dan dithiothreitol dapat mencegah proses oksidasi senyawa fenolik sehingga menghambat aktivitas radikal bebas yang dihasilkan oleh oksidasi fenol terhadap asam nukleat (Wilkins dan Smart, 1996). Metabolit sekunder dan polisakarida juga dapat menghambat kerja enzim Adanya polosakarida dalam tanaman ditandai dengan kekentalan pada hasil isolasi DNA yang menyebabkan kesulitan dalam reaksi PCR akibat penghambatan aktivitas Taq polymerase (Fang *et al.*, 1992 cit Porebski *et al.*, 1997).

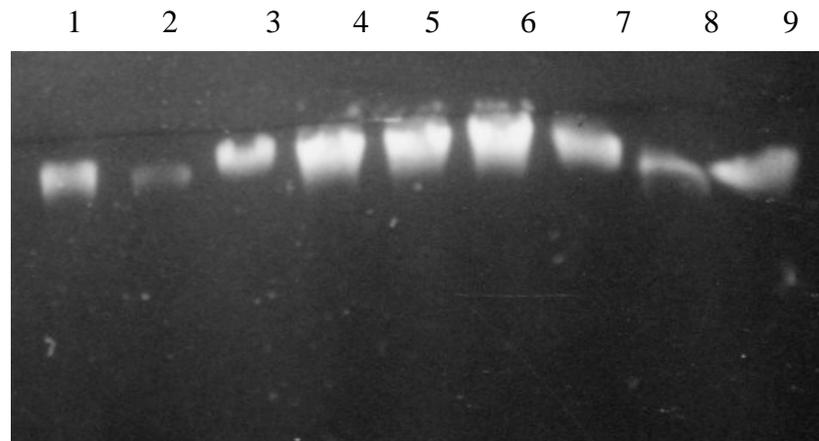
1                      2                      3                      4                      5                      6



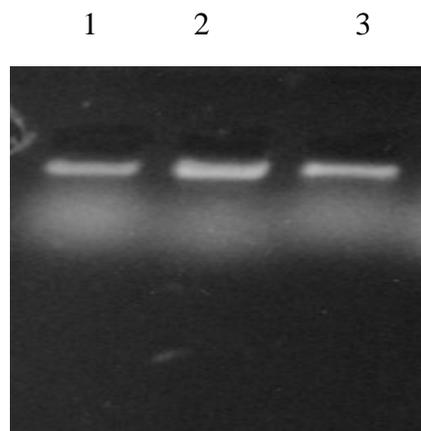
Gambar 1. Hasil proses isolasi DNA tanaman jarak pagar dengan menggunakan bufer CTAB (Sambrook *et al.*, 1989) : Karang Tengah (baris 1, 2), Lamongan (baris 3, 4), Lombok Barat (baris 5, 6)

Tahap selanjutnya diujikan prosedur isolasi DNA tanaman jarak pagar dengan menggunakan buffer pengekstrak CTAB berdasarkan metode Doyle and Doyle (1990). DNA genomik tanaman jarak pagar diisolasi dengan menggunakan 200 mg daun, yang ditambahkan bufer ekstraksi CTAB. Campuran tersebut divorteks lalu diinkubasi dalam pemanas air dan setelah dingin hingga suhu kamar ditambah dengan kloroform - isoamil alkohol. Hasil running elektroforesis gel agarose menunjukkan metode tersebut dapat menghasilkan DNA genom jarak pagar Karangtengah, Lamongan dan NTB dengan kuantitas dan kualitas yang cukup baik (Gambar 2).

Pemakaian prosedur isolasi DNA tanaman jarak pagar dengan menggunakan buffer pengekstrak Sodium Dodecyl Sulfate (Zheng *et.al.*, 1995) larutan buffer yang dipergunakan terdiri atas 25 mM EDTA pH 7,5, 50 mM Tris HCl, pH 8 300 mM Na Cl, 1% Sodium Dodecyl Sulfate dan dH<sub>2</sub>O. Dengan menggunakan teknik tersebut telah berhasil diperoleh DNA genom tanaman jarak pagar aksesori Karang Tengah, Lamongan dan NTB dengan kualitas DNA yang cukup baik (Gambar 3.).



