

METODE EKSTRAKSI DNA PADA *Jatropha* spp. TANPA MENGGUNAKAN NITROGEN CAIR

DNA Extraction Method of Jatropha spp. without Liquid Nitrogen

KRISTIANO NUGROHO, RERENSTRADIKA T. TERRYANA,
HABIB RIJAANI, dan PUJI LESTARI

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

E-mail: nugrohoxkristianto@gmail.com

ABSTRAK

Ekstraksi DNA merupakan salah satu tahap penting dalam kegiatan pemuliaan berbasis molekuler. Jarak merupakan salah satu tanaman dengan kandungan getah cukup tinggi sehingga proses ekstraksi DNA cukup sulit dilakukan. Selama ini metode ekstraksi yang dikembangkan umumnya menggunakan nitrogen cair untuk menghancurkan jaringan tanaman. Nitrogen cair merupakan senyawa yang cukup sulit untuk didistribusikan ke laboratorium yang letaknya jauh dari kota. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh teknik ekstraksi DNA jarak yang mampu menghasilkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang baik tanpa menggunakan nitrogen cair. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor pada bulan November hingga Desember 2015. Terdapat lima spesies jarak asal Thailand yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Jatropha curcas*, *Jatropha podagrica*, *Jatropha gossypifolia*, *Jatropha multifida*, dan *Baliospermum solanifolium*. Ekstraksi DNA dilakukan melalui modifikasi buffer CTAB melalui penambahan senyawa PVP, natrium metabisulfit, sukrosa dan asam askorbat. Bagian tanaman yang digunakan berupa daun yang masih muda. Hasil penelitian menunjukkan DNA jarak yang diekstraksi dengan metode ini mempunyai kualitas dan kuantitas yang baik serta mampu diamplifikasi dengan baik. Metode ini mampu mengurangi ketergantungan terhadap nitrogen cair yang ketersediaannya terbatas di laboratorium yang lokasinya jauh dari kota.

Kata kunci: *Jatropha* spp., ekstraksi, DNA, nitrogen cair

ABSTRACT

Physic nut is one of potential plant which produces biofuel. It is necessary to do an intensive breeding program either conventionally or molecularly based to develop new varieties of physic nut. All this time the physic nut DNA extraction methods always used liquid nitrogen to destroy the plant tissue. Liquid nitrogen is not always available, especially in remote areas. Physic nut has high latex content which makes extraction process more difficult. The aim of this study was to find the technique of DNA extraction which can give a good result without using liquid nitrogen. This research was conducted in Molecular Biology Laboratory, ICABIOGRAD Bogor from November to December 2015. There were five *Jatropha* species from Thailand which used in this research e.g. *Jatropha curcas*, *Jatropha podagrica*, *Jatropha gossypifolia*, *Jatropha multifida*, and *Baliospermum solanifolium*. The extraction method used modification CTAB by addition of PVP, sodium metabisulphite, sucrose and ascorbic acid. The young leaves were used as the part to be extracted. The results showed that the modified method could produce a good quality and quantity of DNA. The banding pattern of DNA amplification clearly visible under UV light. This method can reduce the dependency of liquid nitrogen.

Keywords: *Jatropha* spp., extraction, DNA, liquid nitrogen

PENDAHULUAN

Jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) merupakan tanaman tahunan anggota famili Euphorbiaceae yang bersifat multifungsi, karena selain dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat, bijinya juga menghasilkan minyak yang dapat diolah menjadi bahan bakar alternatif dan bahan pembuat sabun, serta bungkil bijinya dapat diolah menjadi biobriket (ERYTHRINA, 2007; HAMBALI, 2007).

Tanaman ini mampu menghasilkan minyak yang dapat dikonversi menjadi biodiesel (ACHTEN *et al.*, 2007). Kehadiran bahan bakar dari minyak jarak diharapkan mampu mengurangi ketergantungan terhadap bahan bakar berbasis minyak bumi yang sifatnya tidak dapat diperbarui. Tidak seperti pada tanaman penghasil biofuel seperti jagung, kedelai, tebu, atau singkong, jarak pagar merupakan tanaman yang tidak dapat dimakan (*non edible plant*) sehingga pemanfaatannya sebagai bahan bakar tidak akan menimbulkan persaingan kebutuhan (BECKER dan MAKKAR, 2008).

Untuk menghasilkan varietas jarak dengan sifat unggul, maka kegiatan pemuliaan dilakukan secara intensif. Pemuliaan dengan teknik persilangan pada jarak tidak hanya dilakukan secara intraspesifik namun juga dapat dilakukan secara interspesifik karena genus *Jatropha* memiliki banyak spesies dan genera yang saling berkerabat (TANYA *et al.*, 2011). Terdapat beberapa spesies selain jarak pagar antara lain jarak bali (*Jatropha podagrica*) memiliki kandungan minyak pada biji lebih dari 50% sehingga cocok untuk dijadikan tanaman donor sifat minyak tinggi, jarak cina (*Jatropha multifida*) memiliki ukuran buah yang besar, sedangkan *bellyache bush* (*Jatropha gossypifolia*) memiliki sifat toleran cekaman salinitas dan kekeringan (KRISHNAN dan PARAMATHMA, 2009; KUMAR *et al.*, 2009).

