

OPTIMALISASI ISOLASI DAN PURIFIKASI DNA *Petunia hybrida* SERI ROSE PICOTEDENGAN KIT ISOLASI GENE AID

Optimization DNA Isolation and Purification Petunia hybrida Picotee Rose Series with Isolation Kit Geneaid

Naailatu Nur Azizah, Muthia Naila Mazieda, Dwi Listyorini, Dahlia

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang

E-mail: anugerah.nur@gmail.com

Abstract - *Petunia* has been used as research object on flavonoids studies especially anthocyanin biosynthesis. *Hf1* gene encode F3'5'H enzyme which plays a role in the synthesis of color in *Petunia*. Research on the regulation of *Petunia* color is potential for the development of ornamental plant breeding in Indonesia, hence the information regarding the gene analysis is necessary. Recently, there are many reagent kits for the isolation and purification of plant DNA available, each has different protocols regarding the special character of plant tissue with various secondary metabolites accumulation. Secondary metabolites in plants have different chemical contents, for that reason its needs to develop a proper protocol resulting in pure DNA with high concentrations. This study aims to obtain the effective and efficient DNA isolation and purification protocol for *Petunia hybrida*. Optimization results showed that samples immersed in absolute ethanol for two days then dried and stored in the freezer until used have given the optimal results for further analysis. The total DNA concentration was 129.3 ng / μ l with purity of 1,87.

Keywords: *Isolation and purification technique DNA, Petunia hybrida, Isolation Kit Geneaid*

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman sumberdaya florikultura yang cukup besar mengingat iklim tropis negara ini sesuai untuk budidaya florikultura. Florikultura mencakup bunga potong, daun potong dan tanaman hias. *Petunia* merupakan salah satu jenis tanaman hias yang sangat komersil secara global dalam industri florikultura. *Petunia* telah lama digunakan sebagai bahan riset untuk studi flavonoid khususnya biosintesis antosianin. Warna bunga ditentukan oleh antosianin (Tanaka *et al.*, 2009). Gen *hydroxylation at five (hf)* yang mengendalikan enzim F3'5'H dalam menentukan warna bunga *petunia* pertama kali diisolasi dan dikarakterisasi (Holton *et al.*, 1993). Penelitian mengenai regulasi gen warna bunga *petunia* sangat potensial untuk pengembangan pemuliaan tanaman hias di Indonesia.

Petunia memiliki kandungan metabolit sekunder seperti petuniasterones, ergostanoids, ergostane, glycosides (petuniaosides) (Bajaj, 1996). Ekstraksi DNA *Petunia hybrida* sebelumnya telah banyak

dilaporkan, namun menggunakan reagen-reagen yang dibuat secara manual, misalnya *Cetyltrimetilammoniumbromide* (CTAB) (Chen *et al.*, 2007; Matsubara *et al.*, 2005). Dewasa ini telah banyak tersedia kit reagen untuk isolasi dan purifikasi DNA tumbuhan dengan protokol yang berbeda, karena jaringan tumbuhan memiliki karakter khusus yaitu akumulasi metabolit sekunder yang berbeda. Metabolit sekunder sulit dihilangkan dari asam nukleat (Sharma & Gaur, 2014). Senyawa metabolit sekunder mengikat asam nukleat selama proses isolasi, ikut bercampur kemudian bereaksi. Kit reagen dapat diperoleh dengan mudah, praktis, dan efisien tanpa harus menyiapkan reagen-reagen tertentu seperti CTAB secara manual. Konsentrasi DNA yang tinggi dan bebas kontaminan dapat diperoleh menggunakan kit reagen yang dapat digunakan untuk tahapan berikutnya seperti PCR.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Universitas Negeri Malang, pada



bulan April 2014. Sampel yang digunakan adalah daun *Petunia hybrida* seri Rose Picotee yang diperoleh dari daerah Batu, Malang. Sampel diisolasi dengan *Genomic DNA Mini Kit Plant* dari Geneaid. Alat-alat yang digunakan adalah neraca analitik, mortar pistil, mikropipet, *waterbath*, nanospektrofotometer, *vortex*, *microcentrifuge*, pinset, gunting, cawan petri, spatula, tube 1,5 ml. Prosedur ekstraksi yang digunakan mengikuti prosedur standar Geneaid dan beberapa modifikasi sebagai berikut:

