

**PENGARUH TEKNIK ISOLASI DNA GENOM TANAMAN TEMBAKAU TERHADAP
KUALITAS DAN KUANTITAS HASIL EKSTRAKSI**
***THE EFFECT OF TOBACCO PLANT GENOMIC DNA ISOLATION TECHNIQUES ON THE
QUALITY AND QUANTITY OF EXTRACTION PRODUCTS***

Ahmad Ilham Tanzil, Wahyu Indra Duwi Fanata
Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember

Email korespondensi: aitanzil@unej.ac.id

ABSTRAK

Tanaman tembakau merupakan komoditas perkebunan penting di Indonesia. Namun belakang sering terjadi kendala dalam budidaya. Adapun kendala tersebut diantaranya cekaman abiotik dan biotik. Dalam menanggulangi hal tersebut perlu dilakukan perbaikan varietas tanaman melalui program pemuliaan berbasis molekuler. Program bioteknologi tersebut perlu dilakukan penelitian optimalisasi dalam proses isolasi DNA agar hasil yang dihasilkan bisa digunakan untuk analisa lebih lanjut. Adapun metode yang digunakan menggunakan perbandingan teknik ekstraksi menggunakan alat dan gerus dengan bahan kimia. Sedangkan sampel daun tembakau digunakan menggunakan perbandingan sampel basah dan sampel kering. Dari hasil yang didapatkan bahwa perlakuan metode gerus dengan bahan kimia (nitrogen cair) menggunakan sampel basah mampu meningkatkan hasil dari kualitas maupun kuantitas konsentrasi DNA.

Kata kunci: Isolasi DNA, Nitrogen Cair, Konsentrasi DNA, Pemuliaan Berbasis Molekuler, Genom

ABSTRACT

Tobacco plants are an important plantation commodity in Indonesia. However, problems often occur in cultivation. These obstacles include abiotic and biotic stress. To overcome this problem, it is necessary to improve plant varieties through molecular-based breeding programs. This biotechnology program needs to carry out optimization research on the DNA isolation process so that the results produced can be used for further analysis. The method used uses a comparison of extraction techniques using tools and grinding with chemicals. Meanwhile, tobacco leaf samples were used with a comparison of wet samples and dry samples. From the results obtained, the treatment of the grinding method with chemicals and wet samples was able to increase the quality and quantity of DNA concentration.

Key words : DNA Isolation, Liquid Nitrogen, DNA Concentration, Molecular Based Breeding, Genome

PENDAHULUAN

Studi genetik terutama studi populasi genetik terhadap jenis tumbuhan berlangsung sangat lambat disebabkan oleh banyak kesulitan yang menghambat seperti

penyediaan sampel segar setelah dibawa dalam perjalanan jauh sering menginduksi senyawa fenol dan polisakarida pada berbagai tumbuhan. Senyawa tersebut dapat mengontaminasi sediaan DNA dan

akan menghambat analisis lebih lanjut. Isolasi untuk mendapatkan DNA berkualitas tinggi merupakan satu kaidah dasar yang harus dipenuhi dalam analisis molekuler. Permasalahan dalam isolasi DNA masih merupakan hal penting yang perlu diatasi (Leigh Greathouse et al., 2019; Restu & dan Gusmiaty, 2012; Sajali et al., 2018).

Berbagai teknik analisis dalam pemuliaan tanaman dan biologi molekuler yang berdasarkan pada hibridisasi molekuler atau PCR membutuhkan DNA dalam jumlah yang cukup dan kualitas yang baik (Amani, 2011). Oleh karena kandungan senyawa sekunder dalam sel tanaman berbeda-beda, maka setiap tanaman membutuhkan prosedur isolasi yang optimum agar diperoleh DNA genom yang dapat digunakan sebagai bahan dalam analisis molekuler. Optimasi prosedur tersebut dapat dilakukan terhadap komposisi larutan buffer lisisnya ataupun teknik penanganan fisik dalam pemisahan DNA genom dari senyawa lain. Pada prinsipnya optimasi prosedur ini bertujuan melindungi DNA genom dari degradasi akibat senyawa sekunder yang dilepaskan ketika sel dihancurkan atau kerusakan akibat penanganan fisik (Harris & Hoelzel, 1993).