Penggunaan marka molekuler pada kegiatan pemuliaan dapat mempermudah proses pemindahan gen-gen tertentu dari satu individu ke individu lain (BAHAGIAWATI, 2011). Pengembangan marka molekuler yang terpaut gen-gen tertentu juga dapat membantu mengurangi ukuran populasi dan waktu yang dibutuhkan dalam program pemuliaan per siklus seleksi (SYUKUR *et*

al., 2012). Selain itu penggunaan marka molekuler juga sangat bermanfaat untuk melihat kekerabatan genetik antar spesies yang digunakan dalam kegiatan pemuliaan tanaman (TANYA *et al.*, 2011).

Ekstraksi DNA merupakan salah satu tahap penting dalam kegiatan berbasis molekuler. Permasalahan utama yang sering muncul dalam proses ekstraksi DNA tanaman adalah kehadiran senyawa kontaminan pada sampel yang diisolasi seperti senyawa polisakarida, polifenol, protein, RNA, dan senyawa metabolit sekunder (VARMA *et al.*, 2007). Menurut FATCHIAH *et al.* (2011), beberapa permasalahan yang sering muncul saat ekstraksi DNA yaitu DNA patah-patah selama proses ekstraksi, DNA mengalami degradasi akibat kehadiran enzim nuklease, adanya kontaminasi senyawa polisakarida, dan ikut terisolasinya senyawa metabolit sekunder. RANJAN *et al.* (2010) menyatakan bahwa kehadiran senyawa kontaminan tersebut dapat menghambat berbagai proses mulai dari pematangan DNA, amplifikasi, hingga kloning. Jarak merupakan salah satu tanaman yang daunnya memiliki kandungan getah yang cukup tinggi sehingga mempersulit proses isolasi DNA. Menurut DEVAPPA *et al.* (2011) getah jarak mengandung senyawa terpena, diterpena, dan metabolit sekunder lain.

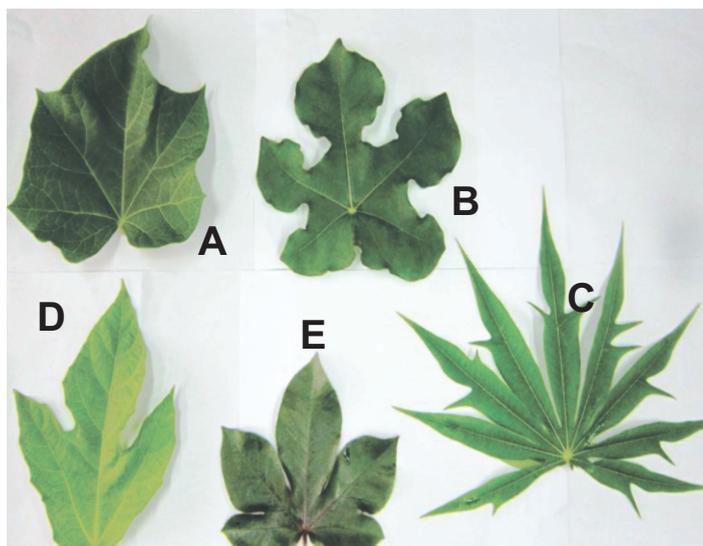
Selama ini metode ekstraksi DNA jarak yang dikembangkan masih menggunakan nitrogen cair. Nitrogen cair merupakan senyawa yang digunakan untuk menghancurkan dinding sel tanaman sehingga isi sel dapat dikeluarkan (ROGERS dan BENDICH, 1989). Menurut TAI dan TANKSLEY (1990), penggunaan nitrogen cair memiliki kelemahan antara lain bila jaringan tanaman telah terpapar nitrogen cair maka jaringan tersebut tidak boleh mencair (*thawing*) sebelum diekstraksi. Selain itu proses transportasi

nitrogen cair tidaklah mudah sehingga laboratorium yang letaknya jauh dari kota akan mengalami kesulitan dalam memperolehnya.

