

Isolasi DNA Tumbuhan Hasil Eksplorasi di Nusakambangan dengan Metode Kit di Laboratorium Treub, Kebun Raya Bogor

DEVI OCTAVIA¹, ARNIA SARI MUKAROMAH¹, IRFAN MARTIANSYAH^{2*}, MIMIN², S MA'MUN², HERMAN RUKMANTO²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Walisongo Semarang
Jl. Prof. Hamka Semarang, Indonesia. 50185

Email: octaviadevi372@gmail.com; arniasm@walisongo.ac.id

²Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya-LIPI

Jl. Ir. H. Juanda No.13 Bogor, Indonesia. 16122

*Email: imartiansyah6311@gmail.com

ABSTRACT

Genetic conservation is an act to preserve, record, and archive specimens, particularly in a living collection, herbarium, seed, and DNA genome. A molecular approach is an alternative in conserving genetic, and it is commonly achieved by isolating a particular organ to obtain genetic material. The purpose of writing this article is to describe the DNA isolation results of several samples from Nusakambangan Island contained in Treub Laboratory, Bogor Botanic Garden. The method of DNA isolation is carried out using two plant DNA kits based on the standard protocol in each kit. The results of DNA isolation from 32 samples showed that the DNA band appears to represent the genetic conservation progress. In the beginning, from 29 samples that DNA isolation using Kit#1, only 1 sample was appeared the DNA band. Later on, the other five samples were successfully isolated using Kit#2. In the end, from 32 samples isolated, 13 samples performed band and 19 samples (does not appear bands) with the various density of DNA concentration. It is assumed some of a technical error of handling in the laboratory processes.

Keywords: DNA kit; Nusakambangan Island; plant DNA isolation

INTISARI

Konservasi genetik merupakan suatu tindakan untuk menjaga, mendokumentasikan dan mengarsipkan spesimen tertentu dalam bentuk koleksi hidup maupun koleksi genom. Pendekatan molekuler sebagai alternatif dalam konservasi genetik, umumnya dilakukan dengan mengisolasi organ tertentu hingga diperoleh materi genetiknya. Tujuan penulisan artikel ini adalah untuk melaporkan hasil isolasi DNA dari beberapa sampel tumbuhan yang terdapat di Laboratorium Treub, Kebun Raya Bogor. Isolasi DNA mendukung metode konservasi genetik dari koleksi herbarium dan Bank Biji di Kebun Raya Bogor yang sudah ada sebelumnya. Metode isolasi DNA yang dilakukan berbasis pada penggunaan 2 kit DNA khusus untuk tumbuhan dengan protokol baku pada masing-masing kit. Adapun hasil isolasi DNA dari 32 sampel menunjukkan bahwa pita DNA yang muncul menjadi tanda dari keberhasilan konservasi genetik secara molekuler. Dari 29 yang diisolasi menggunakan Kit #1. Hanya 1 sampel yang muncul pita DNA. Kemudian 5 sampel lainnya berhasil terisolasi menggunakan Kit #2. Dari 32 sampel yang diisolasi, 13 sampel muncul pita dan 19 (tidak muncul pita) dengan variasi konsentrasi DNA. Hal tersebut diasumsikan beberapa kesalahan teknis penanganan dalam proses laboratorium.

Kata kunci: isolasi DNA tumbuhan; kit DNA; Pulau Nusakambangan

PENDAHULUAN

Isolasi DNA merupakan pemisahan molekul DNA dari komponen sel. Isolasi DNA mempunyai dua prinsip, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Gaya sentrifugasi dan perbedaan berat molekul menjadi prinsip kerja dari sentrifugasi, sedangkan pengendapan DNA agar terpisah dari zat lain yang berada dalam sel menjadi prinsip kerja dari presipitasi. Tahapan

isolasi DNA secara umum yaitu sentrifugasi, inkubasi, presipitasi, elusi, pencucian, dan pengeringan (Wahyuni, 2011).

Metode isolasi DNA dapat dilakukan menggunakan kit maupun konvensional. Metode konvensional/manual memerlukan persiapan alat dan bahan yang relatif rumit dan lama dengan hasil isolasi tergantung jenis sampel. Sedangkan kelebihanannya relatif murah.

Sementara itu isolasi DNA menggunakan kit lebih praktis karena dalam satu paket kit terdapat larutan isolasi yang siap pakai sehingga menghemat waktu kerja namun harganya relatif lebih mahal (Sari *et al.*, 2014). Kit pemurnian DNA universal untuk keperluan isolasi dinilai lebih cepat, sederhana dan efektif dibandingkan dengan metode isolasi konvensional. Hasil pemurnian DNA oleh kit seperti Kit #2. lebih berkualitas tinggi sehingga berfungsi dengan baik sebagai template untuk pencernaan enzim restriksi, analisis PCR, sekuensing, keperluan *Gen Bank*, DNA genom, ligasi DNA dan prosedur transformasi (Universal DNA purification kit handbook, 2021).

