

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Konsentrasi DNA

Konsentrasi DNA menunjukkan jumlah DNA yang dihasilkan dalam proses isolasi DNA suatu sampel (Mulyati, 2011). Konsentrasi DNA yang dimiliki setiap sampel berbeda-beda, dan dapat dipengaruhi oleh perlakuan yang diberikan serta kemampuan buffer ekstraksi dalam memecah sel (Mulyati, 2011). Nilai dari konsentrasi DNA dapat diketahui dari panjang gelombang lamda 260 nm dikalikan dengan nilai absorbansi 1 yaitu 50 untai ganda DNA permil, dan faktor pengenceran dengan nilai 20.000 μ l (Fatchiyah, dkk., 2012)

Tabel 1. Kisaran konsentrasi DNA Daun Tanaman Kepel Hasil Isolasi DNA.

Perlakuan		Kisaran Konsentrasi (ng/ul)
Jenis Sampel	Berat Sampel	
Daun Muda Merah	0,1 gram	125,82 - 281,71
	0,2 gram	209,15 - 662,15
	0,3 gram	454,62 - 889,67
Daun Muda Hijau	0,1 gram	137,65 - 157,12
	0,2 gram	43,7 - 181,2
	0,3 gram	60,54 - 239,42
Daun Dewasa	0,1 gram	138,88 - 540,9
	0,2 gram	30,91 - 298,46
	0,3 gram	156,73 - 211,81

Tabel 2. Rerata Konsentrasi Hasil Isolasi DNA pada Jenis dan Berat Sampel Daun Tanaman Kepel yang Berbeda.

Perlakuan		Rerata Konsentrasi (ng/ul)
Jenis Sampel	Berat Sampel	
Daun Muda Merah	0,1 gram	201,44bc
	0,2 gram	482,30ab
	0,3 gram	651,15a
Daun Muda Hijau	0,1 gram	145,80c
	0,2 gram	108,49c
	0,3 gram	160,66c
Daun Dewasa	0,1 gram	347,98abc
	0,2 gram	204,71bc
	0,3 gram	182,62bc

Keterangan: Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji lanjut DMRT pada taraf kesalahan 5%.

Berdasarkan Tabel 1, menunjukkan konsentrasi DNA hasil uji kuantitatif menggunakan Spektrofotometer memiliki nilai rerata konsentrasi DNA dengan kisaran 43,7 – 889,67ng/μl. Kisaran konsentrasi tersebut menunjukkan semua sampel DNA yang didapatkan memenuhi syarat untuk dilakukan proses tahap selanjutnya yaitu dilakukan amplifikasi marka target dengan metode PCR, karena untuk dapat dilakukan amplifikasi, konsentrasi minimal sampel adalah 25 ng/μl (Ningsih, dkk., 2017).

Berdasarkan Tabel 2, nilai konsentrasi tertinggi berturut-turut terdapat pada perlakuan jenis sampel daun muda merah dengan berat 0,3gram yaitu 651,15ng/ul, daun muda merah 0,2 gram yaitu 482,30ng/ul dan daun dewasa 0,1 gram yaitu

347,98ng/ul. Nilai rerata konsentrasi terendah berturut-turut terdapat pada perlakuan daun muda hijau 0,2 gram yaitu 108,49ng/ul, daun muda hijau 0,1 gram dan 0,2 gram yaitu 145,80ng/ul dan 160,66ng/ul; daun muda merah 0,1 yaitu 201,44ng/ul; serta daun dewasa 0,1gram sampai 0,3gram yaitu 347,98ng/ul, 204,71ng/ul, dan 182,62ng/ul.

Nilai rerata konsentrasi berdasarkan jenis sampel, pada perlakuan jenis sampel daun muda merah menunjukkan adanya peningkatan nilai konsentrasi DNA seiring dengan penambahan berat sampel yaitu pada berat sampel 0,1 gram 201,44ng/ul, berat sampel 0,2 gram 482,30ng/ul, dan berat sampel 0,3 gram 651,15 ng/ul. Pada jenis sampel daun muda hijau rerata yang ditunjukkan terjadi fluktuasi seiring dengan penambahan berat sampel, dan pada jenis sampel daun dewasa menunjukkan adanya penurunan konsentrasi seiring dengan penambahan berat sampel yaitu pada berat 0,1 gram 347,98ng/ul, berat 0,2gram 204,71ng/ul, dan berat 0,3gram 182,62ng/ul.

