

Efektivitas Metode Ekstraksi DNA pada Daun Segar dan Kering dari Tanaman Obat

Effectiveness of DNA Extraction Method on Fresh and Dried Leaves of Medicinal Plants

Enny Rimita Sembiring^{1*)}, Rerenstradika Tizar Terryana¹, Yuliana Galih Dyan Anggraheni¹, Irmanida Batubara^{2,3}, Amalia Prihaningsih¹, Waras Nurcholish^{2,4}, Taopik Ridwan², Rita Andini¹, Chairunisa¹, Rikno Harmoko¹, Nurhamidar Rahman¹ dan Hani Fitriani¹

¹Pusat Riset Rekayasa Genetika, Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Kawasan Sains dan Teknologi Soekarno, Jl. Raya Bogor km. 46, Cibinong, Kab. Bogor, Jawa Barat 16911

²Pusat Studi Biofarmaka Tropika LPPM Institut Pertanian Bogor, Gedung CRC Lantai 2, Kawasan STP IPB, Kampus IPB Taman Kencana, Jl Taman Kencana No. 3, Bogor, Jawa Barat 16128, Indonesia

³Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat 16680, Indonesia

⁴Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat 16680, Indonesia

^{*)} Penulis untuk korespondensi E-mail: enrimita@gmail.com

Diajukan: 07 November 2022 **/Diterima:** 21 Juni 2023 **/Dipublikasi:** 29 Agustus 2023

ABSTRACT

*Medicinal plants are one of the plants that are often the target of molecular studies. In molecular studies, the extraction and purification of the DNA genome is the initial stage to determine the subsequent analysis. Therefore, the DNA extraction method is needed that can produce DNA with good quantity and quality. This study aimed to determine the effectiveness of the DNA extraction method from fresh and dried leaves of medicinal plants. A total of nine genotypes of medicinal plants used in this study were three genotypes of *Justicia gendarussa*, two genotypes of *Orthosiphon aristatus*, and one genotype of *Adenostemma lavenia*, *Adenostemma platyphyllum*, *Adenostemma madurense*, and *Curcuma xanthorrhiza* each. The DNA genome extraction method used was the CTAB method with several modifications. Investigation of the DNA genome from fresh and dried leaves showed good quantity and quality and could be amplified using RAPD primers and DNA barcodes.*

Keywords: CTAB method modifications; DNA extraction; dried leaves; fresh leaves

INTISARI

Tanaman obat merupakan salah satu tanaman yang sering menjadi target studi molekuler. Pada studi molekuler, ekstraksi dan purifikasi DNA genom merupakan tahap awal yang akan menentukan analisis selanjutnya. Oleh sebab itu, dibutuhkan metode ekstraksi DNA yang mampu menghasilkan DNA dengan kuantitas dan kualitas yang baik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas metode ekstraksi DNA dari daun segar maupun daun yang dikeringkan dari tanaman obat. Sebanyak sembilan genotip tanaman obat pada penelitian ini yaitu tiga genotip *Justicia gendarussa*, dua genotip *Orthosiphon aristatus*, dan masing-masing satu genotip *Adenostemma lavenia*, *Adenostemma platyphyllum*, *Adenostemma madurense*, dan *Curcuma xanthorrhiza*.

Metode ekstraksi DNA genom yang digunakan adalah metode CTAB dengan beberapa modifikasi. Hasil penelitian DNA genom dari daun segar dan kering menunjukkan kuantitas, kualitas, dan dapat teramplifikasi dengan baik menggunakan primer RAPD dan penanda DNA.

Kata kunci: daun kering; daun segar; ekstraksi DNA; modifikasi metode CTAB

PENDAHULUAN

Saat ini adalah era bioteknologi dimana DNA menjadi bagian penting untuk penelitian zaman modern (Jabeen et al. 2022). Tanaman obat merupakan salah satu tanaman yang sering menjadi target studi molekuler untuk identifikasi genotip, identifikasi sifat terkait dengan gen yang diinginkan, dan keragaman genetik. Isolasi dan pemurnian DNA merupakan langkah penting dalam teknik molekuler DNA. Teknik molekuler DNA umumnya digunakan dalam analisis reaksi berantai polimerase (PCR). Pengujian ini membutuhkan DNA genom dengan konsentrasi, kemurnian, dan kualitas yang baik (Aboul-Maaty & Oraby 2019).

Namun, ekstraksi DNA dari tanaman obat sulit karena kandungan metabolit sekunder yang tinggi seperti senyawa fenolik, polisakarida, protein, tanin, dan metabolit lainnya yang mempengaruhi kualitas dan kemurnian DNA yang diekstraksi. DNA yang terkontaminasi senyawa polisakarida dan polifenol menyebabkan DNA menjadi sulit larut dalam air atau larutan penyangga Tris-EDTA (Rezadoost, Kordrostami & Kumleh 2016). Adanya agen pengoksidasi kuat seperti senyawa polifenol dapat mengurangi kualitas dan kemurnian DNA yang diekstraksi (Esfandani-Bozchaloyi, Sheidai & Kalalegh 2019) dan menyebabkan DNA teroksidasi

(Siregar et al. 2021). Senyawa-senyawa ini terikat kuat dengan DNA selama proses ekstraksi. Menghilangkan kontaminan ini membutuhkan protokol yang rumit, memakan waktu, dan biaya (Aboul-Maaty & Oraby 2019). Ada 3 senyawa kontaminan utama hasil isolasi DNA dari tanaman yang dapat menyebabkan masalah signifikan pada pengujian PCR yaitu polifenol, polisakarida, dan RNA (Kanwal, Shahzad & Rahman 2021). Keberadaan metabolit sekunder juga merupakan inhibitor baik secara langsung maupun tidak langsung yang dapat mengganggu reaksi PCR (Abubakar et al. 2021).

Selain itu, tanaman yang digunakan sebagai materi penelitian seringkali terletak jauh dari laboratorium, sehingga memerlukan waktu beberapa hari hingga minggu untuk pengiriman. Pengiriman tanaman atau organ tanaman segar juga lebih sulit karena membutuhkan tempat, biaya, dan perlakuan khusus. Resiko tanaman mati atau organ tanaman mengalami kebusukan juga rentan selama perjalanan. Organ tanaman yang dikeringkan lebih memudahkan dalam pengiriman karena tidak membutuhkan tempat yang luas, perlakuan khusus, biaya lebih murah, dan lebih awet.

