

## EFEKTIVITAS DAN EFISIENSI TEKNIK ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA PADA JAMBU METE

Syafaruddin<sup>1)</sup>, Enny Randriani<sup>1)</sup> dan Tri Joko Santoso<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri

Jalan Raya Pakuwon km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357

balittri@gmail.com

<sup>2)</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor 16111

(Diajukan tanggal 1 April 2011, diterima tanggal 1 Juni 2011)

### ABSTRAK

Jambu mete merupakan salah tanaman industri potensial untuk dikembangkan karena selain sebagai penghasil utama kacang mete yang harganya relatif mahal, juga dapat digunakan sebagai tanaman konservasi. Sebagai tanaman yang potensial, maka sangat diperlukan informasi lengkap termasuk informasi molekuler. Berbagai teknik dapat dilakukan untuk mengisolasi Deoxyribonucleic acid (DNA) tergantung dari jenis tanaman atau jaringan tanaman yang digunakan. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor pada bulan Mei-Juli 2011. Materi genetik yang digunakan adalah contoh daun muda tanaman jambu mete yang diambil dari Kebun Percobaan (KP) Cikampek, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri (BALITTRI). Sedangkan bahan lain adalah paket bahan kimia yang digunakan dalam kegiatan isolasi DNA pada umumnya. Kegiatan meliputi beberapa tahapan: ekstraksi dan purifikasi DNA, pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA serta amplifikasi DNA. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan teknik isolasi DNA berkualitas tinggi dari daun jambu mete, tetapi dengan teknik yang lebih sederhana, biaya lebih murah serta waktu yang relatif singkat. Hasil menunjukkan bahwa kuantitas DNA yang banyak dan kualitas DNA yang tinggi dapat dihasilkan pada sampel tanaman jambu mete dengan cara memodifikasi teknik ekstraksi DNA berbasis *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) serta penambahan antioksidan polivinilpolipirolidon (PVPP) dan mercaptoethanol, namun tanpa penggunaan nitrogen cair. Penyimpanan ekstrak daun setelah digerus tidak perlu lagi disimpan semalaman, sehingga waktu dapat dipersingkat. Pola pita yang dihasilkan juga sangat tebal dan jelas. Dengan demikian, teknik ekstraksi ini cukup menghemat waktu dan biaya. Selanjutnya untuk isolasi DNA tanaman tahunan lain yang mempunyai kemiripan dengan jambu mete atau yang mempunyai kandungan phenol tinggi, disarankan untuk mengikuti protokol seperti yang dilakukan pada jambu mete.

**Kata Kunci :** *Anacardium occidentale* L., efektivitas, efisiensi, isolasi, purifikasi, DNA.

### ABSTRACT

*Effectivity and efficiency of DNA isolation and purification technique on cashew plant. Cashew well known as a potential industrial plant to be expanded due to of kernel price and cashew can also be used as conservation plant, so needed information more detail including the molecular information. There are many techniques to conduct DNA isolation depend on kind of plants or plant tissue that will be used. The experiment had been conducted at Molecular Biology Laboratory of Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (BB BIOGEN), Bogor on May-July 2011. Young leaf of cashew used as genetic materials which is took from experimental station Cikampek, Indonesian Spice and Industrial Crops Research Institute (BALITTRI). While some chemicals were used as the other material. The activities following step: DNA extraction and purification, measurement of DNA concentration and amplification of DNA. Deletion of resistor enzyme-polysaccharide, especially for perennial plant. DNA isolation can be done by breaking down of cell wall, cell membrane and nuclear membrane. The aim of this experiment was to find the effectivity and efficiency technique of DNA isolation and purification so can be reducing cost and time consuming while working in the laboratory. The results shows that conscientiousness of DNA isolation and purification denotes an important step to obtain clean and contaminant free of DNA, so banding pattern will be clear. In this technique did not used polypinilpolypirolidone (PVPP) and mercapto-ethanol such as antioxidant, liquid nitrogen, neither over night storage of leaf extract on before used for purification which is often used for perennial plant. In addition, the results shows that band pattern of DNA was very thick and clear, therefore, this techniqe can be used for DNA isolation on cashew.*

**Keywords :** *Anacardium occidentale* L., effectivity, efficiency, isolation, purification, DNA.

## PENDAHULUAN

Jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) merupakan salah satu tanaman industri yang sangat potensial untuk dikembangkan dengan produk utamanya berupa biji mete (kacang mete). Tanaman ini umumnya dikembangkan di daerah dataran rendah yang beriklim kering dan dapat tumbuh pada lahan marjinal atau lahan kritis, sehingga dapat difungsikan juga sebagai tanaman untuk penghijauan dan konservasi.

Pengembangan jambu mete selain untuk rehabilitasi tanah kritis juga untuk tujuan produksi dan ekspor. Ekspor jambu mete tahun 2009, volume ekspor mencapai 68.767 ton senilai US \$ 82,65 juta, sebagian besar (88%) dalam bentuk gelondong (kernel) dengan negara tujuan utama adalah India, Srilanka, Jepang, Singapura, Taiwan, China, Malaysia, Kanada, Inggris, Amerika, dan Jerman. Selain gelondong, produk jambu mete yang mempunyai nilai ekonomi di antaranya adalah CNSL yang diekstrak dari kulit gelondong dan untuk keperluan industri (minyak rem), buah semu untuk buah segar, bahan sirup atau selai dan pakan ternak, kulit batang untuk obat diare dan daun pucuk untuk lalap.

