

OPTIMALISASI METODE EKSTRAKSI DNA DAUN, KULIT KAYU DAN KAYU *Pinus merkusii* Jungh. Et de Vriese *Optimization of DNA Extraction Methods of Leaves, Wood Skins and Wood Pine merkusii Jungh. Et de Vriese*

Emilia¹, Essy Harnelly¹, Ashabul Anhar¹

Program Studi Kehutanan, Fakultas Pertanian, Universitas Syiah Kuala

Email: emiliakm3@gmail.com

Abstrak. Keberhasilan ekstraksi DNA sangatlah penting dalam proses investigasi genetika molekuler. Penggunaan sampel biasanya berupa organ tanaman muda karena diketahui dapat menghasilkan ekstrak DNA yang bagus. Kayu dan kulit kayu juga berpotensi sebagai sumber DNA karena sifatnya yang mudah didapat. Namun pengujian efektifitasnya untuk spesies *Pinus merkusii* belum pernah dilaporkan. Tujuan penelitian untuk membandingkan hasil ekstraksi DNA dari tiga jenis sampel dari spesies *Pinus merkusii* menggunakan tiga metode ekstraksi yaitu metode CTAB, CTAB dengan *mercaptoethanol* dan *DNeasy Plant Mini Kit*. Hasil ekstraksi dikuantifikasi menggunakan alat *nanophotometer* dan divisualisasi dalam *gel* agarosa. Dari ketiga metode ekstraksi DNA, metode CTAB memperoleh hasil kemurnian DNA yang lebih bagus baik pada uji kuantitas maupun uji kualitas. Semua metode memperoleh nilai *optical density ratios* di luar rentang kemurnian ($\lambda_{260}/280 = 1,8 - 2,0$ ng/ μ l dan $\lambda_{260}/230 = 2,0$ ng/ μ l) pada sampel kayu, kulit kayu dan sampel daun khusus metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan memperoleh nilai *optical density ratios* mencapai 1,8-2,0 ng/ μ l pada sampel daun dari metode CTAB dan metode CTAB dengan *mercaptoethanol*. Hasil ekstraksi DNA pada metode CTAB dan metode CTAB dengan menggunakan *mercaptoethanol* tidak menunjukkan hasil pita DNA yang dapat diinterpretasikan sama sekali, sedangkan pada metode *DNeasy Plant Mini Kit* menunjukkan pita DNA pada sampel KK3 dan D3 dan pada sampel lainnya juga tidak menunjukkan pita DNA yang dapat diinterpretasikan.

Kata Kunci: CTAB, Ekstraksi, DNA, *DNeasy Plant Mini Kit*

Abstract. The success of DNA extraction is very important in the process of genetic investigations molecular. The use of samples is usually in the form of young plant organs because it is known can produce a good DNA extract. Wood and bark are also potential as source of DNA because it is easy to obtain. However, testing its effectiveness for species of *Pinus merkusii* has never been reported. The aim of the study is to compare the results of DNA extraction from three types of samples from the *Pinus merkusii* species using three the extraction methods are the CTAB method, CTAB with *mercaptoethanol* and *DNeasy Plant Mini Kits*. The extraction result were quantified using a *nanophotometer* and visualized in agarose gel. Of the three DNA extraction methods, the CTAB. Method obtain better DNA purity results in both the quantity test and the test quality. All methods obtain optical density ratios outside the purity range ($\lambda_{260}/280 = 1.8-2.0$ ng/ μ l and $\lambda_{260}/230 = 2.0$ ng/ μ l) on wood, bark and leaf samples from specifically for the *DNeasy Plant Mini Kit* method and obtained optical density values ratios reached 1.8-2.0 ng/ μ l in leaf samples from the CTAB method and the CTAB. Method with *mercaptoethanol*. The result of DNA extraction on the CTAB method and the CTAB. Method using *mercaptoethanol* did not show the result of DNA bands that could interpreted at all, whereas in the *DNeasy Plant Mini Kit* method, shows an interpretable DNA band.

Keywords: CTAB, Extraction, DNA, *DNeasy Plant Mini Kit*

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pinus merkusii merupakan satu-satunya jenis Pinus yang tumbuh di Indonesia dan ditemukan sepanjang wilayah Asia Tenggara (Zonneveld, 2009).

Satu-satunya spesies dari famili Pinaceae yang dapat tumbuh secara alami di Indonesia pada ketinggian mencapai 200-2.000 m dpl dan pada ketinggian optimalnya yaitu pada ketinggian 400-1.500 m dpl (Khaerudin, 1999). *P. merkusii* dapat tumbuh dengan baik pada lahan yang kurang subur termasuk di Padang alang-alang. *P. merkusii* merupakan salah satu spesies endemik Aceh dengan jenis pohon pionir atau pohon konifer yang berperan penting dalam pengusahaan hutan.

Sejak beberapa tahun ke belakang populasi *P. merkusii* di Aceh kian mengalami kerusakan (Daud, 2017). Jumlah populasi *P. merkusii* diperkirakan kurang dari 2000 Km² dari luas kewasannya yang diperkirakan 20.000 Km². Kondisi populasi *P. merkusii* berkurang secara terus-menerus dan mengalami fragmentasi berat (Harahap dan Aswandi, 2008). Eksploitasi secara terus-menerus tanpa diimbangi dengan penanaman dan pengembangan tanaman akan menyebabkan potensi tegakan *P. merkusii* dialam akan terus terdegradasi dan pada akhirnya punah (Gusmiaty, *et al.*, 2016). Salah satu upaya konservasi yang dapat kita lakukan saat ini adalah dengan melakukan investigasi asal usul *P. merkusii*.

