

Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Cengkeh dengan Menggunakan Modifikasi Bufer CTAB

DNA Isolation Technique of Clove Plant Genomes Using Buffer CTAB Modification

Sundari

Prodi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Khairun Ternate

email: sundariunkhair08@gmail.com

Abstrak

Metode dan teknik sederhana, efisien untuk isolasi DNA genom tanaman cengkeh yang banyak mengandung residu polisakarida dan phenol telah dihasilkan. Pada penelitian ini, digunakan protokol isolasi DNA tumbuhan dengan metode CTAB yang dimodifikasi sebagai protokol yang efisien untuk membuang polisakarida dan phenol yang terdapat pada tanaman cengkeh. Obyek penelitian ini terdiri dari sampel tanaman cengkeh dan protocol CTAB yang dimodifikasi pada konsentrasi pvp, washing dan presipitasi serta inkubasi dingin untuk pemurnian DNA genom dari polisakarida dan phenol. Perbandingan 2 protokol isolasi DNA genom cengkeh dengan CTAB standard dan CTAB modifikasi menunjukkan bahwa metode CTAB modifikasi menghasilkan *whole genom* durian cukup murni rata rata 1,90 dan berhasil diamplifikasi dengan PCR-RAPD.

Kata kunci: isolasi, DNA, polisakarida, CTAB, modifikasi.

Abstract

The simple and efficient method for genomic DNA isolation protocol from clove, its woody crops containing high polysaccharide and phenol levels has been described here. In the present study, using modified CTAB for plant DNA isolation method were studied for removing the highly concentrated polysaccharides from genomic DNA of woody crops. This method involves the modified CTAB at the pvp concentration, time incubate and precipitate procedure employing DNA purification step to remove polysaccharides and phenol residu. Compared with the two studied DNA isolation methode of clove using standart CTAB and modified CTAB the everage yield high quality DNA whole genom is 1.90 purity and DNA was suitable for PCR and RAPD analyses.

Keyword: isolation, DNA, polysaccharides, phenol residu, CTAB

Pendahuluan

Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L. Mer & Perry) merupakan tanaman rempah rempah yang bernilai ekonomi. Tanaman ini termasuk salah satu spesies dari *family Myrtaceae*. Cengkeh dalam sejarah disebut sebagai tanaman asli Indonesia yang berasal dari Kepulauan Maluku, yaitu dari Pulau Ternate, Tidore, Motir, Makian, dan Bacan (Purseglove *et al.*, 1981). Cengkeh varietas Afo terdapat di pulau Ternate. Cengkeh ini merupakan cengkeh tetua dari cengkeh zanzibar yang merupakan varietas cengkeh unggulan di Indonesia. Sebagai daerah hotspot dan pusat persebaran cengkeh dunia, maka perlu dilakukan program pemuliaan dan strategi konservasi spesies cengkeh asli Maluku Utara. Pada saat ini upaya pemuliaan dan konservasi cengkeh asal Maluku Utara telah dilakukan berbasis data sebaran dan karakter fenotip. Program pemuliaan akan sangat efektif jika didukung dengan data genetic dalam hal ini keanekaragaman genetic tanaman cengkeh. Diharapkan melalui kajian ini dapat diketahui jarak genetik untuk digunakan sebagai acuan dalam persilangan antar kerabat sehingga diperoleh sifat yang unggul.

Pada saat ini teknologi DNA untuk kajian analisa molekuler telah berkembang pesat. Tahap isolation DNA dengan merupakan tahap yang sangat penting dan menentukan keberhasilan. Kualitas DNA genom yang diisolasi tinggi merupakan hal yang dijadikan tolak ukur keberhasilan pekerjaan ditahap amplifikasi dan analisis sekuen DNA penanda molekuler. Kontaminasi Polysaccharida dan derivatnya merupakan salah satu problem dalam kegiatan isolasi DNA pada tanaman berkayu. Pada umumnya sampel DNA dari tanaman berkayu sering terkontaminasi oleh polisakarida, fenol, dan derivatnya. Kontaminan tersebut sangat mengganggu kualitas DNA genom yang dihasilkan (Fang *et al.* 1992; Porebski *et al.* 1997; Schlink and Reski 2002), Kualitas DNA genom yang dihasilkan selama isolasi juga akan mempengaruhi daya simpan DNA dan peluang adanya enzim dan inhibitor pada saat tahap amplifikasi DNA dan sekuensing (Lodi *et al.* 1994; Sharma *et al.* 2002).

