

**BEBERAPA MODIFIKASI PERLAKUAN UNTUK MENGEKSTRAKSI DNA
DARI BAHAN HERBARIUM**
(Several modifications of treatment in extracting DNA from herbarium material)

TOPIK HIDAYAT dan ANA RATNA WULAN

Jurusan Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudi 229
Bandung 40154

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk mengembangkan suatu metode isolasi DNA dari bahan herbarium. Bahan herbarium yang digunakan dalam penelitian ini adalah herbarium *Mangifera sp.* Pengembangan metode yang dilakukan meliputi perendaman awal bahan herbarium di dalam akuabides, dilakukan dalam skala kecil, dan penambahan Natrium Bisulfit ke dalam larutan CTAB. Karakter kuantitatif hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi DNA sampel herbarium *Mangifera sp.* H-1 dan H-2 secara berturut-turut adalah sebesar 610 ng/ μ l dan 555 ng/ μ l, dengan rasio 1,768 untuk H-1 dan 1,734 untuk H-2. Disamping itu, karakter kualitatif sampel menunjukkan bahwa ukuran fragmen DNA yang dihasilkan yaitu sepanjang \pm 21227 pasang basa (pb) dari kedua sampel H-1 dan H-2. Dengan demikian, metode yang dikembangkan dalam penelitian ini terbukti efektif menghasilkan DNA yang memadai untuk digunakan dalam proses selanjutnya.

ABSTRACT

We conducted a research to develop a method to extract DNA from herbarium material. The material that used in this research was herbarium of *Mangifera sp.* Development of the method included early soaking the herbarium materials in akuabides, conducting within a small scale, and adding of Natrium Bisulfit into CTAB solution. Quantitative character indicated that DNA concentration of samples H-1 and H-2 are 610 ng/ μ l (ratio 1,768) and 555 ng / μ l (ratio 1,734), respectively. Further, qualitative character of the samples showed that the size of DNA fragment yielded was \pm 21227 base pairs (bp) from both samples H-1 and H-2. Therefore, the modifications developed in this research have proven effectively yielding an adequate DNA amount for further analyses.

* Alamat korespondensi = topikhidayat@upi.edu

PENDAHULUAN

Perkembangan biologi molekuler yang pesat beberapa tahun belakangan ini membuat terobosan baru keilmuan terutama dalam berkembangnya penelitian-penelitian di bidang biologi secara umum, khususnya dalam sistematika tumbuhan. Penggunaan karakter molekuler, misalnya DNA, dalam berbagai penelitian sistematik/taksonomi tumbuhan telah dilakukan secara intensif (Topik, 2001b). Dengan satu harapan bahwa data molekuler dapat mendukung data morfologi yang sudah lebih dulu ada.

Penyiapan bahan DNA yang berasal dari sumber DNA tumbuhan, seperti daun, batang, dan bunga, merupakan tahap penting dalam menunjang keberhasilan teknik biologi molekuler secara keseluruhan (Topik, 2001a). DNA tumbuhan dapat diisolasi dari berbagai sumber DNA seperti bahan segar, bahan yang dibekukan, bahan yang dikeringkan dengan menggunakan silika gel dan bahan herbarium.

Kenyataan menunjukkan bahwa sering jumlah DNA hasil isolasi dari bahan segar tidak tersedia dalam jumlah banyak yang memadai untuk proses lanjutan. Selain itu, adanya kepunahan jenis tumbuhan tertentu menyebabkan kesulitan untuk memperoleh bahan segarnya. Kenyataan inilah yang membuat para peneliti sistematik tumbuhan menggunakan bahan herbarium sebagai sumber DNA alternatif yang mudah diperoleh (Topik & Wulan, 2001).

Sampai saat ini masih sedikit metode isolasi DNA dari bahan herbarium yang telah dikembangkan, walaupun ada, masih belum efektif (Topik & Wulan, 2001). Untuk itu perlu dilakukan lagi upaya pengembangan metode isolasi DNA dari bahan

herbarium. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan beberapa modifikasi perlakuan dalam isolasi DNA dari bahan herbarium.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini meliputi tahap-tahap utama, yaitu penyiapan bahan herbarium, isolasi DNA dengan metode CTAB (Foster & Twell, 1997) yang telah dimodifikasi, dan karakterisasi DNA dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif.

Dalam penelitian ini modifikasi yang dilakukan adalah (1) bahan herbarium direndam terlebih dahulu di dalam akuabides selama 24 jam; (2) isolasi dilakukan dalam skala kecil dengan menggunakan tabung Eppendorf 1,5 ml; (3) larutan CTAB ditambah Natrium Bisulfit.