Beberapa teknik dan prosedur telah dipublikasikan, tetapi seringkali tidak dapat diaplikasikan karena genus atau bahkan spesies tanaman bersifat sangat spesifik. Modifikasi metode standar ekstraksi DNA diperlukan pada ekstraksi DNA dari daun tanaman yang mengandung banyak polisakarida atau metabolit sekunder. Berdasarkan penelitian (Langga & Kuswinanti, 2012) memperlihatkan hasil ekstraksi DNA yang kurang optimal baik kualitas maupun kuantitas DNA yang dihasilkan sehingga mempengaruhi intensitas pita DNA hasil amplifikasi yang

tidak jelas. Hal tersebut menunjukkan bahwa metode isolasi DNA yang telah dilakukan pada padi tidak dapat diaplikasikan secara maksimal pada tanaman seperti tembakau. Oleh karena itu pemilihan dan optimalisasi metode isolasi yang memungkinkan diperolehnya DNA genom tanaman tembakau perlu dilakukan.

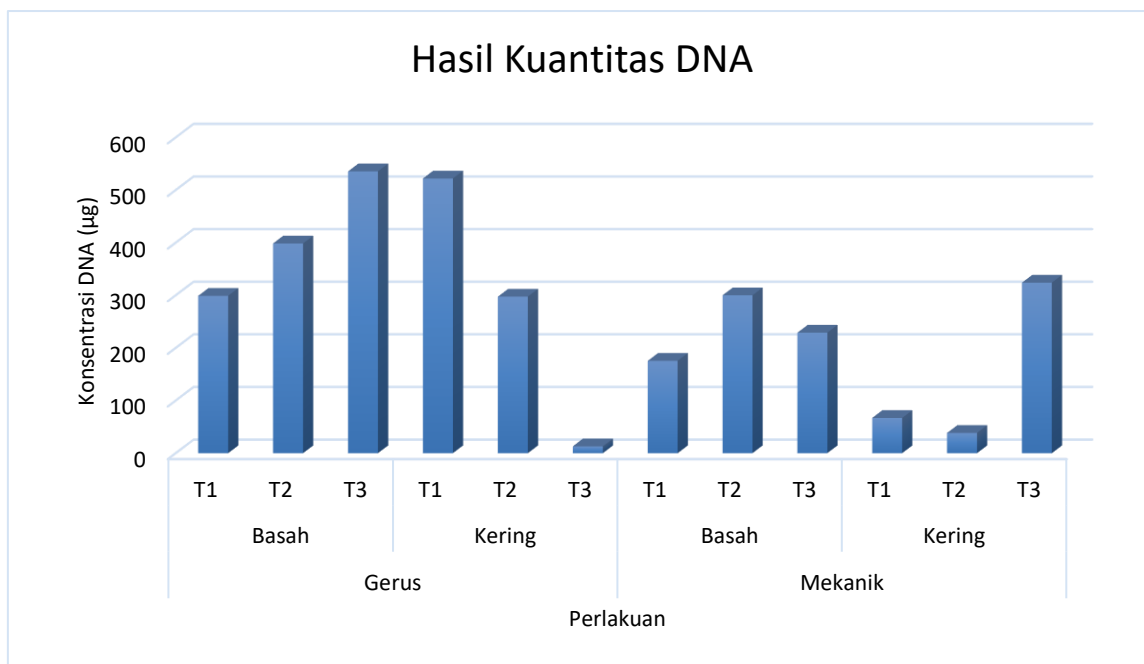
BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus – November 2023 di Green House Agroteknopark dan Laboratorium Terpadu CDAST Universitas Jember. Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah analog disruptor genie, sentrifugus, oven, timbangan, mikropipet, gelas ukur, elektroforesis, nano drop, microwave, gel doc, mortar, dan alat tulis. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bibit tembakau varietas bligon 1 (T1), jepiril 1 (T2), kemloko 3 (T3), tanah, nitrogen cair, buffer lisis, buffer ekstraksi, gel elektroforesis.

