

OPTIMASI ISOLASI DNA DAUN TANAMAN KEPEL

(*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook. F. & Thomson)

Ilyas Al Akbar

Agroteknologi, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Ilyas.alakbar@yahoo.co.id

Abstrak. Keanekaragaman hayati adalah kekayaan hidup di bumi yang meliputi tumbuhan, hewan, mikroorganisme, dan genetika yang dikandungnya. Melestarikan keanekaragaman hayati melalui sumber daya genetik merupakan hal yang penting dalam mengantisipasi kepunahan dan sebagai upaya pengembangan kultivar atau ras yang unggul. Tanaman Kepel merupakan tanaman khas Yogyakarta dan memiliki kandungan yang bermanfaat untuk kesehatan. Namun, keberadaannya saat ini semakin sedikit, sehingga perlu dilakukan pelestarian melalui sumber daya genetik yaitu dengan isolasi DNA. Keberhasilan dari isolasi DNA memerlukan kosentersasi dan kemurnian yang baik, sehingga tujuan penelitian ini adalah untuk mengoptimasi isolasi DNA daun Tanaman Kepel yang ditinjau dari jenis dan berat sampel terhadap kualitas dan kuantitas DNA. Metode yang digunakan yaitu metode percobaan faktor tunggal yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan terdiri dari 9 perlakuan dengan 3 ulangan, sehingga didapatkan 27 unit percobaan. Perlakuan yang digunakan yaitu jenis sampel daun muda merah, daun muda hijau, dan daun dewasa dengan setiap jenis memiliki berat 0,1 gram, 0,2 gram, dan 0,3 gram. Hasil penelitian menunjukkan optimasi isolasi DNA daun Tanaman Kepel dengan jenis sampel daun muda merah dan berat 0,3 gram diduga menjadi perlakuan terbaik dalam menghasilkan DNA.

Kata kunci: Keanekaragaman hayati, Tanaman Kepel, isolasi DNA

Pendahuluan

Latar Belakang

Tanaman kepel (*Stelechocarpus burahol*) merupakan salah satu jenis tumbuhan yang menjadi flora identitas Indonesia khususnya Daerah Istimewa Yogyakarta serta memiliki kandungan yang bermanfaat untuk kesehatan (Tisnadjaja, dkk., 2006). Tanaman ini memiliki beberapa senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat alami. Keistimewaan kepel sebagai flora identitas Indonesia dan khasiat tanaman kepel sebagai bahan obat alami, membuat tanaman ini perlu dijaga kelestariannya. Salah satu cara pelestarian yang dapat dilakukan adalah konservasi sumber daya genetik.

Konservasi sumber daya genetik merupakan pengelolaan sumber daya alam dengan cara mengoleksi sumber daya genetik dari makhluk hidup (Yuniawan, dkk., 2014). Metode konservasi sumber daya genetik terbagi menjadi dua, salah satunya adalah metode ex situ. Metode konservasi ex situ merupakan metode konservasi spesies di luar dari populasi aslinya, dengan cara mengisolasi dari habitat yang tidak

aman dan menempatkannya di bawah perlindungan dengan tujuan mendapatkan kondisi penyimpanan yang baik untuk dapat mempertahankan plasma nutfah (Hamid, 2013). Konservasi plasma nutfah secara *ex situ* dapat dilakukan dengan berbagai cara salah satunya adalah dengan cara mengoleksi sumber daya genetik dimulai dengan isolasi DNA dari organisme tersebut.

Isolasi DNA merupakan salah satu teknik dasar dalam biologi molekuler yang berfungsi mengisolasi DNA dari makhluk hidup dan mengenali informasi genetik yang dimiliki suatu organisme. Isolasi DNA bermanfaat untuk konservasi dan menjaga dari kepunahan, serta mendapatkan plasma nutfah guna pengembangan kultivar yang lebih unggul (Lister, 2013 dalam Widyastuti, 2017). Isolasi DNA dapat dilakukan dengan menggunakan semua bagian dari makhluk hidup, namun dalam isolasi DNA terkadang sulit didapatkan hasil yang optimal dikarenakan kurang tepatnya formulasi bahan yang digunakan. Keberhasilan isolasi DNA memerlukan kuantitas dan kualitas yang tinggi untuk mendapatkan kemurnian DNA yang optimal. Tahapan yang dapat dilakukan untuk mendapatkan kuantitas dan kualitas DNA yang baik adalah dengan cara optimalisasi teknik isolasi DNA.