Kit #1 juga diformulasikan untuk menghasilkan pemurnian DNA genom yang berkualitas dari berbagai spesies tanaman dan jenis jaringan. Kit #1 menggunakan teknologi membran berbasis silika dalam bentuk *spin column* dengan hasil DNA yang bervariasi antara spesies jaringan yang tergantung pada ukuran genom, ploidi, jumlah sel, dan usia sampel jaringan. Mini kit pemurnian DNA genomik tanaman memenuhi syarat dengan mengisolasi DNA genomik dari 100 mg jaringan tanaman mengikuti protokol yang diuraikan seperti metode isolasi manual. DNA yang dimurnikan memiliki rasio A260/280 antara 1,7 dan 1,9. Satu pita DNA memiliki panjang ≥ 30 kb yang diamati setelah elektroforesis gel agarosa dan pewarna (Thermo scientific GeneJet plant genomic DNA purification mini kit handbook, 2016).

Di Kebun Raya Bogor sendiri koleksi berbasis DNA genomik bertujuan untuk melengkapi herbarium dan Bank Biji sebagai tempat penyimpanan plasma nutfah dan sumber daya genetik tumbuhan. Keberadaan bank DNA atau *Gene bank* tidak bertujuan untuk mengembalikan populasi tumbuhan yang telah mengalami kepunahan, tetapi berpotensi meningkatkan peluang konservasi sumber daya genetik yang masih berkembang saat ini (De Vicente 2006; Hodkinson *et al.*, 2007; Martiansyah., 2020).

Konservasi genetik memerlukan strategi yang cepat dan tepat. Salah satunya dengan

mengoleksi bahan genetik dan sampel jaringan dari tumbuhan hasil eksplorasi di berbagai lokasi dengan mengacu pada prosedur pengelolaan berbasis bank DNA. Oleh karena itu tujuan kegiatan dan penulisan artikel ini adalah untuk melaporkan hasil isolasi DNA dari beberapa sampel tumbuhan yang terdapat hasil eksplorasi di Pulau Nusakambangan yang tersimpan di Laboratorium Treub, Kebun Raya Bogor. Metode isolasi DNA yang dilakukan berbasis pada penggunaan dua kit DNA (Kit #1 dan Kit#2) khusus untuk tumbuhan dengan protokol standar pada masing-masing kit.

Cagar Alam (CA) Nusakambangan Barat merupakan kawasan Cagar Alam berdasarkan SK Penunjukan Menteri Kehutanan No. SK.359/Menhut-II/2004 dengan luas mencapai 656,06 ha pada tahun 2009. Kawasan konservasi ini memiliki tipe ekosistem hutan hujan tropis dataran rendah (*Tropical Lowland Evergreen Rains Forest*) dengan suhu berkisar 27-34°C dan curah hujan rata-rata 3.375-3.720 mm/tahun dengan karakteristik tanah latosol aluvial. CA Nusakambangan Barat memiliki potensi flora yang sangat beragam seperti plalar (*Dipterocarpus littoralis*), pulai (*Alstonia scholaris*), sempu (*Dillenia obovata*), tanaman benda (*Antrocarpus elastica*) dan fauna endemik yang sekaligus menjadikan kawasan ini sebagai potensi pelestarian plasma nutfah (BKSDA Jateng, 2021).

METODE PENELITIAN

Dalam penelitian ini menggunakan metode isolasi DNA mengikuti protokol standar dari dua kit yang berbeda yaitu Kit#1 GeneJet (Thermo) dan kit#2 Tiangen. Secara umum, kegiatan isolasi DNA ini meliputi empat tahapan utama, yaitu: (1) Penggerusan sampel; (2) Ekstraksi DNA; (3) Amplifikasi PCR dengan suatu primer tertentu; dan (4) Elektroforesis dengan gel agarosa 1%.

1. Penggerusan Sampel

Sampel daun dipotong kecil dan ditambahkan pasir silika sebanyak 1-2 sendok spatula lalu digerus sampai halus menggunakan mortar dan pistil. Sampel yang sudah halus dimasukkan dalam tabung mikro 1,5 ml dan 2,0 ml kemudian diberi label. Jumlah dan nama

spesies sampel yang digerus terlampir pada
Tabel 1.