Isolasi DNA menggunakan sampel daun basah (segar) dan daun kering (yang telah di oven suhu 80°C selama 48 jam). Metode alat menggunakan analog disruptor genie (de Jonge et al., 2020; Mokoena et al., 2023) sedangkan metode gerus menggunakan bantuan nitrogen cair suhu -196°C (Abdel-Latif & Osman, 2017; Sahu et al., 2012). Setelah daun hancur, baru diberikan buffer lisis. Hingga nanti didapatkan DNA dan diberi buffer TE. Analisa kuantitas konsentrasi DNA diukur dengan Nano-Drop (Sophian & Syukur, 2021) dan analisa kualitas DNA diukur dengan elektroforesis gel 1%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil konsentrasi DNA yang dihasilkan disajikan dalam grafik berikut:

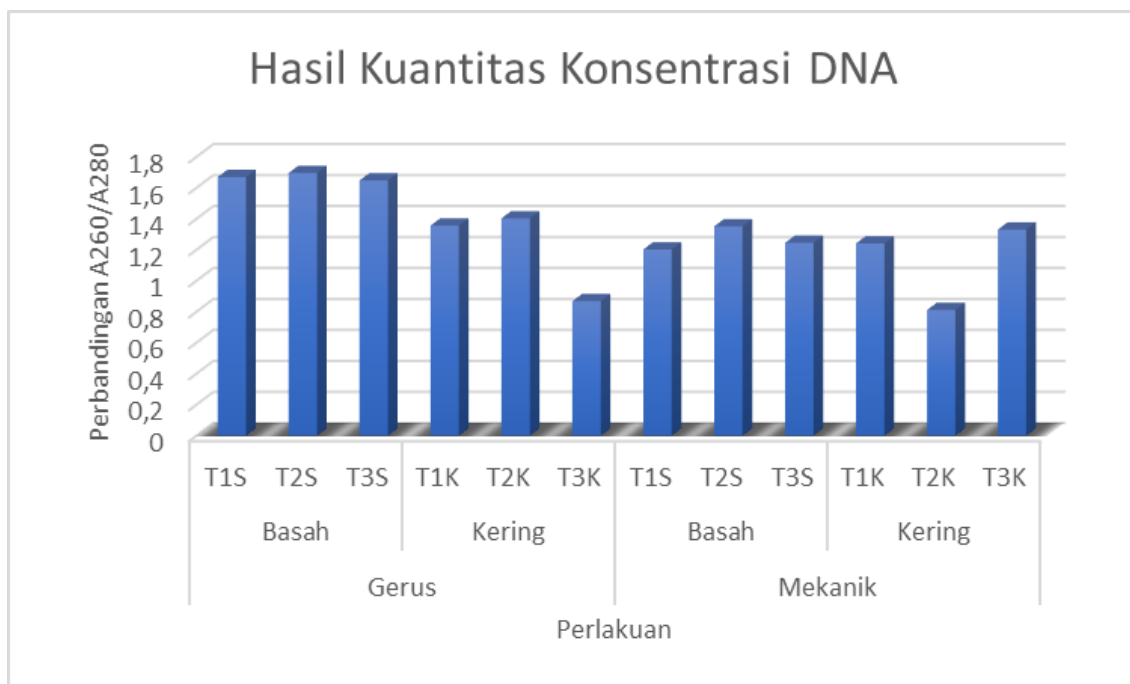


Gambar 1. Hasil Kuantitas DNA

Keterangan: T1 = Var. Bligon 1; T2 = Var. Jepril 1; T3 = Var. Kemloko 3; Sampel Basah dan Kering; Metode Gerus dan Mekanik

Berdasarkan hasil gambar 1 menyatakan bahwasannya perlakuan metode sampel basah mampu meningkatkan hasil konsentrasi DNA. Hal ini diduga bahwa sampel basah masih dalam kondisi segar sehingga lebih mudah dalam melaksanakan ekstraksi DNA dibandingkan sampel kering. Selaras dengan hasil penelitian Chase & Hills (1991) bahwasannya sampel daun yang segar lebih disukai karena menghasilkan DNA yang bagus. Sedangkan metode gerus memiliki kuantitas DNA lebih baik dibandingkan dengan metode mekanik. Hal ini diduga karena penggerusan menggunakan nitrogen cair mampu menghasilkan serbuk halus sehingga semua bagian sel dapat diekstraksi dibandingkan metode mekanik. Pernyataan Haymes, et. al. (2004) bahwasannya penggunaan metode mekanik menggunakan disruptor genie tidak sebaik dengan metode yang lain.