Optimalisasi teknik isolasi DNA dipengaruhi oleh metode isolasi yang digunakan, jenis tanaman, jenis sampel, umur sampel, jumlah sampel yang diekstrak, formulasi kimia, dan alat yang digunakan (Handyani, 2008). DNA yang optimal juga dapat dipengaruhi oleh jenis sampel yang digunakan. Penggunaan sampel yang tepat dalam isolasi DNA dapat mempengaruhi perolehan DNA yang optimal, penelitian ini dilakukan dengan memanfaatkan DNA yang terdapat pada daun kepel dengan kombinasi yang digunakan yaitu berat dan jenis sampel. Hal ini merujuk pada penelitian Yulianti (2006) yang menjelaskan, penggunaan jenis bahan dalam isolasi DNA dapat mempengaruhi konsentrasi DNA yang diperoleh; dan penelitian Handayani (2008) yang menjelaskan, jenis dan berat sampel yang digunakan dalam isolasi DNA dapat menghasilkan konsentrasi DNA yang nyata berbeda.

Tujuan

1. Menganalisis pengaruh berat dan jenis sampel (daun muda merah, daun muda hijau dan daun dewasa) terhadap kualitas dan kuantitas DNA tanaman kepel.
2. Mendapatkan formulasi berat dan jenis sampel yang tepat untuk mendapatkan kualitas dan kuantitas DNA yang baik pada Isolasi DNA daun tanaman kepel.

Metode

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, daun tanaman kepel (daun muda merah, daun muda hijau dan daun dewasa), DNA kit Wizard Genomic DNA Purification Kit A 1120 (Promega *catalogue number*: 12, 2018), alkohol 70%,

isopropanol 95%, aquades, kertas parafilm, gel agarose 1%, larutan TAE 1x, ethidium bromida 1 ug/ml, DNA loading dye 2ul, DNA marker.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikropipet + tips, microsentrifuse, mortar, pestle, *tube eppendorf* 1,5 ml, alat tulis, *freezer*, *sterofoam*, spatula/sendok logam, *waterbath*, pembuangan tips, tempat es, sarung tangan, alat elektroforesis, *UV transiluminator*, spektrofotometer merk Tecan Spark 20M (Tecan *catalogue number*: 06, 2017), timbangan analitik, *glassware*, mangkuk timbang, *microwave*, gelas ukur.

Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental menggunakan faktor tunggal yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri dari 9 perlakuan dengan 3 ulangan, sehingga terdapat 27 unit percobaan Adapun perlakuan dalam penelitian ini, yaitu:

1. 0,1 gram daun muda merah
2. 0,2 gram daun muda merah
3. 0,3 gram daun muda merah
4. 0,1 gram daun muda hijau
5. 0,2 gram daun muda hijau
6. 0,3 gram daun muda hijau
7. 0,1 gram daun dewasa
8. 0,2 gram daun dewasa
9. 0,3 gram daun dewasa

Preparasi Sampel. Persiapan sampel dilakukan dengan cara mengambil daun muda merah, daun muda hijau, dan daun dewasa tanaman kepel di wilayah Tamansari Yogyakarta. Sampel dibersihkan dengan cara dicuci dan diusap menggunakan kain bersih, dan dipotong menjadi beberapa bagian serta dipisahkan dengan bagian tulang daun menggunakan pisau, kemudian didinginkan pada suhu -20°C selama 24 jam. Sampel kemudian digerus menggunakan mortar sampai halus.

Isolasi DNA. Daun muda merah, daun muda hijau dan daun dewasa yang sudah halus ditimbang dengan variasi berat yaitu 0,1 gram; 0,2 gram dan 0,3 gram. Sampel daun kemudian dimasukkan dalam tabung eppendorf dan ditambah 600 μl larutan *Nuclei Lysis Solution*, dan dihomogenkan selama 3 menit sampai homogen. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65°C di dalam *water bath* dengan lama inkubasi yaitu 15 menit, dan dilakukan pengocokan tabung secara manual setiap 5 menit sekali supaya bahan dalam tabung eppendorf homogen..

Langkah selanjutnya ditambahkan 3 μl larutan *Rnase Solution* dan dihomogenkan kembali dengan cara membolak-balik tabung eppendorf. Campuran

yang sudah homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Sampel selanjutnya didinginkan pada suhu kamar selama 5 menit., kemudian ditambahkan 200 µl larutan *protein precipitation* dan disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit menggunakan microsentrifuge. Hasil dari sentrifugasi yaitu berupa supernatan, lalu supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL sebanyak 600 µl diikuti dengan penambahan 600 µl isopropanol dan didiamkan dalam suhu kamar selama 10 menit.