Tabel 1. Sampel tumbuhan hasil eksplorasi di Pulau Nusakambangan

Nomor Koleksi	Nama	Suku	Nama Lokal	Asal Sampel
IM004	<i>Hibiscus tiliaceus</i> L.	Malvaceae	Waru Laut	Kali Jati
IM005	<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb.	Goodenaceae	Gabusan	Batar Panjang
IM006	<i>Guettarda speciosa</i> L.	Rubiaceae	Jati Pasir	Batar Panjang
IM007	<i>Premna serratifolia</i> L.	Verbenaceae	Kayu Pahang	Batar Panjang
IM008	<i>Leea indica</i> (Burm.f) Merr.	Vitaceae	Girang	Batar Panjang
IM009	<i>Xylocarpus granatum</i> K.D Koenig.	Meliaceae	Nyirih	Batar Panjang
IM010	<i>Mallotus philippensis</i> (Lam). Muell.Arg.	Euphorbiaceae	Kapasan	Kali Jati
IM011	<i>Ziziphus</i> sp.	Rhamnaceae	-	Kali Jati
IM012	<i>Vitex pinnata</i> L.	Lamiaceae	Laban	Kali Jati
IM013	<i>Dillenia obovata</i> (Jack) Gilg.	Dilleniaceae	Garaaq	Kali Jati
IM014	<i>Ficus variegata</i> Blume.	Moraceae	Gondang	Kali Jati
IM015	<i>Diospyros macrophylla</i> (Desr) Kostel.	Ebenaceae	Culiket	Kali Jati
IM018	<i>Ardisia</i> sp.	Loganiaceae	-	Kali Jati
IM019	<i>Excoecaria agalocha</i> L.	Euphorbiaceae	Buta-buta	Kali Jati
IM020	<i>Ficus hirta</i> Vahl.	Moraceae	Gegedangan	CA Nusakambangan Barat
IM021	<i>Antidesma stipulare</i> Blume.	Phyllanthaceae	Buni-buni	CA Nusakambangan Barat
IM022	<i>Antidesma montanum</i> Blume.	Phyllanthaceae	Ki Seueur Badak	CA Nusakambangan Barat
IM023	<i>Canarium vrieseanum</i> Engl.	Burseraceae	Sido	CA Nusakambangan Barat
IM024	<i>Willughbeia coriacea</i> Wall.	Apocynaceae	Tenguhan	CA Nusakambangan Barat
IM026	<i>Mucuna gigantea</i> (Willd.) DC.	Leguminosae	Kacangan	CA Nusakambangan Barat
IM027	<i>Mallotus rufidulus</i> (Miq.) Müll.Arg.	Euphorbiaceae	Balek Angin	CA Nusakambangan Barat
IM028	<i>Croton</i> sp.	Euphorbiaceae		CA Nusakambangan Barat
IM029	<i>Baccaurea javanica</i> (Blume) Müll.Arg.	Euphorbiaceae	Rambai	CA Nusakambangan Barat
IM030	<i>Ficus hispida</i> L.f.	Moraceae	Luwingan	CA Nusakambangan Barat
IM031	<i>Ficus racemosa</i> L.	Moraceae	Loa	CA Nusakambangan Barat
IM032	<i>Mappania</i> sp.	Cyperaceae	-	CA Nusakambangan Barat
IM033	<i>Clausena excavata</i> Burm.f	Rutaceae	Tikusan	CA Nusakambangan Barat
IM034	<i>Knema cinerea</i> (poir) Warb.	Myristicaceae	Dara-dara	CA Nusakambangan Barat
IM035	<i>Syzygium polyanthum</i> (Wight) Walpers	Myrtaceae	Salam	Batar Panjang
IM036	<i>Commersonia batramia</i> (L.) Merr.	Malvaceae	Bulu Semak	Batar Panjang
IM037	<i>Kleinhovia hospita</i> L.	Sterculiaceae	Paliasa	CA Nusakambangan Barat
IM038	<i>Kadsura</i> sp.	Schysandraceae	-	CA Nusakambangan Barat

Sumber: Diolah dari sumber primer

2. Ekstraksi DNA

a. Protokol Isolasi Kit#1 GeneJet

Sampel dimasukkan dalam tabung mikro (1,5 ml). ditambahkan *lysis buffer A* (350 μ l) kemudian vortex hingga homogen. *Lysis buffer B* (50 μ l) dan *RNAase* (20 μ l) ditambahkan kemudian vortex kembali. Tabung mikro diinkubasi dalam *heatblock* (20 menit, suhu 65°C) dan *invert* tiap 5 menit. Larutan *presipitation solution* ditambahkan (130 μ l) kemudian *invert* dan inkubasi dalam kulkas (5 menit). Sampel disentrifugasi (7 menit, dengan kecepatan 13.000 rpm). larutan *binding solution* ditambahkan (400 μ l) kemudian disentrifugasi. Supernatan diambil (450 μ l) dan dicampurkan ke tabung mikro tersebut. Etanol ditambahkan (400 μ l) kemudian *invert*. Diambil 600 μ l dan pindahkan dalam filter *spin column*. Sentrifugasi (1 menit, kecepatan 8 rpm). Kemudian cairan di bawah *spin column* dibuang. Sisa cairan dalam tabung mikro sebelumnya (600 μ l) ditambahkan kembali lalu disentrifugasi ulang. Buang cairan dibawah tabung *spin column*. *wash buffer 1* (500 μ l) ditambahkan kemudian disentrifugasi (1 menit, kecepatan 10.000). Cairan di bawah tabung *spin column* dibuang. Ditambahkan *wash buffer II* (500 μ l) kemudian disentrifugasi ulang (4 menit, kecepatan 13.000 rpm). Filter *spin column* dimasukkan dalam tabung mikro baru (ukuran 1,5 ml). *elution buffer* ditambahkan (100 μ l) dan diinkubasi (5 menit, suhu ruang). Lalu disentrifugasi ulang (1 menit, kecepatan 10.000 rpm).