Keberhasilan proses ekstraksi DNA tanpa menggunakan nitrogen cair telah dilaporkan antara lain pada proses ekstraksi DNA tanaman pepaya dan jeruk (ARDIANA, 2009), beberapa spesies tanaman obat (SHARMA *et al.*, 2010), kemiri sunan (SYAFARUDDIN dan SANTOSO, 2011), jambu mete (SYAFARUDDIN *et al.*, 2011), dan bakau (SAHU *et al.*, 2012). Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh metode ekstraksi DNA jarak yang dapat menghasilkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang baik tanpa menggunakan nitrogen cair.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor pada bulan November hingga Desember 2015. Bahan tanaman yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini terdiri atas lima spesies jarak asal Thailand yang terdiri atas *Jatropha curcas*, *Jatropha podagrica*, *Jatropha multifida*, *Jatropha gossypifolia*, dan *Baliospermum solanifolium* yang ditanam di Rumah Kaca Cikeumeuh, Bogor. Bagian tanaman yang diambil berupa daun yang masih muda karena menurut LEFORT dan DOUGLAS (1999), daun yang sudah dewasa memiliki dinding sel yang lebih tebal, serta memiliki kandungan polisakarida dan senyawa fenolik yang lebih tinggi. Tiap sampel yang diekstraksi diulangi sebanyak tiga kali.



Gambar 1. Bentuk daun dari lima species yang digunakan dalam penelitian: (A). *Jatropha curcas*, (B). *Jatropha podagrica*, (C). *Jatropha multifida*, (D). *Baliospermum solanifolium*, (E). *Jatropha gossypifolia*

Figure 1. Leaf shape of five species in this research, (A). *Jatropha curcas*, (B). *Jatropha podagrica*, (C). *Jatropha multifida*, (D). *Baliospermum solanifolium*, (E). *Jatropha gossypifolia*

Buffer Ekstraksi

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode CTAB (DOYLE dan DOYLE, 1990) yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan melalui penambahan 2% (w/v) PVP (*Polyvinylpyrrolidone*), 0.3% (w/v) natrium metabisulfit, 2% (w/v) sukrosa, dan 40 mM asam askorbat pada bufer ekstraksi. Bahan-bahan untuk pembuatan bufer ekstraksi terdiri atas 2% (w/v) CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*), 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, dan 20 mM EDTA pH 8.0. Bahan-bahan seperti PVP, natrium metabisulfit, sukrosa, dan asam askorbat baru ditambahkan pada buffer ekstraksi saat kegiatan ekstraksi akan dilakukan. Bahan-bahan tersebut dicampurkan ke dalam buffer ekstraksi lalu dilarutkan dengan bantuan *magnetic stirer* yang dipanaskan pada *hot plate* bersuhu 60°C hingga bahan-bahan tersebut larut. Buffer ekstraksi kemudian didinginkan pada suhu ruang sebelum digunakan.

Penambahan senyawa PVP pada metode ini berfungsi untuk mengurangi oksidasi senyawa fenolik. PVP akan membentuk senyawa kompleks melalui ikatan hidrogen dengan senyawa fenolik dan terendap bersama debris sel sehingga mencegah terjadinya interaksi antara polifenol dengan DNA (MICHIELS *et al.*, 2003; ANURADHA *et al.*, 2013). Penggunaan senyawa β -Merkaptoetanol pada metode ini selain berperan sebagai antioksidan juga berperan dalam mendegradasi protein (VARMA *et al.*, 2007).

Selain CTAB, terdapat deterjen lain yang digunakan dalam metode ini yaitu *sodium N-lauroyl sarcosine*. Deterjen ini efektif mendenaturasi komponen polisakarida pada sel (MOORE *et al.*, 2004) dan berperan juga sebagai antioksidan yang mencegah oksidasi senyawa fenolik selama sel dihancurkan (FLEISCHMANN dan HEUBL, 2009). Deterjen ini tidak boleh dicampurkan bersama dengan buffer ekstraksi, namun sebaiknya diberikan setelah sampel tercampur dengan buffer ekstraksi karena penambahan deterjen ini secara langsung pada buffer ekstraksi dapat mengakibatkan DNA menjadi terdegradasi (BEKESIOVA *et al.*, 1999).

Metode Ekstraksi

Sebanyak 0.5-0.6 gram daun jarak yang telah dibuang tulang daunnya dari tiap sampel diletakkan pada cawan porselen yang telah disterilisasi. Selanjutnya dilakukan penambahan buffer ekstraksi sebanyak 1 ml lalu sampel digerus dengan mortar steril hingga lumat. Sampel yang telah lumat kemudian dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 2 ml. Selanjutnya dilakukan penambahan *sodium N-lauroyl sarcosine* 2% sebanyak 50 μ l, diikuti penambahan RNase A (10 mg/ml) sebanyak 5 μ l pada tiap sampel. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan penambahan β -merkaptoetanol sebanyak 10 μ l, diikuti dengan vortex selama 15 detik.

Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65°C di dalam *water bath* (ThermoScientific, USA) selama 60 menit dan

dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung setiap 10 menit. Setelah diinkubasi sampel didinginkan terlebih dahulu pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan penambahan 700 μ l larutan kloroform:isoamil alkohol (24:1) ke dalam tiap tabung. Campuran lalu dihomogenkan dengan cara divortex selama 30 detik hingga merata. Setelah itu campuran disentrifugasi pada kecepatan 13 000 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C. Supernatan yang terbentuk lalu dipindahkan ke tabung Eppendorf baru. Penambahan larutan kloroform:isoamil alkohol (24 :1) diulangi sekali lagi hingga warna supernatan menjadi jernih. Selanjutnya dilakukan penambahan 5M natrium klorida (NaCl) sebanyak 1/10 kali volume supernatan diikuti dengan penambahan isopropanol sebanyak satu kali volume supernatan. Campuran kemudian dibolak-balik secara perlahan lalu didiamkan pada suhu ruang selama semalam.

Pada hari berikutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 8000 g selama 10 menit pada suhu 20°C. Supernatan kemudian dibuang dan pelet DNA yang terbentuk lalu dicuci dengan larutan 70% etanol sebanyak 500 μ l. Pelet tersebut kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 3000 g suhu 20°C. Supernatan kemudian dibuang dan tahapan pencucian dengan 70% etanol diulangi sekali lagi. Pelet kemudian dikeringkan dengan cara divakum menggunakan alat *SpeedVac Concentrator* (ThermoScientific, USA) untuk mengeringkan sisa-sisa etanol selama 8 menit dengan tingkat pengeringan medium. Pelet yang telah kering lalu dilarutkan dalam 100 μ l larutan TE (10 mM Tris pH 8.0 dan 1 mM EDTA) dan larutan DNA stok kemudian disimpan pada suhu -20°C hingga siap digunakan.

Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA Jarak

Larutan DNA stok jarak yang diperoleh dari hasil isolasi lalu diuji secara kuantitatif dan kualitatif untuk mengetahui tingkat kemurniannya. Uji kuantitatif larutan DNA stok jarak dilakukan dengan menggunakan alat Nanodrop Spektrofotometer (Thermo Scientific, USA) sedangkan uji kualitatif larutan DNA stok jarak dilakukan dengan teknik elektroforesis pada gel agarose konsentrasi 1% pada tangki berisi buffer 1x TAE, dengan tegangan 100 volt selama 35 menit. Hasil elektroforesis kemudian diamati di bawah sinar UV di dalam alat *UV Trans Illuminator* (Biorad, USA).

Amplifikasi DNA

Masing-masing sampel diamplifikasi dalam total reaksi 10 μ l mengandung 20 ng DNA *template* sebanyak 2 μ l; Kapa2G Fast ReadyMix (Kapa Biosystems, USA) sebanyak 5 μ l; primer *Forward* dan *Reverse* dengan konsentrasi 10 pmol/ μ l masing-masing sebanyak 0.5 μ l, dan *MQ water*. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan dua pasang primer SSR yaitu Scaffold 13-1 dan Scaffold 46-2 yang didesain di *Seoul National University*.

Urutan sikuen *forward* primer Scaffold 13-1 adalah 5'-AGGCCATAACGAACAACAC-3' sedangkan urutan sikuen *reverse* adalah 5'-GCCGAGTCAGAGGATTTGAG-3'. Urutan sikuen *forward* primer Scaffold 46-2 adalah 5'-ATAGGAAATCGAAAACCGCC-3' sedangkan urutan sikuen *reverse* primer Scaffold 46-2 adalah 5'-TGATTCTGTGGTGATCCGAA-3'.

Reaksi PCR dilakukan dalam mesin PCR *TI Thermocycler* (Biometra, Germany) dengan profil PCR sebagai berikut: denaturasi awal dilakukan pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti oleh sebanyak 35 siklus proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* (tahap penempelan primer) pada suhu 55°C selama 1 menit, dan *elongation* (tahap perpanjangan basa) pada suhu 72°C selama 1 menit. Reaksi PCR diakhiri dengan siklus *final extension* (tahap akhir perpanjangan basa) pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1% pada tangki berisi buffer 1x TAE, dengan tegangan 100 volt selama 35 menit.

Pemotongan DNA dengan Enzim Restriksi

Kemampuan DNA jarak hasil isolasi untuk digunakan dalam teknik hibridisasi diuji dengan menggunakan enzim restriksi. Reaksi pemotongan dilakukan dengan mereaksikan 1 µg DNA dengan 2 µl 10x buffer enzim restriksi (NEB, UK) dan 1 µl enzim *EcoRI* (20 000 U/ml) (NEB, UK) dengan total reaksi 20 µl. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam. Hasil pemotongan kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi bufer yang bersifat basa akibat adanya senyawa deterjen (CTAB) membuat proses oksidasi senyawa polifenol berlangsung lebih mudah. Begitu senyawa polifenol teroksidasi senyawa tersebut akan berikatan secara kovalen dengan DNA dan pada saat proses penambahan alkohol akan ikut terendap bersama DNA. Hal ini menjadikan endapan berwarna coklat dan larutan menjadi lebih kental (GUILLEMAUT dan MARECHAL-DROUARD, 1992). Penambahan asam askorbat pada buffer ekstraksi akan menurunkan pH larutan yang semula bersifat basa dengan pH 7.5-8.5 menjadi 6.0-6.5, dan selanjutnya selama proses penambahan kloroform- isoamil alkohol, pH larutan akan kembali turun hingga 5.5-6.0 (BORSE *et al.*, 2011). Kondisi bufer yang bersifat asam akibat kehadiran asam askorbat akan mencegah proses oksidasi senyawa polifenol. Namun konsentrasi asam askorbat yang diberikan pada bufer ekstraksi tidak boleh melebihi konsentrasi di atas 40 mM karena pH larutan yang terlalu asam justru akan berbahaya bagi DNA (BORSE *et al.*, 2011).