Penambahan nilai konsentrasi pada jenis sampel daun muda merah seiring dengan penambahan berat dimungkinkan terjadi karena pada daun muda merah memiliki ketebalan daun yang lebih tipis dan tidak kaku dengan kandungan polisakarida dan fenol yang lebih sedikit dibandingkan dengan daun muda hijau dan daun dewasa. Hal tersebut mengakibatkan dalam proses ekstraksi daun muda merah lebih mudah dalam pemecahan dinding sel dan mendegradasi sel, sehingga buffer yang digunakan masih berfungsi secara optimal dalam memperoleh DNA daun muda merah sampai dengan berat 0,3 gram. Menurut Ferniah (2013), penggunaan sampel dengan ketebalan yang tipis, tidak kaku dan kandungan fenol tidak tinggi

akan mempermudah mendapatkan DNA, hal ini dikarenakan apabila sampel yang digunakan tebal, kaku, dan mengandung senyawa fenol yang tinggi maka sel-sel daun tidak lisis dengan sempurna sehingga penambahan buffer lisis kurang efektif dalam pemisahan isi sel dengan debris sel dan berakibat DNA yang didapatkan berjumlah sedikit. Penggunaan berat sampel yang berbeda dapat mempengaruhi keefektifan buffer dalam mendapatkan konsentrasi DNA.

Penurunan nilai konsentrasi pada jenis sampel daun dewasa seiring dengan penambahan berat dimungkinkan terjadi karena daun dewasa memiliki ketebalan daun yang tebal, kaku dengan kandungan polisakarida dan fenol yang tinggi. Keadaan tersebut mengakibatkan pada proses ekstraksi, daun dewasa lebih sulit mengalami pemecahan dinding sel dan buffer yang digunakan mengalami kesulitan dalam mendegradasi sel, sehingga seiring dengan penambahan berat mengakibatkan kinerja buffer akan semakin berat dan mengakibatkan konsentrasi DNA dapat berkurang seiring dengan penambahan berat. Handayani (2008) menyatakan, bahwa penambahan berat sampel yang digunakan dalam isolasi DNA dapat mempengaruhi nilai konsentrasi yang didapatkan.

B. Kemurnian DNA

Kemurnian DNA menunjukkan jumlah DNA yang tidak mengalami kontaminasi pada sampel DNA, yang didapatkan dari hasil konsentrasi DNA pada panjang gelombang pada lamda 260 nm dibagi dengan panjang gelombang pada lamda 280 nm (Ludyasari, 2014). Nilai 260 nm merupakan nilai maksimal pita ganda DNA dapat menyerap cahaya, sedangkan nilai 280 merupakan nilai maksimal residu protein atau phenol dapat menyerap cahaya (Fatchiyah, 2012).

Kemurnian DNA yang optimal ditunjukkan dengan nilai 1,8 – 2. Apabila nilai kemurnian kurang dari (<) 1,8 maka DNA tersebut dimungkinkan masih terkontaminasi oleh protein, dan apabila nilai kemurnian lebih dari (>) 2 maka dimungkinkan DNA tersebut terkontaminasi dengan RNA (Hasrida, 2016). Nilai kemurnian DNA disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rerata Kemurnian DNA Daun Tanaman Kepel Hasil Isolasi DNA

Perlakuan		Rerata Kemurnian
Jenis Sampel	Berat Sampel	
Daun Muda Merah	0,1 gram	1,45c
	0,2 gram	1,51abc
	0,3 gram	1,56ab
Daun Muda Hijau	0,1 gram	1,60a
	0,2 gram	1,53abc
	0,3 gram	1,44c
Daun Dewasa	0,1 gram	1,33d
	0,2 gram	1,50bc
	0,3 gram	1,54abc

Keterangan: Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji lanjut DMRT pada taraf kesalahan 5%.