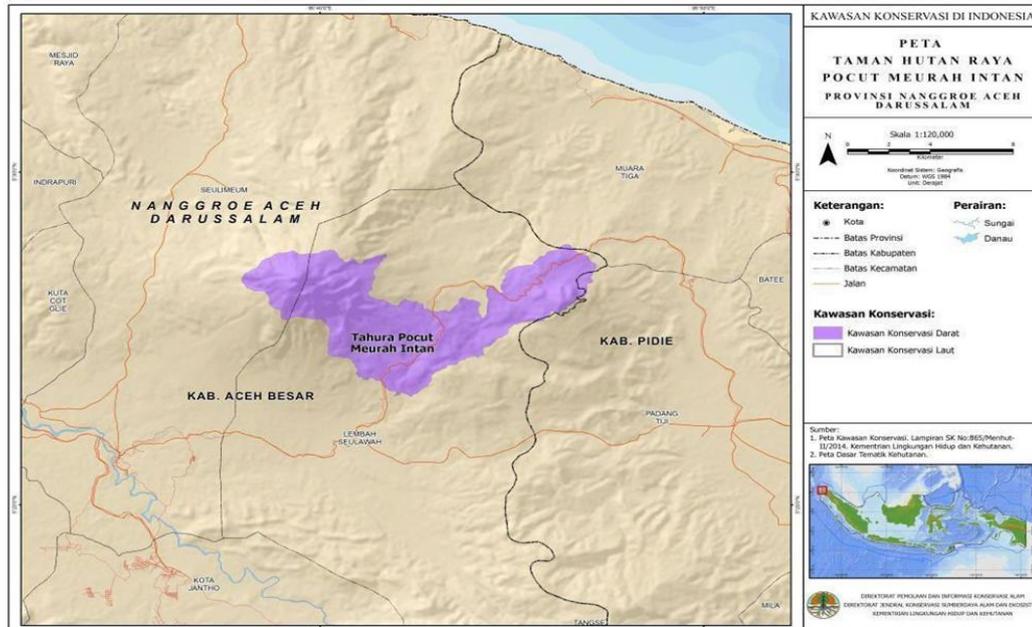
Investigasi genetika kehutanan molekuler dimulai dari proses ekstraksi DNA. Kualitas DNA genom yang diekstraksi secara optimal menjadi tolak ukur keberhasilan analisis penanda molekuler (Porebski, *et al.*, 1997). Ekstraksi DNA adalah teknik untuk mengeluarkan DNA dari inti sel atau organel sel seperti DNA kloroplas dan DNA mitokondria, fungsinya untuk memisahkan DNA murni dari protein, karbohidrat dan lemak. DNA dapat diekstraksi dari sampel yang masih segar, beku, dikeringkan maupun disimpan dalam alkohol atau bufer (Pharmawati, 2009). Sampel tanaman segar lebih direkomendasikan untuk memperoleh DNA yang berkualitas baik (Semagn, *et al.*, 2006). Sampel ekstraksi DNA tumbuhan umumnya berasal dari organ muda dan lunak seperti daun, kuncup, bunga, tunas atau kambium (Tibbits, *et al.*, 2006). Kayu baik yang sudah diolah maupun belum juga memiliki potensi sebagai sumber DNA (Deguilloux *et al.*, 2002). Kayu mampu menutupi kekurangan sampel lain karena sifatnya yang mudah diperoleh.

Masalah-masalah dalam ekstraksi DNA baik pada sampel daun, kulit kayu maupun kayu merupakan hal yang sangat penting yang perlu diatasi. Jumlah dan kualitas DNA hasil ekstraksi bervariasi tergantung dari spesies tanaman sehingga dapat mempengaruhi analisis lebih lanjut. *P. merkusii* merupakan tumbuhan yang mengandung senyawa polifenol. Senyawa polifenol merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang dapat mengikat DNA sehingga mengganggu proses ekstraksi DNA. Selain itu, penerapan metode ekstraksi dengan menggunakan sampel kayu juga masih terbatas pada jenis-jenis tertentu saja, belum ada referensi tentang ekstraksi DNA dari sampel kayu *P. merkusii*. Oleh karena itu sangat perlu dilakukan penelitian optimalisasi ekstraksi DNA *P. merkusii* untuk memperoleh metode ekstraksi DNA optimal yang tepat dan efisien dalam pengestraksian DNA *P. merkusii*.

BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler, Program Sarjana Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Syiah Kuala. Pengambilan sampel dilakukan di Taman Hutan Raya Pocut Meurah Intan, Kecamatan Lembah Seulawah, Kabupaten Aceh Besar. Beberapa sampel kayu juga diambil dari Panglong. Penelitian ini dilakukan dari September 2020 sampai dengan Mei 2021.



Gambar 1. Gambar Peta Tahura Pocut Meurah Intan Sebagai Lokasi Pengambilan Sampel

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah meteran, gunting bunga, pisau steril, spidol permanen, plastik klip, kantung plastik, tali rafia, sasak, parang, kamera, bor listrik, pinset, mortar, *vortex*, *centrifuge*, *waterbath*, timbangan *digital*, *freezer*, gelas ukur, spatula, *spin column*, *micro pipet* (0,1-10 μ l, 10-50 μ l, 100-1000 μ l), *nanophotometer*, alat elektroforesis, *microwave*, tabung *erlenmeyer*.