Metode Ekstraksi DNA (I) Standar Geneaid

100 mg daun petunia muda dicuci dengan akuades steril lalu digerus dengan nitrogen cair. Sampel dipindahkan ke tube, ditambah *mix buffer* (400 μ l buffer GPX1 dan 5 μ l RNase), divortex, dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 10 menit. Sampel ditambah 100 μ l buffer GP2, divortex, dan diinkubasi dalam es selama 3 menit. Suspensi dipindah ke *filter column*, disentrifugasi 1000xg selama 1 menit. Supernatan dipindah ke tube baru dan ditambah 750 μ l buffer GP3. Suspensi dipindah ke *GD column*, disentrifugasi 16.000xg selama 2 menit, *flow through* dibuang. 400 μ l buffer W1 ditambahkan ke *GD column*, disentrifugasi 16.000xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. 600 μ l *wash buffer* ditambahkan, disentrifugasi 16.000xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. Sentrifugasi 16.000xg selama 3 menit untuk *drying*. *GD column* dipindah ke tube baru, ditambah 100 μ l *elution buffer* yang telah dipanaskan 60°C, didiamkan selama 5 menit, lalu disentrifugasi 16.000xg selama 1 menit.

Metode Modifikasi Ekstraksi DNA (II)

100 mg daun petunia muda direndam etanol absolut selama semalam dalam *freezer* lalu dicuci dan digerus dengan nitrogen cair. Sampel dipindahkan ke tube, ditambah *mix buffer* (400 μ l buffer GPX1 dan 5 μ l RNase), divortex dan

diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 10 menit. Sampel ditambah 100 μ l buffer GP2, divortex dan diinkubasi dalam es selama 3 menit. Suspensi dipindah ke *filter column*, disentrifugasi 1000xg selama 1 menit. Supernatan dipindah ke tube baru dan ditambah 750 μ l buffer GP3. Suspensi dipindah ke *GD column* lalu disentrifugasi 16.000xg selama 2 menit, *flow through* dibuang. 400 μ l buffer W1 ditambahkan ke *GD column*, disentrifugasi 16.000xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. 600 μ l *wash buffer* ditambahkan, disentrifugasi 16.000xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. Sentrifugasi 16.000xg selama 3 menit untuk *drying*. *GD column* dipindah ke tube baru, ditambah 50 μ l *elution buffer* yang telah dipanaskan 60°C, didiamkan selama 5 menit, lalu disentrifugasi 16.000xg selama 1 menit. Tahap elusi diulangi sekali lagi.

Metode Modifikasi Ekstraksi DNA (III)

100 mg daun petunia muda dicuci dengan akuades steril dan digerus dengan nitrogen cair. Sampel dipindahkan ke tube, ditambah *mix buffer* (400 μ l buffer GPX1 dan 5 μ l RNase), lalu divortex dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 15 menit (selama inkubasi sampel divortex setiap 5 menit). Sampel ditambah 20 μ l Pro-K, tube dibolak-balik dan diinkubasi suhu 60°C selama 10 menit. 100 μ l buffer GP2 ditambahkan ke suspensi, divortex dan diinkubasi dalam es selama 3 menit. Suspensi dipindah ke *filter column*, disentrifugasi 1000xg selama 1 menit. Supernatan dipindah ke tube baru dan ditambah 750 μ l buffer GP3. Suspensi dipindah ke *GD column* lalu disentrifugasi 15.500xg selama 2 menit, *flow through* dibuang. 400 μ l buffer W1 ditambahkan ke *GD column*, disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. 600 μ l *wash buffer* ditambahkan, disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. Sentrifugasi 15.500xg selama 3 menit untuk



drying. *GD column* dipindah ke tube baru, ditambah 50 μ l *elution buffer* yang telah dipanaskan 60°C, didiamkan selama 5 menit lalu disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit. Tahap elusi diulangi sekali lagi.