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi, pengukuran konsentrasi, pengujian kualitas dan kemurnian DNA, serta analisis PCR menggunakan primer RAPD dan penanda DNA pada tanaman obat. Beberapa protokol ekstraksi DNA telah berhasil digunakan untuk berbagai organ dan jenis tanaman seperti metode Doyle & Doyle (1990) diterapkan untuk mengekstraksi DNA dari berbagai tanaman dan buah-buahan; metode Lodhi et al. (1994) digunakan untuk mengisolasi anggur, apel, aprikot, persik, ceri, dan buah naga; metode Vroh Bi et al. (1996) diaplikasikan pada kapas, kopi, pohon karet, ubi kayu, pisang, dan delima (Sarkhosh et al. 2006). Berbagai metode CTAB yang dikembangkan oleh Doyle & Doyle dimodifikasi untuk mengisolasi DNA dari berbagai jenis dan jaringan tanaman untuk mendapatkan sampel DNA yang berkualitas, murni dengan konsentrasi tinggi (Abdel-Latif & Osman 2017; Aboul-Maaty & Oraby 2019; Bailey et al. 2022).

Protokol ekstraksi yang paling banyak digunakan saat ini merupakan metode konvensional *cetyl trimethylammonium bromide* (CTAB) yang dikembangkan oleh Doyle & Doyle. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode CTAB dengan beberapa modifikasi untuk mengekstraksi DNA dari tanaman obat. Modifikasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah penambahan polivinil piroolidon (PVP), peningkatan konsentrasi β -merkaptotanol dan EDTA. Selain itu, ekstraksi dilakukan 2 kali menggunakan fenol:kloroform:isoamil

alkohol dan kloroform:isoamil alkohol. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas metode ekstraksi DNA pada daun segar maupun daun kering dari tanaman obat.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Gedung Genomik, Kawasan Sains dan Teknologi Ir. Soekarno, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Cibinong pada bulan Juni hingga September 2022. Materi penelitian adalah tanaman obat yang ditanam di kebun Unit Konservasi Budidaya Biofarmaka (UKBB) Trop BRC LPPM-IPB, Kampus Dramaga IPB, Bogor. Sampel dalam penelitian ini adalah DNA hasil isolasi dari daun tanaman obat tersebut.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah larutan ekstraksi (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA pH 8,0; 4% PVP; dan 0,5% β -merkaptotanol), nitrogen cair, akuades, larutan fenol:kloroform:isoamil alkohol (25:24:1), larutan kloroform:isoamil alkohol (24:1), sodium asetat 3 M, isopropanol (Merck), etanol (Merck), tris-EDTA (TE) pH 8,0 (Thermo Scientific), *EcoRI* (Thermo Scientific), MyTaq™ HS Red Mix (Bioline), primer RAPD (1st BASE), penanda DNA (1st BASE), 1 Kb DNA ladder (Vivantis), *nuclease free water* (Thermo Scientific), tris-asetat-EDTA (TAE), RNase A (Thermo Scientific), agarosa (Vivantis), dan SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

Alat yang digunakan adalah tabung sentrifus, tabung mikro, mikropipet dan tips,

TissueLyser II (Qiagen), T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad), perangkat elektroforesis (Bio- Rad), *fluorescence and visible* G:Box (Syngene), NanoDrop One (Thermo Scientific), Thermo-Shaker PST-100HL (Biosan), refrigerator (Thermo Scientific), timbangan digital (Kern), timbangan analitik (Shimadzu), mikrosentrifus (Eppendorf dan Hitachi), mini sentrifus (Tomy), *microwave* (Panasonic), lemari asam (Duraline), vorteks (Corning), inkubator (Thermo Scientific), peralatan gelas, spatula, gunting, dan sarung tangan karet.

Metode Penelitian

Preparasi Sampel

Daun diambil dari kebun percobaan dan diberi 2 perlakuan yaitu segar dan kering. Perlakuan segar, selanjutnya disebut daun segar yaitu sebagian daun langsung disimpan di freezer -80 °C, lalu keesokan harinya diekstraksi. Perlakuan kering selanjutnya disebut daun kering adalah sebagian daun langsung diletakkan pada tempat terbuka pada suhu ruang (dikeringanginkan) selama 2 minggu, setelah itu diekstraksi. Daun yang diekstraksi adalah daun tua. Jumlah sampel dalam penelitian ini sebanyak 9 sampel daun segar dan 9 sampel daun kering.

Ekstraksi DNA

Sampel daun segar dan daun kering digunting kecil-kecil, lalu ditimbang masing-masing sebanyak 100 mg kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 mL. Daun segar dengan bantuan nitrogen cair dihaluskan menggunakan TissueLyser II

getaran 20 Hz selama 45 detik hingga menjadi serbuk halus. Daun kering tanpa bantuan nitrogen cair langsung dihaluskan dengan getaran 22 – 30 Hz selama 2 – 4 menit hingga menjadi serbuk halus. Larutan ekstraksi ditambahkan sebanyak 1 kali volume supernatan ke dalam serbuk daun, lalu divorteks. Sampel diinkubasi pada suhu 65 °C selama 1 jam sambil sesekali tabung mikro dibolak-balik. Larutan fenol:kloroform:isoamil alkohol (25:24:1) ditambahkan sebanyak 600 µL, lalu divorteks. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 25 °C. Supernatan dipindahkan ke tabung mikro yang baru. Larutan kloroform:isoamil alkohol (24:1) ditambahkan sebanyak 600 µL, lalu divorteks. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 25 °C. Supernatan dipindahkan ke tabung mikro yang baru. Selanjutnya, ditambahkan sodium asetat 3 M sebanyak 1/10 kali dan isopropanol sebanyak 1 kali volume supernatan, lalu tabung mikro dibolak-balik kemudian diinkubasi di freezer -80 °C selama semalam. Larutan disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C, lalu supernatan dibuang. Pelet DNA dicuci dengan etanol 70% sebanyak 500 µL. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C, lalu supernatan dibuang. Pencucian pelet DNA dilakukan sebanyak 2 kali. Pelet DNA dikeringanginkan. Pelet DNA dilarutkan dengan TE-RNase sebanyak 40

μ L. Larutan DNA diinkubasi di inkubator suhu 37 °C selama 1 jam lalu disimpan di freezer -20 °C.