Peran senyawa asam askorbat selama proses isolasi DNA telah diteliti oleh BORSE *et al.* (2011) dan hasilnya menunjukkan bahwa pada saat jaringan tanaman dihancurkan, maka bagian sel yaitu vakuola akan mengeluarkan metabolit sekunder yang selama ini tersimpan.

Pada metode ekstraksi digunakan natrium klorida (NaCl) konsentrasi tinggi saat presipitasi DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan 1 M NaCl dapat membantu mengeliminasi senyawa polisakarida dengan cara meningkatkan kelarutan senyawa tersebut di dalam etanol sehingga senyawa polisakarida tersebut tidak ikut mengendap bersama DNA (FANG *et al.* 1992). Sementara itu, penggunaan NaCl konsentrasi 5 M untuk menghilangkan senyawa polisakarida pada tanaman *Vitis* sp telah dilakukan oleh LODHI *et al.* (1994). Pada metode ini, presipitasi DNA dengan isopropanol dilakukan selama semalam pada suhu ruang dan hasil penelitian MICHIELS *et al.* (2003) menunjukkan bahwa presipitasi semalam pada suhu 25°C menghasilkan konsentrasi DNA yang lebih rendah dibanding presipitasi pada suhu rendah, namun demikian spektrofotometer menunjukkan bahwa presipitasi pada suhu ruang memberikan hasil kemurnian DNA yang lebih tinggi. Selanjutnya MICHIELS *et al.* (2003) menambahkan bahwa suhu presipitasi yang hangat dapat membantu mengurangi kontaminan selama proses presipitasi.

Hasil ekstraksi menunjukkan bahwa DNA jarak yang dihasilkan pada penelitian ini memiliki konsentrasi yang beragam antara 100-300 ng/ µl (Tabel 1). Tiap spesies jarak yang digunakan memiliki kandungan senyawa metabolit pada daun yang berbeda-beda. Perbedaan ini diduga sebagai penyebab beragamnya konsentrasi DNA yang diperoleh. Namun demikian, konsentrasi DNA yang diperoleh melalui metode ini sudah cukup untuk kegiatan PCR karena konsentrasi DNA *template* yang dibutuhkan antara 10-100 ng/µl.

Terdapat banyak faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi DNA antara lain pemilihan jenis jaringan yang akan digunakan dan umur jaringan tersebut, penanganan dan penyimpanan jaringan tersebut sebelum diisolasi DNANYA, dan perlakuan homogenasi jaringan, terutama pada jaringan tumbuhan yang dinding selnya banyak mengandung senyawa polisakarida (VARMA *et al.*, 2007). Menurut SYAFARUDDIN dan SANTOSO (2011) terdapat tiga faktor penentu dalam proses ekstraksi dan purifikasi DNA secara optimal antara lain: (1) proses penghomogenan jaringan tanaman, (2) komposisi larutan buffer pada saat penggerusan daun/jaringan tanaman sampel, dan (3) penghilangan senyawa polisakarida khususnya untuk tanaman tahunan. Oleh sebab itu VARMA *et al.* (2007) menyatakan bahwa proses isolasi DNA lebih merupakan sebuah seni dibanding sains.