b. Protokol Isolasi Kit#2 Tiangen

Hasil gerusan sampel dimasukkan dalam tabung mikro (0,5 ml) kemudian diberi larutan *buffer GP1* (700 μ l). Vortex dan inkubasi 20 menit dalam *heatblock* dengan suhu 65°C (tiap 5 menit *diinvert*). Ditambahkan kloroform (700 μ l) kemudian *invert* dan sentrifugasi (5 menit, kecepatan 12.000 rpm). Supernatan (700 μ l) dipindahkan ke tabung mikro baru (2 ml). *Buffer GP 2* ditambahkan (700 μ l) kemudian *invert*. Isolat dimasukkan dalam tabung *spin column* dari kit #2. Diambil 700 μ l kemudian disentrifugasi (30 detik, kecepatan 12.000). larutan di bawah *spin column* dibuang. Sisa dari

tabung mikro sebelumnya (700 μ l) diambil lalu ditambahkan *buffer GD* (500 μ l). Sentrifugasi (30 detik, kecepatan 12.000 rpm). Larutan di bawah tabung *spin column* dibuang. *Buffer PW* (700 μ l) ditambahkan kemudian disentrifugasi ulang (30 detik, kecepatan 12.000 rpm). Tambahkan kembali *buffer PW* (500 μ l) lalu disentrifugasi ulang (2,5 menit, kecepatan 12.000 rpm). Larutan di bawah *spin column* dibuang. *Buffer TE* (100 μ l) ditambahkan kemudian inkubasi (5 menit, suhu ruang). Disentrifugasi kembali selama 2 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.

3. Amplifikasi PCR dengan primer tertentu (*rbcL* atau ITS)

Tabung mikro 1,5 ml dan tabung mikro khusus PCR disiapkan. Beri label tulisan pada bagian tutup atau badan tabung. larutan PCR mix dibuat dengan komposisi primer *rbcL reverse* 1 μ l dan *forward* 1 μ l, 3 μ l ddH₂O, dan 6 μ l *my taq*. Komposisi PCR tersebut *mix* dibuat dengan mengalikan jumlah tiap sampel dengan dilebihkan 2 ml. Total larutan PCR mix dalam tabung mikro 1,5 ml tersebut dibagi dengan jumlah sampel. 2 μ l DNA sampel ditambahkan dalam tabung mikro (ukuran PCR) kemudian PCR *mix* ditambahkan. *Spin down* hingga homogen. Susun dalam mesin *Thermal cycler*. Suhu *annealing* untuk *rbcL* adalah 53°C dan ITS adalah 58°C. Jumlah siklus dalam PCR adalah sebanyak 35 siklus.

4. Elektroforesis

Gel agarosa 1% dibuat dengan menimbang 0,8 gr agarosa + TAE 1x 80 ml yang dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer lalu ditutup aluminium foil dan dididihkan selama 2 menit. Setelah diangkat, larutan gel agarosa ditambah dengan 1 μ l *gel red* dan diaduk hingga homogen. Larutan gel dituangkan dalam cetakan. Setelah padat, gel dimasukkan dalam alat elektroforesis yang berisi larutan *buffer*. Masukkan sampel DNA hasil PCR kedalam sumuran gel sebanyak 5 μ l. Nyalakan alat elektroforesis dengan 100 volt selama 30 menit. Pita-pita yang terbentuk kemudian dilihat menggunakan *gen analyzer*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil kegiatan isolasi DNA sampel tumbuhan dari Pulau Nusakambangan berhasil dilakukan dengan cukup baik menggunakan

kedua kit DNA. Jumlah sampel yang berhasil diekstraksi DNA nya adalah sebanyak 13 sampel dari total seluruh sampel 32 sampel.