Protokol isolasi DNA yang sering digunakan pada tanaman yaitu metode konvensional CTAB dengan modifikasi yang disesuaikan dengan karakteristik dan kandungan zat pada tanaman (Aboul-Maaty & Oraby 2019). Isolasi DNA dalam penelitian ini menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi dengan penambahan PVP sebanyak 4% dan peningkatan konsentrasi β -merkaptotanol dari 0,2% menjadi 0,5%. PVP adalah antioksidan yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap senyawa polifenol sehingga penggunaan PVP dengan konsentrasi tinggi efektif untuk memisahkannya dari DNA (Kanwal et al. 2021). β -merkaptotanol adalah senyawa pereduksi yang berfungsi mendenaturasi protein dengan memutus ikatan disulfida antara residu sistein dan menghilangkan senyawa polifenol dan tanin (Tiwari et al. 2017).

CTAB merupakan deterjen yang paling umum digunakan pada isolasi DNA dan digunakan bersama dengan NaCl, Tris-HCl, dan EDTA untuk membentuk larutan penyanggalisis. Larutan ini menghancurkan dinding, membran, dan inti sel sehingga DNA terlepas. Larutan ini juga menghambat enzim pendegradasi DNA (Aboul-Maaty & Oraby 2019).

Ekstraksi DNA dilakukan dua kali menggunakan campuran fenol:kloroform:isoamil alkohol dan kloroform:isoamil alkohol. Prinsip dasarnya adalah memisahkan DNA, RNA, dan protein berdasarkan kelarutannya. Selanjutnya, sodium asetat dan isopropanol digunakan untuk mengendapkan DNA (Gautam 2022).

Pengujian Kualitas dan Kuantitas DNA

DNA hasil isolasi diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan spektrofotometer NanoDrop One (Thermo Scientific). Konsentrasi DNA dihitung dalam satuan ng/ μ l, sedangkan kemurnian DNA berdasarkan perbandingan absorbansi 260/280 nm dan perbandingan absorbansi 260/230 nm. DNA diuji kualitasnya dengan teknik elektroforesis untuk melihat pola pita DNA genom. Pengecekan pita DNA genom dilakukan dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1%, larutan penyangga TAE 1x, tegangan 100 volt selama 45 menit. Gel agarosa yang telah diberi pewarna SYBR® Safe DNA Gel Stain diamati dibawah sinar ultraviolet (UV) menggunakan *fluorescence and visible G:Box*

Tabel 1. Tanaman yang digunakan dalam penelitian

No.	Nama Latin	Nama lokal	Kegunaan	Keterangan
1	<i>Adenostemma lavenia</i>	Legetan warak, rumputbabi, jotang leuweung, daun muka sakit	Anti-inflamasi, anti-hiperpigmentasi, Memperlambat penuaan, terapi kanker	-
2	<i>Adenostemma madurense</i>	Legetan warak, rumputbabi, jotang leuweung, daun muka sakit	Antibakteri, anti-inflamasi dan antioksidan	-
3	<i>Adenostemma platyphyllum</i>	Legetan warak, rumputbabi, jotang leuweung, daun muka sakit	Antibakteri, anti-inflamasi, antioksidan, mengobatidiare, disentri, luka bakar, mata bengkak	-
4	<i>Orthosiphon aristatus</i>	Kumis kucing, remujung, songkot koceng	Antihipertensi, Antibakteri, antivirus, anti-inflamasi, antioksidan	Warna bunga putih
5	<i>Orthosiphon aristatus</i>	Kumis kucing, remujung, songkot koceng		Warna bunga ungu
6	<i>Curcuma xanthorrhiza</i>	Temulawak, konenggede, temu labak	Anti-inflamasi, antibakteri, antioksidan, neuroprotektif, nefroprotektif, antitumor, hepatoprotektif, mengobati sakit perut, konstipasi, diare berdarah, disentri, radang sendi, demam anak-anak, hipotrigliseridemia, wasir, keputihan, rematik, erupsi kulit, menambah nafsu makan	-
7	<i>Justicia gendarussa</i>	Handarusa, gandarusa, tetean, puli, besi-besi, gandarisa	Anti-inflamasi, antibakteri, anti-HIV, antifungi, antioksidan, hepatoprotektif, mengobatirematik, anemia, demam, cacingan dan terapi kanker	Warna batang hijau
8	<i>Justicia gendarussa</i>	Handarusa, gandarusa, tetean, puli, besi-besi, gandarisa		Warna batang ungu
9	<i>Justicia gendarussa</i>	Handarusa, gandarusa, tetean, puli, besi-besi, gandarisa		Bentuk daun varigata



Gambar 1. Keragaman 9 jenis tanaman obat dari 4 genus

Pemotongan DNA dengan Enzim Restriksi

Polisakarida mengganggu beberapa reaksi enzimatik seperti polimerase, ligase, dan restriksi endonuklease. Polisakarida sulit dipisahkan dari DNA. Keberadaan polisakarida dalam larutan DNA menyebabkan konsistensi larutan DNA menjadi lengket dan kental (Lodhi et al. 1994). Untuk menguji kualitas DNA apakah mengandung polisakarida maka dilakukan pemotongan DNA dengan enzim restriksi. Enzim restriksi yang digunakan adalah *EcoR1* dengan konsentrasi 10 unit/ μ l. Reaksi pemotongan DNA adalah 2500 ng DNA sampel, 2 μ l larutan penyangga 10x, 10 unit enzim *EcoRI* dengan total reaksi 20 μ l. Campuran tersebut lalu divorteks dan diinkubasi di inkubator suhu 37 °C selama semalam. Hasil pemotongan DNA dicek dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1%, larutan penyangga TAE 1x, tegangan 75 volt selama 70 menit. Gel agarosa yang telah diberi pewarna SYBR® Safe DNA Gel Stain diamatidibawah sinar UV menggunakan *fluorescence and visible G:Box*.