Sebagai salah satu tanaman industri penghasil devisa, maka sudah selayaknya tanaman jambu mete mendapatkan perhatian yang lebih serius, yang dimulai dengan cara melakukan penelitian yang lebih detail tentang tanaman tersebut, tidak hanya sebatas penelitian secara konvensional, tetapi dapat ditingkatkan sampai tingkat molekuler. Hal ini akan sangat membantu dalam memberikan informasi penting, sehingga data atau informasi tentang jambu mete dapat diperoleh lebih komprehensif. Terlebih dengan perkembangan ilmu bioteknologi melalui teknik-teknik molekuler, maka usaha untuk mendapatkan informasi genetik akan lebih mudah dilakukan dan akan memperoleh hasil yang lebih akurat.

Teknik molekuler sangat bervariasi tergantung cara pelaksanaan untuk mendapatkan data maupun tingkatan target data yang diinginkan sesuai kemudahan pelaksanaan, kapabilitas sumber daya manusia, fasilitas dan peralatan serta kecukupan finansial (Karp *et al.*, 1997). Selain faktor-faktor di atas, maka masalah biaya selalu menjadi faktor penghambat, karena harga bahan kimia yang sangat mahal serta pengadaannya yang

memakan waktu sangat lama, karena pada umumnya bahan kimia yang diperlukan adalah produk impor. Dengan memperhatikan permasalahan tersebut, maka perlu dilakukan terobosan-terobosan penelitian yang dapat memberikan solusi, khususnya untuk tanaman tahunan atau tanaman yang mengandung phenol tinggi, di antaranya dengan cara memodifikasi metode-metode yang sudah ada. Baik dalam hal pemakaian bahan kimia maupun pengaturan *annealing* temperatur pada saat *running* Polymerase Chain Reaction (PCR) pada tingkat yang paling optimal.

Kualitas DNA yang baik yang diperoleh dari hasil ekstraksi merupakan syarat dasar yang harus dipenuhi dalam studi molekuler, terutama dalam penandaan sidik jari DNA. *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) merupakan metode yang umum digunakan dalam ekstraksi DNA tanaman yang banyak mengandung polisakarida dan senyawa polifenol (Lumaret *et al.*, 1998; Jose dan Usha, 2000). Ada 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).

Perkembangan ilmu pengetahuan sangat pesat dewasa ini, di antaranya ilmu biologi molekuler yang memungkinkan diperolehnya suatu marka gen yang mengendalikan karakter target perbaikan dalam program pemuliaan tanaman. Penemuan teknik dalam memperoleh gen yang mengendalikan suatu karakter sebagai penanda atau marker molekuler, sangat membantu efektivitas maupun efisiensi dari pelaksanaan proses seleksi yang akan dilakukan. Marka molekuler berdasarkan polimorfisme yang terdeteksi pada tingkat makro molekul di dalam sel (Gupta *et al.*, 2002).

Seiring dengan berkembangnya ilmu pengetahuan yang mampu mendukung akselerasi kemajuan dari seleksi untuk mendapatkan karakter yang diinginkan, berbagai metode seleksi juga berkembang, antara lain adalah seleksi dilakukan pada tingkat gametofit dan sporofit (Ottaviano dan Sari-Gorla, 1993), seleksi secara *in vitro* (Wenzel dan Foroughi-Webr, 1993), dan seleksi tingkat molekuler (Arus dan Morino-Gonzales, 1993). Metode PCR dengan menggunakan sepasang primer, yang meliputi : STSs (*Sequence-Tagged Sites*)

dan (SCARs) *Sequence Characterized Amplified Regions*, DALP (*Direct Amplification of Length Polymorphism*), SSRs (*Simple Sequence Repeats*), IFLP (*Intron Fragment Length Polymorphism*), ESTs (*Expressed Sequence Tags*), RAMP (*Random Amplified Microsatellite Polymorphism*) dan REMAP (*Retroposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) dan modifikasinya, SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*). Dan melacak beberapa sifat QTL (*Quantitative Trait Locus*) (Herran *et al.*, 2000; Lebrun *et al.*, 2001).

Pemilihan jenis marka molekuler yang akan digunakan dalam seleksi harus benar-benar dipertimbangkan kesesuaiannya dengan fasilitas dan materi yang dimiliki untuk melakukan seleksi. Penyiapan atau purifikasi gen target juga sangat menentukan keberhasilan dari seleksi yang dilakukan. Dari berbagai jenis marka molekuler yang sudah ada, umumnya yang dipilih untuk dijadikan marka molekuler untuk mendukung program seleksi antara lain adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*) berdasarkan marka, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), dan AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), dan QTL (*Quantitative Trait Locus*) (Herran *et al.*, 2000; Teulat *et al.*, 2000; Lebrun *et al.*, 2001).