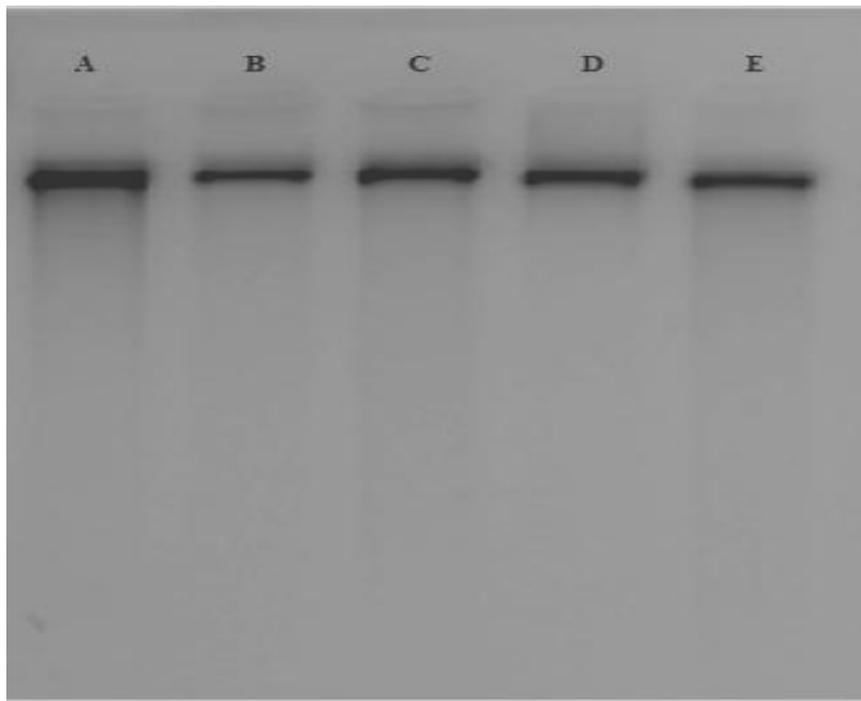
Pita DNA akan menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan berupa protein atau senyawa fenol akan menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm sehingga kemurnian larutan DNA dapat diukur dari nilai perbandingan antara absorbansi pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}) dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm (A_{280}) (MULADNO, 2010; FATCHIYAH, 2011). Menurut SAMBROOK dan RUSSELL (1989), DNA yang kemurniannya baik memiliki nilai perbandingan A_{260}/A_{280} sebesar 1.8-2.0. DNA yang

dihasilkan memiliki perbandingan A_{260}/A_{280} antara 1.8-2.2 (Tabel 1). Walaupun terdapat sampel yang nilai perbandingannya di atas 2.0 namun secara umum DNA yang dihasilkan masih memiliki kualitas yang baik. Hal ini terlihat dari hasil uji kualitatif dengan gel agarose 1% yang menunjukkan bahwa pita DNA terlihat dengan jelas dan tidak menunjukkan adanya degradasi (*smearing*) (Gambar 2). Pada bagian bawah gel juga sudah tidak

terlihat keberadaan RNA. Di samping itu, hasil pemotongan dengan enzim *EcoRI* juga menunjukkan bahwa DNA yang diisolasi dapat terpotong dengan baik (Gambar 3) dan pita hasil amplifikasinya juga tervisualisasi dengan jelas di bawah sinar UV (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan sudah sesuai untuk kegiatan ekstraksi DNA jarak.

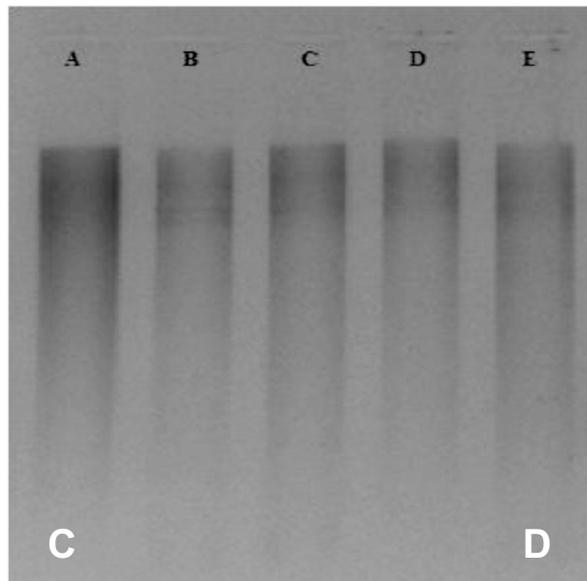
Tabel 1. Hasil uji kuantitatif DNA jarak dengan alat Nanodrop Spektrofotometer
 Table 1. Result of quantitative measurement of *Jatropha* DNA by using Nanodrop Spectrophotometer

Sampel Sample	Rentang konsentrasi DNA DNA concentration range (ng/ μ l)	Rata-rata konsentrasi DNA The average concentration of DNA (ng/ μ l)	Rentang nilai Range of value A_{260}/A_{280}	Rata-rata nilai Mean A_{260}/A_{280}
<i>Jatropha curcas</i>	231.2 - 327.6	283.4	1.8 - 2.1	1.9
<i>Jatropha gossypifolia</i>	151.0 - 224.1	185.1	2.0 - 2.1	2.1
<i>Jatropha podagrica</i>	222.4 - 398.6	302.0	1.9 - 2.0	2.0
<i>Jatropha multifida</i>	191.0 - 375.1	273.2	1.9 - 2.0	1.9
<i>Baliospermum solanifolium</i>	121.2 - 194.9	164.8	2.0 - 2.2	2.1