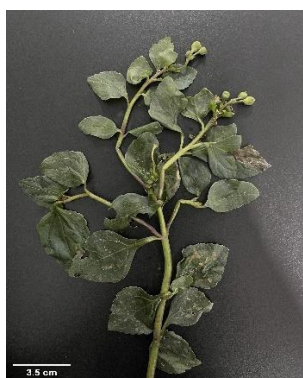
Amplifikasi DNA

Penanda DNA *trnH-psbA* digunakan untuk mengamplifikasi *O. aristatus* dan *Adenostemma* sp. (Tnah et al. 2019), sedangkan *J. gendarussa* dan *C. xanthorrhiza* di amplifikasi menggunakan primer RAPD OPC8 dan OPD7 (Syamkumar & Sasikumar 2007). Reaksi amplifikasi DNA adalah 100 ng DNA sampel, 0,8 – 1 pmol primer RAPD OPC8 (5'- TGGACCGGTG-3'); OPD7 (5'- GAAACGGGTG-3'); penanda DNA *trnH-psbA* (*psbA3* (5'- GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3') dan

trnH05 (5'- CGCGCATGGTGGATTCAATCC-3')), 6,25 μ l MyTaq™ HS Red Mix dengan total reaksi 10 – 12,5 μ l. Program PCR dilakukan 3 tahap yaitu tahap pertama denaturasi awal suhu 94 °C selama 3 menit; tahap kedua siklus PCR dengan total 30 siklus (primer RAPD) dan 39 siklus (penanda DNA) yaitu denaturasi 94 °C selama 30 detik, penempelan 38 °C selama 45 detik (primer RAPD), 55 °C selama 1 menit (penanda DNA), dan pemanjangan pada suhu 72 °C selama 1 menit; tahap ketiga yaitu pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit (primer RAPD) dan 7 menit (penanda DNA). Hasil PCR divisualisasi dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 2% (primer RAPD) dan 1% (penanda DNA), larutan penyangga elektroforesis TAE 1x, tegangan 75 volt selama 50 menit. Marker DNA yang digunakan 1 Kb DNA *ladder* (Vivantis). Selanjutnya, gel agarosa yang telah diberi pewarna SYBR® Safe DNA Gel Stain diamati dibawah sinar UV menggunakan *fluorescence and visible G:Box*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *Adenostemma* sp. mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, antrakuinon, steroid, triterpenoid, dan tanin (Fauzan et al. 2018; Moncayo et al. 2021). *O. aristatus* kaya akan senyawa polifenol, flavon, protein bioaktif, glikosida, minyak atsiri, dan kalium yang tinggi (Ashraf, Sultan & Adam 2018).



1



2



3

SEGAR

KERING



4



5



6

SEGAR

KERING



Gambar 2. Daun segar dan kering. 1. *A. lavenia*; 2. *A. madurensense*; 3. *A. platyphyllum*; 4. *O. aristatus* (bunga putih); 5. *O. aristatus* (bunga ungu); 6. *C. xanthorrhiza*; 7. *J. gendarussa* (batang hijau); 8. *J. gendarussa* (batang ungu); 9. *J. gendarussa* (daun varigata)

Tabel 2. Konsentrasi dan kemurnian daun segar dan kering

No	Sampel	Konsentrasi DNA (ng/μl)	Segar		Konsentrasi DNA (ng/μl)	Kering	
			Kemurnian			Kemurnian	
			A260/A280	A260/A230		A260/A280	A260/A230
1	<i>A. lavenia</i>	932,6	2,111	1,543	1613	1,847	1,176
2	<i>A. madurensense</i>	2117	2,145	2,053	820,2	1,962	1,566
3	<i>A. platyphyllum</i>	1052	2,016	1,129	918,6	1,822	1,244
4	<i>O. aristatus</i> (bunga putih)	1612	1,753	1,395	1348	1,776	1,385
5	<i>O. aristatus</i> (bunga ungu)	2368	2,062	2,085	1918	1,829	1,554
6	<i>C. xanthorrhiza</i>	1539	2,155	1,478	1675	1,988	1,931
7	<i>J. gendarussa</i> (batang hijau)	3175	2,082	2,315	2742	2,019	2,043
8	<i>J. gendarussa</i> (batang ungu)	3452	2,095	2,305	1969	2,032	1,946
9	<i>J. gendarussa</i> (daun varigata)	2793	2,127	2,226	1589	2,015	1,967

Eksplorasi terhadap kandungan kimia *C. xanthorrhiza* menunjukkan sebagian besar adalah senyawa terpen, fenolik seperti curcuminoid, minyak atsiri, dan metabolit sekunder lainnya (Rahmat, Lee & Kang 2021). Studi kimia *J. gendarussa* menunjukkan kandungan alkaloid, saponin, flavonoid, polifenol, minyak atsiri, tanin, dan steroid (Putri et al. 2020). Tanaman obat diketahui mengandung banyak zat berbeda dalam jumlah tinggi, sehingga kemungkinan tidak hanya satu metode isolasi DNA yang cocok untuk semua tanaman. Oleh karena itu, protokol isolasi DNA perlu dimodifikasi (Esfandani-Bozchaloyi et al. 2019).

Hasil optimasi ekstraksi menggunakan daun segar dan kering dengan metode CTAB yang dimodifikasi menunjukkan konsentrasi dan kemurnian yang baik (tabel 2). Konsentrasi DNA pada daun segar dari 9 tanaman obat yang diujikan berkisar antara 932,6 ng/μl (*A. lavenia*) – 3452 ng/μl (*J. gendarussa*, batang ungu), sedangkan pada daun kering berkisar antara 820,2 ng/μl (*A. madurensis*) – 2742 ng/μl (*J. gendarussa*, batang hijau). Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi DNA dari daun segar lebih tinggi daripada daun kering.