1. Penyiapan Bahan Herbarium

- a. Bahan herbarium dari marga *Mangifera* dikoleksi dari Herbarium Bogoriense, Bogor.
- b. Beberapa helai daun herbarium direndam dalam akuabides selama 24 jam
(Modifikasi).

2. Isolasi DNA (*Small Scale*)-Modifikasi

- a. Mengeringkan daun dengan memasukkannya ke dalam oven selama 15 menit.
- b. Menimbang daun 30 -50 mg.
- c. Menggerus daun dalam bufer CTAB dengan Na-Bisulfit (**Modifikasi**) suhu 65⁰C.
- d. Mengambil 400µl ekstrak daun dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml steril.

- e. Diinkubasi pada suhu 65°C selama 90 menit. Sese kali tabung dibolak-balik.
- f. Tabung dibiarkan di suhu ruang agar suhunya turun. Selanjutnya ditambah 1 x volume kloroform : isoamil alkohol (24 : 1), dibolak-balik perlahan-lahan.
- g. Disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13000 rpm.
- h. Fase cair dari hasil sentrifugasi dicuplik, dan segera dipindahkan ke tabung Eppendorf 1,5 ml yang baru dan steril.
- i. Selanjutnya ditambah 600 μl isopropanol 100% dan dibolak-balik. Diinkubasi selama 1 minggu pada suhu -20°C dan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 13000 rpm.
- j. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Pelet (endapan) yang terbentuk dicuci dengan 800 μl etanol 70% + 0,2 M Na-Asetat dan disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 13000 rpm.
- k. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Pelet yang terbentuk dicuci dengan 100 μl etanol 70% dan disentrifugasi lagi selama 5 menit pada kecepatan 13000 rpm.
- l. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Pelet dikeringkan.
- m. Pelet DNA (berwarna putih) dilarutkan dalam air deion. Volume air deion tergantung kepada kepadatan pelet.
- n. Pelet DNA yang sudah larut disimpan di dalam lemari es (-20°C).

Karakterisasi DNA

Karakterisasi DNA dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Karakterisasi secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer. Sementara

itu karakterisasi secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan elektroforesis di atas gel agaros.

1. Secara Kuantitatif

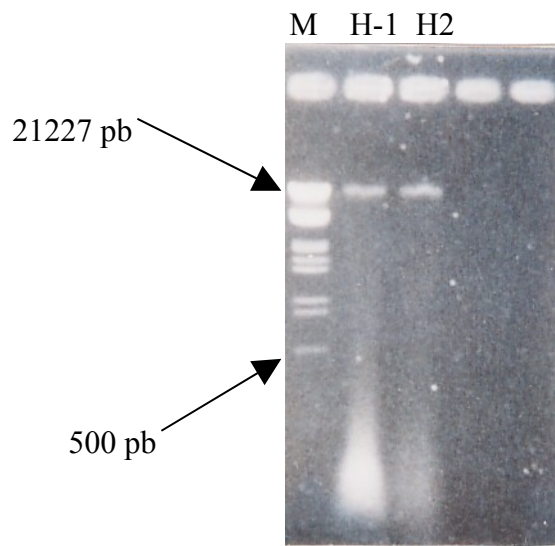
- a. Larutan DNA dimasukkan ke dalam tabung khusus.
- b. Selanjutnya dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer.
- c. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan Absorbansi 260 dan 280 (A_{260} dan A_{280}).
- d. Konsentrasi DNA dihitung dengan menggunakan rumus $A_{260} \times 50 \times$ faktor pengenceran. Karena dalam penelitian ini digunakan pengenceran 100x maka rumusnya menjadi $A_{260} \times 50 \times 100$ ng/ μ l. Rasio DNA dihitung dengan menggunakan rumus A_{260} / A_{280} .

2. Secara Kualitatif

- a. Membuat dan mencetak gel agaros 1%.
- b. Mencuplik 5 μ l sampel DNA dan dimasukkan ke dalam sumur pada gel agaros. Dalam tahap ini digunakan juga DNA standar (DNA yang dipotong dengan enzim *EcoRI* dan *HindIII*).
- c. Me"running" gel agaros dalam mesin elektroforesis selama 30 menit.
- d. Hasil "Running" gel dilihat di bawah sinar ultra violet (UV).
- e. Pita-pita DNA yang terbentuk didokumentasi dengan menggunakan kamera instans polaroid.

HASIL PENELITIAN DAN DISKUSI

Gambar 1 dan Tabel 1 menunjukkan karakter kualitatif dan kuantitatif DNA yang dihasilkan dari penelitian ini.



Gambar 1 Foto gel hasil isolasi DNA. H-1 dan H-2 adalah sampel bahan herbarium yang digunakan. M adalah DNA standar yang dipotong dengan enzim *EciRI* dan *HindIII*.