Bahan yang digunakan dalam praktikum ini adalah sampel daun, kulit kayu dan kayu *Pinus merkusii*, Nitrogen cair, *silica gel*, bufer CTAB, PVP 2-4%, CIA, *Isopropanol*, *ethanol* 70%, bufer TE, bufer AP1, RNase, bufer AE, bufer AW1, bufer AW2, bufer P3, alkohol 70%, *aluminium foil*, sarung tangan, isolatip, Koran, pipet *tips*, tisu, *gel agarose* 2%, *gel red*, TAE 1%, *aquadest*, *loading dye*, *qiashedder*, dan *collection tube*.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*), metode CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) dengan *mercaptoethanol* dan metode *DNeasy Plant Mini Kit*.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan dalam kegiatan pengambilan data dan penyusunan

1. Pengambilan dokumentasi pada lokasi pengambilan sampel

2. Pemotongan sampel sekaligus preservasi atau penyemprotan dengan alkohol 70% pada sampel guna mengeringkan daun sebelum dibawa ke Laboratorium.
3. Ekstraksi DNA
4. Uji Kuantitas DNA dengan menggunakan nanophotometer
5. Uji Kualitas DNA dengan elektroforesis
6. Mencari sumber informasi dari berbagai literature dan jurnal lainnya untuk mendukung informasi.
7. Penyusunan hasil penelitian

3.6 Analisis Data

Setelah melakukan proses pengambilan sampel daun, kulit kayu dan kayu *Pinus merkusii* segar di lapangan. Kemudian dilakukan analisis ekstraksi DNA, uji kualitas dan uji kuantitas DNA daun, kulit kayu dan kayu *Pinus merkusii* di Laboratorium, hasil data yang diperoleh akan disesuaikan dengan informasi dari berbagai literatur dan jurnal yang telah dikumpulkan. Data yang telah sesuai dengan tujuan awal inilah yang akan ditulis sebagai hasil penelitian. Data yang diperoleh akan ditampilkan dalam bentuk tabel, gambar dan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Kuantitas DNA

4.1.1 Metode CTAB

Hasil pengukuran kemurnian DNA pada metode CTAB dapat dilihat pada tabel berikut ini.

Tabel 1. Data Kemurnian DNA Menggunakan Metode CTAB

No	Sampel	Konsentrasi	A230	A260	A280	A260/A280	A260/A230
1	K1	338.85	15.48	11.01	8.520	1.581	0.603
2	K2	425.70	25.42	14.62	11.86	1.480	0.441
3	K3	40.900	3.571	1.597	1.489	1.152	0.293
4	K4	335.25	33.23	12.97	12.31	1.109	0.249
5	K5	5.9000	0.146	0.220	0.200	1.204	2.682
	Rerata	229.32	15.57	8.083	6.876	1.305	0.853
6	KP1	89.450	7.689	3.207	3.011	1.123	0.285
7	KP2	178.45	14.67	6.509	6.062	1.143	0.304
8	KP3	41.100	3.320	1.512	1.386	1.181	0.313
9	KP4	142.20	11.63	5.285	4.958	1.130	0.310
10	KP5	122.30	11.59	4.728	4.382	1.165	0.263
	Rerata	114.7	9.779	4.248	3.959	1.148	0.295
11	KK1	32.450	2.394	1.830	1.617	1.489	0.535
12	KK2	70.800	3.671	3.725	3.223	1.549	1.040
13	KK3	-	-	-	-	-	-
14	KK4	20.100	0.953	0.826	0.722	1.349	0.760
15	KK5	20.550	0.406	0.878	0.742	1.495	-6.738
	Rerata	28.78	1.485	1.452	1.261	1.176	-0.881
16	D1	155.45	1.848	3.106	1.603	1.936	1.680
17	D2	287.00	2.891	5.748	2.925	1.968	1.991
18	D3	57.650	1.367	1.149	0.653	1.755	0.841

19	D4	204.20	1.851	4.064	2.050	1.973	2.183
20	D5	138.95	3.779	4.701	3.427	1.847	1.496
	Rerata	168.65	2.347	3.753	2.131	1.896	1.638

Keterangan Tabel:

- K1-K5 = Sampel Kayu Asal Tahura PMI
 KP1-KP5 = Sampel Kayu Asal Panglong
 KK1-KK5 = Sampel Kulit Kayu Asal Tahura PMI
 D1-D5 = Sampel Daun Asal Tahura PMI

Konsentrasi DNA pada sampel kayu berkisar antara 5.9-338.8 ng/ μ l dengan rata-rata 229.32 ng/ μ l. Pada sampel kulit kayu berkisar antara 0-70.8 ng/ μ l dengan rata-rata 28.78 ng/ μ l. pada sampel daun berkisar antara 57.6-287 ng/ μ l dengan rata-rata 168.65 ng/ μ l. dan sampel kayu asal Panglong berkisar antara 41.1-178.8 ng/ μ l dengan rata-rata 114.7 ng/ μ l.

Nilai konsentrasi DNA terendah diperoleh dari sampel K5 yaitu hanya mencapai 5.9 ng/ μ l. Adapun nilai konsentrasi DNA tertinggi diperoleh dari sampel K2 yaitu 425.7 ng/ μ l. Sedangkan sampel KK3 tidak memperoleh nilai konsentrasi sama sekali. Sampel ini telah dilakukan pengulangan ekstraksi sebanyak dua kali.

Kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/280 yang diperoleh dari sampel kayu berkisar antara 1.1 – 1.6 ng/ μ l dengan rata-rata 1.3 ng/ μ l. pada sampel kayu yang berasal dari Panglong berkisar antara 1.1 ng/ μ l – 1.2 ng/ μ l dengan rata-rata 1.1 ng/ μ l. Pada sampel kulit kayu berkisar antara 0 ng/ μ l – 1.5 ng/ μ l dengan rata-rata 1.2 ng/ μ l. Pada sampel daun berkisar antara 1.7 ng/ μ l – 1.9 ng/ μ l dengan rata-rata 1.8 ng/ μ l yang menunjukkan DNA yang diekstraksi telah murni.

Kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/230 yang diperoleh dari sampel kayu berkisar antara 0.2–0.7 ng/ μ l dengan rata-rata 0.85 ng/ μ l. Pada sampel kulit kayu berkisar antara -6.7-1.0 ng/ μ l dengan rata-rata 0.8 ng/ μ l. Pada sampel kayu yang berasal dari Panglong berkisar antara 0.263 ng/ μ l – 0.313 ng/ μ l dengan rata-rata 0.28 ng/ μ l. Pada sampel daun berkisar antara 0.8–2.1 ng/ μ l dengan rata-rata 1.63 ng/ μ l.