Parameter dalam mengukur kuantitas DNA dapat dilihat dari tingkat kemurnian. Tingkat kemurnian dapat diketahui melalui kuantitas DNA dari kontaminan yang ikut terisolasi. Adapun caranya yaitu dengan membagi nilai A260/280. Jika nilai sekitar 1,8-2 maka dapat dikatakan murni. Namun jika dibawah 1,8 kemungkinan ada kontaminasi fenol atau protein dalam larutan. Nilai hasil konsentrasi A260/280 tampak seperti gambar 2 dibawah ini. Dari keseluruhan hasil tampak, nilai konsentrasi masih dibawah 1,8 yang artinya terdapat kontaminasi protein. Solusi dalam permasalahan ini, maka dalam isolasi DNA perlu ditambahkan protease. Jika nilai kemurniannya di bawah 1,8, DNA yang diisolasi mungkin demikian terkontaminasi protein, begitu pula sebaliknya jika nilai kemurniannya diatas 2,1 maka dapat diduga demikian isolasi DNA yang dilakukan terkontaminasi RNA (Eppendorf, 2016).



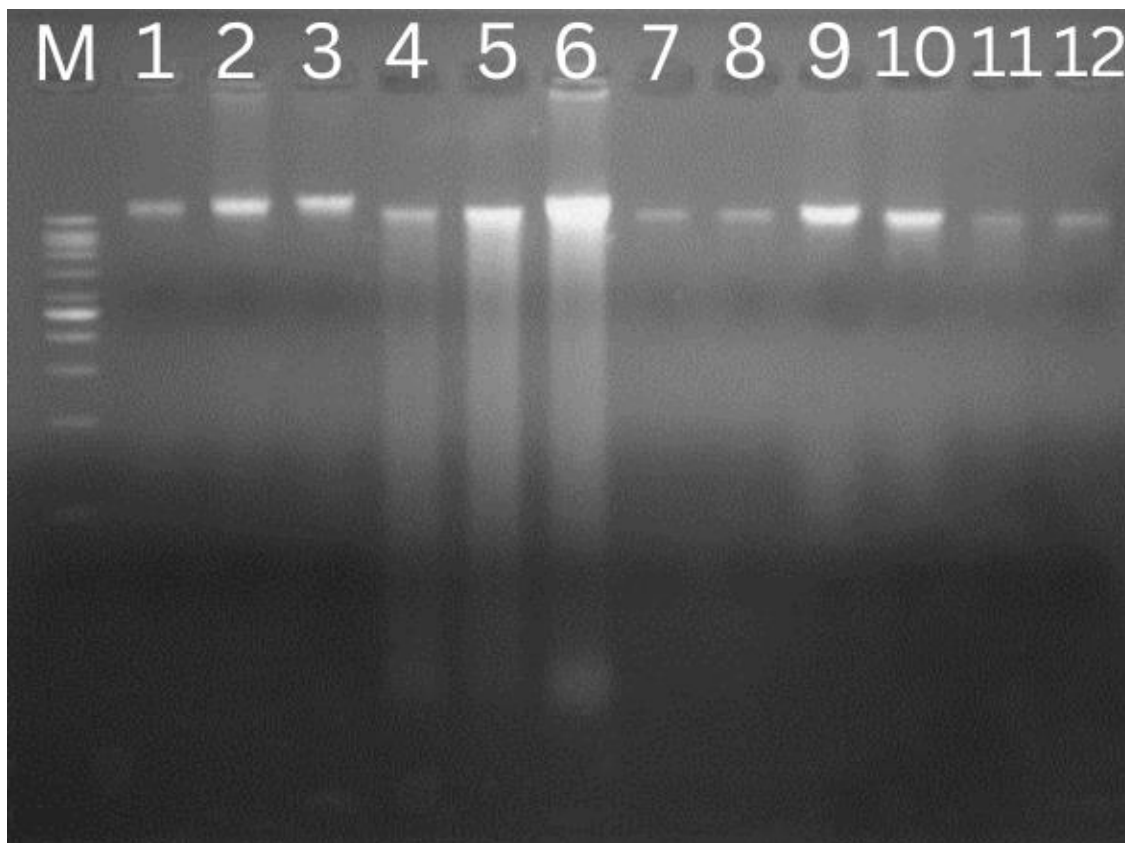
Gambar 2. Hasil Kuantitas Konsentrasi DNA