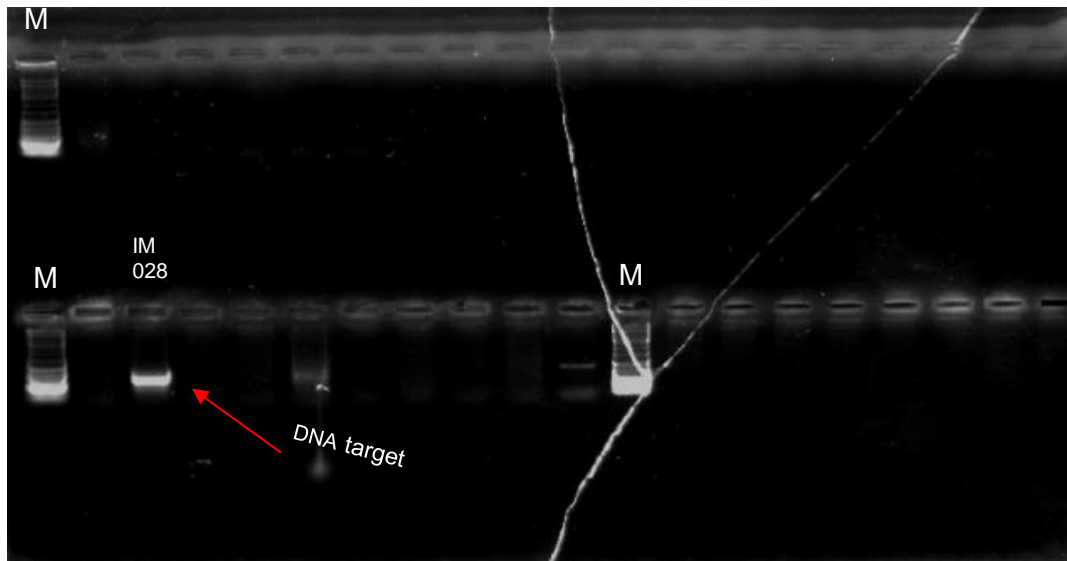
Tabel 2. Spesies tumbuhan yang diisolasi

NO	Nomor Koleksi	Nama	Kit #1.	Kit #2.	Keterangan
1.	IM004	<i>Hibiscus tiliaceus</i> L.	√		Diduga ada polisakarida
2.	IM005	<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb.	√		
3.	IM006	<i>Guettarda speciosa</i> L.	√		
4.	IM007	<i>Premna serratifolia</i> L.	√		Diduga ada polisakarida
5.	IM008	<i>Leea indica</i> (Burm.f) Merr.	√	√	
6.	IM009	<i>Xylocarpus granatum</i> K.D Koenig.	√		Diduga ada polisakarida
7.	IM010	<i>Mallotus philippensis</i> (Lam). Muell.Arg.	√		
8.	IM011	<i>Ziziphus</i> sp.	√	√	
9.	IM012	<i>Vitex pinnata</i> L.	√		
10.	IM013	<i>Dillenia obovata</i> (Jack) Gilg.	√		
11.	IM014	<i>Ficus variegata</i> Blume.	√		
12.	IM015	<i>Diospyros macrophylla</i> (Desr) Kostel.	√		
13.	IM018	<i>Ardisia</i> sp.		√	
14.	IM019	<i>Excoecaria agalocha</i> L.	√		
15.	IM020	<i>Ficus hirta</i> Vahl.	√		
16.	IM021	<i>Antidesma stipulare</i> Blume.	√		
17.	IM022	<i>Antidesma montanum</i> Blume.	√		
18.	IM023	<i>Canarium vrieseanum</i> Engl.	√	√	
19.	IM024	<i>Willughbeia coriacea</i> Wall.	√		
20.	IM025	<i>Canarium</i> sp.		√	
21.	IM026	<i>Mucuna gigantea</i> (Willd.) DC.	√		
22.	IM027	<i>Mallotus rufidulus</i> (Miq.) Müll.Arg.		√	
23.	IM028	<i>Croton</i> sp.	√		
24.	IM029	<i>Baccaurea javanica</i> (Blume) Müll.Arg.	√	√	Diduga ada polisakarida
25.	IM030	<i>Ficus hispida</i> L.f.	√		
26.	IM031	<i>Ficus racemosa</i> L.	√		
27.	IM032	<i>Mappania</i> sp.	√		
28.	IM033	<i>Clausena excavata</i> Burm.f	√		
29.	IM034	<i>Knema cinerea</i> (poir) Warb.	√		
30.	IM035	<i>Syzygium polyanthum</i> (Wight) Walpers		√	
31.	IM036	<i>Commersonia batramia</i> (L.) Merr.	√		Diduga ada polisakarida
32.	IM037	* <i>Kleinhovia hospita</i> L.			
33.	IM038	<i>Kadsura</i> sp.	√	√	

Keterangan: *belum diisolasi

Dua puluh Sembilan (29) sampel yang diisolasi menggunakan Kit #1 menunjukkan bahwa Kit #1 kurang baik digunakan dibandingkan Kit#2. Kit #1 hanya berhasil memvisualisasi 1 pita DNA dengan kode sampel IM 028 (*Croton* sp.). Pita DNA yang

tidak muncul diasumsikan karena adanya kesalahan teknis pada saat isolasi dimana jumlah sampel yang digunakan terlalu banyak sehingga larutan buffer pada Kit#1 tidak optimal dalam mendegradasi dinding sel daun.