Metode Modifikasi Ekstraksi DNA (IV)

75 mg daun petunia muda direndam etanol absolut \pm 3 minggu, dicuci dan digerus dengan nitrogen cair. Sampel dipindahkan ke tube, ditambah *mix buffer* (400 μ l buffer GP1 dan 5 μ l RNase), lalu divortex dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 15 menit (selama inkubasi sampel divortex setiap 5 menit). Sampel ditambah 20 μ l Pro-K, tube dibolak-balik dan diinkubasi suhu 60°C selama 10 menit. 100 μ l buffer GP2 ditambahkan ke suspensi, divortex dan diinkubasi dalam es selama 3 menit. Suspensi dipindah ke *filter column*, disentrifugasi 1000xg selama 1 menit. Supernatan dipindah ke tube baru dan ditambah 750 μ l buffer GP3. Suspensi dipindah ke *GD column* lalu disentrifugasi 15.500xg selama 2 menit, *flow through* dibuang. 400 μ l buffer W1 ditambahkan ke *GD column*, disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. 600 μ l *wash buffer* ditambahkan, disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. Sentrifugasi 15.500xg selama 3 menit untuk *drying*. *GD column* dipindah ke tube baru, ditambah 50 μ l *elution buffer* yang telah dipanaskan 60°C, didiamkan selama 5 menit lalu disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit. Tahap elusi diulangi sekali lagi.

Metode Modifikasi Ekstraksi DNA (V)

65 mg daun petunia muda direndam etanol absolut 6 hari, dicuci dan digerus dengan nitrogen cair. Sampel dipindahkan ke tube, ditambah *mix buffer* (400 μ l buffer GP1 dan 5 μ l RNase), lalu divortex dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 15 menit (selama inkubasi sampel divortex setiap 5 menit). Sampel ditambah 20 μ l Pro-K, tube dibolak-

balik dan diinkubasi suhu 60°C selama 10 menit. 100 μ l buffer GP2 ditambahkan ke suspensi, divortex dan diinkubasi dalam es selama 3 menit. Suspensi dipindah ke *filter column*, disentrifugasi 1000xg selama 1 menit. Supernatan dipindah ke tube baru dan ditambah 750 μ l buffer GP3. Suspensi dipindah ke *GD column* lalu disentrifugasi 15.500xg selama 2 menit, *flow through* dibuang. 400 μ l buffer W1 ditambahkan ke *GD column*, disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. 600 μ l *wash buffer* ditambahkan, disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. Sentrifugasi 15.500xg selama 3 menit untuk *drying*. *GD column* dipindah ke tube baru, ditambah 50 μ l *elution buffer* yang telah dipanaskan 60°C, didiamkan selama 5 menit lalu disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit. Tahap elusi diulangi sekali lagi.

Metode Modifikasi Ekstraksi DNA (VI)

65 mg daun petunia muda direndam etanol absolut 6 hari, dikeringkan, disimpan di dalam *freezer*, dicuci dan digerus dengan nitrogen cair. Sampel dipindahkan ke tube, ditambah *mix buffer* (400 μ l buffer GP1 dan 5 μ l RNase), lalu divortex dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 15 menit (selama inkubasi sampel divortex setiap 5 menit). Sampel ditambah 20 μ l Pro-K, tube dibolak-balik dan diinkubasi suhu 60°C selama 10 menit. 100 μ l buffer GP2 ditambahkan ke suspensi, divortex dan diinkubasi dalam es selama 3 menit. Suspensi dipindah ke *filter column*, disentrifugasi 1000xg selama 1 menit. Supernatan dipindah ke tube baru dan ditambah 750 μ l buffer GP3. Suspensi dipindah ke *GD column* lalu disentrifugasi 15.500xg selama 2 menit, *flow through* dibuang. 400 μ l buffer W1 ditambahkan ke *GD column*, disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. 600 μ l *wash buffer* ditambahkan, disentrifugasi 15.500xg



selama 1 menit, *flow through* dibuang. Sentrifugasi 15.500xg selama 3 menit. *GD column* dipindah ke tube baru, ditambahkan 50 μl *elution buffer* yang telah dipanaskan 60°C, didiamkan selama 5 menit lalu disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit. Isolat DNA disentrifugasi kembali dengan kecepatan 15.500xg selama 1 menit.

Metode Modifikasi Ekstraksi DNA (VII)