Berdasarkan Tabel 3, menunjukkan rerata kemurnian DNA hasil uji kuantitatif menggunakan Spektrofotometer yang dilihat dari perbandingan lamda 260 dengan 280 memiliki nilai rerata yang rendah yaitu 1,33 sampai 1,60 dan nilai tersebut di bawah 1,8 sebagai ketentuan nilai DNA murni yaitu pada nilai 1,8-2. Rendahnya kemurnian DNA mengindikasikan pada DNA hasil ekstraksi masih terdapat kontaminasi berupa senyawa protein, RNA dan senyawa sisa metabolit sekunder (Hasrida, 2016).

Berdasarkan uji lanjut DMRT pada tabel 3, nilai rerata kemurnian tertinggi terdapat pada perlakuan jenis sampel daun muda hijau dengan berat 0,1gram yaitu 1,60 namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan daun muda merah 0,3gram dan 0,2gram yaitu 1,56 dan 1,51; daun muda hijau 0,2gram yaitu 1,53; dan daun dewasa 0,3gram yaitu 1,54. Nilai rerata kemurnian terendah terdapat pada perlakuan daun dewasa 0,1gram.

Penggunaan jenis sampel daun muda merah dan daun dewasa menunjukkan adanya peningkatan nilai kemurnian seiring dengan penambahan berat, namun pada jenis sampel daun muda hijau menunjukkan adanya penurunan. Peningkatan nilai kemurnian pada daun muda merah menunjukkan *buffer* yang digunakan masih optimal sampai dengan berat 0,3 gram dalam memurnikan DNA, jenis sampel daun muda merah yang tipis, tidak kaku dengan kandungan fenol dan polisakarida yang rendah juga dapat membuat *buffer* yang digunakan dapat optimal dalam mendegradasi sel dan memurnikan DNA, serta peningkatan konsentrasi pada daun muda merah diduga dapat meningkatkan nilai kemurnian DNA sampai berat 0,3gram.

Peningkatan kemurnian pada jenis sampel daun dewasa terjadi dapat disebabkan karena pada saat lisis dimungkinkan DNA yang berhasil terisolasi memiliki jumlah sedikit, hal ini dapat dilihat dari konsentrasi yang didapatkan seiring dengan penambahan berat semakin rendah. Namun, dengan sedikitnya DNA yang terisolasi membuat membuat *buffer* yang digunakan dapat memurnikan DNA dengan lebih optimal seiring dengan penambahan berat. Kemudian pada daun muda

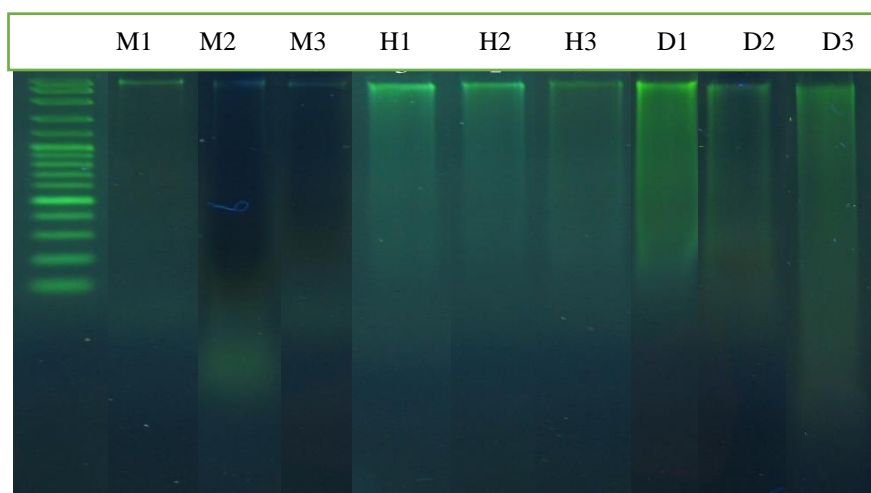
hijau *buffer* yang digunakan mendapatkan kemurnian optimal pada berat 0,1, sehingga pada penambahan berat nilai kemurnian menunjukkan adanya penurunan.