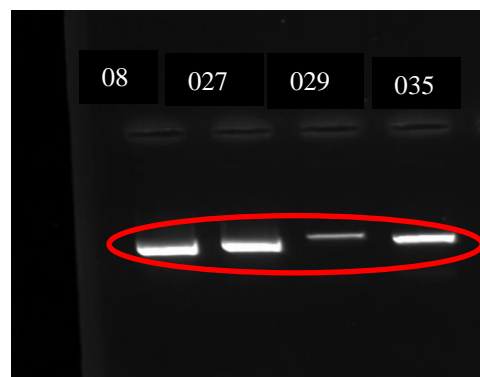
Gambar 1: Visualisasi *gel doc* dari 29 sampel menggunakan Kit#1 dengan panjang pita DNA 500 bp pada sampel *Croton* sp.

Lima (5) sampel yang diisolasi menggunakan Kit #2 primer *rbcL* suhu 52°C berhasil memvisualisasi 4 sampel namun hasilnya tampak debris (Gambar 2.). Sedangkan setelah diuji menggunakan primer *rbcL* suhu 55°C hasilnya lebih baik dan murni meskipun ketebalan pita tidak diketahui

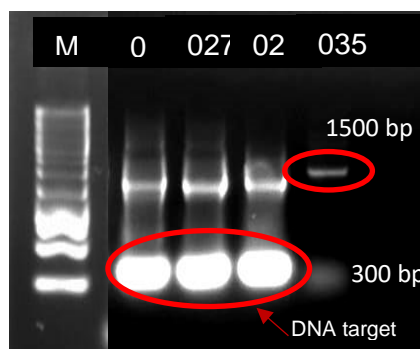
(Gambar 3.). Berbeda dengan *rbcL*, hasil visualisasi pita dengan primer ITS suhu 58°C tampak pita yang cukup tebal (Gambar 4.). Tebalnya pita DNA dapat disebabkan oleh tingginya konsentrasi DNA, fragment DNA yang mengumpul, tidak menyebar dan utuh pada saat diekstraksi (Harahap, 2017).



Gambar 2: Visualisasi pita DNA menggunakan primer *rbcL* suhu 52°C Kit #2



Gambar 3: Visualisasi pita DNA menggunakan Kit #2 primer *rbcL* suhu 55°C



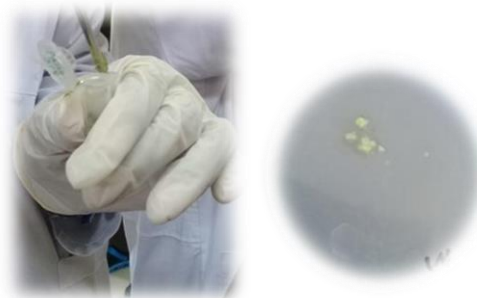
Gambar 4: Visualisasi pita DNA menggunakan Primer ITS suhu 58°C

Sebagian besar faktor ketidakhadiran fragmen DNA disebabkan oleh kesalahan teknis saat isolasi, adanya senyawa pengotor isolasi, dan ketidaksesuaian suhu *annealing* saat PCR. Variasi suhu dan waktu *annealing* saling berkorelasi dengan tebal tipisnya pita DNA yang terbentuk akibat kualitas DNA hasil isolasi sehingga apabila DNA *template* tidak murni atau banyak terdapat kontaminan maka akan mengganggu penempelan primer pada siklusnya yang menghambat aktivitas enzim *polymerase*. Sementara itu untuk mengukur tingkat kemurnian DNA dapat dilakukan dengan spektrofotometer Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Konsentrasi DNA yang diharapkan untuk dikoleksi di Bank DNA sebesar 100-250 ng ml⁻¹ dengan kemurnian berada pada rentang 1,8-2,0 pada rasio A260/280 (Hodkinson *et al.*, 2007).

Kit#2 menunjukkan hasil yang lebih baik daripada Kit#1 yang dibuktikan dengan munculnya pita DNA dari 12 sampel (Gambar 2; 3; dan 4). DNA hasil isolasi Kit #2 memiliki kualitas tinggi dan berfungsi dengan baik sebagai *template* pada saat amplifikasi PCR. Sementara itu Kit#1 hanya berhasil memvisualisasi 1 sampel yang menunjukkan bahwa Kit #2 lebih disarankan digunakan untuk isolasi DNA. Sehingga dari kegiatan isolasi ini diperoleh 13 sampel berhasil tervisualisasi menggunakan Kit#1 dan Kit#2.

