

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Konsentrasi DNA

Konsentrasi DNA menunjukkan jumlah atau kandungan DNA dalam suatu larutan yang diperoleh dari proses isolasi DNA. Konsentrasi DNA yang dihasilkan pada proses ekstraksi dapat dipengaruhi oleh berat sampel yang digunakan dan lama inkubasi yang tepat untuk memecah membran dan jaringan sel secara optimal (Langga, dkk., 2012). Nilai konsentrasi DNA dapat diketahui dari konsentrasi DNA pada panjang gelombang 260 nm dikalikan dengan 50 µg/ml dan faktor pengenceran (Glasel, J. A., 1995 dalam Fathiyah, dkk., 2011).

Tabel 1. Kisaran Konsentrasi DNA Tanaman Kepel Hasil Isolasi DNA

No	Perlakuan	Kisaran (ng/µl)
1	Berat sampel 0,1g + inkubasi 15`	23,99-435,58
2	Berat sampel 0,1g + inkubasi 30`	35,92-220,92
3	Berat sampel 0,1g + inkubasi 45`	29,33-134,77
4	Berat sampel 0,2g + inkubasi 15`	128,86-159
5	Berat sampel 0,2g + inkubasi 30`	100,87-222,73
6	Berat sampel 0,2g + inkubasi 45`	129,72-174
7	Berat sampel 0,3g + inkubasi 15`	42,7-421,7
8	Berat sampel 0,3g + inkubasi 30`	60,17-437,84
9	Berat sampel 0,3g + inkubasi 45`	44,69-267,03

Tabel 2. Rerata Total Konsentrasi DNA pada beberapa Lama Inkubasi dan Berat Sampel terhadap Hasil Isolasi DNA Tanaman Kepel (ng/ μ l)

No	Perlakuan	Konsentrasi (ng/ μ l)
1	Berat sampel 0,1g + inkubasi 15`	179,19a
2	Berat sampel 0,1g + inkubasi 30`	101,53a
3	Berat sampel 0,1g + inkubasi 45`	74,88a
4	Berat sampel 0,2g + inkubasi 15`	141a
5	Berat sampel 0,2g + inkubasi 30`	151,07a
6	Berat sampel 0,2g + inkubasi 45`	149,13a
7	Berat sampel 0,3g + inkubasi 15`	219,61a
8	Berat sampel 0,3g + inkubasi 30`	237,59a
9	Berat sampel 0,3g + inkubasi 45`	125,92a

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

Berdasarkan data pada Tabel 1, menunjukkan konsentrasi DNA hasil uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer memiliki nilai konsentrasi DNA antara 23,99 ng/ μ l. Nilai rerata konsentrasi tertinggi berturut-turut terdapat pada perlakuan berat sampel 0,3 gram dengan lama inkubasi 30 menit yaitu 237,59 ng/ μ l, perlakuan berat sampel 0,3 gram dengan lama inkubasi 15 menit yaitu 219,61 ng/ μ l dan perlakuan berat sampel 0,1 gram dengan lama inkubasi 15 menit yaitu 179,2 ng/ μ l. Nilai rerata konsentrasi terendah berturut-turut terdapat pada perlakuan berat sampel 0,1 gram dengan lama inkubasi 45 menit yaitu 74,88 ng/ μ l, berat sampel 0,3 gram dengan lama inkubasi 45 menit yaitu 125,92 ng/ μ l dan berat sampel 0,2 gram dengan lama inkubasi 15 menit yaitu 141 ng/ μ l (Tabel 2).

Berdasarkan hasil uji lanjut DMRT pada Tabel 2, menunjukkan tidak terdapat beda nyata antar perlakuan terhadap konsentrasi DNA. Nilai rerata konsentrasi DNA pada perlakuan berat sampel 0,3 gram dengan lama inkubasi 30

menit menunjukkan nilai rerata yang diduga lebih baik dibandingkan dengan perlakuan lainnya yaitu 237,59 ng/μl. Hal tersebut diduga pada lama inkubasi 30 menit, DNA yang diiringi dengan penambahan jumlah sampel yang digunakan dalam proses isolasi dapat mengoptimalkan keluarnya DNA dari sel dan mendegradasi protein dari dinding sel secara optimal sehingga dapat meningkatkan nilai konsentrasi DNA yang diperoleh.