Pada panjang gelombang 260/280 nilai rasio DNA terendah diperoleh dari sampel K4 yaitu 1.1 ng/ μ l dan pada panjang gelombang 260/230 memperoleh nilai rasio 0.2 ng/ μ l yang berarti DNA yang diperoleh tidak murni. Pada sampel KK3 yang tidak memperoleh nilai konsentrasi DNA otomatis tidak memperoleh rasio kemurnian DNA. Pada panjang gelombang 260/280 nilai rasio tertinggi diperoleh dari sampel D4 yaitu 1.9 ng/ μ l dan pada panjang gelombang 260/230 memperoleh nilai rasio 2.1 ng/ μ l yang berarti DNA telah dikatakan murni.

Pada panjang gelombang 260/280 nilai rasio kemurnian DNA yang diperoleh kurang dari 1.8 ng/ μ l menunjukkan adanya kontaminasi dari protein dan fenol. Kemurnian DNA yang diperoleh melebihi 2.0 ng/ μ l menunjukkan adanya kontaminasi dari RNA. (Wilson dan Walker, 2010). Sedangkan pada panjang gelombang 260/230 nilai rasio DNA yang diperoleh <2.0 menunjukkan adanya kontaminasi karbohidrat dan bahan organik lainnya.

4.1.2 Metode CTAB dengan *Mercaptoethanol*

Hasil pengukuran kemurnian DNA pada metode CTAB dapat dilihat pada tabel berikut ini.

Tabel 2. Data Kemurnian DNA Menggunakan Metode CTAB dengan Mercaptoethanol

No	Sampel	Konsentrasi	A230	A260	A280	A260/A280	A260/A230
1	K1	484.60	29.53	15.22	11.55	1.609	0.404
2	K2	1022.0	61.50	35.45	29.13	1.448	0.440
3	K3	258.05	24.67	10.18	9.451	1.164	0.263
4	K4	121.40	10.26	5.064	4.759	1.144	0.318
5	K5	673.00	39.68	24.99	20.56	1.491	0.478
	Rerata	511.81	31.18	18.18	15.09	1.371	0.380
6	KP1	109.00	9.481	3.797	3.527	1.141	0.277
7	KP2	212.10	17.58	7.723	7.095	1.174	0.301
8	KP3	209.20	17.99	7.787	7.269	1.141	0.291
9	KP4	126.60	11.13	4.777	4.533	1.107	0.285
10	KP5	171.65	17.27	7.417	6.975	1.148	0.258
	Rerata	165.71	14.69	6.300	5.879	1.142	0.282
11	KK1	39.700	3.128	2.027	1.795	1.413	0.419
12	KK2	92.400	4.267	4.337	3.655	1.585	1.039
13	KK3	50.200	4.416	3.027	2.709	1.464	0.420
14	KK4	42.950	2.161	1.647	1.328	1.591	0.626
15	KK5	43.850	1.960	1.833	1.493	1.633	0.874
	Rerata	53.82	3.186	2.574	2.196	1.537	0.675
16	D1	21.300	0.368	0.518	0.299	2.058	1.543
17	D2	18.150	0.236	0.405	0.224	1.995	1.871
18	D3	84.300	2.029	1.823	0.982	1.995	0.891
19	D4	26.600	0.407	0.611	0.344	2.008	1.622
20	D5	145.40	1.019	2.827	1.389	1.978	2.644
	Rerata	59.15	0.812	1.237	0.634	2.007	1.714

Keterangan Tabel:

- K1-K5 = Sampel Kayu Asal Tahura PMI
 KP1-KP5 = Sampel Kayu Asal Panglong
 KK1-KK5 = Sampel Kulit Kayu Asal Tahura PMI
 D1-D5 = Sampel Daun Asal Tahura PMI

Konsentrasi DNA yang diperoleh dari sampel kayu berkisar antara 121.4 – 1.022 ng/μl dengan rata-rata 511.8 ng/μl. Pada sampel kulit kayu berkisar antara 39.7 – 171.6 ng/μl dengan rata-rata 53.82 ng/μl. Pada sampel daun berkisar antara 18.1 – 602.4 ng/μl dengan rata-rata 59.15 ng/μl. Dan pada sampel kayu yang berasal dari Panglong berkisar antara 109 – 212.1 ng/μl dengan rata-rata 165.7 ng/μl.

Kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/280 yang diperoleh dari sampel kayu berkisar antara 1.14 – 1.6 ng/μl dengan rata-rata 1.37 ng/μl. Pada sampel kulit kayu berkisar antara 1.4 – 1.6 ng/μl dengan rata-rata 1.54 ng/μl. Pada sampel daun berkisar antara 1.97 – 2.07 ng/μl dengan rata-rata 2.02 ng/μl. Dan pada sampel kayu yang berasal dari Panglong berkisar antara 1.1 – 1.17 ng/μl dengan rata-rata 1.14 ng/μl.

Kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/230 yang diperoleh dari sampel kayu yang berasal dari Tahura PMI berkisar antara 0.26 ng/μl – 0.47 ng/μl dengan rata-rata 0.38 ng/μl. Pada sampel kulit kayu yang berasal dari Tahura PMI berkisar antara 0.42 – 1.04 ng/μl dengan rata-rata 0.67 ng/μl. Pada sampel daun

yang berasal dari Tahura PMI berkisar antara 0.87 – 2.6 ng/μl dengan rata-rata 1.74 ng/μl. Dan pada sampel kayu yang berasal dari Panglong berkisar antara 1.26 – 1.3 ng/μl dengan rata-rata 0.28 ng/μl.