Kit #1 terdiri dari beberapa reagen yang berfungsi memisahkan komponen sel dalam jaringan tumbuhan. Jenis reagen yang terdapat dalam Kit #1 diantaranya *lysis buffer A*, *lysis*

buffer B, *presipitation solution*, *binding solution* dan *washing buffer*. *Lysis buffer A* dan *B* berperan dalam proses penghancuran sel dan pemisahan protein. *Presipitation solution* membantu memisahkan protein dan polisakarida, *binding solution* membantu mengikat DNA, sedangkan *washing buffer* berfungsi untuk memurnikan DNA. Namun kelima reagen dalam Kit#1 tersebut belum dapat mengisolasi secara sempurna sehingga pada beberapa sampel (IM 004, IM 007, IM 009, IM 029, IM 036) masih ditemukan senyawa berbentuk gumpalan berwarna kekuningan yang merupakan senyawa polisakarida (Gambar 5.). Polisakarida dan metabolit sekunder disinyalir menjadi penyebab tidak tidak munculnya pita DNA saat visualisasi. Senyawa polisakarida biasanya ditemukan sebagai gumpalan, sedangkan metabolit sekunder ditemukan dalam bentuk minyak maupun warna khas dari masing-masing metabolit sekunder (Syafaruddin, 2011). Metabolit sekunder seperti fenol, tannin, pigmen, alkaloid, dan flavonoid, dapat mengganggu penempelan primer saat amplifikasi PCR. Selain itu komponen pengotor lain seperti RNA, dan lipid juga memengaruhi kualitas kemurnian DNA (Alaey *et al.*, 2005; *Setiaputri et al.*, 2020). Teknis penanganan saat ditemukan polisakarida saat isolasi dapat dilakukan dengan mengambil zat pengotor menggunakan pinset (apabila berbentuk gumpalan) atau pipet (apabila berbentuk cair) kemudian vortex ulang hingga sampel kembali homogen dan bersih dari kontaminan.



Gambar 5. Gumpalan yang diduga polisakarida pada sampel IM 004, IM 007, IM 009, IM 029 dan IM 036

Kandungan senyawa metabolit sekunder dalam sel tanaman berbeda-beda sehingga membutuhkan prosedur isolasi yang optimal agar diperoleh DNA genom yang dapat digunakan sebagai bahan analisis molekuler salah satunya dalam analisis kergaman genetik seperti eksplorasi tumbuhan untuk keperluan *data base* bank DNA. Upaya optimasi prosedur tersebut dapat dilakukan terhadap komposisi larutan *lysis buffer* ataupun teknik penanganan fisik dalam pemisahan DNA genom dari senyawa lain sehingga dapat melindungi DNA genom dari degradasi akibat senyawa metabolit sekunder yang dilepaskan ketika lisis sel akibat penanganan isolasi (Restu *et al.*, 2012). Pada dasarnya beberapa faktor penentu keberhasilan dalam ekstraksi dan purifikasi DNA secara optimal dipengaruhi oleh penghomogenan jaringan tanaman, komposisi penambahan larutan *buffer* pada saat penggerusan daun/jaringan tanaman sampel, dan penghilangan enzim penghambat polisakarida khususnya untuk tanaman tahunan (Syafaruddin & Santoso, 2011).

Proses isolasi menjadi kunci tingkat kemurnian dan keberhasilan visualisasi pita DNA. Kualitas isolasi DNA dikatakan kurang baik apabila komponen pengotor (protein) tidak terdegradasi secara sempurna saat isolasi sehingga tercampur dengan DNA target dan adanya kontaminasi protein yang berasal dari komponen sel yang tidak lisis atau dari larutan fenol yang ditambahkan saat isolasi (untuk presipitasi DNA) (Bellard *et al.*, 1973).

Beberapa teknik yang kemungkinan mengakibatkan terjadinya kontaminasi diantaranya yaitu kesalahan teknik pengambilan supernatan yang kurang teliti dan hati-hati sehingga substansi yang tidak selain DNA ikut terambil, Proses digesti (pemotongan fragmen DNA) yang mungkin tidak sempurna karena selama inkubasi sampel tersebut tidak digoyang sehingga pada saat pengambilan fenol sebagian protein tidak ikut terikat dan tetap berikatan dengan DNA dalam sampel (Ramlah, 2015; Ratnasari & Faridah, 2019).