Bufer *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) lebih dikenal sebagai metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA genom tanaman yang banyak mengandung

polisakarida dan senyawa polifenol (Lumaret *et al.* 1998; Jose dan Usha 2000). Terdapat tiga langkah utama dalam ekstraksi DNA, yaitu perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Nicholl 1993; Surzycki 2000). Teknik dan metode isolasi DNA saat sudah banyak dikembangkan namun teknik tersebut masih bersifat universal bagi tanaman atau hewan dan mikroorganisme. Teknologi terbaru telah dikembangkan teknik isolasi DNA dalam paket miniprep kit DNA extraction untuk tanaman sudah dilengkapi dengan bahan dan kolom pembersih polisakarida (Porebski *et al.* 1997; Schlink and Reski 2002).

Tanaman cengkeh merupakan jenis tanaman berkayu dan aktif menghasilkan senyawa metabolit sekunder minyak atsiri. Pada umumnya teknik isolasi DNA genom tanaman berkayu masih sangat sulit dalam memisahkan kontaminan polisakarida dan derivatnya selama proses isolasi DNA sehingga proses amplifikasi DNA dengan PCR – RAPD, RFLP maupun SSR, dan sekuen DNA barcode menghasilkan pita DNA yang sangat sedikit bahkan ada yang gagal dalam amplifikasi DNA (Luro *et al.* 1995; Porebski *et al.* 1997). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan teknik isolasi DNA genom dari tanaman cengkeh yang merupakan tanaman berkayu dan produktif menghasilkan senyawa metabolit sekunder, teknik isolasi DNA genom dimodifikasi dari protocol CTAB standar, modifikasi difokuskan pada menghilangkan kontaminan residu fenol dan polisakarida dari DNA melalui peningkatan konsentrasi PVP, presipitasi PCI dan penamjangan waktu inkubasi dingin.

Metode Penelitian

Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel daun muda tanaman cengkeh asal Ternate. Bahan lain yang digunakan adalah Nitrogen cair, Bufer CTAB CTAB (CTAB: 4,1 g NaCl, 10 g CTAB, 0,5 M EDTA pH 8,0, 18,61 g disodium etilendiamin tetra asetat 2H₂O, 1M Tris-HCl pH 8,0, 12,11 g *Trisma Base*, 1,40 M NaCl, 29,22 g sodium klorida, 2% PVP dan 0,20% β -mercaptoetanol), pvp, β -mercaptoetanol, buffer TE, buffer EDTA, befer TBE, primer RAPD 1-5 yang mempunyai untaian nukleotida RAPD1, RAPD2, RAPD3, RAPD4, RAPD5, RAPD6, 3000 kb DNA ladder.