Konsentrasi DNA yang terendah diperoleh dari sampel D2 yaitu 18.1 ng/μl. Nilai konsentrasi tertinggi diperoleh sampel K2 yaitu 1.022 ng/μl. Adapun sampel D1 memperoleh nilai rasio tertinggi yaitu 2.0 ng/μl pada panjang gelombang 260/280 dan nilai rasio 1.8 ng/μl pada panjang gelombang 260/230 yang berarti DNA telah dikatakan murni. Sampel KP4 memperoleh rasio DNA terendah yaitu 1.1 ng/μl pada panjang gelombang 260/280 dan nilai rasio 0.3 ng/μl pada panjang gelombang 260/230 yang berarti DNA yang diperoleh tidak murni. Hal ini terjadi karena beberapa faktor seperti isolasi DNA dan presipitasi kurang maksimal yang menyebabkan ekstraksi DNA dari dalam sel hanya sedikit. Selain itu hal ini juga dapat disebabkan oleh pengikatan DNA yang kurang maksimal pada tahap binding DNA.

4.1.3 Metode *DNeasy Plant Mini Kit*

Hasil pengukuran kemurnian DNA pada metode *DNeasy Plant Mini Kit* dapat dilihat pada tabel berikut ini.

Tabel 3. Data Kemurnian DNA Menggunakan Metode *DNeasy Plant Mini Kit*

No.	Sampel	Konsentrasi	A230	A260	A280	A260/A230	A260/A280
1	K1	0.9500	-0.146	0.019	0.015	1.267	-0.130
2	K2	2.3500	0.079	0.071	0.065	1.146	0.855
3	K3	2.1000	0.050	0.052	0.038	1.500	1.050
4	K4	0.7000	-0.043	0.010	0.002	2.333	-0.359
5	K5	5.4000	0.251	0.148	0.129	1.213	0.512
	Rerata	2.3	0.038	0.06	0.049	1.492	0.385
6	KP1	1.1000	0.020	0.039	0.029	1.833	7.333
7	KP2	3.6000	0.142	0.112	0.089	1.469	0.706
8	KP3	1.0500	-0.009	0.029	0.030	0.955	-1.235
9	KP4	14.7000	0.958	0.394	0.279	1.642	0.343
10	KP5	0.8000	-0.009	0.022	0.019	1.231	-1.067
	Rerata	4.25	0.220	0.119	0.089	1.426	1.216
11	KK1	2.4500	0.131	0.070	0.056	1.400	0.445
12	KK2	4.1000	0.296	0.166	0.153	1.188	0.387
13	KK3	5.0500	0.339	0.170	0.142	1.384	0.374
14	KK4	11.3000	0.558	0.411	0.356	1.322	0.606
15	KK5	3.8000	0.184	0.134	0.142	1.152	0.603
	Rerata	5.334	0.301	0.190	0.169	1.289	0.483
16	D1	1.7000	-0.054	0.032	0.017	1.789	-0.654
17	D2	2.0000	0.014	0.049	0.041	1.250	8.000
18	D3	1.8000	-0.024	0.041	0.022	2.118	-1.241
19	D4	9.3000	0.069	0.184	0.166	1.576	2.620
20	D5	1.7000	0.020	0.040	0.028	1.545	2.429
	Rerata	3.3	0.005	0.069	0.055	1.655	0.791

Keterangan Tabel:

- K1-K5 = Sampel Kayu Asal Tahura PMI
- KP1-KP5 = Sampel Kayu Asal Panglong
- KK1-KK5 = Sampel Kulit Kayu Asal Tahura PMI
- D1-DK5 = Sampel Daun Asal Tahura PMI

Konsentrasi DNA yang diperoleh dari sampel kayu berkisar antara 0.7 – 5.4 ng/μl dengan rata-rata 2.3 ng/μl. Pada sampel kulit kayu yang berasal dari Tahura PMI berkisar antara 2.4 – 11.3 ng/μl dengan rata-rata 5.34 ng/μl. pada sampel daun yang berasal dari Tahura PMI berkisar antara 1.7 – 9.3 ng/μl dengan rata-rata 3.32 ng/μl. dan pada sampel kayu yang berasal dari Panglong berkisar antara 0.8 – 14.7 ng/μl dengan rata-rata 4.25 ng/μl. Perolehan nilai konsentrasi DNA ini terlalu rendah bila dibandingkan metode CTAB dan *Mercaptoethanol*. Hal ini diduga karena pada metode *DNeasy Plant Mini Kit*, DNA akhir dilarutkan dengan volume bufer elusi yang lebih besar daripada metode CTAB. Selain itu, sistem penyaring pada tabung *Qiagen mini spin column* menyebabkan DNA tersimpan pada saringan sehingga konsentrasi DNA yang lolos menjadi lebih sedikit.

Konsentrasi DNA sampel kayu yang diperoleh dari penelitian ini termasuk cukup tinggi jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Verbylaite *et al.* (2010) yang hanya memperoleh konsentrasi DNA tertingginya 63 ng/μL dari sampel kayu aspen (*Populus tremula*) menggunakan metode CTAB. Rentang konsentrasi dari hasil ekstraksi DNA pada sampel kayu hampir sama jika dibandingkan dengan konsentrasi DNA yang diperoleh oleh Rachmayanti *et al.* (2006) pada kayu-kayu Dipterocarpaceae yaitu hanya sekitar 2.2 ng/μl dan Asif dan Cannon (2005) pada kayu ramin (*Gonyostilus bancanus*) yaitu < 15 ng/μl dengan menggunakan metode *DNeasy Plant Mini Kit*.

Tinggi rendahnya konsentrasi DNA yang dihasilkan dalam proses ekstraksi DNA juga dapat disebabkan oleh beberapa faktor pada metode yang telah dimodifikasi seperti faktor suhu inkubasi, suhu yang terlalu tinggi dapat merusak DNA sedangkan jika suhunya terlalu rendah akan mengakibatkan membran sel tidak dapat hancur. Faktor lainnya adalah waktu inkubasi. Jika waktu inkubasi DNA terlalu lama maka akan merusak DNA dan jika terlalu sebentar maka tidak dapat menghancurkan membran dan jaringan sel.