Tabung yang berisi larutan DNA dan isopropanol disentrifugasi kembali dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang sedangkan palet yang terbentuk dibilas menggunakan larutan etanol 70% sebanyak 600 µl untuk menghilangkan sisa garam. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Pelet yang telah bersih dikeringanginkan semalam. Pelet yang telah kering dilarutkan dalam 100 µl larutan DNA Rehydration. Larutan DNA stok tersebut diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. DNA stok yang sudah jadi disimpan pada suhu 4°C hingga siap digunakan.

Analisis Kuantitatif. Larutan DNA yang sudah disolasi diambil sebanyak 2 µl dan diencerkan sebanyak 100µl dengan akuades steril kemudian dimasukkan dalam kuvet dan dibaca hasil absorbansi optikal densitinya (OD) menggunakan Tecan Spark 20M pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dihitung berdasarkan hasil OD tersebut (Tecan, 2006).

Analisis Kualitatif. Agarose sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam 50 mL TAE 1X dan dipanaskan dalam microwave selama 5 menit sampai terlarut dan larutan terlihat bening. Selanjutnya didinginkan ± 1 menit untuk menghilangkan uap panas dan ditambah 10 ul ethidium bromida dan dituangkan dalam cetakan elektroforesis. Setelah padat gel direndam dalam tabung elektroforesis yang berisi TAE 1X. Sampel DNA sebanyak 5 ul dimasukkan ke dalam masing-masing well (sumuran) dan pada salah satu well dimasukkan marker DNA λ Styl. Elektroforesis dijalankan dengan menggunakan voltase 100 volt selama ±20 menit. Arus akan mengalir dari kutub negatif ke kutub positif dan DNA akan bergerak menuju kutub positif dan akan terpisah sesuai dengan ukuran molekulnya sehingga dengan menggunakan lampuUV dapat dianalisis pita DNA yang tampak dengan cara membandingkan dengan marker DNA λ Styl (Handayani, 2008).

Analisis Data. Data hasil dari variabel pengamatan disajikan dalam bentuk tabel. Hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan sidik ragam atau *analysis of variance* pada taraf α 5%. Apabila ada perbedaan nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Hasil pembacaan DNA dianalisis secara kualitatif dengan gel elektroforesis dan kuantitatif dengan Spektrofotometer.

Hasil dan Pembahasan

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/ μ l)
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

Berdasarkan Tabel 1, menunjukkan konsentrasi DNA hasil uji kuantitatif menggunakan Spektrofotometer memiliki nilai rerata konsentrasi DNA dengan kisaran 43,7 – 889,67ng/ μ l. 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/ μ l (Ningsih, dkk., 2017).

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 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.

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

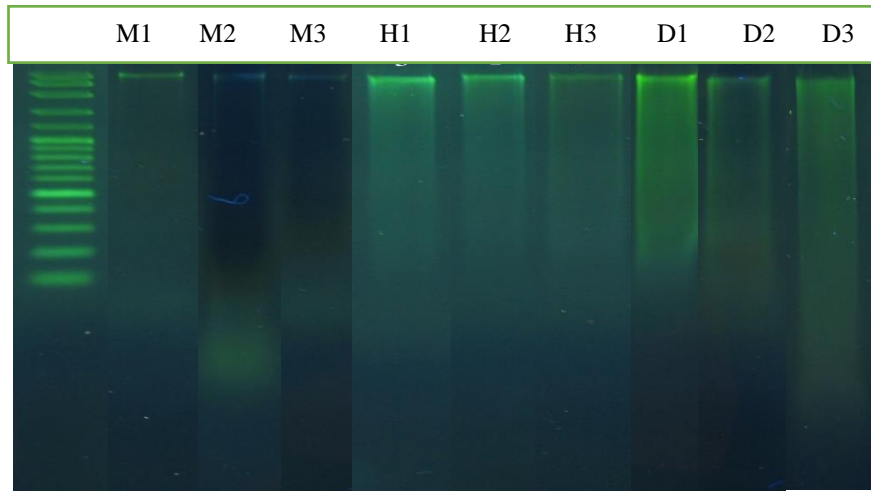
rendah juga dapat membuat *buffer* yang digunakan dapat optimal dalam mendegradasi sel dan memurnikan DNA, serta peningkatan konsentrasi pada daun muda merah diduga dapat meningkatkan nilai kemurnian DNA sampai berat 0,3gram.

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.