Nilai rerata konsentrasi DNA pada perlakuan berat sampel 0,1 gram dengan lama inkubasi 45 menit memiliki nilai rerata konsentrasi yang diduga lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya yaitu 74,88 ng/μl. Hasil tersebut diduga berat sampel yang lebih sedikit dan diiringi waktu inkubasi yang terlalu lama dapat menurunkan nilai konsentrasi DNA. Mubarok (2016) menyatakan apabila waktu inkubasi pada proses ekstraksi DNA terlalu lama maka dapat merusak DNA dan DNA menjadi terpotong-potong serta memiliki ukuran yang sangat kecil. DNA dengan ukuran yang sangat kecil akan lebih sedikit menyerap cahaya UV, sehingga konsentrasi DNA yang dihasilkan juga sedikit (Murtyaningsih, 2017). Selain itu, berat sampel yang digunakan dalam proses isolasi DNA juga dapat mempengaruhi konsentrasi yang akan diperoleh (Handayani, 2008).

B. Kemurnian DNA

Kemurnian suatu DNA ditunjukkan dari banyaknya jumlah DNA yang tidak terkontaminasi dalam larutan DNA sampel (Ludyasari, 2014). Perhitungan tingkat kemurnian sampel DNA dapat dilakukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Larutan DNA murni dapat menyerap sinar UV dengan optimal, sedangkan pada panjang gelombang 280 nm protein dapat

menyerap sinar UV dengan maksimal (Muladno, 2002). Kemurnian DNA dikatakan baik apabila rasio pada OD 260/280 memiliki nilai 1,8-2 dan OD 260/230 memiliki nilai 1,8- 2,2. Apabila nilai kemurnian DNA memiliki nilai kurang dari 1,8 mengindikasikan DNA terkontaminasi oleh protein atau fenol, dan apabila nilai kemurnian lebih dari 2,0 menunjukkan bahwa DNA tidak murni karena terkontaminasi oleh RNA (Fatchiyah, dkk., 2011).

Tabel 3. Rerata Tingkat Kemurnian DNA pada beberapa Lama Inkubasi dan Berat Sampel terhadap Hasil Isolasi DNA Tanaman Kepel.

No	Perlakuan	Kemurnian (ng/ μ l)
1	Berat sampel 0,1g + inkubasi 15`	1,44ab
2	Berat sampel 0,1g + inkubasi 30`	1,58a
3	Berat sampel 0,1g + inkubasi 45`	1,51a
4	Berat sampel 0,2g + inkubasi 15`	1,49ab
5	Berat sampel 0,2g + inkubasi 30`	1,48ab
6	Berat sampel 0,2g + inkubasi 45`	1,34ab
7	Berat sampel 0,3g + inkubasi 15`	1,25b
8	Berat sampel 0,3g + inkubasi 30`	1,43ab
9	Berat sampel 0,3g + inkubasi 45`	1,47ab

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

Berdasarkan hasil uji lanjut DMRT pada Tabel 3, menunjukkan tidak terdapat beda nyata antara perlakuan terhadap kemurnian DNA. Rerata kemurnian DNA hasil uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer memiliki nilai rerata yang rendah yaitu 1,25 sampai 1,58. Nilai rerata tersebut menunjukkan angka dibawah 1,8 yang mengindikasikan bahwa DNA tidak murni. Rendahnya kemurnian DNA menunjukkan DNA hasil ekstraksi masih terdapat kontaminasi berupa senyawa protein, dan senyawa sisa metabolit sekunder (Sari, 2014). Kemurnian DNA yang masih rendah dimungkinkan karena *buffer* yang digunakan kurang efektif dalam