Prosedur isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom dari sampel daun cengkeh Ternate menggunakan metode CTAB (Doyle & Doyle, 1990 dan metode CTAB yang dimodifikasi peneliti. Modifikasi CTAB yang dilakukan peneliti adalah modifikasi :1) Konsentrasi Bufer CTAB menjadi 3%; 2) konsentrasi pvp 4%, 3) proses pencucian dengan PCI menjadi 3-4 kali cuci, dan 5) inkubasi suhu -20°C menjadi 18 jam. Selanjutnya, sebanyak 0,05 gram daun segar digerus dengan mortal pistil steril dengan nitrogen cair dan ditambahkan buffer ekstrak {CTAB 2%, 1 M Tris-HCl (pH 8), 0,5M EDTA (pH 8), 5 M NaCl, 7,5 M Amonium sulfat, dan 0,1 mg/μL RNase } kemudian ditambahkan PVP, 2% β mercaptoetanol, dan selanjutnya inkubasi suhu 60 °C selama 30 menit, kemudian di sentrifuse pada suhu 4°C, 13.000 rpm selama 10 menit, Supernatan ditambahkan PCI (phenol: Chloroform: Isoamilalkohol) 25:24:1 dan disentrifuse pada suhu 4°C, 13.000 rpm selama 10, selanjutnya supernatan ditambah dengan CI (chloroform:Isoamilalkohol) 24:1 dan disentrifuse pada suhu 4°C, 13.000 rpm selama 5 menit, supernatan dipindahkan ke tabung ependof baru dan ditambahkan amonium sulfat 7,5M sebanyak 0,1 volume supernatan mixgentle dan ditambahkan alkohol absolut sebanyak 2,5 volume supernatan dan dikocok, selanjutnya diinkubasi pada suhu -20 °C selama 2 jam, selanjutnya sentrifuge selama 15 menit pada suhu 4°C 13.000 rpm. kemudian supernatan dibuang dan pelet ditambah alkohol 70% sebanyak 500μL dan disentrifuse selama 15 menit, buang supernatan dan pelet dikeringanginkan selama 1 jam selanjutnya ditambahkan buffer TE (pH 8) sebanyak 50 μL dan DNA cengkeh siap disimpan pada suhu -20°C untuk jangka waktu lama.

Kuantifikasi DNA Menggunakan Elektroforesis

DNA dikuantifikasi menggunakan elektroforesis pada agarose gel 1,5%. Prosesnya, 1μl stok DNA dicampur dengan 9 μl air suling dan 2μl *loading dye*. Campuran contoh lalu dimasukkan ke dalam sumuran gel dalam kamar elektroforesis yang telah diisi bufer TBE 1x (*Trisma Base*, *boric acid*, dan 0,5 M EDTA pH 8,0). Sebagai pembanding digunakan marker DNA *ladder* yang diletakkan

pada sumur pertama kemudian elektroforesis dijalankan pada tegangan 70 volts sampai DNA bermigrasi/bergerak lebih kurang 1 cm di atas batas bawah. Selanjutnya visualisasi dengan GelDoc Uv transluminator, sedangkan uji kuantitatif dilakukan dengan mengukur konsentrasi dengan spektrofotometer.

Amplifikasi RAPD PCR

Reaksi amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR merk Takara. Jumlah koktail PCR yang digunakan adalah 10 μL dengan komposisi 5 μL PCR mix merk INTRON; 3 μL DdH₂O; 1 μL primer OPA (1, dan 19) dan 1 μL DNA template. Pengaturan program PCR yang digunakan adalah sebanyak 45 siklus yang terdiri dari fase Pradenaturasi suhu 94°C selama 5 menit; Denaturasi suhu 94°C selama 30 detik; Annealing suhu 37°C selama 30 detik; Ekstensi suhu 72°C selama 90 detik; dan Post Ekstensi suhu 72°C selama 7 menit. Selanjutnya dilakukan tahap elektroforesis untuk visualisasi hasil amplifikasi DNA durian menggunakan penanda molekuler RAPD dengan menggunakan 2 primer (Tabel 1). Untuk membandingkan ukuran pasang basa antar pita DNA hasil amplifikasi digunakan marker DNA 1000bp plus merk INTRON.