Rasio absorbansi 260/280 nm DNA pada daun segar berada pada rentang 1,753 (*O. aristatus*, bunga putih) – 2,155 (*C. xanthorrhiza*) dan daun kering pada rentang 1,776 (*O. aristatus*, bunga putih) – 2,032 (*J. gendarussa*, batang ungu). DNA dapat menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan senyawa fenolik dan protein yaitu asam amino

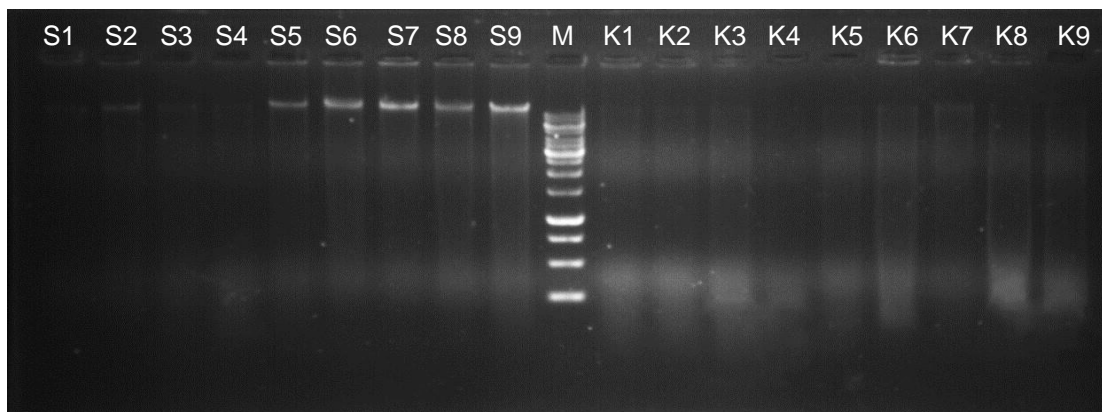
aromatik dapat menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 280 nm. Rasio absorbansi 260/280 nm yang menunjukkan kemurnian DNA yang baik adalah berkisar antara 1,8 – 2,0. Rasio absorbansi 260/280 nm dibawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi senyawa fenolik dan protein (Kanwal, Shahzad & Rahman 2021). Berdasarkan rasio absorbansi 260/280 nm pada penelitian ini menunjukkan bahwa DNA dari daun segar maupun kering secara umum memiliki kemurnian yang baik meskipun ada sampel yang dibawah 1,8 dan diatas 2,0.

Berdasarkan rasio absorbansi 260/230 nm DNA pada daun segar berada pada rentang 1,129 (*A. platyphyllum*) – 2,315 (*J. gendarussa*, batang hijau) dan daun kering pada rentang 1,176 (*A. lavenia*) – 2,043 (*J. gendarussa*, batang hijau). Rasio absorbansi 260/230 nm pada sampel DNA digunakan untuk menunjukkan adanya senyawa organik yang tidak diinginkan seperti trizol, fenol, guanidin HCl, guanidin tiosianat, dan senyawa organik lainnya (Youssef et al. 2015; Thermo Fisher Scientific 2017). Kemurnian DNA berdasarkan rasio absorbansi 260/230 nm yang dapat diterima secara umum berada dalam kisaran 2,0 – 2,2. Nilai yang lebih rendah dari 2,0 mengindikasikan kontaminasi sampel DNA dengan senyawa organik tersebut (Qamar, Khan & Arafah 2017). Pada penelitian ini, larutan ekstraksi menggunakan fenol dan EDTA, sehingga diduga senyawa tersebut berkontribusi mempengaruhi nilai rasio absorbansi 260/230 nm, meskipun residunya saja.

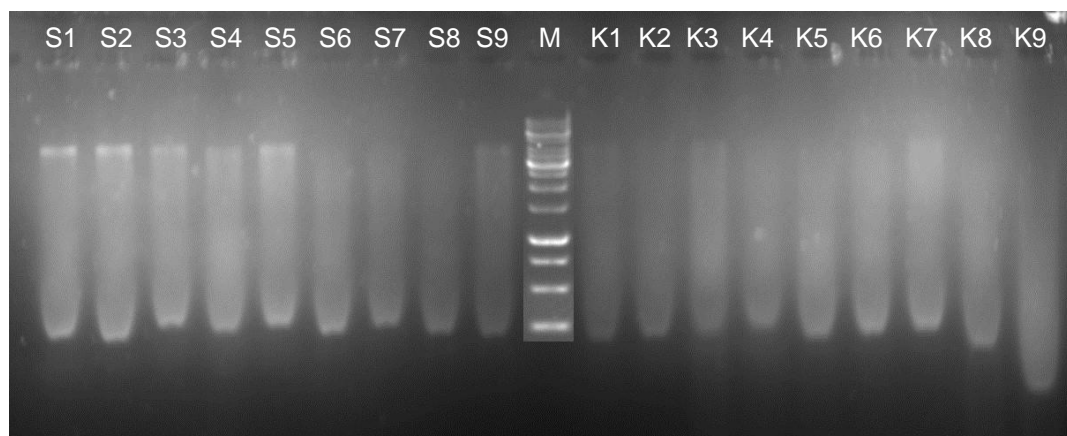
Pada elektroferogram hasil pengecekan genom DNA menunjukkan pita DNA 'smear' pada sampel daun kering. Hasil ini menunjukkan adanya fragmentasi atau degradasi DNA akibat proses pengeringan daun. Hal ini sesuai dengan laporan Abubakar et al. (2021) bahwa proses pengeringan dengan suhu yang tinggi dapat menyebabkan DNA terfragmentasi atau terdegradasi. Senada dengan temuan Siregar et al. (2021) menyebutkan proses pengeringan juga dapat menyebabkan DNA teroksidasi. Hal ini dapat disebabkan oleh proses pengeringan, lama pengeringan, dan kondisi pengeringan daun yang tidak tepat. Pita DNA 'smear' tersebut merupakan DNA yang terfragmentasi atau terdegradasi bukan senyawa kontaminan diperkuat oleh hasil spektrofotometer yang menunjukkan kemurnian DNA dari daun kering 1,776 – 2,032, dimana nilai tersebut masih berada pada rentang kemurnian DNA yang baik 1,8 – 2,0.

Indikasi kualitas DNA yang baik juga dapat diuji dengan cara dipotong dengan enzim restriksi. Senyawa yang diketahui dapat mengganggu kerja enzim adalah polisakarida. Polisakarida sulit dipisahkan dari DNA dan keberadaannya dapat mengganggu kerja enzim polimerase, ligase, maupun restriksi endonuklease.