Gambar 2. Hasil proses isolasi DNA tanaman Jarak Pagar dengan menggunakan bufer CTAB (Doyle and Doyle, 1990) : Karang Tengah (baris 1, 2, 3), Lamongan (baris 4, 5, 6), Lombok Barat (baris 7, 8, 9)



Gambar 3. Hasil proses isolasi DNA tanaman jarak pagar dengan menggunakan bufer SDS (Zheng *et.al.*, 1995) : Karang Tengah (baris 1), Lamongan (baris 2), Lombok Barat (baris 3).

Pada umumnya ekstraksi DNA tanaman dilaksanakan dengan menggunakan bufer pengeksrak SDS (*sodium dodecyl sulphate*) dan CTAB (*cetyltrimetilammonium bromide*). Perlakuan lisis sel dengan menggunakan detergen non ionik CTAB menghasilkan kuantitas DNA yang cukup tinggi terutama dari jaringan segar, dengan jumlah DNA yang dihasilkan bervariasi tergantung pada species dan kondisi awal material yang digunakan (Ausubet *et al.*, 1994). Pada tanaman dengan kandungan polisakarida dan metabolit sekunder tinggi perlu dilakukan modifikasi pada saat ekstraksi DNA. Untuk menghilangkan polisakarida ekstraksi lisat dengan menggunakan kloroform disarankan dibandingkan dengan kloroform/isoamil alkohol karena lebih efisien untuk mengisolasi asam nukleat (Ausubet *et al.*, 1994). Secara umum hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan pemakaian tiga metode isolasi DNA genom yang diujikan maka dihasilkan dua metode yang mampu menghasilkan DNA genom jarak pagar dengan kuantitas dan kualitas yang baik, yaitu metode Doyle and Doyle (1990) yang menggunakan bufer CTAB (*cetyltrimetilammonium bromide*) dan metode Zheng *et al.*, (1995) yang menggunakan bufer pengeksrak SDS (*sodium dodecyl sulphate*)

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

Metode isolasi DNA berdasarkan metode Doyle and Doyle (1990) yang menggunakan bufer CTAB (*cetyltrimetilammonium bromide*) dan metode Zheng *et al.*, (1995) yang menggunakan bufer pengeksrak SDS (*sodium dodecyl sulphate*) sesuai untuk dipergunakan dalam isolasi DNA genom tanaman jarak pagar.

#### DAFTAR PUSTAKA

Ausubel, F.M., Brent, R., Kongston, R.E., Moore, D.D., Saidman, J.G., Smith J.A., and Stuhl, K. 1994. Current protocols in molecular biology. New York. John Wiley and Sons. Inc.

CIMMYT, 1998. Molecular Marker Applications to Plant Breeding. *In: Amboinet's First Training Workshop*, 9 November-4 Desember, El Batan, Mexico. 76 p.

Correa, R. X., Ricardo V. A., Fabio G. F. Cosme D. C., Maurilio A. M., dan Everaldo G. B., 1999. *Genetic Distance in Soybean Based on RAPD Markers*. (On line), <http://www.scielo.br/scielo.php> diakses 22 April 2004.

Doyle J.J and Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus. Moscow*. 12(1):13-15.

dos Santos JB, Nienhuis J, Skruch P, Tivang J and Slokum MK. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor. Appl Genet*. 87:909-915.

Hoon-Lim S, Peng Teng PC, Lee YH, and Goh CJ. 1999. RAPD analysis of some species in the genus vanda (orchidaceae). *Annals of Botany*. 83:193-196.

Liu Z and Furnier GR. 1993. Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between Trembling Aspen and Bigtooth Aspen. *Theor. Appl. Genet*. 87:97-105.

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

Porebski, S., Bailey, L.G., and Baum, B.R. 1997. Modification of CTAB DNA extractions protocol for plants cotaining high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molec Biol reporter* 15: 8-15

Sambrook J., E.F. Fritsch and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning : A laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

Schnell R.J., CM. Ronning and R.J. Knight. 1995. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet* 90:269-274.

Zheng K, Huang N, Bennet P. and Khush GS. 1995. PCR-based marker assisted selection in rice breeding. IRRI news lett 2. Wilkins, T.A. and Smart, L.B.. 1996 Isolation of RNA from Plant Tissue. Di dalam: Krieg, P.A. (ed). A Laboratory Guide to RNA. Isolation, Analysis and Synthesis. New York: Wiley – Liss.