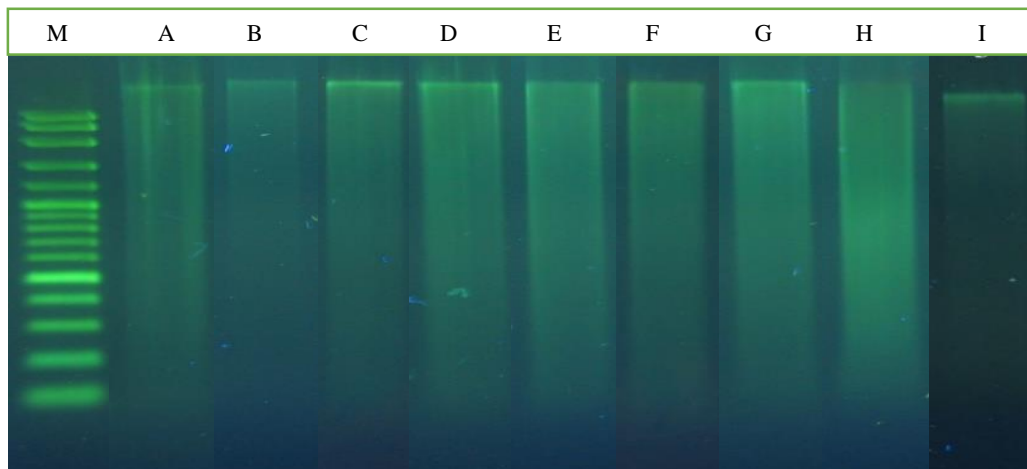
mendegradasi protein dan sisa senyawa metabolit sekunder pada tanaman kepel. Atmaja (2014) menyatakan salah satu kekurangan penggunaan DNA KIT adalah *buffer* yang tersedia hanya didesain untuk tanaman yang memiliki kadar metabolit sekunder dan polisakarida rendah. Selain itu, kontaminasi juga disebabkan oleh tidak optimalnya proses penghomogenan sampel dengan larutan *buffer*, sehingga menyebabkan adanya kontaminan yang masih menempel pada DNA. Mubarak (2016) menyatakan pada tahapan *vortex* setelah dilakukannya penambahan larutan PPS (*Protein Precipitation Solution*) harus benar-benar homogen untuk menghilangkan protein yang menempel pada DNA.

Berdasarkan Tabel 3, nilai rerata kemurnian DNA tertinggi terdapat pada perlakuan berat sampel 0,1 gram dengan lama inkubasi 30 menit yaitu 1,58. Hal tersebut menunjukkan berat sampel yang lebih sedikit dengan lama inkubasi yang optimal dapat meningkatkan nilai kemurnian suatu 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. Selain itu, lama inkubasi yang tepat dapat memaksimalkan keluarnya DNA dari sel dan mendegradasi protein dan bahan lainnya dari dinding sel secara optimal sehingga dapat menghasilkan nilai kemurnian yang cukup tinggi (Langga, dkk., 2012). Apabila DNA memiliki tingkat kemurnian yang tinggi maka dapat digunakan untuk penelitian molekuler lainnya, sedangkan DNA yang tidak murni dapat mengganggu proses penempelan primer dan menghambat aktivitas enzim polymerase DNA pada proses PCR (Hanum, dkk., 2015).

Sementara itu, nilai rerata kemurnian terendah terdapat pada perlakuan berat sampel 0,3 gram dengan lama inkubasi 15 menit. Hal tersebut menunjukkan nilai kemurnian DNA mengalami penurunan ketika konsentrasi DNA yang diekstrak semakin besar dengan lama inkubasi yang terlalu cepat, sehingga dapat diasumsikan apabila jumlah DNA yang diisolasi semakin banyak dengan lama inkubasi yang terlalu cepat dapat menurunkan kinerja *buffer* dalam mendegradasi protein atau bahan lainnya dalam memurnikan DNA.