Elektroferogram DNA hasil pemotongan dengan enzim *EcoR1* menunjukkan pola *smear* yang merata dari atas hingga ke bawah, seperti yang ditunjukkan pada gambar 4. Pola tersebut menunjukkan DNA dapat terpotong dengan baik. Hal ini menunjukkan tidak adanya polisakarida dalam sampel DNA. Hasil ini sesuai dengan laporan Lodhi et al. (1994) bahwa keberadaan polisakarida dapat mengganggu reaksi enzimatik sehingga DNA tidak terpotong. Pada sebagian pita DNA dari daun segar terlihat pada bagian atas ada yang masih tebal, belum terpotong seluruhnya. Kemungkinan karena konsentrasi DNA yang tinggi dan tidak terfragmentasi sehingga membutuhkan enzim restriksi yang lebih banyak agar dapat terpotong seluruhnya, berbeda dengan pita DNA dari daun kering yang telah banyak terfragmentasi. NaCl berfungsi untuk menghilangkan polisakarida. Konsentrasi 1,4 M NaCl dalam larutan ekstraksi pada penelitian ini berhasil menghilangkan polisakarida dengan meningkatkan kelarutannya sehingga tidak ikut mengendap bersama DNA pada saat proses presipitasi. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa konsentrasi NaCl 1 M hingga 2,5 M efektif dalam melarutkan polisakarida pada saat ekstraksi DNA (Lodhi et al. 1994).



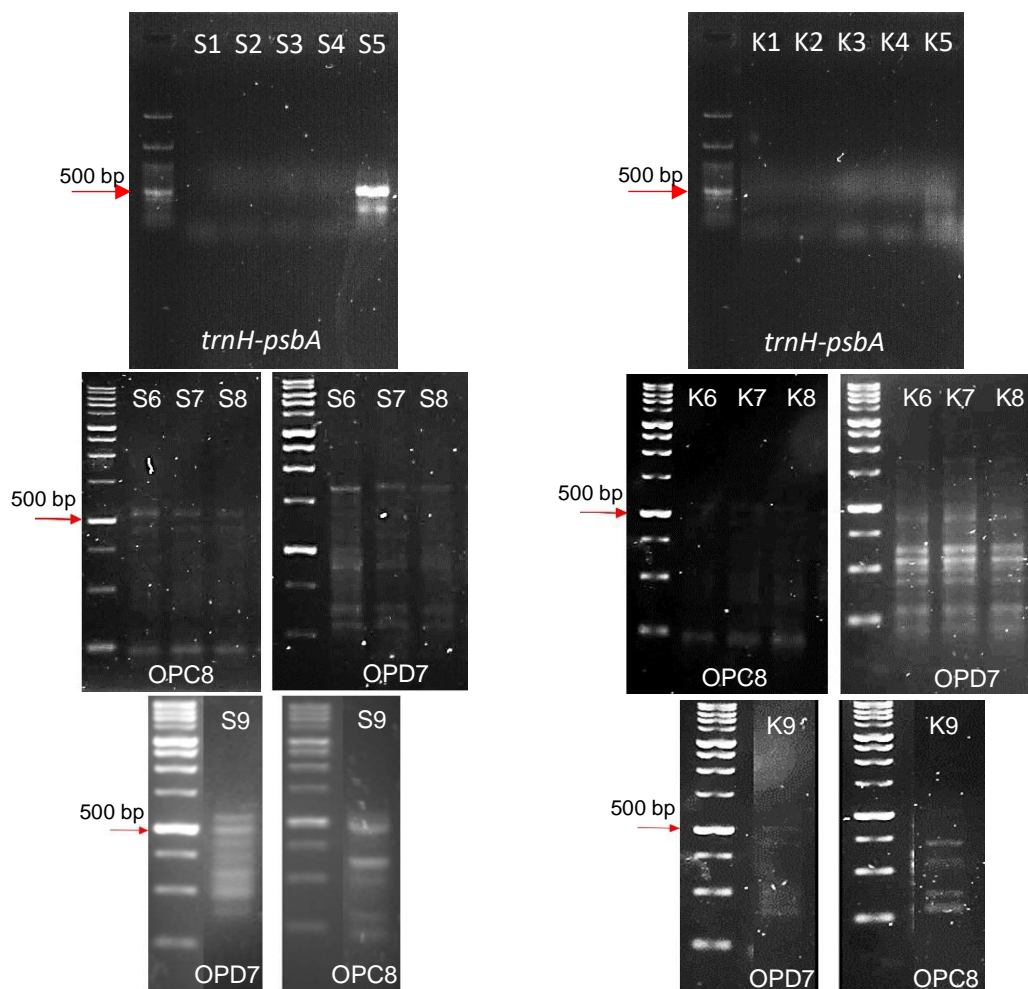
Gambar 3. Elektroforegram DNA genom hasil ekstraksi. Keterangan: S = daun segar; K = daun kering. 1. *O. aristatus* (bunga putih); 2. *O. aristatus* (bunga ungu); 3. *A. lavenia*; 4. *A. platyphyllum*; 5. *A. madurense*; 6. *J. gendarussa* (batang ungu); 7. *J. gendarussa* (daun varigata); 8. *J. gendarussa* (batang hijau); 9. *C. xanthorrhiza*.



Gambar 4. Elektroforegram DNA genom hasil ekstraksi yang dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI*. Keterangan: S = daun segar; K = daun kering. 1. *O. aristatus* (bunga putih); 2. *O. aristatus* (bunga ungu); 3. *A. lavenia*; 4. *A. platyphyllum*; 5. *A. madurense*; 6. *J. gendarussa* (batang ungu); 7. *J. gendarussa* (daun varigata); 8. *J. gendarussa* (batang hijau); 9. *C. xanthorrhiza*.