Dalam bidang pemuliaan misalnya, penanda molekuler yang sering digunakan dalam kegiatan analisis keragaman genetik adalah RAPD (Syafaruddin dan C. Tresniati, 2011; Mawikere, 2006; Hannum *et al.*, 2003; Maftuchah, 2001; Cheng *et al.*, 1998a; 1998b; 1998c; Syafaruddin, 1998a; 1998b; Welsh dan Mc Clelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). RAPD adalah penanda berbasis PCR dengan menggunakan 10 basa primer acak. Teknik RAPD tidak memerlukan pelacak DNA atau informasi mengenai sekuens DNA yang dilacak. Prosedurnya sederhana dan mudah dalam hal preparasi, dapat dilakukan secara maksimal untuk sampel dalam jumlah banyak, jumlah DNA yang diperlukan relatif sedikit, dan pengerjaannya tidak menggunakan senyawa radioaktif (Karp *et al.*, 1996). Pada tanaman tahunan RAPD dapat digunakan untuk meningkatkan efisiensi seleksi awal. Teknik RAPD memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya.

Jambu mete adalah salah satu tanaman tahunan yang daunnya banyak sekali mengandung senyawa phenol, sehingga apabila daun digerus phenol tersebut akan keluar dan akan menjadi penghambat dalam isolasi dan purifikasi DNA, sehingga hasilnya pasti tidak bagus. Pada umumnya teknik isolasi DNA pada tanaman tahunan diperlukan berbagai modifikasi dari teknik standar umumnya, seperti penambahan antioksidan polivinilpolipirolidon (PVPP) dan mercaptoethanol, ataupun penggunaan nitrogen cair untuk membantu menghancurkan jaringan serta penyimpanan lebih lama (*over night*) dari ekstrak daun yang telah digerus sebelum dilakukan purifikasi. Dengan demikian akan berdampak pada peningkatan biaya dan waktu yang diperlukan akan lebih lama, sehingga harus dicari solusinya untuk mengatasi permasalahan tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan teknik isolasi DNA berkualitas tinggi dari daun jambu mete, tetapi dengan teknik yang lebih sederhana, biaya lebih murah serta waktu yang relatif singkat.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor pada bulan Mei-Juli 2011. Materi genetik yang digunakan adalah contoh daun muda tanaman jambu mete yang diambil dari Kebun Percobaan Cikampek, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri (BALITTRI). Bahan lainnya adalah paket bahan kimia yang digunakan dalam kegiatan isolasi DNA pada umumnya. Alat yang digunakan adalah timbangan analitis, mesin PCR, perangkat elektroforesis, gel documentation, *waterbath*, sentrifus, *microwave oven*, lemari es dan *freezer*, *vortex mixer*, alat gelas, mortar dan pestel, spatula, gunting, pipet ukur, pipet mikro, tip mikro, pH meter, tabung mikrosentrifus, dan sarung tangan karet. Kegiatan meliputi beberapa tahapan:

## Ekstraksi dan Purifikasi DNA

Protokol yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah prosedur ekstraksi yang dikembangkan oleh Doyle dan Doyle (1987) berbasis CTAB dengan modifikasi penambahan 1,5% Polivinilpolipirrolidon (PVPP). Sampel daun muda segar (Gambar 1) dari jambu mete ditimbang sebanyak 0,5 – 0,7 g, lalu diletakkan dalam cawan porselen steril dan ditambahkan 300 µl buffer ekstraksi CTAB kemudian digerus dengan mortar steril sampai daun lumat.



Gambar 1. Daun muda yang digunakan untuk sampel  
*Figure 1. Young leaf used for DNA extraction sample*

Daun sampel yang telah lumat dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 2 ml, kemudian ditambahkan kembali buffer ekstraksi CTAB sebanyak 300 µl dan divortex selama 2-3 menit.

Tahapan selanjutnya dilakukan inkubasi sampel dalam water bath bersuhu 65°C selama 15 menit sambil tabung dibolak-balik setiap 5 menit. Tahapan ini dilakukan untuk mengoptimalkan kerja buffer ekstrak yang ditambahkan ke dalam sampel. Sampel kemudian divortex selama 2-3 menit, selanjutnya dilakukan sentrifugasi sampel dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Tujuannya untuk memisahkan debris dan komponen sel lain yang menjadi penyebab kontaminasi dengan DNA.

Supernatan yang telah diperoleh kemudian diambil dan ditambahkan dengan larutan Chloroform:Isolamylalkohol atau Chisam dengan perbandingan 24:1. Penambahan Chisam ini

dilakukan untuk mengekstraksi DNA dari kontaminan. Chloroform merupakan pelarut organik yang dapat melarutkan protein, lipid dan molekul lain seperti polisakarida, sehingga diharapkan akan diperoleh supernatan berisi DNA yang bebas kontaminan. Suspensi kemudian divortex sampai rata untuk optimalisasi homogenasi.

Selanjutnya suspensi disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 25°C selama 10 menit, sehingga diperoleh suspensi dengan tiga lapisan: lapisan atas berwarna hijau jernih, lapisan tengah berwarna hijau keruh dan lapisan bawah berupa pelet yang berwarna hijau tua. Supernatan pada lapisan paling atas diambil dan ditambahkan dengan 2/3 x volume larutan isopropanol dingin untuk presipitasi DNA. Supernatan yang telah ditambahkan isopropanol kemudian digoyang perlahan-lahan dengan cara membolak-balikkan tabung. Untuk mengendapkan DNA (pelet DNA), larutan disentrifugasi kembali pada kecepatan 12000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit.