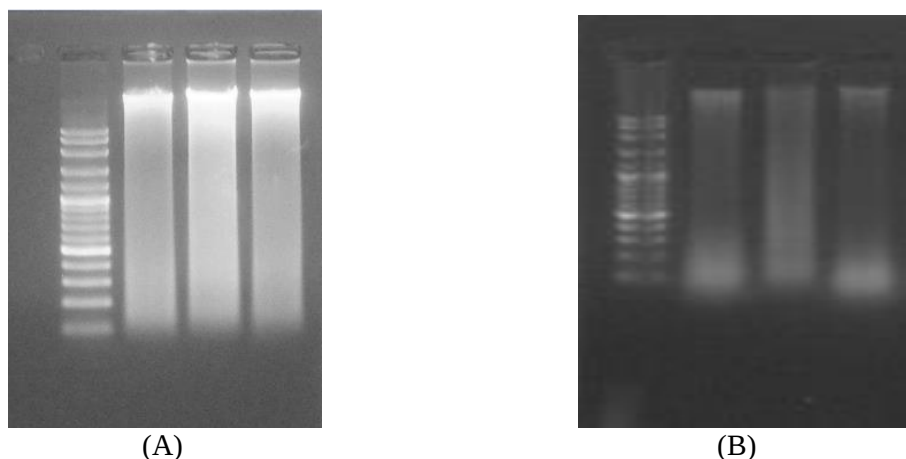
Tabel 1. Sekuen primer OPA

Primer	Seq 5 to 3
OPA-1	CAG GCC CTT C
OPA-2	TGC CGA GCT G

Selanjutnya hasil dari PCR di elektroforesis dengan dimasukkan dalam sumuran gel 1,5% dalam kamar elektroforesis yang sudah diisi bufer TBE 1x, diisi satu sumuran pertama dengan 3000 bp DNA *ladder*. Setelah itu elektroforesis dijalankan dengan daya 70 volt sampai penanda *loading dye* berada sekitar 1 cm di atas batas gel bagian bawah.

Hasil dan Pembahasan

Data hasil penelitian ini berupa profil DNA genom tanaman cengkeh hasil isolasi dengan menggunakan protocol isolasi DNA CTAB (Doyle & Doyle, 1990) dan CTAB modifikasi ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. A) DNA Cengkeh (metode CTAB) B) DNA Cengkeh (CTAB modifikasi)

Profil DNA genom tanaman cengkeh dengan protocol CTAB (Doyle & Doyle, 1990) (Gambar 1A) terlihat bahwa DNA genom yang dihasilkan pada 3 sampel tanaman cengkeh DNA genom yang dihasilkan cukup tebal namun mengalami *smear*. Gambar 1B terlihat bahwa DNA genom yang dihasilkan dengan protocol CTAB modifikasi DNA genom yang dihasilkan lebih tipis namun tidak *smear*. Selanjutnya data konsentrasi dan kemurnian DNA seperti pada table 2 berikut:

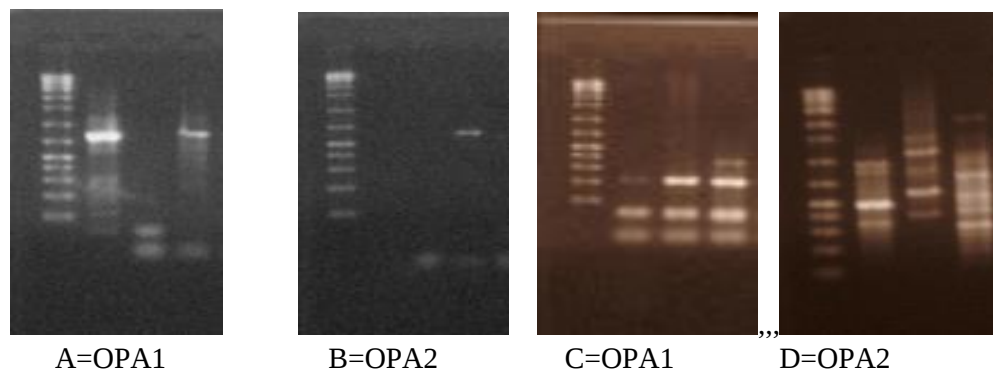
Tabel 2. Data Kemurnian DNA Genom pada tanaman durian

Nomor	Sampel	Komurnian (metode CTAB)	Kemurnian (CTAB modifikasi)
1	A1	2,03	1,78
2	A2	2,05	1,86
3	A3	2,09	1,79

Hasil isolasi DNA genom tanaman cengkeh dengan metode isolasi dengan CTAB menghasilkan DNA dengan kemurnian yang rendah artinya masih terdapat kontaminasi polisakaridasi dan phenol. Kemurnian DNA genom hasil isolasi dengan protocol CTAB modifikasi menunjukkan nilai yang mendekati DNA murni yaitu 1,80. Komposisi DNA yang mengandung basa purin dan pirimidin dapat menyerap cahaya UV. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm, sedang kontaminan protein atau phenol dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm. Dengan adanya perbedaan penyerapan cahaya UV ini, kemurnian DNA dapat diuji secara kuantitatif dengan

menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm (Aras, *et al.*, 2003). Kemurnian DNA ditentukan dengan estimasi rasio absorbansi pada 260 nm sampai 280 nm ($\text{\AA} 260 / \text{\AA} 280$), dan nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0. (Sambrook, 2001).