Faktor-faktor yang mempengaruhi optimalisasi amplifikasi DNA pada reaksi PCR adalah suhu penempelan (*annealing*) primer, kecocokan primer, konsentrasi enzim polimerase, dan jumlah siklus amplifikasi (Simarmata, Inorih & Haquarsum 2014). Konsentrasi DNA yang dibutuhkan untuk pengujian PCR berkisar antara 10 – 100 ng/ μ l. Konsentrasi DNA yang kecil akan menghasilkan pita DNA yang redup/buram

atau tidak jelas. Menurut Sasmito, Kurniawan, dan Muhimmah (2014) keberhasilan pengujian PCR dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu: 1) deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP), 2) Oligonukleotida primer, 3) cetakan DNA, 4) komposisi larutan penyangga, 5) jumlah siklus reaksi, 6) enzim yang digunakan, 7) faktor teknis, dan non teknis lainnya seperti kontaminasi



Gambar 5. Elektroforegram PCR DNA hasil ekstraksi dengan primer RAPD dan penanda DNA. S = daun segar; K = daun kering. 1. *O. aristatus* (bunga putih); 2. *O. aristatus* (bunga ungu); 3. *A. lavenia*; 4. *A. platyphyllum*; 5. *A. madurense*; 6. *J. gendarussa* (batang ungu); 7. *J. gendarussa* (daun varigata); 8. *J. gendarussa* (batang hijau); 9. *C. xanthorrhiza*.

Elektroforegram amplifikasi DNA menggunakan primer RAPD dan penanda DNA (Gambar 5) menunjukkan bahwa DNA dari daun segar maupun daun kering dapat teramplifikasi. DNA dari *O. aristatus* dan *Adenostemma* sp. diamplifikasi menggunakan penanda DNA *trnH-psbA*, sedangkan DNA dari *J. gendarussa* dan *C. xanthorrhiza* diamplifikasi menggunakan primer RAPD OPC8 dan OPD7. Pita DNA *O. aristatus* dan *Adenostemma* sp. terlihat buram dan kurang tajam. Hal ini menunjukkan penanda DNA yang digunakan kurang cocok untuk tanaman

tersebut sedangkan pita DNA *J. gendarussa* dan *C. xanthorrhiza* terlihat jelas dan tajam baik pada daun segar maupun kering. Hasil ini menunjukkan bahwa primer RAPD OPC8 dan OPD7 cocok untuk tanaman tersebut.

Hasil amplifikasi ini konsisten dengan hasil pengecekan dan pengujian kualitas DNA sebelumnya, dimana DNA yang diperoleh memiliki kualitas dan kemurnian yang baik. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya bahwa amplifikasi DNA dapat terjadi karena tidak adanya kontaminan (Lodhi et al. 1994). Berdasarkan data-data yang

diperoleh menunjukkan bahwa metode CTAB yang dimodifikasi dapat diaplikasikan pada sampel daun segar maupun daun kering dari tanaman *O. aristatus*, *Adenostemma* sp., *J. gendarussa*, dan *C. xanthorrhiza*. Bila sampel terletak jauh dan memerlukan waktu pengiriman sehingga daun perlu dikeringkan agar awet dan tidak busuk, maka metode ini dapat diandalkan untuk mengekstraksi DNA dari daun kering tanaman tersebut.

KESIMPULAN

Larutan ekstraksi CTAB yang dimodifikasi dengan penambahan PVP 4%, β -merkaptotanol 0,5%, dan ekstraksi 2 tahap menggunakan larutan fenol:kloroform:isoamil alkohol dan kloroform:isoamil alkohol berhasil mengisolasi DNA genom dari daun segar dan daun kering tanaman obat. Hasil pengujian DNA genom hasil ekstraksi dari daun segar dan kering secara kuantitas, kualitas, dan amplifikasi menunjukkan hasil yang baik dan sesuai harapan. Metode isolasi ini dapat diterapkan untuk melakukan analisis genetik terhadap tanaman *O. aristatus*, *Adenostemma* sp., *J. gendarussa*, dan *C. xanthorrhiza*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Ibu Dr. Ratih Asmana Ningrum, Kepala Pusat Riset Rekayasa Genetika yang telah memberikan kesempatan Magang Riset di Pusat Studi Biofarmaka Tropika LPPM-IPB.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Latif, A & Osman, G 2017, 'Comparison of Three Genomic DNA Extraction Methods to Obtain High DNA Quality from Maize', *Plant Methods*, vol. 13, no. 1, pp. 1–9, DOI:10.1186/S13007-016-0152-4/FIGURES/5.
- Aboul-Maaty, NAF & Oraby, HAS 2019, 'Extraction of High-Quality Genomic DNA from Different Plant Orders Applying A Modified CTAB-Based Method', *Bulletin of the National Research Centre*, vol. 43, no. 1, pp. 1–10, DOI:10.1186/S42269-019-0066-1.
- Abubakar, BM, Salleh, FM, Wagiran, A & Abba, M 2021, 'Comparative Evaluation of Different DNA Extraction Methods from *E. Longifolia* Herbal Medicinal Product', *eFood*, vol. 2, no. 1, pp. 21–26, DOI:10.2991/EFOOD.K.210202.001.
- Ashraf, K, Sultan, S & Adam, A 2018, '*Orthosiphon stamineus* Benth. is An Outstanding Food Medicine: Review of Phytochemical and Pharmacological Activities', *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, vol. 10, no. 3, p. 109, DOI:10.4103/JPBS.JPBS_253_17.
- Bailey, DW, Attia, Z, Reinert, S, Hulke, BS & Kane, NC 2022, 'Effective Strategies for Isolating DNA from Members of Asteraceae with High Concentrations of Secondary Metabolites', *Bio Techniques*, vol. 72, no. 3, pp. 85–89, DOI:10.2144/BTN-2021-0050.
- Doyle, JJ & Doyle, JE 1990, 'Isolation of Plant DNA from Fresh Plant Tissue', *Focus*, no. 12, pp. 13–15, DOI:10.1007/978-3-642-83962-7_18.
- Esfandani-Bozchaloyi, S, Sheidai, M & Kalalegh, MH 2019, 'Comparison of DNA Extraction Methods from Geranium (*Geraniaceae*)', *Acta Botanica Hungarica*, vol. 61, no. 3–4, pp.251–266, DOI:10.1556/034.61.2019.3-4.3.