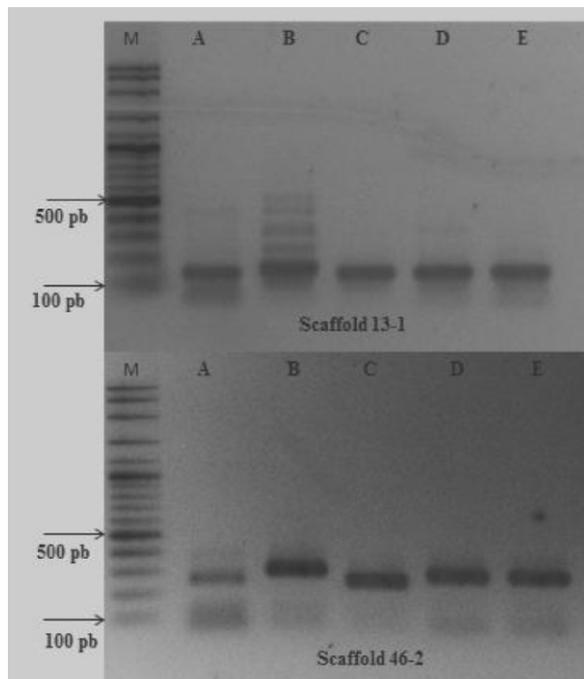
Keterangan: A. *Baliospermum solanifolium*, B. *Jatropha gossypifolia*, C. *Jatropha curcas*, D. *Jatropha podagrica*, dan E. *Jatropha multifida*
 Note: A. *Baliospermum solanifolium*, B. *Jatropha gossypifolia*, C. *Jatropha curcas*, D. *Jatropha podagrica*, and E. *Jatropha multifida*

Gambar 2. Hasil uji kualitatif DNA kelima spesies jarak pada gel Agarose 1%
 Figure 2. Qualitative DNA test results using 1% agarose gel



Keterangan: A. *Baliospermum solanifolium*, B. *Jatropha gossypifolia*, C. *Jatropha curcas*, D. *Jatropha podagrica*, dan E. *Jatropha multifida*
Note: A. *Baliospermum solanifolium*, B. *Jatropha gossypifolia*, C. *Jatropha curcas*, D. *Jatropha podagrica*, and E. *Jatropha multifida*

Gambar 3. Hasil pemotongan DNA dengan enzim EcoRI pada gel Agarose 1%
Figure 3. DNA cutting using EcoRI enzyme in 1% agarose gel %



Keterangan: M : DNA ladder 100 pb, A. *Baliospermum solanifolium*, B. *Jatropha gossypifolia*, C. *Jatropha curcas*, D. *Jatropha podagrica*, dan E. *Jatropha multifida*.
Note: M : DNA ladder 100 bp, A. *Baliospermum solanifolium*, B. *Jatropha gossypifolia*, C. *Jatropha curcas*, D. *Jatropha podagrica*, and E. *Jatropha multifida*.

Gambar 4. Hasil amplifikasi DNA jarak dengan primer Scaffold 13-1 dan Scaffold 46-2 pada gel agarose 1%
Figure 4. Result of DNA amplification using primer Scaffold 13-1 and Scaffold 46-2 in 1% agarose gel

KESIMPULAN

Metode ekstraksi DNA jarak melalui modifikasi bufer ekstraksi tanpa menggunakan nitrogen cair sudah cukup untuk memperoleh DNA jarak yang baik karena telah memenuhi kuantitas dan kualitas untuk kegiatan amplifikasi. Hasil PCR menunjukkan bahwa sampel yang diekstraksi dapat diamplifikasi dengan baik dan pita hasil amplifikasinya dapat divisualisasi dengan jelas di bawah sinar UV. Metode ini mampu mengurangi ketergantungan pada nitrogen cair yang sulit diperoleh laboratorium yang letaknya jauh di luar kota.