C. Intensitas dan Berat Molekul DNA

Intensitas dan berat molekul DNA pada gel elektroforesis berfungsi untuk menunjukkan kualitas DNA. Kualitas DNA dapat dikatakan baik apabila pita DNA yang dihasilkan tebal, terang, jelas dan tidak *smear* (Utami, dkk., 2012 dalam Sholihah, 2014). Uji kualitas DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa, didasarkan pada pergerakan molekul DNA dengan muatannya di dalam medan listrik yang kemudian divisualisasikan menggunakan UV-transluminator (Sholihah, 2014). Pergerakan molekul DNA pada medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul (Titrawani, 1996). Pemisahan molekul DNA pada elektroforesis dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran berat molekul dan muatan listrik yang dikandung oleh molekul DNA (Pratiwi, 2001). Hasil elektroforesis DNA pada tanaman kepel disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Intensitas dan Berat Molekul DNA Tanaman Kepel pada Gel Elektroforesis.

Keterangan:

- A : Berat sampel 0,1 gram dengan lama inkubasi 15 menit
- B : Berat sampel 0,1 gram dengan lama inkubasi 30 menit
- C : Berat sampel 0,1 gram dengan lama inkubasi 45 menit
- D : Berat sampel 0,2 gram dengan lama inkubasi 15 menit
- E : Berat sampel 0,2 gram dengan lama inkubasi 30 menit
- F : Berat sampel 0,2 gram dengan lama inkubasi 45 menit
- G : Berat sampel 0,3 gram dengan lama inkubasi 15 menit
- H : Berat sampel 0,3 gram dengan lama inkubasi 30 menit
- I : Berat sampel 0,3 gram dengan lama inkubasi 45 menit
- M : DNA marker

Berdasarkan gambar 5, menunjukkan pita DNA yang dihasilkan dalam gel elektroforesis pada perlakuan berat sampel 0,1 gram dengan lama inkubasi 15, 30 dan 45 menit masih terdapat *smear* dengan intensitas yang lebih tipis. Pada perlakuan 0,1 gram dengan lama inkubasi 45 menit (C) diketahui memiliki pita DNA yang lebih baik karena pita DNA yang terlihat diduga lebih tebal meskipun masih terdapat *smear*. Adanya *smear* pada visualisasi DNA dengan elektroforesis menunjukkan DNA masih terkontaminasi oleh RNA. Munculnya kontaminan RNA dapat disebabkan oleh kurang maksimalnya kerja RNase pada tahap purifikasi (Murtyaningsih, 2017).

Berdasarkan gambar 5, menunjukkan pita DNA yang dihasilkan dalam gel elektroforesis pada perlakuan 0,2 gram dengan lama inkubasi 15,30 dan 45 menit cukup tebal dan masih terdapat *smear* dengan intensitas yang lebih tebal dibandingkan pada perlakuan 0,1 gram. Pada perlakuan 0,2 gram dengan lama inkubasi 15 menit (D) diketahui memiliki pita DNA yang lebih baik karena pita DNA yang terlihat diduga lebih terlihat tebal meskipun masih terdapat *smear*. Keberadaan *smear* pada visualisasi DNA dengan elektroforesis juga 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 temperatur tinggi dan waktu inkubasi yang terlalu lama (Irmawati, 2003).

Pada perlakuan berat sampel 0,3 gram dengan lama inkubasi 15, 30 dan 45 menit, menunjukkan pita DNA yang dihasilkan dalam gel elektroforesis cukup tebal dan masih terdapat *smear* (Gambar 5). Pada perlakuan 0,3 gram dengan lama inkubasi 45 menit (I) diketahui memiliki pita DNA yang lebih baik karena pita DNA yang terlihat cukup tebal meskipun masih terdapat *smear*, namun *smear* pada perlakuan ini lebih tipis. Hal ini menunjukkan, DNA total yang diekstrak dalam keadaan utuh dan memiliki konsentrasi dan kemurnian yang cukup tinggi. Menurut Irmawati (2003), menyatakan bahwa pita DNA yang tebal, terang, jelas dan mengumpul (tidak menyebar) merupakan pita DNA yang memiliki konsentrasi tinggi dan DNA total dalam keadaan utuh.