Pada tahap awal isolasi DNA dengan menggunakan nitrogen cair untuk melisis dinding sel dan mengeluarkan semua isi sel, selanjutnya ditampung dalam larutan penyangga yang berisi Tris HCl dan EDTA. Namun dinding sel juga dapat dipecahkan dengan penggerusan menggunakan bufer ekstraksi diikuti dengan penghangatan pada suhu 65°C. Bahan detergen seperti sodium dodecil sulfat (SDS), sarkosil, dan CTAB dapat digunakan untuk proses lisis (Subandiyah, 2006). Penggunaan bufer CTAB sebagai pengganti nitrogen cair untuk ekstraksi dapat menghasilkan produk DNA yang berkualitas yang ditunjukkan oleh pita DNA genom (Gambar 1). Produk isolasi DNA yang berkualitas baik ditunjukkan dengan pita DNA yang terlihat tebal dan bersih bila divisualisasi menggunakan gelDoc elektroforesis. Setelah proses elektroforesis DNA genom dan dihasilkan pita DNA yang berkualitas dilanjutkan proses PCR, yaitu metode *in vitro* yang secara cepat dapat mengcopy sekuenseku DNA target yang ada di dalam whole genom DNA. Selanjutnya dilakukan amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR-RAPD dengan 2 primer OPA 1 dan OPA 2. Hasil amplifikasi DNA ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Profil PCR-RAPD dari 3 sampel cengkeh dengan Metode CTAB (Gambar A dan B) dan metode CTAB modifikasi (Gambar C dan D)

Hasil amplifikasi DNA dengan PCR-RAPD menunjukkan bahwa metode isolasi DNA dengan CTAB standar pada penelitian ini kurang efektif untuk proses amplifikasi DNA cengkeh, hal ini dapat dilihat pada gambar 2 pita DNA yang terbentuk pada primer OPA 1 sedikit pita yang muncul, sedangkan pada penggunaan OPA 2 hanya terdapat 1 sampel DNA yang dapat teramplifikasi dan sisanya kosong. Pada produk PCR-RAPD dengan menggunakan protocol CTAB modifikasi diketahui pada primer OPA 1 dan primer OPA 2 terdapat 3 sampel DNA yang teramplifikasi. Produk PCR akan menjadi DNA target. Sekitar 105 kopi dari sekuen DNA target dengan mudah dapat divisualisasikan sebagai pita diskret dengan ukuran spesifik ketika disepari pada elektroforesis gel agarose (Tridjasmiko, 2006).

Proses amplifikasi dengan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) merupakan teknik pengujian polimorfisme DNA berdasarkan pada amplifikasi dari segmen-segmen DNA acak yang menggunakan primer tunggal yang sekuen nukleotidanya ditentukan secara acak. Primer tunggal ini biasanya berukuran 10 basa. PCR dilakukan pada suhu anealing yang rendah yang memungkinkan primer menempel pada beberapa lokus pada DNA. Aturan sederhana untuk primer adalah terdiri atas 18- 28 susunan basa dengan persentase G+C 50-60% (Subandiyah, 2006).