DAFTAR PUSTAKA

- ACHTEN W.M.J., E. MATHIJS, L. VERCHOT, V.P. SINGH, R. AERTS, and B. MUYS. 2007. *Jatropha* biodiesel fueling sustainability?. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1(4): 283-291.
- ANURADHA, H.J., K. VIJAYAN, C.V. NAIR, and A. MANJULA. 2013. A novel and efficient protocol for the isolation of genomic DNA from mulberry (*Morus L.*). *Emir. J. Food Agric.* 25(2):124-131.
- ARDIANA, D.W. 2009. Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi bufer CTAB. *Buletin Teknik Pertanian* 14 (1): 12-16
- BAHAGIAWATI. 2011. Peran Markah Molekuler dalam Pemuliaan Tanaman. *Sinar Tani Edisi 16-22 Maret 2011 No. 3397 Tahun XLI*.
- BECKER, K., and H.P.S. MAKKAR. 2008. *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel. *Lipid Technology* 20 (5): 104-107.
- BEKESIOVA, I., J.P.NAP, and L. MLYNAROVA. 1999. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 17: 269-277.
- BORSE, T., P. JOSHI, and S. CHAPALKAR. 2011. Biochemical role of ascorbic acid during the extraction of nucleic acids in polyphenol rich medicinal plant tissues. *J. Plant. Mol. Biol. Biotechnol.* 2(2): 1-7.
- DEVAPPA, R.K., H.P.S. MAKKAR, and K. BECKER. 2011. *Jatropha* diterpenes: a review. *J Am Oil Chem Soc.* 88:301-322.
- DOYLE, J.J. and J.L. DOYLE. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- ERYTHRINA. 2007. Jarak tanam dan pemupukan fosfat pada tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas L.*) di Propinsi Lampung. *Prosiding Lokakarya-II Status Teknologi Tanaman Jarak Pagar Jatropha curcas L.* Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan Bogor. p. 43-49
- FATCHIYAH. 2011. Uji kuantitatif dan kualitatif. *Dalam: Fatchiyah, Arumingtyas E.L., Widyarti S., dan Rahayu S. (ed). Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis.* Jakarta: Penerbit Erlangga. p. 33-37.
- FATCHIYAH, S. RAHAYU, dan E.L. ARUMINGTYAS. 2011. Isolasi DNA. *Dalam: Fatchiyah, Arumingtyas E.L., Widyarti S., dan Rahayu S. (ed.). Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis.* Jakarta: Penerbit Erlangga. p. 21-32.
- FANG, G., S. HAMMAR, and R. GRUMET. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*. 13: 52-54.
- FLEISCHMANN, A. and G. HEUBL. 2009. Overcoming DNA extraction problems from carnivorous plants. *Anales del Jardin Botánico de Madrid*. 66(2): 209-215.
- GUILLEMAUT, P. and L. MARECHAL-DROUARD. 1992. Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive, and reliable method. *Plant Molecular Biology Reporter*. 10(1): 60-65.
- HAMBALI, E. 2007. Diversifikasi produk olahan jarak pagar (*Jatropha curcas L.*). *Prosiding Lokakarya-II Status Teknologi Tanaman Jarak Pagar Jatropha curcas L.* Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan Bogor. hlm. 181-194.
- KRISHNAN, P.R. and M. PARAMATHMA. 2009. Potentials and *Jatropha* species wealth of India. *Current Science*. 97: 1000-1004.
- KUMAR, R.S., K.T. PARTHIBAN, P. HEMALATHA, T. KALAISELVI, and M.G. RAO. 2009. Investigation on cross-compatibility barriers in the biofuel crop *Jatropha curcas L.* with wild *Jatropha* species. *Crop Science*. 49: 1667-1674.
- LEFORT, F. and G.C. DOUGLAS. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus*, and *Quercus*. *Ann. For. Sci.* 56: 259-263.
- LODHI, M.A., G.N.YE, N.F. WEEDEN, and B.I. REISCH. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12(1): 6-13.
- MICHELIS, A., W. VAN DEN ENDE, M. TUCKER, L. VAN RIET, and A. VAN LAERE. 2003. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*. 315: 85-89.
- MOORE, E., A. ARNSCHEIDT, A. KRUGER, C. STROMPL, and M. MAU. 2004. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 1(01): 3-18.
- MULADNO. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: IPB Press. 130 hlm.
- RANJAN, S., G. KISHORE, V.S. JADON, J.P. BHATT, and S. GUPTA. 2010. Standardization of extraction of genomic DNA and PCR-RFLP conditions of *Allium stracheyi*: a high altitude plant. *Academia Arena*. 2(7): 11-14.
- ROGERS, S.O. and A.J. BENDICH. 1989. Extraction of DNA from plant tissues. *In: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A., and Verma, D.P.S. (eds.). Plant Molecular Biology Manual.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p. 73-83.

- SAHU, S.K., M. THANGARAJ, and K. KATHIRESAN. 2012. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology* p. 1-7.
- SAMBROOK, J. and D.W. RUSSELL. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 165.
- SHARMA, P., N. JOSHI, and A. SHARMA. 2010. Isolation of genomic DNA from medicinal plants without liquid nitrogen. *Indian J. Exp. Biol.* 48: 610-614.
- SYAFARUDDIN dan T.J. SANTOSO. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Littri*. 17(1): 11-17.
- SYAFARUDDIN, E. RANDRIANI, dan T.J. SANTOSO. 2011. Efektivitas dan efisiensi teknik isolasi dan purifikasi DNA pada jambu mete. *Buletin RISTRI* 2(2): 151-160.
- SYUKUR, M., S. SUJIPRIHATI, dan R. YUNIANI. 2012. *Teknik Pemuliaan Tanaman*. Jakarta: Penebar Swadaya. p. 348 hlm.
- TAI, T.H. and S.D. TANKSLEY. 1990. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter* 8 (4): 297-303.
- TANYA, P., P. TAEPRAYOON, Y. HADKAM, and P. SRINIVES. 2011. Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers. *Plant Mol Biol Rep.* 29: 252-264.
- VARMA, A., H. PADH, and N. SHRIVASTAVA. 2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnol. J.* 2: 386-392.