Menurut Haris *et al.* (2003), konsentrasi DNA akan berdampak pada kualitas fragmen hasil amplifikasi. Konsentrasi DNA yang terlalu rendah akan menghasilkan fragmen yang sangat tipis pada gel atau bahkan tidak terlihat secara visual, sebaliknya konsentrasi DNA yang terlalu tinggi akan menyebabkan fragmen terlihat tebal sulit dibedakan antara satu fragmen dengan fragmen lainnya. Konsentrasi hasil ekstraksi DNA dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu kecepatan ekstraksi pada waktu ekstraksi dan komposisi penambahan lisis bufer. Faktor kecepatan ekstraksi merupakan faktor paling berpengaruh karena pada tahap lisis sel dan presipitasi pengambilan *supernatant* harus dilakukan per sampel, sehingga beberapa sampel terjadi pengendapan DNA (Komalasari, 2009) maupun sisa-sisa guanidina yang biasanya terdapat pada *kit*. Namun hal ini dapat dihindari dengan pembersihan pedestal dan uji blanko dengan bufer elusi yang sama dengan sampel sebelum proses pengujian. Konsentrasi DNA yang besar pula tidak menjamin bahwa DNA tersebut murni, sehingga perlu dilihat nilai kemurniannya. Nilai kemurnian DNA diperlukan untuk menilai derajat kontaminasi dari DNA yang dihasilkan.

Kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/280 yang diperoleh dari sampel kayu berkisar antara 1.14 – 2.3 ng/μl dengan rata-rata 1.49 ng/μl. Pada

sampel kulit kayu berkisar antara 1.15 – 1.4 ng/μl. pada sampel daun berkisar antara 1.25 – 2.12 ng/μl dengan rata-rata 1.64 ng/μl. Dan pada sampel kayu yang berasal dari Panglong berkisar antara 0.95 – 1.8 ng/μl dengan rata-rata 1.42 ng/μl.

Kemurnian DNA pada panjang gelombang 260/230 yang diperoleh dari sampel kayu berkisar antara -0.35 – 1.05 ng/μl dengan rata-rata 0.38 ng/μl. Pada sampel kulit kayu yang berasal dari Tahura PMI berkisar antara 0.37 – 0.6 ng/μl dengan rata-rata 0.48 ng/μl. Pada sampel daun yang berasal dari Tahura PMI berkisar antara -1.24 – 8.0 ng/μl dengan rata-rata 2.82 ng/μl. dan pada sampel kayu yang berasal dari Panglong berkisar antara -1.23 – 7.3 ng/μl dengan rata-rata 1.21 ng/μl.

Sampel KP3 memperoleh rasio DNA terendah yaitu 0.9 ng/μl pada panjang gelombang 260/280 dan nilai rasio -1.2 ng/μl pada panjang gelombang 260/230 yang berarti DNA yang diperoleh tidak murni, hal ini diakibatkan kandungan polifenol yang terkandung dalam sampel kayu terlalu tinggi. Adapun sampel D3 memperoleh nilai rasio tertinggi yaitu 2.1 ng/μl pada panjang gelombang 260/280 dan nilai rasio -1.2 ng/μl pada panjang gelombang 260/230 yang berarti DNA yang diperoleh tidak murni.

DNA genom dapat diekstraksi dengan berbagai macam teknik. Pada prinsipnya, sel harus dipecah terlebih dahulu menggunakan beberapa agensia, baik secara fisik maupun kimiawi. Senyawa yang sering digunakan untuk memecah sel pada isolasi DNA genom adalah CTAB. Senyawa CTAB biasanya digunakan untuk ekstraksi DNA dari jaringan tanaman. Setelah sel dipecah selanjutnya dilakukan ekstraksi dan pemurnian DNA (Yuwono, 2008). Teknik pemecahan sel dapat dibagi dalam metode fisik, metode mekanik dan metode kimiawi (Sudjadi, 2008). Sel diperlakukan dengan pemaparan senyawa kimiawi yang mempengaruhi dinding sel. Metode kimiawi lebih banyak digunakan untuk preparasi DNA.

Dalam suatu teknik ekstraksi 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 (Maftuchah dan Zainuddin, 2013). Kandungan senyawa sekunder dalam sel tanaman berbeda-beda, maka setiap tanaman membutuhkan prosedur ekstraksi yang optimal untuk memperoleh DNA genom yang layak digunakan dalam proses analisis molekuler. Ekstraksi DNA bertujuan memisahkan DNA dengan komponen lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Proses-proses dalam ekstraksi DNA memiliki fungsinya masing-masing, diantaranya:

Beberapa kandungan dalam senyawa yang digunakan dalam ekstraksi DNA dengan metode CTAB diantaranya: EDTA merupakan *chelating agents*. EDTA akan mengikat ion logam yang merupakan kofaktor DNase dan protein lain yang dapat mendegradasi DNA. *Hydranate* akan berikatan dengan protein dan memisahkannya dari DNA dengan kekuatan ionik. Secara bersamaan bahan-bahan ini akan memisahkan protein dari DNA dan melindungi DNA dari kerusakan (Gierer, A. and G. Schramm, 1956). Pada saat dilakukan penggerusan, bahan tanaman yang akan diisolasi DNANYa dilarutkan dalam larutan CTAB. Hal ini dimaksudkan untuk menghindari adanya degradasi nukleolitik yang disebabkan karena adanya DNase. CTAB memiliki beberapa peranan, yaitu membantu merusak

membran, juga akan berikatan dengan muatan positif protein kromosomal sehingga DNA akan dilepaskan ke dalam larutan dan EDTA pada CTAB akan segera menonaktifkan DNase. CTAB mengandung NaCl. Garam akan meminimalkan daya ikatan antara DNA dan protein dengan merusak keseimbangan muatan negatif dan positif antara keduanya. Dengan demikian DNA akan lebih mudah dipisahkan (Galactics, 1998). Garam akan berikatan dengan gugus fosfat DNA yang bermuatan negatif yang dapat membantu DNA mengendap pada saat pemberian *ethanol absolute* dingin (Dollard, 1994).