Keterangan: T1 = Var. Bligon 1; T2 = Var. Jepril 1; T3 = Var. Kemloko 3; Sampel Basah dan Kering; Metode Gerus dan Mekanik

Gambar 2 menunjukkan hasil kuantitas konsentrasid DNA setelah diamati di NanoDrop. DNA atau RNA pada umumnya merupakan rangkaian nukleotida yang terdiri dari 5 jenis dimana kelima jenis tersebut nukleotida jika dibaca nilai serapannya pada panjang gelombang A260/A280 akan mempunyai nilai yang berbeda-beda, misalnya cDNA, nilai kemurnian 1,8-2,1 merupakan nilai akumulasi 4 Jenis nukleotida adalah guanin (1,15), adenin (4,50), sitosin (1,51), dan timin (1,47). sedangkan untuk RNA, timin akan digantikan oleh urasil yang mempunyai nilai serapan (4,00). karena nilai serapan urasil lebih tinggi dibandingkan yang lain nukleotida penyebab adanya urasil jika dibaca pada panjang gelombang A260/A280 akan menunjukkan nilai kemurnian yang diatas 2,1 (University, 2020). Ekstraksi DNA ialah proses perbandingan antara

seni dan sains karena banyak faktor yang mempengaruhi (Nugroho et. al. 2019)

Berdasarkan hasil gambar 3 menyatakan bahwasannya perlakuan metode sampel basah mampu meningkatkan hasil konsentrasi DNA. Kualitas ekstraksi DNA sangat dipengaruhi oleh ketiga faktor diantaranya proses pengancuran, kualitas bahan jaringan tanaman, serta kuantitas jaringan tanaman (Ferniah & Pujianto, 2013). Hal ini diperkuat dengan penelitian (Guha et al., 2018) bahwa sampel basah akan membuat pita band menjadi terang dan tebal. Hasil penggerusan dengan menggunakan nitrogen cair lebih baik dibandingkan dengan metode mekanik. Nitrogen cair sangat bermanfaat dalam proses pengerusan jaringan tanaman dikarenakan suhu yang dingin mampu menjaga DNA tetap tidak terdegradasi (Kamba & Deb, 2018).



Gambar 3. Hasil Kualitas Pita DNA

Keterangan: 1-3 perlakuan sampel basah dan gerus, 4-6 perlakuan sampel kering dan gerus, 7-9 perlakuan sampel basah dan mekanik, 10-12 perlakuan sampel kering dan mekanik

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul-molekul berdasarkan muatan listrik yang diaplikasikan pada molekul tersebut. Dalam konteks analisis DNA, elektroforesis digunakan untuk memisahkan fragmen-fragmen DNA berdasarkan ukuran mereka. Salah satu aspek penting dalam analisis elektroforesis DNA adalah kualitas pita DNA yang dihasilkan (Gambar 3). Kualitas pita DNA dapat diukur berdasarkan kecerahan atau intensitas pita yang terbentuk pada gel elektroforesis. Hasil elektroforesis DNA sering kali menunjukkan variasi dalam kecerahan pita, yaitu ada yang tampak terang dan ada yang tampak kurang terang. Penyebab variasi dalam kecerahan pita DNA dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi DNA, kualitas isolasi DNA, keberadaan kontaminan, dan kondisi elektroforesis. Konsentrasi DNA yang tinggi

cenderung menghasilkan pita yang lebih terang karena jumlah molekul DNA yang lebih banyak. Namun, konsentrasi yang sangat tinggi juga dapat menyebabkan overloading, di mana pita-pita DNA bertumpuk dan sulit untuk dipisahkan dengan jelas. Sebaliknya, konsentrasi DNA yang rendah dapat menghasilkan pita yang kurang terang atau bahkan tidak terlihat sama sekali.