KESIMPULAN

Isolasi DNA hasil eksplorasi di Pulau Nusakambangan telah berhasil dilakukan dengan cukup baik. Dari seluruh sampel yang di isolasi, hanya sebanyak 13 sampel yang berhasil diekstraksi DNANYA. Hal tersebut ditunjukkan dengan munculnya pita DNA hasil amplifikasi PCR menggunakan primer universal tumbuhan (*rbcL*) pada gel agarosa 1%. Dari hasil pengujian beberapa sampel, penggunaan kit #2. dinilai lebih baik daripada kit #1. yang diketahui dari tingkat keberhasilan pada saat isolasi (pita DNA yang muncul). Adapun pita DNA yang muncul menjadi tanda dari keberhasilan konservasi genetik secara pendekatan molekuler. Upaya konservasi genetik dengan isolasi DNA ini mendukung metode konservasi genetik dari koleksi herbarium dan Bank Biji di Kebun Raya Bogor.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dian Latifah, Pak Agus Susilo, Pak Rohim, Mas Adit, Mas Hariri, Ramdani, Akbar, Rifqi, Risqi dan Kepala Seksi dan Staf Konservasi Wilayah II Cilacap serta Masyarakat Mitra Polhut Pulau Nusakambangan atas bantuannya untuk kegiatan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alaey, M., Naderi, R., Verzaei, A., Khaligi, A., Salami A. 2005. Comparing study between four different methods of genomic DNA extraction from *Cylamen persicum* Mill. *International Journal of Agriculture and Biology*. vol. 7(6): 882-884.
- Bellard, M.G., Outdet, P., Chambon, P. 1973. Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*. vol. 36 (1): 32-38.
- BKSDA Jawa Tengah. 2021. Kawasan Konservasi. <http://36.67.9.26/home/Cagar-Alam-Nusakambangan-Barat.html> diakses pada 20 September 2021 pukul 12:49 WIB.
- De Vicente M.C. (2006). *DNA Banks: Providing Novel Option for Genebank*. Biodiversity International
- Harahap, A. S. 2018. Uji kualitas dan kuantitas DNA beberapa populasi pohon kapur Sumatera. *Jasa Padi*. vol. 2(02): 1-6.
- Hodkinson T.R., S, Waldren., J.A. Parnell., C.T. Kelleher., K. Salamin., N. Salamin. 2007. DNA banking for plant breeding, biotechnology and

- biodiversity evaluation. *Journal of Plant Research*. vol. 120(1): 17-29.
- Martiansyah, I., Robiansyah, I., & Latifah D. 2020. Konservasi ex situ tumbuhan terancam kepunahan Indonesia berbasis bank DNA koleksi Kebun Raya Bogor. *Proposal in-House Research*. LIPI
- Ramlah. 2015. Keragaman Genetik Plasma Nutfah Jagung Lokal Tanah Toraja Berbasis SSR (*Simple Sequence Repeats*). [Skripsi] Makassar: Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin.
- Ratnasari, A.Y., & Faridah, N. I. 2019. Optimasi Metode Isolasi DNA sampel FTA CARDS menggunakan Kit Purelink® Genomic DNA dan Chelex-100. [Disertasi]. Yogyakarta: Universitas Ahmad Dahlan.
- Restu, M, Mukrimin & Gusmiaty. 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*. vol. 14(2): 138-142.
- Sari, S. K., Listyorini, D., Mazieda, M. N., & Sulasmi, E. S. 2014. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA pada daun cabai rawit (*Capsicum frutescens* cv. Cakra Hijau) menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Plant) GENE AID. *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Environmental, and Learning*. vol. 11(1): 65-70.
- Setiaputri, A.A., Barokah, Giri. R., Sahaba, A.B., Arbajayanti, R.D., Fabella, N., Pertiwi, R.M., Nuruilma, M., Nugraha, R., & Abdulla, A. 2020. Perbandingan isolasi DNA pada produk perikanan segar dan olahan. *JPHPI*. vol. 23(1): 447-458.
- Syafaruddin, S., Randriani, E., & Santoso, T.J. 2011. Effectiveness and efficiency of DNA isolation and purification techniques in cashews. *Journal of Industrial and Beverage Crops*. vol. 2(2): 151-160.
- Syafaruddin, S., & Santoso, T.J. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. vol. 17(1): 11-17.
- Thermo Scientific DNA Purification Mini Kit Handbook. 2016. *Product Information Thermo Scientific GeneJet Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0791 #K0792*. California: Thermo Fisher Scientific inc.
- Triana, S. H. 2010. DNA fragment analysis of tiger grouper fish (*Epinephelus fuscoguttatus*) that are resistant and susceptible to *Vibrio alginolyticus* bacteria. *Journal of Basic Sciences*. vol. 11(1): 8-16.
- Universal DNA Purification Kit Handbook. 2021. Universal DNA purification kit for purification of DNA fragment from agarose gels and solution. www.Tiagen.com/en.
- Wahyuni, Tri. 2011. Ekspresi Gen CSF3SYN Dengan Promotor Konstitutif P_{GAP} Pada *Pichia pastoris*.
- [Skripsi]. Depok: Universitas Indonesia.