PVP 2% berfungsi untuk mereduksi senyawa-senyawa fenolik yang keberadaannya dapat merusak kualitas DNA. *Mercurpentoethanol* dapat mencegah proses oksidasi senyawa fenolik sehingga menghambat aktivitas radikal bebas yang dihasilkan oleh oksidasi fenol terhadap asam nukleat. Selain itu *mercurpentoethanol* juga berfungsi untuk melindungi RNA dari senyawa *quinon*, *desulphide*, peroksida, *poliphenoksidase* dan protein. Proses inkubasi pada air dengan suhu 65° C berfungsi untuk mendenaturasi protein tanpa merusak DNA. Selain itu proses pemanasan ini akan membantu melunakkan membran sel dan membantu *detergen* menyisip diantara membran sehingga membran bisa terurai.

Sentrifugasi merupakan teknik untuk memisahkan campuran berdasarkan berat molekul komponennya. Molekul yang mempunyai berat molekul besar akan berada di bagian bawah tabung dan molekul ringan akan berada pada bagian atas tabung. Tehnik sentrifugasi dilakukan oleh mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi. Hasil sentrifugasi akan menunjukkan dua macam fraksi yang terpisah, yaitu supernatan di bagian atas dan pelet di bagian bawah.

Klorofom dan isoamil alkohol (CIAA) berfungsi untuk mengekstrak dan mengendapkan komponen polisakarisa didalam bufer ekstrasi yang mengkontaminasi larutan DNA (Ningrum, 2008). *Ethanol* 70% berfungsi untuk mengeluarkan endapan garam karena NA^+ bermuatan positif dan DNA bermuatan negatif. Pemberian isoprofanol dan etanol dilakukan agar terjadi dehidrasi DNA sehingga terjadi presipitasi (Purwantara, 2001). Presipitasi Merupakan langkah yang dilakukan untuk mengendapkan suatu komponen dari campuran.

Pengeringan pelet DNA berfungsi untuk mengeringkan pelet dari sisa-sisa bufer maupun etanol. Bufer TE berfungsi melarutkan DNA yang dihasilkan dan menjaga DNA agar tidak mudah rusak. Dalam bufer TE mengandung EDTA yang berfungsi sebagai senyawa pengkelat yang mengikat ion *magnesium*, yaitu kofaktor yang diperlukan untuk aktivitas berbagai enzim *nuclease* (Sudarsono, 1996).

Pada dasarnya semua metode ekstraksi memiliki prinsip yang sama yaitu penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian, hanya saja setiap metode merancang senyawa-senyawa yang berbeda sesuai dengan kebutuhan teknik ekstraksi yang semakin berkembang. Adapun fungsi-fungsi senyawa dalam metode *DNeasy Plant Mini Kit* diantaranya: Bufer AP1 (*cell lysis buffer*) berfungsi melisis sampel, bufer AP2 berfungsi untuk merusak kandungan protein dalam sampel, buffer AW1 dan AW2 berfungsi untuk membersihkan sampel dari sisa-sisa bahan ekstraksi. Buffer AE berfungsi sebagai pelarut DNA yang dihasilkan dan menjaga DNA agar tidak mudah rusak.

4.2 Uji Kualitas DNA



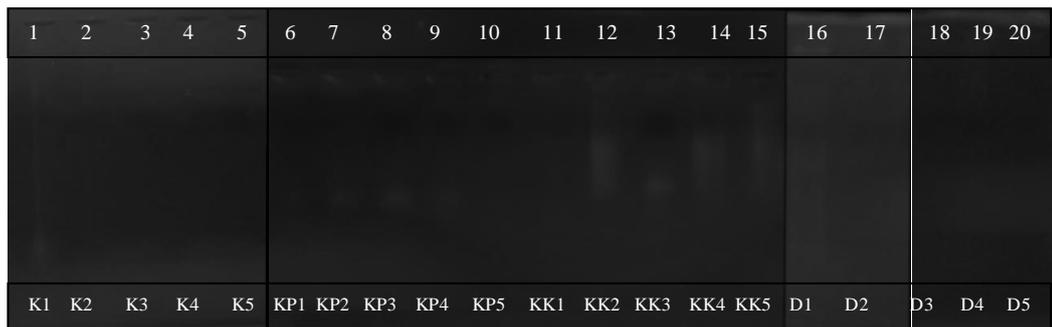
Gambar 2. Hasil elektroforesis ekstraksi DNA dengan metode CTAB

Keterangan Gambar :

Angka = Nomor Sampel

Huruf = Kode Sampel

Hasil elektroforesis DNA total dari semua sampel menunjukkan hasil pita DNA yang tidak terlihat dan tidak dapat diinterpretasikan.



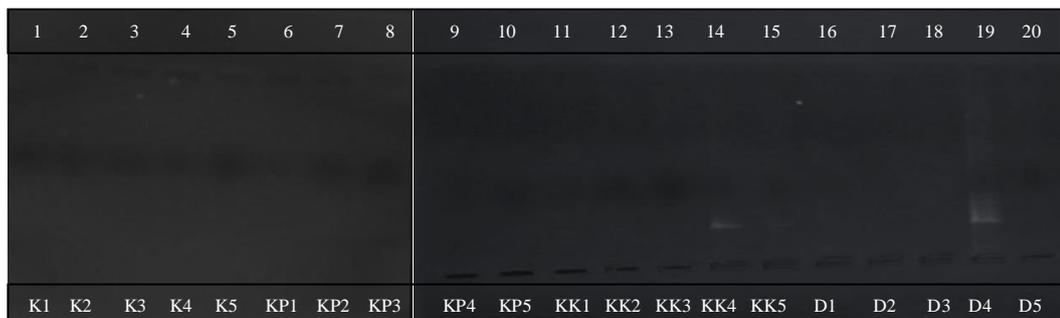
Gambar 3. Hasil elektroforesis ekstraksi DNA dengan metode CTAB menggunakan mercaptoethanol.