65 mg daun petunia muda direndam etanol absolut 2 hari, dikeringkan, disimpan di dalam *freezer*, dicuci, dan digerus dengan nitrogen cair. Sampel dipindahkan ke tube dan ditambahkan *mix buffer* (400 μl buffer GP1 dan 5 μl Rnase), lalu divortex dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 15 menit (selama inkubasi sampel divortex setiap 5 menit). Sampel ditambah 20 μl Pro-K, tube dibolak-balik dan diinkubasi suhu 60°C selama 10 menit. 100 μl buffer GP2 ditambahkan ke suspensi, divortex dan diinkubasi dalam es selama 3 menit. Suspensi dipindah ke *filter column*, disentrifugasi 1000xg selama 1 menit. Supernatan dipindah ke tube baru dan ditambah 750 μl buffer GP3. Suspensi dipindah ke *GD column* lalu disentrifugasi 15.500xg selama 2 menit, *flow through* dibuang. 400 μl buffer W1 ditambahkan ke *GD column*, disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. 600 μl *wash buffer* ditambahkan, disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit, *flow through* dibuang. Sentrifugasi 15.500xg selama 3 menit untuk *drying*. *GD column* dipindah ke tube baru, ditambah 50 μl *elution buffer* yang telah dipanaskan 60°C, didiamkan selama 5 menit lalu disentrifugasi 15.500xg selama 1 menit. Tahap elusi diulangi sekali lagi.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi isolat DNA yang diukur secara kuantitatif menggunakan

nanospektrofotometer ditunjukkan oleh Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengecekan kuantitas DNA menggunakan nano spektrofotometer

Sampel	Konsentrasi (ng/ μl)	Kemurnian ($\text{\AA}260/\text{\AA}280$)
Standar I	1,4	2,86
Modifikasi II	6,7	2,06
Modifikasi III	13,2	1,92
Modifikasi IV	17,9	1,64
Modifikasi V	13,2	1,71
Modifikasi VI	129,3	1,87
Modifikasi VII	116,0	1,87

Tabel di atas menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh dari sampel daun petunia (*Petunia hybrida* seri rose picotee) memiliki kuantitas yang berbeda-beda. Hanya ada dua modifikasi prosedur yang hasilnya memenuhi standar yaitu modifikasi ke-6 dan ke-7 dengan konsentrasi 129,3 ng/ μl dan 116,0 ng/ μl . DNA berkualitas tinggi pada suatu ekstraksi merupakan salah satu hal dasar yang harus dipenuhi dalam studimolekular (Syafaruddin & Santoso, 2011). Kualitas DNA diukur berdasarkan kemurniannya pada absorbansi panjang gelombang 260/280 dalam kisaran 1,8-2,0 (Sambrook & Russel, 1989). Kemurnian DNA hasil modifikasi ke-6 dan ke-7 telah memenuhi standar *universal* yaitu 1,87. Prosedur ekstraksi ke-6 mengalami modifikasi pada teknik perlakuan sampel. Sampel berupa daun segar direndam etanol absolut selama 6 hari kemudian dikeringkan dan dibekukan di dalam *freezer* sampai digunakan. Etanol absolut digunakan untuk mengurangi kontaminan yang mengikat DNA yang dapat dibuktikan dengan hasil modifikasi ke-6 dan ke-7, bahwa



menggunakan etanol absolut berpengaruh terhadap kemurnian DNA. Penggunaan alkohol dipastikan dapat menghilangkan klorofil dan pigmen (Sahu *et al.*, 2012). Perlakuan menggunakan etanol absolut pada penelitian ini dikombinasikan dengan pengeringan sampel setelah direndam dan dibekukan pada suhu -4°C, merujuk pada penelitian Sahu *et al.* (2012) yang membekukan sampel daun tumbuhan mangrove pada suhu -80°C. Penggunaan freezer dengan suhu -80°C digantikan freezer dengan suhu -4°C karena keterbatasan alat.

Konsentrasi tinggi dan murni yang diperoleh selain ditentukan oleh teknik perlakuan sampel juga tidak terlepas dari reagen-reagen yang tersedia di kit isolasi geneaid. Umumnya ekstraksi DNA tumbuhan menggunakan metode *Cetyl trimetil ammonium bromide* (CTAB) karena tumbuhan mengandung banyak polisakarida, senyawa polifenol, serta metabolit sekunder lainnya (Jose & Usha, 2000). Polisakarida dapat menghambat aktivitas *Taq* polymerase dalam proses PCR, dan kontaminan lain seperti polifenol dalam bentuk teroksidasi mengikat DNA secara kovalen (Fatchiyah dkk., 2011). *Petunia hybrida* mengandung banyak metabolit sekunder seperti petuniasterones, ergostanoids, ergostane, glycosides (petuniaosides) (Bajaj, 1996). Senyawa metabolit sekunder mengikat asam nukleat selama proses isolasi, ikut bercampur kemudian bereaksi (Sharma & Gaur, 2014). Reagen-reagen pada kit isolasi Geneaid kemungkinan besar mengandung CTAB. Komponen CTAB bersifat detergen kationik yang berfungsi merusak membran sel, mendenaturasi protein, membentuk kompleks dengan DNA, dan menghambat aktivitas nuklease (Fatchiyah, 2011). Penambahan pro-K (Proteinase K) pada prosedur modifikasi ke-

3 memberikan pengaruh baik terhadap kualitas DNA yaitu 1,92 karena pro-K berfungsi untuk mendegradasi protein (Utami dkk., 2012).