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 elektroforesi gel agarosa, dengan prinsip memisahkan molekul berdasarkan muatannya dan kemudian di visualisasikan menggunakan UV-transluminator (Sholihah, 2014). Keberadaan smear pada visualisasi DNA dengan elektroforesi 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 elektroforesi 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 0,1 gram 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.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

1. Penggunaan jenis dan berat sampel dalam isolasi DNA daun tanaman kepel belum menghasilkan DNA yang murni.
2. Penggunaan jenis sampel untuk isolasi DNA daun muda merah dengan berat 0,3 gram menunjukkan hasil yang diduga terbaik menghasilkan konsentrasi DNA yaitu 651,15 ng/ul dengan kemurnian DNA 1,56.

Saran

1. Perlu dilakukan purifikasi DNA lebih lanjut menggunakan isopropanol dan etanol secara berulang untuk mendapatkan kuantitas DNA dan kualitas DNA yang lebih baik.
2. Perlu dilakukan optimasi isolasi DNA menggunakan metode CTAB untuk mengetahui metode isolasi DNA daun Tanaman Kepel yang efektif sehingga bisa mendapatkan kuantitas dan kualitas yang optimal dalam isolasi DNA Tanaman Kepel.

Daftar Pustaka

- Fatchiyah, Arumingtyas Laras. E, Widyarti Sri, dan Rahayu Sri. 2012. *Biologi Molekular Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta
- Ferniah, R. S., dan Pujiyanto. 2013. Optimasi Isolasi DNA Cabai (*Capsicum annuum* L.) Berdasar Perbedaan Kualitas dan Kuantitas Daun serta Teknik Penggerusan Optimization of DNA Isolation from Different Quantity and Quality of Chili (*Capsicum annuum* L.) Leaves and Grinding Technique. *Jurnal BIOMA*, Vol 156, No. 1, Hal. 14-19.
- Handayani, E. 2008. Optimasi Macam dan Berat Sampel untuk Isolasi DNA Anggrek (*Phalaenopsis Amabilis*, L). *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian AGRUMY*.
<http://repository.umy.ac.id/bitstream/handle/123456789/1529/PNLT7635.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Hamid, A. 2013. Metode Konservasi Genetik. *Buletin KBR4* Vol.2 No. 9 Tahun 2013.

- Irmawati. 2003. Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus Generasi Pertama Pada Stok Hatchery. Thesis. Bogor: IPB.
- Ludyasari. 2014. Pengaruh Suhu Annealing Pada Program Pcr Terhadap Keberhasilan Amplifikasi Dna Udang Jari (*Metapenaeus Elegans*) Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah. *Skripsi*. UIN Malang.
- Mogea, J.P. 2001. Tumbuhan Langka Indonesia. Buletin Kebun Raya. Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi LIPI: Bogor.
http://jurnal2.krbogor.lipi.go.id/index.php/buletin/article/view/18_1_4
- Promega. 2018. Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual.
<https://www.promega.com/.../dna-purification.../genomic>.
- Sholihah, S. M. 2014. Hubungan Kekerbatan Beberapa Kultivar Pisang (*Musa* sp) untuk Sifat Ketahanan Terhadap Penyakit Berdasarkan RGA. *Skripsi*. UIN Malang.
- Tecan. 2017. Application Guide for Multimode Readers. Vol. 3 No. 6.
https://ww3.tecan.com/platform/apps/datainterface/downloadctrl.asp?odl=1&file=%2Fmandant%2Ffiles%2Fdoc%2F611%2FBR_Application_Guide_Multimode_Reader_397823%2Epdf&title=Application+Guide+for+Multimode+Readers&submissionGuid=c3638ac4-8977-4452-93da-c4c342f30533
- Tisnadaja, D., Saliman, E., Silvia, Simanjuntak,P. 2006 Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Biodiversitas Volume 7, nomor 2 hal: 199-202.
<http://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D0702/D070223.pdf>.
- Widyastuti, D. A.. 2017. Widyastuti. Isolasi DNA Kromosom Salmonella sp. dan Visualisasinya pada Elektroforesis Gel Agarosa. Seminar Nasional Risna, V. 2012. Variasi Morfologi Tanaman Kepel yang Tumbuh pada Ketinggian Berbeda. Skripsi S1. Universitas Airlangga, Surabaya.
<http://repository.unair.ac.id/25681/1/SARI%2C%20VISCA%20R.pdf>.
- Yulianti, E. 2006. Pengembangan Teknik Isolasi DNA Tumbuhan Menggunakan Detergen Komersial. SEMINAR NASIONAL MIPA 2006 Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UNY.
- Yuniawan, T., Masyruki, Alamsyah. 2014. Kajian Ekolinguistik Sikap Mahasiswa Terhadap Ungkapan Pelestarian Lingkungan Di Universitas Negeri Semarang. Indonesian Journal of Conservation, Vol. 3 No. 1 - Juni 2014 Hlm. 41—49.