Endapan DNA dicuci dengan 70% etanol sebanyak 500 µl selama dua kali, disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm dengan suhu 4°C, kemudian cairan etanol dibuang dan pelet DNA dikeringanginkan, lalu dilarutkan dalam 50 µL buffer TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,5) dan ditambahkan 1 µL RNase A (10 mg/mL) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit sampai 1 jam. DNA disimpan dalam refrigerator sampai siap digunakan.

## Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Pengecekan kuantitas dan kualitas DNA hasil isolasi dilakukan untuk melihat konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan spektrofotometer dan elektroforesis gel. Pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan protein diukur pada panjang gelombang 280. Kemurnian larutan DNA dapat dihitung melalui perbandingan  $A_{260}$  nm dengan  $A_{280}$  nm. Batas kemurnian yang biasa dipakai dalam analisis molekuler pada rasio  $A_{260}/A_{280}$  adalah 1,8 – 2,0 (Sambrook and Russel, 1989).

DNA yang sudah diukur konsentrasinya diencerkan sehingga mendapatkan konsentrasi yang

seragam untuk digunakan dalam analisis PCR. Selanjutnya dilakukan pengecekan kualitas DNA dengan elektroforesis gel untuk mengetahui tingkat kemurnian DNA dari kontaminan RNA dan keutuhan DNA hasil isolasi.

### Amplifikasi DNA

Reaksi amplifikasi DNA dilakukan menggunakan Mesin PCR (MJ Research tipe PCT-100), dengan kondisi PCR sebagai berikut: satu siklus 3 menit pada suhu 94°C, dan diikuti dengan 45 siklus selama 1 menit pada suhu 94°C (denaturasi), 1 menit pada suhu 37°C (*annealing*), 2 menit pada suhu 72°C (ekstensi). Seluruh produk amplifikasi DNA dilengkapi dengan ekstensi selama 1 menit pada suhu 72°C. Analisis PCR dilakukan dengan total reaksi 20 µl mengandung 10 ng DNA genomik cetakan, masing-masing dNTP 0,1 µM (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP), masing-masing primer RAPD 0,25 µmol, enzim *Taq DNA polymerase* 0,04 unit dalam larutan buffer 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glycerol, 0,5% Tween 20, 0,5% nonidet P40 dan MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM). Hasil amplifikasi divisualisasikan menggunakan elektroforesis horizontal dengan gel agarose 1,5% (w/v) dalam buffer 1X TAE. Gel agarose kemudian direndam di larutan EtBr, sehingga pola pita dapat dilihat di bawah sinar ultraviolet. Hasil elektroforesis difoto menggunakan BIO-RAD Gel Doc™ EQ.

### Pemotongan dengan enzim restriksi

DNA genomik yang telah diisolasi dari daun jambu mete diuji kemampuannya untuk dapat dipotong (*digestibility*) dengan enzim restriksi. Reaksi pemotongan dilakukan pada suhu 37°C selama satu malam pada inkubator. Reaksi pemotongan dengan total 20 µl mengandung 5 µg DNA, 2 µl 10x buffer restriksi dan 10 unit enzim *EcoRI* (Roche). Hasil pemotongan DNA kemudian dicek pada gel agarosa 1% dan divisualisasi pada perangkat BIO-RAD Gel Doc™ EQ.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik atau metode yang digunakan dalam isolasi DNA semakin berkembang dan beragam, tergantung dari jenis tanaman dan jaringan

tanaman yang digunakan. Tetapi pada dasarnya ada tiga faktor penentu dalam ekstraksi dan purifikasi DNA secara optimal. 1). Penghomogenan jaringan tanaman, 2). Komposisi penambahan larutan buffer pada saat penggerusan daun/jaringan tanaman sampel, dan 3). Penghilangan enzim penghambat-polisakarida khususnya untuk tanaman tahunan.

Untuk tanaman-tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder yang cukup tinggi, seperti getah dan poliphenol, demikian juga dengan tanaman jambu mete, maka perlu dilakukan modifikasi teknik dan penggunaan bahan kimia pada saat ekstraksi dan isolasi DNA untuk mendapatkan kuantitas DNA yang banyak dengan kualitas yang tinggi.

Teknik ekstraksi DNA yang efektif dan efisien telah dilakukan oleh peneliti-peneliti sebelumnya. Di antaranya pada tanaman kemiri sunan (Syafaruddin dan Santoso, 2011). Pada teknik ekstraksi kemiri sunan digunakan fenol-kloroform yang berfungsi sebagai pendenaturasi protein. Sedangkan DNA dan RNA tidak terdenaturasi karena molekul ini tidak larut di dalam pelarut organik seperti fenol-kloroform. Selanjutnya dilakukan presipitasi DNA dengan menggunakan etanol yang berfungsi sebagai penghilang fenol-kloroform. Apabila fenol-kloroform masih berada di dalam sampel maka ada kemungkinan akan menghambat kerja enzim-enzim restriksi atau enzim lain yang digunakan untuk analisis molekuler. Ekstraksi DNA pada tanaman jambu mete bisa lebih hemat lagi dibandingkan dengan kemiri sunan, karena penambahan 1,5% Polivinilpolipirrolidon (PVPP) pada saat ekstraksi DNA berbasis CTAB, dimana pada kemiri sunan 2%. Disamping penambahan buffer ekstraksi CTAB yang dikurang menjadi 300 µl, sedangkan pada kemiri sunan sebanyak 400 µl (Syafaruddin dan Santoso, 2011).