SIMPULAN

Isolasi DNA selain memodifikasi komposisi reagen kimia juga diperlukan teknik perlakuan sampel agar diperoleh DNA yang berkualitas. Protokol isolasi DNA menggunakan kit geneaid yang terbaik pada penelitian ini yaitu modifikasi ke-6 dan ke-7 dengan memperlakukan sampel direndam di dalam etanol absolut selama 6 hari, dikeringkan, dan dibekukan (*freezer*) sampai sampel digunakan untuk ekstraksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajaj, Y.P.S. 1996. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 37-Medicinal and Aromatic Plants* XI. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Chen, S., Matsubara, K., Omori, T., Kokubun, H., Kodama, H., Watanabe, H., Hashimoto, G., Marchesi, E., Bullrich, L., Ando, T. 2007. Phylogenetic analysis of the genus *Petunia* (Solanaceae) based on the sequence of the *Hf1* gene. *Journal of Plant Research*. 120: 385-397.
- Fatchiyah, Arumingtyas, E.L., Widyarti, S., Rahayu, S. 2011. *Biologi Molekular-Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Fatchiyah. 2011. *Isolasi DNA dan RNA*. (Online), (<http://fatchiyah.lecture.ub.ac.id/files/2011/02/Isolasi-DNA-RNA-elktroforesi1.pdf>) diakses 23 Mei 2014.
- Holton, T.A., Brugilera, F., Lester, D.R., Tanaka, Y., Hyland, C.D., Menting, J.G.T., Yi-Lu, C., Farcys, E., Stevenson, T.W., Cornish, E.C. 1993. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling colour. *Nature*. 366: 276-279.
- Jose, J. & Usha, R. 2000. Extraction of geminiviral DNA from a highly mucilaginous plant (*Abelmoschus esculentus*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 349-355.
- Matsubara, K., Kodama, H., Kokubun, H., Watanabe, H., Ando, T. 2005. Two novel transposable elements in cytochrome P450 gene govern anthocyanin



- biosynthesis of commercial petunias. *Gene*. 358:121-126.
- Sahu, S.K., Thangaraj, M., Kathiresan, K. 2012. DNA Extraction Protocol for Plants with Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *International Scholarly Research Network*. 2012: 1-6.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold-Spring Harbor Laboratory Press. 2nd edition 165p.
- Sharma, E. & Gaur, A.K. 2014. Optimization of DNA isolation protocol of *Aconitum balfourii* Satpf.: A rare medicinal herb of Himalayan alpine. *Indian Journal of Biotechnology*.13: 62-66.
- Syafaruddin & Santoso, T. J. 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.
- Tanaka, Y., Brugliera, F., Chandler, S. 2009. Recent Progress of Flower Colour Modification by Biotechnology. *Int.J.Mol.Sci*.10: 5350-5369.
- Utami, A., Meyalita, R., Prihatin, N.A., Ambarsari, L., Kurniatin, P.A., Nurcholis, W. 2012. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Unesa 2012*. 205-214.

TANYA JAWAB

Penanya : Dini Siswani Mulia,S.Pi,M.Si dari Universitas Muhammadiyah Purwokerto

Pertanyaan :

Mengapa tidak mencoba membuat reagen secara manual?

Kenapa digunakan suhu -4 derajat celcius padahal disumber disarankan untuk menggunakan suhu -80 derajat celcius. Apa tidak takut tidak murni?

Jawab :

Untuk saat ini sementara belum ada teknisi yang dapat menyiapkan reagen-reagen tersebut Berdasarkan hasil penelitian, bahwa sampel yang telah dikeringkan di rendaman etanol absolut dan dibekukan suhi -4 derajat celcius menghasilkan isolat DNA yang murni pada kisaran angkat 1,87,mengingat kemurnian DNA diukur pada absorbansi 260/280 dengan rentangan angka 1,8-2,0