Kualitas isolasi DNA juga memainkan peran penting dalam membentuk pita yang jelas, karena kontaminan atau fragmen DNA yang tidak diinginkan dapat mengganggu visualisasi pita target. Selain itu, faktor lain yang dapat mempengaruhi kecerahan pita DNA adalah kondisi elektroforesis, seperti tegangan listrik, durasi, dan jenis buffer yang digunakan. Penggunaan tegangan listrik yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat memengaruhi migrasi DNA dalam gel,

sehingga mempengaruhi intensitas pita yang terbentuk. Durasi elektroforesis yang tidak tepat juga dapat menghasilkan pita yang tidak optimal. Pemilihan buffer yang sesuai juga penting untuk memastikan kondisi elektroforesis yang optimal dan pembentukan pita DNA yang jelas. Beberapa studi telah mendukung hubungan antara faktor-faktor ini dengan kualitas pita DNA dalam elektroforesis. Misalnya, penelitian oleh Smith et al. (2018) menunjukkan bahwa konsentrasi DNA yang tepat dan kondisi elektroforesis yang optimal sangat penting untuk mendapatkan hasil elektroforesis yang

akurat. Begitu juga, penelitian oleh Jones dan Brown (2020) menyoroti pentingnya kualitas isolasi DNA dalam mempengaruhi kecerahan pita DNA. Dalam praktiknya, untuk mendapatkan hasil elektroforesis DNA yang optimal, penting untuk memperhatikan semua faktor yang telah disebutkan di atas dan mengoptimalkan kondisi eksperimental sesuai dengan tujuan analisis yang diinginkan.

KESIMPULAN

1. Hasil kuantitas DNA berdasarkan konsentrasi DNA lebih baik menggunakan sampel basah dan metode gerus dengan nitrogen cair dibandingkan pita band DNA sampel kering dengan metode alat
2. Hasil kuantitas DNA berdasarkan perbandingan panjang gelombang A260/A280 lebih tinggi menggunakan sampel basah dan metode gerus dengan nitrogen cair dibandingkan pita band DNA sampel kering dengan metode alat
3. Hasil kualitas DNA berdasarkan uji elektroforesis lebih tebal pita band DNA sampel basah dengan metode gerus dibandingkan pita band DNA sampel kering dengan metode alat

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih kepada pihak Universitas Jember dan LP2M yang telah memberikan pendanaan hibah penelitian skim hibah dosen pemula Bantuan Pendanaan Program Hibah Internal Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Tahun 2023. Berdasarkan Surat

Keputusan Rektor Universitas Jember Nomor 7575/UN25/KP/2023 Tanggal: 30 Maret 2023 dan Perjanjian Penerima Hibah Dosen Pemula Nomor: 3437/UN25.3.1/LT/2022 Tanggal 3 April 2023 mendapatkan anggaran penelitian dengan judul Optimalisasi Teknik Isolasi DNA Genom Tanaman Padi, Tebu, dan Tembakau untuk Kegiatan Pemuliaan Berbasis Molekuler sumber dana DIPA PNPB 2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Amani, J., Kazemi, R., Abbasi, A. R., & Salmanian, A. H. (2011). A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *Iranian journal of biotechnology*, 9(1), 69-71.
- Chase, M. W., & Hills, H. H. (1991). Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*, 40(2), 215-220.
- de Jonge, W. J., Brok, M., Kemmeren, P., & Holstege, F. C. P. (2020). An Optimized