Keterangan Gambar:

Angka = Nomor Sampel

Huruf = Kode Sampel

Hasil elektroforesis DNA total dari semua sampel menunjukkan hasil pita DNA yang tidak terlihat dan tidak dapat diinterpretasikan.



Gambar 4. Hasil elektroforesis ekstraksi DNA dengan metode *DNeasy plant mini kit*

Ket Gambar:

Angka = Nomor Sampel

Huruf = Kode Sampel

Sampel KK3 dan D3 memberikan hasil pita DNA yang cukup terlihat. Sedangkan sampel lainnya memberikan hasil pita DNA yang sama sekali tidak terlihat dan tidak dapat diinterpretasikan.

Elektroforesis DNA total tidak menunjukkan hasil pita DNA yang tidak terlihat dan tidak dapat diinterpretasikan. Pada metode CTAB dan metode CTAB dengan menggunakan *mercaptoethanol* tidak menunjukkan pita DNA yang jelas sama sekali seperti yang terlihat pada gambar. Pada Metode *DNeasy Plant Mini Kit* memberikan hasil elektroforesis hanya menunjukkan pita DNA pada dua sampel saja dan tidak menunjukkan hasil pita DNA yang dapat diinterpretasikan pada sampel lainnya. Metode *DNeasy plant mini kit* adalah satu-satunya metode yang memberikan hasil pita DNA pada hasil elektroforesis. Metode *DNeasy plant Mini Kit* juga menghasilkan elektroforesis yang tergolong bersih, yaitu tidak terdapat sisa-sisa bahan ekstraksi dan sapuan (*smear*).

Tidak adanya pita DNA diduga karena kandungan fenol dan polisakarida yang terkandung dalam kayu dan kulit kayu *Pinus merkusii* sangat tinggi serta jumlah DNA total yang terekstraksi cukup rendah dan terdegradasi. Hal tersebut didukung oleh Rachmayanti *et al.* (2006) yang memberikan alasan hasil ekstraksi tidak tervisualisasi karena DNA sangat terdegradasi menjadi fragmen yang lebih kecil sehingga menyebabkan sapuan (*smear*) dan juga Hasil DNA terlalu rendah untuk divisualisasi dengan teknik UV. Menurut Ardiana (2006) sapuan (*smear*) yang terlihat juga menunjukkan bahwa hasil ekstraksi yang dilakukan tidak cukup bersih. Namun pada sampel daun, kemungkinan DNA terdegradasi cukup kecil sehingga sapuan (*smear*) yang terjadi diduga karena hasil ekstraksi DNA cukup tinggi sehingga DNA tidak turun secara keseluruhan (Komalasari 2009). Hal ini terbukti dengan adanya hasil uji kuantitas DNA yang menunjukkan hasil kemurnian DNA yang diperoleh cukup bagus pada sampel daun.

Tidak terihatnya pita DNA pada sampel kayu dan kulit kayu ini juga terjadi pada penelitian sebelumnya oleh Deguilloux *et al.* (2002) pada kayu kering jenis pasang dan Rachmayanti *et al.* (2006) pada kayu Dipterocarpaceae dimana pita DNA hasil ekstraksi tidak tervisualisasi pada saat proses elektroforesis.

KESIMPULAN

Dari ketiga metode ekstraksi DNA, metode CTAB memperoleh hasil kemurnian DNA yang lebih bagus baik pada uji kuantitas maupun uji kualitas. Semua metode memperoleh nilai *optical density ratios* di luar rentang kemurnian ($\lambda 260/280 = 1.8 - 2.0$ ng/ μ l dan $\lambda 260/230 = 2.0$ ng/ μ l) pada sampel kayu, kulit kayu dan sampel daun khusus metode *DNeasy Plant Mini Kit* dan memperoleh nilai *optical density ratios* mencapai 1.8-2.0 ng/ μ l pada sampel daun dari metode CTAB dan metode CTAB dengan *mercaptoethanol*. Hasil ekstraksi DNA pada metode

CTAB dan metode CTAB dengan menggunakan *mercaptoethanol* juga tidak menunjukkan hasil pita DNA yang dapat diinterpretasikan sama sekali, sedangkan pada metode *DNeasy Plant Mini Kit* menunjukkan pita DNA pada sampel KK3 dan D3 dan pada sampel lainnya tidak menunjukkan pita DNA yang dapat diinterpretasikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Khaerudin, 1999. Pembibitan Tanaman HTI. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Daud, M., 2017. Profil KPH TAHURA Pocut Meurah Intan. Yogyakarta: Penebar Media Pustaka.
- Gusmiaty, *et al.*, 2016. Polimorfisme Penanda RAPD untuk Analisis Keragaman Genetik *Pinus merkusii* di Hutan Pendidikan Unhas. *Jurnal Natur Indonesia*. 16(2), pp.47-53.
- Pharmawati, Made, 2009. Optimalisasi Ekstraksi DNA Dan PCR-Rapd Pada *Grevillea spp. (Proteaceae)*. *Jurnal Biologi XIII*, (1), pp.12 -16.
- Semagn, K., *et al.*, 2006. An overview of *molecular marker methods for plants*. *Afr. J. Biotechnol.* (5), pp.2540-2568.
- Tibbits J.F.G., *et al.*, 2006. A rapid method for tissue collection and high-throughput isolation of genomic DNA for mature trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, (15), pp.219-23.
- Deguilloux M.F., *et al.*, 2002. Novel perspective in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Science*. 269: 1039-1046.
- Yuwono, Triwibowo, 2009. *Biologi Molekular*. Jakarta, Erlangga.
- Rachmayanti Y., *at al.*, 2006. Extraction, amplification and characterization of *wood DNA from Dipterocarpaceae*. *Plant Molecular Biology Reporter*. (24), pp.45-55.
- Wilson, K. and J. Walker. 2010. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press, UK.