Proses penggerusan atau homogenasi daun muda jambu mete juga tidak menggunakan nitrogen cair, tetapi cukup ditambahkan 0,5 ml buffer ekstraksi CTAB yang mempunyai fungsi untuk melisiskan membran sel dan membran fosfolipid bilayer. Hal ini sesuai dengan hasil beberapa peneliti terdahulu, diantaranya Surzycki (2000); Santoso (2005); Syafaruddin dan Santoso (2011) mengatakan bahwa buffer CTAB dengan kandungan garam yang tinggi dapat memisahkan polisakarida dari dinding sel. Ardiana (2009),

menyatakan bahwa penggunaan buffer CTAB sebagai pengganti nitrogen cair untuk mengisolasi DNA pada tanaman jeruk dan pepaya dapat menghasilkan produk DNA yang berkualitas yang ditunjukkan oleh pita DNA genom.

Berdasarkan hasil pengecekan kualitas dan kuantitas dengan spektrofotometer menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh dari sampel daun jambu mete memperlihatkan kualitas dan kuantitas DNA yang cukup baik (Tabel 1). Kuantitas DNA yang diperoleh mempunyai kisaran antara 1090,7 – 2452,5 ng/μl. Jumlah DNA yang dihasilkan cukup banyak, sehingga lebih dari cukup untuk digunakan dalam analisis PCR. Sedangkan kualitas DNA berada pada kisaran angka dimana DNA dikatakan murni yaitu antara 1,80 – 1,91. Hal ini sesuai dengan yang dijelaskan dalam Sambrook and Russel (1989) bahwa DNA dikatakan murni apabila mempunyai angka A260/A280 dalam kisaran 1,8 – 2,0.

Dengan menggunakan gel elektroforesis 1%, hasil pengecekan kualitas DNA juga menunjukkan hasil yang cukup memuaskan dimana DNA yang diperoleh terlihat utuh DNA dengan tidak adanya *smear* DNA yang dielektroforesis

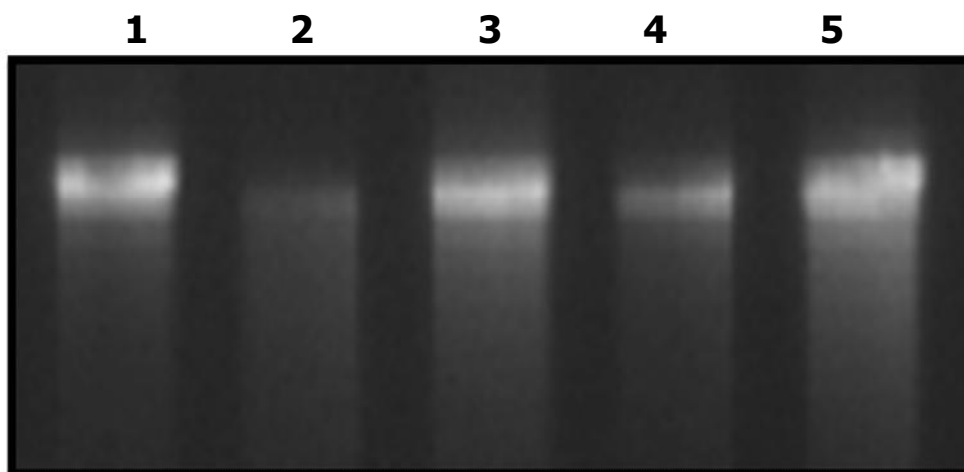
(Gambar 2). Hal ini sangat penting karena DNA yang utuh memberikan hasil yang akurat pada proses PCR.

DNA yang diisolasi dari tanaman sering kali terkontaminasi oleh polisakarida dan metabolit sekunder seperti tanin, pigmen, alkaloid dan flavonoid, sehingga diperlukan cara untuk menghindari hal di atas. Teknik yang digunakan dalam percobaan kali ini adalah kombinasi penambahan antioksidan polivinilpolipirolidon (PVPP) dan mercaptoethanol pada buffer ekstraksinya. Dengan kombinasi ini dihasilkan kualitas DNA yang baik. PVP dan mercaptoethanol akan mereduksi senyawa-senyawa fenolik yang keberadaannya dapat merusak kualitas DNA. Penggerusan secara langsung sampel segar tanpa penyimpanan selama semalam dan tanpa penggunaan nitrogen cair (yang diketahui sangat membantu untuk menghancurkan jaringan dan melindungi DNA dari degradasi oleh enzim *DNase*) tetapi hasil yang diperoleh sangat memuaskan yang ditandai dengan kualitas DNA yang utuh dan murni dilihat dari nilai rasio A260/A280 (Tabel 1 dan Gambar 2).