- Fauzan, A, Praseptianga, D, Hartanto, R & Pujiasmanto, B 2018, 'Characterization of The Chemical Composition of *Adenostemma lavenia* (L.) Kuntze and *Adenostemma platyphyllum* Cass', in AN Al-Baarri (ed.), *Developing Sustainable Agriculture and Food Production, The 2nd International Symposium on Food and Agrobiodiversity*, Semarang, Indonesia, p. 012029, DOI:10.1088/1755-1315/102/1/012029.
- Gautam, A 2022, *DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts*, Springer Nature Switzerland AG, Switzerland, DOI:10.1007/978-3-030-94230-4_3, viewed 30 October 2022
- Jabeen, R, Habiba, U, Khalid, S & Shirazi, JH 2022 'Extraction and Comparison of Quality and Purity of DNA of Medicinal Plants by CTAB and Kit Method', *Journal of Contemporary Pharmacy*, vol. 6, no. 1, pp. 19–22, DOI:10.56770/JCP2022613.
- Kanwal, S, Shahzad, SJR & Rahman, SU 2021, 'Standardization of Different Protocols for Genomic DNA Isolation from *Phoenix dactylifera* L.', *Pakistan Journal of Botany*, vol. 31, no. 6, pp. 1665–1668.
- Lodhi, MA, Ye, GN, Weeden, NF & Reisch, BI 1994, 'A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* Species', *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 12, no. 1, pp. 6–13, DOI:10.1007/BF02668658.
- Moncayo, S, Cornejo, X, Castillo, J & Valdez, V 2021, 'Preliminary Phytochemical Screening for Antioxidant Activity and Content of Phenols and Flavonoids of 18 Species of Plants Native to Western Ecuador', *Trends in Phytochemical Research*, vol. 5, no. 2, pp. 93–104, DOI:10.30495/TPR.2021.1922658.1196.
- Putri, VA, Zulharmita, Asra, R & Chandra, B 2020, 'Overview of Phytochemical and Pharmacological of Gandarussa Extract (*Justicia Gandarussa* Burm)', *EAS Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 2, no. 5, pp. 180–185, DOI:10.36349/easjpp.2020.v02i05.003.
- Qamar, W, Khan, MR & Arafah, A 2017, 'Optimization of Conditions to Extract High Quality DNA for PCR Analysis from Whole Blood Using SDS-Proteinase K Method', *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 24, no. 7, pp. 1465–1469, DOI:10.1016/J.SJBS.2016.09.016.
- Rahmat, E, Lee, J & Kang, Y 2021, 'Javanese Turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.): Ethnobotany, Phytochemistry, Biotechnology, and Pharmacological Activities', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2021, pp. 1–15, DOI:10.1155/2021/9960813.
- Rezadoost, MH, Kordrostami, M & Kumleh, HH 2016, 'An Efficient Protocol for Isolation of Inhibitor-Free Nucleic Acids Even from Recalcitrant Plants', *3 Biotech*, vol. 6, no. 1, pp.1–7, DOI:10.1007/S13205-016-0375-0/TABLES/4.
- Sarkhosh, A, Zamani, Z, Fatahi, R & Ebadi, A 2006, 'RAPD Markers Reveal Polymorphism Among Some Iranian Pomegranate (*Punica granatum* L.) Genotypes', *Scientia Horticulturae*, vol. 111, no. 1, pp. 24–29, DOI:10.1016/J.SCIENTA.2006.07.033.
- Sasmito, D, Kurniawan, R & Muhimmah, I 2014, 'Karakteristik Primer pada Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Sekuensing DNA: Mini Review', in *Bioinformatika : Tantangan dan Prospeknya di Indonesia, Seminar Informatika Medis (SNIMed) V*, Yogyakarta, Indonesia, pp. 93–102, viewed 13 October 2022.

- Simarmata, M, Inorah, E & Haquarsum, EJ 2014, 'Optimalisasi PCR-RAPD dan Identifikasi Morfologi Tanaman Kumis Kucing di Provinsi Bengkulu', *Akta Agrosia*, vol. 17, no. 2, pp. 190–200, DOI: 10.31186/aa.17.2.190-200.
- Siregar, IZ, Ramdhani, MJ, Karlinasari, L, Adzkiya, U, Arifin, MZ & Dwiyantri, FG 2021, 'DNA Isolation Success Rates from Dried and Fresh Wood Samples of Selected 20 Tropical Wood Tree Species for Possible Consideration in Forensic Forestry', *Science & Justice*, vol. 61, no. 5, pp. 573–578, DOI:10.1016/J.SCIJUS.2021.07.002.
- Syamkumar, S & Sasikumar, B 2007, 'Molecular Marker Based Genetic Diversity Analysis of Curcuma species from India', *Scientia Horticulturae*, vol. 112, no. 2, pp. 235–241, DOI:10.1016/J.SCIJUS.2006.12.021.
- Thermo Fisher Scientific 2017, *NanoDrop One User Guide*, cat. no. 269-309102, ThermoFischer Scientific Inc., viewed 2 October 2022 *Material*.
<https://vetmed.illinois.edu/wpcontent/uploads/sites/19/2018/05/NanoDropOneUserManual.pdf>.
- Tiwari, S, Vijayaraje, R, Krishi, S, Vidyalaya, V, Sewak, R, Tomar, S, Bai, RL, Ahuja, A, Tomar, RS, & Tripathi, MK 2017, 'Modified Protocol for Plant Genomic DNA Isolation', *Indian Res. J. Genet. & Biotech*, vol. 9, no. 4, pp. 478–485.
- Tnah, LH, Lee, SL, Tan, AL, Lee, CT, Ng, KKS, Ng, CH, & Nurul F 2019, 'DNA Barcode Database of Common Herbal Plants in The Tropics: A Resource for Herbal Product Authentication', *Food Control*, vol. 95, pp. 318–326, DOI:10.1016/J.FOODCONT.2018.08.022.
- Vroh Bi, I, Harvengt, L, Chandelier, A, Mergeai, G & Du Jardin, P 1996, 'Improved RAPD Amplification of Recalcitrant Plant DNA by the Use of Activated Charcoal During DNA Extraction', *Plant Breeding*, vol. 115, no. 3, pp. 205–206, DOI:10.1111/J.1439-0523.1996.TB00905.X.
- Youssef, M, Valdez-Ojeda, RA, Valdez-Ojeda, R, Ku-Cauich, R, María, R & Medrano E-G 2015, 'Enhanced Protocol for Isolation of Plant Genomic DNA', *Article in Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, vol. 4, no. 2, pp. 2334–2412, DOI:10.15640/jaes.v4n2a20.