Profil pita DNA genom pada tanaman termasuk cengkeh yang dihasilkan dari isolasi DNA menggunakan CTAB standar (Gambar 3), dan hasil isolasi DNA pada tanaman cengkeh menggunakan teknik isolasi DNA modifikasi CTAB {3% CTAB, 1 M NaCl, 3% β -mercaptoetanol, dan 4% PVP 10}. Bila kedua

hasil tersebut dibandingkan maka pola pita DNA yang dihasilkan memiliki ketebalan yang tidak sama. Dengan demikian, bufer CTAB modifikasi cukup memenuhi syarat untuk digunakan dalam isolasi DNA dari tanaman yang mengandung karbohidrat dan fenol tinggi karena tidak merusak DNA. Bufer CTAB dengan kandungan garam yang tinggi dapat memisahkan polisakarida dari dinding sel (Porebski *et al.* 1997; Surzycki 2000), sedangkan PVP dapat mengurangi broning akibat kandungan fenol pada daun muda (Porebski *et al.* 1997).

Simpulan

Isolasi DNA genom tanaman cengkeh memerlukan prosedur dan teknik isolasi yang spesifik yang dapat dikembangkan dari modifikasi CTAB. Teknik isolasi tersebut dapat dikembangkan dari prosedur standar yaitu CTAB. Pemisahan DNA dari kontaminan seperti protein, lemak, dan karbohidrat dapat dilakukan saat isolasi dengan modifikasi konsentrasi bahan, waktu inkubasi dan teknik presipitasi. Penggunaan bufer CTAB ditambah 3% β -mercaptoetanol dan PVP mampu mengurangi broning.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih tak terhingga kepada Dr. Yayuk Muliati, M.Si dan Abdu Mas'ud M.Pd yang telah membantu pelaksanaan isolasi DNA, pemotretan gelDoc dan analisis data molekuler PCR-RAPD selama penelitian.

Daftar Pustaka

- Aras, S., A. Duran & G. Yenilmez. 2003. Isolation of DNA for RAPD Nalysis From Dry leaf Material of some Hesperis L. specimens. *Plant Molecular Biology Reporter*. 21: 461a- 461f
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15. Fang, G, S. Hammar and R. Grumet. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *BioTechniques* 13:52-57.
- Fang G, Bammar S, Grumnet R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biofeedback* 13: 52-54.
- Jose, J. and R. Usha. 2000. Extraction of geminiviral DNA from a highly mucilaginous plant (*Abelmoschus esculentus*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 349-355.
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI. 1994. Simple and efficient method for DNA extractions from grape vine cultivars and Vitis species. *Plant Mol Biol Rep* 12: 6-13.
- Luro FM, Lorieux JM, Laigret Bove, Ollitrault P. 1995. Genetic mapping of an integenric *Citrus* hybrid using molecular markers. *Fruits*. 49: 404-408.
- Lumaret, R., H. Michaud, J.P. Ripoll, and L. Toumi. 1998. *Chloroplast DNA extraction procedure for species high in phenolics and polysaccharides*. p. 15-17. In A. Karp, P.G.
- Nicholl, D.S.T. 1993. *An Introduction to Genetic Engineering*. Department of Biological Science, University of Praisly.
- Porebski, S., L.G. Baily, and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 8-15.
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and ployphenol components. *Plant Mol Biol Rep.* 15: 8-15.
- Purseglove, J.W., E.G. Brown, C.L. Green, and S.J. Robbins. 1981. *Spices Vol I*. Longman. London and New York. p. 229
- Isaac, and D.S. Ingram (Eds.). *Molecular Tool for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, London Schlink K, Reski R. 2002. Preparing high-quality DNA from Moss (*Physcomitrella patens*). *Plant Mol Biol Rep.* 20: 423a-423f.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Edisi ke-2. Cold Spring Harbor Laboratory. New York Sharma AD, Gill PK, Singh P. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Mol Biol Rep.* 20: 415a-415f.
- Subandiyah, S. 2006. *Polymerase Chain Reaction untuk Deteksi atau Identifikasi Patogen Tumbuhan. Beberapa Metode Ekstraksi DNA. Pelatihan dan Workshop Identifikasi DNA dengan Aplikasi PCR*. Malang. hlm. 43-50.
- Surzycki, S. 2000. *Basic techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Tridjatkiko, K.R. 2006. *Penggunaan Metode PCR untuk Deteksi Cepat Keragaman DNA. Pelatihan dan Workshop Identifikasi DNA dengan Aplikasi PCR*. Malang. hlm. 22-25.