- Chromatin Immunoprecipitation Protocol for Quantification of Protein-DNA Interactions. *STAR Protocols*, 1(1). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100020>
- Eppendorf. (2016). Nucleic Acid Photometry. 22331.
- Ferniah, R. S., & Pujiyanto, S. (2013). Optimasi Isolasi DNA Cabai (*Capsicum annuum* L.) Berdasar Perbedaan Kualitas dan Kuantitas Daun serta Teknik Penggerusan. *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 15(1), 14-19. <https://doi.org/10.14710/bioma.15.1.14-19>
- Guha, P., Das, A., Dutta, S., & Chaudhuri, T. K. (2018). A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(1). <https://doi.org/10.1002/jcla.22181>
- Harris, S. A., & Hoelzel, A. R. (1993). Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. *The Journal of Applied Ecology*, 30(1). <https://doi.org/10.2307/2404283>
- Haymes, K. M., Ibrahim, Mischke, S., Scott, D. L., & Saunders, J. A. (2004). Rapid isolation of DNA from chocolate and date palm tree crops. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(17), 5456-5462.
- Jones, R., & Brown, D. (2020). Effects of DNA isolation quality on DNA gel electrophoresis results. *Journal of Genetic Analysis*, 40(2), 78-85.
- Kamba, J. O. Y. R. I. S. O. N., & Deb, C. R. (2018). A new simple and efficient DNA extraction protocol for orchid without liquid nitrogen and phenol. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol*, 19(3-4), 143-147.
- Langga, I. F., & Kuswinanti, T. (2012). Tanaman Bitti (*Vitex cofassus* Reinw) Serta Analisis Keragaman Genetik Dengan Teknik RAPD-PCR Optimization of Temperature and Length of Incubation in Extracting Bitti Plant (*Vitex cofassus* Reinw.) Dna and Genetic Variety Analysis with RAPD-PCR. *J. Sains & Teknologi, Desember*, 12(3), 265–276.
- Leigh Greathouse, K., Sinha, R., & Vogtmann, E. (2019). DNA extraction for human microbiome studies: The issue of standardization. In *Genome Biology* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1843-8>
- Mokoena, N. Z., Steyn, H., Hugo, A., Dix-Peek, T., Dickens, C., Gcilitshana, O. M. N., Sebolai, O., Albertyn, J., & Pohl, C. H. (2023). Eicosapentaenoic acid influences the pathogenesis of *Candida albicans* in *Caenorhabditis elegans* via inhibition of hyphal formation and stimulation of the host immune response. *Medical Microbiology and Immunology*, 212(5), 349–368. <https://doi.org/10.1007/s00430-023-00777-6>
- Nugroho, K., Terryana, R. T., & Lestari, P. (2019). Metode ekstraksi DNA tanaman tanpa presipitasi etanol untuk kegiatan polymerase chain reaction (PCR). *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(1), 29-38.
- Restu, M., & dan Gusmiaty, M. (2012). Optimalisasi Teknik Ekstraksi dan Isolasi DNA Tanaman Suren (*Toona Sureni* Merr.) untuk Analisis Keragaman Genetik berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal Natur Indonesia*, 14(2), 138–142.
- Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2012/205049>
- Sajali, N., Wong, S. C., Hanapi, U. K., Abu Bakar @ Jamaluddin, S., Tasrip, N. A., & Mohd Desa, M. N. (2018). The Challenges of DNA Extraction in Different Assorted Food Matrices: A Review. In *Journal of Food Science* (Vol. 83, Issue 10, pp. 2409–2414). Blackwell

Publishing Inc.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14338>

- Smith, A., Johnson, B., & Williams, C. (2018). The impact of DNA concentration and electrophoresis conditions on gel electrophoresis results. *Journal of Molecular Biology*, 25(3), 112-120.
- Sophian, A., & Syukur, A. (2021). Analysis of Purity and Concentration of Isolated DNA in Making Raw DNA of Rat Species: Analysis of Purity and Concentration of Isolated DNA in Making Raw DNA of Rat Species. *Eruditio: Indonesia Journal of Food and Drug Safety*, 1(2), 1-5.
- University, E. (2020). EIGC. 005 _ Quantitation with NanoDrop Standard Operating Procedure Staff Review Page: Standard Operating Procedure Approval Page: Manual Prosedure, 1–5.