Tabel 1. Hasil pengecekan kualitas dan kuantitas DNA jambu mete menggunakan spektrofotometer

Table 1. Checking result of DNA quantity and quality of cashew by using spectrophotometer

| No. | Sampel   | Konsentrasi (ng/μl) | Kemurnian (A260/A280) |
|-----|----------|---------------------|-----------------------|
| 1.  | Sampel 1 | 1888,5              | 1,81                  |
| 2.  | Sampel 2 | 2452,5              | 1,80                  |
| 3.  | Sampel 3 | 1829,9              | 1,91                  |
| 4.  | Sampel 4 | 1090,7              | 1,80                  |
| 5.  | Sampel 5 | 2025,1              | 1,83                  |



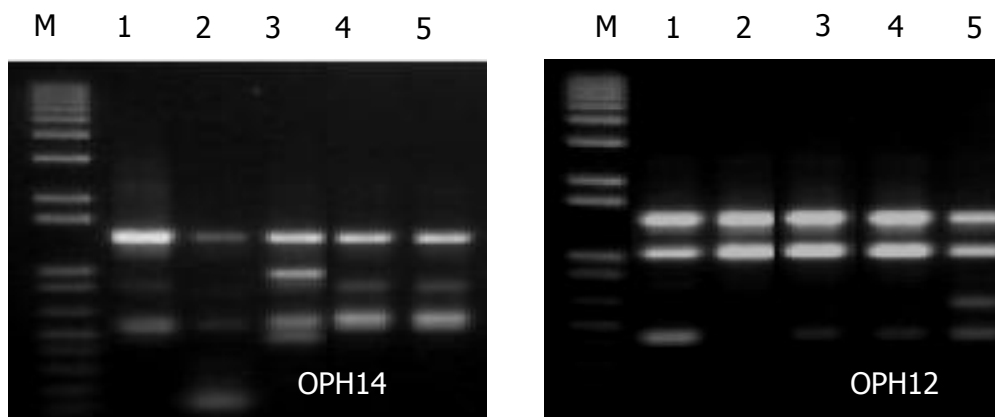
Gambar 2. Hasil pengecekan kualitas DNA sampel jambu mete dengan gel elektroforesis 1%  
Figure 2. Checking result of DNA quality of cashew with electrophoresis gel 1%

Sebagai pembuktian bahwa DNA yang telah diperoleh mempunyai kualitas yang sangat baik maka DNA tersebut digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk analisis PCR dengan menggunakan program RAPD. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer RAPD OPH-14 dan OPM-12 menunjukkan bahwa DNA yang diamplifikasi menghasilkan pita DNA (*amplikon*) yang sangat bagus dimana pola pita DNA terlihat sangat jelas dan tebal (Gambar 3).

Indikasi lain bahwa DNA yang diperoleh mempunyai kualitas yang baik (murni) adalah dapat digunakan untuk aplikasi molekuler lain selain proses amplifikasi. DNA dengan kualitas yang baik akan dapat dipotong oleh enzim restriksi dengan sempurna karena tidak adanya kontaminan dalam DNA yang dapat mengganggu kerja dari enzim restriksi. Hasil pemotongan DNA yang diperoleh

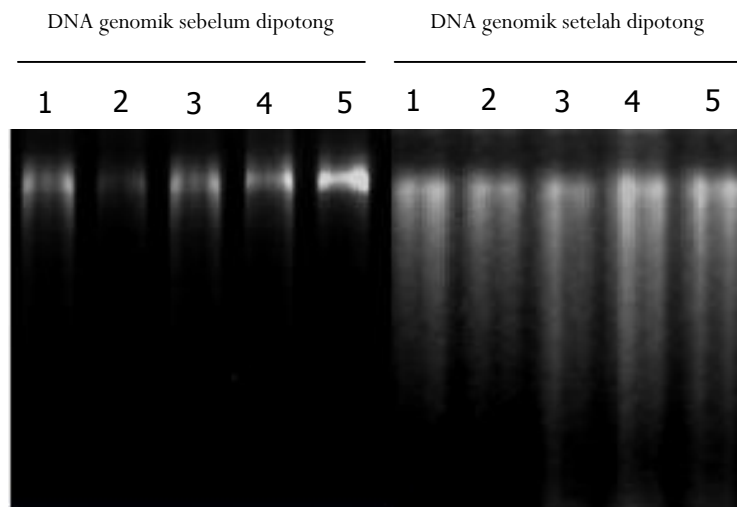
dengan enzim restriksi *EcoRI* menunjukkan hasil pemotongan yang bagus yang terlihat adanya fragmentasi DNA yang hampir sempurna setelah dicek dengan gel agarose 1% (Gambar 4).

Dari hasil uji molekuler baik amplifikasi atau pemotongan DNA dengan enzim restriksi ini dapat dikatakan bahwa teknik isolasi DNA yang dipakai dalam kegiatan ini adalah sangat memberikan hasil yang nyata dan memenuhi syarat untuk digunakan dalam ekstraksi DNA jambu mete. Penelitian-penelitian terdahulu tentang optimasi isolasi DNA dan protokol untuk PCR-RAPD juga telah dilakukan untuk tanaman aromatik dan obat-obatan, tanaman endemik serta tanaman kemiri sunan (Padmalatha and Prasad, 2006; Tridjatkiko 2006; Sahasrabudhe dan Deodhar, 2010; Syafaruddin dan Santoso, 2011).



Gambar 3. Contoh pola pita hasil amplifikasi PCR menggunakan cetakan DNA jambu mete hasil ekstraksi dengan teknik miniprep CTAB. M = 1 kb plus ladder (Invitrogen)

Figure 3. Band pattern obtained of PCR amplification by using DNA printing of cashew with miniprep CTAB technique. M = 1 kb plus ladder(Invitrogen)



Gambar 4. Contoh hasil fragmentasi DNA jambu mete hasil ekstraksi dengan teknik miniprep CTAB sebelum dan setelah dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI*.

Figure 4. Fragmentation of cashew DNA isolated by using miniprep CTAB technique before and after digestion with *EcoRI* restriction enzyme.