Tabel 1 Karakter kuantitatif hasil isolasi DNA dari bahan herbarium

Sampel	A260	A280	Konsentrasi (ng/ μl)	Rasio
H-1	0,122	0,069	610	1,768
H-2	0,111	0,064	555	1,734

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa karakter DNA yang dihasilkan, baik kuantitatif maupun kualitatif cukup baik untuk digunakan dalam proses selanjutnya, misalnya untuk amplifikasi. Konsentrasi DNA yang dihasilkan dari sampel H-1 dan H-2 berturut-turut adalah 610 ng/ul dan 555 ng/ul, dengan rasio 1,768 untuk H-1 dan 1,734 untuk H-2. Nilai rasio $\pm 1,750$ menandakan minimnya senyawa kontaminan yang terdapat dalam larutan DNA (Pharmacia Biothech, dalam Kusumawaty, 1999). Karakter kualitatif menunjukkan ukuran fragmen DNA yang dihasilkan yaitu sepanjang ± 21227 pasang basa (pb).

Dari hasil ini membuktikan bahwa modifikasi yang dikembangkan dalam penelitian ini cukup membawa hasil yang memuaskan. Apalagi ini dilakukan dalam skala kecil. Biasanya untuk isolasi DNA dari bahan herbarium selalu dilakukan dalam skala besar (Foster & Twell, 1997).

Sebagaimana disinggung sebelumnya, modifikasi yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi perendaman bahan herbarium di dalam akuabides, dilakukan dalam skala kecil dan pada larutan CTAB ditambahkan Natrium Bisulfit. Perendaman bahan herbarium di dalam akuabides dilakukan untuk melarutkan sublimat yang melindungi seluruh permukaan bahan herbarium. Sehingga mempermudah proses destruksi dinding sel.

Penambahan natrium Bisulfit ke dalam larutan CTAB dilakukan untuk melarutkan senyawa kontaminan seperti polisakarida dan senyawa metabolit sekunder (misalnya fenol) dapat mengganggu proses amplifikasi karena menghambat kerja enzim DNA polimerase.

Terdapat hal penting yang harus diperhatikan berkaitan dengan isolasi DNA dari bahan herbarium. Pertama, proses pengeringan menyebabkan terjadinya kerusakan pada isi sel yang berujung pada peristiwa fragmentasi DNA. Hal ini menyebabkan konsentrasi DNA yang dihasilkan tidak akan lebih banyak dibandingkan dengan konsentrasi DNA yang dihasilkan dari bahan segar (Topik & Wulan, 2001).

Kedua, waktu penyimpanan bahan herbarium (berkaitan dengan “usia” herbarium) sangat mempengaruhi konsentrasi DNA yang akan dihasilkan. Semakin tua “usia” herbarium maka semakin rendah konsentrasi DNA yang dihasilkan, dan sebaliknya.

KESIMPULAN

Metode isolasi DNA yang dikembangkan dalam penelitian ini, yang meliputi perendaman bahan herbarium di dalam akuabides, dilakukan dalam skala kecil dan pada larutan CTAB ditambah Natrium Bisulfit, terbukti efektif untuk mengisolasi DNA dari bahan herbarium. Secara kualitatif dan kuantitatif, DNA yang dihasilkan cukup memadai untuk digunakan dalam proses amplifikasi DNA. Konsentrasi DNA yang dihasilkan dari sampel H-1 dan H-2 berturut-turut adalah 610 ng/ul dan 555 ng/ul, dengan rasio 1,768 untuk H-1 dan 1,734 untuk H2. Karakter kualitatif

menunjukkan ukuran fragmen DNA yang dihasilkan sepanjang ± 21227 pasang basa (pb) pada kedua sampel, H-1 dan H-2.

DAFTAR PUSTAKA

Clark, M.S. (Ed). 1997. *Plant Molecular Biology: Laboratory Manual*. Heidelberg. Springer.

Foster, G.D. & Twell, D. (Ed). 1997. *Plant Gene Isolation*. John Wiley & Sons.

Kusumawati, D. 1999. *Isolasi dan Karakterisasi Mikrosatelit pada Jati (*Tectona grandis*)*. Bandung: ITB. Tesis Megister Biologi.

Topik H. 2001. *Isolasi, Amplifikasi dan Karakterisasi Gen 5,8S rRNA*. Bandung: Lembaga Penelitian UPI.

Topik H. 2001. *Studi Filogenetik Molekuler pada Anacardiaceae Berdasarkan Variasi Urutan daerah ITS*. Bandung: ITB Bandung. Tesis Megister Biologi.

Topik H. & Wulan, A.R. 2001. *Isolasi DNA dari Bahan Herbarium*. Bandung : Lembaga Penelitian UPI.