Penurunan nilai kemurnian pada daun muda hijau menunjukkan penggunaan *buffer* pada daun muda hijau dapat memurnikan DNA dengan optimal pada berat sampel yang rendah yaitu 0,1gram, sehingga pada penambahan berat sampel terjadi penurunan nilai kemurnian. Berdasarkan konsentrasi DNA pada daun muda hijau juga didapatkan nilai konsentrasi yang rendah, dan pada setiap berat sampelnya tidak berbeda nyata, hal tersebut menunjukkan *buffer* yang digunakan pada setiap penambahan berat sampel memiliki pengaruh yang sama dalam mendapatkan DNA sehingga dapat diasumsikan jumlah DNA yang terisolasi sama banyaknya. Jumlah DNA yang sama banyak membuat kinerja *buffer* seiring dengan penambahan berat akan mengalami penurunan keefektifan dalam memurnikan DNA. Menurut (Rejeki dan Sri, 2003), menyatakan jumlah DNA yang lebih sedikit dapat mengoptimalkan kerja *buffer* yang digunakan dalam proses pemurnian sehingga DNA yang didapat memiliki nilai kemurnian yang optimal.

C. Intensitas dan Berat Molekul DNA pada Gel Elektroforesi

Intensitas dan berat molekul DNA pada gel elektroforesi berfungsi untuk menunjukkan kualitas DNA. Utami dkk. (2012) dalam Sholihah (2014), menyatakan bahwa kualitas DNA dapat dikatakan baik apabila pita DNA yang dihasilkan tebal, terang, jelas dan tidak smear. Uji kualitas DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa, dengan prinsip memisahkan molekul berdasarkan muatannya dan kemudian di visualisasikan menggunakan UV-transluminator (Sholihah, 2014).

Keberadaan smear pada visualisasi DNA dengan elektroforesis dapat disebabkan oleh terputusnya ikatan antar molekul DNA pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan pada saat proses pemipetan, disentrifus, atau temperature tinggi dan waktu inkubasi yang terlalu lama (Irmawati, 2003). Hasil elektroforesis DNA Daun Tanaman Kepel disajikan pada Gambar 10.



Gambar 9. Intensitas dan berat molekul DNA Daun Tanaman Kepel pada gel elektroforesis.

Keterangan: M1 = 0,1 gram Daun Muda Merah
M2 = 0,2 gram Daun Muda Merah
M3 = 0,3 gram Daun Muda Merah
H1 = 0,1 gram Daun Muda Hijau
H2 = 0,2 gram Daun Muda Hijau
H3 = 0,3 gram Daun Muda Hijau
D1 = 0,1 gram Daun Dewasa
D2 = 0,2 gram Daun Dewasa
D3 = 0,3 gram Daun Dewasa

Berdasarkan gambar 5, menunjukkan pita DNA yang dihasilkan dalam gel elektroforesis pada perlakuan daun muda merah dengan berat 0,1gram, 0,2gram,

dan 0,3gram sangat tipis dan terdapat smear. Pada berat 0,1gram pita DNA yang terlihat lebih tebal akan tetapi smear yang dimiliki lebih banyak dari berat 0,2gram dan 0,3gram. Pita DNA tersebut memiliki kesamaan pada kemurnian, dimana berdasarkan kemurnian jenis sampel daun muda merah 0,3gram memiliki kemurnian yang lebih tinggi dari daun muda merah 0,1gram dan 0,2gram.

Pita DNA pada perlakuan daun muda hijau, terlihat lebih terang dari daun muda merah dan memiliki smear yang lebih terang. Perlakuan daun muda hijau dengan berat sampel 0,1gram menunjukkan pita DNA yang lebih terang dari daun muda hijau 0,2gram dan 0,3gram. Berdasarkan nilai kemurnian, daun muda hijau 0,1gram memiliki nilai kemurnian tertinggi dari semua perlakuan yang diuji coba sehingga diduga warna pita yang lebih terang tersebut merupakan pengaruh dari nilai kemurniannya.

Pita DNA pada perlakuan daun dewasa terlihat terang, namun kurang jelas dikarenakan smear yang terlihat pada gel elektroforesis juga cukup banyak dan terang. Perlakuan daun dewasa dengan berat 0,1gram memiliki warna smear yang cukup terang, hal ini diduga dipengaruhi oleh nilai kemurnian yang dimilikinya rendah yang dimungkinkan masih terdapat banyak sumber kontaminasi baik dari protein maupun sisa senyawa metabolik sekunder yang belum terdegradasi.