Berdasarkan hasil yang telah dipaparkan di atas, terlihat bahwa teknik isolasi DNA dengan cara menghilangkan penggunaan nitrogen cair, tanpa penyimpanan sampel jaringan yang akan diisolasi terlebih dahulu serta dengan memodifikasi teknik yang digunakan dapat memberikan hasil DNA yang sangat murni dan pola pita serta fragmentasi yang sangat jelas ketika dilakukan proses PCR dan pemotongan DNA. Hal ini memberikan efek yang sangat signifikan pada pembiayaan dan efektivitas waktu, sehingga proses analisis molekuler bisa lebih hemat dan cepat. Bahkan dapat lebih hemat dari proses isolasi DNA yang pernah dilakukan pada tanaman kemiri sunan, karena ada beberapa pengurangan jumlah bahan kimia.

Proses isolasi DNA juga difokuskan pada teknik modifikasi, diantaranya pada saat penggerusan, pemvortekan sampel dan pengaturan temperatur *annealing* yang digunakan pada saat denaturasi. Seperti yang diuraikan oleh Subandiyah (2006), kegagalan dalam PCR sering disebabkan karena proses denaturasi yang tidak sempurna. Suhu yang diprogramkan biasanya 95°C selama 30 detik atau 97°C selama 15 detik. Hal ini didukung juga oleh pendapat Ardiana (2009) yang menyatakan bahwa untuk DNA yang mengandung G+C tinggi, suhu perlu dinaikkan atau waktu denaturasi diperpanjang tetapi tidak terlalu lama dan suhunya tidak terlalu tinggi karena akan merusak enzim Taq D-pol yang umumnya mempunyai waktu paruh 40 menit pada 95°C.

#### KESIMPULAN DAN SARAN

Kuantitas DNA yang banyak dan kualitas DNA yang tinggi dapat dihasilkan pada sampel tanaman jambu mete dengan cara memodifikasi teknik ekstraksi DNA berbasis CTAB serta penambahan antioksidan polivinilpolipirolidon (PVPP) dan mercaptoethanol, namun tanpa penggunaan nitrogen cair. Penyimpanan ekstrak daun setelah digerus tidak perlu lagi disimpan semalaman, sehingga waktu dapat dipersingkat. Pola pita yang dihasilkan juga sangat tebal dan jelas. Dengan demikian, teknik ekstraksi ini cukup menghemat waktu dan biaya. Selanjutnya untuk isolasi DNA tanaman tahunan lain yang mempunyai kemiripan dengan jambu mete atau yang mempunyai kandungan phenol tinggi, disarankan

untuk mengikuti protokol seperti yang dilakukan pada jambu mete.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ardiana, D.W. 2009. Teknik isolasi DNA genom tanaman pepaya dan jeruk dengan menggunakan modifikasi bufer CTAB. *Bul. Teknik Pertanian* Vol. 14 (1): 12-16.
- Arus, P. and J. Moreno-Gonzales. 1993. Marker-assisted selection. In: Hayward, M.D., N.O. Bosermark, and I. Romagosa (Eds.) *Plant Breeding: Principles and Prospects*. Chapman & Hall. London. p.314-331.
- Chau, N.M. 1998. Integrated production practices of cashew in Vietnam. FAO, Reg. Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- Chaikiattiyos, S. 1998. Integrated production practices of cashew in Thailand. *Integrated production of cashew in Asia*. FAO-Regional office for Asia and The Pacific. Bangkok. Thailand : 61-67.
- Cheng K.T., L.C. Fu, C.S. Wang, F.L. Hsu and H.S. Tsay. 1998a. Identification of *Anoectochilus formosanus* and *Anoectochilus koshunensis* spesies with RAPD markers, *Planta Medica* 64(1): 46-49.
- Cheng K.T., H.S. Tsay, C.F. Chen and T.W. Chou. 1998b. Determination of the components in a Chinese prescription Yu-Ping-Feng San, by RAPD analysis. *Planta Medica* 64(6): 563-565.
- Cheng K.T., C.H. Su, H.C. Chang and J.Y. Huang. 1998c. Differentiation of genuines and counterfeits of *Cordyceps* spesies using Random Amplified Polymorphic DNA. *Planta Medica* 64(5): 451-453.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Ditjenbun. 2008. Statistik Perkebunan Indonesia tahun 2007. Departemen Pertanian. Direktorat Jenderal Perkebunan. Jakarta.



- Ditjenbun. 2010. Statistik Perkebunan Indonesia tahun 2009. Departemen Pertanian. Direktorat Jenderal Perkebunan. Jakarta.
- Gupta, P.K., R.K. Varshney and M. Prasad. 2002. Molecular markers: Principles and Methodology. In: Jain, S.M., D.S. Brar, and B.S. Ahloowalia (Eds.). *Molecular Techniques in Crop Improvement*. p.9-54.
- Hannum S., A. Hartana dan Suharsono. 2003. Kemiripan genetik empat populasi kelapa genjah berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA. *Hayati* 10(4):125-129.
- Herran A., L. Estioko, D. Becker, M.J.B. Rodriguez. 2000. Linkage mapping and QTL analysis in coconut. *Theor. Appl. Genet.* 101:292-300.
- Jose, J. and R. Usha. 2000. Extraction of Geminiviral DNA from a Aighly Mucilaginous Plant (*Abelmoschus esculentus*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 349-355.
- Kangde, L.L., Shibang and Shuisheng. 1998. Integrated production practices of cashew in China. *Integrated production of cashew in Asia .* FAO-Regional office for Asia and The Pacific. Bangkok. Thailand : 6-14.
- Karp, A., O. Seberg and M. Buiatti. 1996. Molecular techniques in the assesment of botanical diversity. *Ann. Bot.* 78: 143-149.
- Karp, A., S. Kresovich, K.V. Bhat, W.G. Ayad and T. Hodgkin. 1997. Molecular tool in plant genetic resources conservation: A guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin no. 2.
- Lay, M.M. 1998. Integrated production practices of cashew in Myanmar. *Integrated production of cashew in Asia .* FAO-Regional office for Asia and The Pacific. Bangkok. Thailand : 104-112
- Lebrun P, L. Baudouin, R. Bourdeix, J.L. Konan, J.H.A. Barker, C. Aldam, A. Herran and E. Ritter. 2001. Construction of a linkage map of the Rennel Island Tall coconut type (*Cocos nucifera* L) and QTL analysis for yield characters. *Genome* 44:962-970.
- 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. Isaac, and D.S. Ingram (Eds.). *Molecular Tool for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, London.
- Maftuchah. 2001. Strategi pemanfaatan penanda molekuler dalam perkembangan bidang hortikultura. Makalah Sarasehan Pemanfaatan Penanda Molekuler di Bidang Hortikultura. Perhorti Jatim – Deptan.
- Magboo, C.A.E. 1998. Integrated production practices of cashew in Philippines. *Integrated production of cashew in Asia .* FAO-Regional office for Asia and The Pacific. Bangkok. Thailand : 104-112.
- Mawikere N.L. 2006. Plasma nutfah kelapa Papua dan hubungan kekerabatannya dengan populasi kelapa Indonesia lainnya dan Papua New Guinea berdasarkan penanda RAPD. Disertasi Doktor Sekolah Pascasarjana, IPB. Bogor.
- Nicholl, D. S. T. 1993. An Introduction to Genetic Engineering. Department of Biological Science, University of Praisly.
- Ottaviano, E., M. Sari-Gorla. 1993. Gametophytic and Sporophytic Selection. In: Hayward, M.D., N.O. Bosermark, and I. Romagosa (Eds.) *Plant Breeding: Principles and Prospects*. Chapman&Hall. London. p.332-352.
- Padmalatha K. and M.N.V. Prasad. 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *Afr. J. Biotechnol.* 5:230-234.
- Rao, E.V.V.B. 1998. Integrated Production of Cashew in India. In. *Integr. Prod. Pract of Cashew in Asia*. FAO-Reg. Off. for Asia and The Pacific. Bangkok, Thailand. P 15-25.

- Rohlf, F.J. 2000. NT SYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. User Guide. Department of Ecology and Evolution State University of New York.
- Sahasrabudhe A. and M. Deodhar. 2010. Standardization of DNA extraction and optimization of RAPD-PCR condition in *Garcinia indica*. International Journal of Botany 6(3): 293-298.
- Sambodo, M.T. 2008. Energy sector in Indonesia and environment impact: from fossil fuel to biofuel.
- Sambrook J. and D.W. Russel. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold-Spring Harbor Laboratory Pr.
- Santoso, P.J. 2005. Modified CTAB-based DNA isolation procedure for fruit crops. Jurnal Stigma XIV(1): 1-4.
- 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.
- Syafaruddin. 1998a. Diversity within the *Vigna hirtella* Complex Based on RAPD Analysis. Individual Training Report, Japan International Cooperation Agency (JICA), NIAR-MAFF, Tsukuba-Japan.
- Syafaruddin. 1998b. Isozyme Diversity within Population of *Vigna angularis* var. *nipponensis*. Individual Training Report, Japan International Cooperation Agency (JICA), NIAR-MAFF, Tsukuba-Japan.
- 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 Penelitian Tanaman Industri. 17(1):11-17.
- Syafaruddin dan Cici Tresniawati. 2011. Variabilitas genetik plasma nutfah lada (*Piper nigrum* L.) berdasarkan marka random amplified polymorphic DNA (RAPD). Buletin Littri. *Accepted (in processing)*.
- Teulat B, C. Aldam, R. Trehin, P. Lebrun, J.H.A. Barker, G.M. Arnold, A. Karp, L. Boudouin and F. Rognon. 2000. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) population from across the geographic range using sequence-tagged microsatellite (SSRs) and RFLPs. Theor.Appl.Genet. 100:764-771
- Tridjatmiko, K.R. 2006. Penggunaan Metode PCR untuk Deteksi Cepat Keragaman DNA. Pelatihan dan Workshop Identifikasi DNA dengan Aplikasi PCR. Malang. hlm. 22-25.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. Nucl.Acids Res. 18: 7213-7218.
- Wenzel, G. and B. Foroughi-Webr. 1993. *In Vitro* Selection. In: Hayward, M.D., N.O. Bosemark, and I. Romagosa (Eds.) Plant Breeding: Principles and Prospects. Chapman&Hall. London. p.353-370.
- Williams, J.G.K., A.R.K. Kubelik, J.L. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Random Primers are Useful as Genetic Markers. Nucl.Acids Res. 18: 6531-6535.